



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos



Sociedade Brasileira de
Reumatologia

gmap_unisinos

Tratado Brasileiro de **Biotecnologia em Saúde** DA BANCADA AO LEITO

ORGANIZADORES

Aline de Almeida Oliveira

Maria de Lourdes de Sousa Maia

Amanda de Miranda Marques

Valderilio Feijó Azevedo

Carla Lemos Gottgroy

Daniel Pacheco Lacerda




manole
editora

Tratado Brasileiro de
Biotecnologia
em Saúde
DA BANCADA AO LEITO





Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Tratado Brasileiro de **Biotecnologia em Saúde** DA BANCADA AO LEITO

ORGANIZADORES

Aline de Almeida Oliveira
Maria de Lourdes de Sousa Maia
Amanda de Miranda Marques
Valderilio Feijó Azevedo
Carla Lemos Gottgroy
Daniel Pacheco Lacerda



Copyright © 2024 Editora Manole Ltda., conforme contrato com a Fundação Oswaldo Cruz.

PROJETO GRÁFICO: Departamento Editorial da Editora Manole
EDITORAÇÃO ELETRÔNICA: Formato Estúdio
IMAGENS DO MIOLO: Fundação Oswaldo Cruz
CAPA: Ricardo Yoshiaki Nitta Rodrigues
IMAGENS DA CAPA: istock e freepik

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ
T698

Tratado brasileiro de biotecnologia em saúde : da bancada ao leito /
organizadores Aline de Almeida Oliveira ... [et al.]. - 1. ed. - Santana de
Parnaíba [SP] : Manole, 2024.

28 cm.

Inclui bibliografia e índice
ISBN 978-85-204-6126-6

1. Biotecnologia. I. Oliveira, Aline de Almeida.

CDD: 660.6

24-87868

CDU: 606



Meri Gleice Rodrigues de Souza - Bibliotecária - CRB-7/6439

1ª edição – 2024

Editora Manole Ltda.
Alameda América, 876 – Tamboré
06543-315 – Santana de Parnaíba – SP – Brasil
Tel.: (11) 4196-6000
www.manole.com.br | <https://atendimento.manole.com.br/>

Impresso no Brasil
Printed in Brazil

Organizadores

Aline de Almeida Oliveira

Bióloga com Mestrado e Doutorado em Oncologia. Atua em Bio-Manguinhos a 15 anos em diversas funções. Atualmente na Assessoria de Inteligência Competitiva (AICOM), Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Maria de Lourdes de Sousa Maia

Médica pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Mestre em Pesquisa Clínica pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz). Possui especializações em Saúde Pública; Planejamento em Saúde; e em Desenvolvimento de Recursos Humanos pela Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP/Fiocruz) e em Medicina Tropical pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Residência médica em Doenças Infecto-contagiosas. Tem experiência em Saúde Pública, com ênfase em estratégias para gerenciamento e alcance de metas, atuando principalmente nos seguintes temas: Pesquisa Clínica, Gestão, e Imunizações. Coordenou o Projeto Pela Reconquista das Altas Coberturas Vacinais (PRCV). Chefe do Departamento de Assuntos Médicos, Estudos Clínicos e Vigilância Pós-Registro (Deame) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Amanda de Miranda Marques

Coordenadora da Seção de Assuntos Médicos e Assistenciais (SEMAS) do Departamento de Assuntos Médicos, Estudos Clínicos e Vigilância Pós-registro (DEAME) de Bio-Manguinhos/Fiocruz. Graduação em Medicina pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Residência

em Clínica Médica pelo Hospital Federal da Lagoa/RJ e em Reumatologia pelo Hospital Federal dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro. Título de Especialista pela Sociedade Brasileira de Reumatologia. Membro da Comissão de Biotecnologia da Sociedade Brasileira de Reumatologia.

Valderilio Feijó Azevedo

Médico, com atuação em Clínica Médica e Reumatologia. Doutor em Ciências da Saúde. Professor Adjunto Doutor da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Principal investigador da Edumed Centro de Pesquisas Clínicas. Coordenador do Fórum Latino-Americano de Biossimilares.

Carla Lemos Gottgroy

Médica. Pós-graduação em Gestão e Administração em Saúde. Coordenadora Médica de Assuntos Médicos e Assistenciais da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Daniel Pacheco Lacerda

Doutor em Engenharia de Produção pelo Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Coppe/UFRJ). Pesquisador em Engenharia e Gestão da Produção, atuando como coordenador do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos) e do Grupo de Pesquisa em Modelagem para Aprendizagem da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (GMAP/UNSINOS). Vice-presidente da Associação Brasileira de Engenharia de Produção e bolsista de produtividade em pesquisa pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Autores

Adriana Danowski

Médica. Mestre em Reumatologia. Coordenadora do Ambulatório de Lúpus Eritematoso Sistêmico do Hospital Federal dos Servidores do Estado.

Adriana Ribas Andrade

Médica. Doutora em Ciências em Gastroenterologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Gastroenterologista e endoscopista com ênfase em desordens inflamatórias intestinais.

Akira Homma

Graduado em Veterinária pela Universidade Federal Fluminense, com especialização em Virologia. Doutor em Ciências pelo Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Assessor Científico Sênior de Bio-Manguinhos. Coordenou o Projeto Pela Reconquista das Altas Coberturas Vacinais (PRCV).

Aline de Almeida Oliveira

Bióloga com Mestrado e Doutorado em Oncologia. Atua em Bio-Manguinhos a 15 anos em diversas funções. Atualmente na Assessoria de Inteligência Competitiva (AICOM), Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Amanda de Miranda Marques

Coordenadora da Seção de Assuntos Médicos e Assistenciais (SEMAS) do Departamento de Assuntos Médicos, Estudos Clínicos e Vigilância Pós-registro (DEAME) de Bio-Manguinhos/Fiocruz. Graduação em Medicina pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Residência em Clínica Médica pelo Hospital Federal da Lagoa/RJ e em Reumatologia pelo Hospital Federal dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro. Título de Especialista pela Socie-

dade Brasileira de Reumatologia. Membro da Comissão de Biotecnologia da Sociedade Brasileira de Reumatologia.

Ana Carolina Magalhães Andrade

Graduada em Ciências Biológicas. Possui Doutorado em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Atua como Tecnologista em Saúde Pública.

Ana Carolina Ramos Guimarães

Graduada em Ciências Biológicas, Especialização em Bioinformática pelo Laboratório Nacional de Computação Científica. Possui Mestrado e Doutorado em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (IOC/Fiocruz). Pesquisadora titular no Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Computacional e Sistemas (IOC/Fiocruz).

Ana Paula Dinis Ano Bom

Graduada em Biomedicina. Doutora em Química Biológica. Tecnologista em Saúde Pública e Gestora do Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM) em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Andreia Cristina de Melo

Médica oncologista. PhD em Oncologia. Chefe da Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Nacional de Câncer (INCA), Oncologista do Grupo Oncoclínicas.

Anna Erika Vieira de Araújo

Farmácia-bioquímica. Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos. Doutora em Biologia Celular e Molecular (Instituto Oswaldo Cruz). Gerente de projeto na área de desenvolvimento tecnológico em Bio-Manguinhos.

Artur Roberto Couto

Atua como vice-diretor de gestão e desenvolvimento institucional em Bio-Manguinhos/Fiocruz. Coordena a implantação de duas novas áreas fabris, os *campis* Santa Cruz e Ceará. Mestre em Economia Empresarial, com especialização em Planejamento, Programação e Controle de Produção e em Administração Pública. Graduado em Administração de Empresas. Foi diretor de Bio-Manguinhos/Fiocruz de 2009 a 2017. Presidente da ALFOB, no seu segundo mandato, é membro do Conselho Científico da Hemobrás, membro do conselho de Administração do IBMP e Diretor Superintendente da FAP.

Beatriz de Castro Fialho

Graduada em Ciências Econômicas pelo Instituto de Economia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Doutora em Engenharia de Produção com ênfase em inovação pelo Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia (Coppe/UFRJ). Assessora de Inteligência Competitiva da Diretoria do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Bianca Waruar Paulo Lobo

Farmacêutica industrial. Doutora em Ciências Farmacêuticas. Analista Industrial de Hemoderivados e Biotecnologia da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás).

Carla F. Wolanski de Almeida

Farmacêutica bioquímica e industrial. Especialista em Imunologia. Mestre em Tecnologia em Imunobiológicos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. Tecnologista em Saúde Pública da Vice-diretoria de Produção de Biológicos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fiocruz (BM/Fiocruz).

Carla Lemos Gottgroy

Médica. Pós-graduação em Gestão e Administração em Saúde. Coordenadora Médica de Assuntos Médicos e Assistenciais da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Celia Menezes Cruz Marques

Médica. Pediatria e Especialização em Saúde Pública. Médica da Divisão de Vigilância em Saúde da Coordenadoria de Atenção Primária 3.2 da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro e Médica da Assessoria Clínica (Asclin) de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Charles Marques Lourenço

Médico. Doutor. Coordenador do Ambulatório de Neurogenética e Erros Inatos do Metabolismo da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP (FAMERP).

Consultor em Serviços de Educação Especializada do Grupo Pardini, nas áreas de Genética e Medicina Personalizada.

Christiane de Fátima Silva Marques

Bióloga. Mestre em Biologia Celular e Molecular. Doutora em Engenharia de Produção. Tecnologista em Saúde Pública no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e pesquisadora associada do Laboratório de Inovação em Tecnologias, Organizações e Serviços (LabrInTOS), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Assessora do vice-diretor de reativos para diagnóstico em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Cristina Possas

Doutora em Saúde Pública. Cientista social e pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz, onde coordenou o Núcleo de Estudos Especiais da Presidência (NEP) na gestão Sergio Arouca e os oito grupos técnicos da Comissão Nacional da Reforma Sanitária (CNRS). Foi coordenadora de programas de pós-graduação *stricto sensu* (mestrado, doutorado e pós-doutorado) na Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP/Fiocruz) – Saúde Pública – e no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz) – pesquisa clínica em doenças infecciosas. Pós-doutora em saúde internacional pela Universidade de Harvard, onde é *Takemi Fellow* e atuou por dez anos como *Visiting Scientist e Fulbright Scholar* no Harvard New Diseases Group. Pesquisadora e assessora sênior da Direção de BioManguinhos/Fiocruz e docente na instituição do Programa Multi-institucional em Nanobiossistemas.

Daniel André Ribeiro

Graduado em Química Industrial, com Mestrado e Doutorado em Engenharia Química (processos biotecnológicos). Especialista em processos biotecnológicos em Bio-Manguinhos/Fiocruz. Atua em projetos de desenvolvimento e produção de vacinas e biofármacos.

Daniel Pacheco Lacerda

Doutor em Engenharia de Produção pelo Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Coppe/UFRJ). Pesquisador em Engenharia e Gestão da Produção, atuando como coordenador do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos) e do Grupo de Pesquisa em Modelagem para Aprendizagem da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (GMAP/Unisinos). Vice-presidente da Associação Brasileira de Engenharia de Produção e bolsista de produtividade em pesquisa pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Elena Cristina Caride

Bióloga pela Universidade Santa Úrsula (USU). Mestre e Doutora em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Tecnologista em Saúde Pública em Bio-Manguinhos/Fiocruz. Gerente de Programa de Vacinas Virais da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Eliane Matos dos Santos

Médica, pediatra. Especialista em Infectologia Pediátrica. Doutora em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Médica da Seção de Assuntos Médicos e Assistenciais da DEAME, Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Elvira Alonso Lago

Médica. Residência de Pediatria e Gastropediatria. Analista de inovação em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Estevão Portela Nunes

Médico com foco em Doenças Infecciosas. Phd. Médico e Pesquisador do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz.

Fabiana Pompêo de Pina

Médica reumatologista, titulada pela Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR). Mestre em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Coordenadora do Ambulatório de Espondiloartrites do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (HC/FM/UFG). Professora do Departamento de Clínica Médica da FM/UFG e da PUC-Goiás. Atual Coordenadora da Comissão de Biotecnologia da SBR. Presidente da Sociedade Goiana de Reumatologia (2019-2020).

Felipe Leal da Silva

Ciências Biológicas. Pós-graduação em Farmácia Industrial. Coordenador da Divisão de Formulação de Vacinas e Biofármacos de Bio-Manguinhos (Fiocruz).

Flávia Caixeta Albuquerque

Graduada em Ciências Biológicas. Doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Gerente Sênior do Programa de Inovação Radical da Associação Brasileira da Indústria de Insumos Farmacêuticos (ABIQUIFI).

Gabriela dos Santos Esteves

Bióloga. Doutora em Ciências, área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Fiocruz. Tecnologista em Saúde Pública (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Gustavo Mendes Lima Santos

Farmacêutico. Mestre em Toxicologia pela Universidade Estadual de Londrina. Diretor de Assuntos Regulatórios, Qualidade e Ensaios Clínicos na Fundação Butantan.

Helaine Carneiro Capucho

Farmacêutica pela Universidade Federal de Ouro Preto. Doutora pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Professora Adjunta do Departamento de Farmácia da Universidade de Brasília (UnB).

Helena de Almeida Tupinambá

Graduada em Medicina e Residência de Clínica Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Residência de Reumatologia na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Especialista em Reumatologia. Médica reumatologista do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ.

Hugo Garcia Tonioli Defendi

Farmacêutico industrial. Mestre em Prospecção Tecnológica. Doutorando em Gestão da Inovação pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Gerente do Programa de Biofármacos, da Vice-Diretoria de Inovação de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Iralice Medeiros de Souza

Microbiologista. Doutora em Ciências – Microbiologia. Gerente do Projeto Desenvolvimento do Anticorpo Monoclonal Nivolumabe Biossimilar (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Ivna Alana F. B. da Silveira

Farmácia. Doutorado em Imunologia. Tecnologista Sênior em Saúde Pública.

José Procópio Moreno Senna

Farmacêutico, Doutor em Ciências – Biologia Celular e Molecular. Especialista em Saúde Pública -Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Lígia Tereza Bertolino

Graduada em Biologia. Mestre em Genética. Doutora em Biotecnologia e Biologia Molecular de Plantas. Especialista no Laboratório de Tecnologia Recombinante do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Luciana Gomes Pedro Brandão

Médica infectologista. Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa em

Imunização e Vigilância em Saúde do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz. Médica do Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais do INI-Fiocruz.

Maíra Peixoto Pellegrini

Microbiologista e Imunologista, Doutora em Ciências Morfológicas. Tecnologista em Saúde Pública em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Marcos da Silva Freire

Médico veterinário. Doutor em Ciências. Tecnologista em Saúde. Vice-coordenador Geral de Desenvolvimento Tecnológico do Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS/Fiocruz). Assessor Científico de Bio-Manguinhos/Fiocruz e Diretor de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

Maria de Lourdes de Sousa Maia

Médica pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Mestra em Pesquisa Clínica pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz). Possui especializações em Saúde Pública; Planejamento em Saúde; e em Desenvolvimento de Recursos Humanos pela Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP/Fiocruz) e em Medicina Tropical pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Residência médica em Doenças Infecto-contagiosas. Tem experiência em Saúde Pública, com ênfase em estratégias para gerenciamento e alcance de metas, atuando principalmente nos seguintes temas: Pesquisa Clínica, Gestão, e Imunizações. Coordenou o Projeto Pela Reconquista das Altas Coberturas Vacinais (PRCV). Chefe do Departamento de Assuntos Médicos, Estudos Clínicos e Vigilância Pós-Registro (Deame) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Maria de Lourdes M. Leal

Engenheira química. Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tecnologista em Saúde Pública Sênior lotada no Laboratório de Tecnologia Recombinante em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Mariana Torres Mazzi

Médica. Residência em Hematologia e Transplante de Medula Óssea e Doutoranda em Terapia Gênica e Celular. Consultora Médica em Novas Tecnologias na DEAME/VDINV - Bio-Manguinhos (Fiocruz).

Martín Bonamino

Biomédico. Doutor em Química Biológica. Pesquisador do Instituto Nacional de Câncer (Inca) e Especialista da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Miguel Angel de la O Herrera

Doutor em Engenharia Química e Gerente de Parceria para o Desenvolvimento Produtivo (PDP).

Nayara Salgado Carvalho

Gastroenterologista pela Federação Brasileira de Gastroenterologia (FBG). Especialista em Doenças Funcionais e Manometria pelo Hospital Israelita Albert Einstein, SP. Médica do Núcleo de Fisiologia Gastrointestinal (Nufig) do Departamento de Endoscopia do Hospital Israelita Albert Einstein, SP. Professora da Pós-graduação de Doenças Funcionais e Manometria do Hospital Israelita Albert Einstein, SP. Doutora em Ciências em Gastrenterologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Membro do Grupo de Doenças Inflamatórias Intestinais do Brasil (GEDIIB).

Patrícia Alvarez

Graduada em Biologia Modalidade Genética. Mestre em Química Biológica e Doutora em Genética pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Especialista em Ciência, Tecnologia, Produção e Inovação em Saúde Pública – Fiocruz.

Patrícia Cristina da Costa Neves

Biomédica. Mestra em Biologia Parasitária. Doutora em Biologia Celular e Molecular. Líder científico e gerente do Projeto de Implantação da Plataforma de Produtos RNA na Vice-Diretoria de Inovação de Bio-Manguinhos.

Patrícia Mouta Nunes de Oliveira

Médica, formada pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Participa da Equipe de Farmacovigilância de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Paulo Roberto Takey

Farmacêutico. Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Responsável pela farmacovigilância e tecnologia do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Raouf Emile Gerhard Sykora

Médico veterinário. Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos. Responsável pela Tecnovigilância do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Renata Saraiva Pedro

Graduação em Farmácia. Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas pelo Instituto Nacional de Infecologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz). Responsável pela Farmacovigilância do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Ricardo da Costa Lopes

Químico. Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos (IOC/Fiocruz/Bio-Manguinhos), MBA em Gestão de Imunobiológicos (COPPE/UFRJ). Chefe de Departamento de Processamento Final de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos /Fiocruz.

Ricardo Machado Xavier

Médico, atua em Reumatologia. Doutor em Imunologia pela Universidade de Shimane, Japão. Professor Titular da Faculdade de Medicina na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Chefe do Serviço de Diagnóstico Laboratorial no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rosane Cuber Guimarães

Graduada em Ciências Biológicas Modalidade Médica. Mestre em Bioquímica e Doutora em Vigilância Sanitária. Professora do Programa de Pós-graduação de Bio-Manguinhos na Fundação Oswaldo Cruz e Vice-Diretora de Qualidade do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Sheila Barros Matsuoka

Farmacêutica. Especialista em Vigilância Sanitária, Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz. Doutoranda em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Gerente de assuntos regulatórios de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Sotiris Missailidis

Biólogo. Post-doctorate in Pharmaceutical Sciences and Molecular Biology at the Universities of Nottingham and Cambridge. Vice-Diretor de Inovação de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Stephen Doral Stefani

Médico oncologista. Especialista em Economia da Saúde. Presidente do Capítulo Brasil da International Society of Pharmacoeconomics and Outcome Research (ISPOR).

Tatiana Guimarães de Noronha

Médica pediatra com especialização em doenças infecciosas e parasitárias. Mestre em Saúde Pública e Doutora em

Epidemiologia em Saúde Pública. Pesquisadora de Bio-Manguinhos/Fiocruz, responsável pela Divisão Médico-Científica e de Gerenciamento de Dados. Professora Adjunta de Pediatria e Permanente da Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Tatiana Martins Tilli

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Mestrado em Atenção em Câncer pelo Instituto Nacional de Câncer e Doutorado em Atenção em Câncer pelo Instituto Nacional de Câncer. Pós-Doutora em Oncologia. Pesquisadora em Saúde Pública na Fundação Oswaldo Cruz. Coordena a Plataforma de Oncologia Translacional no Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS) e Chefe Substituta no Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental, no Instituto Oswaldo Cruz. Faz parte do Comitê Científico da Rede Fio-Câncer e do Comitê Gestor do Centro Integrado de Pesquisa Oncológica Translacional (CIPOT). Atualmente, é Jovem Cientista do Nosso Estado – FAPERJ

Thiago Rennó dos Mares Guia

Doutorado em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais e Vice-Presidente Executivo do Bionovis – Companhia Brasileira de Biotecnologia Farmacêutica.

Valderilio Feijó Azevedo

Médico, com atuação em Clínica Médica e Reumatologia. Doutor em Ciências da Saúde. Professor Adjunto Doutor da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Principal investigador da Edumed Centro de Pesquisas Clínicas. Coordenador do Fórum Latino-Americano de Biossimilares.

Verônica Goulart Moreira

Graduada e Mestre em Medicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Chefe da Divisão de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Câncer.

Wagner José Tenório dos Santos

Biomédico pelo Centro Universitário Tabosa de Almeida ASCES/UNITA. Mestre e Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Pernambuco. Pós-doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde no Instituto Aggeu Magalhães. Analista de projetos biomédicos no Laboratório de tecnologia diagnóstica (LATD). Gerente de projeto para diagnósticos remotos no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz-RJ).

Sumário

Prefácio xix

Mauricio Zuma Medeiros

Apresentação xxi

*Aline de Almeida Oliveira, Maria de Lourdes de Sousa Maia,
Amanda de Miranda Marques, Carla Lemos Gottgroy,
Valderilio Feijó Azevedo, Daniel Pacheco Lacerda*

Parte I – Visão geral

1. Visão geral da biotecnologia aplicada à saúde: desafios para o Brasil 2

*Akira Homma, Thiago Rennó dos Mares Guia,
Artur Roberto Couto, Cristina Possas*

1.1 Introdução 2

1.2 A moderna biotecnologia 3

1.3 Biotecnologia no mundo 4

1.4 A biotecnologia no Brasil 8

1.5 O Caso Biobrás, iniciativa privada pioneira em biotecnologia farmacêutica no Brasil e na América Latina 15

1.6 A história da dimensão regulatória da biotecnologia no Brasil 19

1.6.1 CTNBio e a biossegurança: arcabouço institucional e marco legal na avaliação de produtos biotecnológicos com OGM 19

1.6.1.1 Descrição do arcabouço institucional e do marco legal 20

1.6.2 CTNBio: marco legal 20

1.7 Considerações finais 22

Referências 22

2. Fundamentos da biotecnologia: tecnologia do DNA recombinante e sistemas de expressão 24

*Daniel André Ribeiro, Máira Peixoto Pellegrini,
Gabriela dos Santos Esteves, Lígia Tereza Bertolino*

2.1 DNA recombinante e sistemas de expressão: uma contextualização 24

2.2 Clonagem e expressão 24

2.3 Sistemas de expressão mais utilizados para proteínas terapêuticas 26

2.3.1 Sistema de expressão bacteriano 26

2.3.2 Sistema de expressão de leveduras 31

2.3.3 Sistema de expressão de células de inseto 31

2.3.4 Sistema de expressão de células de mamífero 32

2.3.5 Sistema de expressão de vegetais 33

2.3.5.1 Plantas transgênicas e expressão transiente 34

2.3.5.2 Células vegetais 35

2.3.6 Animais transgênicos 36

2.4 Considerações finais 37

Referências 39

Parte II – Biotecnologia para vacinas

3. Introdução à biotecnologia em vacinas 42

*Elena Cristina Caride, Ivna Alana F. B. da Silveira,
Akira Homma*

3.1 Biotecnologia em vacinas: uma contextualização 42

3.2 Aspectos históricos sobre a descoberta e utilização das vacinas 43

3.2.1 História das vacinas no Brasil 49

3.3 Plataformas vacinais, tipos de vacinas e suas características 52

3.3.1 1ª geração: plataformas clássicas 55

3.3.2 2ª geração: plataformas biotecnológicas 55

3.3.3 3ª geração: plataformas inovadoras 55

- 3.4 Pesquisa, desenvolvimento e produção de vacinas 56
- 3.5 O paradigma criado pela pandemia de Covid-19 61
- 3.6 Desafios nacionais para o desenvolvimento de vacinas e as contribuições para o complexo econômico industrial da saúde 62
- 3.7 Considerações finais 63
- Referências 63

4. Vacinas virais 65

Elvira Alonso Lago, Eliane Matos dos Santos, Elena Cristina Caride, Luciana Gomes Pedro Brandão, Celia Menezes Cruz Marques

- 4.1 Vacinas virais: uma contextualização 65
- 4.2 Classes de vacinas virais 65
 - 4.2.1 Vacinas atenuadas 67
 - 4.2.2 Vacinas inativadas 67
 - 4.2.3 Vacinas de subunidade 68
 - 4.2.4 Vacinas de vetores virais 69
 - 4.2.5 Vacinas de ácidos nucleicos 71
- 4.3 Aplicações clínicas e recomendações sobre vacinas virais 72
 - 4.3.1 Febre amarela 72
 - 4.3.2 Influenza 74
 - 4.3.3 Varicela 75
 - 4.3.4 Sarampo 76
 - 4.3.5 Caxumba 76
 - 4.3.6 Rubéola 76
 - 4.3.7 Vacina para sarampo, caxumba e rubéola 76
 - 4.3.8 Hepatite A 77
 - 4.3.9 Hepatite B 77
 - 4.3.10 Poliomielite 78
 - 4.3.11 Papilomavírus humano 80
 - 4.3.12 Herpes-zóster 81
 - 4.3.13 Covid-19 81
 - 4.3.14 Dengue 81
 - 4.3.15 *Monkeypox* 82
 - 4.3.16 Rotavírus 83
 - 4.3.17 Ebola 84
 - 4.3.18 Raiva 84
- 4.4 Considerações finais 85
- Referências 85

5. Vacinas bacterianas 89

Ívna Alana F. B. da Silveira, Tatiana Guimarães de Noronha, Luciana Gomes Pedro Brandão, José Procópio Moreno Senna

- 5.1 Tipos de vacinas bacterianas 89
 - 5.1.1 Vacinas atenuadas (células inteiras vivas) 89

- 5.1.2 Vacinas inativadas (células inteiras mortas) 90
- 5.1.3 Vacinas de subunidades baseadas em proteínas nativas 91
- 5.1.4 Vacinas de subunidades baseadas em anatoxinas 91
- 5.1.5 Vacinas de subunidades baseadas em polissacarídeos capsulares 92
 - 5.1.5.1 Vacinas polissacarídicas 92
 - 5.1.5.2 Vacinas conjugadas (polissacarídeo – proteína carreadora) 93
- 5.1.6 Vacinas de subunidades baseadas em vesícula de membrana externa (VME) 96
- 5.1.7 Vacinas para bactérias multirresistentes 97
 - 5.1.7.1 Classificação das vacinas contra bactérias RAM 98
 - 5.1.7.2 Vacinas virais e incidência de infecções bacterianas RAM 100
- 5.1.8 Vacinas de vetores bacterianos 100
 - 5.1.8.1 Vetores bacterianos atenuados por modificações genéticas 100
 - 5.1.8.2 Vetores bacterianos baseados em bactérias não patogênicas (bactérias do ácido láctico) 100
 - 5.1.8.3 Vetores bacterianos baseados em BCG 100
- 5.2 O processo de desenvolvimento e produção de vacinas bacterianas e a presença da biotecnologia neste contexto 101
- 5.3 Aplicações clínicas e recomendações sobre vacinas bacterianas 102
 - 5.3.1 Tuberculose 103
 - 5.3.1.1 Vacina BCG 103
 - 5.3.2 Difteria 104
 - 5.3.2.1 Vacina dupla bacteriana – contra difteria e tétano (DT ou dT) 104
 - 5.3.3 Tétano 104
 - 5.3.4 Coqueluche 105
 - 5.3.4.1 Vacina DTP 105
 - 5.3.4.2 Vacina DTPa 105
 - 5.3.4.3 Vacina dTpa 105
 - 5.3.5 Doença invasiva causada por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) 106
 - 5.3.5.1 Vacina penta (DTP + Hib + hepatite B) 106
 - 5.3.5.2 Vacina *Haemophilus influenzae* tipo b 106
 - 5.3.6 Doença meningocócica 106
 - 5.3.6.1 Vacina meningocócica C conjugada 107
 - 5.3.6.2 Meningocócica ACWY conjugada 107
 - 5.3.7 Doença invasiva causada por pneumococo 107

- 5.3.7.1 Vacina pneumocócica conjugada 10-valente (Pneumo 10) 107
- 5.3.7.2 Vacina pneumocócica conjugada 13-valente (Pneumo 13) 107
- 5.3.7.3 Vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente 108
- 5.3.8 Febre tifoide 108
- 5.4 O papel das vacinas bacterianas para o CEIS 109
- 5.5 Considerações finais 110
- Referências 110

Parte III – Biotecnologia para testes de diagnósticos

6. Reativos para diagnóstico de doenças infecciosas 114

Christiane de Fátima Silva Marques, Wagner José Tenório dos Santos, Patrícia Alvarez, Ricardo Machado Xavier, Estevão Portela Nunes, Raouf Emile Gerhard Sykora, Marcos da Silva Freire

- 6.1 Exames laboratoriais e testes para diagnóstico: uma contextualização 114
- 6.2 Biotecnologia em testes para diagnóstico: definição e histórico 116
- 6.3 Plataformas tecnológicas para diagnóstico de doenças infecciosas 118
 - 6.3.1 Diagnóstico parasitológico 119
 - 6.3.2 Imunodiagnóstico 120
 - 6.3.2.1 Testes laboratoriais 120
 - 6.3.2.2 Testes rápidos 124
 - 6.3.3 Diagnóstico molecular 127
 - 6.3.4 PCR em tempo real 128
 - 6.3.5 Amplificação isotérmica 129
 - 6.3.6 Microarranjos sólidos e líquidos 129
 - 6.3.7 *Point-of-care* (POC) molecular 129
 - 6.3.8 A plataforma MPOC pode evitar atrasos no diagnóstico correto para o paciente e para o médico, auxiliando diretamente na condução clínica e manejo dos pacientes (PCR digital) 130
 - 6.3.9 Sequenciamento e NGS 130
- 6.4 Tendências tecnológicas 131
- 6.5 Desenvolvimento, produção e controle de qualidade de reativos para diagnóstico 134
 - 6.5.1 Desenvolvimento e produção de reativos em Bio-Manguinhos/Fiocruz 136
 - 6.5.2 Implementação de testes para diagnóstico 137
 - 6.5.3 Tecnovigilância 137

- 6.6 O Papel dos Reativos para Diagnóstico no CEIS 139
- 6.7 Considerações finais 140
- Agradecimentos 141
- Referências 141

7. Biomarcadores para decisão terapêutica 145

Tatiana Martins Tilli, Nayara Salgado Carvalho, Adriana Ribas Andrade, Adriana Danowski, Verônica Goulart Moreira

- 7.1 Biomarcadores 145
 - 7.1.1 Biomarcadores de diagnóstico 147
 - 7.1.2 Biomarcadores de prognóstico 147
 - 7.1.3 Biomarcadores preditivos 147
 - 7.1.4 Biomarcadores de resposta 148
 - 7.1.4.1 Biomarcadores de segurança 148
 - 7.1.4.2 Biomarcadores farmacodinâmicos 149
 - 7.1.4.3 Biomarcadores de resposta de eficácia ou *endpoints* substitutos 150
- 7.2 Biomarcadores em oncologia 150
 - 7.2.1 Receptor de estrogênio (RE) 151
 - 7.2.2 HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) 151
 - 7.2.3 Antígeno carcinoembrionário 152
 - 7.2.4 NTRK (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*) 152
 - 7.2.5 PD-1 (*programmed cell death 1*)/PDL-1 (*programmed-death ligand 1*) 152
- 7.3 Biomarcadores nas doenças inflamatórias intestinais 153
 - 7.3.1 Neoplasias 155
 - 7.3.2 Infecções 155
 - 7.3.3 Uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) 156
 - 7.3.4 Doenças ácido-relacionadas e úlcera péptica 156
 - 7.3.5 Fibrose cística 156
 - 7.3.6 Doença gastrointestinal enxerto vs. hospedeiro (GvHD) 156
- 7.4 A importância dos biomarcadores na reumatologia 157
 - 7.4.1 Artrite reumatoide 157
 - 7.4.2 Biomarcadores para diagnóstico e prognóstico 157
 - 7.4.3 Biomarcadores para monitoramento da doença 157
 - 7.4.4 Biomarcadores preditivos de resposta terapêutica 158
 - 7.4.5 Lúpus eritematoso sistêmico 158
- 7.5 Considerações finais 159
- Referências 160

Parte IV – Biotecnologia em biofármacos

8. Introdução da biotecnologia em biofármacos 166

Aline de Almeida Oliveira, Carla Lemos Gottgroy, Amanda de Miranda Marques

- 8.1 Biotecnologia em biofármacos: definição e histórico 166
- 8.2 Classificações de biofármacos 167
 - 8.2.1 Proteínas recombinantes 169
 - 8.2.2 Anticorpos monoclonais terapêuticos 170
 - 8.2.3 Terapias baseadas em ácidos nucleicos 173
 - 8.2.4 Terapia celular 173
- 8.3 Processo de produção e desenvolvimento (P&D) de biofármacos 174
 - 8.3.1 Fase de descoberta de biofármacos 175
 - 8.3.2 Fase pré-clínica 175
 - 8.3.3 Fase de desenvolvimento clínico 177
- 8.4 Aspectos político-estruturais relacionados à produção e desenvolvimento para acesso a biofármacos 178
- 8.5 Considerações finais 181
- Referências 182

9. Proteínas recombinantes 184

Maíra Peixoto Pellegrini, Daniel André Ribeiro, Ana Carolina Magalhães Andrade, Helena de Almeida Tupinambá, Carla Lemos Gottgroy, Amanda de Miranda Marques

- 9.1 Proteínas recombinantes: uma contextualização 184
- 9.2 Biofármacos: definições, aspectos estruturais e de fabricação 185
- 9.3 Principais classes de proteínas recombinantes de uso terapêutico 189
 - 9.3.1 Fatores de coagulação sanguínea 190
 - 9.3.2 Hormônios 190
 - 9.3.3 Citocinas 190
 - 9.3.4 Enzimas 192
 - 9.3.5 Proteínas de fusão 197
 - 9.3.6 Anticorpos monoclonais 197
- 9.4 Evolução dos biofármacos 198
 - 9.4.1 Biossuperiores (*biobetters*) 200
 - 9.4.1.1 Modificações estruturais 201
 - 9.4.1.2 Modificações de formulação 202
 - 9.4.1.3 Modificações na via de administração 202
 - 9.4.1.4 Modificação da meia-vida de circulação plasmática 203
 - 9.4.2 Estudo de caso 206
 - 9.4.2.1 A história da insulina 206
- 9.5 Uso e recomendações clínicas 211

- 9.5.1 Diabetes melito 214
- 9.5.2 Doença de Gaucher 217
- 9.6 O papel dos biofármacos no CEIS 218
- Referências 220

10. Anticorpos monoclonais terapêuticos 223

Aline de Almeida Oliveira, Patrícia Cristina da Costa Neves, Fabiana Pompêo de Pina, Andreia Cristina de Melo

- 10.1 Estrutura e função de anticorpos 223
- 10.2 O desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos pelas tecnologias de hibridomas e de *phage display* 224
 - 10.2.1 Tecnologia de hibridomas 224
 - 10.2.2 Tecnologia de *phage display* 227
- 10.3 Os camundongos humanizados e *single cell sequencing* 230
- 10.4 Desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais terapêuticos 231
 - 10.4.1 Engenharia de anticorpos e variações de formatos 232
 - 10.4.2 Desenvolvimento de processo produtivo de anticorpos terapêuticos 238
- 10.5 Anticorpos monoclonais terapêuticos: uso e recomendações na prática clínica 240
 - 10.5.1 Aplicação na prática clínica em doenças inflamatórias imunomediadas e de interesse na reumatologia 240
 - 10.5.2 Aplicação na prática clínica em oncologia 242
- 10.6 O papel dos anticorpos monoclonais terapêuticos para o Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS) 244
- 10.7 Considerações finais 244
- Referências 247

Parte V – Biotecnologia e o processo produtivo, regulatório e de farmacovigilância

11. Desafios da produção em larga escala 252

Maria de Lourdes M. Leal, Daniel André Ribeiro, Miguel Angel de la O Herrera, Ricardo da Costa Lopes, Carla F. Wolanski de Almeida, Felipe Leal da Silva

- 11.1 A produção de ingrediente farmacêutico ativo de vacinas e biofármacos 252
- 11.2 Desafios na produção de ingrediente farmacêutico ativo de vacinas e biofármacos 254
 - 11.2.1 Operações de *upstream* 254
 - 11.2.1.1 Produção de vacinas atenuadas em ovos embrionários 254
 - 11.2.1.2 Produção de biorreatores 255

11.2.2 Operações de <i>downstream</i>	261
11.2.2.1 Ruptura celular e clarificação	267
11.2.2.2 Cromatografia	268
11.2.2.3 Operações de filtração com membranas e inativação viral	269
11.3 Produção de <i>kit</i> diagnóstico	272
11.4 Processamento final	275
11.4.1 Formulação em larga escala de vacinas e biofármacos	276
11.4.2 Envase	278
11.4.2.1 Linhas semifechadas	279
11.4.2.2 Linhas fechadas	279
11.4.2.3 Simulação asséptica	280
11.4.3 Liofilização	281
11.4.4 Recravação, inspeção visual, rotulagem e embalagem	282
11.4.4.1 Recravação	283
11.4.4.2 Inspeção visual e teste de integridade	283
11.4.4.3 Rotulagem e embalagem	284
11.5 Considerações finais	284
Referências	286

12. O papel da qualidade e regulação 288

<i>Rosane Cuber Guimarães, Sheila Barros Matsuoka, Bianca Waruar Paulo Lobo, Gustavo Mendes Lima Santos</i>	
12.1 Conceitos de qualidade	288
12.2 Boas práticas de fabricação, clínicas e laboratoriais	289
12.2.1 Boas Práticas de Fabricação	291
12.2.2 Boas Práticas Clínicas	291
12.2.3 Boas Práticas de Laboratório	292
12.3 O papel da qualidade na produção de vacinas e biofármacos	293
12.4 O papel da qualidade na produção de testes para diagnósticos	295
12.5 Regulação em biotecnologia e biossimilares no mundo e no Brasil	296
12.5.1 O que é considerado durante uma avaliação de registro de produto biotecnológico?	296
12.5.2 Por que um produto que é registrado em outro país não pode ser automaticamente autorizado no Brasil?	298
12.5.3 Quais são os prazos e quais são as estratégias de priorização para análise de um registro de produto biotecnológico pela Anvisa?	298
12.6 Considerações finais	299
Referências	300

13. Farmacovigilância 302

Paulo Roberto Takey, Patrícia Mouta Nunes de Oliveira, Helaine Carneiro Capucho, Renata Saraiva Pedro

13.1 Farmacovigilância: conceitos e definições	302
13.2 Aspectos históricos sobre a farmacovigilância no Brasil e no mundo	303
13.3 A importância da farmacovigilância para segurança dos produtos de origem biotecnológica	304
13.4 O papel da farmacovigilância na detecção, notificação, investigação e avaliação dos eventos adversos	305
13.4.1 Detecção dos eventos adversos	307
13.4.2 Notificação e registro dos eventos adversos	308
13.4.3 Avaliação dos eventos adversos	310
13.4.4 Compreensão dos eventos adversos	311
13.4.5 Comunicação dos eventos adversos	311
13.5 Considerações finais	312
Referências	312

14. Biossimilares 314

Valderilio Feijó Azevedo, Hugo Garcia Tonioli Defendi, Iralice Medeiros de Souza, Anna Erika Vieira de Araújo, Flávia Caixeta Albuquerque

14.1 Estudos de comparabilidade de biossimilares	314
14.1.1 Estudos analíticos de desenvolvimento por comparabilidade	317
14.1.2 Estudos não clínicos de desenvolvimento por comparabilidade	318
14.1.3 Estudos clínicos de desenvolvimento por comparabilidade	319
14.1.4 Estudos confirmatórios de desenvolvimento por comparabilidade	320
14.1.5 Ensaio clínicos	321
14.1.6 Intercambialidade de biossimilares	323
14.1.7 Biossimilares em doenças raras	323
14.1.8 Aspectos da qualidade	323
14.2 Considerações finais	328
Referências	328

Parte VI – Biotecnologia e terapias avançadas

15. Terapia gênica e celular 332

Martín Bonamino, Mariana Torres Mazzi

15.1 Terapia gênica e celular: definição e histórico	332
15.2 Tipos de terapia gênica	334
15.2.1 Terapia gênica germinativa	334
15.2.2 Terapia gênica somática	335
15.2.3 Terapia com célula CAR-T	335
15.2.3.1 Terapia com célula TCR	338

15.3 Terapias imunológicas não modificadas geneticamente	339
15.3.1 Transplante de medula óssea	339
15.3.1.1 As bases imunológicas do TMO alogênico	342
15.3.1.2 Princípios clínicos do TMO alogênico	343
15.3.2 Células NK	344
15.3.2.1 Uso clínico das células NK	346
15.3.2.2 Resultados clínicos	346
15.3.2.3 O futuro da terapia com células NK	347
15.3.3 Terapias com TIL	348
15.3.3.1 Produção de TIL	348
15.3.3.2 Eficácia TIL	349
15.4 Biotecnologia aplicada à terapia gênica e celular	350
15.5 Aplicações clínicas de terapia gênica e celular	351
15.6 O papel da terapia gênica e celular para o Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS)	352
15.7 Considerações finais	352
Referências	352

16. Outras terapias baseadas em ácidos nucleicos 355

Sotiris Missailidis, Ana Paula Dinis Ano Bom, Charles Marques Lourenço, Patrícia Cristina da Costa Neves

16.1 Aplicação de RNA mensageiro na prevenção e no tratamento de doenças	355
--	-----

16.2 Sistemas de entrega	360
16.3 Terapias baseadas em RNAi	364
16.4 Terapias baseadas em aptâmeros	367
16.5 Aplicações de terapias baseadas em ácidos nucleicos às doenças genéticas	375
16.5.1 Atrofia muscular espinhal (AME)	375
16.5.2 Polineuropatia amiloidótica familiar	376
16.5.3 Porfirias agudas hepáticas	378
16.6 Conclusões e perspectivas das tecnologias baseadas em ácidos nucleicos	378
Referências	380

Parte VII – O futuro da biotecnologia na saúde

17. O futuro da biotecnologia na saúde 386

Beatriz de Castro Fialho, Ana Carolina Ramos Guimarães, Stephen Doral Stefani, Ana Paula Dinis Ano Bom,

Martín Bonamino, Patrícia Cristina da Costa Neves

17.1 Aspectos históricos	386
17.2 Tecnologias digitais na área da saúde e a bioinformática	392
17.3 Tecnologias digitais para o desenvolvimento <i>in silico</i>	396
17.4 Medicina personalizada	399
17.5 Considerações finais	402
Referências	405

Índice remissivo	411
------------------	-----

Prefácio

Caro Leitor,

Muitas são as motivações para o nascimento de um livro. Este aqui nasceu por uma razão muito particular e tem como origem uma história de sucesso. Tendo participado desses momentos originários, sinto-me honrado em revelá-los aqui neste espaço.

Desde as nossas primeiras interações em 2018 com o Dr. Valderilio Feijó e Dr. José Roberto Provenza, da Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), promovidas pela Dra. Lurdinha Maia, do nosso Departamento de Assuntos Médicos, ficou evidente para os dois lados que uma maior integração seria benéfica para ambas as instituições. Pelo lado de Bio-Manguinhos, conhecer as necessidades de ponta, representadas pelas práticas médicas e pela utilização de nossos produtos junto aos pacientes, seria como que um insumo especial para um processo de inovação voltado de fato para as necessidades da população. Pelo lado médico, conhecer as técnicas complexas e o rigor de qualidade no desenvolvimento e na produção de produtos biológicos seria uma oportunidade de complementação dos conhecimentos adquiridos nos bancos acadêmicos em uma área muito específica e pouco abordada nos currículos universitários. E, principalmente, de aumentar a confiança dos profissionais médicos nos tratamentos por eles conduzidos.

Dessas interações surgiu o curso de Biotecnologia, ministrado de forma virtual em meio à pandemia, por médicos, biotecnologistas, dentre outros, tendo mais de 500 inscritos, em sua maioria médicos não apenas da SBR como também de outras sociedades médicas citadas mais à frente neste compêndio. Do sucesso desse curso

nasce o *Tratado Brasileiro de Biotecnologia em Saúde: da Bancada à Beira do Leito*.

Este livro preenche uma lacuna importante na literatura sobre a biotecnologia em saúde. Mas vai além do seu propósito original. Escrito por profissionais que atuam na área e vivem os seus problemas em regime dioturno, tem potencial para influenciar também as políticas de Ciência, Tecnologia e Inovação em saúde. Em linha com a mais recente Estratégia Nacional para o Complexo Econômico-Industrial da Saúde (CEIS), tem a pretensão de gerar conhecimento que possa ser transformado em ações que impactem diretamente na qualidade da saúde da população.

A biotecnologia em saúde não é um campo novo de conhecimento, mas vive atualmente uma verdadeira revolução tecnológica. Dezenas de bilhões de dólares são investidos anualmente pelas principais corporações farmacêuticas internacionais, o que coloca um enorme desafio para o Brasil, onde os investimentos são majoritariamente realizados pelo governo e em valores insuficientes para acompanhar a evolução mundial.

Portanto, seja qual for o seu campo de estudo, pesquisa ou profissão, vá em frente na leitura deste livro e aproveite essa oportunidade única. Aqui você encontrará temas que dificilmente estarão reunidos em outra publicação e, em alguns capítulos, que se encontram próximos da fronteira do conhecimento. As informações encontradas aqui podem o ajudar em seu trabalho, a escolher o seu futuro ou a acrescentar um novo conhecimento à sua formação intelectual. Formar massa crítica nessa área é o nosso principal objetivo.

Mauricio Zuma Medeiros, D.Phil
Diretor Geral de Bio-Manguinhos/Fiocruz

Apresentação

Aline de Almeida Oliveira

Maria de Lourdes de Sousa Maia

Amanda de Miranda Marques

Carla Lemos Gottgroy

Valderilio Feijó Azevedo

Daniel Pacheco Lacerda

Biotecnologia significa qualquer sistema que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para uma utilização específica (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992). Assim, a biotecnologia busca, a partir de organismos vivos (biologia) e utilização da tecnologia, criar produtos para melhorar a vida das pessoas (CAVAGNARO, 2002).

Existem diversos campos de aplicação da biotecnologia (por exemplo, agricultura, indústria de transformação, entre outros) entre os quais destaca-se a aplicação da biotecnologia na saúde humana (DEMAIN, 2000). A utilização da biotecnologia na área da saúde humana é estratégica para o desenvolvimento de políticas de inovação em diversos países, incluindo o Brasil. Por esse motivo, o Brasil vem realizando investimento na elaboração de políticas públicas que alavanquem o desenvolvimento e a utilização da biotecnologia, principalmente na indústria farmacêutica. Em relação à indústria farmacêutica, a biotecnologia trouxe novas soluções para saúde, revolucionando prevenção, tratamento e diagnóstico de diversas doenças por meio do desenvolvimento e da produção de vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos, tema deste livro.

Apesar do contexto apresentado sobre a importância da biotecnologia, percebe-se que no Brasil existe escassez de debates aprofundados sobre o tema. Por exemplo, o país ainda precisa evoluir em termos de política de biotecnologia formalizada e possui um *backlog* tecnológico na área. Além disso, não se identificou um livro-texto sobre biotecnologia para servir como referência básica para os cursos de graduação que abordem esse tema. A biotecnologia pode ser considerada um conhecimento importante para profissionais de saúde, uma vez que a compreensão do contexto de produção e desenvolvimento de insumos biotecnológicos (medicamentos

biológicos, vacinas e reativos para diagnóstico), podem apoiar a prática clínica e farmacêutica. A falta de um debate mais aprofundado sobre biotecnologia no Brasil, inclusive, motivou o desenvolvimento do curso “Biotecnologia aplicada à Saúde Humana”. Esse curso foi desenvolvido no ano de 2021 pela Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz) em parceria com a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR). A partir desta parceria, foi possível associar a apresentação dos princípios biotecnológicos, necessários às atividades de desenvolvimento e produção de Bio-Manguinhos, à sua aplicabilidade médica. O curso, portanto, contou com aulas dos especialistas de Bio-Manguinhos e contraponto médico de diferentes especialistas líderes de opinião das sociedades médicas das quais fazem parte: a já citada SBR; a Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (ABHH); a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD); a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC); e o Grupo de Estudos de Doenças Inflamatórias Intestinais do Brasil (GEDIIB). Além destas parcerias, também contamos com a participação do Instituto Oswaldo Cruz e da empresa de biotecnologia brasileira, Bionovis. O sucesso do evento, representado pela multidisciplinaridade também dos inscritos – farmacêuticos, médicos, biomédicos, biólogos, dentre outros – em conjunto com o elevado nível das discussões realizadas, motivou a elaboração deste livro.

Assim, o objetivo deste livro é expor uma visão ampla sobre a biotecnologia para profissionais da área da saúde. Esta obra visa prover a médicos, farmacêuticos e outros profissionais ou estudantes da área da saúde a compreensão dos processos biotecnológicos envolvidos no desenvolvimento e na produção de vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos. Além disso, busca discutir as perspectivas futuras da biotecnologia no mundo, em geral, e no Brasil, em particular. Para a elaboração deste

livro, foram realizadas revisões bibliográficas, além de algumas entrevistas com atores envolvidos nos processos. Além disso, o livro materializa os conhecimentos, a visão e a experiência de um conjunto de especialistas (autores dos capítulos) que contribuíram para estruturar uma narrativa que proporcionasse uma visão integrada das distintas visões (visão sistêmica, científica e médica) sobre a biotecnologia em saúde no Brasil. Adicionalmente, procura-se explicitar as contribuições em relação à área de biotecnologia para o Complexo Econômico-Industrial da Saúde (CEIS).

O programa de pesquisa do CEIS vem sendo desenvolvido na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) há mais de duas décadas. O CEIS estabelece uma agenda de investigação em torno da relação entre saúde e desenvolvimento econômico, procurando captar a interdependência econômica, tecnológica, política e institucional presente no campo da saúde (GADELHA, 2021). Assim, o CEIS representa a base econômica e material em saúde, ou seja, o espaço sistêmico no qual a produção e inovação em bens e serviços de saúde se realizam e as tensões e contradições entre o interesse econômico e social se expressam de modo acentuado (GADELHA, 2022).

Para discutir a integração entre a biotecnologia e o CEIS, foram utilizados os trabalhos de Gadelha (2021, 2022) com a experiência dos organizadores para elaborar um modelo conceitual para a área específica da biotecnologia em saúde (Figura 1) que suporta a organização deste livro. O modelo conceitual também ajudou na identificação e no posicionamento dos atores, os quais expressam sua visão em capítulos específicos. A partir desse modelo conceitual, o livro é organizado em sete Partes, englobando 17 capítulos, para cobrir diferentes aspectos da biotecnologia em saúde.

O livro busca apresentar uma visão sistêmica da biotecnologia a partir do Sistema Único de Saúde (SUS) e seus impactos para os subsistemas industriais e de serviços, além dos seus desdobramentos. Assim, inicialmente, na primeira parte, o livro traz um debate introdutório sobre os caminhos estratégicos para o desenvolvimento de uma política brasileira de biotecnologia (Capítulo 1). Em seguida, é apresentado em termos gerais, os fundamentos da biotecnologia moderna (Capítulo 2). Após essas discussões basilares que visam proporcionar uma visão ampla ao leitor, é apresentada a segunda parte do livro. A segunda parte se dedica à compreensão da biotecnologia no que tange às vacinas (Capítulos 3, 4 e 5). Por sua vez, a terceira parte aborda a biotecnologia do ponto de vista dos testes de diagnósticos (Capítulos 6 e 7). Na quarta parte, é realizada uma discussão da biotecnologia em biofármacos (Capítulos 8, 9 e 10). A quinta parte expõe o processo produtivo, regulatório e

de farmacovigilância associados a essa temática, além de um capítulo específico que discute sobre os biossimilares (Capítulos 11, 12, 13 e 14, respectivamente). As últimas partes procuram gerar reflexões quanto às perspectivas futuras sobre a biotecnologia (Capítulos 15, 16 e 17). O modelo conceitual que suporta a organização deste livro e suas respectivas partes e capítulos são mostrados na Figura 1.

Em cada uma das sete partes do livro, procura-se estabelecer uma narrativa lógica para o leitor baseada na abordagem de *storytelling* (Çetin, 2021). Assim, inicialmente é efetuada uma contextualização sobre o tema abordado (por exemplo, capítulo inicial de cada parte) e posteriormente é realizada uma discussão técnica (de mais capítulos de cada parte). A contextualização pode colocar o leitor não especializado a par dos aspectos gerais, enquanto a discussão técnica pode ser de maior interesse aos leitores mais experientes ou que desejam aprofundar seu conhecimento no tema.

A estruturação do livro em partes e capítulos segue uma ordenação. O primeiro capítulo se inicia com a história da biotecnologia desde a antiguidade até a biotecnologia moderna, desenvolvida a partir da descoberta da estrutura do DNA e das metodologias de biologia molecular. Trata também das suas principais aplicações em diversas áreas do conhecimento e da multidisciplinaridade e bioconvergência da biotecnologia atual e da medicina translacional. Esse capítulo ainda discute o contexto brasileiro, destacando a dependência de importação de produtos e tecnologia de desenvolvimento e manufatura, embora o país gere conhecimento científico considerável na área. Também conta a trajetória do desenvolvimento de inovação, empreendedorismo e indústrias e também da dimensão regulatória da biotecnologia no Brasil. No segundo capítulo, os fundamentos da biotecnologia moderna, a biologia molecular, são aprofundados. Assim, são discutidos os princípios de clonagem e expressão, incluindo os principais elementos e tipos de vetores. A escolha do sistema para a produção da proteína de interesse é crucial, por isso este capítulo também aborda os diferentes sistemas de expressão mais utilizados, discutindo vantagens, desvantagens e aplicações para a obtenção de proteínas recombinantes, que podem ser aplicados em vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico.

A Parte II considera a biotecnologia em vacinas e abrange os Capítulos 3, 4 e 5. No terceiro capítulo, descreve-se uma introdução da biotecnologia em vacinas, em que são abordados os aspectos históricos sobre as descobertas e a utilização das vacinas no contexto mundial e brasileiro, contando também a história da Fundação Oswaldo Cruz, grande produtora de vacinas. Além disso, discute-se sobre plataformas vacinais e clas-

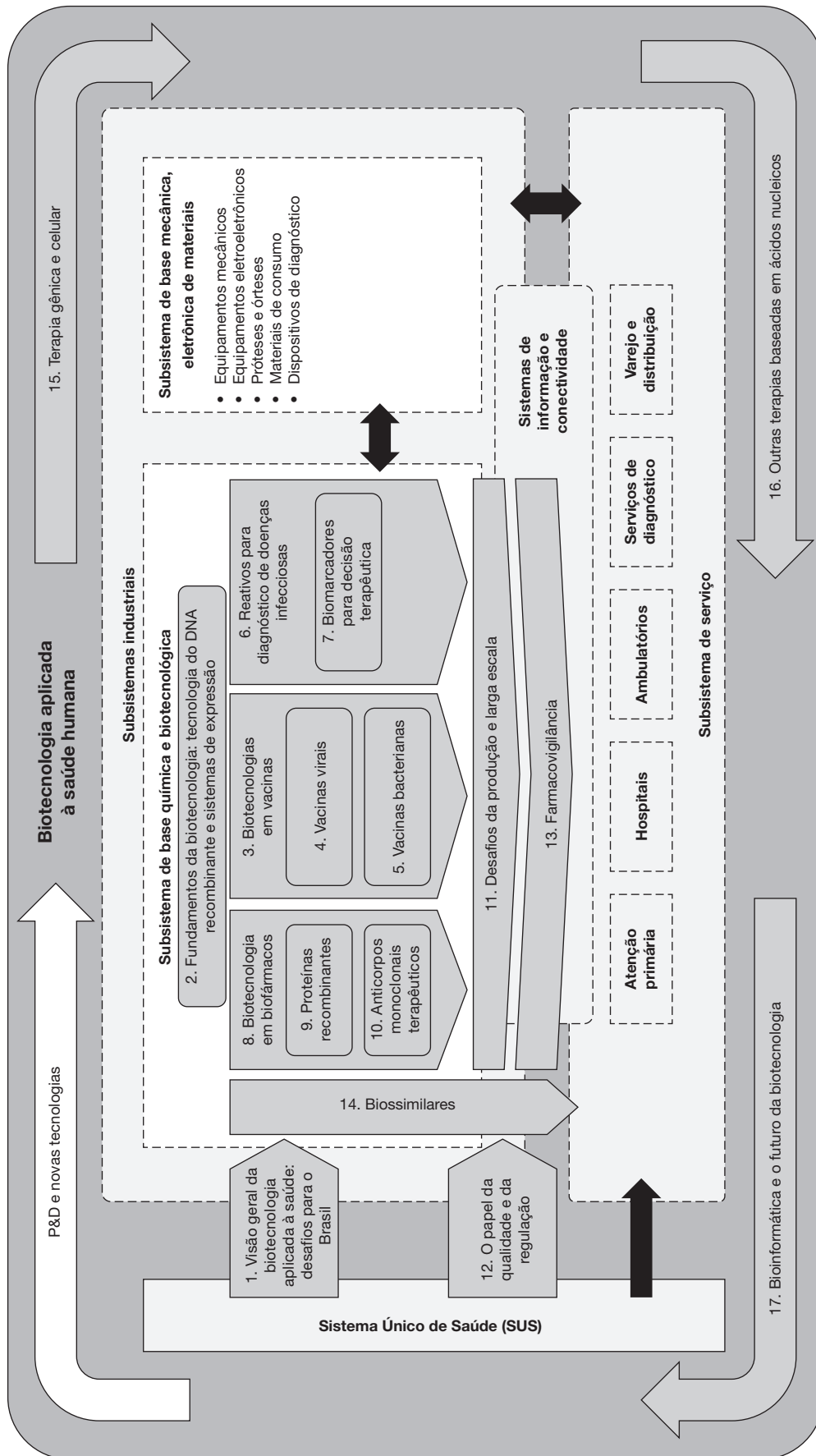


FIGURA 1 Modelo conceitual do livro de biotecnologia aplicada a saúde humana. Fonte: elaborada com base em Gadelha e adaptada pelos organizadores para biotecnologia em saúde (2021, 2022).

sificações, com enfoque principalmente na pesquisa, no desenvolvimento e na produção de vacinas. Este capítulo termina com os desafios nacionais para o desenvolvimento de vacinas e as contribuições para o Complexo Econômico Industrial da Saúde. O quarto capítulo aborda, especificamente, as vacinas virais, discutindo as plataformas tecnológicas utilizadas, além do papel da biotecnologia aplicada na pesquisa, no desenvolvimento e na produção das vacinas virais. Adicionalmente, explicita as aplicações clínicas e recomendações sobre essas vacinas. O quinto capítulo trata das vacinas bacterianas, em que, primeiramente, são conceituados os tipos de vacinas bacterianas e as plataformas tecnológicas utilizadas. De maneira subsequente, é explorado o papel da biotecnologia aplicada na pesquisa, no desenvolvimento e na produção de vacinas bacterianas, bem como as suas aplicações clínicas e recomendações.

A Parte III considera a biotecnologia em testes para diagnósticos e abrange os Capítulos 6 e 7. No sexto capítulo, é realizada uma introdução à biotecnologia em testes para diagnóstico. Este capítulo inicia pela apresentação da definição e do histórico dos testes para diagnóstico no mundo, em geral, e no Brasil, em particular. Além disso, avança pela caracterização dos tipos de teste para diagnóstico (reativos e biomarcadores), seguido pela descrição dos processos de pesquisa e desenvolvimento (P&D), produção e processamento. De maneira subsequente, aborda o papel da biotecnologia no desenvolvimento desses processos. Adicionalmente, o sexto capítulo trata dos reativos para diagnóstico de doenças infecciosas, em que se inicia pela definição de reativos para diagnóstico em geral e, em particular, para doenças infecciosas. Em seguida, avança pela caracterização dos principais tipos de reativo (por exemplo, ELISA, RT-PCR, RT-LAMP), seguido pelos avanços biotecnológicos a eles relacionados. Também, aborda seu uso e as recomendações clínicas no diagnóstico de doenças infecciosas, como malária, febre amarela, HIV, leishmaniose e Covid-19. No sétimo capítulo, relatam-se os biomarcadores para decisão terapêutica. O capítulo inicia pela definição de biomarcadores, seguido pela caracterização de suas principais categorias (prognóstico, predição, farmacodinâmica e *surrogate*). Para cada categoria, apresenta os tipos proeminentes de biomarcadores (por exemplo, PIK3CA, EGFR) e os avanços biotecnológicos a eles relacionados. De maneira subsequente, aborda seu uso no acompanhamento clínico de doenças, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, entre outras.

A Parte IV considera a biotecnologia em biofármacos e abrange três Capítulos (8, 9 e 10). No oitavo capítulo, é realizada uma introdução à biotecnologia em biofármacos e seu papel na saúde pública, em par-

ticular na clínica. Além disso, aborda a contribuição da biotecnologia para o desenvolvimento tecnológico na área. O capítulo inicia pela apresentação da definição e do histórico dos biofármacos no mundo e no Brasil. Avança pela caracterização das principais categorias de biofármacos (proteínas recombinantes e de fusão e anticorpos monoclonais), seguido pela descrição dos processos de pesquisa, desenvolvimento e produção.

No nono capítulo, é aprofundado o tema de proteínas recombinantes. Assim, inicialmente é discorrido sobre o sistema de expressão mais utilizado para as proteínas terapêuticas, além das principais classes de proteínas recombinantes de uso terapêutico. O capítulo é finalizado discorrendo sobre recomendações clínicas das principais proteínas terapêuticas disponíveis no mercado. O décimo capítulo aborda os anticorpos monoclonais terapêuticos, mostrando o desenvolvimento desse tipo de biofármaco (tecnologias de hibridomas, de *phage display*, camundongos humanizados e *single cell sequencing*). Em seguida, avança pela caracterização da biotecnologia aplicada à pesquisa, ao desenvolvimento e à produção de anticorpos monoclonais terapêuticos. Posteriormente, aborda o uso e recomendações sobre anticorpos monoclonais terapêuticos.

A Parte V é composta por quatro capítulos (11, 12, 13 e 14), abordando respectivamente os aspectos gerais sobre produção, regulação, farmacovigilância de imunobiológicos e de biossimilares. O décimo primeiro capítulo apresenta uma visão geral dos desafios da produção em larga escala de produtos biotecnológicos, primeiro com foco no processo produtivo de vacina, em seguida de testes para diagnósticos e, por fim, de biofármacos. O décimo segundo capítulo apresenta uma visão geral do papel da qualidade e regulação, iniciando pela apresentação dos conceitos de qualidade em relação aos produtos biotecnológicos e das boas práticas de fabricação, clínicas e laboratoriais. Em seguida, avança pela caracterização do papel da qualidade na produção de vacinas, testes para diagnósticos e biofármacos. Posteriormente, aborda os aspectos históricos sobre regulação em biotecnologia e biossimilares no mundo e no Brasil.

O décimo terceiro capítulo apresenta uma visão ampla sobre a farmacovigilância, iniciando pela apresentação de seus aspectos históricos no Brasil e no mundo, seguido pela caracterização de sua atividade para segurança dos produtos de origem biotecnológica. Posteriormente, explicita seu papel na detecção, notificação, investigação e avaliação dos eventos adversos, ou seja, o funcionamento da farmacovigilância na prática. Por sua vez, o décimo quarto capítulo discorre, especificamente, sobre os biossimilares, iniciando pela apresentação dos conceitos de biossimilaridade e trocas. Em seguida, é apresentada a caracterização dos estudos analíticos de

biossimilaridade além da comparabilidade não clínica, clínica e de indicação. Por fim, aborda a comparabilidade de qualidade.

As Partes VI e VII procuram tratar de terapias avançadas e gerar reflexões sobre as perspectivas futuras da biotecnologia, compostas por três capítulos (15, 16 e 17). Assim, o décimo quinto capítulo apresenta uma visão ampla sobre terapias gênica e celular, bem como aborda a contribuição da biotecnologia para o avanço das pesquisas e aplicações clínicas na área. O capítulo inicia pela apresentação da definição e pelo histórico das terapias gênica e celular no mundo e no Brasil, em particular. Avança pela caracterização dos tipos de terapia gênica (germinativa e somática) e celular (envolvendo modificações genéticas ou não), seguida pela descrição do papel da biotecnologia no desenvolvimento dessas terapias. O décimo sexto capítulo trata de outras terapias baseadas em ácidos nucleicos. Assim, o capítulo apresenta uma visão ampla sobre as terapias de RNA e aptâmeros bem como aborda a contribuição da biotecnologia para o avanço das pesquisas e aplicações clínicas na área. O capítulo inicia pela apresentação da definição e pelo histórico das terapias de RNA no mundo e no Brasil, em particular. Avança pela caracterização dos principais tipos de terapia de RNA, dando destaque às vacinas terapêuticas e terapias baseadas em aptâmeros.

Por fim, para fechar este livro, o décimo sétimo capítulo busca discorrer sobre a bioinformática e gerar reflexões sobre o futuro da biotecnologia na área da saúde. Para esse fim, o capítulo apresenta uma visão ampla sobre bioinformática e o futuro da biotecnologia na saúde 4.0, iniciando pela apresentação dos aspectos históricos sobre bioinformática/biologia computacional em termos gerais. Em seguida, são caracterizadas as aplicações da bioinformática/biologia computacional na área da saúde em específico. Posteriormente, são abordados os aspectos históricos sobre a saúde 4.0, caracterizando suas tecnologias e aplicações. Por fim, é realizada uma discussão sobre o futuro da biotecnologia na saúde 4.0.

Enfim, este livro, principalmente por ser o primeiro lançado no Brasil a tratar específica e globalmente do tema da biotecnologia para saúde, busca lançar luz sobre o tema a partir de um conjunto amplo de visões de especialistas (autores dos capítulos) amparados em uma instituição reconhecida mundialmente como referência em saúde (Fiocruz). Entende-se que este trabalho pode ser utilizado como referência por médicos, enfermeiros, biotecnólogos, biólogos, biomédicos, farmacêuticos e estudantes destas áreas. Além disso, pode ajudar a mostrar a capacidade brasileira de desenvolver tecnologia em saúde.

Saiba mais sobre o curso de Biotecnologia:



REFERÊNCIAS

1. CAVAGNARO, Joy A. Avaliação de segurança pré-clínica de produtos farmacêuticos derivados da biotecnologia. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 6, pág. 469-475, 2002.
2. ÇETIN, E. Digital storytelling in teacher education and its effect on the digital literacy of pre-service teachers. **Thinking Skills and Creativity**, v. 39, p. 100760, 2021.
3. CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992. Disponível em: < <http://www.cbd.int/>>. Acesso em: 16 jan. 2022.
4. DEMAİN, Arnold L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 1, pág. 26-31, 2000.
5. GADELHA, C. A. G. Complexo Econômico-Industrial da Saúde: a base econômica e material do Sistema Único de Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 38, p. e00263321, 2022.
6. GADELHA, C. A. G. O Complexo Econômico-Industrial da Saúde 4.0: por uma visão integrada do desenvolvimento econômico, social e ambiental. **Cadernos do Desenvolvimento**, v. 16, n. 28, p. 25-49, 2021.

Parte I

Visão geral

Visão geral da biotecnologia aplicada à saúde: desafios para o Brasil

Akira Homma

Thiago Rennó dos Mares Guia

Artur Roberto Couto

Cristina Possas

Neste capítulo, é discutida uma visão geral da biotecnologia aplicada à saúde, considerando-se os desafios mundiais em termos gerais e os desafios para o contexto brasileiro, em termos específicos. O capítulo inicia-se por uma contextualização histórica sobre a biotecnologia, seguida de uma discussão sobre a biotecnologia moderna, mostrando suas descobertas e aplicações recentes. Em seguida, avança mostrando o caso da Biobrás, uma iniciativa privada pioneira em biotecnologia farmacêutica no Brasil e na América Latina. Por fim, é mostrado um contexto histórico sobre a dimensão regulatória da biotecnologia no Brasil.

1.1. INTRODUÇÃO

Os produtos biotecnológicos existiam na antiguidade – por exemplo, os diversos produtos originados de fermentação bacteriana, os alimentos fermentados, o vinho, o queijo, entre outros. Muitos desses produtos ainda estão presentes no cotidiano de nossas vidas.

No final do século XIX, houve um importante avanço na biotecnologia, com a identificação de micro-organismos nos trabalhos de Koch e Pasteur. Os trabalhos de Mendel também contribuíram, significativamente, para o entendimento do papel da genética no desenvolvimento de seres vivos. Em 1869, o ácido desoxirribonucleico (DNA – traduzido do inglês *deoxyribonucleic acid*) foi identificado pela primeira vez pelo químico suíço Friedrich Miescher (DAHLM, 2005). Nas décadas seguintes, duas contribuições se mostraram decisivas para a compreensão posterior da estrutura do DNA: as pesquisas de Levene, em 1919, (SLYKE; JACOBS, 1940) e Chargaff (ELSON; CHARGAFF, 1952). Finalmente, em 1953, foi descoberta a estrutura do DNA carregando informações genéticas com as instruções contidas no

código genético, como mostra o revolucionário artigo da dupla hélice (WATSON; CRICK, 1953), que originou a biotecnologia moderna. Somente a partir de 1980 a biotecnologia evoluiu do campo da pesquisa científica para aplicações em produtos, com a identificação de genes relacionados a funções específicas e o entendimento de suas respectivas propriedades. Esses rápidos avanços possibilitaram um extraordinário acúmulo de conhecimentos científicos e tecnológicos sobre a forma como os organismos vivos – animais, vegetais, bactérias, vírus e fungos – são gerados, crescem, se desenvolvem e morrem.

Esse salto no conhecimento ocorreu, portanto, com a descoberta do código genético do DNA, que possibilitou a identificação das instruções genéticas contidas nesse código. Uma sequência de importantes e extraordinárias descobertas resultaram na mudança de paradigma com a revelação da estrutura do DNA de dupla hélice em 1953, por Watson & Crick: a identificação do código genético em 1961-1965 por Holley, Khorana e Nirenberg (KHORANA, 1979; NOBEL PRIZE, 2023a) e a descoberta de endonucleases de restrição por Arber, Smith &

Nathans (NOBEL PRIZE, 2023b). Além disso, ocorreu a descoberta dos ligantes (OKAZAKI; HONJO, 2007), de novas técnicas de clonagem em meados da década de 1970, além do mapeamento do genoma humano em 2000 pelo projeto Genoma (OLSON, 1993). Esses avanços criaram as condições para o início do desenvolvimento acelerado de novos produtos biotecnológicos, importantes para uso terapêutico, prevenção de doenças, produção de alimentos, agropecuária e a indústria em geral.

Portanto, a biotecnologia consiste em conhecimentos científicos que geram o desenvolvimento e a produção de novos produtos. Em 1919, Karl Ereky, pioneiro pesquisador húngaro, definia o termo “biotecnologia” como a ciência que permite produzir insumos e produtos com uso de organismos vivos (BUD, 1991).

1.2 A MODERNA BIOTECNOLOGIA

O domínio de plataformas da biologia e da genética molecular tornou-se fundamental para o desenvolvimento de novas vacinas, inclusive para o câncer e outras doenças crônicas como HIV/AIDS e doenças imunomediadas, tratamentos pela abordagem genética, além de enorme impacto na agricultura, pecuária, produção de alimentos e outros campos. A moderna biotecnologia constitui, portanto, parte essencial das estratégias da humanidade para melhoria da sua qualidade de vida. A utilização de tecnologias de manipulação genética, realizando alteração genética controlada, com foco na otimização de organismos vivos, unicelulares, em cultura *in natura* ou *in vitro* está voltada para o desenvolvimento e a produção de produtos biotecnológicos para prevenção ou uso terapêutico em humanos, animais e plantas.

Na agricultura, a produção de alimentos não apenas para a população brasileira, mas também para a exportação, tem enorme destaque no plano global. O aperfeiçoamento biotecnológico na agricultura consiste em plantas resistentes aos vírus, aos insetos e aos parasitas e outras infecções, permitindo expressivo aumento de produtividade. Além de contribuir decisivamente para o aumento da produtividade dos alimentos, a biotecnologia tem sido direcionada nas últimas décadas à produção de biocombustíveis, especialmente o álcool, cada vez mais usado nos meios de transporte. Na pecuária, além de produtos para prevenção e uso terapêutico, a hibridização e clonagem de animais, com enorme potencial de mercado, tem contribuído para o melhoramento e aumento da produtividade do rebanho brasileiro. Essas importantes conquistas da pesquisa tecnológica na agropecuária têm impulsionado cada vez mais esse setor estratégico, decisivo para a economia do país e a segurança alimentar do mundo (OGBU; NAMAYANJA, 2021; SARDENBERG, 2000).

A biotecnologia está presente, também, na área do meio ambiente, contribuindo para a redução de poluentes ambientais, problema que tem aumentado em todo o mundo. Além disso, está presente em outras áreas de pesquisa e em diferentes setores da atividade econômica que surgiram ao longo do tempo. A interconexão das áreas de pesquisa e dos setores de atividade econômica potencializaram uma aceleração expressiva no desenvolvimento de novos produtos. Outra questão relevante da biotecnologia consiste na dimensão ética e regulatória, como questões associadas à biossegurança na aplicação, no cultivo, na produção e no uso desses produtos biotecnológicos, como aquelas pertinentes ao uso de plantas transgênicas.

O avanço acelerado dos conhecimentos científicos propiciou a criação e o desenvolvimento de novas áreas, como biologia molecular e celular, genética e imunologia molecular, microbiologia, bioquímica, engenharia química. Essas importantes conquistas científicas foram acompanhadas de contribuições inovadoras relacionadas à proteômica, à genômica e à bioinformática, que demandam cada vez mais a integração dos conhecimentos científicos e tecnológicos, impondo a multidisciplinaridade e a interdisciplinaridade como questões cruciais. Nesse contexto, com o avanço do conhecimento e das inovações tecnológicas, surgiu a engenharia genética, transformando as descobertas em novos e importantes produtos para distintas áreas da vida e do cotidiano social da humanidade. Em decorrência desse ambiente inovador e transformador, expressivos avanços ocorreram nas tecnologias de modificação genética, permitindo a inserção de genes de organismos diferentes, ou deleção de genes, tecnologia denominada de manipulação genética e que deu origem a notáveis produtos DNA recombinantes, como insulina, vacinas recombinantes como hepatite B e inúmeros biofármacos (OECD, 1999).

O ambiente inovador que possibilitou, em escala global, o avanço acelerado da biotecnologia foi também acompanhado pelo aumento da complexidade das novas técnicas e tecnologias, que contribuem, direta ou indiretamente, para a descoberta, o desenvolvimento e a produção de um novo produto biotecnológico. Essa complexidade crescente requer cada vez mais um esforço integrador, chamado de “bioconvergência”, abordagem multidisciplinar que busca sinergias entre campos científicos e tecnológicos diversos como biologia, inteligência artificial, microbiologia, bioquímica, imunologia e engenharia genética (ERNST AND YOUNG, 2022), conforme exposto nas Figuras 1.1 e 1.2.

Para a obtenção de um produto biotecnológico, as competências necessárias das diferentes áreas de conhecimento e tecnologias e suas aplicações são bem

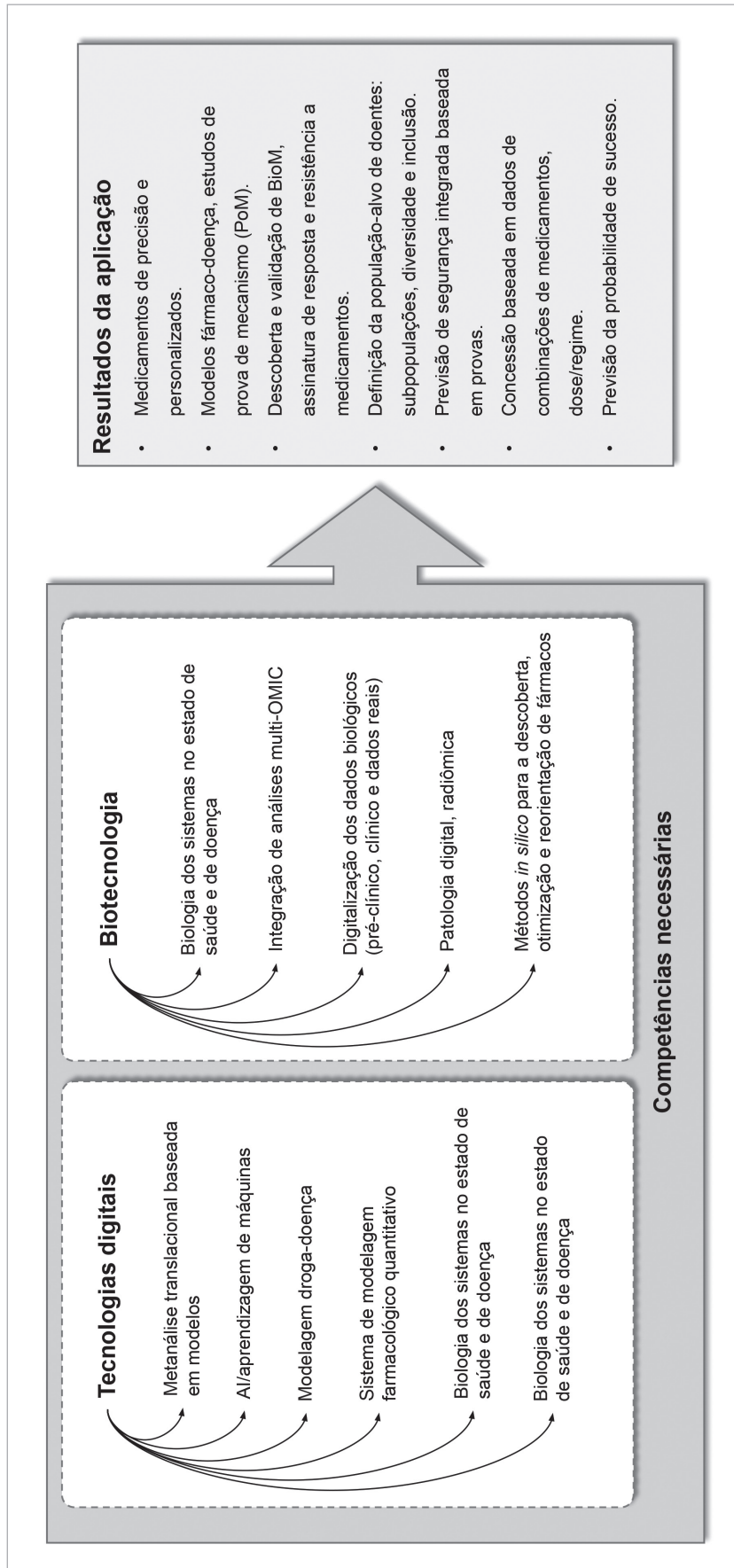


FIGURA 1.2 Bioconvergência de competências para a medicina translacional.

AI: inteligência artificial; BioM: biologia molecular.

Fonte: elaborado com base em Ernst and Young (2022).

TABELA 1.1 Diferença de 5 anos

Fatores avaliados	2016	2021
Desempenho financeiro		
Receitas	US\$ 139,4 b	US\$ 216,7 b
Resultados líquidos	US\$ 7,4 b	
Investimento em pesquisa e desenvolvimento	US\$ 45,7 b	US\$ 88,6 b
Capitalização de mercado	US\$ 863 b	US\$ 1,6 t
Total financiamento	US\$ 53,4 b	US\$ 115,2 b
Financiamento de risco (número de <i>rounds</i> superiores a US\$ 100 m +531% (13 a 82))	US\$ 10 b	US\$ 26,2 b
IPO (número de <i>rounds</i> superiores a US\$ 100 +1,825% (4 a 77))	US\$ 2,3 b	US\$ 19,3 b
Transações		
Valores de fusões e aquisições	US\$ 93,2	US\$ 65,9 b
Aliança <i>biobucks</i>	US\$ 65,8 b	US\$ 152,1 b
Aliança avançada	US\$ 3,5 b	US\$ 10,3 b
Aprovações de medicamentos pela <i>Food and Drug Administration</i> dos Estados Unidos		
Número de aprovações	35	63

Fonte: Elaborado com base em Ernst and Young (2022).

houve, no período, um crescimento de 55% de vendas, atingindo o valor de US\$ 216,7 bilhões. Assim, os investimentos em pesquisa e desenvolvimento aumentaram em 94%, alcançando o montante de US\$ 88,6 bilhões, evidenciando a confiança na busca de novos produtos biotecnológicos. Finalmente, mostra o crescimento de 80% dos novos produtos registrados pelo FDA.

No plano internacional, os avanços científicos e tecnológicos, a engenharia genética e o desenvolvimento de novos produtos despertaram o interesse de países como os Estados Unidos, Japão, China, Índia, Coreia do Sul e países europeus. A biotecnologia foi priorizada para investimento em Ciência, Tecnologia e Inovação, orientado para o desenvolvimento tecnológico e a produção.

Diversos indicadores caracterizam os países que mais investem em biotecnologia, conforme a Figura 1.3, que expõe a evolução dos países por volume de empresas de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) com patentes em biotecnologia de 2006 a 2020. Os seis países com maior volume de empresas em P&D com patentes nessa área em 2020 foram os Estados Unidos, com 2.910 empresas, e, em seguida, a França, com 2.239 empresas, a Espanha, com 2.767 empresas, a Coreia do Sul, com 998 empresas, a Alemanha, com 877 empresas, e o Canadá, com 683 empresas registradas. O Brasil, com 190 empresas (2017), está na 14ª colocação em uma lista de 27 países. Esses dados evidenciam os investimentos públicos e privados estratégicos que os países têm realizado continuamente durante anos para fortalecimento da área biotecnológica e apontam a necessidade urgente de assegurar uma

ampliação expressiva e sustentável em longo prazo do investimento brasileiro em biotecnologia.

A Figura 1.3 apresenta os países com maior investimento (apenas da OCDE) em P&D, portanto, com maior competitividade e que têm maior potencial para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos. Cabe destacar que não estão incluídos países como China, Índia, Austrália, Indonésia, entre outros, que possuem importantes investimentos em desenvolvimento tecnológico, inovação e produção de produtos biotecnológicos.

Outro indicador importante da inovação e desenvolvimento de produtos biotecnológicos refere-se às patentes. As patentes asseguram ao seu detentor o domínio do conhecimento e da tecnologia pela rota indicada. A Figura 1.4 mostra a quantidade de patentes em 2019 por país e destaca os países detentores de conhecimento científico e tecnológico em biotecnologia.

Conforme a Figura 1.4, é inevitável que os países com maior investimento em Ciência e Tecnologia liderem os depósitos de patentes. É necessário fazer uma importante ressalva à Tabela 1.2, que traz informações dos países da OCDE, pois a China disputa com os Estados Unidos a liderança de patentes em vacinas e não consta na Figura 1.4. Os três países que possuem maiores depósitos de patentes são, com larga vantagem, os Estados Unidos, com cerca de 35.500 patentes – seguidos do Japão, com cerca de 12 mil patentes; em seguida, a Coreia do Sul com 5 mil patentes. O Brasil não consta nessa lista de 38 países, o que significa um reduzido investimento na pesquisa científica e desenvolvimento em biotecnologia

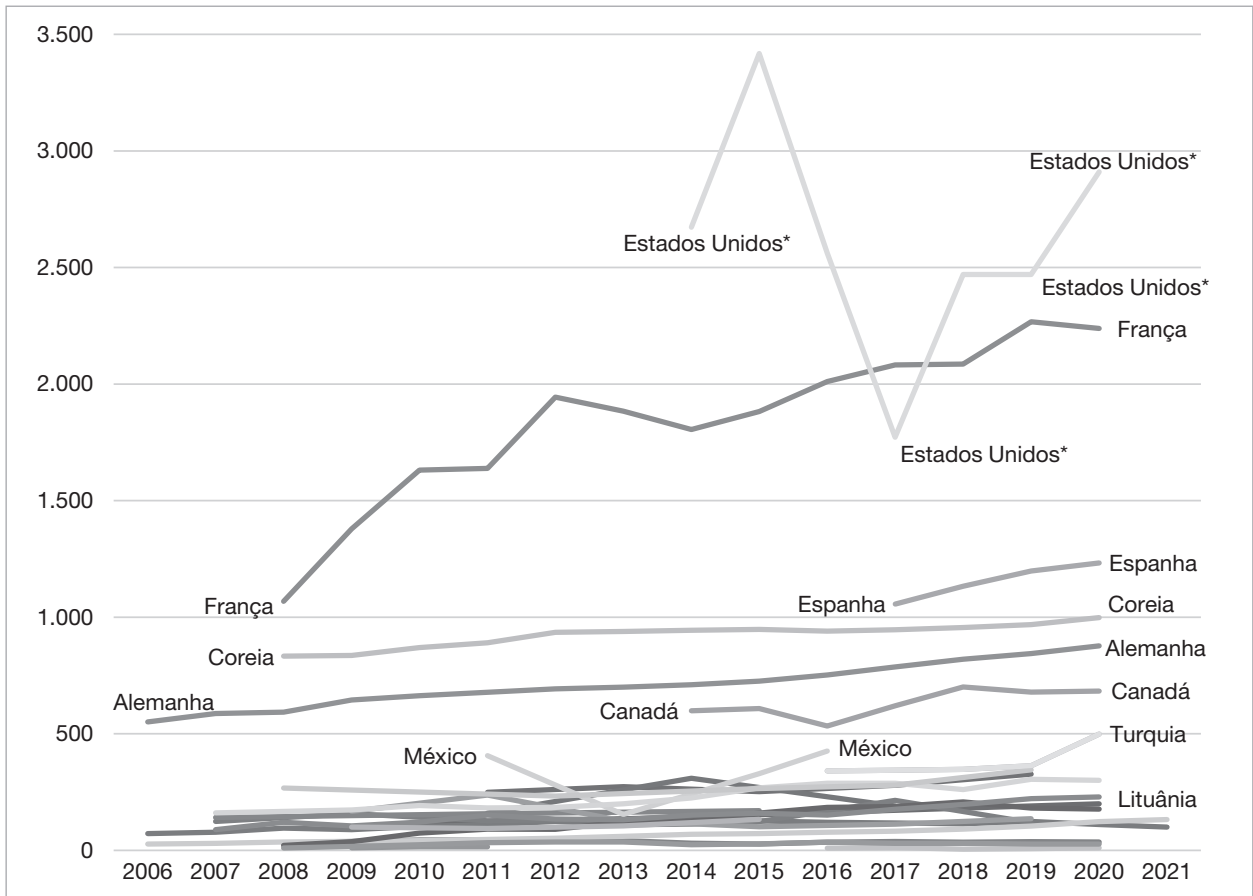


FIGURA 1.3 Participação das economias nas patentes relacionadas com a biotecnologia, com base na nova definição biotecnológica, países da OCDE, 2000-2019.

Fonte: OCDE (2023).

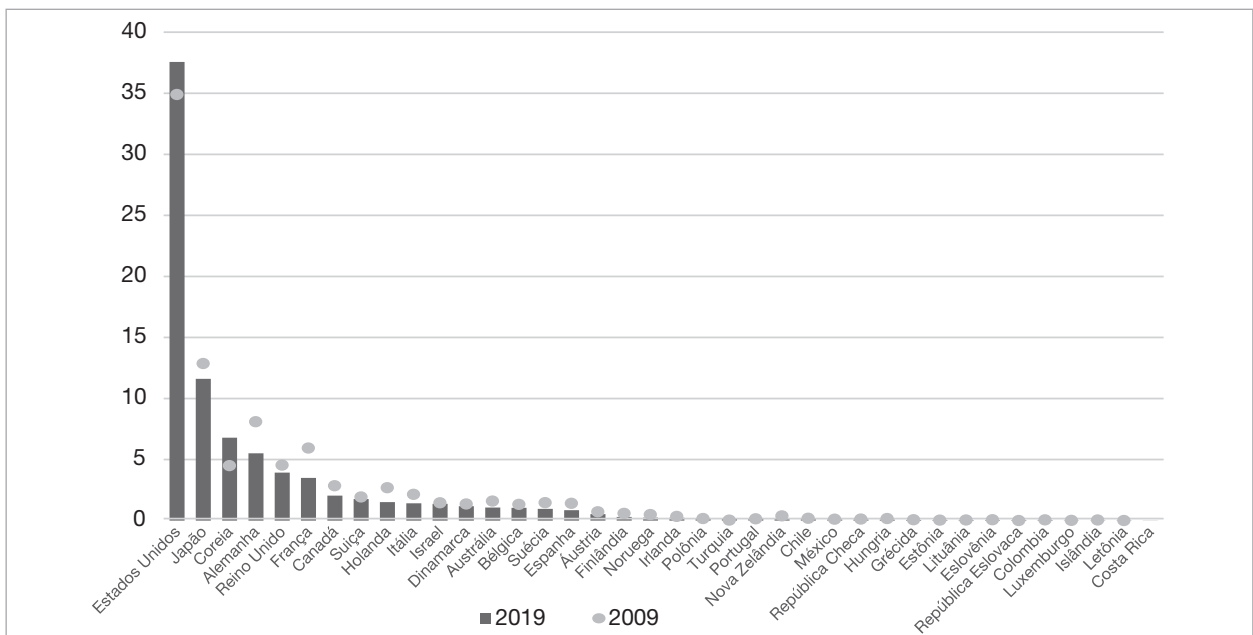


FIGURA 1.4 Participação das economias nas patentes relacionadas com a biotecnologia, com base na nova definição biotecnológica, países da OCDE, 2000-19.

Fonte: OCDE (2023).

no país. Esse cenário determina que o Brasil dependerá, por muitos anos, do conhecimento científico e da importação de novos produtos biotecnológicos, enquanto perdurarem os inexpressivos investimentos em Ciência e Tecnologia pelos governos federal e estaduais.

Em termos de publicações científicas, o artigo *A brief overview of global biotechnology* (MARTIN et al., 2021) mostra que, no período de 2017 a 2020, foram publicados mais de 12 mil artigos sobre o tema no mundo, tendo mais de 8.500 instituições contribuído nas pesquisas. As instituições que mais publicaram estão localizadas na França, em sequência na China, Estados Unidos, Espanha e Brasil, como mostra a Tabela 1.2.

A Tabela 1.3 mostra que o país que mais publicou foi os Estados Unidos, seguidos pela China, Alemanha, Brasil e Índia, mostrando que, ainda que os investimentos em C&T realizados pelo Brasil estejam muito distantes em comparação com os países líderes, o país tem mostrado uma capacidade muito importante em pesquisa científica na área; porém, esta precisa ser transformada em produtos. Essa etapa de pesquisa translacional é bastante restrita no Brasil, o que determina a falta de competitividade tecnológica nacional.

1.4 A BIOTECNOLOGIA NO BRASIL

No início da década de 1980, havia no país uma elevada expectativa sobre as possibilidades e potenciali-

dades da biotecnologia. O CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), preocupado em organizar e estruturar as atividades de biotecnologia, preparou, entre os seus importantes programas de apoio à Ciência e Tecnologia, o Programa Nacional de Biotecnologia, englobando atividades nas áreas de saúde, agropecuária e energia (CNPq, 2023). O CNPq considerava a biotecnologia como uma área estratégica de enorme potencialidade, ensejando a preparação e edição de portarias e leis para o apoio das atividades de biotecnologia no país. Destacam-se as expostas na Tabela 1.4.

O apoio do governo federal tem sido importante para alavancar a biotecnologia no Brasil (PIMENTEL et al., 2012; REIS; PIERONI; SOUZA, 2010). No entanto, ainda que o país detenha vantagens comparativas, em termos territoriais e de bioma, capazes de proporcionar excelentes oportunidades na área de bioenergia, agricultura, saúde animal, meio ambiente e saúde humana, a biotecnologia cresce muito lentamente, quando comparada a outros países.

Com as políticas de governo apoiando, ainda que modestamente, as atividades de biotecnologia, tem crescido o investimento privado em empresas nessa área. Em agosto de 2011, o Centro Brasileiro de Análise e Planejamento (CEBRAP) apresentou um estudo de mapeamento da biotecnologia no Brasil (FREIRE, 2011), iniciativa da BRBIOTEC Brasil no âmbito do Progra-

TABELA 1.2 As cinco instituições mais produtivas em termos de publicações na área da biotecnologia (2019)

Instituição	Volume de publicações (% do total)	Citações/publicações
Centro Nacional Francês de Investigação Científica (CNRS)	236 (1,9%)	3,6
Academia de Ciências da China	216 (1,7%)	3,6
Sistema da Universidade da Califórnia	214 (1,7%)	4,6
Conselho Nacional de Investigação Espanhol (CSIC)	204 (1,7%)	4,4
Universidade de São Paulo	177 (1,4%)	2,6

Fonte: Martin et al. (2021).

TABELA 1.3 Os cinco países/regiões mais produtivos em termos de publicações no domínio da biotecnologia (2019)

País/região	Quantidade de publicações	Citações/publicações
Estados Unidos da América	2,208 (17,9%)	3,9
China	1,559 (12,6%)	3,3
Alemanha	1,056 (8,6%)	3,6
Brasil	862 (7,0%)	2,0
Índia	756 (6,1%)	2,8

Fonte: Martin et al. (2021).

TABELA 1.4 Portarias e leis para apoio das atividades de biotecnologia no país

Lei/Decreto/Portaria	Descrição
Lei n. 10.332, de 19/12/2001, instituindo o Fundo Setorial de Biotecnologia	CT-Biotecnologia, a fim de incentivar o desenvolvimento científico e tecnológico, financiando projetos de interesse da área de biotecnologia e recursos genéticos.
Decreto n. 4.154, de 07/03/2002	Dispõe sobre a criação de um fundo específico para apoio aos projetos de biotecnologia, tendo como fonte de recursos a parcela de 7,5% da Contribuição de Intervenção de Domínio Econômico (CIDE) que tinha sido instituída pela Lei n. 10.168, de 29/12/2000. Esse decreto institui também o Comitê Gestor do Fundo.
Decreto n. 6.041/2007	Instituiu o Comitê Nacional de Biotecnologia, constituído por 21 membros de diversas esferas do governo federal, para coordenar a implementação da Política de Desenvolvimento de Biotecnologia e visando ao desenvolvimento da indústria brasileira e à utilização da biotecnologia pela sociedade.
Portaria n. 4.488/2021, do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)	Cria a Iniciativa Brasil-Biotec e, segundo o Secretário de Pesquisa e Formação Científica do MCTI, Dr. Marcelo Morales, com o objetivo de promover o avanço e o fortalecimento científico do país em biotecnologia e estimular novas tecnologias e a transferência de conhecimento, mobilizando, articulando o fomento e promovendo a cooperação entre entes públicos e privados no desenvolvimento de novos produtos e com vistas à geração de riqueza, emprego e crescimento nacional.

Fonte: elaborada pelos autores (2023)

ma Setorial Integrado da Biotecnologia, uma parceria entre Bio-Rio e Apex-Brasil. Esse estudo do CEBRAP apresentou que existiam 237 empresas de biotecnologia no Brasil, a maioria de micro ou pequenas empresas – 56% faturando até R\$ 2,4 milhões, um quinto delas ainda não faturando, e apenas 10% com faturamento superior a R\$ 12 milhões. No entanto, nos últimos 10 anos, observou-se um crescimento acima de 100% dos investimentos realizados, conforme o Mapa de Empresa de Biotecnologia do Profissão Biotec (SALVATI, 2021). Esse estudo identificou 519 empresas de biotecnologia no Brasil. Somente 2 anos após, ou seja, em 2023, o Mapa Biotec – Dashboard informa que existem 563 empresas de biotecnologia no país. Os resultados promissores indicam um expressivo crescimento de empresas de biotecnologia no Brasil.

A Figura 1.5 exibe um estudo desenvolvido pelo CEBRAP, mapeando a distribuição das 237 empresas atuando em diferentes áreas da biotecnologia no país, com destaque para a área da saúde, que tem 39,7% de participação, e, em seguida, a área de saúde animal, com 14,3% (BIOLATINAMERICA, 2019).

O Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos (SINDUSFARMA) mostrou, em um estudo de 2017, que o mercado da biotecnologia no Brasil tinha o valor de US\$ 18 bilhões. A Figura 1.6 mostra que o país possui 563 empresas (PROFISSÃO BIOTEC, 2023), algumas delas com filiais presentes em várias localidades, aumentando o volume total de empresas para 632. Nesse sentido, observa-se uma concentração de empresas biotecnológicas na região Sudeste, seguida pela região

Sul do país. A região Norte possui a menor quantidade de empresas.

A Figura 1.7 mostra, a partir de estudo realizado em 2011 (PROFISSÃO BIOTEC, 2023), a distribuição de empresas de biotecnologia pelos diferentes estados brasileiros, sendo o estado de São Paulo – o líder, com 40,5% das empresas.

Outro levantamento, realizado em junho de 2021, mostra entre 2011 e 2021 quase o dobro do volume de empresas de biotecnologia no Brasil. O levantamento (PROFISSÃO BIOTEC, 2023) traz uma lista de 547 empresas, sendo 308 empresas e 155 *startups* nacionais de biotecnologia e 84 empresas multinacionais no Brasil. Essas empresas são concentradas nas áreas de Saúde humana e bem-estar (27,42%), Agricultura (20,48%), Insumos (15,9%), Biotecnologia e saúde animal (11,52%), Indústria e bioprocessos (7,5%), Meio ambiente (5,85%), Biotecnologia dos alimentos (3,11%) e outras áreas (8,23%). É interessante notar que, nesse levantamento, foram incluídas 155 *startups*, que possuem peso econômico reduzido.

O mercado de biotecnologia pode ser visto na Figura 1.8, que mostra a estimativa de crescimento de 3,9% entre os anos 2020 e 2025 (RESEARCH AND MARKETS, 2022). São valores ainda inferiores aos apresentados pelos países desenvolvidos e mesmo boa parte dos países emergentes.

A Figura 1.9 mostra o aumento contínuo, de 2018 a 2022, dos gastos com biofármacos de 2ª geração tecnológica no mercado de biotecnologia no Brasil. Assim sendo, há uma pressão por novos produtos e aumento

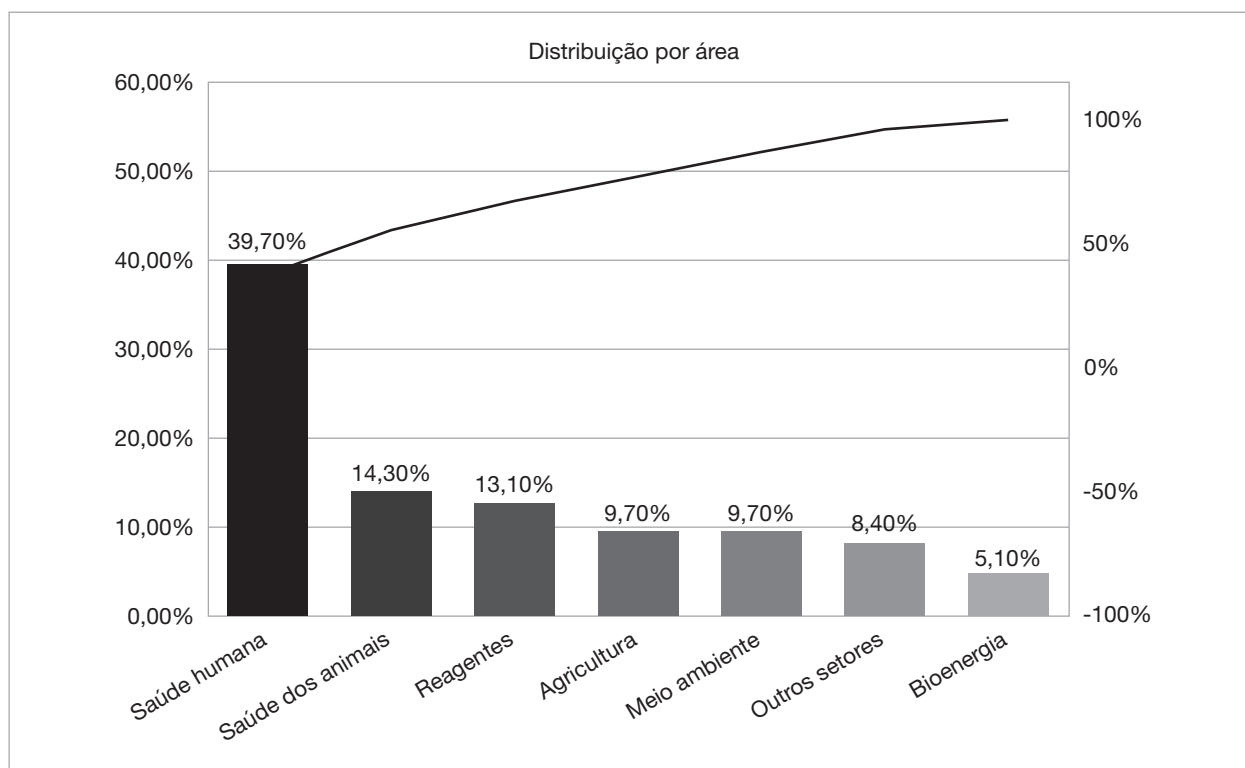


FIGURA 1.5 Distribuição de áreas de atuação da biotecnologia no Brasil.

Fonte: Biolatinamerica (2019).

da dependência de importação de produtos finais ou o estabelecimento de projetos para a internalização das respectivas tecnologias.

A Figura 1.10 mostra os valores gastos em produtos biotecnológicos, observando-se que a vacina Covid-19 contribuiu significativamente para a elevação desses gastos.

O Ministério da Saúde (MS) vem sofrendo enorme pressão da sociedade para fornecer produtos biotecnológicos inovadores e outros medicamentos de alto valor agregado e alto custo para os cidadãos. Esses produtos são importados, inclusive, por via judicial. Esse fato causa enorme déficit na balança comercial da saúde desde 2014 (Figura 1.11) e tem crescido continuamente.

Para reverter essa situação de alta dependência de importação desses produtos e outros insumos de saúde de alto custo, o Ministério da Saúde por meio da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos para Saúde (SCTIE) lançou o programa Parceria para o Desenvolvimento Produtivo (PDP). A PDP envolve a cooperação científica e tecnológica entre instituições públicas e privadas para desenvolvimento tecnológico, a transferência de tecnologia e produção no país de bens biotecnológicos

e fármacos selecionados. Nesse contexto, a política de PDP busca o fortalecimento da capacidade produtiva instalada no país, de produtos de tecnologias modernas e necessárias para o Sistema Único de Saúde, buscando também a redução de preços dos produtos oferecidos.

A Figura 1.12 mostra o tripé dessa operação, onde o governo federal, utilizando o seu poder de compra, negocia a tecnologia de interesse, e os parceiros nacionais público e privado asseguram a internalização das tecnologias de produção de artigos estratégicos. Desde a criação da PDP, são dezenas de produtos que tiveram a tecnologia de produção internalizada e puderam ser oferecidos ao SUS, gerando uma significativa economia para o Ministério da Saúde, além do fortalecimento da capacidade produtiva de modernos insumos biotecnológicos.

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz) produzia biofármacos antes da criação do PDPs e participa ativamente das PDPs, produzindo e fornecendo 11 produtos ao Ministério da Saúde, como mostra a Tabela 1.5.

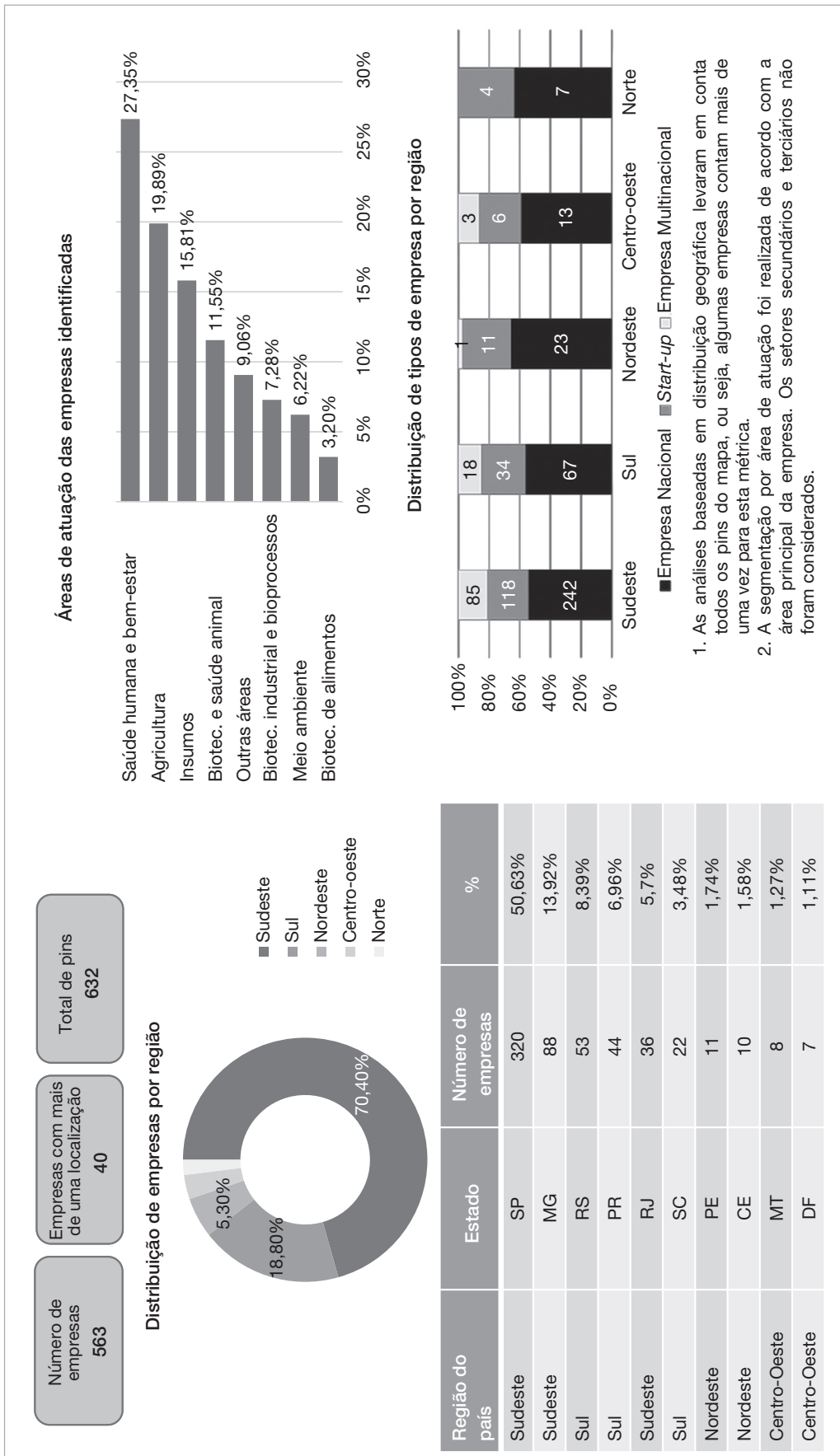


FIGURA 1.6 Mapa Biotec.
Fonte: Profissão Biotec (2023).

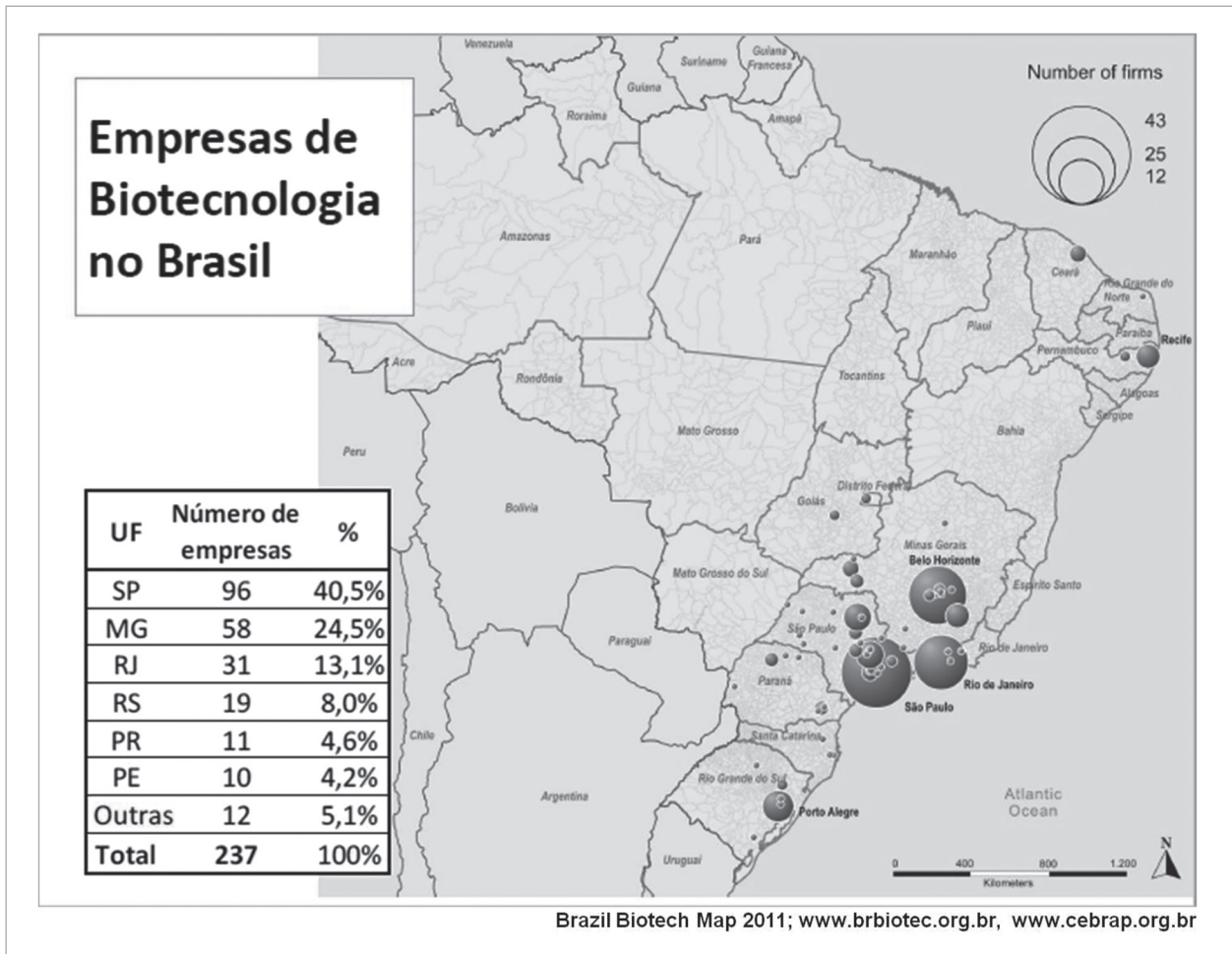


FIGURA 1.7 Empresas de biotecnologia no Brasil.
 Fonte: Profissão Biotec (2023).

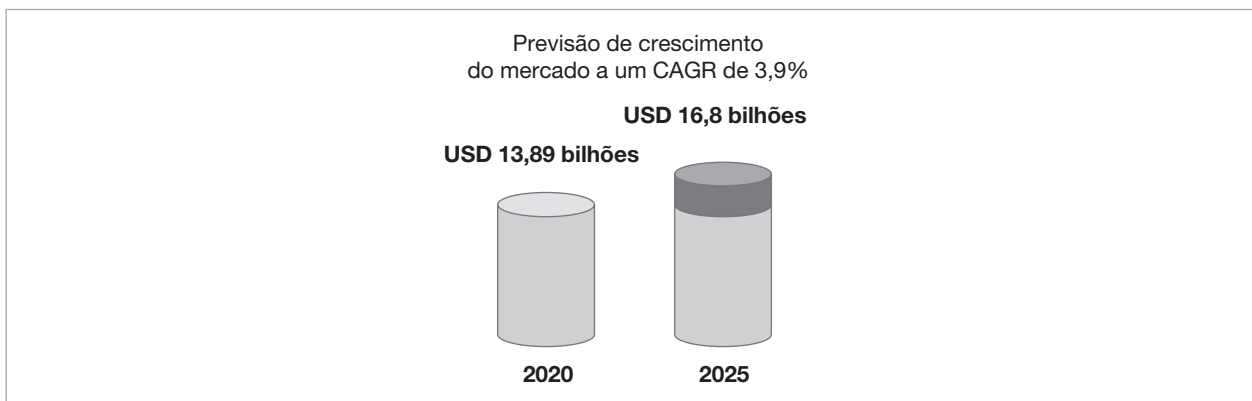


FIGURA 1.8 Brazilian Biotechnology Market.
 CARG: taxa de crescimento anual composta.
 Fonte: Adaptado de Research and Markets (2022).

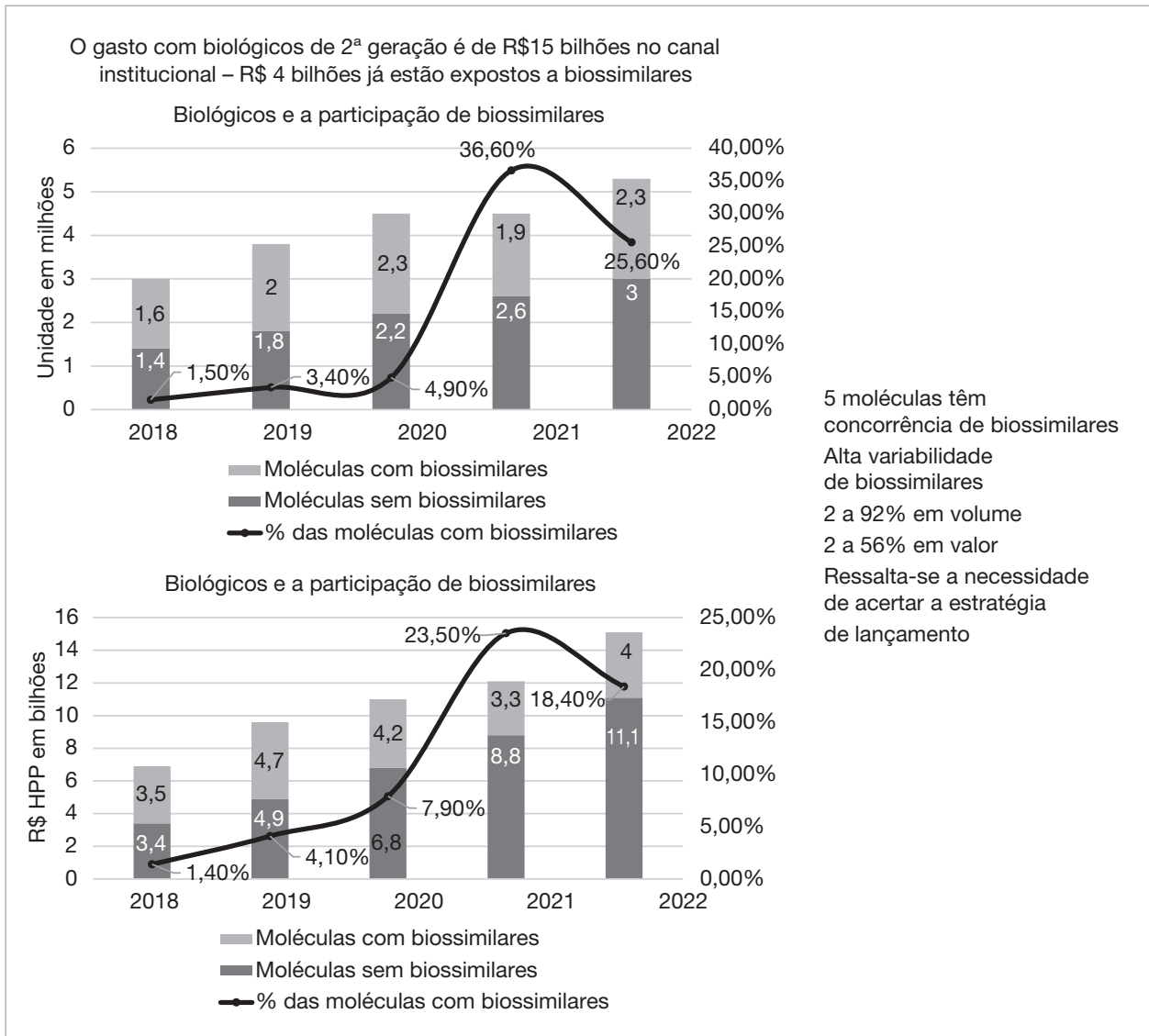


FIGURA 1.9 Gasto com biológicos de 2ª geração.

* Inclui somente anticorpos monoclonais + etanercepte; ** Considerando somente moléculas onde já foram lançados biossimilares.
 Fonte: IQVIA (2022).

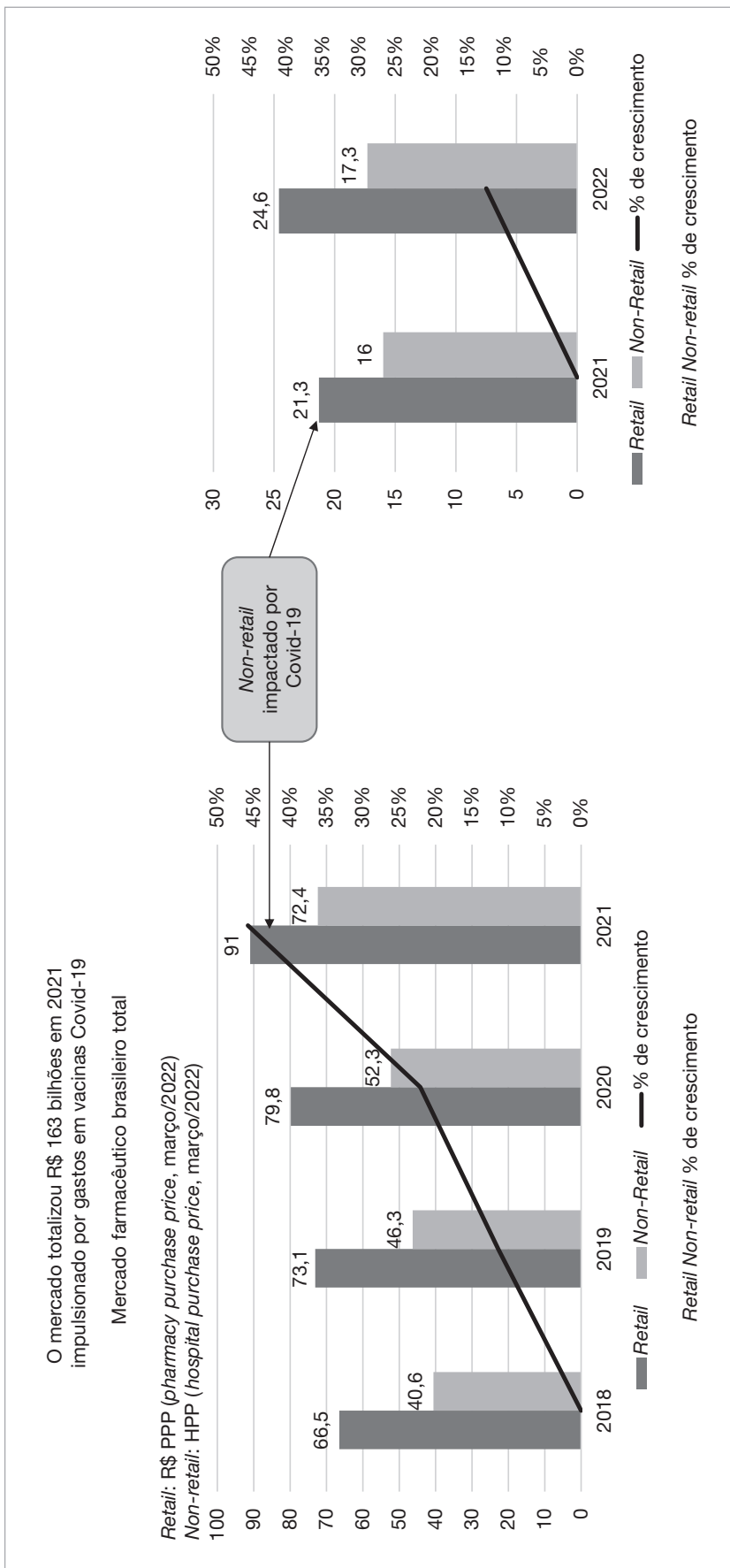


FIGURA 1.10 Gastos em vacinas.
Fonte: IQVIA (2022).

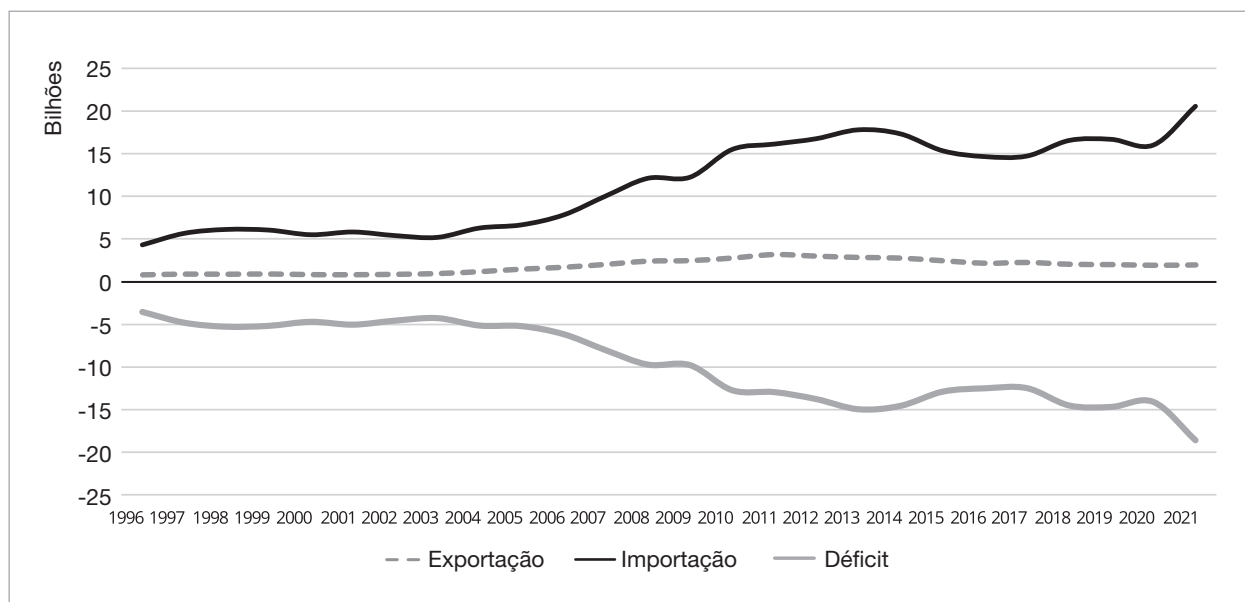


FIGURA 1.11 Balança comercial da saúde.

Fonte: Adaptado de Gadelha (2023).

TABELA 1.5 Biofármacos

Biofármaco	Descrição
Adalimumabe	Artrite reumatoide, artrite psoriásica, espondilite anquilosante, doença de Crohn, hidradenite supurativa, artrite idiopática juvenil e uveíte.
Alfataliglicerase	Doença de Gaucher.
Alfainterferona 2b	Hepatites causadas pelos vírus B e C.
Alfaepoetina	Anemia associada à doença renal crônica.
Infliximabe	Artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriásica, doença de Crohn, retocolite ulcerativa e psoríase.
Betainterferona 1a	Esclerose múltipla.
Etanercepte	Artrite reumatoide, espondilite, artrite psoriásica e psoríase.
Somatropina	Hipopituitarismo e síndrome de Turner.
Rituximabe	Linfomas não Hodgkin e artrite reumatoide.
Trastuzumabe	Câncer de mama tipo HER2 positivo.
Golimumabe	Artrite reumatoide, espondilite anquilosante e artrite psoriática.

Fonte: Bio-Manguinhos (2023).

Com o domínio das tecnologias para a produção nacional e o fornecimento de importantes produtos biotecnológicos com preços reduzidos por Bio-Manguinhos e outros produtores (como a Biobrás), houve uma importante economia aos cofres públicos, conforme apresentado na Figura 1.13. Esse cenário contribuiu para o aumento do acesso da população a esses produtos.

Nas seções a seguir, discutiremos a história da biotecnologia no país, iniciando pelos estudos de caso da Biobrás, uma das pioneiras de inovação e empreendedorismo em biotecnologia industrial no país.

1.5 O CASO BIOBRÁS, INICIATIVA PRIVADA PIONEIRA EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA NO BRASIL E NA AMÉRICA LATINA

A Biobrás (Bioquímica do Brasil S.A.) foi criada no início da década de 1970 a partir da visão empreendedora do médico e cientista Marcos Luiz dos Mares Guia (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2023). Discípulo de José Baeta Vianna, Mares Guia obteve seu Ph.D. em Enzimologia pela Universidade Tulane, Estados Unidos, com bolsa da Fundação Rockefeller, realizando pesquisas que elucidaram o sítio ativo da tripsina. Em seu retorno ao Brasil, docente da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e financiado por um *grant* do NIH, estabeleceu um laboratório no Departamento de Bioquímica da Universidade, e, ao lado do Prof. Carlos

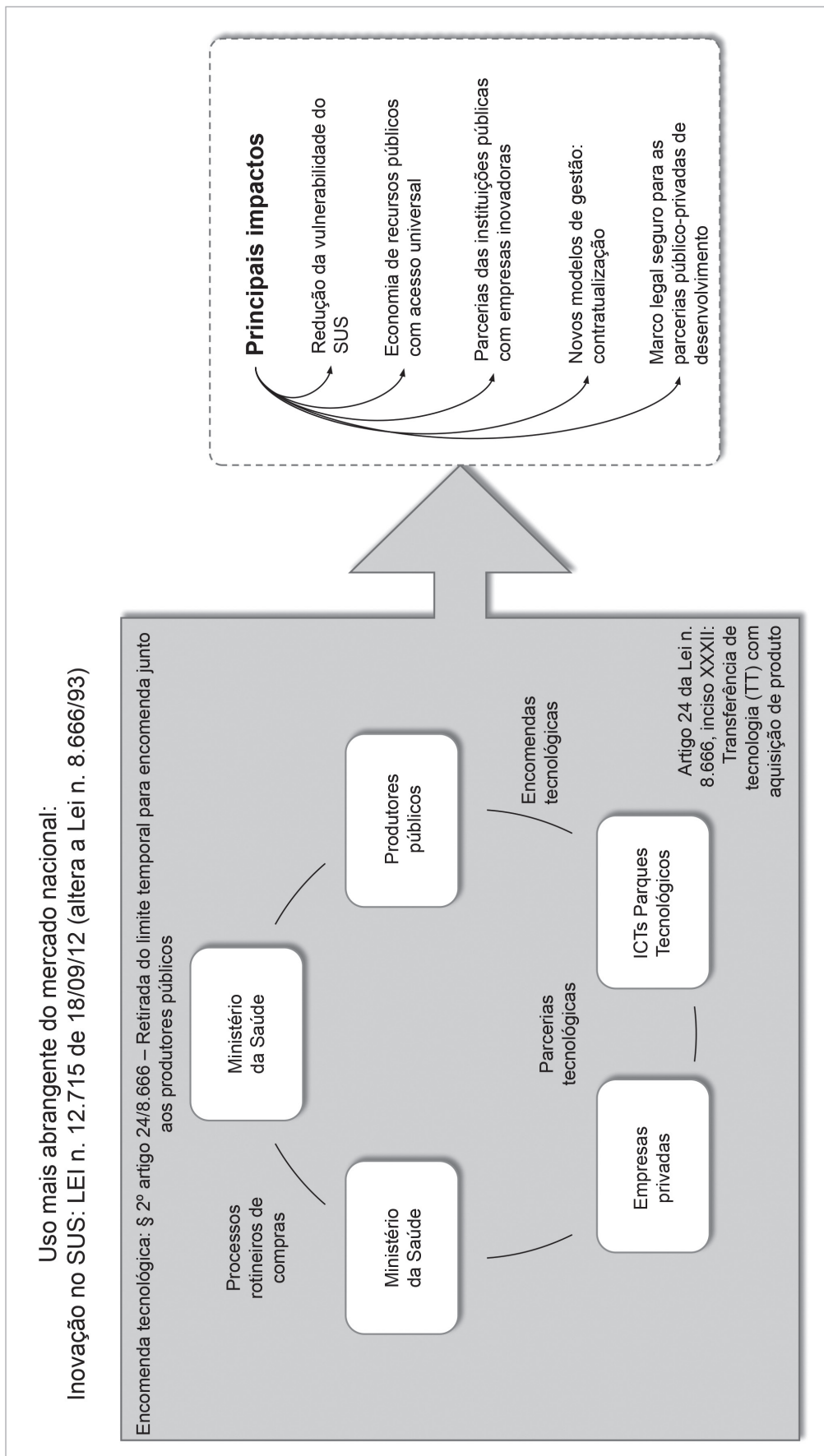


FIGURA 1.12 Inovação no SUS – encomenda tecnológica.
Fonte: Elaborado com base em SCTIE (2015).

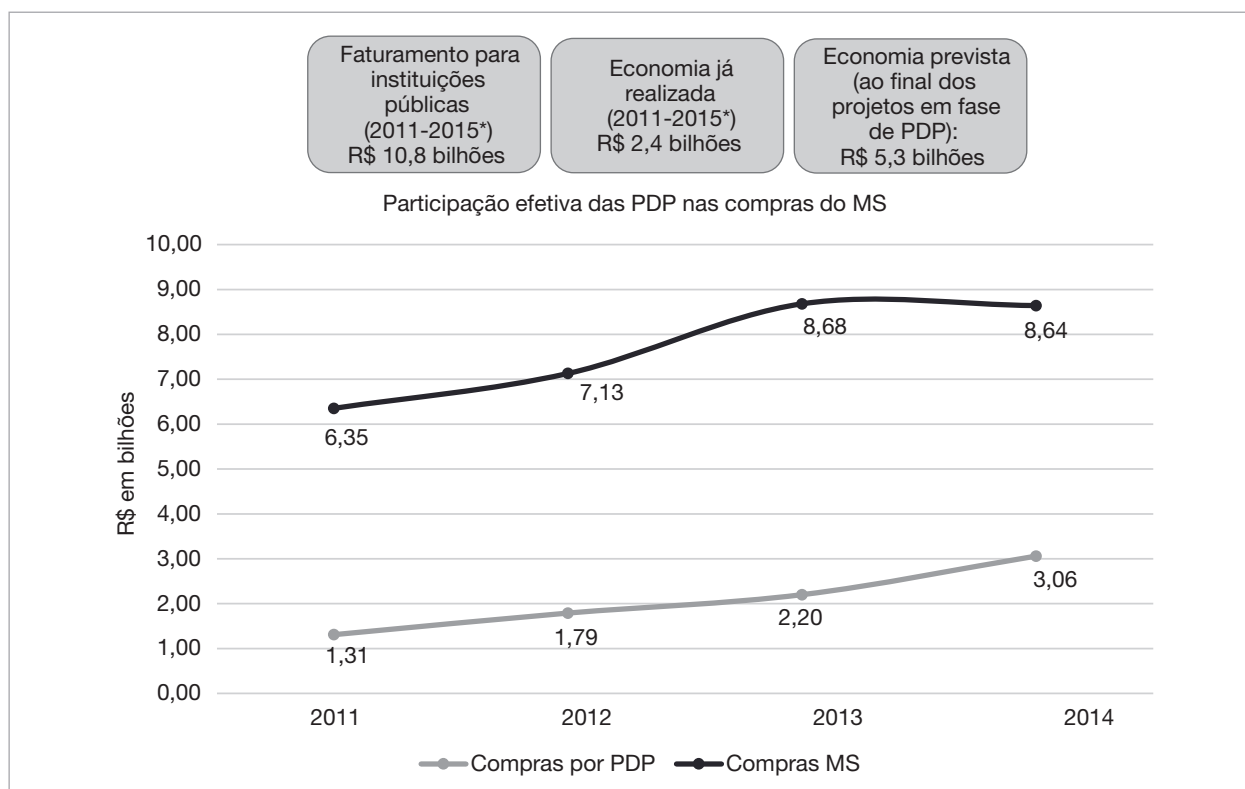


FIGURA 1.13 PDP – avanços e resultados.

*2015 – Ano em que a pesquisa foi realizada, portanto refere-se a valor parcial.

Fonte: Adaptado de SCTIE (2015).

Ribeiro Diniz, iniciaram estudos com enzimas visando à pesquisa básica e aplicação biotecnológica (CANAL DA CIÊNCIA, 2022; CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022a, 2022b; JUDICE; VEDOVELLO, 2007). No final dos anos 1960, com a participação de seu irmão Walfrido, então estudante do último ano de Engenharia Química, desenvolvem processos para a extração de renina, bromelina e outras enzimas para utilização na produção de queijo, atividade relevante em Minas Gerais, então o maior produtor do Brasil (entrevista com Walfrido Silvino dos Mares Guia Neto, um dos sócios-fundadores da Biobrás, 2022).

Em 1971, Marcos e Walfrido Mares Guia, em sociedade com Guilherme Emrich, fundam a Biobrás, com o objetivo inicial de produzir enzimas para a indústria de alimentos, têxtil e de saúde humana (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022a; JUDICE; VEDOVELLO, 2007). Em 1973, a empresa aprovou um projeto junto à Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE) e, em 1974, o então Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico (BNDE) se juntou a outros investidores, realizando aporte na empresa e prestando assessorias fundamentais para o seu desenvolvimento. Assim, a empresa investiu na formação de recursos hu-

manos e parcerias com a academia, adquirindo massa crítica suficiente para construir uma fábrica em Montes Claros (MG), cuja inauguração ocorreu em 1976 (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022a, 2022b). De 1977 a 1979, a empresa desenvolveu diversos novos processos e produtos, consolidando competências tecnológicas que a tornaram grande produtora de enzimas, sobretudo as extraídas de pâncreas bovino, inclusive competindo com empresas multinacionais (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022a, 2022b; JUDICE; VEDOVELLO, 2007).

Nesse período, a visão científica somada à empreendedora leva a Biobrás a buscar parceria para a produção de insulina, evolução natural de sua base tecnológica. Sob a liderança de Guilherme, as negociações resultaram na criação de uma *joint venture* (JV), a Biofar, com uma participação acionária de 46% da empresa americana Eli Lilly e 54% da Biobrás (FERREIRA, 2007; entrevista com Walfrido Silvino dos Mares Guia Neto, 2022). A Eli Lilly, por sua vez, visualizou uma oportunidade de ampliar a sua capacidade produtiva para suprir o mercado americano a partir da competência instalada no Brasil, que dominava a base necessária para a produção de proteínas pancreáticas (CASSIOLATO et al., 2011; FERREIRA, 2007; JUDICE; VEDOVELLO, 2007; FONSECA, 2009).

A partir desse evento, ocorre intensa atividade de treinamento do pessoal da Biobrás nos Estados Unidos, com transferência de tecnologia integral para a produção de cristais de insulina bovina em Montes Claros. Paralelamente, foi construída a fábrica de insulina com recursos da Lilly e dos fundadores por meio do programa de financiamento do BNDE e da abertura de capital no mercado brasileiro (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022a). A disseminação do conhecimento trazido para o Brasil por líderes técnico-científicos, como Luciano Vilela e Marco Aurélio Xavier, ocorreu rapidamente. A partir disso, com o objetivo de obter certificação do FDA, a Biobrás aprimorou consistentemente seus processos, padrões regulatórios, garantia e controle de qualidade, capaz de processar inicialmente 4,5 toneladas de pâncreas por dia e, com melhorias de processo desenvolvidas internamente, logo atingir 10 toneladas por dia (GUIA, 2022a, 2022b). Em 1979, a empresa obteve a aprovação do FDA e passou a exportar cristais de insulina bovina para os Estados Unidos, utilizados pela Lilly para a produção do medicamento utilizado no país (GUIA, 2022b).

Em 1982, a Biobrás adquire a participação da Eli Lilly na JV e passa a investir no desenvolvimento de capacidades para formular, envasar e embalar, completando o domínio da fabricação integral de insulina (IFA e produto acabado) no Brasil (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022b; JUDICE; VEDOVELLO, 2007). Paralelamente, a empresa estabelece novas colaborações com a academia brasileira, visando desenvolver novos processos e produtos. Dentre estes, vale ressaltar projeto com o Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP), para o desenvolvimento de insulina humana semissintética, obtida a partir da transpeptidação enzimática da insulina suína (GUIA, 2022b).

Nesse contexto, a Biobrás supria 80% do mercado nacional, tornou-se a quarta produtora mundial de insulina e exportava para mais de 20 países um produto de alta qualidade e produzido com processos de purificação aprimorados localmente. Isso resultou em um impacto clínico e social relevante para milhões de pacientes com diabetes do Brasil e do mundo (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022a, 2022b).

Nesse mesmo período, Marcos Mares Guia iniciava ações estratégicas que culminaram no desenvolvimento da insulina humana recombinante brasileira. Considerando a evolução tecnológica e mercadológica desencadeada pelo evento inaugural da indústria de biotecnologia farmacêutica, ocorreu o lançamento da insulina Humulin pela Eli Lilly a partir de tecnologia desenvolvida pela também americana Genentech (GUIA, 2022a, 2022b).

Novamente, a Biobrás firma acordos de colaboração com a academia brasileira, em particular com a Uni-

versidade de Brasília (UnB) para o desenvolvimento de insulina produzida em bactérias *E. coli* e, também, com a USP e a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) para o desenvolvimento em plataforma de leveduras (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022b). A empresa avança na parceria com a UnB, cuja plataforma de expressão bacteriana demonstra ser a mais promissora. Também firma colaborações com instituições da Alemanha, Rússia e Suécia para solucionar desafios específicos do desenvolvimento do processo de produção da insulina humana recombinante (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022b).

A colaboração fundamental com a UnB e as instituições do exterior culminam na criação de um vetor e um processo inovadores para obtenção da insulina humana recombinante de maneira eficiente. Essa inovação foi definitivamente protegida no ano 2000, com a concessão pelo USPTO, Estados Unidos, da então quarta patente mundial relacionada à produção de insulina, proteção posteriormente replicada via PCT em diversos outros países relevantes, incluindo o Brasil (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022b).

Esse feito pioneiro da biotecnologia nacional foi possível graças ao contínuo investimento em P&D (7% a 10% do faturamento da empresa), aos recursos humanos altamente qualificados e à competência fabril desenvolvidos a partir de uma plataforma tecnológica que evoluiu ao longo dos anos (CASSIOLATO et al., 2011; GUIA, 2022b). Ao final desse ciclo, a Biobrás chegou a produzir 100 quilos de insulina humana recombinante em sua fábrica de Montes Claros (MG), suficientes para a formulação de milhões de frascos do produto acabado, utilizando tecnologia própria, apta a competir com as maiores multinacionais do setor (GUIA, 2022b).

Em 2001, diante das incertezas de continuidade da sustentabilidade do negócio no Brasil, levando em consideração impactos de eventos de práticas concorrenciais deletérias e ausência de visão estratégica do Governo Federal quanto à importância de manutenção da produção local de biofármacos, a Biobrás é adquirida pela dinamarquesa NovoNordisk, que posteriormente descontinua a produção de cristais de insulina em Montes Claros, passando a importar o IFA da Europa e fabricar o produto final no Brasil (CASSIOLATO et al., 2011; FERREIRA, 2007).

A aquisição da empresa pela NovoNordisk cursa com a criação da Biom, *spin-off* criada pelos sócios fundadores da Biobrás, que mantém a propriedade intelectual, o *know-how* e os profissionais, sobretudo de P&D, essenciais para o domínio da tecnologia de produção da insulina humana recombinante (CASSIOLATO et al., 2011; FERREIRA, 2007; GUIA, 2022a, 2022b).

Nesse momento, há um hiato na evolução da biotecnologia farmacêutica no Brasil, durante o qual a

produção de IFA biotecnológico é interrompida por mais de 10 anos. Enquanto isso, países como a Coreia do Sul, China e Índia avançam vigorosamente na implementação contínua de políticas estratégicas de investimento e incentivos para o desenvolvimento de indústrias locais de biotecnologia (FERREIRA, 2007; GUIA, 2022b).

Essa lacuna volta a ser preenchida aos poucos, de certa forma tardiamente, quando comparada aos países mencionados, a partir de investimentos de empresas privadas nacionais e laboratórios públicos. No princípio individualmente, com projetos específicos, e logo também por meio de parcerias público-privadas estimuladas pela política do Complexo Econômico e Industrial da Saúde, em particular pelas PDPs.

A partir das PDP surgem novas empresas de biotecnologia farmacêutica e parcerias com multinacionais interessadas em transferir, integralmente, as tecnologias de produção de medicamentos biológicos. As PDP incluem os produtos de alta complexidade, envolvendo laboratórios públicos e um compromisso em buscar realizar o *catch-up* que pode permitir que o país volte a dominar essas competências em biotecnologia (BNDES, 2020).

O papel da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BNDES, 2020), que lucidamente implementou regulamentação robusta para biológicos e biossimilares no Brasil, também tem sido extremamente relevante para guiar um desenvolvimento da produção local de forma alinhada aos requisitos mais rigorosos, similares aos praticados pela Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – traduzido do inglês *Food and Drug Administration*) e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA – traduzido do inglês *European Medicines Agency*).

O movimento de investimentos e desenvolvimentos em biotecnologia farmacêutica que volta a ocorrer sobretudo a partir de 2012 (BNDES, 2020), mais de 10 anos após a venda da Biobrás, representa uma segunda chance para o Brasil participar de uma oportunidade global, buscando preencher a lacuna tecnológica em medicamentos biológicos em um país que até há pouco era o único entre os 20 maiores mercados farmacêuticos que não produzia localmente IFA biotecnológico.

A trágica pandemia de Covid-19 trouxe à tona a importância, para todo o mundo, de investir em competências locais de desenvolvimento e produção em biotecnologia farmacêutica, questão de soberania e, nos Estados Unidos, questão de defesa nacional. O Brasil, com um histórico bem-sucedido no setor público, representado pelos centenários Bio-Manguinhos/Fiocruz e Instituto Butantan, e no setor privado pela pioneira Biobrás, tem à frente a missão de resgatar, implementar e consolidar o domínio de tecnologias essenciais para o desenvolvimento do país e garantia do acesso dos pacientes brasileiros a medicamentos de alta complexidade.

1.6 A HISTÓRIA DA DIMENSÃO REGULATÓRIA DA BIOTECNOLOGIA NO BRASIL

Um aspecto crucial da pesquisa biotecnológica diz respeito à complexa atividade regulatória, envolvendo uma ampla gama de agências e também questões relacionadas. Além disso, existem crescentes barreiras regulatórias no mercado global, que vêm dificultando maior protagonismo dos produtores dos países em desenvolvimento como o Brasil. Em trabalho recente (POSSAS et al., 2020), é descrita a atuação das principais instâncias regulatórias no país, como a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (Conep), a Anvisa, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), mostrando os seus importantes avanços e dificuldades em cada uma dessas instâncias.

Possas et al. (2020) também destacam a necessidade urgente de criação de mecanismos mais ágeis para a avaliação dos projetos de pesquisa e desenvolvimento. A próxima subseção apresenta um desses aspectos cuja trajetória se mostrou decisiva para o desenvolvimento da biotecnologia Brasil: a avaliação da biossegurança na pesquisa com organismos geneticamente modificados (OGMs), abrangendo ampla gama de projetos em instituições públicas e privadas na saúde humana, saúde animal, agricultura e meio ambiente.

1.6.1 CTNBio e a biossegurança: arcabouço institucional e marco legal na avaliação de produtos biotecnológicos com OGM

Nas décadas de 1980 e 1990, a tecnologia do DNA recombinante surgiu com enorme impacto e grande expectativa no meio científico e na sociedade. O seu extraordinário potencial de aplicação e as suas perspectivas e possibilidades eram tão amplas e abrangentes que as sociedades em todo o mundo passaram a exigir a sua regulação e o seu uso seguro.

Com essa perspectiva, diante do rápido avanço da ciência e da sua dimensão regulatória, foi necessário criar adequadas estruturas institucionais e procedimentos legais que permitissem a adequada avaliação de biossegurança de processos e produtos biotecnológicos envolvendo OGMs. Nesse complexo contexto global de controvérsias científicas e debates efervescentes, foi criada em nosso país a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). O seu marco inaugural foi a primeira reunião realizada em 19 de junho de 1996.

A CTNBio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) teve e tem um papel histórico e estratégico para o desenvolvimento da biotecnologia no Brasil, garantindo, no início de sua criação em 1996,

a biossegurança dos primeiros OGMs liberados para saúde humana no país. Em 2005, o Congresso Nacional aprovou finalmente a nova Lei de Biossegurança, a Lei n. 11.105/2005.

Desde a criação da CTNBio até 2005, pouco se investiu em biotecnologia no Brasil, o que dificultou a geração de *know-how* e massa crítica no setor de biotecnologia no país. A partir de 2005, com a nova Lei de Biossegurança, observou-se um avanço nas tecnologias que foram disponibilizadas aos diversos setores produtivos, garantindo não somente o desenvolvimento tecnológico do Brasil, mas também a biossegurança dos produtos em saúde humana, saúde animal, agricultura e meio ambiente, as quatro áreas de atuação da CTNBio, durante seus 25 anos de atuação.

A primeira década desde a criação da CTNBio foi um período muito intenso de consolidação do marco legal e institucional da biossegurança em nosso país, marcado por debates científicos acirrados e permeado em vários momentos pela influência de percepções políticas distintas. Apesar das dificuldades relatadas, a CTNBio conseguiu manter o debate somente no âmbito científico (BARROSO; FINARDI; SBAMPATO, 2021), o que lhe permitiu consolidar uma legislação de biossegurança reconhecida como uma das mais avançadas do mundo, assegurando a biossegurança e o desenvolvimento tecnológico de produtos essenciais à qualidade de vida da população brasileira. Trezentos e trinta e sete cientistas participaram dos trabalhos da CTNBio ao longo desses anos e doaram os seus conhecimentos e tempo ao país. O resultado desse esforço e do seu intenso trabalho da Comissão foi a edição de normas e tomada de decisões com elevado rigor científico para garantir a biossegurança dos OGMs.

A estrutura administrativa da Comissão foi concebida de maneira enxuta, formada por competentes técnicos do MCTI e pelo trabalho voluntário dos membros da CTNBio. Essa notável colaboração e dedicação permitiu que o país usufruísse com segurança de tecnologias inovadoras a um custo irrisório para o Estado brasileiro.

1.6.1.1 Descrição do arcabouço institucional e do marco legal

Projetos de pesquisa que utilizem OGMs são obrigatoriamente submetidos à avaliação da CTNBio, órgão colegiado vinculado ao MCTI apoiado por uma rede de 313 comitês locais de biossegurança (CIBios) em institutos de pesquisa e universidades. A existência da CTNBio é prevista na Lei de Biossegurança (Lei n. 11.105/2005), e essa legislação exige que qualquer projeto com OGM, como vacinas recombinantes e outros produtos biotecnológicos para a saúde humana, passe por uma criteriosa avaliação científica.

A CTNBio é o órgão responsável por essa avaliação, além da sua responsabilidade de acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico-científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia e bioética. São listadas nas próximas subseções o marco legal que orienta as avaliações de pesquisas e produtos com OGM. As comissões que a compõem são:

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio): órgão colegiado vinculado ao MCTI.

Comitês locais de biossegurança – CIBios: a CTNBio é apoiada por uma rede de 313 CIBios em institutos de pesquisa e universidades nos diversos estados brasileiros.

1.6.2 CTNBio: marco legal

- **Lei n. 11.105, de 24 de março de 2005 – Lei de Biossegurança:** regulamenta os incisos II, IV e V do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam OGMs e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB), revoga a Lei n. 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a medida provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei n. 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências.
- **Resolução normativa n. 14, de 4 de fevereiro de 2015:** altera o inciso IV do art. 5º, inclui o inciso XVII no art. 8º, altera o *caput* do art. 9º e os incisos II, IV e VI do art. 11, acrescenta o parágrafo único ao art. 16 e os arts. 17-A e 17-B, altera o item 6 e acrescenta o item 14 ao Anexo; altera os itens 3, 5 e 13 e acrescenta o item 17 ao Modelo de Relatório de Atividades do Anexo da Resolução Normativa nº 1, de 20 de junho de 2006.
- **Comunicado n. 5, de 24 de junho de 2008:** a CTNBio, no uso de suas atribuições estabelecidas no Decreto n. 5.591, de 22 de novembro de 2005, que regulamenta dispositivos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, e de acordo com deliberação da 114ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 19 de junho de 2008, determina: 1. A CIBio poderá autorizar atividades de importação, exportação e transporte de derivados de OGM da classe de risco 1 para uso exclusivo em pesquisa em regime de contenção. 2. A CIBio deverá informar em seu relatório anual de Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) todas as importações, exportações e transportes efetuados no período coberto pelo relatório. 3. Este comunicado não isenta as instituições de respeitar outras normas legais

- **Resolução normativa n. 2, de 27 de novembro de 2006:** dispõe sobre a classificação de riscos de OGMs e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção.
- **Resolução normativa n. 1, de 20 de junho de 2006:** dispõe sobre a instalação e o funcionamento das CIBios e sobre os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do CQB.
- **Instrução normativa n. 17, de 17 de novembro de 1998:** dispõe sobre as normas que regulamentam as atividades de importação, comercialização, transporte, armazenamento, manipulação, consumo, liberação e descarte de produtos derivados de OGM.
- **Instrução normativa CTNBio n. 13, de 1º de junho de 1998:** dispõe sobre as normas para importação de animais geneticamente modificados (AnGMs) para uso em trabalho em regime de contenção.
- **Instrução normativa CTNBio n. 4, de 19 de dezembro de 1996:** dispõe sobre as normas para o transporte de OGM.

O sucesso da atuação da CTNBio pode ser medido pelos seus resultados desde a sua criação. Foram avaliados para uso comercial mais de 200 produtos, que permitem ao país cultivar anualmente dezenas de milhões de hectares com plantas geneticamente modificadas e imunizar bilhões de animais com vacinas GM. Além disso, permite a proteção de milhões de brasileiros contra doenças, como na pandemia de Covid-19. Isso é possível por meio das vacinas, biofármacos e outros produtos biotecnológicos geneticamente modificados para a saúde humana.

Como bem sinalizaram o Presidente e os membros da CTNBio em publicação recente, “não há um só brasileiro que não use produtos contendo OGM todos os dias, e a CTNBio/MCTI se orgulha de garantir o uso seguro – sem prejuízos ao meio ambiente, à saúde humana e à saúde animal – ao longo de seus 25 anos de história” (BARROSO; FINARDI; SBAMPATO, 2021). Esse sucesso se deve à forma correta e cuidadosa como a CTNBio abordou o Princípio da Prudência ou da Precaução formulado pela Conferência de Asilomar, em 1975, que possibilitou a elaboração de diretrizes para a utilização adequada e segura do conhecimento científico na engenharia genética (BARROSO; FINARDI; SBAMPATO, 2021).

A postura precautória assumida pela Conferência de Asilomar contribuiu para a orientação do comportamento na atividade da pesquisa em engenharia genética, que fundamentaria o Princípio da Prudência ou Precaução que seria, posteriormente, objeto de

reflexão por diversos autores. Esse aspecto fundamentou, no cenário internacional, a atividade dos órgãos reguladores da atividade científica nesse campo em todo o mundo.

A conclusão mais importante, portanto, para fins do trabalho da CTNBio, em um momento decisivo para a consolidação da Comissão, foi o entendimento de que essa redação do Princípio da Precaução ou Prudência não deve implicar, necessariamente, em uma leitura literal, o impedimento da atividade biotecnológica. Implica, conforme bem mostra a atuação da CTNBio, a implementação de procedimentos ou medidas que efetivamente garantam a execução das atividades de manipulação genética em condições de biossegurança e de bioética capazes de assegurar a prevenção do potencial risco de dano, conforme previsto e dimensionado no Suplemento do Código de Ética de Manipulações Genéticas da revista do CGEE (POSSAS & MINARE, 2002; POSSAS & NEPOMUCENO, 2002).

Diante de desafios tão complexos, envolvendo a engenharia genética e a biotecnologia, o sucesso da CTNBio se deve ao fato, desde a sua criação, da visão de que cabe à comunidade científica, em parceria com os Ministérios envolvidos e as organizações da sociedade civil representadas na Comissão, a tarefa permanente de esclarecer e orientar o debate. Com essa perspectiva, a CTNBio possibilitou o adequado entendimento de como minimizar os riscos sem criar obstáculos para o desenvolvimento de processos e produtos biotecnológicos com OGMs tão necessários à humanidade, voltados à proteção da vida e do meio ambiente.

Finalmente cabe destacar que, apesar desses avanços no campo regulatório possibilitados pela CTNBio, em especial a partir de 2005 com as novas tecnologias disponibilizadas, a pesquisa e desenvolvimento da biotecnologia com OGMs ainda precisa percorrer um longo caminho em nosso país. Esse esforço irá requerer uma atividade indutora do Estado com financiamento sustentável e fortalecimento de parcerias público-privadas.

Como bem lembra o primeiro Presidente da CTNBio, Barreto de Castro, apesar do apoio do PADCT, a biotecnologia como geradora de tecnologias com OGMs não se desenvolveu no Brasil com o ímpeto que se observou nos Estados Unidos nas décadas 1970 e 1980, e os estímulos ao seu desenvolvimento permanecem insuficientes. Isso é surpreendente porque a participação brasileira na produção científica foi multiplicada por seis nos últimos 50 anos a partir de 0,4% na década de 1970.

A área de formação de recursos humanos do Brasil desenvolveu massa crítica com competência científica em praticamente todos os setores da biotecnologia de ponta e em alguns setores específicos. Entretanto, os recursos para ciência e tecnologia na pesquisa biotecnológica

seguem limitados, e a formação de recursos humanos e a participação do setor privado em investimentos na área permanecem modestas (BARROSO; FINARDI; SBAMPATO, 2021). Como bem lembra o autor, apenas com a reversão desse quadro a biotecnologia brasileira obterá o reconhecimento internacional que merece, pelo seu potencial resultante da sua biodiversidade, como grande fonte de genes, uma das principais matérias-primas da biotecnologia do próximo século.

1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síntese apresentada sobre a evolução da biotecnologia aponta para um avanço acelerado da pesquisa, desenvolvimento e inovação em escala mundial em diversos setores da atividade econômica. O crescimento da biotecnologia na saúde humana tem resultado em avanços, com novos e inovadores produtos biotecnológicos como vacinas e biofármacos. Assim, países desenvolvidos e boa parte dos países emergentes ampliaram nas últimas décadas rapidamente o seu investimento no setor, aumentando de forma expressiva a sua competitividade. Em contraste, o Brasil, se mantidas as atuais condições de inexpressivo investimento no setor, continuará dependente de importação desses produtos de alto valor agregado e tão importantes para o bem-estar da sociedade, causando, como observado, enorme déficit na balança comercial da saúde.

Em que pesem essas limitações, é importante reconhecer que, graças ao entendimento do Governo Federal da importância de se incorporar à produção nacional esses importantes insumos biotecnológicos, com a criação do PDP e com a utilização do poder de compra do estado, o país vem internalizando a produção de inúmeros biofármacos de grande importância para a Saúde Pública. Essa estratégia, que deve ser fortalecida de forma sustentável em longo prazo, propiciará maior acesso à população brasileira desses produtos críticos, permitindo substancial economia de recursos financeiros e um enorme aumento da capacidade nacional de produção de biofármacos no país.

O grande desafio brasileiro é, portanto, superar urgentemente o baixo investimento em Ciência e Tecnologia, o que, se persistir, manterá o país cada vez mais dependente de importação de produtos e tecnologias de ponta. Comparando os valores dos investimentos realizados pelas empresas farmacêuticas multinacionais e governos de países desenvolvidos, os países mais desenvolvidos aumentaram os seus investimentos em Ciência e Tecnologia de forma significativa, alcançando US\$ 66 bilhões de dólares no ano de 2021. Com isso, esses países certamente manterão a sua liderança em inovação tecnológica nesse campo.

Para mudar essa situação, o Brasil precisa definir urgentemente uma Política de Estado sustentável em longo prazo para o fortalecimento das atividades de Ciência e Tecnologia, assegurando as atividades estratégicas de pesquisa translacional para desenvolver novos insumos e produtos biotecnológicos. Além disso, deve buscar formas inovadoras de captar e apoiar investimentos privados e o fortalecimento das parcerias público-privadas, reduzindo a inaceitável dependência nacional de importação de conhecimentos, tecnologias, insumos e produtos importantes para a saúde pública (Figura 1.9 e Figura 1.10).

REFERÊNCIAS

1. ABDI. **Relatório Maio de Acompanhamento Setorial**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/11055449-Relatorio-de-acompanhamento-setorial-incorporacao-da-rotabiotecnologica-na-industria-farmaceutica-brasileira-desafios-e-oportunidades.html>>. Acesso em: 2 fev. 2023.
2. ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. **Marcos Luiz Dos Mares Guia**. Disponível em: <<http://www.abc.org.br/nacional/divulgacao-cientifica/ciencia-gera-desenvolvimento/3o-video-marcos-luiz-dos-mares-guia/>>. Acesso em: 28 maio 2023.
3. BARROSO, P. A. V.; FINARDI, F.; SBAMPATO, I. **CTNBio 25 anos: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança sob o olhar de seus presidentes**. Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 2021.
4. BIOLATINAMERICA. **Brazilian Biotech Sector Overview**. Disponível em: <<https://biolatinamerica.com/brazilian-biotech-sector-overview/>>. Acesso em: 4 fev. 2023.
5. BIOMANGUINHOS. Portfólio de biofármacos; 2023. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/biofarmacos>. Acesso em 18/08/2023.
6. BNDES. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro: BNDES, 2020.
7. BNDES. **Pronaf ABC+ Bioeconomia**. Disponível em: <<https://www.bndes.gov.br/wps/portal/site/home/financiamento/produto/pronaf-bioeconomia>>. Acesso em: 2 fev. 2023.
8. BUD, R. Biotechnology in the Twentieth Century. **Social Studies of Science**, v. 21, n. 3, p. 415-57, 29 ago. 1991.
9. CANAL DA CIÊNCIA. **Mares Guia**. Disponível em: <<https://antigo.canalciencia.ibict.br/ciencia-brasileira-3/notaveis/406-mares-guia>>. Acesso em: 28 maio 2023.
10. CASSIOLATO, J. E. et al. The Recent Evolution of the Biotech Local Innovation System of Minas Gerais: University, Local Firms and Transnational Corporations. In: **Biotechnology and Innovation Systems**. Cheltenham: Edward Elgar Publishing, 2011.
11. CNPq. **Principais Realizações em 1982**. Disponível em: <<https://centrode memoria.cnpq.br/realiz82.html>>. Acesso em: 2 fev. 2023.
12. COMEX STAT. **Exportação e Importação Geral**. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>>. Acesso em: 23 jun. 2023.
13. DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental Biology**, v. 278, n. 2, p. 274-88, fev. 2005.
14. ELSON, D.; CHARGAFF, E. On the desoxyribonucleic acid content of sea urchin gametes. **Experientia**, v. 8, n. 4, p. 143-5, abr. 1952.

15. EMBRAPA. **EMBRAPA Biotecnologia**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/biotecnologia>>. Acesso em: 2 fev. 2022.
16. ERNST AND YOUNG. **How do biotechs stay the course in uncharted waters?** Londres, 2022. Disponível em: <https://assets.ey.com/content/dam/ey-sites/ey-com/en_us/topics/life-sciences/ey-beyond-borders-2022-report-v8-web-hires.pdf>.
17. FERREIRA, B. **Produção pública de insulina**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2007.
18. FONSECA, M. G. D. et al. Instituto de Economia da UFRJ & Instituto de Economia da UNICAMP. Perspectivas do Investimento em Ciência. Projeto perspectivas do investimento no Brasil. Bloco: economia do conhecimento. Sistema produtivo: baseados em ciência (2009).
19. FREIRE, C. T. **Mapeamento da Biotecnologia no Brasil 2011**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://oic.nap.usp.br/wp-content/uploads/2011/08/08-08-2011-CarlosTorresFreire-Brazil-BiotecMap.pdf>>.
20. GADELHA, C. A. G. O Complexo Econômico-Industrial da Saúde 4.0: por uma visão integrada do desenvolvimento econômico, social e ambiental. **Cadernos do Desenvolvimento**, v. 16, p. 1-26, 2021.
21. GADELHA, C. A. G. **O Complexo Econômico-Industrial da Saúde - Saúde como vetor de uma nova estratégia nacional de desenvolvimento: uso estratégico do poder de compra do Estado**. Apresentação CÂMARA DOS DEPUTADOS COMISSÃO DE SAÚDE AUDIÊNCIA PÚBLICA, 2023. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/apresentacoes-em-eventos/arquivos/audiencia-publica-sobre-as-parcerias-de-desenvolvimento-produtivo-apresentacao-carlos-gadelha-ministerio-da-saude>>. Acesso em: 25 ago. 2023.
22. GUIA, T. M. **Entrevista com Walfrido Silvino dos Mares Guia Neto, um dos sócios-fundadores da Biobrás [Entrevista concedida a Thiago Mares Guia]**. Rio de Janeiro, 2022a.
23. GUIA, T. M. **Entrevista com Luciano Vilela, Diretor de Tecnologia da Biobrás [Entrevista concedida a Thiago Mares Guia]**. Rio de Janeiro, 2022b.
24. IQVIA. **As dinâmicas e tendências do mercado farmacêutico no Brasil**. Disponível em: <https://sindusfarma.org.br/uploads/files/229d-gerson-almeida/Publicacoes_PPTs/Forum_2023_Sydney_Clark_IQVIA.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2023.
25. JUDICE, V.; VEDOVELLO, C. **Projeto "Estudo Comparativo dos Sistemas de Inovação no Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul" - BRICS**. Disponível em: <https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/10.+Biotechnology+Final_3606.pdf/74099978-e068-4f81-8831-bbd7ea3f589f?version=1.0>. Acesso em: 28 maio 2023.
26. KESWANI, C. et al. **Agricultural Bioeconomy: Innovation and Foresight in the Post-Covid Era**. Massachusetts: Academic Press, 2022.
27. KHORANA, H. G. Total synthesis of a gene. **Science**, v. 17, n. 12, p. 614-25, 19 dez. 1979.
28. MARTIN, D. K. et al. A brief overview of global biotechnology. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. sup1, p. S5-S14, 19 fev. 2021.
29. NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1968**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/summary/>. Acesso em: 2 fev. 2023a.
30. NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1978/summary/>. Acesso em: 2 fev. 2023b.
31. OECD. **Key biotechnology indicators**. Disponível em: <https://www.oecd.org/innovation/inno/keybiotechnologyindicators.htm>. Acesso em: 2 fev. 2023.
32. OECD. Modern Biotechnology and the OECD. **Policy Brief**, p. 1-8, 1999.
33. OGBU, J. U.; NAMAYANJA, A. Agricultural Biotechnology. In: **Agricultural Technology for Colleges**. Revised Edition. Nigeria: Dominion Publisher Services, 2021. p. 583-96.
34. OKAZAKI, T.; HONJO, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. **International Immunology**, v. 19, n. 7, p. 813-24, 22 jun. 2007.
35. OLSON, M. V. The human genome project. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 10, p. 4338-44, 15 maio 1993.
36. PIMENTEL, V. P. et al. Saúde como desenvolvimento: perspectivas para atuação do BNDES no complexo industrial da saúde. In: BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (Ed.). **BNDES 60 anos: perspectivas setoriais**. 1. ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2012. p. 329-32.
37. POSSAS, C. et al. Vacinas e Vacinações no Brasil: Agenda 2030 na Perspectiva do Desenvolvimento Sustentável. In: Homma A, Possas C. Noronha J, Gadelha P. **Vacinas e Vacinação no Brasil: Horizontes para os Próximos 20 Anos**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2020. p. 17-201.
38. POSSAS, C.; MINARE R. The ethical principle of prudence or precaution in genetic engineering: implications for human health and the environment. **Strategic Partnerships CGEE**, v. 16, p. 183-91, 2002.
39. POSSAS, C.; NEPOMUCENO, A. Bioethics in activities with genetically modified plants: contribution to the code of ethics in genetic manipulation. **Strategic Partnerships CGEE**, v. 16, p. 163-81, 2002.
40. PROFISSÃO BIOTEC. **Mapa Profissão Biotec**. Disponível em: <<https://www.mapa.profissaobiotec.com.br/>>. Acesso em: 4 fev. 2023.
41. REIS, C.; PIERONI, J. P.; SOUZA, J. O. B. DE. Biotecnologia para saúde no Brasil. In: BNDES (Ed.). **BNDES Setorial**. Brasília: BNDES, 2010. p. 193-230.
42. RESEARCH AND MARKETS. **Report Brazil Biotechnology Market**. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/5694020/brazil-biotechnology-market-summary-competitive>>. Acesso em: 6 jun. 2023.
43. SALVATI, C. **Lançamento do Mapa de Empresa de Biotecnologia do Profissão Biotec**. Disponível em: <<https://www.linkedin.com/uas/login-submit>>. Acesso em: 28 jan. 2023.
44. SARDENBERG, R. M. **Política Nacional de C&T e o Programa de Biotecnologia do MCT**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2000.
45. SCTIE. **Complexo Industrial da Saúde**. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/apresentacoes-em-eventos/eventos-2015/PDP_DECIS_CONGRESSO.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2023.
46. SLYKE, D. D. VAN; JACOBS, W. A. **Phoebus Aaron Theodor Levene**. Volume XXI. New York: National Academy of Sciences, 1940.
47. WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-8, 25 abr. 1953.

Fundamentos da biotecnologia: tecnologia do DNA recombinante e sistemas de expressão

Daniel André Ribeiro

Maíra Peixoto Pellegrini

Gabriela dos Santos Esteves

Lígia Tereza Bertolino

Neste capítulo, é discutida a tecnologia do DNA recombinante e os sistemas de expressão. O capítulo inicia-se com uma contextualização sobre o tema. Em seguida, aborda a clonagem e expressão. Posteriormente, avança mostrando os sistemas de expressão mais utilizados para proteínas terapêuticas. Nesse sentido, discute-se em profundidade sobre os sistemas de expressão bacteriano, de leveduras, de células de inseto, de células de mamíferos, de vegetais e de animais transgênicos.

2.1 DNA RECOMBINANTE E SISTEMAS DE EXPRESSÃO: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO

A possibilidade da manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA – traduzido do inglês *deoxyribonucleic acid*), agregado ao conhecimento de que a síntese proteica em nível ribossomal é um processo universalmente conservado, permitiu a síntese de proteínas em sistemas hospedeiros heterólogos. Em 1972, Paul Berg produziu pela primeira vez rDNA (DNA recombinante – molécula gerada a partir da junção de dois fragmentos de DNA de origem diferente), e, um ano depois, a equipe liderada por Herbert Boyer transformou geneticamente células de *Escherichia coli* com plasmídeo recombinante (COHEN et al., 1973; JACKSON; SYMONS; BERG, 1972).

A partir da década de 1980, houve uma corrida das indústrias biotecnológicas para a produção de proteínas recombinantes em diversos sistemas de expressão para propósitos variados, como vacinas, biofármacos e insumos utilizados em diagnósticos. O primeiro exemplo da produção biotecnológica para saúde é a insulina, proteína recombinante terapêutica utilizada no controle do diabetes. Inicialmente, essa molécula era isolada de fontes animais (bovinos e suínos), porém tinha elevado

risco de causar reações extremamente alergênicas nos indivíduos que utilizavam a medicação.

Em 1978, as empresas Genentech e Eli Lilly and Co. trabalharam conjuntamente para expressar a insulina humana recombinante em *E. coli* K-12. O processo de obtenção dentro das especificações da Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – traduzido do inglês *Food and Drug Administration*) foi alcançado em 1982 e passou a ser produzida e distribuída pela empresa Eli Lilly and Co. Considerando o desenvolvimento de vacinas, a primeira proteína recombinante, produzida como imunizante, foi o antígeno de superfície da hepatite B (rHBsAg). Essa proteína foi expressa em leveduras *S. cerevisiae* e aprovada pelo FDA em 1986 (WALSH; WALSH, 2022).

2.2 CLONAGEM E EXPRESSÃO

A expressão da proteína de interesse é iniciada pela construção de um vetor adequado. O vetor consiste em uma molécula de ácido nucleico, podendo ser um plasmídeo (moléculas de DNA que têm a capacidade de replicação independente do DNA cromossômico) ou um vírus, que tem a função de carregar a informação genética para a produção da proteína de interesse.

O vetor possui diversos componentes que exercem funções específicas para a expressão da proteína de interesse, sendo eles: (i) promotores, região do DNA reconhecida pela maquinaria celular para o início da transcrição; (ii) potenciadores, mais conhecidos como *enhancers*, que têm a função de melhorar a expressão do gene de interesse; (iii) cassete de seleção, que consiste em um conjunto de elementos necessários para expressar um gene de seleção (ex.: gene que confere resistência a um antibiótico), responsável por selecionar as células que receberam o vetor de expressão; (iv) origem de replicação, região do DNA reconhecida por proteínas celulares responsáveis pela replicação do vetor; (v) sítio múltiplo de clonagem, região do vetor que contém sítios de enzimas de restrição (responsáveis por cortar o DNA em sequências específicas) utilizados para inserção do gene de interesse. As etapas iniciais de construção dos vetores de expressão são realizadas em bactérias. Portanto, é necessário que haja elementos que promovam a replicação (origem de replicação) e seleção (cassete de seleção) do plasmídeo em procarionotos.

Uma vez construído, esse vetor será utilizado no sistema de expressão heterólogo escolhido. Sendo assim, também é necessário que existam elementos de repli-

cação e seleção reconhecidos pelo sistema de expressão selecionado. A Figura 2.1 mostra a estrutura de um vetor plasmidial (o mais utilizado para clonagem do gene de interesse) para expressão em células de mamíferos.

Em todas as células vivas, a expressão do gene ocorre por meio da informação genética contida no DNA, transmitida ao RNA no processo de transcrição e, em seguida, do RNA para proteínas no processo de tradução. Assim, o corpo sintetiza o RNA e depois as proteínas, de acordo com as instruções contidas no DNA. O processo de transcrição se inicia a partir da ligação da RNA polimerase à molécula de DNA, em um sítio específico chamado de promotor. Os promotores estão sempre localizados na posição que antecede o início da transcrição do gene.

Em procarionotos, há duas regiões promotoras que se encontram nas posições -10 e -35 pares de base (o sinal negativo representa as bases antes do início da transcrição do gene de interesse). É nessa região que a subunidade σ da holoenzima da RNA polimerase interage. Em eucariotos, a sequência análoga é a TATAAAA (também conhecida como TATA box), presente na posição -30 , na região promotora. Vários outros elementos, como *enhancers*, também estão envolvidos na expressão e

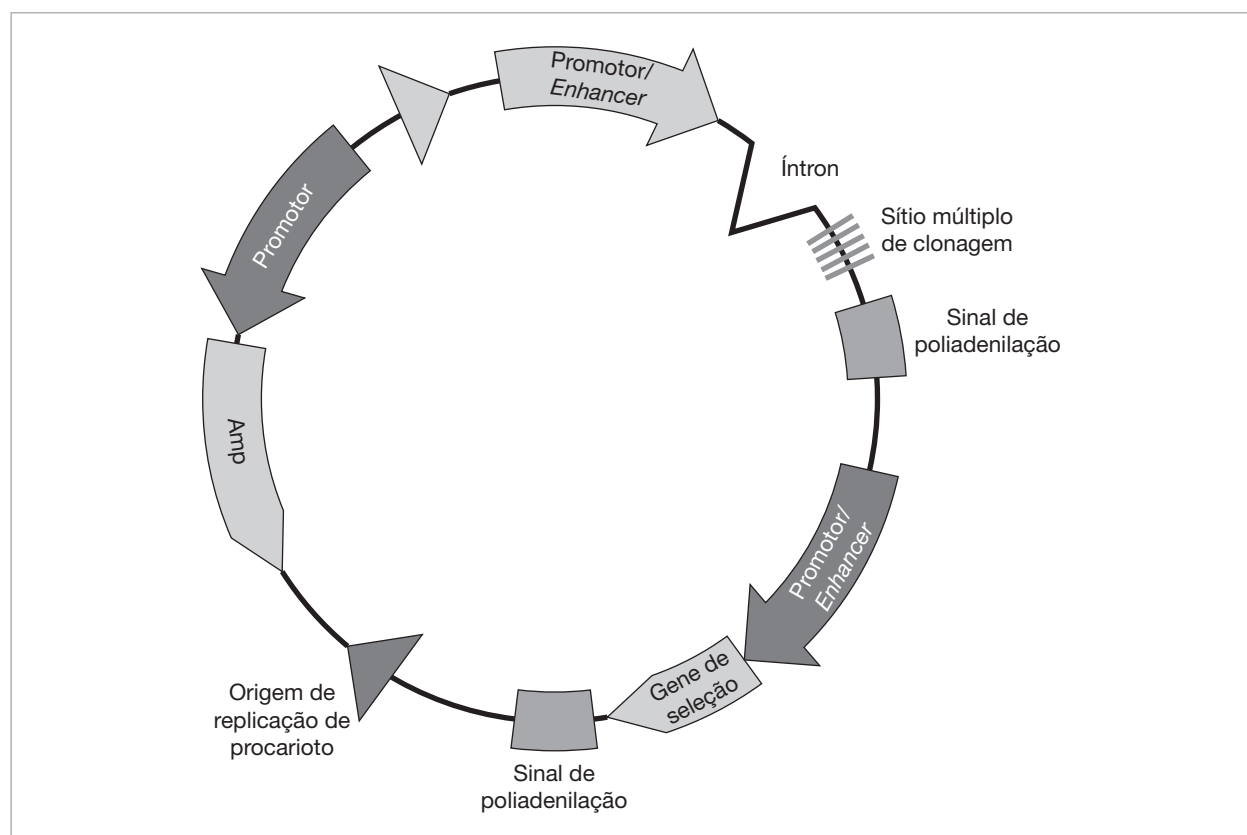


FIGURA 2.1 Esquema representativo de um vetor de expressão plasmidial para célula de mamífero.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

podem estar bem distantes do gene-alvo. Estes exercem efeitos estimulantes sobre a atividade promotora e podem ser encontrados antes do início do gene, no final ou até mesmo dentro do gene. Os genes possuem regiões codificadoras (éxons) separadas por regiões não codificadoras (íntrons). Na clonagem para expressão de proteínas recombinantes, normalmente a versão do gene sem íntrons é utilizada.

Para maximizar a eficiência de produção, o vetor de expressão e o gene de interesse podem ser otimizados. Sequências de DNA podem ser adicionadas ao vetor para promover a estabilidade genética e a secreção de proteínas. A seleção de promotores e *enhancers* fortes, a otimização dos códons, a utilização de genes de seleção capazes de aumentar a quantidade de cópias do gene de interesse e a utilização de genes repórter para ajudar na seleção de células altamente produtivas são alguns exemplos de elementos que podem ser adicionados ou melhorados nos vetores de expressão.

Para a produção de proteínas recombinantes, é importante considerar alguns aspectos relacionados à clonagem diretamente relacionados com o rendimento final da proteína de interesse. São eles:

- O gene recombinante deve ter todos os elementos necessários para uma iniciação eficaz da transcrição.
- A utilização de um promotor viral ou celular forte é importante para uma transcrição eficiente. A utilização do promotor viral T7 em bactérias pode resultar num rendimento maior de proteínas recombinantes. Em células de inseto, o transcrito pode ser expresso sob o controle de um promotor de poliedrina de baculovírus. As células de mamíferos podem utilizar o promotor SV40 ou do citomegalovírus (CMV).
- Para eliminar as baixas taxas de tradução devido à variabilidade dos códons, o gene pode ser convertido para um gene de alta expressão por meio da alteração destes para anticódons de t-RNA mais abundantes (otimização dos códons).
- Alguns genes seletivos, como os que promovem resistência a antibióticos ou os que estão envolvidos com biossíntese de nucleotídeos (ex.: DHFR – diidrofolato redutase), têm a função de promover o crescimento somente das células que receberam o gene heterólogo quando cultivadas em meio contendo um agente de pressão seletiva, por exemplo, na pressão de antibiótico.

Em bactérias, o vetor contendo o gene de interesse é transferido para dentro da célula, assim o DNA é mantido na sua forma episomal (quando a molécula de DNA não se integra ao genoma bacteriano). Uma vez que os plasmídeos têm a tendência de serem elimi-

nados das células bacterianas, a integração ao genoma tem sido mais utilizada. Nas células animais, a proteína recombinante é normalmente codificada a partir de um gene que se integra ao cromossomo do hospedeiro. Para a transferência do gene de interesse para a célula (etapa conhecida como transfecção), várias metodologias são utilizadas, como fosfato de cálcio, polietilenoimina ou lipídios, bem como choque elétrico e microinjeção (PUETZ; WURM, 2019). A Figura 2.2 resume o processo de clonagem e expressão de uma proteína recombinante.

2.3 SISTEMAS DE EXPRESSÃO MAIS UTILIZADOS PARA PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS

A estrutura das proteínas recombinantes está intimamente relacionada ao seu correto enovelamento e manutenção da sua atividade biológica. Assim, é fundamental compreender as modificações que ocorrem após a síntese proteica (chamadas de modificações pós-traducionais) e suas funções para analisar qual sistema de expressão deve ser utilizado. Dentre as principais modificações, destacam-se: (i) formação de pontes dissulfeto; (ii) clivagem proteolítica; (iii) glicosilação; (iv) gamacarboxilação; (v) fosforilação; (vi) hidroxilação; (vii) sulfatação; (viii) acetilação. Essas modificações ocorrem por etapas ou vias enzimáticas específicas, que precisam estar disponíveis na célula hospedeira. A maioria das modificações é exclusiva de proteínas direcionadas para a via de secreção, portanto ocorrem durante a passagem da proteína pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi (WALSH, 2010).

Diversos sistemas de expressão podem ser empregados na produção de proteínas recombinantes, utilizadas como biofármacos, vacinas ou para diagnóstico. Por razões técnicas, econômicas e regulatórias, apenas alguns sistemas são empregados na indústria biofarmacêutica. A escolha do sistema para a produção da proteína terapêutica é crucial e deve atender a determinados critérios, como a qualidade do produto e o custo de produção. Para isso, devem-se levar em consideração as características da proteína (modificações pós-traducionais, enovelamento, atividade e aplicação); a quantidade a ser produzida (demanda e dosagem); e os requerimentos de segurança para que o produto possa ser aprovado.

2.3.1 Sistema de expressão bacteriano

A primeira plataforma de expressão estabelecida foi utilizando bactérias, sendo as bactérias da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*), a principal delas. Esse sistema, ao longo dos anos, vem mostrando ser o hospedeiro mais adequado para a produção de proteínas não glicosiladas.

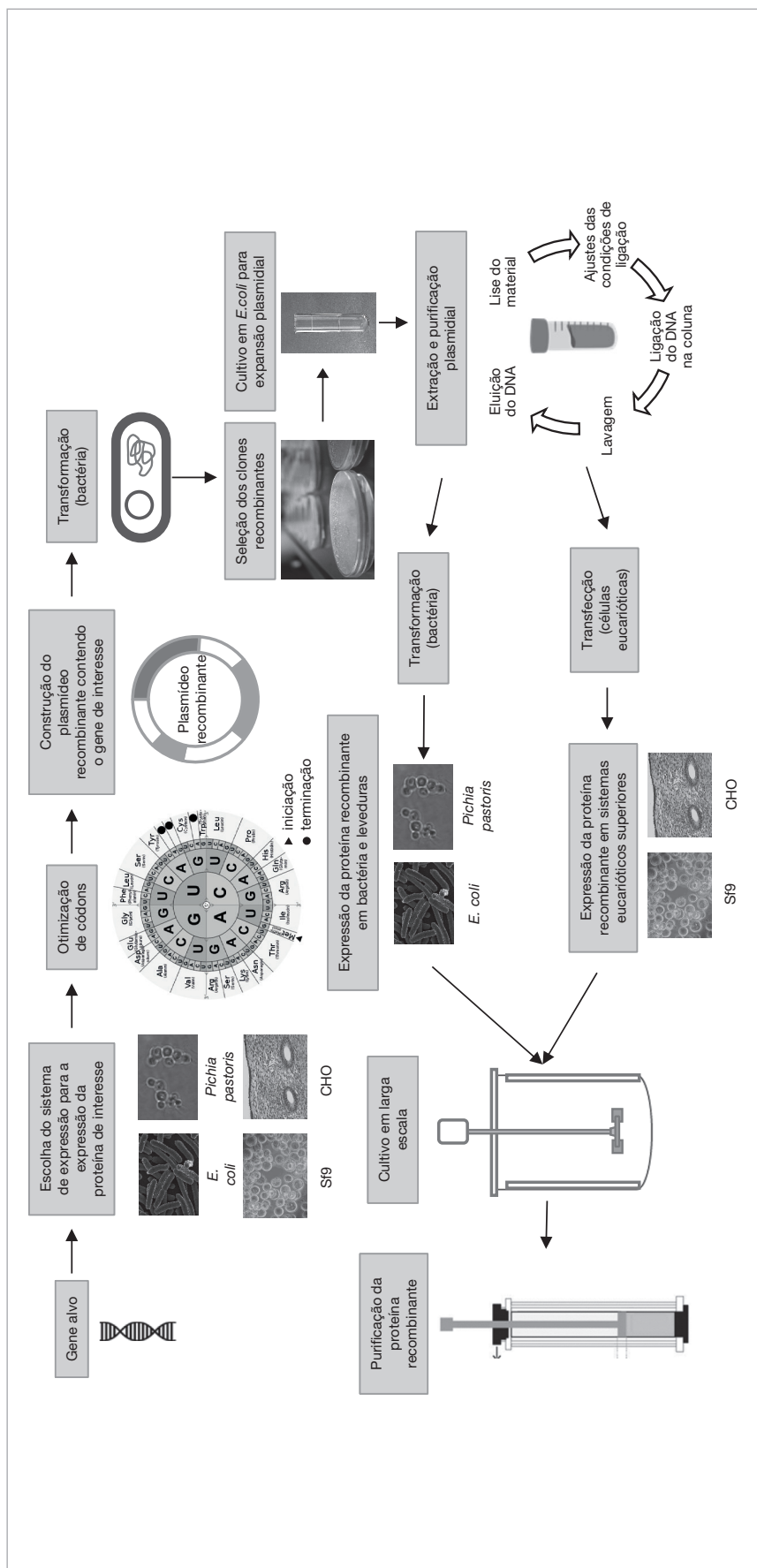


FIGURA 2.2 Esquema ilustrativo das etapas que compõem o processo de obtenção de uma proteína recombinante para fins terapêuticos. Inicialmente, define-se a proteína-alvo e busca-se o gene referente em bases de dados, o que servirá como base para a síntese do gene. Dependendo das características físico-químicas e do tipo de proteína, por exemplo, uma glicoproteína, define-se o sistema de expressão. A partir da escolha do hospedeiro, a sequência gênica é otimizada por meio de programas computacionais apropriados, de forma a utilizar os códons preferenciais da célula escolhida como sistema de expressão. O gene pode ser sintetizado e inserido no vetor apropriado a partir da utilização de enzimas de restrição, ou adquirido em empresas especializadas já inserido no vetor (plasmídeo) de interesse. Este, então, é inserido numa bactéria pelo método chamado de transformação, e nesse caso obrigatoriamente *E. coli* (Top 10 ou DH5α são as cepas mais utilizadas) para seleção do clone contendo a construção plasmidial correta e consequente expansão plasmidial (aumento do número de cópias) e estocagem. O plasmídeo recombinante purificado é utilizado para transfecção em células eucarióticas superiores ou transformação em *E. coli* e leveduras, dependendo do hospedeiro escolhido inicialmente. A proteína é expressa em condições apropriadas de cultivo e em seguida purificada para ser utilizada como produto terapêutico.

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Trabalhar com esse micro-organismo inclui uma série de vantagens: (i) conhecimento completo do genoma; (ii) versatilidade de ferramentas de clonagem; (iii) crescimento rápido em comparação com outros organismos simples; (iv) custo reduzido devido à sua simplicidade genética (tem apenas cerca de 4.400 genes); (v) alta segurança em comparação a outros organismos; (vi) suas condições de crescimento são simples e exigem meios de cultivo baratos (HAYAT et al., 2018). Além disso, dentro da perspectiva industrial, é de fácil escalonamento e possui elevado rendimento e qualidade do produto de interesse (TRIPATHI, 2016).

Apesar de esse sistema de expressão ser o mais empregado na biotecnologia, pode apresentar algumas desvantagens para a produção de proteínas com aplicação terapêutica, entre elas: (i) a ausência de modificações pós-traducionais, como a glicosilação e pontes dissulfeto;

e a (ii) necessidade de utilização de códons preferenciais, que pode acarretar mudanças traducionais, gerando proteínas que podem causar reações imunogênicas, ou alterações na estrutura terciária da proteína e subsequente alteração ou perda de função. São situações raras, mas não impossíveis. Considerando o custo-benefício observado ao longo de 40 anos, desde o lançamento da insulina humana recombinante no mercado, é uma das plataformas de expressão de proteínas recombinantes mais populares até os dias atuais. Na Tabela 2.1 é possível verificar todos os produtos terapêuticos de origem bacteriana lançados nos últimos 40 anos (MCELWAIN et al., 2022; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Essa plataforma funciona muito bem para proteínas terapêuticas como a insulina, o hormônio de crescimento humano, citocinas, alguns fatores de crescimento e outras proteínas que não são glicosiladas ou não necessitam da

TABELA 2.1 Lista dos bioterapêuticos produzidos em *E. coli*

Nome comercial	Princípio ativo	Ação	Massa molar	Ano	Empresa que comercializa
Humulin	Insulina humana	Hormônio	5.8 kDa	1982	Genentech/Eli Lilly
IntronA	Interferon $\alpha 2b$	Citocina	19.2 kDa	1986	Schering-Plough
Humatrope	Somatropina	Hormônio	22.1 kDa	1987	Eli Lilly
Neupogen	Filgrastim	Estimulador de granulócitos	18.8 kDa	1991	Amgen Inc.
Lispro	Humalog 75-25	Hormônio	5.8 kDa	1996	Eli Lilly
Retavase	Retepase	Droga trombolítica	39.6 kDa	1996	Roche
Infergen	Interferon alfacon-1	Interferon	19.4 kDa	1997	Amgen
Ontak	Denileukin diftitox	Proteína citotóxica	58 kDa	1999	Seragen Inc.
Lantus	Insulin glargine	Hormônio	6.06 kDa	2000	Aventis
Kineret	Anakinra	Imunomodulador	17.3 kDa	2001	Amgen
Natrecor	Nesiritida	Peptídeo natriurético	3.46 kDa	2001	Scios Inc.
Somavert	Pegvisomanto	Endócrino	21.9 kDa	2003	Pharmacia NV
Lucentis	Ranibizumabe	Anticorpo monoclonal	48 kDa	2006	Novartis
Nivestym	Filgrastim rhG-CSF	Hormônio	18.7 kDa	2010	Hospira
Voraxaze	Glucarpidase	Carboxipeptidase	83 kDa	2012	BTG International
Myalept	Metreleptin	Análogo da leptina	16.1 kDa	2014	Aegerion
Natpara	Hormônio da paratireoide	Hormônio	9.42 kDa	2015	Takeda
Asparlas	Calaspargase	Enzima	34.5 kDa	2018	Servier Pharmaceuticals
Elzonris	Tagraxofusp-erzs	Citotoxina	57.6 kDa	2018	Stemline Therapeutics
Palyzqi	Pegvaliase-pqpz	Enzima	62 kDa	2018	Biomarin
Fulphila	Pegfilgrastim-jmdb	Fator de crescimento	19 kDa	2018	Mylan
Revcovi	Elapegamase-lvrl	Enzima	113 kDa	2018	Leadiant Biosciences, Inc.
Lumoxiti	Moxetumomab-tdfk	Citotoxina	63 kDa	2018	AstraZeneca

(continua)

TABELA 2.1 Lista dos bioterapêuticos produzidos em *E. coli* (continuação)

Nome comercial	Princípio ativo	Ação	Massa molar	Ano	Empresa que comercializa
Beovu	Brolucizumab	Fator de crescimento	26 kDa	2019	Novartis
Cablivi	Caplacizumab-yhdp	Anticorpo monoclonal	28 kDa	2019	Sanofi
Skytrofa	Lonapegsomatropin-tcgd	Hormônio	22 kDa	2021	Ascendis Pharma
Sogroya	Somapacitan-beco	Hormônio	22 kDa	2020	NovoNordisk
Besremi	Ropeginterferon alfa-2b-njft	Interferon	60 kDa	2021	PharmaEssentia Corp
Voxzogo	Vosoritida	Peptídeo natriurético	4.1 kDa	2021	Biomarin Pharma

Fonte: adaptada de McElwain et al. (2022).

glicosilação para a sua atividade biológica ou eficácia. Apesar de não realizar outras modificações pós-traducionais, algumas, como o processamento proteolítico e a formação de pontes dissulfeto, não são problemáticas, pois podem ser introduzidas como parte do processamento de *downstream* (WALSH, 2010), ou linhagens celulares geneticamente modificadas podem suprir essa necessidade. Um exemplo é a linhagem *SHuffle*, que promove a formação de pontes dissulfeto na proteína de interesse a ser expressa (LOBSTEIN et al., 2012).

As proteínas produzidas nesse sistema podem se apresentar em duas formas: (i) solúveis ou (ii) corpos de inclusão (GUPTA; SHUKLA, 2017). No estado solúvel, as proteínas apresentam enovelamento apropriado; entretanto, quando formam corpos de inclusão, é necessária a adição de agentes caotrópicos para a solubilização das proteínas, seguida do reenovelamento para que adquiram seu estado nativo e, conseqüentemente, sua atividade biológica. Para isso, são necessárias etapas adicionais às etapas de purificação, podendo acarretar perda no rendimento final do processo.

Aspectos cruciais devem ser levados em consideração para uma produção de proteínas recombinantes bem-sucedida, como o sistema de expressão, o vetor ou plasmídeo e o meio de cultivo escolhidos. São amplas as possibilidades, e discutiremos sobre elas brevemente neste tópico. Com relação ao hospedeiro escolhido, as bactérias da espécie *E. coli* se desdobram em diversas linhagens e derivadas destas (Tabela 2.2), aplicáveis à expressão de proteínas recombinantes, são elas: BL21 (BL21 (DE3), BL21 (DE3), pLysS, BL21 Star, Origami, *SHuffle*, C41, C43, entre outras. Essas linhagens apresentam genomas diferenciados e, por consequência, características que favorecem a expressão de proteínas recombinantes. Um exemplo é a linhagem BL21 Star, cuja mutação em um dos seus genes permite maior estabilidade do RNA mensageiro. Dependendo das características da proteína de interesse a ser testada, é importante avaliar o tipo de linhagem mais apropriada, e, sendo o objetivo sua aplicação industrial, é importante

avaliar os níveis de expressão e comparar o desempenho se este for o caso (HAYAT et al., 2018).

Com relação ao vetor de expressão, algumas regiões são essenciais para a expressão em *E. coli*, como a origem de replicação, região promotora, sítio múltiplo de clonagem e região contendo um gene de resistência a antibióticos. Muitos vetores estão disponíveis comercialmente e podem ser considerados “famílias” com algumas pequenas mudanças em suas sequências que envolvem principalmente a adição de “tags” ou caudas, que facilitam a purificação da proteína recombinante de interesse e são amplamente utilizados para fins de prova de princípio. Os vetores da família pET são utilizados com frequência e são, geralmente, a primeira escolha em relação à clonagem e expressão de proteínas recombinantes, pois possuem um promotor efetivo e tem em sua composição as regiões contendo as sequências que expressam “tags” de histidina. Essa sequência pode expressar seis ou oito vezes o aminoácido histidina, facilitando a purificação da proteína de interesse por meio da metodologia de afinidade a íons metálicos por sua interação com níquel. Além da histidina, diversos tags podem ser utilizados: MBP (*maltose-binding protein*), SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) e GST (*Glutathione-S-transferase*) são alguns deles. Outros vetores são utilizados na expressão de proteínas recombinantes, e mais detalhes sobre esses e suas possíveis aplicações podem ser encontrados na literatura (GOPAL; KUMAR, 2013; HAYAT et al., 2018).

A otimização do processo em pequena escala é essencial antes de prosseguir à produção em larga escala. Vários critérios devem ser considerados para otimização das condições para a obtenção de altos níveis de expressão de uma proteína recombinante em *E. coli*. Essa otimização pode auxiliar no alcance de alto rendimento do produto de interesse e no custo-benefício para a sua produção. O primeiro passo para aumentar a expressão de proteínas recombinantes é otimizar a composição do meio de cultivo. Geralmente, são utilizados meios

TABELA 2.2 Cepas de *E. coli* utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes

Cepa	Características	Benefício	Empresa que comercializa
BL21 (DE3)	Tem lisógeno DE3 que expressa T7 RNA polimerase Deficiente em proteases lon e ompT Induzida por IPTG	Expressão de genes não tóxicos	Novagen
BL21(DE3) pLysS	Tem lisógeno DE3 que expressa T7 RNA polimerase Expressa uma lisozima que decompõe a T7 polimerase antes da indução da expressão da proteína de interesse	Previne o “vazamento” da expressão da proteína recombinante Expressão de genes tóxicos	Novagen
BL21 Star	Mutação do gene rne131	Aumento da estabilidade do RNAm	Novagen
Lemo21(DE3)	Semelhante a BL21 (DE3) Expressão controlável dos clones difíceis por variação do nível de lisozima (lisY)	Adequada para a expressão de proteínas desafiadoras, incluindo proteínas tóxicas, proteínas de membrana e proteínas de baixa solubilidade	NEB
Tuner (DE3)	Mutação na permease lacY	Permite a entrada uniforme do IPTG em todas as células da população Apropriada para proteínas tóxicas e insolúveis	Novagen
Origami	Mutação nos genes trxB e gor	Aumento da formação de pontes dissulfeto no citoplasma	Novagen
SHuffle	Deficiente em proteases Lon e Omp	Promove o enovelamento correto de proteínas não-oxidadas	NEB
Rosetta	Derivada da BL21 Tem cópias adicionais de genes que codificam o tRNAs para códons raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA	Apropriada para expressão de proteínas de origem eucariótica	Novagen
Rosetta-gami (DE3)	Derivada da Origami Tem cópias adicionais de genes que codificam o tRNAs para códons raros	Aumento da formação de pontes dissulfeto no citoplasma na expressão de proteínas heterólogas	Novagen
C41(DE3) e C43(DE3)	Mutantes de BL21(DE3) que impedem morte celular associada à expressão de proteínas recombinantes tóxicas	Adequada para a expressão de proteínas de membrana e/ou tóxicas de todas as classes de organismos	Lucigen

Fonte: adaptada de Hayat et al. (2018).

complexos como o “Luria broth” (LB) para a expressão de proteínas recombinantes em culturas de pequena escala. No entanto, vários pesquisadores descreveram a utilização dos meios: SOB, SOC, 2YT, GYT, MBL, “Terrific Broth” (TB), “Super Broth” (SB), M9 e meios “Enbase Flo” para o melhoramento dos níveis de expressão das proteínas.

Vários pesquisadores avaliaram a utilização de meios definidos e semidefinidos nos cultivos de *E. coli*. Em geral, os meios definidos contêm glicose como fonte de carbono, sulfato de amônio e/ou cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, assim como sulfato de magnésio e sais de fosfato. O meio semidefinido, contudo, contém glicose ou glicerol como fonte de carbono, extrato de levedura e/ou triptona como fonte de nitrogênio juntamente com os sais de sulfato de magnésio e fosfato. Os

componentes do meio, como o glicerol, podem aumentar o crescimento celular e o rendimento das proteínas recombinantes. Meios complexos como o TB e o SB contêm glicerol, que tendem a aumentar concentrações proteicas em comparação com outros meios, entretanto o meio LB pode mostrar resultados satisfatórios. É importante avaliar e comparar experimentalmente caso a caso (TRIPATHI, 2016).

O sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é um dos mais empregados na indústria biotecnológica pelos motivos mencionados, e a perspectiva é que esse sistema continue sendo utilizado amplamente. Com o avanço da tecnologia, espera-se que algumas das desvantagens sejam superadas para que volte a ter mais destaque na produção de biofarmacêuticos para a indústria.

2.3.2 Sistema de expressão de leveduras

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são amplamente utilizadas na indústria biotecnológica, pois são organismos eucarióticos que têm a capacidade de produzir proteínas com modificações pós-traducionais mais próximas do humano, porém ainda com limitações. *S. cerevisiae* e *P. pastoris* vêm sendo utilizadas há várias décadas nas indústrias de panificação e cervejaria, no entanto têm sido utilizadas também para a produção de muitas proteínas recombinantes terapêuticas na escala industrial. Até 2022, foram desenvolvidos cerca de 22 produtos biofarmacêuticos produzidos em *Saccharomyces cerevisiae* e sete em *Pichia pastoris* nos Estados Unidos e na Europa (WALSH, 2022). Os dois hospedeiros são capazes de produzir proteínas recombinantes com enovelamento adequado e algumas modificações pós-traducionais, fato pelo qual esses sistemas são considerados melhores do que os procariotos quando essas modificações são necessárias à proteína de interesse. A levedura clássica *S. cerevisiae* está entre as leveduras eucarióticas amplamente estudadas e é o hospedeiro heterólogo mais comumente utilizado para síntese biofarmacêutica, manipulação de genes e produção de proteínas. Além de *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris*, várias espécies de leveduras não convencionais como *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis* têm sido utilizadas como hospedeiros substitutos para a síntese de proteínas heterólogas (MADHAVAN et al., 2021).

Além da capacidade de realizar algumas modificações pós-traducionais, podem-se destacar outras vantagens, como: (i) possibilidade de produção de proteínas mais complexas, mantendo altos rendimentos; (ii) capacidade de secretar a proteína de interesse no sobrenadante, facilitando a recuperação do produto; (iii) menos suscetibilidade a contaminações por fago (vírus que infecta bactérias); (iv) alta tolerância a pH baixo; (v) reconhecimento como segura e por não replicar patógenos humanos. Com relação às desvantagens, esse sistema oferece um perfil de glicosilação ainda diferente do humano. Muitos esforços estão sendo empregados para suprir essa deficiência, e cepas modificadas geneticamente oferecem um perfil de N-glicosilação humanizado. Um estudo de Liu et al. (2018) descreveu uma plataforma de expressão e engenharia de cepas e processos de produção utilizando leveduras para a produção de anticorpos, e concluiu-se que a produção homogênea de anticorpos monoclonais oportunizou uma janela para a glicoengenharia (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). Novas estratégias têm sido avaliadas para minimizar as desvantagens e imprimir melhorias ao sistema de

expressão em *P. pastoris*, incluindo vetores, padrão de glicosilação e tecnologia de fermentação, bem como engenharia das cepas usando a tecnologia CRISPR/Cas9 para produzir glicoproteínas semelhantes às humanas, e cepas deficientes em proteases (BAGHBAN et al., 2018; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

2.3.3 Sistema de expressão de células de inseto

Células de insetos podem ser utilizadas para a expressão de várias proteínas recombinantes. O sistema de expressão vetorial baculovírus (BEVS – traduzido do inglês *baculovirus expression vector system*) aproveita a capacidade natural dos mais de 600 tipos de baculovírus isolados na natureza de infectar células de insetos. Essa plataforma BEVS engloba quatro etapas fundamentais: (i) produção do baculovírus recombinante; (ii) cultivo de células de insetos; (iii) infecção das células de inseto pelo baculovírus; (iv) purificação da proteína de interesse.

A linhagem celular *Spodoptera frugiperda* (SF) Sf9 é a mais utilizada (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). Além disso, as células Sf21, *Trichoplusia ni* (Tn)-368, e High-Five™ também podem ser empregadas para a expressão de proteínas recombinantes. Entre as vantagens desse sistema está o fato de que o baculovírus recombinante tem estabilidade de aproximadamente seis meses, o que permite diversas rodadas de produção. Outra vantagem é que as células infectadas com o baculovírus recombinante podem ser utilizadas para escalonamento de forma bastante reprodutível.

Embora seja de grande utilidade, a tecnologia de baculovírus tem uma série de limitações: (i) o processo de infecção lítica resulta na liberação de proteases hospedeiras e virais que podem impactar a qualidade das proteínas; (ii) certas proteínas virais (por exemplo, v-cathepsina e v-chitinase) podem impedir a via de secreção; (iii) as repetidas ondas de amplificação do vírus tendem a produzir partículas interferentes defeituosas com redução concomitante da produção de proteínas; (iv) pode ser observado o processamento incompleto de proteínas precursoras (por exemplo, hormônios peptídicos); (v) apesar de as células de inseto serem capazes de realizar a N-glicosilação, o padrão não é semelhante ao de humano (ASSENBERG et al., 2013). Cabe ressaltar que, mesmo não sendo o primeiro sistema de escolha para a produção de biofarmacêuticos, os pesquisadores têm trabalhado para minimizar as desvantagens do sistema, e, com a pandemia da Covid-19, esse sistema obteve notoriedade com a vacina Nuvaxovid/Covovax, licenciada pela Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency* – EMA) em 2021 e, recentemente, pelo FDA em 2022 (HONG et al., 2022).

2.3.4 Sistema de expressão de células de mamífero

O sistema de expressão em células de mamíferos é dominante como plataforma de produção de biofármacos, devido à sua capacidade de realizar o enovelamento apropriado das proteínas recombinantes e de inserir as modificações pós-traducionais fundamentais para que proteínas terapêuticas exerçam suas funções biológicas. Outra vantagem é o fato de as proteínas produzidas em células de mamíferos seguirem, preferencialmente, rotas de síntese que culminam na secreção da molécula no meio de cultura, facilitando o isolamento e a purificação do produto.

No entanto, historicamente, as células de mamíferos, por serem fisiológica e bioquimicamente mais complexas em comparação a outros sistemas de expressão, possuem limitações: (i) metabolismo mais lento, quando comparadas com o sistema microbiano, pois possuem tempo de duplicação ao redor de 24 a 30 horas, o que implica uma reduzida taxa de crescimento celular, resultando em períodos mais longos para se obter altas densidades celulares; (ii) níveis inferiores de expressão devido à complexidade da síntese proteica em mamíferos, englobando a maquinaria envolvida nos processos de transcrição, tradução, processamento pós-traducional e secreção; (iii) integração aleatória ao cromossomo do hospedeiro, podendo ocorrer em um local de alta ou baixa expressão, resultando em clones com comportamentos variados em termos de número de cópias do gene heterólogo e estabilidade da expressão. Isso acarreta um procedimento muito árduo de seleção de clones, que são avaliados pela produtividade, estabilidade e viabilidade (processo que dura de 6 a 12 meses); (iv) exigência de meios mais ricos em nutrientes e, portanto, mais caros, para alcançarem concentrações celulares e produtividade satisfatórias, viabilizando os processos industriais; (v) maior sensibilidade, pois o acúmulo de metabólitos, falta de nutrientes, aumento da pressão osmótica, alterações de pH e disponibilidade de oxigênio podem induzir mecanismos de morte celular acarretando perda do cultivo celular. Outra característica marcante de células de mamífero é a alta suscetibilidade ao rompimento causado por altas tensões de cisalhamento (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Apesar das desvantagens, a célula de mamífero é a única possibilidade de expressão para determinadas proteínas recombinantes terapêuticas para que essas moléculas desempenhem sua atividade biológica. Portanto, há décadas, muitos esforços têm sido feitos para contornar muitas dessas limitações. Ao longo do tempo, meios de cultivo foram aprimorados para suprir as necessidades nutricionais e superar os desafios relacionados

à sensibilidade celular, conferindo mais robustez aos processos produtivos. A aplicação dos conhecimentos da engenharia metabólica propiciou o desenvolvimento de estratégias de alimentação de acordo com cada fase de cultivo, como na etapa de produção no biorreator. Aliado a isso, diferentes modos de operação de cultivo celular resultam, atualmente, em cultivos que alcançam maiores densidades celulares e com melhores rendimentos. Com o objetivo de aumentar a produtividade, são utilizados promotores fortes, constitutivos e de expressão ubiquitária (normalmente promotores virais como o de citomegalovírus – CMV, o de adenovírus e o de vírus símio 40 – SV40) para promover altos níveis de transcrição em diversas linhagens celulares. Além disso, são desenvolvidas estratégias de manipulação genética nas linhagens celulares para otimizar os mecanismos de transcrição, tradução, enovelamento e secreção, além de alterações no metabolismo em geral que irá atuar nas características de proliferação e sobrevivência das células. Para contornar as questões relacionadas à seleção de clones, instabilidade genética e integração do gene de interesse em local de baixa transcrição, estudos têm sido desenvolvidos para gerar sistemas de integração sítio-dirigida em locais de alta atividade transcricional (CHEN et al., 2022; FAORO; ATAIDE, 2021; HAMA-KER; LEE, 2018; MAKRIDES, 1999; XIAO; SHILOACH; BETENBAUGH, 2014).

Outra estratégia para aumentar a produtividade das células de mamíferos é a amplificação gênica. Essa estratégia se vale de sistemas de seleção baseados em enzimas que participam da biossíntese celular (ex.: DHFR – diidrofolato redutase e GS – glutamina sintetase). Para empregar esses sistemas de seleção, é necessário utilizar linhagens celulares modificadas geneticamente para serem deficientes nessas enzimas (CHO DHFR⁻ ou CHO-GS). Essas linhagens celulares são mantidas em meios suplementados com os componentes essenciais que não podem ser sintetizados por elas, como HT (hipoxantina e timidina, no caso de células CHO DHFR⁻) e glutamina (no caso de células CHO-GS). Ao serem transfectadas com o vetor contendo o gene de interesse e o gene de seleção (DHFR ou GS), os clones produtores podem ser selecionados sem a suplementação do componente essencial. Esse sistema de seleção, ainda, permite realizar a amplificação gênica ao adicionar as drogas MTX (metotrexato; inibidor da enzima MTX) ou MSX (metionina sulfoximina; inibidor da enzima GS). As culturas podem ser submetidas a várias rodadas de aumento gradativo da concentração da droga, o que estimula o aumento do número de cópias do gene de seleção para que a cultura sobreviva a essa pressão seletiva. Nesse processo, devido à proximidade, o gene da proteína de interesse é

coamplificado. A amplificação por DHFR pode chegar a alcançar até centenas de cópias, porém uma proporção desses genes é instável e a remoção do agente seletivo pode resultar em perda gradual do número de cópias dos genes (BUTLER, 2005).

As linhagens de células animais mais utilizadas na indústria para a produção de biofármacos são as células de ovário de hamster chinês (CHO – *Chinese hamster ovary cells*) e as células de rim de hamster neonato (BHK – *baby hamster kidney cells*). As células CHO são as mais utilizadas para a produção de proteínas recombinantes terapêuticas devido a diversos motivos: (i) são adaptáveis a cultivos em suspensão (essencial para produção em larga escala); (ii) não são suscetíveis à infecção pela maioria dos vírus que infectam humanos; (iii) provaram-se adaptáveis ao crescimento com ausência de soro e em meios quimicamente definidos propiciando maior reprodutibilidade ao processo; (iv) as modificações pós-tradicionais são comparáveis ao padrão humano (principalmente em relação à glicosilação); muitos sistemas de amplificação gênica são bem estabelecidos, resultando em células mais estáveis e com alta produtividade da proteína recombinante; (v) é um sistema de expressão bem estabelecido em termos de produção de moléculas, aprovadas para uso humano, facilmente aceito por agências regulatórias (LAI; YANG; NG, 2013; MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008; PEREIRA; KILDEGAARD; ANDERSEN, 2018).

As linhagens de células humanas, como HEK293 (*human embryonic kidney cells*) e HT-1080 (*human fibrossarcoma cells*) são uma alternativa promissora e emergente a células hospedeiras não humanas, pela possibilidade de inserção das modificações pós-tradicionais com padrões totalmente humanos. Contudo, uma restrição ao uso para drogas comerciais é que as células humanas carregam um risco potencial de contaminação e subsequente transmissão de patógenos humanos, como vírus e outros agentes adventícios. Outra limitação decorre do fato de que células humanas têm capacidade para produzir o padrão de glicosilação sialil-Lewis X (sLex) que se liga a selectinas (proteína responsável pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam ao processo de inflamação) endoteliais em áreas de inflamação. Essa forma glicosilada é indesejada para a produção de biológicos, pois poderia perturbar a biodistribuição adequada da droga e farmacocinética, além de ser um padrão de glicanos associado a malignidade tumoral e metástase. Essas são questões de natureza regulatória e considerações de segurança para a fabricação de medicamentos biofarmacêuticos. No entanto, essas considerações não são intransponíveis, pois existem biofármacos terapêuticos aprovados produzidos usando linhas celulares HEK293

e HT-1080 (GOH; NG, 2018; TRINCHERA; ARONICA; DALL'OLIO, 2017).

2.3.5 Sistema de expressão de vegetais

O potencial do uso de plantas para a produção de proteínas recombinantes terapêuticas começou a ser explorado no final dos anos 1980, quando estudos pioneiros demonstraram que plantas geneticamente modificadas são capazes de produzir proteínas de mamíferos complexas, oligoméricas e com modificações pós-tradicionais. O primeiro artigo explorando experimentalmente essa possibilidade foi publicado em 1989 e evidenciou a expressão de imunoglobulinas de camundongo em plantas transgênicas da espécie *Nicotiana tabacum* (HIATT; CAFFFERKEY; BOWDISH, 1989). Desde então, muitas plataformas de expressão em plantas foram exploradas, incluindo o uso de culturas celulares, cultura de tecidos, plantas transgênicas estáveis, linhagens transplastômicas e expressão transiente em folhas. Além disso, uma ampla diversidade de espécies vegetais foi testada para a produção de proteínas recombinantes, incluindo tabaco, cenoura, alface, arroz, trigo, milho, batata, girassol, cevada, soja, entre outros (O'KEEFE et al., 2015; SCHILLBERG; FINNERN, 2021; SPIEGEL et al., 2018).

Inicialmente, o desenvolvimento de processos industriais, em larga escala, para plataformas vegetais foi liderado por empresas com foco na produção de moléculas para uso em laboratório de pesquisa, diagnóstico e na indústria cosmética (SPIEGEL et al., 2018). Na indústria farmacêutica, o primeiro marco foi alcançado em 2012, quando o FDA aprovou o primeiro biofármaco para uso em humanos produzido em uma plataforma vegetal (FOX, 2012). A alfatilglicerase, forma recombinante da glucocerebrosidase humana, foi produzida em suspensão celular de cenoura pela empresa israelense Protalix, utilizada no tratamento da doença de Gaucher. Em 2022, a vacina contra Covid-19 produzida pela Medicago, também em plataforma de expressão transiente em *N. benthamiana*, foi aprovada pela agência canadense (SWOPE et al., 2021). Embora ainda haja poucos exemplos de biofármacos expressos em plantas aprovados para uso terapêutico em humanos, o uso de plataformas vegetais é um campo em expansão, e outros candidatos se encontram em estudo clínico fase III (ANAND et al., 2021; CHEN et al., 2022; SCHILLBERG; FINNERN, 2021; TRIPATHY et al., 2021).

Apesar da versatilidade exibida pelas plataformas vegetais, na indústria um grupo mais seletivo de sistemas de expressão em plantas vem se consolidando. Destacam-se plataformas de cultivo celular, plantas transgênicas estáveis e expressão transiente, sendo espécies como *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana* as mais

utilizadas. Em nível de biologia molecular, plataformas que utilizam o cultivo de plantas inteiras para a produção de proteínas recombinantes podem ser divididas basicamente em duas abordagens: (i) expressão estável e (ii) expressão transiente.

2.3.5.1 Plantas transgênicas e expressão transiente

Uma forma de produzir proteína recombinante é utilizando plantas transgênicas ou a expressão transiente em folhas, sendo a mais empregada a folha de tabaco. Esses sistemas conferem vantagens econômicas, como o custo reduzido para o cultivo de plantas e a facilidade de aumento de escala, porém com a limitação de área de cultivo. Pode-se destacar como desvantagem o longo tempo de crescimento das plantas, não impossibilitando seu uso em processos produtivos. Apesar das diferenças no padrão de glicosilação observadas em proteínas recombinantes sintetizadas por plantas, quando comparadas com proteínas obtidas em células de mamíferos, o interesse por desenvolver moléculas complexas de uso terapêutico em sistemas vegetais vem aumentando (GOMORD; FAYE, 2004).

No caso da expressão estável, linhagens de plantas transgênicas, com inserção do DNA recombinante em seu genoma, e homocigotas devem ser desenvolvidas. Nessa abordagem, diversas metodologias podem ser usadas para a transformação genética do material vegetal, no entanto a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* é a mais utilizada. Independentemente da metodologia de transformação, a produção de linhagens transgênicas estáveis e homocigotas é um processo bastante longo, que na maioria das vezes envolve a regeneração do tecido vegetal em cultura de tecidos, podendo levar muitos meses. Em contrapartida, plataformas de expressão transiente proporcionam a obtenção de proteínas recombinantes em um intervalo de algumas semanas, o que acelera etapas de desenvolvimento e otimização da obtenção da molécula de interesse (LOMONOSSOFF; D'AOUST, 2016). Plataformas de expressão transiente, geralmente, utilizam plantas da espécie *Nicotiana benthamiana*, devido ao seu crescimento rápido e sua suscetibilidade a patógenos de plantas (GOODIN et al., 2008). Elas se baseiam na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, mas não dependem da seleção de inserção do transgene no genoma vegetal. O *A. tumefaciens* é uma bactéria presente no solo, patógeno responsável por causar a doença galha da coroa em plantas (SMITH; TOWNSEND, 1907). Na natureza, o *A. tumefaciens* possui a capacidade de transferir uma parte de seu DNA para o núcleo de células vegetais. Esse fragmento de DNA, chamado T-DNA, é delimitado por bordas de sequências de nucleotídeos conhecidas e se

localiza no chamado plasmídeo Ti (indutor de tumor). A partir do conhecimento do processo de transferência de DNA via *A. tumefaciens*, cepas da bactéria foram modificadas, e um sistema de vetores, os chamados vetores binários, foi criado para possibilitar a transferência de sequências de interesse do plasmídeo Ti para o núcleo de células vegetais (PĂCURAR et al., 2011). A transformação via *Agrobacterium* é uma metodologia consolidada dentro da biotecnologia vegetal. A técnica é eficiente para diversas espécies de plantas e permite a utilização de diferentes cassetes de expressão. A sua utilização promove a transferência de múltiplas cópias da sequência de interesse para o núcleo celular. Destas, uma parte pequena será inserida no genoma da célula vegetal, expressando-se de maneira estável. Enquanto as demais não serão integradas ao genoma, mas serão expressas, de maneira transiente, até sua degradação (KOMAROVA et al., 2010).

Em termos de processo (sintetizado na Figura 2.3), a produção de um produto recombinante em plataforma de expressão transiente inicia com o cultivo de plantas (Figura 2.3). No caso da utilização de *N. benthamiana*, as plantas são cultivadas por aproximadamente 4 semanas. Na fase final desse período, inicia-se o cultivo de *A. tumefaciens* carregando o vetor de interesse. Em seguida, as plantas passarão por um processo de agroinfiltração (Figura 2.3). Para tal, são transferidas para uma câmara contendo uma solução com uma densidade definida de *Agrobacterium*. As plantas são invertidas, e suas partes aéreas, submersas nessa solução. Em seguida, a câmara é selada e a pressão atmosférica é reduzida, levando à liberação do ar presente nos espaços intercelulares do tecido vegetal por meio dos estômatos da planta. Após um período curto (1-2 minutos), a pressão atmosférica normal é restabelecida, levando à entrada, via estômatos, da solução de infiltração com *Agrobacterium* no tecido vegetal. A bactéria é, então, responsável pela transferência do T-DNA de interesse para o núcleo das células vegetais. As plantas infiltradas são mantidas em crescimento por aproximadamente mais uma semana. Nesse período, a proteína de interesse será expressa e se acumulará no tecido vegetal. Na próxima etapa, as folhas das plantas são coletadas e processadas. O material vegetal passa por um processo de homogeneização em solução contendo antioxidantes e inibidores de proteases. O líquido recuperado passa por processos de filtração para remoção de fibras, debris celulares e outras impurezas insolúveis. Finalmente, o filtrado passa por etapas de purificação por cromatografia, cujo processo depende do tipo de proteína recombinante a ser recuperada (KLIMYUK et al., 2012; SWOPE et al., 2021, 2022). Nessa plataforma, é possível obter a molécula de interesse purificada em um período de cerca

de 6 semanas. A rapidez desse processo é interessante do ponto de vista de produção, mas também acelera as etapas de desenvolvimento e otimização de novos produtos, com relevância no contexto de resposta a epidemias e situações emergenciais.

2.3.5.2 Células vegetais

Culturas de células vegetais é uma plataforma de expressão que vem sendo muito estudada, ao longo dos últimos anos, para a produção de proteínas recombinantes. As linhagens de células mais comuns em estudos de

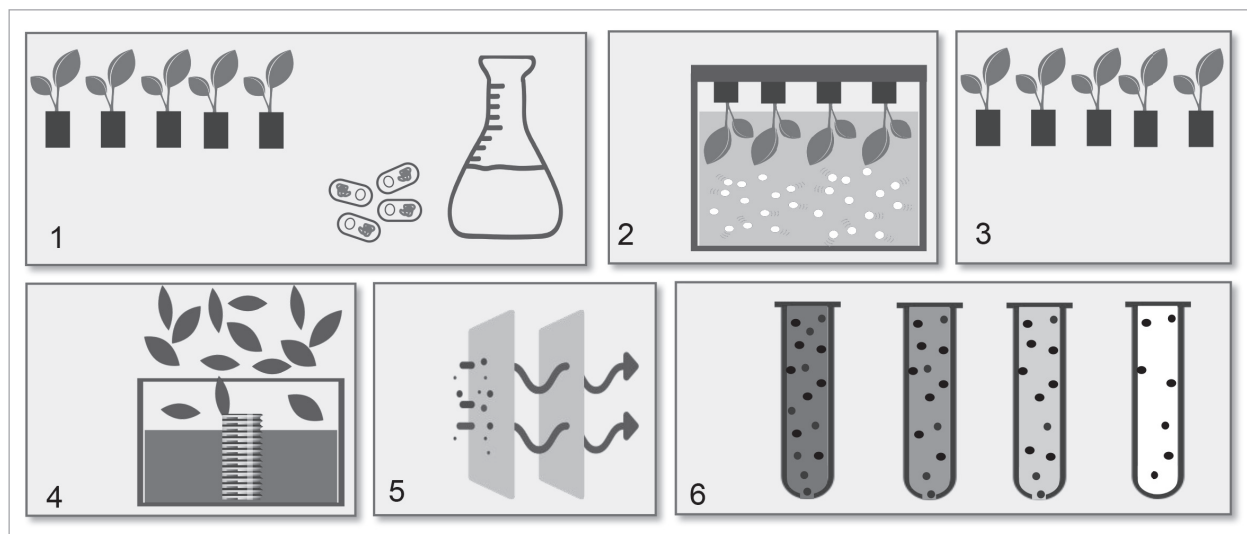


FIGURA 2.3 Esquema mostrando as diferentes etapas do processo de produção de proteína recombinante em plataforma de expressão transitiente em plantas. 1: O processo é iniciado com o cultivo de plantas e o posterior cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* carregando as construções gênicas de interesse. 2: Plantas passam por procedimento de agroinfiltração por vácuo. 3: Plantas agroinfiltradas continuam a ser cultivadas por cerca de 1 semana e produzem a proteína recombinante de maneira transitiente. 4: O material vegetal é coletado, processado e homogeneizado. 5: A solução resultante passa por procedimento de clarificação, envolvendo etapas de filtração. 6: O material clarificado é purificado por uma sequência de procedimentos cromatográficos.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).



FIGURA 2.4 Cultivo indoor de *N. benthamiana* para uso em plataforma de expressão transitiente nos laboratórios da Fraunhofer USA.

Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:IFarm.fi_Vertical_farm_Finland.jpg; <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>.



FIGURA 2.5 Equipamento de agroinfiltração utilizado nos laboratórios da Fraunhofer USA. Plantas cultivadas são invertidas e mergulhadas em solução de infiltração dentro de câmara de pressão.

Fonte: Jerzy Karczewski and Vidadi Yusibov, “Plant-based technologies to enable rapid response to Ebola outbreak” in “Vaccine Technology VI”, Laura Palomares, UNAM, Mexico Manon Cox, Protein Sciences Corporation, USA Tarit Mukhopadhyay, University College London, UK Nathalie Garçon, BIOASTER Technology Research Institute, FR Eds, ECI Symposium Series, (2016). http://dc.engconfintl.org/vaccine_vi/44; <http://network.bepress.com/engineering/>.

expressão são derivadas do tabaco (*Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana*) e células de cenoura.

Células vegetais têm a capacidade de sofrer desdiferenciação, ou seja, a célula adulta diferenciada regride para um estágio indiferenciado, sendo capaz de originar novos tecidos. No caso de vegetais, a desdiferenciação é caracterizada pela formação do calo (massa celular indiferenciada), ilustrado na Figura 2.6. Os calos gerados a partir de plantas transgênicas podem ser cultivados em meio líquido para estabelecer culturas em suspensão de células vegetais transgênicas. Ao contrário dos sistemas de plantas inteiras, células vegetais podem ser cultivadas sob condições controladas em biorreatores possibilitando obter rendimentos mais reprodutíveis e têm preocupações ambientais reduzidas relacionadas à migração de transgenes para a natureza uma vez que os organismos recombinantes estão confinados dentro dos biorreatores. Pode-se destacar, ainda, outras vantagens: (i) possibilidade, mesmo que limitada, de purificação de produtos secretados no meio extracelular (células vegetais secretam apenas cerca de 100–500 mg/L do total de proteínas solúveis do meio de cultura); (ii) consistência em relação à qualidade do produto e homogeneidade em condições ambientais controladas; (iii) facilidade de conformidade com os requisitos de BPF; (iv) eliminação da necessidade de cultivo e manipulação de plantas cultivadas em estufa ou no campo, que podem exigir trabalho árduo; (v) capacidade de usar sistemas com promotores induzíveis; (vi) potencial reduzido de contaminação por

endotoxinas e micotoxinas derivadas da planta e do solo, e (vii) mínima comunicação célula-a-célula resultando na redução do risco de silenciamento gênico pós-transcricional sistêmico (PTGS), que ocorre via plasmodesmas, no sistema vascular em plantas inteiras (HUANG; MCDONALD, 2009).

Assim como o cultivo de plantas inteiras, os sistemas de expressão baseados em células de plantas são facilmente mantidos em meios simples e de custo reduzido, sendo o meio Murashige & Skoog basal o mais utilizado para o cultivo de células vegetais.

2.3.6 Animais transgênicos

A possibilidade de direcionar a expressão de proteínas recombinantes a órgãos de secreção (particularmente a glândula mamária) de animais transgênicos conferiu vantagens a esse sistema por permitir a produção de proteínas heterólogas com modificações pós-traducionais complexas de uma maneira possivelmente mais econômica do que a produção em culturas de células de mamíferos. A produção de proteínas recombinantes em leite de animais transgênicos, como vacas, cabras, ovelhas e coelhos, obteve relativo sucesso (LILLICO et al., 2005). No entanto, essa abordagem deve considerar o custo, a dificuldade técnica e o tempo de desenvolvimento e produção, entre outros fatores, por isso provavelmente permanecerá restrita à fabricação de certos produtos (SODOYER, 2004). Além disso, há variações no rendimento e qualidade do produto, devido à dependência da saúde e nutrição do animal. Até

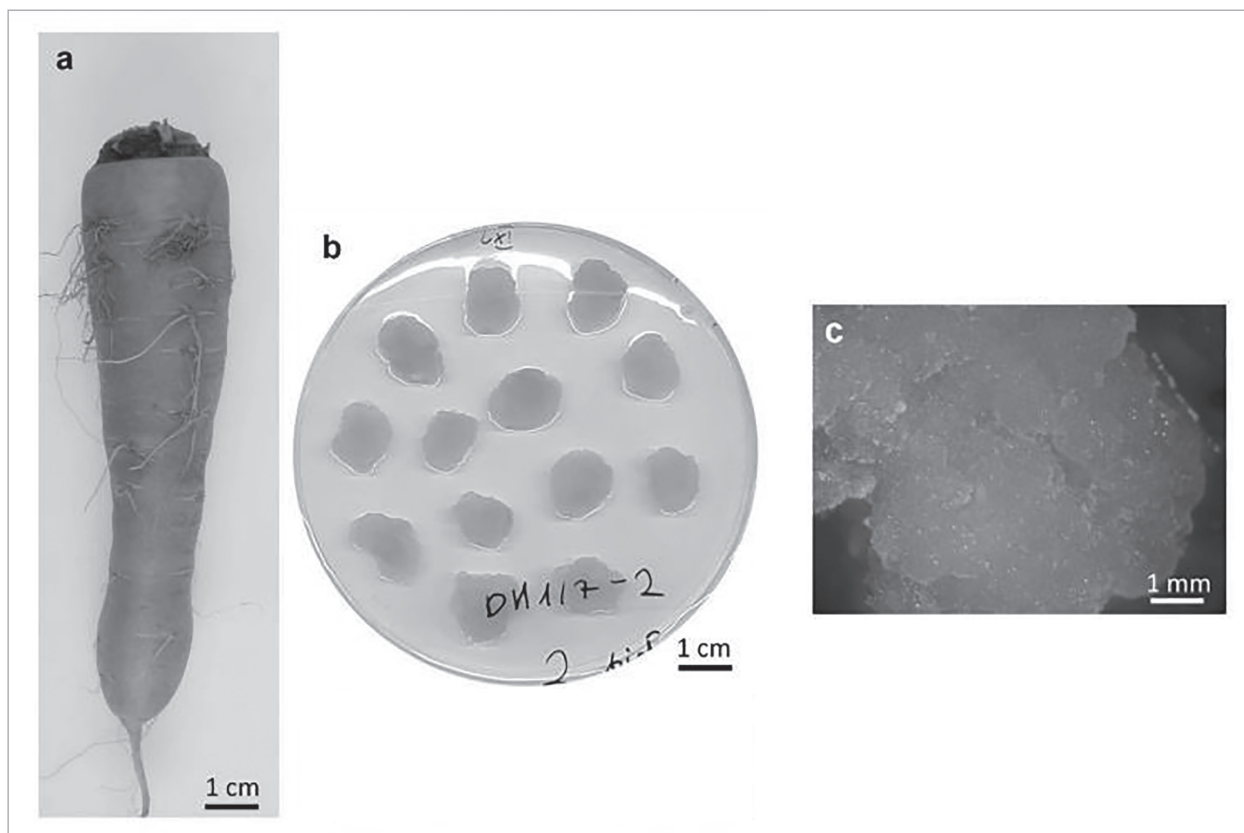


FIGURA 2.6 Ilustração do início da geração de linhagem de células vegetais a partir da cenoura. a) cenoura; b) calos formados após 2 meses de cultivo; c) foto ampliada dos calos.

Fonte: Oleszkiewicz et al. (2018); <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

o momento, existem quatro produtos produzidos em animais transgênicos licenciados para uso humano terapêutico: a antitrombina; o inibidor de C1 esterase; a lipase ácida lisossômica; e o fator de coagulação sanguínea VII ativado (WALSH, 2022).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os sistemas de expressão apresentam vantagens e desvantagens, e não há nenhum sistema universal que reúna todas as características desejadas e que possa ser aplicado em todas as situações. Na Tabela 2.3, é possível verificar as principais semelhanças e diferenças entre os diferentes sistemas de expressão. A escolha do hospedeiro para a fabricação de proteínas recombinantes terapêuticas é feita caso a caso, envolvendo um profundo conhecimento técnico. O sistema de expressão é determinado pelas características específicas de cada

molécula (farmacocinética e farmacodinâmica) e pela resposta do organismo humano a ela (resposta imunogênica), e não necessariamente pelo rendimento, custo e facilidade do processo de produção. Algumas proteínas não glicosiladas, como a insulina, e proteínas que são glicosiladas naturalmente, mas que possuem atividade farmacológica independente da glicosilação, como algumas citocinas como interferonas, interleucinas e fator de necrose tumoral, são geralmente produzidas na forma recombinante em sistemas procarióticos ou em leveduras. Nos casos em que a glicosilação é necessária para a atividade e meia-vida da proteína no paciente, os sistemas eucarióticos são os escolhidos para a produção. No entanto, vale ressaltar que as modificações pós-tradicionais diferem entre os vários sistemas eucarióticos, e o padrão de glicosilação que mais se assemelha aos encontrados nos humanos está presente nas células de mamíferos.

TABELA 2.3 Características dos diferentes sistemas de expressão utilizados na produção de biofarmacêuticos recombinantes

Sistemas de expressão	Custo operacional ¹	Enovelamento	Escalabilidade ²	Glicosilação	Capacidade de secreção	Segurança ³	Velocidade de produção ⁴	Rendimento do produto ⁵
Células de mamíferos	+++++	Satisfatório	Difícil	Padrão similar ao humano	Alta	++	Média	Médio-alto
Bactérias	+++	Não realiza	Média	Não realiza	Baixa	+++	Muito alta	Alto
Leveduras	++++	Satisfatório	Média	Limitada (rica em manose)	Alta	++++	Alta	Alto
Células de insetos	++++	Satisfatório	Difícil	Limitada e baixa complexidade	Alta	++++	Média	Alto
Plantas transgênicas	+	Satisfatório	Muito fácil	Padrão similar ao humano ⁶	Não secreta ⁷	+++++	Baixa	Baixo
Plantas (expressão transitente)	++	Satisfatório	Muito fácil	Padrão similar ao humano ⁶	Não secreta ⁷	+++++	Baixa	Baixo
Células vegetais	++	Satisfatório	Fácil	Padrão similar ao humano ⁶	Muito Baixa	+++++	Baixa	Médio
Animais transgênicos	+++++	Satisfatório	Fácil	Padrão similar ao humano	Alta	+	Muito baixa	Alto

1. Nível relativo ao custo global, considerando principalmente o processo de *upstream*, uma vez que o processo de *downstream* tem complexidade similar entre os sistemas de expressão.

2. Capacidade de escalar o processo de *upstream* baseado na complexidade, ou seja, quanto mais difícil, maior o risco de redução de performance ao escalar o processo devido a variação intrínseca do organismo com relação às condições de processo. Essa dificuldade também é relacionada com a necessidade de controle do processo.

3. Referente ao potencial de contaminação do produto final com endotoxinas (eleva o risco para bactérias) ou contaminação por vírus que infecta humanos.

4. Relação com a taxa de crescimento do organismo.

5. Os níveis são comparativos; o nível baixo não significa inviabilidade econômica.

6. Não adiciona galactose e ácido siálico terminais; além disso, insere fucose com ligação alterada em comparação às células de mamíferos.

7. Plantas inteiras precisam necessariamente ser maceradas para que a proteína seja extraída, portanto não secretam direto no sobrenadante.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

REFERÊNCIAS

- ANAND, U. et al. Novel coronavirus disease 2019 (Covid-19) pandemic: From transmission to control with an interdisciplinary vision. **Environmental Research**, v. 197, p. 111126, 2021.
- ASSENBERG, R. et al. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p. 393-402, jun. 2013.
- BAGHBAN, R. et al. New Developments in *Pichia pastoris* Expression System, Review and Update. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 451-67, 5 set. 2018.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 283-91, 16 ago. 2005.
- CHEN, W. C. W. et al. A synthetic transcription platform for programmable gene expression in mammalian cells. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 6167, 18 out. 2022.
- COHEN, S. N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240-4, nov. 1973.
- FAORO, C.; ATAIDE, S. F. Noncanonical Functions and Cellular Dynamics of the Mammalian Signal Recognition Particle Components. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 25 maio 2021.
- FLOOD, C. **Fraunhofer: Looking for the medicine in marijuana**. Disponível em: <<https://www.capegazette.com/article/fraunhofer-looking-medicine-marijuana/97886>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- FOX, J. L. First plant-made biologic approved. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 472, 7 jun. 2012.
- GOH, J. B.; NG, S. K. Impact of host cell line choice on glycan profile. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 851-67, 18 ago. 2018.
- GOMORD, V.; FAYE, L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 171-81, abr. 2004.
- GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 8, p. 1015-26, ago. 2008.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 419-25, 30 ago. 2013.
- GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 4 jul. 2017.
- HAMAKER, N. K.; LEE, K. H. Site-specific integration ushers in a new era of precise CHO cell line engineering. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 22, p. 152-60, dez. 2018.
- HAYAT, S. M. G. et al. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (E.coli): What We Need to Know. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 6, p. 718-25, 10 maio 2018.
- HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. **Nature**, v. 342, n. 6245, p. 76-8, nov. 1989.
- HONG, M. et al. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 20 set. 2022.
- HUANG, T.-K.; MCDONALD, K. A. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 168-84, ago. 2009.
- JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 10, p. 2904-9, out. 1972.
- KLIMYUK, V. et al. **Production of Recombinant Antigens and Antibodies in *Nicotiana benthamiana* Using 'Magnifection' Technology: GMP-Compliant Facilities for Small- and Large-Scale Manufacturing**. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/82_2012_212>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- KOMAROVA, T. V et al. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 8, p. 859-76, 9 ago. 2010.
- LAI, T.; YANG, Y.; NG, S. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 5, p. 579-603, 26 abr. 2013.
- LILLICO, S. G. et al. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 3, p. 191-6, fev. 2005.
- LIU, X. et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 448, 31 jan. 2018.
- LOBSTEIN, J. et al. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 753, 8 dez. 2012.
- LOMONOSSOFF, G. P.; D'AOUST, M.-A. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1237-40, 16 set. 2016.
- MADHAVAN, A. et al. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 124, 30 dez. 2021.
- MAKRIDES, S. C. Components of Vectors for Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. **Protein Expression and Purification**, v. 17, n. 2, p. 183-202, nov. 1999.
- MCELWAIN, L. et al. Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 44, n. 8, p. 917-31, 7 ago. 2022.
- MORAES, A.; AUGUSTO, E.; CASTILHO, L. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos à Terapia Gênica**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2008.
- O'KEEFE, B. R. et al. Engineering soya bean seeds as a scalable platform to produce cyanovirin-N, a non- <sc>ARV</sc> microbicide against <sc>HIV</sc>. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 7, p. 884-92, 9 set. 2015.
- OLESZKIEWICZ, T. et al. Unique chromoplast organisation and carotenoid gene expression in carotenoid-rich carrot callus. **Planta**, v. 248, n. 6, p. 1455-71, 21 dez. 2018.
- PĂCURAR, D. I. et al. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, n. 2, p. 76-81, ago. 2011.
- PEREIRA, S.; KILDEGAARD, H. F.; ANDERSEN, M. R. Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 3, p. 1700499, mar. 2018.

36. PUETZ, J.; WURM, F. M. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. **Processes**, v. 7, n. 8, p. 476, 24 jul. 2019.
37. SCHILLBERG, S.; FINNERN, R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins – Critical evaluation of achievements and future challenges. **Journal of Plant Physiology**, v. 258-9, p. 153359, mar. 2021.
38. SMITH, E. F.; TOWNSEND, C. O. A Plant-Tumor of Bacterial Origin. **Science**, v. 25, n. 643, p. 671-3, 26 abr. 1907.
39. SODOYER, R. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 18, n. 1, p. 51-62, 2004.
40. SPIEGEL, H. et al. Current Status and Perspectives of the Molecular Farming Landscape. In: **Molecular Pharming**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2018. p. 1-23.
41. SWOPE, K. et al. **Manufacturing plant-made monoclonal antibodies for research or therapeutic applications**. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/Covid19-industry/drugs-vaccines-treatments/vaccines/medicago.html>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
42. SWOPE, K. et al. Reproducibility and flexibility of monoclonal antibody production with *Nicotiana benthamiana*. **mAbs**, v. 14, n. 1, 31 dez. 2022.
43. TRINCHERA, M.; ARONICA, A.; DALL’OLIO, F. Selectin Ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in Gastrointestinal Cancers. **Biology**, v. 6, n. 4, p. 16, 23 fev. 2017.
44. TRIPATHI, N. K. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. **ChemBioEng Reviews**, v. 3, n. 3, p. 116-33, jun. 2016.
45. TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 20 dez. 2019.
46. TRIPATHY, S. et al. Plant-based vaccine research development against viral diseases with emphasis on Ebola virus disease: A review study. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 60, p. 261-7, out. 2021.
47. WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-8, p. 773-80, set. 2010.
48. WALSH, G.; WALSH, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 12, p. 1722-60, 5 dez. 2022.
49. XIAO, S.; SHILOACH, J.; BETENBAUGH, M. J. Engineering cells to improve protein expression. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 26, p. 32-8, jun. 2014.

Parte II

Biotecnologías para vacinas

Introdução à biotecnologia em vacinas

Elena Cristina Caride
Ivna Alana F. B. da Silveira
Akira Homma

Neste capítulo, são discutidos aspectos relacionados à biotecnologia em vacinas. O capítulo inicia por uma contextualização histórica sobre a descoberta e a utilização das vacinas, considerando o contexto global, em geral, e o brasileiro, em específico. Em seguida, avança com o detalhamento das plataformas vacinais e os tipos de vacinas e suas características. Além disso, segue discorrendo sobre pesquisa, desenvolvimento e produção de vacinas, trazendo um debate específico sobre a vacina da Covid-19. Por fim, são discutidos os desafios nacionais para o desenvolvimento de vacinas e as contribuições do Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS).

3.1 BIOTECNOLOGIA EM VACINAS: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO

Vacinas são produtos farmacêuticos que contêm microrganismos vivos com baixa virulência (vírus ou bactérias atenuadas), microrganismos mortos ou substâncias obtidas de microrganismos. As vacinas podem ser utilizadas para conferir proteção de forma profilática ou terapêutica contra uma infecção ou exposição posterior a um patógeno. Dessa forma, os antígenos incluídos nas vacinas devem induzir uma resposta imunológica, conferindo assim a proteção desejada, após inoculação em animais ou seres humanos para evitar ou tratar doenças infecciosas (POLLARD; BIJKER, 2021).

A primeira vacina desenvolvida no mundo foi uma vacina contra o vírus da varíola. Ela foi desenvolvida de forma totalmente empírica, mas demonstrou o princípio da imunização. A partir dos seus resultados, surgiu um novo ramo da ciência que impulsionou o desenvolvimento de novas vacinas. Cem anos depois, Louis Pasteur desenvolveu as primeiras vacinas bacterianas e desvendou mecanismos das infecções mortais.

Seguindo Pasteur, que havia atenuado o vírus da raiva por passagem em cérebros de coelhos, Max Theiler usou diferentes tecidos animais para atenuar o vírus da febre amarela, resultando em uma das vacinas mais eficazes desenvolvidas. Theiler recebeu o Prêmio Nobel em 1951 por esse trabalho e continua sendo o único Prêmio Nobel a ser concedido pelo desenvolvimento de uma vacina viral.

No final do século XIX, a bacteriologia se tornou uma ciência, abrindo caminho para o desenvolvimento de vacinas para difteria, tétano e *pertussis* (coqueluche). No século XX, a cultura de células *in vitro* desenvolvida por Enders, Weller e Robbins, em 1949, abriu um novo horizonte na ciência. Desde então, surgiram várias vacinas virais obtidas por esse processo, sendo a primeira a de poliomielite. Quando a vacina contra a poliomielite foi licenciada em 1955, Jonas Salk, seu inventor, tornou-se um cientista famoso. Na década de 1960, outras três vacinas virais foram desenvolvidas e controlaram as doenças sarampo (1963), caxumba (1967) e rubéola (1969). Essas três vacinas foram combinadas na vacina TVV pelo Dr. Maurice Hilleman, em 1971. Finalmente,

a obtenção de vacina hepatite B pela produção de HBsAg clonado em células de levedura, em 1986, possibilitou o desenvolvimento de vacinas obtidas por engenharia genética. Nessa mesma linha, foram obtidas as vacinas contra HPV em 2006.

As vacinas transformaram a saúde pública, principalmente após o estabelecimento de programas nacionais de imunização na década de 1960. Ao lado da água potável, as vacinas são a maior conquista de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 2 e 3 milhões de vidas são salvas a cada ano pelos programas de imunização, contribuindo globalmente para a redução da mortalidade de crianças com menos de 5 anos de idade. O êxito das Campanhas de Vacinação contra a varíola na década de 1960 mostrou que a vacinação em massa tinha o poder de erradicar uma doença. Assim, o último caso de varíola foi notificado no Brasil em 1971 e, no mundo, em 1977, na Somália (GATES, 2011).

Historicamente, as vacinas eram consideradas “apenas para crianças”. No entanto, as vacinas para adultos estão se tornando cada vez mais comuns e necessárias (PLOTKIN, 2018). A maioria dos adultos pensa apenas no reforço antitetânico recomendado a cada 10 anos, e, mesmo assim, muitos apenas tomam a vacina ao se machucarem. As vacinas contra a gripe, disponíveis desde a década de 1940, agora são recomendadas para a maioria dos adultos. Além disso, as vacinas como TVV e catapora são recomendadas para adultos que não tiveram as doenças. As vacinas como hepatite A e hepatite B são recomendadas para subgrupos da população adulta. A vacina contra o HPV ficou disponível em 2006 e em 2018, com licença ampliada para a inclusão de pessoas de até 45 anos. A primeira vacina contra herpes-zóster foi licenciada em 2006, e uma segunda, em 2017. Duas doses dessa vacina, separadas por dois a seis meses, são recomendadas para pessoas com 50 anos ou mais. No final de 2020, as primeiras vacinas para Covid-19 foram aprovadas para uso em adultos, iniciando-se a vacinação pelos idosos.

Diante desse contexto, o objetivo deste capítulo é, de uma perspectiva histórica, apresentar o papel da biotecnologia aplicada na pesquisa, no desenvolvimento e na produção de vacinas, bem como as gerações tecnológicas que permitiram a introdução de vacinas nos programas de imunização.

3.2 ASPECTOS HISTÓRICOS SOBRE A DESCOBERTA E UTILIZAÇÃO DAS VACINAS

A história das vacinas se confunde com a história de epidemias que assolaram a humanidade. O flagelo da varíola perpassou implacavelmente o segundo milênio,

matando milhões de pessoas em todo o mundo. As epidemias de *influenza*, coqueluche (*pertussis*), sarampo, febre amarela e outras doenças infecciosas letais enfatizaram a necessidade de combater as doenças contagiosas (THE COLLEGE OF PHYSICIANS OF PHILADELPHIA, 2023). A Figura 3.1 apresenta uma linha do tempo com os principais marcos nas descobertas de vacinas.

A vacinação, como forma de proteção de seres humanos contra doenças, tem uma longa história, embora apenas no século XX tenha se tornado uma prática de rotina aplicável a grandes populações. Desde o século VII, existem relatos de que budistas da Índia bebiam veneno de cobra na busca de se tornarem imunes às picadas desse animal. Relatos impressos no documento *The Golden Mirror of Medicine*, em 1742, na China, fazem referências a inoculações contra varíola desde 1695. Mesmo o ato de variolização, que consistia na administração de material purulento de pústulas variólicas da pele de pacientes em indivíduos saudáveis, desenvolvido no século XVIII por Edward Jenner, era comum na Ásia antes do século XVI. A prática de variolização foi introduzida na Inglaterra em 1721 por Lady Mary Montagu, e esse tratamento resultou em cerca de 2% a 3% de mortes de pessoas após contraírem a doença. Embora a origem exata da variolização seja desconhecida, ela se desenvolveu em algum lugar da Ásia Central e se espalhou pela China, oeste da Turquia e Europa. Na mesma época, outros pesquisadores também demonstraram que uma doença era causada por um agente infeccioso no sangue dos pacientes. Em 1757, o médico escocês Francis Home inoculou pessoas ativamente contra sarampo e publicou esses estudos.

Em 1774, um homem que cuidava de vacas, chamado Benjamin Justy, fez a associação entre mecanismos de prevenção da varíola humana com o ato de ordenhar vacas, em função do contato prévio com o vírus bovino. Ele era imunizado contra o vírus humano após contrair o vírus bovino e imunizou a própria mulher e duas crianças com o vírus bovino, para evitar a epidemia causada pelo vírus humano. As duas crianças permaneceram imunizadas durante 15 anos. Apesar desses fatos, o primeiro sucesso alcançado na prevenção de uma doença infecciosa por meio da utilização de vacinas foi obtido por Edward Jenner, em 1796, contra o vírus da varíola (*smallpox*) após a imunização de humanos com o vírus da varíola bovina (*cowpox*; mesma família do vírus da varíola Orthopoxvirus).

Inicialmente, ele provou que o vírus bovino podia ser transmitido diretamente de uma pessoa para outra, independentemente dos surtos esporádicos, fornecendo o conceito de inoculação em larga escala. Jenner imunizou ativamente um garoto, James Phipps, de 8 anos de idade, com o vírus bovino e depois desafiou a criança

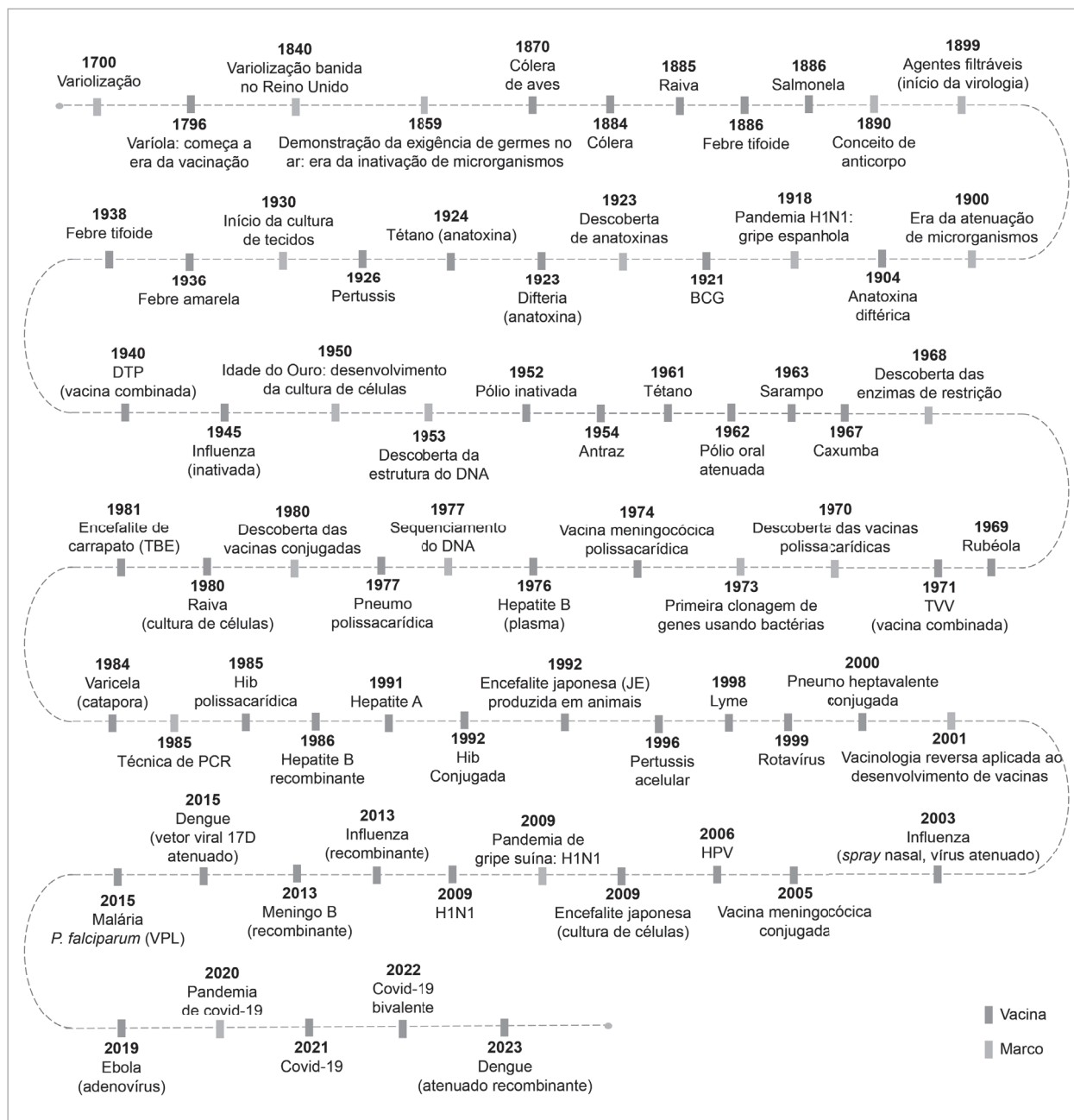


FIGURA 3.1 Principais marcos no desenvolvimento de vacinas. A figura representa uma linha do tempo com o ano de desenvolvimento das vacinas, assim como marcos importantes na história da ciência, que fundamentaram o desenvolvimento de vacinas e de plataformas vacinais. Os retângulos verdes representam o ano de desenvolvimento das vacinas, e os retângulos cinza representam os marcos científicos. Fonte: elaborada pelos autores (2023).

ao inocular o vírus humano. O garoto não desenvolveu a doença, e os resultados do sucesso na proteção do indivíduo foram publicados, constituindo assim a prática da inoculação de vacinas. Edward Jenner, então, expôs repetidamente o menino à varíola. Sua teoria era que seu jovem ficaria imune à varíola após a inoculação. Foi um procedimento radical e arriscado, que não seria

aprovado nos comitês de ética em pesquisa atuais e que poderia ter sido letal.

No entanto, o procedimento mostrou resultados positivos, e essa pequena vitória encorajou o médico a estender seus estudos, o que resultou em um relatório que provou que sua vacina era segura em crianças e adultos. Após o estabelecimento e a comprovação do

princípio da vacinação, o passo seguinte foi a aplicação desse novo método a outras doenças. Jenner, o fundador da imunização, abriu um novo ramo da ciência, mas caberia a uma nova geração de pensadores inovadores impulsionar a vacinação.

A vacinação para varíola foi sendo difundida no mundo, mas, em 1836, Edward Ballard identificou problemas na escolha de novas cepas de *cowpox* para fins vacinais, uma vez que cepas se tornavam mais fracas, após sucessivas passagens. A vacina apresentava também problemas quanto à contaminação e estabilidade. Em 1850, cientistas alemães utilizaram glicerina para matar bactérias e para conservação de fluidos biológicos, o que originou vacinas mais estáveis e de potência consistente.

A vacina antivariola foi produzida por muitos anos utilizando vitelos, assim como desenvolvido por Jenner. Conseguia-se a vaccínia (vírus vacinal), raspando-se a pele de vitelos infectados com *cowpox* (varíola de vaca). O produto obtido era, então, filtrado, para evitar a contaminação por outros agentes patogênicos. Foram realizadas várias tentativas de cultura do vírus fora do vitelo, mas a produção da vacina contra a varíola somente passou por uma profunda modificação com a introdução da técnica de cultivo do vírus em embrião de galinha (ovos), no século XIX.

A partir dos estudos de Jenner, a atenção da classe médica se voltou para os méritos da imunização com agentes patogênicos inativados e/ou atenuados, na tentativa de buscar resistência a doenças endêmicas e epidêmicas. Surgiam assim a prática da vacinação e o conceito de profilaxia. Porém, essa nova ciência somente teve um avanço considerável após quase 100 anos, em 1885, quando Louis Pasteur desenvolveu a primeira vacina humana contra raiva.

Em 1870, Pasteur introduziu conceitos extremamente importantes por meio de estudos com a bactéria causadora de cólera em aves. Nesse período, passou a estudar fenômenos como inativação, atenuação e modificação de microrganismos por meio da prática de subculturas. Trouxe, ainda, conceitos sobre estimulação de virulência pela passagem de agentes infecciosos em animais e, principalmente, a descoberta da transmissão de doença entre indivíduos e a ideia de proteção como um conceito preliminar de imunidade. Os esforços de Pasteur para entender os mecanismos das infecções mortais, como raiva ou antraz, o levaram a desenvolver vacinas contra ambos na década de 1880. Devido a esses avanços, a vacinação obteve atenção e tornou-se uma questão de prestígio nacional, com as leis de vacinação obrigatória implementadas no final do século.

Pasteur, estudando a cólera aviária em galinhas, causada pela bactéria *Pasteurella septica*, verificou redução de patogenicidade em culturas de duas semanas.

Os animais inoculados com suspensões dessas culturas não desenvolviam a doença e se mostravam protegidos quando recebiam posterior inoculação com cepas de *Pasteurella septica*, recém-semeadas e altamente virulentas. Dessa forma, reproduziu o experimento de Jenner, que utilizou o vírus *Vaccinia* pouco virulento para a indução de proteção contra varíola. Esse resultado sugeriu que as culturas mais antigas poderiam sofrer alterações que induziam a redução de virulência com manutenção de sua imunogenicidade. Pasteur, um dos pioneiros mais influentes da vacinologia, usou a terminologia de vacina (“matéria *vaccinia*”, que em latim significa “material proveniente de vaca”) para se referir genericamente aos agentes imunizantes, em homenagem a Jenner.

No final do século XIX, a bacteriologia emergiu como uma nova ciência. Assim, a partir da descoberta de bactérias como agentes etiológicos de doenças humanas e veterinárias, entre elas cólera, febre tifoide, difteria, tuberculose e a infecção de animais pelo *Bacillus anthrax*.

A primeira vacina bacteriana para uso humano foi desenvolvida por Jaime Ferran, em 1884, contra *Vibrio cholerae*. No entanto, apesar do sucesso, o produto estava contaminado, por isso foram observados muitos efeitos adversos. Em 1891, Waldemar Haffkine, por sugestão de Pasteur, desenvolveu novo agente imunizante contra a cólera, testada na Índia, que, embora tenha apresentado eficácia promissora, foi abandonada pela dificuldade de padronização dos procedimentos de produção em larga escala (PLOTKIN, 2018).

Um novo avanço no desenvolvimento de vacinas bacterianas ocorreu em 1886, quando Edmund Salmon e Theobald Smith publicaram os primeiros resultados da obtenção de uma vacina contra *Salmonella* obtida a partir de células mortas. Richard Pfeiffer e Wilhelm Kolle, em 1886, e Amroth Wright trabalharam independentemente no desenvolvimento de uma vacina contra *Salmonella typhi* (*S. typhi*), de células mortas pelo calor e conservadas com fenol, que foi amplamente utilizada. Esses estudos deram origem ao surgimento, 15 anos mais tarde, das vacinas humanas de células inteiras mortas, de uso parenteral, contra febre tifoide, cólera e peste bubônica.

Ainda, durante o apogeu das vacinas bacterianas compostas de células mortas, em 1888, Alexandre Yersin e Roux demonstraram que o bacilo da difteria produz uma toxina extremamente poderosa. Dois anos mais tarde, Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato descreveram a presença de antitoxina em animais infectados com suspensões de bacilos diftéricos com capacidade de neutralizar a toxina diftérica em cultura e proteger animais do desafio com a bactéria viva. Alexander Glennie, em 1904, foi o pioneiro na preparação da antitoxina diftérica a partir do tratamento da toxina bruta

com formalina, que destrói a atividade tóxica da toxina, preservando sua capacidade imunogênica. Esse procedimento foi, em seguida, adotado na obtenção da anatoxina tetânica, e esses dois componentes inauguraram a era das vacinas bacterianas de subunidades. Posteriormente, foi desenvolvida a produção de antitoxinas específicas para imunização passiva.

Embora não sejam verdadeiras vacinas, as antitoxinas foram criadas quando uma toxina do tétano ou difteria foi administrada a um grande mamífero, como um cavalo. O mamífero desenvolveria anticorpos contra a toxina, sendo colhidos, purificados e administrados a pessoas que apresentavam sinais da doença.

Em 1902, a contaminação de uma dessas antitoxinas com a toxina tetânica real levou a vários ferimentos. O governo federal dos Estados Unidos respondeu criando a Agência Regulatória dos Estados Unidos, conhecida como *Food and Drug Administration* (FDA) – foi o primeiro passo para a regulamentação de medicamentos e terapias, fundamento em constante aperfeiçoamento até a atualidade. Mais tarde, na década de 1920, os cientistas descobriram que uma antitoxina combinada com uma toxina inativaria a toxina, mas a deixaria intacta o suficiente para que o sistema imunológico humano reagisse. Foram desenvolvidas vacinas antitoxina-toxina para difteria e tétano. No entanto, um grande segmento da população que recebia a antitoxina (sozinha ou em combinação com uma toxina) desenvolvia uma reação alérgica às proteínas dos animais usados para criar a antitoxina. Para resolver esse problema, os cientistas encontraram uma maneira de inativar a toxina antes de administrá-la como vacina. A era das vacinas de anatoxinas nasceu, com as vacinas contra difteria e tétano. A proteção contra essas doenças ficou mais segura após não depender de grandes mamíferos para produzi-las.

No final do século XIX, a febre amarela era uma pestilência conhecida e temida no hemisfério ocidental e nas regiões costeiras da África Ocidental, para a qual não se conhecia causa ou tratamento eficaz. Conhecida frequentemente como *yellow jack*, por causa da bandeira amarela de quarentena nos navios, a doença aterrorizou as populações e interrompeu gravemente o comércio. Depois de tentativas frustradas de produzir vacinas baseadas em bactérias, a descoberta de um agente viral causador da febre amarela e seu isolamento em macacos abriram novos caminhos de pesquisa.

Em junho de 1927, o sangue de um africano de 28 anos chamado Asibi, que sofria de uma doença febril relativamente leve, à qual sobreviveu, foi injetado em primatas rhesus importados da Índia (os macacos não adoeceram) por Adrian Stokes. Os macacos se mostraram suscetíveis, estabelecendo a infecção pela primeira vez em um hospedeiro de laboratório adequado. O

vírus, então, pôde ser transportado para o laboratório e devidamente estudado. Liderados pelo pesquisador Max Theiler, pesquisadores do Instituto Rockefeller, em Nova York, iniciaram o desenvolvimento da vacina de febre amarela de maneira totalmente empírica. Theiler sabia que o vírus herpes-simples havia sido cultivado no cérebro de camundongos por Howard Andervont e conhecia o método de Pasteur de atenuar o vírus da raiva em tecido nervoso não hospedeiro.

Em 1930, Theiler iniciou o trabalho para reduzir a patogenicidade do vírus para que pudesse ser usado como uma vacina. Ele evidenciou que a passagem repetida em culturas de tecido cerebral de camundongos reduzia o efeito do vírus na maioria dos órgãos, mas aumentava potencialmente seu impacto no sistema nervoso central, o que poderia causar encefalite. Max Theiler e Hugh Smith passaram a utilizar tecido de embriões de galinha. Os pesquisadores fizeram passagens da cepa Asibi, inicialmente em tecido embrionário de camundongo e soro de macaco; em seguida, em embrião de galinha inteiro picado e, finalmente, em embrião de galinha, do qual o cérebro e a medula espinhal haviam sido removidos. Após 176 passagens, o vírus 17D, como ficou conhecido, havia perdido neurotropismo, viscerotropismo e competência de infectar mosquitos, mas ainda tinha o potencial de desencadear uma resposta imunológica.

Em 1936, foi realizada a vacinação experimental de funcionários do Instituto Rockefeller usando as passagens número 227 e 229. A vacina se mostrou com aceitável tolerabilidade e desenvolveu anticorpos neutralizantes. Em 1937, o Instituto financiou os primeiros ensaios de campo da vacina no Brasil, e, após o sucesso desses testes, iniciou-se a fabricação em larga escala da vacina. A produção brasileira da vacina 17DD de febre amarela ficou consolidada no Instituto Oswaldo Cruz, graças à determinação e competência de Henrique de Azevedo Penna e seu grupo, em colaboração com a Fundação Rockefeller (POST et al., 2001). Por seus esforços, Theiler foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1950 e, em seu discurso, agradeceu os esforços de Penna. Desde a sua criação, em 1976, a Bio-Manguinhos/Fiocruz produz 700 milhões de doses da vacina de febre amarela e, anualmente, produz e fornece cerca de 20 milhões de doses.

A vacina contra tuberculose (BCG, traduzido do inglês *bacille de Calmette-Guérin*) foi a primeira vacina bacteriana atenuada a ser produzida para uso em rotina, em seres humanos, obtida a partir de culturas sucessivas do bacilo, isolado por Albert Calmette e Camile Guérin em 1906. A partir de 1927, a vacina passou a ser utilizada como rotina em vários países do mundo.

Outro desenvolvimento importante na área de vacinas bacterianas no início do século XX foi a vacina composta de células inteiras mortas contra a coqueluche, contendo o agente etiológico *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), isolado por Jules Bordet e Octave Gengou em 1900 e que continua sendo utilizada.

Na década de 1930, os cientistas desenvolveram o microscópio eletrônico. Isso provocou uma revolução na virologia, pois as partículas virais individuais foram vistas pela primeira vez e classificadas de acordo com suas formas e tamanhos. Amostras da pandemia de gripe espanhola de 1918 foram analisadas, e o vírus *influenza* foi observado e classificado. Amostras de tecido nervoso de vítimas da poliomielite mostraram o poliovírus. Em 1954, após décadas de pesquisa, Jonas Salk e equipe desenvolveram a primeira vacina para poliomielite de vírus inativado. Foi graças aos trabalhos de Isabel Morgan que Salk desenvolveu a vacina contra poliomielite. Isabel Merrick Morgan, virologista da Universidade Johns Hopkins, demonstrou experimentalmente que uma vacina com vírus inativado da poliomielite protegia macacos contra um desafio com o vírus selvagem.

Na época, a maioria dos virologistas proeminentes acreditava que uma vacina somente seria obtida usando um vírus vivo atenuado. Sua pesquisa levou à identificação de três sorotipos distintos de poliovírus, os quais deveriam ser incorporados a uma vacina para fornecer imunidade completa. Após cinco anos de trabalho, sua equipe se tornou a primeira a inocular macacos com sucesso com uma vacina de vírus inativado. Ela, provavelmente, estava um ou dois anos à frente de Jonas Salk na corrida por uma vacina, mas, como muitas mulheres americanas nos anos após a Segunda Guerra Mundial, grande parte de sua energia foi para ser dona de casa. Caso tivesse continuado suas pesquisas, se discutiria sobre a vacina Morgan, e não sobre a vacina Salk.

Na década de 1940, os cientistas trabalharam em vacinas contra *influenza*, poliomielite, sarampo e outros vírus considerados de importância crítica. Essa década trouxe as vacinas contra a gripe, que então se entendia não ser apenas um vírus, mas vários tipos de vírus, para os quais seriam necessárias vacinas diferentes.

As décadas de 1950 e 1960 também trouxeram grande cooperação entre as nações na eliminação e erradicação da varíola. Aquele velho adversário que iniciou a ciência da vacinação estava recuando por meio de programas em países desenvolvidos. Quem não quis ser vacinado enfrentou muitas pesadas e a impossibilidade de participar de espaços públicos como escolas, ou mesmo de determinados empregos. Por meio de um esforço mundial para vacinar todas as pessoas vivas, a varíola se tornou o primeiro vírus humano a ser erradicado quando o último caso foi detectado, em 1978. Desde a

sua erradicação, a vacina contra a varíola é usada apenas em pessoas que trabalham com o vírus da varíola e em militares como parte da preparação contra uma liberação intencional do vírus.

Na década de 1960, foram desenvolvidas três vacinas clássicas de vírus atenuados: contra o vírus do sarampo, por Samuel Katz e John Enders; vírus da caxumba, por Maurice Hilleman; e vírus da rubéola, por vários autores (Harry Meyer, Abel Prinzie e Stanley Plotkin). Todas foram desenvolvidas por passagem em ovos embrionados ou cultura de células e, no caso do vírus da rubéola, passagem em células incubadas a 30°C selecionadas para atenuação. Em todos os três casos, foi estabelecido por meio de administração passiva que a presença de anticorpos neutralizantes se correlacionava com a proteção; portanto, o objetivo era tornar os vírus menos reatogênicos, mas manter sua imunogenicidade. A década de 1960 trouxe também a vacina oral contra a poliomielite como um substituto para a vacina de Salk, depois que o Incidente Cutter reduziu a confiança do público nas vacinas (BBC NEWS, 2020). Assim que a vacina de Salk foi aprovada, seis laboratórios foram licenciados para produzi-la e, dentre estes, o Cutter Laboratories, na Califórnia. A empresa farmacêutica produziu 380 mil doses do produto, mas alguns lotes continham, acidentalmente, vírus não inativados. Como resultado, foram confirmados mais de 260 casos de pólio, com e sem paralisia. Esse episódio, apesar de trágico, foi fundamental para melhorar os sistemas de fabricação e a regulamentação sobre as vacinas. A vacina oral de vírus vivos e atenuados, desenvolvida por Albert Sabin, foi testada na União Soviética e na América Latina com relevante sucesso.

Durante muito tempo negligenciada, a doença meningocócica obteve maior atenção como um problema de saúde pública graças aos esforços do médico militar francês Léon Lapeyssonnie (BAYLAC-PAOULY, 2019). Lapeyssonnie trabalhou por vários anos nas colônias francesas da África Ocidental, estudando a incidência e prevalência da tripanossomíase africana e, durante esse período, pôde observar o impacto da doença na vida profissional e nas atividades de saúde. Lapeyssonnie trabalhou para a OMS de 1961 a 1962, período no qual realizou missões em três regiões diferentes da África e publicou uma importante monografia sobre meningite cerebrospinal, que continua sendo referência sobre a doença e sua epidemiologia. Ele destacou o problema de saúde pública na África, especialmente em uma área que se estende do Senegal à Etiópia, a qual nomeou “cinturão de meningite”.

A partir dessa monografia, a OMS lançou um programa de pesquisa contra a doença, incluindo o desenvolvimento de uma vacina, onde escolheu o Institut

Mérieux de Lyon da OMS para sua produção. Com a ajuda da OMS, Léon Lapeyssonnie e a equipe do Institut Mérieux desenvolveram uma vacina, testada em 1967 em Burkina Faso, na África Ocidental. A história do desenvolvimento da vacina meningocócica A está no período descrito como “Era de Ouro” do desenvolvimento e produção de vacinas.

A Era de Ouro do desenvolvimento de vacinas foi lançada por um avanço metodológico em meados do século XX: o crescimento de vírus em cultura de células. Os pioneiros dessa técnica foram John Enders, Frederick Robbins e Thomas Weller. O método foi rapidamente aplicado ao desenvolvimento de vacinas. Nesse período, entre o final da década de 1940 e o final da década de 1970, o desenvolvimento e a produção de vacinas eram compartilhados entre instituições dos setores público e privado, muitas vezes em colaboração aberta. Bio-Manguinhos tem produzido a vacina meningocócica polissacarídica AC desde a década de 1970, graças a um acordo de cooperação técnica com o Instituto Mérieux, da França.

Na década de 1970, as primeiras vacinas bacterianas compostas de polissacarídeos capsulares purificados, presentes em bactérias encapsuladas, foram desenvolvidas, e os polissacarídeos meningocócicos foram as primeiras moléculas definidas quimicamente, a serem utilizadas como imunógenos. Esses compostos mostraram-se imunogênicos em adultos e crianças com mais de 18 meses de idade. Nessa mesma época, também, foram desenvolvidas vacinas polissacarídicas contra *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). O poder antigênico dos polissacarídeos havia sido descoberto por Michael Heidelberger e Oswald Avery em 1923, com base em pesquisas com a bactéria pneumococo. Heidelberger foi um imunologista americano, muitas vezes considerado o pai da imunologia moderna (NIH, 2023). Eles demonstraram que os polissacarídeos do pneumococo são antígenos, permitindo-lhe mostrar que os anticorpos são proteínas. No entanto, apenas na década de 1960, inspirado no trabalho de Heidelberger, Emil Gotschlich (Rockefeller Institute) extraiu polissacarídeos da cápsula da *Neisseria meningitidis* com um detergente chamado Cetavlon, o qual entraria na composição de sua vacina. Entre 1966 e 1968, enquanto servia como capitão do corpo médico do Walter Reed Army Institute of Research, Gotschlich fez parte de uma equipe que desenvolveu uma vacina polissacarídica purificada contra a meningite do grupo C, aprovada em 1970 para uso em todos os recrutas (ROCKEFELLER UNIVERSITY, 2023).

Na década de 1970, Michiaki Takahashi desenvolveu a vacina para varicela por meio da atenuação do vírus por passagem em células de cobaia. Além disso, uma

vacina inativada contra o vírus da encefalite japonesa, baseada na produção no cérebro de camundongos, uma vacina contra o vírus da encefalite transmitida por carapatos produzida em cultura de células e uma vacina contendo uma cepa auxotrófica viva do bacilo tifoide foram licenciadas.

Dois estratégias importantes para o desenvolvimento de vacinas se originaram na década de 1980: (i) a conjugação de polissacarídeos capsulares bacterianos a proteínas; (ii) a engenharia genética. Em 1981, foi desenvolvida a primeira vacina conjugada, obtida a partir da reação química entre o polissacarídeo capsular de Hib e uma proteína carreadora, com o objetivo de superar a limitação de reconhecimento e resposta do antígeno pelo sistema imunológico de crianças com menos de 18 meses de idade. Dessa forma, crianças de 2 meses podem ser vacinadas com um antígeno T-dependente e montar uma resposta imunológica apropriada contra o agente causador da doença. Existem vacinas conjugadas disponíveis para a proteção de doenças também causadas por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*. Essas vacinas têm demonstrado eficácia superior a 90% em indivíduos imunizados e diminuído o estado de portador assintomático, aumentando a imunidade de rebanho.

Entre o final da década de 1980 e o início da década de 1990, uma vacina altamente eficaz contra o vírus da hepatite A foi desenvolvida pela inativação clássica de todo o vírus. Da mesma forma, foram desenvolvidas várias vacinas contra o vírus da raiva derivadas de cultura de células que contêm vírus inativado e induzem anticorpos contra o vírus, que neutralizam o vírus no local da mordida e, assim, bloqueiam sua ligação aos axônios dos neurônios.

Na década de 1990, a poliomielite foi eliminada dos Estados Unidos e grande parte da Europa. No início dos anos 2000, a poliomielite foi eliminada das Américas, da Europa e da maior parte da Ásia. Na década de 2010, a poliomielite havia recuado para surtos locais na África e na Ásia Central. Na década de 2020, os tipos 2 e 3 da poliomielite foram erradicados, e o tipo 1 está presente apenas na Ásia Central.

Avanços na compreensão científica de microrganismos e imunidade trouxeram saltos no desenvolvimento de vacinas (PLOTKIN, 2018). Quando se entendeu que o patógeno poderia ser morto e, ainda, assim provocar uma resposta imunológica, questionou-se a necessidade de todo o patógeno ou apenas uma proteína em sua superfície. A resposta foi que as proteínas de superfície de alguns patógenos eram suficientes para desencadear uma resposta imunológica contra futuras infecções. Assim, teve início a era das vacinas de subunidades. Mais tarde, os cientistas descobriram que o material genético dos patógenos poderia ser usado em laboratório para

criar as proteínas. As proteínas poderiam ser produzidas em microrganismos não patogênicos e purificadas para compor uma vacina. Isso eliminou a necessidade de cultivar patógenos em ambientes perigosos, reduzindo o risco de exposições acidentais para os laboratórios que trabalham com vacinas.

Assim, a era das vacinas recombinantes havia nascido. A engenharia genética permitiu que bactérias, leveduras, células animais e células de insetos se tornassem substratos para a produção de proteínas imunogênicas. A primeira vacina desenvolvida por engenharia genética foi contra o vírus da hepatite B. Maurice Hilleman havia feito uma vacina purificando e inativando as partículas de antígeno do vírus da hepatite B de indivíduos infectados, mas esse método trazia um risco de segurança. No entanto, essa vacina derivada do plasma estabeleceu o fato de que os anticorpos contra o antígeno protegem contra a infecção. O desenvolvimento da engenharia permitiu a produção de novas vacinas contra o vírus da hepatite B, expressando em leveduras a proteína do antígeno de superfície do vírus.

Outras vacinas importantes foram desenvolvidas e licenciadas por meio de engenharia genética. A vacina para o papilomavírus humano foi desenvolvida expressando os genes que codificam as proteínas L1 dos sorotipos oncogênicos em leveduras ou baculovírus, para a produção de partículas semelhantes a vírus (VLP). Uma vacina contra a doença de Lyme foi desenvolvida pela expressão do antígeno de superfície da *Borrelia burgdorferi*, produzido em *Escherichia coli*.

O esforço global para produzir uma vacina para a Covid-19 foi uma das maiores conquistas científicas do século. A velocidade com que o processo passou da primeira sequência genética viral para o lançamento global de vacinas eficazes foi ainda mais impressionante quando se consideram outros desenvolvimentos. Por exemplo, até a Covid-19, a vacina de caxumba foi a mais rapidamente desenvolvida, em cerca de quatro anos, na década de 1960. No entanto, a maioria das vacinas leva acima de 10 anos de desenvolvimento. Vários fatores, incluindo financiamento sem precedentes (Operation Warp Speed), flexibilidade regulatória, conhecimento científico, alianças e parcerias tecnológicas ajudaram para conter a pior crise global de saúde (Covid-19). É importante que esse momento não seja visto apenas como uma conquista pontual, mas como um avanço genuíno na P&D de vacinas para o futuro.

3.2.1 História das vacinas no Brasil

A história das vacinas no Brasil começa no ano de 1804, quando a vacina contra a varíola chegou ao país trazida pelo Marquês de Barbacena. A introdução da

vacina no Brasil ocorreu em 1859, constatada a partir dos estudos de Joaquim Manuel de Macedo e Joaquim Norberto de Souza Silva, membros da Comissão Subsidiária de Trabalhos Históricos do Instituto Histórico e Geográfico Brasileiro, que elaboraram um “Parecer sobre a Introdução da Vacina no Brasil”. Com o intuito de esclarecer quando, e por quem, a vacina foi introduzida no país, o documento explica que o mérito pertence ao Marquês de Barbacena, o primeiro a utilizar de fato a técnica criada por Edward Jenner em 1798, no Brasil. Em 1804, o Marquês trouxe o vírus vaccínico de Portugal nos braços de escravos e o espalhou no país. Desta forma, ocorreram as primeiras vacinações contra varíola no Brasil (BUTANTAN, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O início do século XX foi um ponto de virada na história das vacinas no Brasil. Entre os anos 1900 e 1901, foram fundados o Instituto Soroterápico Federal do Rio de Janeiro (futura Fiocruz) e o Instituto Serumtherapico (futuro Instituto Butantan), com a missão de desenvolver soros e vacinas requeridos para combater as epidemias que estavam grassando no país.

No inverno de 1904, uma violenta epidemia de varíola se abateu sobre a cidade do Rio de Janeiro. Somente naquele ano, cerca de 3.500 pessoas morreriam na capital federal vitimadas pela doença. A futura “Cidade Maravilhosa” era na época pestilenta, onde a peste bubônica, febre amarela e varíola acometiam moradores e visitantes. Havia também sarampo, tuberculose, escarlatina, difteria, coqueluche, tifo, lepra, entre outras.

O presidente da época, Rodrigues Alves, tinha como programa de governo modernizar o porto e remodelar a cidade do Rio de Janeiro a fim de trazer investimentos, maquinaria e mão de obra estrangeira. O projeto sanitário deveria ser executado a qualquer preço, e Rodrigues Alves nomeou Pereira Passos como prefeito e Oswaldo Cruz como chefe da Diretoria de Saúde Pública para cuidar da sua execução. A campanha de Oswaldo Cruz contra a peste bubônica correu bem, conseguindo a participação da população para eliminar os ratos que transmitiam a peste bubônica. Além disso, empregou procedimentos drásticos para combater e eliminar o vetor *Aedes aegypti*, transmissor da febre amarela, com fumigação, invadindo e interditando lares, e conseguiu eliminar a febre amarela do Rio de Janeiro.

Em 31 de outubro, o governo conseguiu aprovar a lei da vacinação obrigatória para varíola. Preparado pelo próprio Oswaldo Cruz, o projeto de regulamentação tinha medidas rigorosas, como exigência do atestado de vacinação para trabalho, viagem, casamento, alistamento militar, matrícula em escolas públicas e hospedagem em hotéis. No entanto, o texto foi noticiado para um jornal e, no dia seguinte à sua publicação, começaram as

agitações no centro da cidade. Isso serviu de catalisador para um episódio conhecido como Revolta da Vacina. A população não aceitava ver sua casa invadida e ter de tomar uma injeção contra a vontade, e foi às ruas da capital da República protestar. A revolta não se resumiu a esse movimento popular. A agitação em torno da vacina, também, serviu de pretexto para a ação de forças políticas que queriam depor Rodrigues Alves. Entre os dias 10 e 18 de novembro de 1904, a cidade do Rio de Janeiro viveu o que a imprensa chamou de “a mais terrível das revoltas populares da República”. O cenário era desolador: bondes tombados, trilhos arrancados, calçamentos destruídos, tudo conduzido por 3 mil revoltosos e dezenas de mortes.

Financiados pelos monarquistas, que apostavam na desordem como um meio de voltar à cena política, jacobinos e florianistas usaram os jornais para passar à população suas ideias conspiradoras, por artigos e charges. Seguiram-se confrontos entre tropas governamentais e militares. No dia 16 de novembro, o governo revogou a obrigatoriedade da vacina, mas os conflitos isolados continuaram. A rebelião foi frustrada no dia 20 de novembro, e o prestígio de Oswaldo Cruz despenhou. Somente 4 anos depois, em 1908, quando o Rio foi atingido pela mais violenta epidemia de varíola de sua história, que elevou os óbitos para cerca de 6.550 casos, o povo buscou voluntariamente a vacina, reconhecendo seu valor e o trabalho de Oswaldo Cruz.

Oswaldo Cruz teve uma trajetória bastante desafiadora, mas sempre dizia: “Sem esmorecer, para não desmerecer”. Apesar da crise, entre 1905 e 1906, Oswaldo Cruz empreendeu uma expedição a 30 portos marítimos e fluviais de Norte a Sul do país, para estabelecer um código sanitário com regras internacionais. A luta contra as doenças foi reconhecida internacionalmente em 1907, quando Oswaldo Cruz recebeu a medalha de ouro no 14º Congresso Internacional de Higiene e Demografia de Berlim, na Alemanha, pelo trabalho de saneamento do Rio de Janeiro. Oswaldo Cruz, ainda, reformou o Código Sanitário e reestruturou todos os órgãos de saúde e higiene do país. Em 1908, o sanitarista foi recepcionado como herói nacional, e, no ano seguinte, o instituto passou a levar seu nome. Com a equipe do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), fez o levantamento das condições sanitárias do interior do país. Em 1910, combateu a malária durante a construção da Ferrovia Madeira-Mamoré (viajou a Rondônia com Belisário Penna), e a febre amarela, a convite do governo do Pará. Em 1916, Oswaldo Cruz foi nomeado prefeito de Petrópolis. A cidade, envolvida em disputas políticas, não recebeu bem a sua nomeação. Oswaldo Cruz morreu em 11 de fevereiro de 1917, durante uma passeata de protesto em frente à sua casa. Análogo aos dias de

hoje, cientistas e sanitaristas não eram reconhecidos pela população, pelo seu trabalho de impacto na saúde pública. Graças ao controle do mosquito vetor, *Aedes aegypti*, e da vacinação, o último caso de febre amarela urbana foi registrado no Brasil em 1942, e todos os casos confirmados desde então decorrem do ciclo silvestre de transmissão.

Outro marco histórico importante no controle de doenças através da vacinação foi a introdução no Brasil da vacina BCG contra a tuberculose, em 1927. Produzida pela Fundação Atauilho de Paiva, no Rio de Janeiro, a vacina BCG tem grande eficácia contra as formas graves da doença e é obrigatória para todos os recém-nascidos, desde a época de sua introdução.

A vacina antivariólica jennneriana somente foi produzida no Brasil no final do século XIX, no Instituto Vacinogênico, fundado pelo Barão de Pedro Afonso. Na década de 1920, essa atividade foi transferida para o Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Essa mudança, empreendida pelo então diretor do Departamento de Saúde Pública, Carlos Chagas, visava à ampliação da produção da vacina para sua utilização rotineira pelos serviços sanitários de outros estados. A vacina era cultivada em ovo embrionado e foi implantada rapidamente, pois a Fiocruz dominava essa tecnologia, usada na produção do imunizante contra a febre amarela.

O imunizante produzido no IOC, ou sob sua supervisão em laboratórios oficiais, em diferentes regiões do país, era colocado em tubos capilares que continham duas doses da vacina. Essa técnica não mudou muito até a década de 1950, quando o Instituto passou a produzir a vacina liofilizada – que era mais estável por ser desidratada e mantida a vácuo – utilizando outras técnicas de aplicação. Foram diversas as técnicas de vacinação contra a varíola: escarificação (incisão na pele), pressão múltipla (esfregar uma agulha paralelamente à pele), punção múltipla (várias picadinhas com uma agulha), broca (rodar um tubo capilar cortado com a vacina sobre a pele), injeção intradérmica e pistola.

No entanto, o Brasil só conseguiu controlar a doença na década de 1970. Com sucessivos fracassos no combate à varíola no currículo, o Brasil adentrou a década de 1960 em uma incômoda posição perante a comunidade internacional. O país era o único do continente americano onde a doença infecciosa, ainda, era endêmica. Em 1962, no entanto, uma nova investida contra a doença começou a se desenhar de maneira diversa das anteriores no país. Apoiada em orientações da OMS, o Brasil criou a Campanha Nacional de Controle da Varíola (CNCV), órgão substituído em 1966 pela Campanha de Erradicação da Varíola (CEV), responsável por coordenar a execução de ações de vacinação em massa em todo o país. A campanha de erradicação da varíola no Brasil

adotou conceitos e técnicas de trabalho em saúde pública muito usados até hoje para conter surtos ou epidemias de novas doenças. Esses conceitos são:

- Articulação única da campanha de vacinação com planejamento operacional, realização e aferição contínua de resultados das coberturas vacinais;
- Convocação de pesquisadores brasileiros a se somarem aos esforços da OMS;
- Diagnóstico em laboratório dos casos suspeitos;
- Busca ativa dos casos e dos contatos para vacinação;
- Vigilância epidemiológica – busca de dados, análise, interpretação e divulgação de informações para a tomada de decisões e intervenções oportunas;
- Produção da vacina de qualidade consistente;
- Aperfeiçoamento da produção com liofilização da vacina, aumentando a estabilidade da potência e termoestabilidade, possibilitando o transporte sem a necessidade de refrigeradores;
- Melhorias na aplicação da vacina usando agulha bifurcada, em forma de um pequeno garfo e por pressão hidrostática (pistola), facilitando sua aplicação;
- Campanhas de vacinação para dissipar resistências populares à vacinação antivariólica;
- Formação de profissionais capacitados, motivados e experientes em operações de campo;
- Isolamento de pessoas doentes;
- Vacinação de bloqueio, aplicada em moradores da vizinhança de um caso confirmado ou suspeito;
- Campanhas de vacinação com o uso de pistolas para vacinar com rapidez milhares de pessoas no mesmo dia;
- Campanhas de vacinação realizada em locais públicos, festas populares, romarias, encontros religiosos, feiras, manifestações artísticas populares, quartéis, escolas públicas, paradas de ônibus e grandes empresas, locais utilizados para vacinação em massa.

Foram fundamentais para o sucesso da CEV a organização da estrutura vertical de comando e operação, a campanha de informação, a produção nacional de qualidade – o IOC produziu mais de 300 milhões de doses utilizadas na campanha – e o acesso fácil da população à vacina. A Campanha de Vacinação contra a Varíola foi sucesso absoluto – atingiu cerca de 100% da população – e garantiu ao Brasil a certificação internacional da erradicação da varíola em 1973. Em 8 de maio de 1980, a Assembleia Mundial da Saúde, órgão decisório da OMS, declarou oficialmente que o mundo estava livre da varíola.

No contexto do sucesso da CEV e aproveitando a sua estrutura, em 1973, foi criado o Programa Nacional de Imunizações (PNI). O PNI é reconhecido e valorizado

por grande parte dos brasileiros, com o objetivo de coordenar a política e as ações de imunizações do país, pois até aquele momento (1973) se caracterizavam pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura.

Outra campanha de vacinação em massa de que se tem história, onde foram usadas as conhecidas pistolas, foi para frear surtos de meningite causados pelos grupos A e C, que assolaram o país na década de 1970. Em 1974, uma epidemia de meningite meningocócica assolou o país. Despreparado para enfrentar o crescente número de casos e face à incapacidade de importar, em curto prazo, a quantidade de doses de vacinas necessárias, o regime militar censurou qualquer menção à doença nos meios de comunicação. Enquanto a moléstia se restringia às áreas mais carentes, a proibição funcionou, mas, quando os óbitos começaram a ocorrer nos bairros nobres do Rio e de São Paulo, a notícia vazou e a pressão da opinião pública se fez sentir. O governo percebeu a carência no país de instituições fortes em ciência e tecnologia e definiu, no planejamento de governo do Ernesto Geisel, como prioridade, a recuperação da Fundação Oswaldo Cruz, nomeando o economista Vinícius Fonseca, especializado em saúde da SEPLAM, para presidir a instituição.

Além da reorganização institucional e do repovoamento de pesquisadores, o presidente Vinícius Fonseca firmou acordo com o Instituto Mérieux, o único produtor de vacina que tinha a vacina meningocócica polissacarídica grupos A/C pronta – para importar 70 milhões de doses dessa vacina – e construiu, de forma acelerada, uma nova fábrica apenas para atender à demanda brasileira. O contrato de compra dessa vacina também tinha embutido a obrigatoriedade de organizar um laboratório piloto para a produção da vacina no país, treinamento do pessoal técnico nas instalações fabris do Instituto Mérieux e fazer a transferência da tecnologia de produção do imunizante no país. Pela primeira vez na história do Brasil, uma vacina bacteriana para uso humano foi produzida em biorreator. A vacina de componente bacteriano, o polissacarídeo, era uma tecnologia avançada na época.

Posteriormente, em 1976, foi criado na Fiocruz o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), unidade da Fiocruz responsável pela pesquisa, inovação, desenvolvimento tecnológico e produção de vacinas, *kits* para diagnóstico e biofármacos, principalmente para atender às demandas da saúde pública brasileira, herdando a missão do Instituto Soroterápico Federal. Com 47 anos de existência, é o maior laboratório público federal da América Latina e que se consolidou como agente estratégico das políticas públicas de saúde no Brasil, papel reforçado pela sua atuação durante a pandemia da Covid-19. A criação de

Bio-Manguinhos foi motivada por duas epidemias de doença meningocócica causadas pelos grupos A e C no início da década de 1970 no Brasil. A iniciativa também teve como objetivos o incentivo e a modernização da Fiocruz na área de imunobiológicos. Nessa ocasião, ocorreu a transferência de tecnologia da produção da vacina meningocócica polissacarídica grupos A/C do Instituto Mérieux, na França, para Bio-Manguinhos, que se tornou no Brasil a instituição produtora dessa vacina. Desde então, produziu mais de 50 milhões de doses.

Foi um período intenso, com incontáveis desafios colocados pelo enfrentamento de uma das mais graves emergências sanitárias em que o Instituto atuou. Desde a sua criação, foram enfrentadas diversas epidemias e surtos controlados por meio da produção e do fornecimento de vacinas e *kits* para diagnóstico. Foi assim quando o país foi fortemente atingido por casos de meningite, poliomielite, febre amarela, sarampo e, recentemente, a Covid-19.

Bio-Manguinhos é uma instituição que contribui para prevenir, diagnosticar, controlar e tratar doenças, ofertando imunizantes, testes de diagnóstico seguros e precisos, além de medicamentos biotecnológicos. As atividades do Instituto contribuem para que o Brasil avance na área biotecnológica, reduza a dependência externa e economize recursos. Seu portfólio apresenta 11 vacinas, 10 biofármacos e 29 *kits* para diagnóstico com registro ativo junto à Anvisa. Ocupa posição de destaque como maior fornecedor de vacinas ao PNI, do Ministério da Saúde, mantendo historicamente o compromisso público de buscar a autossuficiência na produção e fornecimento de imunobiológicos. Desde 2017, foram fornecidas mais de 700 milhões de vacinas, com mais de 19 milhões de doses de vacinas exportadas (excedentes) e mais de 150 milhões de doses da vacina Covid-19 apenas em 2021, quase 57 milhões de *kits* para diagnóstico (reações) e 27,5 milhões de frascos/seringas de biofármacos (FIOCRUZ, 2022).

O primeiro calendário básico de vacinação ocorreu em 1977 e, em 1986, surgiu o Zé Gotinha, personagem que simboliza as campanhas de vacinação. O ano de 1995 foi bastante relevante por conta da substituição da vacina monovalente contra o sarampo pela vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola), aplicada até os dias atuais. No século XXI, o Brasil seguiu avançando com a introdução de vacinas para tétano, gripe, difteria, coqueluche, hepatite B, catapora, HPV, entre outras doenças, que passaram a ser evitadas ou minimizadas pela ação vacinal. A Figura 3.2 mostra uma linha do tempo da introdução de vacinas no calendário nacional pelo PNI até o ano 2020.

3.3 PLATAFORMAS VACINAIS, TIPOS DE VACINAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

As vacinas exploram a capacidade extraordinária do sistema imunológico humano, altamente evoluído, de responder e lembrar-se de encontros com antígenos patogênicos. O objetivo da vacinação é obter essa imunidade sem nenhum dos riscos de desenvolver a doença. Quando se vacina, ativa-se a “memória” do sistema imunológico. Os componentes dessas vacinas são chamados de antígenos e têm como função reduzir ao máximo o risco de infecção ao estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos, semelhante ao que acontece quando somos expostos aos patógenos, porém, sem causar doença. Durante a vacinação, um patógeno enfraquecido, inativado ou ainda um fragmento (subunidade) dele é usado como imunizante. O sistema imunológico é então ativado sem que fiquemos doentes. Para algumas doenças, a vacinação oferece proteção vitalícia, enquanto para outras o efeito diminui após alguns anos e são necessárias doses de reforço. A duração da resposta imunológica também depende do tipo de tecnologia usada para desenvolver a vacina (PLOTKIN, 2018; THE COLLEGE OF PHYSICIANS OF PHILADELPHIA, 2023).

De maneira geral, os princípios ativos que compõem as vacinas são derivados (antígenos) de organismos vivos, atenuados ou inativados. No entanto, vacinas mais modernas foram desenvolvidas a partir de antígenos vacinais obtidos por engenharia genética. Existem vacinas obtidas a partir de subunidades proteicas, expressas em sistemas celulares de procariotos ou eucariotos, subunidades baseadas em anatoxinas, subunidades baseadas em polissacarídeos, vacinas conjugadas, vacinas de vesícula de membrana externa, VLPs (*virus-like particles*), vetores virais e bacterianos e, mais recentemente, vacinas baseadas em ácidos nucleicos (DNA ou mRNA). Uma vacina pode conferir imunidade ativa contra um agente nocivo específico, estimulando o sistema imunológico para atacar o agente. Uma vez estimuladas por uma vacina, as células produtoras de anticorpos, chamadas células B (ou linfócitos B), permanecem sensibilizadas e prontas para responder ao agente, caso ele entre no corpo.

Embora a maioria das evidências aponte que os anticorpos são os principais mediadores da imunidade esterilizante induzida pela vacinação, a maioria das vacinas também induz respostas de células T (linfócitos T), necessárias para controlar e eliminar a infecção estabelecida. As células T têm sido categorizadas como células T citotóxicas ou células T auxiliares. Os subtipos de células T auxiliares (células Th) podem ser diferencia-

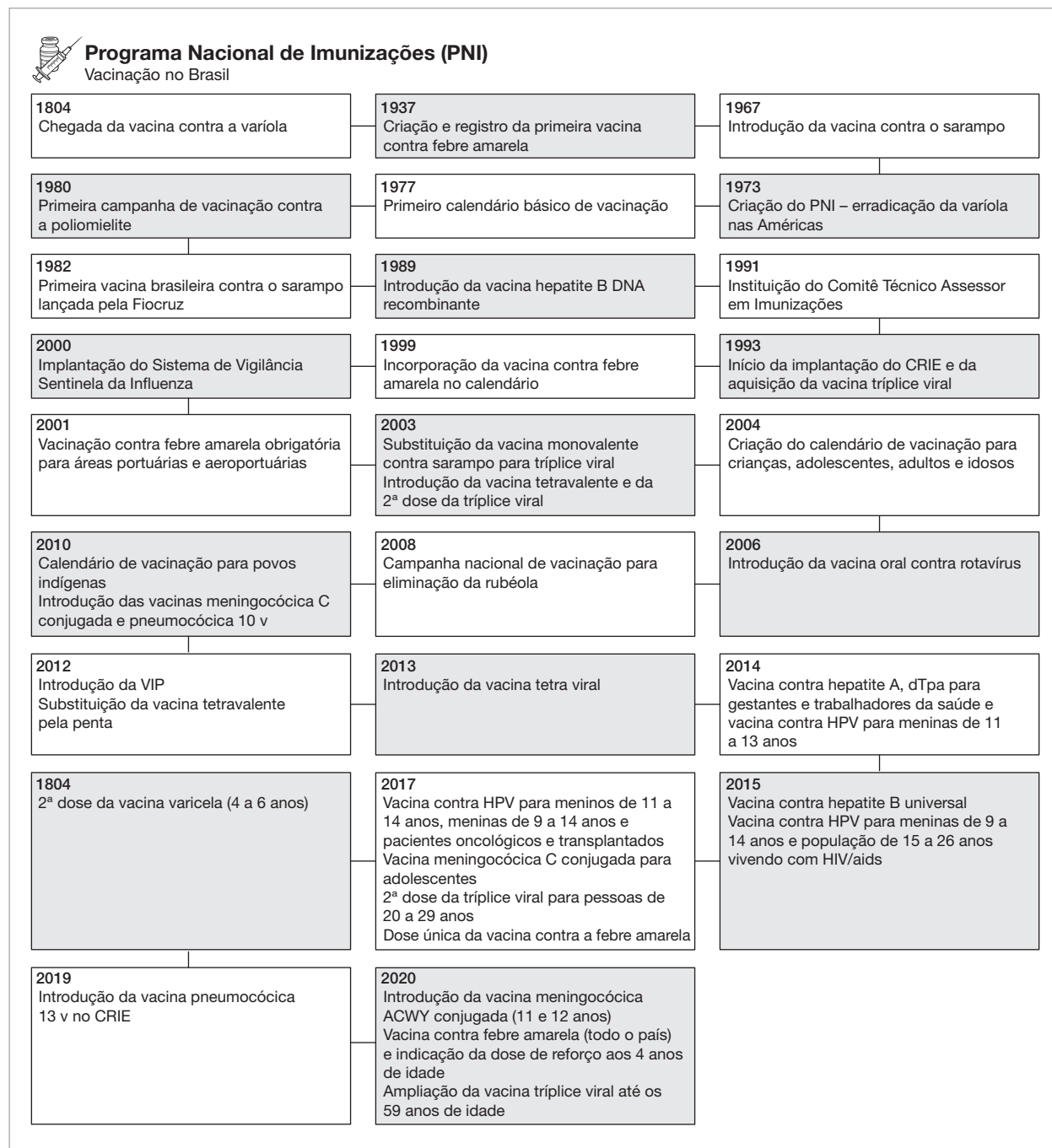


FIGURA 3.2 Linha do tempo da introdução de vacinas pelo Programa Nacional de Imunizações. O Programa Nacional de Imunizações (PNI), coordenado pelo Ministério da Saúde, de forma compartilhada com as secretarias estaduais e municipais de saúde, tem se consolidado como uma das principais e mais relevantes intervenções em saúde pública. Criado em 1973, em sua trajetória o PNI tem uma história de introdução de imunizantes no calendário nacional de vacinação, resumida nessa linha do tempo. O Brasil é um dos países que oferecem o maior número de vacinas, de forma gratuita, com 15 vacinas para crianças, 9 para os adolescentes, 5 para os adultos e idosos.

Fonte: elaborada com base em Domingues et al. (2020).

das de acordo com seus perfis de produção de citocinas. As células *T helper 1* (Th1) e as células Th17 e Th2 são importantes, pois estabelecem a resposta celular e a humoral, respectivamente (STRUGNELL et al., 2011; VACCINESTODAY, 2023).

Além de gerar uma imunidade de memória, capaz de desencadear uma resposta imunológica secundária após a exposição ao patógeno-alvo de uma vacina, a vacinação é benéfica em nível populacional. Quando uma quantidade suficiente de indivíduos em uma população é imune a uma doença, como ocorreria se uma grande proporção de uma população fosse vacinada, a imunidade de rebanho é alcançada. Isso significa que, se houver uma mistura aleatória de indivíduos dentro da população, o patógeno não poderá se espalhar para a população.

A imunidade de rebanho atua interrompendo a transmissão da infecção ou reduzindo as chances de indivíduos suscetíveis entrarem em contato com uma pessoa infectada. Além disso, fornece uma medida de proteção a indivíduos que não são pessoalmente imunes à doença – por exemplo, indivíduos que, por causa de sua idade ou de condições médicas subjacentes, não podem receber vacinas ou indivíduos que receberam vacinas, mas permanecem suscetíveis. A imunidade de rebanho desempenhou um papel importante na erradicação bem-sucedida da varíola e é vital na prevenção da propagação de doenças como a poliomielite e o sarampo e doenças causadas por bactérias encapsuladas como meningococos, pneumococos e Hib (STRUGNELL et al., 2011).

As vacinas têm uma história que começou no final do século XVIII. A partir do final do século XIX, as vacinas puderam ser desenvolvidas em laboratório. No entanto, no século XX, tornou-se possível desenvolver vacinas baseadas em marcadores imunológicos (PLOTKIN, 2018). No século XXI, a biologia molecular permite o desenvolvimento de vacinas que antes não eram possíveis. O desenvolvimento de novas vacinas caminhou lado a lado com os ciclos de inovação na ciência, quando as novas descobertas científicas e tecnologias das últimas décadas levaram a um avanço mais rápido na biologia molecular, virologia, bacteriologia e vacinologia, conforme a Tabela 3.1. Há expressiva aceleração do conhecimento científico básico, avanço dos procedimentos tecnológicos e o surgimento de novas plataformas biotecnológicas, com significativa evolução no processo de obtenção de novas vacinas. Além disso, a ética em pesquisa e o uso de teste em animais trouxeram mais segurança ao desenvolvimento.

As vacinas são, geralmente, classificadas como vivas ou não vivas para distinguir aquelas vacinas que contêm cepas replicantes atenuadas do organismo patogênico

daquelas que contêm apenas componentes de um patógeno ou organismos inteiros mortos (inativados). Essa distinção é importante, pois, por um lado, as vacinas vivas podem ter o potencial de se replicar descontroladamente em indivíduos imunocomprometidos, levando a algumas restrições ao seu uso. Por outro lado, as vacinas não vivas não representam risco para indivíduos imunocomprometidos, embora possam não conferir proteção naqueles com alguma imunodeficiência (VACCINE EDUCATION CENTER, 2021).

As vacinas podem ser classificadas como atenuadas, inativadas, de subunidades ou recombinantes. Os componentes dessas vacinas são chamados de antígenos e têm como função reduzir ao máximo o risco de infecção ao estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos, semelhante ao que acontece quando somos expostos aos patógenos, porém sem causar doença.

Devido à alta complexidade do calendário vacinal com cerca de 20 vacinas, a maioria requerendo múltiplas vacinações para imunização completa, tem se tornado muito difícil às mães/responsáveis levar as crianças inúmeras vezes ao posto de vacinação para receber as vacinações previstas. Além disso, as crianças sofrem com as múltiplas aplicações de vacinas injetáveis. Esses fatos têm despertado um grande interesse no desenvolvimento de novas vacinas combinadas, com a perspectiva de proteção contra várias doenças ao mesmo tempo, em uma única injeção. Essas vacinas combinadas representam produtos com alto potencial de mercado, desde que sua eficácia e segurança sejam comprovadas. As vacinas combinadas promovem a redução do número de visitas dos pacientes aos postos de saúde e dos custos de saúde pública. A combinação pode ser obtida durante o processo de formulação do produto ou no momento da administração. O grande desafio da combinação de vacinas é a manutenção de uma resposta imunológica similar à observada quando a vacina é aplicada separadamente. As combinações mais conhecidas são a tríplice bacteriana (difteria, tétano e coqueluche; DTP), tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola; TVV), tetravalente (DTP-Hib), pentavalente (DTP-Hib-HB; hepatite do tipo B), vacina meningocócica conjugada grupos ACWY, vacina pneumocócica conjugada 10-valente e hexavalente (DTP-Hib-HB-IPV; poliovírus inativado). Houve alguns casos de poliomielite paralítica associada ao uso da vacina contendo poliovírus oral (OPV), os quais podem ser evitados com a inclusão da vacina IPV na combinação de vacinas pediátricas, com a consequente redução dos custos de compra de vacinas e administração significativa delas.

Essas combinações devem seguir critérios de avaliação para assegurar que os antígenos tenham compatibilidade física, química e biológica, sejam seguros e

efetivos e não estejam interferindo na eficácia dos outros antígenos. Dessa forma, as vacinas combinadas podem fornecer proteção múltipla nos indivíduos vacinados. Algumas vacinas combinam duas cepas de uma mesma espécie, como é o caso de vacinas contra poliomielite e *influenza*, e outras associam diferentes subunidades, obtidas de diversos sorotipos de bactérias, como ocorre com a vacina pneumopolissacarídica 23-valente e com a vacina meningocócica conjugada tetravalente contendo os polissacarídeos dos grupos A, C, W e Y.

Em geral, as vacinas são divididas em três gerações, com base no processo de evolução e características específicas (Tabela 3.1). A primeira geração engloba as plataformas clássicas, que incluem as vacinas atenuadas e as vacinas inativadas; a segunda geração contempla as plataformas biotecnológicas, que incluem principalmente vacinas de subunidades e que utilizam a tecnologia de DNA recombinante. Já as vacinas de terceira geração são aquelas que incluem as plataformas inovadoras, que estão na fronteira do conhecimento e que foram muito exploradas durante a pandemia de Covid-19.

3.3.1 1ª geração: plataformas clássicas

As vacinas atenuadas e inativadas são identificadas na primeira geração, pois utilizam um método primário em sua produção. Patógenos atenuados, organismos completos inativados, que são efetivamente imunogênicos, são usados na fabricação dessas vacinas. Existem algumas vantagens nesse tipo de vacina, devido à sua alta

capacidade de estimular a imunidade inata, indução de proteção em longo prazo (no caso das atenuadas), fácil manufatura e menor custo de produção. No entanto, há algumas desvantagens nessa geração, como risco de indução de doença devido ao uso do patógeno completo vivo. Esse tipo de vacina é conhecido como uma vacina tradicional (POLLARD; BIJKER, 2021).

3.3.2 2ª geração: plataformas biotecnológicas

A primeira geração de vacina, feita por patógenos vivos atenuados, não possibilitou o desenvolvimento de vacinas para vírus difíceis de cultivar em laboratório, ou que tinham a possibilidade de reverter a sua virulência. A partir do século XX, com o desenvolvimento da engenharia genética e biologia molecular, foi possível o desenvolvimento de vacinas de segunda geração. A base dessa geração foram elementos de subunidade, proteínas recombinantes ou sintéticas. As vacinas de subunidade baseadas em anatoxinas bacterianas, polissacarídeos de bactérias encapsuladas, polissacarídeos conjugados, vesículas de membrana externa e VLP, que são partículas que imitam vírus, estão nessa geração (POLLARD; BIJKER, 2021).

3.3.3 3ª geração: plataformas inovadoras

A administração de um imunógeno contendo um plasmídeo ou mRNA, que carrega um gene codificador

TABELA 3.1 Gerações de vacinas, suas plataformas tecnológicas e vacinas licenciadas correspondentes

Geração	Tipo	Vacinas licenciadas utilizando essa tecnologia
1ª geração – plataformas clássicas	Atenuadas	Sarampo, caxumba, rubéola, febre amarela, BCG
	Inativadas	<i>Influenza</i> , raiva, hepatite A, <i>pertussis</i> celular
2ª geração – plataformas biotecnológicas	<ul style="list-style-type: none"> ■ Subunidade (proteína purificada) ■ Proteína recombinante ■ Anatoxinas ■ Polissacarídeo ■ Conjugadas polissacarídeo-proteína carreadora ■ Vesículas de membrana externa 	<i>Influenza</i> , Hepatite B, Anatoxinas diftérica e tetânica, Meningocócica polissacarídica e conjugada grupos A, C, W e Y, Pneumocócica polissacarídica 23-valente, Polissacarídeo Vi (<i>Salmonella enterica serovar typhi</i>), Pneumocócica conjugada 10, 13-valente, Vesícula de membrana externa (VME) de meningococo grupo B
	VLP (<i>virus-like particle</i>)	HPV (papilomavírus humano)
	3ª geração – plataformas inovadoras	Vacinas de vetor viral
Vacinas de vetor bacteriano		Experimental
Vacinas para bactérias multirresistentes (RAM)		Pneumocócica polissacarídica 23-valente Pneumocócica conjugada 10, 13-valente
Ácidos nucleicos		SARS-CoV-2

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

do antígeno, ficou conhecida como vacinas genéticas, categorizadas como vacinas de terceira geração. Essa plataforma de desenvolvimento de vacinas tem sido considerada pelos pesquisadores desde o início da década de 1990. Diferentes nomes foram dados para esse tipo de vacina, como vacinas de DNA, vacinas de RNA e vacinas de plasmídeo (POLLARD; BIJKER, 2021).

Além das vacinas baseadas em ácido nucleicos, vetores virais recombinantes representam plataformas vacinais promissoras devido à sua capacidade de expressar antígenos heterólogos e induzir respostas imunológicas celulares antígeno-específicas, além de títulos robustos de anticorpos, sem a necessidade de adjuvantes exógenos. Desde o desenvolvimento do vírus *vaccinia* como vetor de vacina, em 1984, a utilidade de vários vírus em estratégias de vacinação tem sido explorada. Nos últimos anos, as principais melhorias nos vetores existentes, como os baseados em adenovírus, levaram a melhorias significativas na imunogenicidade e eficácia. Além disso, surgiram novos vetores excitantes que exploram vírus como o citomegalovírus (CMV) e os vírus do sarampo e da estomatite vesicular (VSV). Mais recentemente, ainda em estágio experimental, estão sendo desenvolvidas vacinas baseadas em vetores bacterianos, que consistem em uma abordagem cada vez mais atraente, em virtude de sua capacidade de induzir uma ampla gama de resposta imunológica, em especial imunidade de mucosa, bem como sistêmica (humoral e celular). Essas vacinas podem ser baseadas em bactérias patogênicas geneticamente atenuadas ou por sucessivas passagens (cultivos) *in vitro*, como a vacina de BCG, bem como por bactérias não patogênicas, como bactérias do ácido láctico.

Outra plataforma relevante para o desenvolvimento de vacinas multivalentes tem sido avaliada em estudos clínicos para a prevenção da doença pneumocócica. Essa plataforma, conhecida como MAPS (*multiple antigen-presenting system*), representa um processo de inovação disruptiva, porque utiliza a estratégia de ligação da biotina-rizavidina para apresentar múltiplos antígenos dentro do conceito de vacina de subunidades (*plug-and-play*), em uma construção similar àquela de célula inteira (ZHANG et al., 2013). A plataforma utiliza a combinação de antígenos polissacarídeos de bactérias encapsuladas e proteicos, conservados nas espécies, que atuam como carreador e imunógeno. Essa estratégia vacinal permite a manutenção dos epítomos, indução de uma resposta imunológica robusta, ampla e protetora, obtida através da estimulação de diversos mecanismos imunológicos como resposta de células B e T (CD8 citotóxica e resposta Th1/Th17), que reduzem a colonização da bactéria na nasofaringe. Além disso, a plataforma tem facilidade de *design* e manufatura, com

obtenção de estrutura precisa, modular e reprodutível, *plug-and-play*, com potencial para o desenvolvimento acelerado de novos alvos.

3.4 PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE VACINAS

O desenvolvimento de vacinas é bastante complexo e demorado. A partir da descoberta da doença até a regulamentação, uma vacina pode levar décadas para ser oficialmente aprovada e licenciada. Até o início da pandemia de Covid-19, as vacinas desenvolvidas mais rapidamente foram as da caxumba, na década de 1960, e mais recentemente a vacina para Ebola. Somente após cinco anos de estudos, a vacina Ervebo, produzida pela Merck, recebeu aprovação pelas agências regulatórias. Graças ao desenvolvimento de novas tecnologias, foi possível o desenvolvimento e a implementação de uma vacina de Ebola em curto espaço de tempo. A experiência adquirida no desenvolvimento de vacinas para o Ebola forneceu lições importantes no processo regulatório, clínico e de fabricação que pôde ser aplicado ao SARS-CoV-2 e a outros patógenos epidêmicos. Como resultado desse processo, citam-se as vacinas destinadas à Covid-19, desenvolvidas em tempo recorde e com tecnologias inovadoras, como as vacinas de RNA mensageiro (PLOTKIN, 2018).

O tempo para desenvolver e introduzir uma vacina no mercado é, em média, de 10 a 15 anos (Figura 3.3), e para cada sucesso há muitos fracassos, na maioria dos casos nas etapas iniciais de desenvolvimento, nos estágios pré-clínicos e clínicos de fase 1. Usualmente, o desenvolvimento das vacinas segue um padrão de etapas. As primeiras são os estudos em laboratório, que buscam identificar características do patógeno, sua patogenia e modo de cultivo. Nessa etapa inicial do desenvolvimento, os pesquisadores procuram entender o mecanismo de infecção desse patógeno e desenvolver modelos animais da doença, mais tarde usados nos testes das vacinas desenvolvidas.

Para o licenciamento de uma vacina, os estudos clínicos são indispensáveis para obtenção de dados e evidências consistentes de segurança, imunogenicidade e eficácia de uma vacina. Ainda assim, os estudos pós-comercialização (*post-marketing*) são necessários, pois eventos adversos raros, às vezes, apenas são percebidos quando a vacina é aplicada em larga escala.

Para formular uma vacina, um antígeno deve primeiro ser identificado para estimular uma resposta imunológica protetora no hospedeiro contra o patógeno. O método clássico é utilizar os patógenos inteiros, vivos ou mortos, como a fonte do antígeno e imitar a infecção natural. Entretanto, usar organismos inteiros

como fonte de antígenos torna a produção de vacinas e o controle de qualidade logisticamente exigentes para manter a consistência, além de induzir uma sobrecarga desnecessária do sistema imunológico, que reconhece e responde a todas as estruturas e moléculas presentes no patógeno. O uso de vacinas vivas atenuadas também pode ter maior probabilidade de realmente causar a doença contra a qual deveriam estar se imunizando (ANVISA, 2020; FIOCRUZ, 2023b).

A “vacínologia reversa” é mais comumente usada para identificar antígenos potenciais de interesse para o desenvolvimento de vacinas. Isso envolve o uso de genômica, proteômica e bioinformática para encontrar genes e proteínas que podem ser usados como antígenos, mapeando regiões específicas dos antígenos virais ou bacterianos e prevendo quais induzirão melhores respostas imunológicas. Uma outra abordagem, conhecida como “vacínologia reversa 2,0”, possibilita a identificação de células B presentes em indivíduos convalescentes ou em indivíduos vacinados com a vacina de interesse, capazes de produzir anticorpos com funcionalidade relevante (neutralizante, opsonizante ou bactericida). O isolamento desses anticorpos tem possibilitado a descoberta de novos epítopos/antígenos protetores que poderão ser incluídos em novas formulações vacinais, como para o meningococo do grupo B ou outros grupos de meningococo e gonococo.

Outra consideração com relação à seleção de antígenos é o uso de adjuvantes. Para antígenos que provocam respostas fracas, pode ser adicionado um adjuvante que aumentará a imunidade ao antígeno, aumentando a resposta imunológica e tornando a vacina mais eficaz. Eles também podem ser incluídos na formulação para requerer uma dose menor da vacina, o que ajuda a superar as limitações na produção. Métodos mais novos de desenvolvimento de vacinas utilizam tecnologia recombinante que combina o material genético do patógeno com outros vetores virais ou bacterianos ou mesmo formando partículas semelhantes a vírus, chamadas de VLPs. Também plasmídeos podem ser usados para a clonagem de genes de interesse (vacinas de DNA) ou mesmo para a síntese de RNA mensageiro que podem ser usados diretamente como antígenos vacinais (POLLARD; BIJKER, 2021).

Até recentemente, a resposta farmacêutica a doenças infecciosas emergentes e bioterrorismo tem sido caracterizada por uma abordagem “um bicho, uma droga” (do inglês *one bug, one drug*), em que contramedidas médicas específicas, como vacinas e terapias, são desenvolvidas, registradas e implantadas, caso a caso. No entanto, nos últimos anos, foram desenvolvidas plataformas tecnológicas que podem acelerar o desenvolvimento, a aprovação e a produção mais rápida de várias vacinas, a partir de

um único sistema. Se a tecnologia de desenvolvimento e produção puder ser aplicada no desenvolvimento e produção de uma miríade de outras vacinas, adotando alguma estrutura conservada, esta pode ser classificada como plataforma. Essas plataformas tecnológicas usam um “módulo” para entregar um gene sintético que codifica um antígeno indutor de imunidade. Como exemplo de plataformas, temos mRNA sintético (nanopartículas), vetor viral, DNA e vetor bacteriano. Uma vez desenvolvida e licenciada para um patógeno, o desenvolvimento da próxima vacina com a mesma plataforma tecnológica requer somente a substituição do gene sintético.

O investimento em plataformas tecnológicas permite que uma mesma área de produção seja usada para uma nova doença-alvo, com mudanças mínimas no processo de manufatura e controles de qualidade, reduzindo o investimento necessário para construir e manter fábricas. Além disso, vale ressaltar que a aceleração do desenvolvimento de vacinas em situações sanitárias emergenciais, como ocorreu com a obtenção de vacinas para a Covid-19, ressalta a importância do uso de plataformas tecnológicas, que disponibilizam conhecimentos e informações relacionados às vacinas que têm sido desenvolvidas, permitindo um rápido e seguro desenvolvimento de novos produtos. O CEPI (*Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*) é uma parceria global lançada em 2017 para acelerar o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas emergentes, por meio do investimento em plataformas tecnológicas, além de promover testes de segurança e prova de conceito (POLLARD; BIJKER, 2021).

Uma das plataformas mais antigas para a produção de vacinas é baseada em ovos. Os ovos de galinha são usados como pequenos biorreatores (incubadoras) de partículas virais vivas. No entanto, a produção usando esse tipo de plataforma é complexa, pois depende da disponibilidade de ovos especiais chamados de SPF (*specific pathogen-free*), podendo levar a reações adversas em pessoas com alergia a ovos. Como resultado, os fabricantes começaram a usar plataformas baseadas em células para o desenvolvimento de vacinas. Esse tipo de produção usa culturas de células de mamíferos para propagar vírus, que podem ser isolados e purificados de grandes lotes de células cultivadas em garrafas ou em biorreatores. Esse método também apresenta limitações, como elevados custos da matéria-prima, crescimento celular lento e/ou taxas de proliferação viral limitada, além da dependência de equipamentos complexos como biorreatores de grandes volumes, podendo chegar a 10 mil litros.

A plataforma de conjugação química de polissacarídeos capsulares a proteínas carreadoras tem sido utilizada com sucesso, na produção de vacinas glico-

conjugadas para a proteção de doenças causadas por bactérias encapsuladas, a fim de melhorar e ampliar a resposta imunológica induzida pelos antígenos capsulares T-independentes. Entretanto, essas vacinas são as mais complexas existentes, e, dependendo da quantidade de conjugados incluídos, são exigidos muitos testes de controle de qualidade, alguns bastante sofisticados. Na tentativa de superar essas desvantagens, tem sido empregada uma nova tecnologia de acoplamento de glicanos a proteínas no desenvolvimento dessas vacinas. A plataforma tecnológica, ainda em estágio experimental, representa uma evolução do processo de produção de vacinas conjugadas utilizando métodos químicos, inaugurando uma nova era na glicoengenharia. A tecnologia é versátil e permite a conjugação biológica de açúcares bacterianos a qualquer proteína carreadora, por meio do acoplamento enzimático *in vivo* utilizando a via de glicosilação presente na bactéria *Campylobacter jejuni* (via N-glicosilação em resíduos de asparagina), em *Escherichia coli* recombinante. Vários estudos têm demonstrado a biossíntese de diferentes conjugados contendo glicanos de *Staphylococcus aureus* sorotipos 5 e 8, *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14, *Shigella flexneri* 2a, 3a, 6, *Shigella sonnei* e *Burkholderia pseudomallei* (IHSSSEN et al., 2010).

A plataforma de utilização de vesículas de membrana externa (VMEs) como antígeno vacinal se aplica a bactérias Gram-negativas que têm a capacidade de gerar essas estruturas, que também possuem ampla aplicação como adjuvantes, vetores vacinais expressando múltiplos antígenos após a bioengenharia das vesículas e veículos de *delivery* de drogas. A produção de VMEs é obtida após o cultivo da bactéria, seguido por centrifugação para a retirada das células, concentração e purificação. As vesículas podem ser produzidas em grande escala e com rendimentos diferentes, dependendo do tipo de bactéria, mas representam uma produção de baixo custo. Entretanto, esse complexo antigênico é bastante reatogênico em função da presença de lipopolissacarídeo (LPS) residual que é potencialmente tóxico, com alta atividade pirogênica e que deve ser depletado da VME.

A utilização de vegetais manipulados geneticamente para a produção de antígenos é uma plataforma tecnológica em desenvolvimento que, se bem-sucedida, tem potencial de amplos benefícios, como a produção de antígenos em larga escala e em tempo curto. Foi utilizada no desenvolvimento de biofármacos e em uma vacina para Covid-19 licenciada no Canadá.

Após a fase de investigação inicial, os pesquisadores buscam identificar o melhor modelo ou plataforma para desenvolver a vacina desejada (ver na Figura 3.3 as tecnologias usadas para o desenvolvimento das vacinas). Usualmente, mais de uma pode ser testada para

identificar qual se aplica melhor ao patógeno em estudo. A partir desse processo, são selecionados antígenos candidatos à vacina (protótipo vacinal) que são obtidos em uma escala laboratorial pequena, chamada de escala de bancada (Figura 3.3). Assim, os antígenos identificados podem incluir somente partículas parecidas com vírus, vírus enfraquecido, toxinas bacterianas enfraquecidas ou substâncias derivadas do patógeno como proteínas, polissacarídeos e lipopolissacarídeos. Nessa fase de estudos iniciais, testes em animais irão avaliar a segurança da formulação vacinal, assim como sua capacidade de gerar resposta imunológica, conforme a Figura 3.3.

O desenvolvimento de novas vacinas é um processo multidisciplinar e complexo que consiste em diversas etapas, desde a pesquisa básica até a definição do processo industrial. A Figura 3.4 descreve os estágios de desenvolvimento de uma vacina com referências aos controles de qualidade mais relevantes.

A complexidade no desenvolvimento de vacinas aumentou nos últimos 40 anos, exigindo fase pré-clínica (estudos em animais) de desenvolvimento e testes clínicos completos antes da aprovação e comercialização do produto. Geralmente, os pedidos de registro de novas vacinas às agências regulatórias são revistos exaustivamente antes da aprovação, então os resultados do desempenho da vacina durante a sua implementação são reenviados às agências regulatórias para estudos de pós-comercialização (farmacovigilância). Os testes pré-clínicos devem ser feitos em ao menos duas espécies animais, normalmente camundongos e macacos. Desse modo, os pesquisadores têm uma ideia mais clara da resposta imunológica que pode ocorrer em humanos. É nessa fase, também, que pode partir a sugestão de dose inicial e de um método seguro de administração para a próxima etapa. O teste pré-clínico é projetado para fornecer informações importantes sobre a eficácia e segurança de um candidato antes de ser testado em seres humanos. Os estudos pré-clínicos são exigidos pelas autoridades regulatórias, como a Anvisa, antes de autorizar o estudo em seres humanos (estudo clínico). Durante a fase pré-clínica, os pesquisadores podem adaptar a vacina para torná-la mais eficaz. São realizados também estudos de desafio, onde os animais são previamente vacinados e depois infectados com suspensões viáveis do patógeno para observar o bloqueio da doença ou replicação do patógeno no animal (ANVISA, 2020).

Existe uma preocupação crescente em preservar o bem-estar animal, evitando o sofrimento e sacrifício na realização dos testes pré-clínicos. As implicações éticas da experimentação animal são debatidas pela opinião pública, pesquisadores e indústria. A recomendação é seguir o princípio dos 3Rs: *replacement* (substituição de espécie por outra mais abaixo na escala zoológica ou para

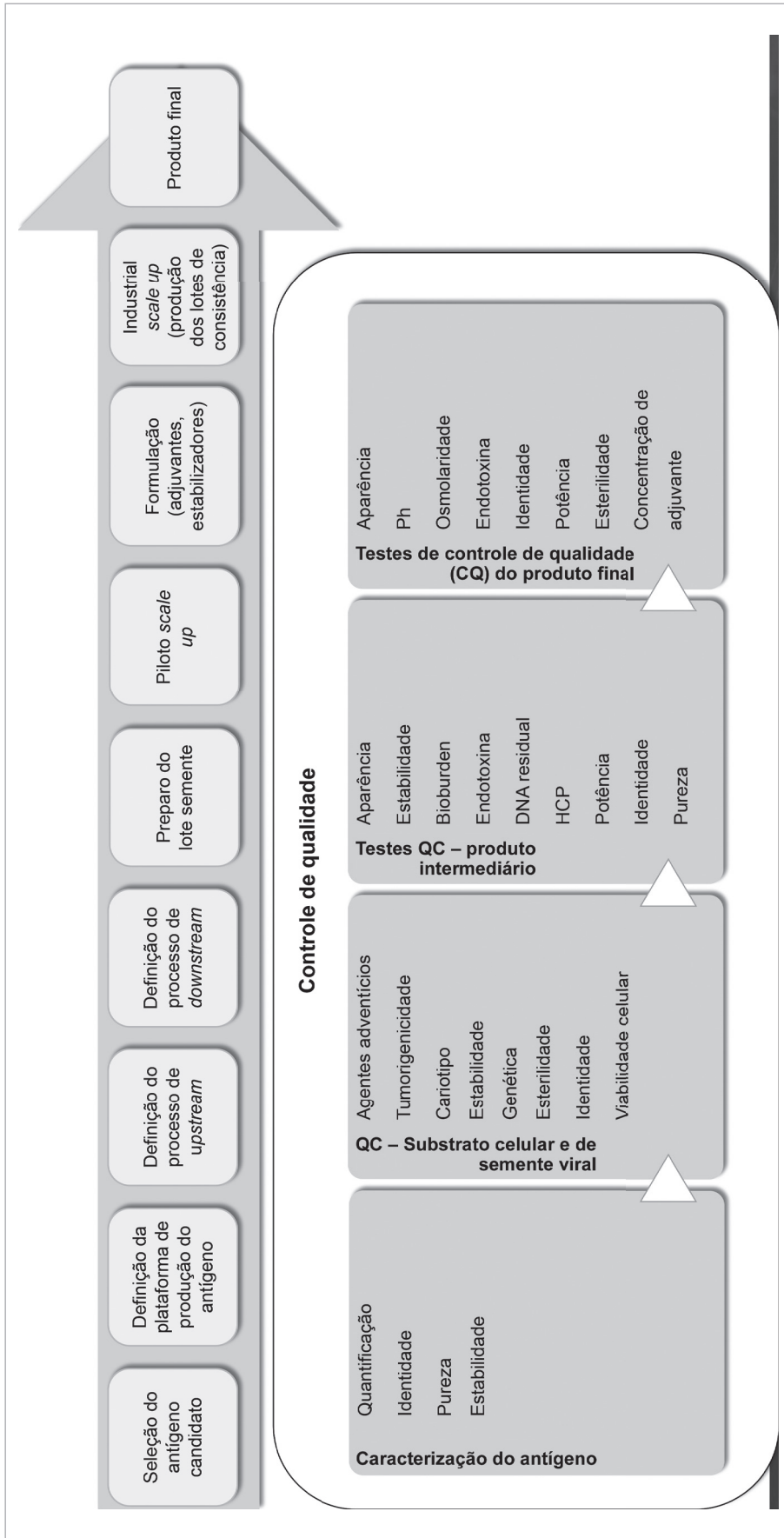


FIGURA 3.3 Etapas do desenvolvimento do processo de produção de uma vacina e controles de qualidade. O desenvolvimento de uma vacina segue um padrão de etapas que se inicia com a identificação do antígeno candidato que estimula a resposta imune ao patógeno. Após a seleção do antígeno, define-se a plataforma onde o antígeno será produzido. Em seguida, são desenvolvidos os processos de produção (*upstream*) e de purificação (*downstream*) desse antígeno que serão utilizados na produção industrial. O preparo de lotes semente, tanto do substrato de produção do antígeno (por exemplo: célula) como da fonte do antígeno (vírus ou bactéria), é uma etapa fundamental do processo de desenvolvimento e garante a consistência de produção, já que todos os lotes serão produzidos a partir dessas sementes. As fases de escalonamento, definição de formulação e produção de lotes de consistência, são as fases mais adiantadas do desenvolvimento, onde são produzidos os lotes de vacinas utilizados nos estudos clínicos, e são definidos os parâmetros de produção exigidos pelas agências regulatórias. Ao longo de todo o desenvolvimento, são definidos e desenvolvidos os testes de controle de qualidade do processo e do produto.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

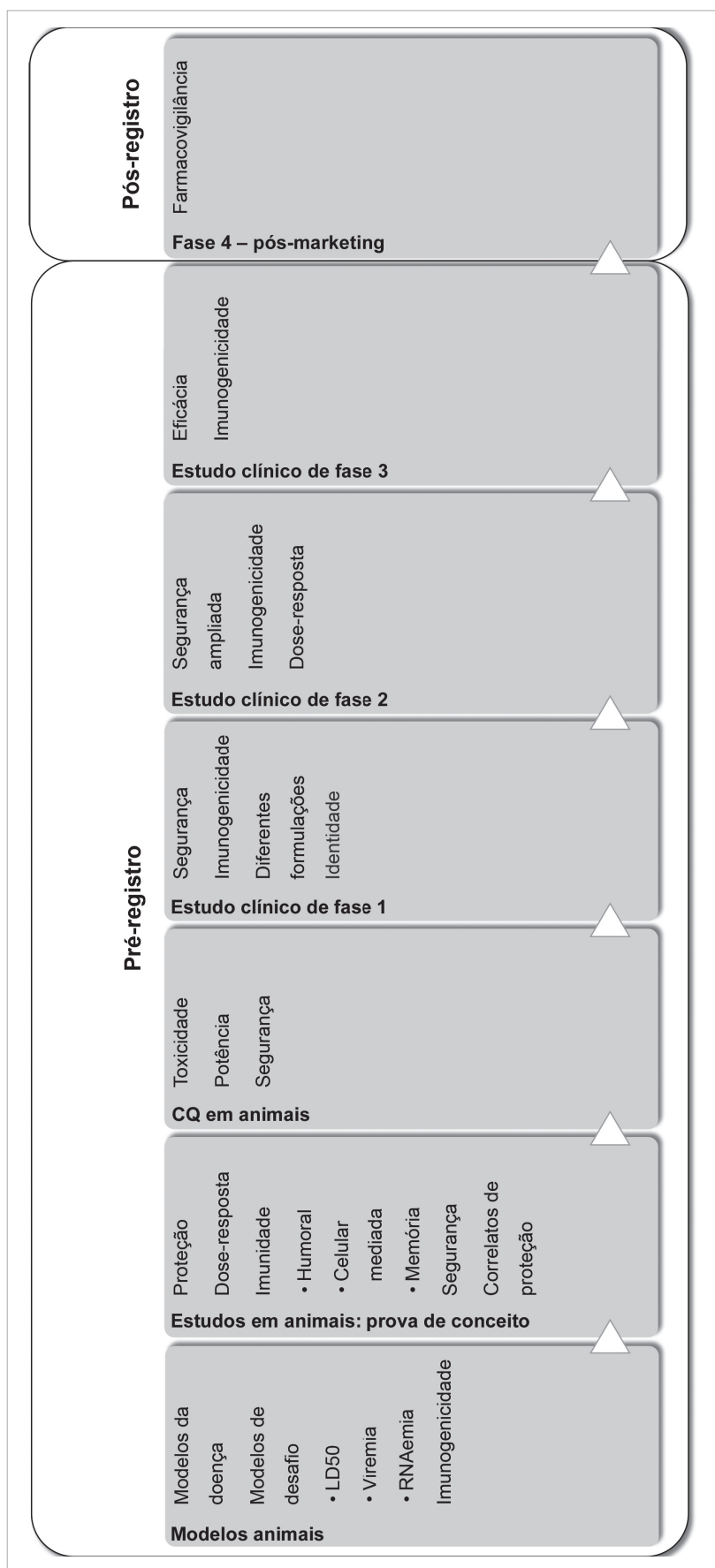


FIGURA 3.4 Fases pré-clínicas e clínicas durante o desenvolvimento de vacinas. O caminho do desenvolvimento de uma vacina inclui a demonstração de segurança e eficácia da nova molécula candidata. Os modelos animais experimentais são imprescindíveis na compreensão da patofisiologia de determinada doença, bem como em testes pré-clínicos, visando à prevenção ou reversão do quadro patológico. Antes dos testes pré-clínicos de uma nova vacina, é preciso estabelecer um modelo de teste em espécie animal não humana, que reproduza a doença ou onde se possam avaliar parâmetros que demonstrem o efeito da nova vacina. Estabelecidos os modelos animais, iniciam-se os estudos pré-clínicos, onde se avalia o potencial efeito terapêutico de um antígeno a ser utilizado em nova vacina. Os estudos toxicológicos não clínicos antecipam riscos e são o primeiro passo para entender a segurança e as dosagens, reduzindo a probabilidade de uma nova vacina prejudicar a saúde do indivíduo. Demonstradas a segurança e eficácia em animais, o desenvolvimento passa para a fase de testes em humanos. Os estudos clínicos visam garantir que a vacina que está sendo testada apresente eficácia e segurança, prevenindo a doença.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

micro-organismos, ou, se possível, para material não biológico); *reduction* (redução do número de animais utilizados); *refinement* (refinamento das técnicas para minimizar o nível de estresse e dor causada ao animal durante a experimentação). A adoção de sistemas *in vitro* de cultura de células permite substituir completamente o uso de animais ou seus derivados para as fases de produção e testes de algumas vacinas. Em uma decisão recente (abril/2022), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) publicou a Portaria nº 560, que possibilita dispensar as empresas fabricantes de produtos biológicos de uso veterinário, como as vacinas veterinárias, da realização de testes com o uso de animais para a liberação de lotes comerciais.

Após a demonstração da prova de princípio do uso daquele antígeno como vacina em animais, os pesquisadores precisam desenvolver os processos produtivos dessa vacina, bem como seus controles de qualidade. Dessa forma, a pesquisa passa de uma escala de bancada para uma escala piloto, visando estabelecer os processos produtivos e de controle de qualidade para produzir lotes de vacinas em uma escala maior e suficiente para realizar os primeiros estudos em humanos (fase 1). Esse desenvolvimento experimental passa pelo estabelecimento dos processos de produção do antígeno (*upstream*) e de purificação (*downstream*) (Figura 3.3). Estabelecidos esses processos, é possível fabricar lote(s) piloto em Boas Práticas de Fabricação (BPF), que serão usados nos estudos clínicos. Juntamente com esses dados de fabricação do lote piloto da vacina e os dados pré-clínicos satisfatórios, a instituição solicita aos comitês de ética em pesquisa e as agências regulatórias a autorização para a fase de testes em humanos.

3.5 O PARADIGMA CRIADO PELA PANDEMIA DE COVID-19

A sequência genética do vírus SARS-CoV-2 foi publicada em 11 de janeiro de 2020, desencadeando uma intensa atividade global em P&D para desenvolver uma vacina para Covid-19. O impacto humanitário e econômico da pandemia de Covid-19 impulsionou a avaliação das plataformas inovadoras (mRNA e vetor viral, principalmente), por meio de novos paradigmas para acelerar o desenvolvimento. O primeiro candidato à vacina para Covid-19, desenvolvido pela empresa Moderna (vacina de mRNA), entrou em testes clínicos em humanos com uma rapidez sem precedentes em 16 de março de 2020. Uma característica marcante do cenário de desenvolvimento de vacinas para Covid-19 foi a variedade de plataformas tecnológicas avaliadas, incluindo ácido nucleico (DNA e RNA), VLP, peptídeos, vetor viral (replicante e não replicante), proteínas

recombinantes, abordagens de vírus vivo atenuado e vírus inativado. Em 2023, há mais de 30 vacinas aprovadas, 13 bilhões de doses administradas e 5,5 bilhões de pessoas vacinadas com ao menos 1 dose (LONDON SCHOOL OF HYGIENE & TROPICAL MEDICINE, 2022; WHO, 2023).

O desenvolvimento tecnológico de vacinas é usualmente demorado, e a maioria dos candidatos a uma vacina falhará durante o denominado “vale da morte”, entre os estudos pré-clínicos e os estudos clínicos de fase 2, sendo que a maioria dos estudos falhará nas fases pré-clínicas em animais. Acredita-se que, de cada 250 projetos, apenas 1 chegará a um registro. Até agosto de 2022, 17 vacinas em desenvolvimento para Covid-19 foram abandonadas (ZIMMER et al., 2022).

O desenvolvimento de uma vacina para Covid-19 não pôde seguir a rota de desenvolvimento tradicional, pois isso custaria mais vidas. O esforço global de P&D em resposta à pandemia do Covid-19 foi sem precedentes, em termos de escala e velocidade. Isso representou uma mudança fundamental na trajetória tradicional de desenvolvimento de vacinas e exigiu novos paradigmas de desenvolvimento, envolvendo paralelismo em diversas fases (estudos pré-clínicos, clínicos e escalonamento), altos investimentos financeiros, processos regulatórios inovadores e capacidade de produção em larga escala. Para reduzir a probabilidade de falha e antecipar a avaliação de segurança e eficácia da vacina, modelos animais específicos para Covid-19 foram desenvolvidos, incluindo camundongos transgênicos – enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2+, do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*), *hamsters*, furões e primatas não humanos. Os resultados pré-clínicos foram disponibilizados em paralelo às avaliações clínicas em humanos de fase 1.

Apesar de tantas plataformas vacinais sendo exploradas para a produção de uma vacina para Covid-19, não se obteve uma vacina que produzisse esterilidade imunizante, ou seja, que impedisse a infecção. As vacinas foram um grande sucesso em evitar o agravamento da doença, mas o vírus continuou a circular criando variantes. O paradigma de que altos títulos de anticorpos neutralizantes conferem proteção não se confirmou, e a resposta celular induzida pelas vacinas foi crítica para reduzir a gravidade da doença. No entanto, além de seu poder imunogênico, outras características foram importantes para implementação das vacinas de Covid-19, como sua velocidade de produção, segurança, reatogenicidade, duração da imunidade, escala, custo de produção, estabilidade e requisitos da cadeia de frio.

Durante a implementação das vacinas de Covid-19, o paradigma de completar o esquema vacinal usando a mesma vacina também foi quebrado. Eventos adversos e a escassez de produtos obrigou os gestores a imple-

mentarem a vacinação heteróloga, ou seja, esquemas de vacinação utilizando vacinas de plataformas e fabricantes diferentes. Os resultados confirmaram o que a ciência havia mostrado em relação ao *prime and boost*, onde o reforço heterólogo parece induzir respostas imunológicas mais robustas. O *prime and boost* é um termo usado na vacinologia para definir uma estratégia de vacinação usando o imunógeno idêntico durante as doses primárias e de reforço usando um imunógeno diferente. As vacinas de Covid-19 demonstraram uma duração da imunidade curta, e a população voltou muitas vezes para se revacinar e elevar seus *status* imunológico.

Devido à circulação do vírus permanente, variantes de preocupação surgiram, levando a um escape imunológico. Algumas variantes acumularam um número elevado de mutações criando sorogrupos separados, o que levou os produtores de vacinas à bancada novamente, para criar vacinas atualizadas e bivalentes. À medida que os debates sobre a necessidade de doses de reforço anuais se tornam realidade, muitos pesquisadores têm observado o modelo de vacinação contra *influenza* como um guia para lidar com a ameaça constante da Covid-19. Assim como os cientistas há muito buscam uma vacina universal contra a *influenza* que possa fornecer proteção duradoura contra vários subtipos desse vírus respiratório, o campo também está em busca de vacinas pan-coronavírus que possam afastar futuras variantes de SARS-CoV-2 e antecipar a próxima pandemia. Sem a urgência de uma nova ameaça pandêmica ou orçamento flexível e disponível, é improvável que o desenvolvimento da vacina pan-coronavírus avance na velocidade vertiginosa da corrida vacinal de 2020. No entanto, os avanços científicos e tecnológicos dos últimos anos impulsionaram o campo. Acredita-se que encontrar uma vacina amplamente protetora contra os coronavírus não será tão difícil quanto desenvolver uma vacina para o HIV ou uma vacina universal para *influenza*.

3.6 DESAFIOS NACIONAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E AS CONTRIBUIÇÕES PARA O COMPLEXO ECONÔMICO INDUSTRIAL DA SAÚDE

Existem desafios para a aceleração e o desenvolvimento autóctone de vacinas, em países em desenvolvimento, como o Brasil. Esses desafios consideram lacunas em questões de regulação, de governança em políticas públicas, tecnológicas e de inovação. Por exemplo, em relação à questão de regulação, os desafios estão relacionados à necessidade de promover a parceria entre países, buscando incluir a interação entre os programas nacionais de imunização já estabelecidos. Com esse processo, podem-se estabelecer padrões de qualidade

para os produtos e buscar uma harmonização regulatória e sanitária mais ampla. Especificamente no caso do Brasil, é preciso promover melhorias no sistema de informação. Essas melhorias podem ocorrer por meio de parcerias públicas e privadas.

Com relação à governança em políticas públicas, os desafios estão relacionados ao estabelecimento de políticas alinhadas entre os Ministérios (da Saúde, por exemplo) e os Programas de Saúde Pública. Em termos globais, é necessário fortalecer o sistema de saúde dos países de média e baixa renda, aumentando o diagnóstico de doenças que possam ser prevenidas por vacinas, para se ter um maior conhecimento da epidemiologia das doenças e, conseqüentemente, de quais são as vacinas mais necessárias em cada país. Além disso, é necessário estabelecer e fortalecer a ambiência interna (ecossistemas), com ações multissetoriais entre Indústria e Comércio, Ciência & Tecnologia, Educação, Saúde, Sistema Regulatório e as atividades científicas locais nas universidades, agências de fomento e laboratórios produtores. Além disso, pode-se estimular a produção em conjunto para uma região específica com o estabelecimento de HUBs de desenvolvimento de vacinas, definindo quais produtos são necessários e quem pode produzir mais rápido sem duplicação de esforços.

Com relação às questões tecnológicas, os desafios se relacionam com a necessidade de estimular a resolução de problemas tecnológicos para melhorar o uso das vacinas (termoestabilidade x cadeia de frio), resultando em vacinas adaptadas aos países em desenvolvimento. Outro aspecto é o estímulo à Vigilância Epidemiológica para o monitoramento de novos patógenos, doenças emergentes causadas por vírus e negligenciadas como chagas, malária, hanseníase, parasitoses, entre outras.

O processo de transferências tecnológicas (TT) também pode ser fomentado, promovendo maior interação entre multinacionais e laboratórios nacionais, permitindo o aumento de confiança nos produtos obtidos localmente e transferência de conhecimento (*know-how*). Além disso, é preciso reduzir as limitações existentes nas TT e o fomento de pesquisa, desenvolvimento e produção local das vacinas. Posteriormente, pode-se estudar a capacidade produtiva local e a capacidade de absorção de novas tecnologias. A superação de alguns desses desafios pode diminuir o *backlog* tecnológico de países de baixa e média renda para que seja possível desenvolver e produzir vacinas localmente e adequadas às necessidades de saúde desses países.

Quanto à inovação, os desafios estão ligados ao fortalecimento dos ecossistemas locais de inovação em vacinas e imunobiológicos. São necessários maiores investimentos em C&T, com acesso a investimentos em geral das empresas públicas e privadas, estimulando o

desenvolvimento rápido de novas vacinas (uso de plataformas tecnológicas) e a sustentabilidade da produção local de vacinas. Além disso, pode-se estimular a realização de ensaios clínicos para proporcionar o acesso da população aos medicamentos e vacinas e promover pesquisas translacionais para o benefício público dos investimentos.

É urgente que novas estratégias sejam concebidas a fim de fortalecer os vínculos entre as políticas científicas e tecnológicas, o Sistema Único de Saúde (SUS) e o PNI no Brasil e o fornecimento e acesso a novas vacinas de baixo custo para enfrentar os principais desafios de saúde pública. Além disso, é necessário resgatar lições aprendidas com a experiência brasileira na implementação de políticas governamentais de inovação em vacinas e que possam ser aplicadas a outros países em desenvolvimento.

O estabelecimento do Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS) no Brasil ajuda a superar os desafios impostos no processo de desenvolvimento e produção de vacinas. O fato de as vacinas serem a base da biotecnologia moderna e terem adquirido progressivamente maior importância no CEIS fez que as vacinas fossem incorporadas cada vez mais ao mercado farmacêutico global (HOMMA et al., 2020). As vacinas são consideradas parte importante do CEIS, que busca contribuir para considerar a cadeia de valor, fortalecendo a produção local de insumos e matérias-primas e diminuindo o monopólio de fornecedores globais.

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É fato que só quem olhou para a história pode entender o presente. Passaram-se quase 230 anos desde que a vacinologia foi lançada pelas observações de Edward Jenner sobre os poderes da varíola bovina para prevenir a varíola. O desenvolvimento de vacinas continua no século XXI aceleradamente, em especial após a pandemia de Covid-19, que descortinou a necessidade de colaboração, financiamento e caminhos regulatórios ajustáveis ao momento (por exemplo, recentemente, a CEPI lançou um projeto para o desenvolvimento de uma vacina em 100 dias). Sem dúvida, os agentes para os quais são necessárias novas vacinas são mais complicados em sua patogênese do que aqueles para os quais já existem vacinas e, portanto, precisa-se de um conhecimento mais profundo do sistema imunológico do que o existente atualmente. Isso é particularmente importante para doenças para as quais a imunidade natural é ausente ou parcial, como HIV/AIDS e malária.

Há várias doenças importantes para as quais são necessárias novas vacinas para reduzir a morbidade e a mortalidade globalmente, que provavelmente terão

mercado em países de alta e baixa renda, incluindo vacinas para *Streptococcus* do grupo B (uma das principais causas de meningite neonatal), RSV, hepatite C e CMV. Outra grande linha de desenvolvimento de novas vacinas é o combate às infecções hospitalares, sobretudo bactérias Gram-positivas resistentes a antibióticos (como *Staphylococcus aureus*) que estão associadas a infecções de feridas e cateteres intravenosos e vários organismos Gram-negativos (como *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*). O progresso tem sido lento neste campo. Talvez a maior área de crescimento para o desenvolvimento de vacinas seja para idosos, com poucos produtos voltados especificamente para essa população. Com o aumento substancial da população de idosos, a prevenção da infecção nessa população deve ser prioridade de saúde pública. Esforços para entender melhor a imunossenescência e como melhorar as respostas vacinais nos adultos mais velhos constituem um grande desafio para os imunologistas.

No entanto, o passado foi um prólogo desse futuro esperado, e todas as vacinas recentemente desenvolvidas foram baseadas em uma análise anterior da resposta imunológica protetora. Nenhuma vacina desde a vacina do bacilo *M. bovis* de Calmette-Guérin foi desenvolvida sem uma hipótese imunológica sobre proteção. É provável que o sucesso das vacinas dependa da indução de anticorpos funcionais que impeçam a infecção e de funções celulares específicas que controlem a replicação do patógeno, caso a infecção ocorra apesar da presença do anticorpo. Esses conceitos são antigos; o que é novo é nossa capacidade de expressar antígenos, de invocar o sistema imunológico inato para aumentar a imunidade adaptativa e de caracterizar as células T necessárias para as respostas que desejamos. Novamente vemos paradigmas desafiados durante a pandemia de Covid-19, em que o foco de desenvolvimento de uma vacina não foi impedir a infecção e circulação do vírus, mas salvar o maior número de vidas, reduzindo a gravidade da doença.

Nota: as duas primeiras autoras contribuíram igualmente para a autoria do capítulo.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA. **Andamento da análise das vacinas na Anvisa.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/andamento-da-analise-das-vacinas-na-anvisa>>. Acesso em: 5 jan. 2023.
2. BAYLAC-PAOULY, B. Vaccine Development and Collaborations: Lessons from the History of the Meningococcal A Vaccine (1969-73). **Medical History**, v. 63, n. 4, p. 435-53, 9 out. 2019.
3. BBC NEWS. **“Incidente Cutter”: a tragédia nos EUA dos anos 1950 que resultou em vacinas mais seguras.** Disponível em:

- <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-54222884>>. Acesso em: 23 mar. 2023.
4. BILL GATES. **My Annual Letter: Vaccine miracles**. Disponível em: <<https://www.gatesnotes.com/bills-annual-letter-vaccine-miracles>>. Acesso em: 24 mar. 2023.
 5. BUTANTAN. **Imunização, uma descoberta da ciência que vem salvando vidas desde o século XVIII**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/imunizacao-uma-descoberta-da-ciencia-que-vem-salvando-vidas-desde-o-seculo-xviii>>. Acesso em: 14 mar. 2023.
 6. DOMINGUES, C. M. A. S. et al. 46 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma história repleta de conquistas e desafios a serem superados. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, p. e00222919, 2020.
 7. FIOCRUZ. **Relatório de atividades 2021**. 1. ed. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos/Fiocruz, 2022a.
 8. FIOCRUZ. **Vacinas virais**. Disponível em: Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas-menu-topo/131-plataformas/1574-vacinas-virais>>. Acesso em: 5 jan. 2023b.
 9. HOMMA, A. et al. **Vacinas e vacinação no Brasil: horizontes para os próximos 20 anos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Edições Livres, 2020.
 10. IHSEN, J. et al. Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 61, 11 dez. 2010.
 11. LONDON SCHOOL OF HYGIENE & TROPICAL MEDICINE. **Covid-19 vaccine tracker**. Disponível em: <https://vac-lshtm.shinyapps.io/ncov_vaccine_landscape/>. Acesso em: 24 mar. 2023.
 12. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Imunizações: 30 anos**. 1. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2003.
 13. NIH. **Michael Heidelberger**. Disponível em: <<https://profiles.nlm.nih.gov/spotlight/dh/catalog.nlm:nlmuid-101584940X-73-img>>. Acesso em: 23 mar. 2023.
 14. PLOTKIN, S. History of vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12283-87, ago. 2014.
 15. POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83-100, 22 fev. 2021.
 16. POST, P. R. et al. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 849-57, ago. 2001.
 17. ROCKEFELLER UNIVERSITY. **Emil C. Gotschlich, creator of lifesaving vaccines, has died**. Disponível em: <<https://www.rockefeller.edu/news/33642-emil-c-gotschlich-creator-of-lifesaving-vaccines-has-died/>>. Acesso em: 23 mar. 2023.
 18. STRUGNELL, R. et al. Vaccine antigens. **Perspectives in Vaccinology**, v. 1, n. 1, p. 61-88, ago. 2011.
 19. THE COLLEGE OF PHYSICIANS OF PHILADELPHIA. **History of vaccines**. Disponível em: <<https://historyofvaccines.org/>>. Acesso em: 23 mar. 2023.
 20. VACCINE EDUCATION CENTER. **Vaccine History: Developments by Year**. Disponível em: <<https://www.chop.edu/centers-programs/vaccine-education-center/vaccine-history/developments-by-year>>. Acesso em: 24 mar. 2023.
 21. VACCINESTODAY. **VaccinesToday**. Disponível em: <<https://www.vaccinestoday.eu/>>. Acesso em: 24 mar. 2023.
 22. WHO. **WHO Coronavirus (Covid-19) Dashboard**. Disponível em: <<https://Covid19.who.int/>>. Acesso em: 24 mar. 2023.
 23. ZHANG, F.; LU Y. J.; MALLEY R. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 33, p. 13564-9, ago. 2013.
 24. ZIMMER, C. et al. **Coronavirus Vaccine Tracker**. Disponível em: <<https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html>>. Acesso em: 1 dez. 2023.

Vacinas virais

Elvira Alonso Lago

Eliane Matos dos Santos

Elena Cristina Caride

Luciana Gomes Pedro Brandão

Celia Menezes Cruz Marques

Neste capítulo, são discutidas as vacinas virais. Serão abordadas as classes das vacinas virais, com ênfase nas vacinas atenuadas, inativadas, de subunidade, vetores virais e ácidos nucleicos. A discussão avança para as aplicações clínicas e a descrição das recomendações sobre as vacinas virais, em que 18 delas serão descritas detalhadamente.

4.1 VACINAS VIRAIS: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO

De maneira geral, os princípios ativos que compõem as vacinas virais são derivados de organismos vivos, atenuados ou inativados. No entanto, vacinas mais modernas foram desenvolvidas a partir de antígenos vacinais obtidos por engenharia genética ou tecnologia do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) recombinante (FIOCRUZ, 2022; PLOTKIN, 2014). Existem vacinas obtidas a partir de subunidades proteicas, expressas em sistemas celulares de procariotos ou eucariotos, VLP (*virus-like particles*), vetores virais e, recentemente, vacinas baseadas em ácidos nucleicos (DNA ou mRNA). Para o licenciamento de uma vacina, os estudos clínicos são indispensáveis. Isto porque possibilitam a obtenção de dados e evidências consistentes sobre a segurança, imunogenicidade e eficácia da vacina. Além disso, os estudos de pós-comercialização (*post-marketing*) também são importantes, uma vez que, às vezes, eventos adversos raros somente são percebidos após a aplicação da vacina em larga escala. Algumas vacinas para doenças raras e que provocam surtos esporádicos, como a meningite meningocócica, são licenciadas após estudos de imunogenicidade, e a eficácia da vacina apenas avaliada após a comercialização (ANVISA, 2020). Após o licenciamento, as vacinas

podem ser implementadas pelos programas de vacinação. No Brasil, há em torno de 20 vacinas fornecidas pelo SUS, que compõem os calendários de vacinação, para crianças, adolescentes, gestantes, adultos e idosos. Algumas vacinas são disponibilizadas em casos específicos e fornecidas por centros de referência de imunobiológicos especiais (CRIE), principalmente para as pessoas com imunodeficiências, condições especiais de morbidade ou pessoas expostas a situações de risco. O calendário do SUS oferece todas as vacinas para doenças de relevância significativa para a saúde pública, que devemos tomar ao longo da vida e durante as campanhas de vacinação. Na rede privada também podemos encontrar todos esses imunizantes, além de alguns específicos, como as vacinas para herpes-zóster e dengue, por exemplo. Neste capítulo, abordaremos os tipos de vacina virais e as plataformas tecnológicas usadas para seu desenvolvimento, correlacionando com as aplicações clínicas e recomendações de uso. Abordaremos também vacinas utilizadas em emergências de saúde pública como *monkeypox* e ebola.

4.2 CLASSES DE VACINAS VIRAIS

Como descrito no Capítulo 3, as vacinas virais podem ser classificadas por gerações. A primeira geração engloba as plataformas clássicas, que incluem as vacinas

atenuadas e as vacinas inativadas (FIOCRUZ, 2022). A segunda geração contempla as plataformas biotecnológicas, que incluem as vacinas recombinantes proteicas de subunidade e as chamadas VLP (*virus-like particle*). As vacinas de terceira geração, por sua vez, são consideradas plataformas inovadoras, amplamente exploradas

durante a pandemia, que incluem as vacinas de vetor viral e de ácidos nucleicos (Figura 4.1).

As vacinas podem ser classificadas em gerações, que estão relacionadas com descobertas científicas ao longo dos séculos, e que permitiram o desenvolvimento de novas plataformas vacinais. A partir dessas plataformas,

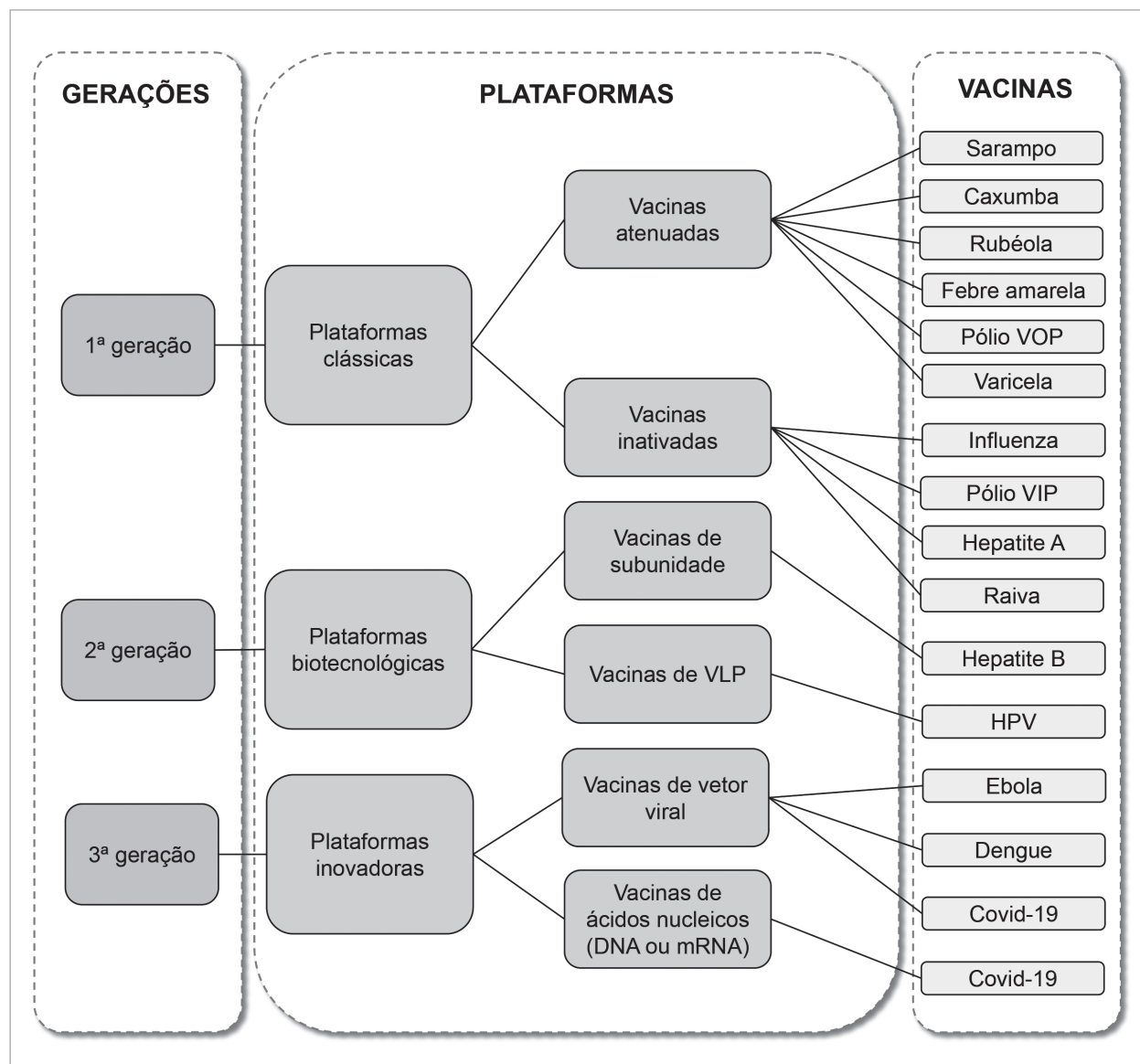


FIGURA 4.1 Gerações de vacinas virais e suas plataformas (tecnologias) correspondentes. Desde os tempos de Pasteur, as vacinas foram desenvolvidas usando abordagens empíricas consistindo principalmente de microrganismos inativados ou vivos atenuados (1ª geração). Essas vacinas tiveram bastante sucesso na eliminação de muitas doenças devastadoras. Durante os últimos 30 anos, ondas subsequentes de novas tecnologias possibilitaram o desenvolvimento de vacinas de 2ª geração, com base na tecnologia de DNA recombinante. Plataformas inovadoras (3ª geração) são estudadas há mais de 20 anos, e sua vantagem principal é a possibilidade de se desenvolver uma vacina com base apenas nas informações genéticas do microrganismo. Isso torna essas plataformas altamente adaptáveis e acelera de forma considerável o desenvolvimento de vacinas. As vacinas listadas na figura são apenas as licenciadas para uso em humanos. Fonte: elaborada pelos autores (2023).

vacinas contra diferentes vírus foram desenvolvidas. Na Figura 4.1 estão alguns exemplos de vacinas licenciadas que foram desenvolvidas a partir de diferentes plataformas: VOP (vacina oral poliomielite) e VIP (vacina inativada poliomielite). A seguir, são detalhadas as classes de vacinas e as doenças para as quais foram desenvolvidas.

4.2.1 Vacinas atenuadas

As vacinas vivas atenuadas, ou simplesmente vacinas atenuadas, contêm o patógeno principal da doença, que foi atenuado em condições laboratoriais. O método de atenuação de um vírus por passagens sucessivas foi desenvolvido por Theiler e Smith em 1937, com o objetivo de atenuar o vírus da febre amarela (THEILER; SMITH, 1937). Os pesquisadores isolaram o vírus da febre amarela de um paciente infectado e atenuaram o vírus inoculando diferentes tecidos de animais: cérebros de camundongos, tecidos embrionários de camundongos cultivados *in vitro* e, finalmente, em embriões de ovos de galinha, com e sem tecido nervoso, até obter um vírus que não causasse mais doenças em humanos, mas tivesse potencial imunogênico. Theiler recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1951 pela descoberta de uma vacina eficaz contra a febre amarela. Apesar de o método de Theiler ter se mostrado eficiente para o desenvolvimento de uma vacina de febre amarela, foi conduzido de maneira totalmente empírica, utilizando tecidos isolados diretamente de animais. Outras vacinas virais atenuadas somente foram desenvolvidas na década de 1960 com a descoberta de que células poderiam ser cultivadas *in vitro* e usadas como substratos para o crescimento viral. Esse é o método mais utilizado para a obtenção de vírus atenuados, o qual consiste em promover infecções sequenciais de vírus patogênicos em culturas celulares *in vitro*. O que se obtém após a série de passagens são cepas virais menos virulentas (atenuadas), as quais sofreram mutações genéticas pontuais que comprometem o funcionamento de fatores virais necessários à patogenicidade, sem, no entanto, gerar prejuízos à capacidade “replicativa” do vírus. Essas mutações pontuais também podem ser obtidas por meio de técnicas de biologia molecular, atenuando-se cepas patogênicas geneticamente. Essa atenuação também pode ser alcançada pela retirada de fragmentos maiores do genoma do vírus. Vacinas atenuadas obtidas por manipulação genética são classificadas como vacinas geneticamente atenuadas. Quando aplicado no corpo de um indivíduo, o vírus atenuado é capaz de se replicar, porém de maneira lenta, sem causar maiores danos ao organismo. A prolongada exposição ao vírus durante a lenta replicação viral induz uma resposta imune. Esta resposta leva à produção de células de memória (lin-

fócitos B e T), as quais garantem o estabelecimento de imunidade contra o vírus em questão. Vacinas atenuadas não dependem do uso de adjuvantes (componentes que ajudam na estimulação do sistema) e usualmente estabelecem uma resposta imunológica de longo prazo.

Essas vacinas são úteis, pois têm a capacidade de emular o processo de infecção, o que pode levar à indução de potentes respostas de anticorpos e imunidade celular. Essas vacinas são contraindicadas para imunodeprimidos e gestantes. A vacina tríplice de sarampo, caxumba e rubéola (TVV) é um tipo de vacina atenuada de destaque. A vacina tríplice viral contém os três vírus em uma única formulação, no entanto os vírus são produzidos separadamente, em células de embriões de galinha, cultivadas *in vitro*, ou em células diploides humanas MRC5. As vacinas de poliomielite (VOP) e varicela são outras conhecidas neste grupo.

4.2.2 Vacinas inativadas

A inativação de patógenos foi aplicada pela primeira vez ao bacilo da febre tifoide, da peste e da cólera no final do século XIX. Pesquisadores demonstraram que a imunogenicidade poderia ser mantida se as bactérias fossem cuidadosamente inativadas por calor ou tratamento químico. A partir desses resultados foram desenvolvidas as primeiras vacinas inativadas, quase simultaneamente, por Salmon e Smith nos Estados Unidos e pelo grupo do Instituto Pasteur (Roux e Chamberland) na França (ROUX; CHAMBERLAND, 1887; SALMON; SMITH, 1880). No século XX, a inativação química também foi aplicada aos vírus. A vacina contra a gripe foi a primeira vacina de vírus inativada bem-sucedida, e a experiência positiva estimulou Salk em seu esforço no desenvolvimento da vacina inativada contra a poliomielite (SALK et al., 1954; THOMAS; MAGILL, 1936).

Vacinas inativadas contêm um vírus que foi produzido em cultura de tecido ou em animais e, em seguida, inativado por agentes químicos e/ou físicos (POLLARD; BIJKER, 2021). As vacinas inativadas não chegam a “imitar” a doença como as atenuadas, o que fazem é “enganar” o sistema imune, pois este não diferencia o agente infeccioso morto do vivo, que representa perigo real, e desencadeia o processo de proteção. São vacinas sem risco de causar infecção em pessoas imunodeprimidas ou em gestante e seu feto. No entanto, existem algumas preocupações, como os vírus inativados não terem capacidade de se replicar e serem eliminados rapidamente do organismo, o que pode diminuir a eficiência e a eficácia das vacinas em comparação com as vacinas atenuadas. Exemplos de vacinas inativadas: (i) influenza (gripe); (ii) poliomielite injetável (VIP); (iii) hepatite A; e (iv) raiva.

Por trabalhar com patógenos completamente incapazes de provocar sintomas de uma doença, as vacinas inativadas, que de modo geral são formuladas com adjuvantes (componentes que ajudam na estimulação do sistema), tendem a ter esquemas vacinais multidoses e, em alguns casos, geram imunidade de curta duração, necessitando de doses de reforço. Existem apenas alguns adjuvantes que são usados rotineiramente em vacinas licenciadas. No entanto, o portfólio de adjuvantes está em constante expansão, com adjuvantes à base de lipossomas e emulsões de óleo em água sendo licenciados nas últimas décadas. O mecanismo de ação dos sais de alumínio (alúmen), embora utilizado como adjuvante por mais de 80 anos, permanece não completamente compreendido.

Há evidências crescentes de que as respostas imunológicas e a proteção das vacinas inativadas podem ser aumentadas pela adição de adjuvantes mais novos e que fornecem outros sinais para o sistema imunológico. Exemplos desses novos adjuvantes são a emulsão óleo-em-água MF59, usada em algumas vacinas contra a gripe; AS01, utilizado em uma das vacinas contra herpes-zóster e a vacina contra malária; e AS04, aplicado em uma vacina contra o papilomavírus humano (HPV). O adjuvante AS03, à base de esqualeno, é usado em vacinas para influenza H1N1 e H5N1. Os adjuvantes podem exercer seus efeitos por meio de diferentes mecanismos. Alguns adjuvantes, como alumínio e emulsões óleo-em-água, funcionam como sistemas de entrega gerando depósitos, aumentando a persistência do antígeno no local da injeção e o recrutamento e a ativação de células apresentadoras de antígeno. O AS03, por sua vez, desencadeia respostas imunes inatas resultando na produção de citocinas e quimiocinas no local da injeção e nos linfonodos, o que induz a migração de células imunes essenciais (por exemplo, monócitos e granulócitos).

4.2.3 Vacinas de subunidade

As vacinas de subunidade são constituídas de fragmentos dos patógenos (antígenos) em vez do patógeno completo, como no caso das vacinas inativadas. Essas vacinas baseadas em subunidades proteicas podem ser constituídas de proteínas purificadas diretamente do vírus obtido em cultura de células, ou de proteínas recombinantes, obtidas por técnicas de biologia molecular. A maioria das vacinas inativadas contra influenza usadas hoje é chamada de fragmentada e inativada, pois são geradas pelo cultivo de vírus em ovos embrionados que, depois de isolado, é quebrado pelo uso de detergentes. A proteína viral hemaglutinina (HA) é purificada para servir como antígeno vacinal, embora outros componentes do vírus influenza possam estar presentes

no produto final (CATE et al., 1977). No entanto, a revolução da engenharia genética (ou tecnologia do DNA recombinante) no final do século XX teve grande impacto no desenvolvimento de vacinas de subunidade, sendo o primeiro fruto dessa revolução a vacina contra a hepatite B. Além da vacina de hepatite B, outra vacina revolucionária obtida por engenharia genética é a vacina contra o vírus do papiloma humano (HPV).

De maneira geral, vacinas de subunidade recombinantes são obtidas a partir da informação genética do patógeno, usando genes que codificam proteínas que representem antígenos relevantes para a proteção. Virtualmente é possível se desenvolver vacinas de subunidade a partir da sequência dos antígenos proteicos patogênicos, obtida sequenciando-se os genes do antígeno principal e produzindo-os sinteticamente por meio da tecnologia de DNA recombinante. Hoje é possível produzir proteínas recombinantes por meio de sistemas de expressão heterólogos usando outros micro-organismos como bactérias, leveduras, células de mamíferos, insetos e até mesmo vegetais. As VLP (do inglês: *virus-like particle*) consistem em proteínas virais (subunidades obtidas por engenharia genética) dispostas em uma estrutura lipídica (nanopartícula), necessárias para formar uma partícula semelhante ao vírus, mas que não possui o genoma viral nem proteínas não estruturais.

Vacinas baseadas em VLP têm recebido interesse crescente devido ao seu bom perfil de segurança e alto potencial imunogênico. São altamente estáveis e menos sujeitas à degradação em comparação às vacinas de proteína tradicionais.

As vacinas de peptídeos, por sua vez, são frequentemente chamadas de vacinas sintéticas e reproduzem regiões antigênicas (epítomos) das proteínas naturais de patógenos. Elas são específicas, o que minimiza os riscos de reações alérgicas ou autoimunes. No entanto, são moléculas instáveis em nosso organismo, podendo gerar uma menor resposta imune.

A vacina para hepatite B foi o primeiro e um dos exemplos bem-sucedidos de vacinas de subunidade. O antígeno de superfície desse vírus (HBsAg) é muito imunogênico e eficaz como vacina, sendo capaz de produzir altos níveis de anticorpos no organismo. No passado, para produzir a vacina contra a hepatite B, o HBsAg era purificado a partir do plasma de portadores da infecção, trazendo risco do uso de plasma contaminado na produção da vacina. Para produzir a vacina recombinante contra a hepatite B, o HBsAg recombinante é expresso em células que possuem um potente sistema de expressão (como leveduras), levando à produção de partículas de HBsAg, que são formuladas com adjuvantes para compor a vacina.

Durante o desenvolvimento de vacinas para o HPV (papilomavírus), pesquisadores identificaram que não seria possível usar técnicas clássicas de desenvolvimento, uma vez que o genoma do HPV possui os chamados oncogenes, trazendo o risco de uma vacina clássica induzir células humanas a se tornarem cancerígenas. No entanto, pesquisadores descobriram que diversas cópias da proteína L1 do HPV obtidas por engenharia genética podem se reunir espontaneamente em partículas semelhantes à vírus, formando as VLP. Após a injeção, essas VLP estimularam a produção de expressivas quantidades de anticorpos e preveniram a infecção viral em modelos animais. As VLP mostraram-se, posteriormente, seguras e altamente imunogênicas em ensaios com voluntários humanos. Como essas partículas não têm genoma, não se replicam, porém, levam a uma resposta eficaz e significativa contra o patógeno.

Vacinas para influenza também foram desenvolvidas e licenciadas usando tecnologia de segunda geração. A partir do uso da sequência genética da proteína de superfície do vírus influenza chamada hemaglutinina (HA), é possível o desenvolvimento de vacinas recombinantes e de rápida atualização anual. Para a obtenção da vacina, o antígeno HA recombinante é produzido em células de inseto por meio de um baculovírus, um vírus que infecta células de invertebrados.

4.2.4 Vacinas de vetores virais



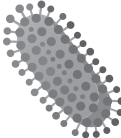
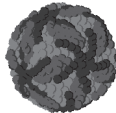

Os vírus evoluíram para infectar células de mamíferos e expressar os genes codificados com alta eficiência. A pesquisa e o desenvolvimento de vacinas, aliados ao melhor entendimento das respostas imunes ao vírus, demonstraram que os próprios vírus poderiam ser manipulados em laboratório e utilizados como carreadores (vetores) de antígenos para outras doenças. As vacinas de vetor viral consistem em um vírus recombinante (vetor viral), muitas vezes não relacionado com a doença para a qual se desenvolve a vacina, frequentemente atenuado para reduzir sua patogenicidade, no qual os genes que codificam o(s) antígeno(s) do patógeno foram clonados usando técnicas de DNA recombinante (POLLARD; BIJKER, 2021). O vírus *Vaccinia* foi o primeiro a ser usado como vetor na década de 1980. Depois disso, surgiram novos vetores como o citomegalovírus (CMV), o vírus da estomatite vesicular (VSV) e os adenovírus. Vetores virais são mais eficientes na transdução *in vivo* do antígeno, quando comparado com outras vacinas, como de ácidos nucleicos, por exemplo. Alguns vírus usados como vetores podem ter como alvo células apresentadoras de antígenos, resultando em uma ativação potente da resposta imune.

As vacinas de vetor viral podem ser replicativas ou não replicativas. As vacinas de vetor replicativo infectam células nas quais o antígeno da vacina é produzido. Podem carregar o antígeno da vacina na superfície da partícula viral gerada durante a infecção celular, sendo capazes de infectar novas células. As vacinas de vetor não replicativo, inicialmente, entram nas células e produzem o antígeno da vacina usando a maquinaria celular, mas nenhuma nova partícula de vírus é formada. Como as vacinas de vetor viral resultam na produção de antígeno endógeno, as respostas imunes humoral e celular são estimuladas, sem a necessidade de uso de adjuvantes na sua formulação (POLLARD; BIJKER, 2021). Uma possível desvantagem é que alguns desses vetores são afetados e, parcialmente, neutralizados pela imunidade a vetor preexistente. Isso é contornado pelo uso de tipos de vetores que são raros em humanos ou derivados de vírus animais. A imunidade antivector afeta a eficiência de administrações repetidas (reforço), que pode ser prejudicada devido à indução de anticorpos neutralizantes e, em alguns casos, linfócitos T contra o próprio vetor. Para contornar essa questão, algumas vacinas para Covid-19 desenvolvidas a partir de vetores virais, como a vacina Sputnik V, usaram as chamadas estratégias de *prime and boost*. Nessa abordagem, são utilizados dois vírus diferentes imunologicamente no esquema vacinal, em que o reforço vacinal é denominado reforço heterólogo.

A plataforma de vetor viral vem sendo estudada há bastante tempo, havendo quatro abordagens diferentes: (i) vetores virais replicativos; (ii) vetores virais não replicativos; (iii) vetores virais de ciclo único; e (iv) vetores virais multissegmentados. Os seguintes tipos de vetores virais são conhecidos: (i) retrovírus; (ii) lentivírus; (iii) adenovírus; (iv) poxvírus; (v) alfavírus; (vi) arenavírus; (vii) herpes vírus; (viii) flavivírus; (ix) paramixovírus; e (x) rhabdovírus. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens. Esses vetores vinham sendo desenvolvidos sobretudo como sistema de liberação em terapia celular e, posteriormente, começaram a ser pesquisados também no desenvolvimento de vacinas (TRAVIESO, 2022). Na Tabela 4.1 são sintetizados os principais vetores virais e suas características.

Dentre os principais tipos de vetores virais em estudo mais avançados, seja para vacinas ou medicamentos, estão os vetores de adenovírus e adenovírus associados. As vacinas baseadas em adenovírus são uma tecnologia relativamente nova; no entanto, existem vacinas aprovadas para o ebola (Ad26.EBOV) baseadas em adenovírus. Diversos candidatos à vacina de vetor não replicativo foram desenvolvidos e aprovados para SARS-CoV-2. A seguir, estão as principais vacinas de Adenovírus para Covid-19:

TABELA 4.1 Características dos vetores virais usados para vacinas contra doenças infecciosas

Vetor	Tipo de vírus	Tipo de vetor	Competente de replicação	Integração de inserção	Tamanho de inserção	Anticorpo	T CD4	T CD8	Vacinação de reforço curto prazo	Estágio clínico
	DNA	Ciclo único	Não	Não	6 kb	Alto	Alto	Alto	Sim	Fase I
Sarampo (paramixovírus)	-ssRNA	Replicativo	sim	Não	6 kb	Alto	N / D	N / D	Sim	Fase II
	DNA	Não replicativo	Não	Não	7,5 kb	Baixo / moderado	Baixo	Não	Sim	Fase III
	-ssRNA	Ciclo único	sim	Não	6 kb	Moderado / alto	Baixo / moderado	Baixo / moderado	Sim	Aprovado Ebola
	+ssRNA	Replicativo	sim	Não	2 kb	Moderado / alto	Moderado / alto	Moderado / alto	Sim	Aprovado Dengue e Encefalite japonesa
	DNA	Não replicativo	Não	Não	7,5 kb	Moderado	Alto	Alto	Sim	Aprovado Ebola, Covid-19

Fonte: Sasso et al. (2020, p. 20). <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

- ChAdOx1nCoV-19 ou Covishield, com base em um chimpanzé, desenvolvida pela universidade de Oxford/AstraZeneca e produzida pela AstraZeneca e pela Fiocruz;
- Ad26.COV2.S, desenvolvida pela Janssen (Johnson & Johnson), baseada no vetor Ad26 humano;
- Convidecia ou Ad5-nCoV, desenvolvida pela CanSino, baseada no vetor Ad5 humano;
- Sputnik V ou Gam-Covid-Vac, desenvolvida pelo instituto Gamaleya Research Institute, baseada em dois tipos de adenovírus humano Ad5 e Ad26, utilizando a estratégia *prime and boost* heterólogo.

O vírus da estomatite vesicular, ou VSV, pertence à família Rhabdoviridae e é um vírus de RNA de fita negativa de cadeia simples, caracterizado por uma forma de bala. O VSV comumente infecta bovinos, equinos, suínos e caprinos. Foi manipulado geneticamente para a obtenção de um vetor competente de replicação, usado para o desenvolvimento de uma vacina contra o ebola (rVSVG-ZEBOV), em que a glicoproteína do VSV foi substituída pela glicoproteína transmembrana do vírus Zaire ebola. O rVSVG-ZEBOV demonstrou ser imunogênico e induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes em modelos animais, bem como em humanos.

O vírus da febre amarela tem sido usado com segurança como vacina viva atenuada contra o vírus da febre amarela (17D) por muitos anos, produzindo anticorpos neutralizantes duradouros e respostas de células T após uma única vacinação, destacando seu potencial como vetor viral. A abordagem mais comum para usar o 17D como vetor é a criação de um vírus quimérico usando o genoma do 17D e inserindo as proteínas estruturais e do envelope de outros flavivírus (prM e E). ChimerVax-JE usa essa metodologia em uma vacina contra a encefalite japonesa, que induz uma resposta rápida e altamente imunogênica. Em 2015, a Sanofi Pasteur lançou a primeira vacina contra a dengue usando uma cepa vacinal (17D) do vírus da febre amarela como vetor viral, que foi registrada em vários dos países endêmicos do mundo, inclusive no Brasil. A vacina Dengvaxia é uma vacina tetravalente desenvolvida usando a tecnologia de DNA recombinante, em que foram substituídas as sequências genéticas dos genes *prM* e *E* do genoma do vírus da vacina da febre amarela cepa 17D pelas sequências homólogas dos quatro sorotipos do vírus da dengue, DENV-1-4. Em março de 2023, a Takeda obteve aprovação pela Anvisa da vacina Qdenga, que é uma vacina que também utiliza a tecnologia de DNA recombinante, em que uma cepa de DENV-2 atenuada geneticamente pela deleção de parte do seu genoma foi usada como vetor viral. A Takeda construiu três diferentes vírus recombinantes, nos quais os genes *prM* e *E* dos sorotipos 1, 3 e

4 foram substituídos na estrutura genética do DENV-2, compondo uma vacina tetravalente.

Os poxvírus são uma grande família de vírus complexos e envelopados, incluindo o vírus *Vaccinia* (VV) e o vírus *Variola*, o agente causador da varíola. Os poxvírus têm um genoma de DNA de fita dupla e são incomuns, pois podem se replicar no citoplasma. Uma vantagem de usar vetores poxvirais é sua capacidade de carregar genes heterólogos de cerca de 25 kb, o que não é possível usando outros vetores virais. O *modified vaccinia ankara* (MVA) foi licenciado pela Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – do inglês *Food and Drug Administration*) como uma vacina contra a varíola dos macacos e a varíola humana, mas também tem sido usado como vetor de vacina contra várias doenças infecciosas como HIV-1, tuberculose e malária. O MVA parece ser particularmente imunogênico quando usado como uma dose de reforço para uma vacina primária heteróloga. Uma dose de reforço de MVA recombinante, que expressa as glicoproteínas de cepas de ebola, foi usada para reforço após uma dose da vacina de Ad26.EBOV. Uma dose da vacina Ad26.EBOV, que carrega a glicoproteína da cepa Zaire de ebola, seguida por uma vacinação com o MVA, demonstrou fornecer 100% de proteção contra o ebola letal quando administrada em primatas não humanos.

O citomegalovírus (CMV) pertence à família de vírus Herpesviridae e é um β -herpes vírus onipresente com uma soroprevalência global de mais de 50%. O CMV é um patógeno oportunista que pode estabelecer latência ao longo da vida em pessoas infectadas após a infecção primária e, ocasionalmente, reativar. O CMV tem sido usado como vetor para o desenvolvimento de vacinas para diferentes alvos, e a eficácia dessas vacinas foi avaliada em modelos animais e estudos clínicos de fase 1 para HIV (CLINICALTRIALS, 2023).

O vírus da vacina contra o sarampo é um vírus atenuado que induz imunidade humoral e celular. Tem excelente perfil de segurança, é altamente eficaz e geneticamente estável e induz imunidade duradoura. Com base nessas características, o vírus vacinal do sarampo tem sido usado como vetor para desenvolver vacinas vivas recombinantes para chikungunya, febre do Nilo Ocidental, dengue, HIV, SARS, MERS, zika e febre de Lassa. A candidata a vacina baseada em vetor de sarampo mais avançada é uma vacina para chikungunya, que demonstrou ser segura e altamente imunogênica em ensaios de Fases I e II (LAUNAY et al., 2022).

4.2.5 Vacinas de ácidos nucleicos

As vacinas baseadas em ácido nucleico fazem uso de DNA ou mRNA e podem ser adaptadas rapidamente a

novos vírus, razão pela qual foram as primeiras vacinas Covid-19 a entrarem em testes clínicos. As vacinas de DNA consistem em uma construção de DNA sintético que codifica o antígeno da vacina. Para a absorção eficiente do construto nas células, a injeção deve ser seguida por eletroporação. Após a absorção nas células, o antígeno da vacina é expresso a partir da translocação nuclear da construção de DNA e transcrição em mRNA, usando a maquinaria celular. A plataforma de desenvolvimento de vacinas de DNA é considerada potente e promissora por ser célere e flexível para o desenvolvimento e a produção de vacinas. Durante o surto anterior de SARS e MERS, vacinas de DNA desenvolvidas para essas doenças induziram uma resposta imune, produzindo anticorpos neutralizantes documentados em ensaios clínicos. Atualmente, existe apenas uma vacina de DNA aprovada para Covid-19, ZyCoV-D, fabricada pela indiana Zydus Lifesciences.

As vacinas baseadas em mRNA, por sua vez, não precisam passar pela fase de translocação para o núcleo da célula, onde o mRNA é usado diretamente pela célula como molde para produção do antígeno vacinal. O desenvolvimento de vacinas de mRNA estava em curso há décadas, mas obstáculos como estabilidade térmica, estratégia de entrega do antígeno e questões acerca da segurança desse tipo de vacina foram respondidos recentemente. Nesse contexto, a pandemia do SARS-CoV-2, como agravo de saúde pública sem precedentes, criou uma oportunidade inesperada para que a tecnologia demonstrasse a sua promessa. Uma molécula transportadora é necessária para permitir a entrada do mRNA nas células; nanopartículas lipídicas são mais comumente usadas. A encapsulação do RNA em envoltório lipídico aumentou a sua estabilidade e garantiu a viabilidade da vacinação utilizando vacinas de RNA. As nanopartículas lipídicas, além de aumentarem a estabilidade da molécula, garantem a entrega do mRNA no citoplasma celular, culminando na expressão do antígeno de interesse. Apesar do avanço significativo alcançado em termos de estabilidade, essas vacinas exigem baixas temperaturas de armazenamento (-80°C a -20°C), o que restringe sua logística de distribuição em casos que demandam longos períodos de estocagem. As vacinas de mRNA contra Covid-19 mais bem-sucedidas até o momento (Pfizer e Moderna) também lançaram mão de modificações na sequência original de nucleosídeos (substituições por resíduos de pseudouridina). Isto para minimizar a ativação de respostas imunológicas inatas, reduzir a reatogenicidade da vacina, bem como para favorecer a expressão do antígeno de interesse. As vacinas baseadas em ácido nucleico induzem uma resposta imune humoral e celular; no entanto, múltiplas doses são necessárias.

As vacinas para Covid-19 aprovadas para uso na população são as da Pfizer/BioNTech (BNT162b2) e da Moderna (mRNA-1273), que foram implementadas em vários países, inclusive no Brasil (Pfizer) para adultos, adolescentes e crianças de 5 a 11 anos. Ainda existem outras vacinas em desenvolvimento clínico usando plataforma de mRNA, como, por exemplo, as vacinas da CureVac, Arcturus e HDT em colaboração com o Instituto SENAI, e a CIMATEC no Brasil. Mais detalhes sobre outras terapias baseadas em ácidos nucleicos serão apresentados no Capítulo 16.

4.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS E RECOMENDAÇÕES SOBRE VACINAS VIRAIS

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi um importante marco para o Brasil. O Ministério da Saúde (MS) determinou a criação do PNI com o intuito de prevenir doenças e proporcionar melhor qualidade de vida para a população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). São fornecidas vacinas para todas as faixas etárias. O Quadro 4.1 apresenta as vacinas virais fornecidas na atenção primária a toda a população brasileira.

Algumas vacinas são disponibilizadas em casos específicos e fornecidas por centros de referência de imunobiológicos especiais (CRIE). Os CRIE são centros constituídos de infraestrutura e logística específicas, destinados ao atendimento de indivíduos portadores de quadros clínicos especiais. Ofertam imunobiológicos para pessoas que apresentam contraindicação à utilização dos produtos disponíveis na rede pública de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a), como imunossuprimidos e indivíduos com reações alérgicas graves às vacinas do programa nacional de imunizações.

A inserção de um novo imunobiológico no programa nacional de imunizações e o estabelecimento de novos grupos populacionais são decisões respaldadas em bases técnicas e científicas, tais como: (i) evidência epidemiológica; (ii) eficácia e segurança da vacina; e (iii) garantia da sustentabilidade da estratégia, como, por exemplo, pela capacidade de produção dos laboratórios públicos nacionais e pela capacidade institucional de armazenamento e distribuição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A seguir, apresentam-se as principais doenças virais e a indicação de seus imunizantes. É importante ressaltar que nem todas as vacinas são disponibilizadas na atenção primária no Brasil.

4.3.1 Febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa grave e que apresenta alta taxa de letalidade e poder endêmico, em especial na América do Sul e na África (RODHAIN,

QUADRO 4.1 Exemplo de vacinas virais disponibilizadas no Brasil

Vacina viral	Vírus	Doença evitada
Febre amarela	Febre amarela (gênero <i>Flavivírus</i>)	Febre amarela
Influenza (gripe)	Influenza	Gripe
Varicela	Varicela-zóster (VZ)	Varicela
HPV quadrivalente	Papilomavírus humano	Câncer de colo uterino, câncer de pênis, câncer de ânus, papilomatose laríngea e verrugas genitais
Tríplice Viral – SCR	Sarampo (gênero <i>Morbillivírus</i>); caxumba (gênero <i>Paramyxovírus</i>); rubéola (gênero <i>Rubivírus</i>)	Sarampo, caxumba e rubéola
Hepatite A	Hepatite A (HAV)	Hepatite A
Hepatite B	Hepatite B (HBV)	Hepatite B
Raiva	Raiva (gênero <i>Lyssavírus</i>)	Raiva
Poliomielite oral (VOP)	Poliovírus	Poliomielite (paralisia infantil)
Poliomielite inativada (VIP)	Poliovírus	Poliomielite (paralisia infantil)
Rotavírus	Rotavírus	Gastroenterite por rotavírus
Covid-19	SARS-CoV-2	Covid-19

Fonte: elaborado pelos autores com base em Pollard e Bijker (2021).

2022). A febre amarela pode ser transmitida por mosquitos hematófagos da família *Culicidae*, tendo como principais transmissores em meio silvestre os artrópodes do gênero *Haemagogus* e, em meio urbano, o *Aedes aegypti* (OLIVEIRA et al., 2014). O vírus da febre amarela é um arbovírus, do gênero de RNA flavivírus, da família *Flaviviridae*. Esse vírus pode ser transmitido por meio da picada de um artrópode que tenha se infectado previamente por um indivíduo com a doença. Não há transmissão direta de pessoa a pessoa.

A doença se manifesta, na maioria das vezes, de maneira leve ou assintomática, mas pode causar quadros muito graves, podendo ser fatal. A forma grave apresenta lesão hepática importante, podendo chegar à insuficiência hepática e renal. Maior frequência masculina (80%), idade média de 50 anos e residência em zona rural são as principais características dos casos humanos (ESCOSTEGUY et al., 2019). Em 2020, 881 casos humanos suspeitos ocorreram em cidades do sul do Brasil, dos quais 18 homens não vacinados entre 18 e 59 anos foram confirmados como casos de febre amarela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Não há tratamento específico até o momento, sendo a recomendação em casos mais graves a internação em hospitais com suporte de terapia intensiva com suporte de diálise (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As vacinas de febre amarela atenuadas são consideradas altamente eficazes e apresentam imunidade duradoura, com poucos casos de falha vacinal descritos.

As vacinas disponíveis no nosso meio são as 17DD (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e 17D-204 (Sanofi Pasteur) (PETRAGLIA et al., 2020). No Brasil, a vacina da febre amarela é produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz. Desde 1937, as preparações vacinais são obtidas em seus laboratórios a partir da cepa atenuada 17DD do vírus da febre amarela, cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes patogênicos, de acordo com as normas estabelecidas pela OMS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O esquema vacinal no PNI recomenda a vacinação aos nove meses de vida e um reforço aos quatro anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). Para aqueles que fizeram sua primeira dose após os quatro anos de idade, não há recomendação de reforço, sendo indicada somente uma única dose. As crianças que receberem sua primeira dose aos quatro anos deverão respeitar o intervalo de trinta dias para a dose de reforço e aquelas que não fizerem o reforço com quatro anos podem fazê-lo a qualquer momento. Pessoas que não foram vacinadas devem receber uma dose.

A vacina da febre amarela é contraindicada para gestantes e nutrizes que estejam amamentando crianças menores de seis meses de vida. Para pessoas acima de 60 anos e imunossuprimidos, deve-se pesar o risco/benefício para a vacinação, uma vez que ocorreram relatos raros de eventos adversos graves após o uso da vacina (WHO, 2019). Os indivíduos com história de reação alérgica grave a ovo devem ser encaminhados

ao CRIE para avaliação e vacinação sob supervisão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A vacina da febre amarela não deve ser administrada, simultaneamente, com a vacina tríplice viral ou tetra viral em crianças menores de 2 anos, devendo ter um intervalo de 30 dias (mínimo de 15 dias). Se existir o risco epidemiológico concomitante para sarampo, caxumba ou rubéola e a febre amarela, o risco da não vacinação é maior que a possibilidade de diminuição da resposta imune pela vacinação concomitante.

4.3.2 Influenza

O vírus influenza causa uma infecção aguda respiratória denominada gripe, que tem alta transmissibilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Esse vírus causa epidemias anuais e pode ocasionar pandemias. As epidemias causam impacto econômico, em decorrência da abstenção escolar e trabalhista. A mortalidade por pneumonia ocorre nas populações com maior risco como idosos, desnutridos, portadores de comorbidades e pessoas com dificuldade de acesso a profissionais de saúde (CARVALHO et al., 2008).

O vírus influenza é da família Ortomixovírus, pleomórficos com genoma de RNA segmentado de fita simples e são subdivididos em A, B e C. O vírus C raramente causa doenças graves, enquanto o tipo B pode causar epidemias, mas não pandemias. Os tipos A e B têm frequentes mutações e são responsáveis por epidemias que, embora possam ocorrer em qualquer estação do ano, são mais frequentes no inverno.

A forma ideal para proteção é a vacinação contra o vírus que está circulando. O vírus tem capacidade de sofrer mudanças antigênicas nas suas duas glicoproteínas de superfície: (i) hemaglutinina (HA ou H) e (ii) neuraminidase (NA ou N), o que dificulta a formulação da vacina. Quando as variantes antigênicas são suprimidas, novas variantes se tornam predominantes, o que torna a população suscetível. Por esse motivo, é necessária uma vigilância constante e nova formulação da vacina anualmente (PLOTKIN et al., 2018). A gripe é responsável por 10 a 20% de todas as doenças respiratórias, com taxas de influenza A um pouco mais altas que as de influenza B. As taxas de infecção em crianças em idades pré-escolar e escolar são muito mais elevadas, principalmente em epidemias pela influenza B (MONTTO; KIOUMEHR, 1975).

A transmissão ocorre de pessoa para pessoa, principalmente por meio de tosse ou espirro de uma pessoa infectada. Pode ser transmitido também a partir de objetos contaminados quando em contato com as mucosas (boca, olho ou nariz). O período de incubação é de um

a quatro dias, com média de dois dias. O período de transmissão depende da característica do doente, isto é, na sua maioria ocorre a partir de um dia antes do início dos sintomas; porém, crianças muito pequenas podem transmitir até seis dias antes e nos imunocomprometidos o período é capaz de se estender por semanas (PLOTKIN et al., 2018). A excreção viral é maior nos primeiros três dias após o início dos sintomas, o que coincide com a piora clínica.

A gripe geralmente se resolve em alguns dias, mas a tosse e o mal-estar podem permanecer por mais de duas semanas. A gripe pode exacerbar doenças preexistentes ou ocasionar uma coinfeção com outros patógenos virais ou bacterianos. A vacina oferecida pelo PNI é trivalente, produzida em ovos embrionados de galinha, purificada, inativada e ajustada à concentração internacionalmente determinada em normas de produção.

Em 1999, o PNI iniciou a campanha de vacinação contra gripe para pessoas com mais de 65 anos, por ser essa faixa etária a que tinha o maior volume de casos graves com interações causadas pelo vírus influenza. Paulatinamente, o PNI tem ampliado o acesso para outros grupos populacionais e hoje é fornecido para:

- Indivíduos com 55 anos ou mais;
- Crianças de 6 meses a 5 anos de idade (5 anos, 11 meses e 29 dias);
- Gestantes, puérperas (até 45 dias após o parto);
- Trabalhadores da saúde, professores das escolas públicas e privadas;
- Povos indígenas, grupos portadores de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições clínicas especiais;
- Adolescentes e jovens de 12 a 21 anos sob medidas socioeducativas;
- População privada de liberdade;
- Funcionários do sistema prisional e forças de segurança e salvamento.

Os portadores de doenças crônicas podem ser vacinados nas Unidades Básicas de Saúde ou nos CRIE, mediante encaminhamento médico. Adicionalmente, comunicantes domiciliares de imunodeprimidos também podem ser encaminhados ao CRIE para vacinação contra influenza (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b).

O esquema vacinal no ano de 2022 foi compilado no Quadro 4.2, retirado do plano de operações da 24ª Campanha Nacional de Vacinação contra Influenza (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022c). Em 2022, a vacina contra influenza foi oferecida para toda a população, independentemente de ser do grupo prioritário.

A vacina influenza (inativada) contém antígenos de superfície hemaglutinina e neuraminidase; 0,5 mL da

QUADRO 4.2 Esquema vacinal

Idade	Quantidade de doses	Intervalo	Volume por dose
De 6 meses a 2 anos (primovacinadas)	2 doses	Intervalo de 30 dias após D1	0,25 mL
De 6 meses a 2 anos (que receberam pelo menos 1 dose nas campanhas anteriores)	Dose única	-	0,25 mL
Crianças de 3 a 8 anos (primovacinadas)	2 doses	Intervalo de 30 dias após D1	0,5 mL
Crianças de 3 a 8 anos (que receberam pelo menos 1 dose nas campanhas anteriores)	Dose única	-	0,5 mL
A partir de 9 anos	Dose única	-	0,5 mL

Fonte: Ministério da Saúde (2022e).

vacina por injeção contém 15 microgramas do antígeno hemaglutinina de cada cepa de vírus recomendada pela OMS para cada temporada. A vacina é formulada todos os anos com informações das vigilâncias sentinelas. A imunidade é geralmente obtida em 2 a 3 semanas.

A OMS organiza informações geradas pelo sistema global de vigilância e resposta à gripe por meio de um grupo consultivo de especialistas, que faz a recomendação da composição viral das vacinas contra influenza dos hemisférios norte e sul da próxima temporada (WHO, 2022a). Para que as vacinas sejam eficazes é necessária essa atualização periódica.

A duração da imunidade pós-vacinação gira em torno de seis a 12 meses (ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL LTDA, 2013). A Sociedade Brasileira de Imunologia recomenda a vacinação para todas as crianças a partir dos seis meses de vida, sendo que as menores de 9 anos na primeira vacinação devem receber duas doses com intervalo de 30 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). Em imunodeprimidos e naqueles em situação epidemiológica de risco, pode ser considerada uma segunda dose, a partir de três meses após a dose anual. Se disponível e com composição concordante com os vírus circulantes, a vacina utilizada na última temporada no hemisfério norte poderá ser recomendada aos viajantes internacionais e brasileiros residentes nos estados do Norte do país, no período pré-estacional de influenza.

4.3.3 Varicela

A varicela, também conhecida como catapora, é uma infecção viral, causada pelo vírus DNA varicela-zóster (VZV). É uma doença febril, aguda, altamente contagiosa, caracterizada por surgimento de exantema de aspecto maculopapular e distribuição centrípeta, que, após algumas horas, torna-se vesicular, evolui rapidamente para pústulas e, posteriormente, forma crostas

secas não infecciosas, em três a sete dias. Em crianças, comumente é benigna e autolimitada. Em adolescentes e adultos, em geral, o quadro clínico é mais exuberante. O único reservatório é o ser humano, e a transmissão é interpessoal, por meio de contato direto ou de secreções respiratórias (disseminação aérea de partículas virais/aerossóis) e, raramente, pelo contato com lesões de pele (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

A vacina para varicela é recomendada pelo PNI com duas doses. A primeira, aos 15 meses, administrada por meio da vacina tetraviral (sarampo, caxumba, rubéola e varicela). A segunda, aos quatro anos, administrada por meio de vacina monovalente, isto é, somente a vacina de varicela. A vacina é de vírus vivo atenuado.

No CRIE, a vacina contra varicela está disponível para indivíduos suscetíveis imunocompetentes de qualquer idade nas seguintes situações: (i) pessoas com convívio domiciliar (familiares, cuidadores) ou hospitalar (profissionais de saúde) com pacientes imunodeprimidos; (ii) candidatos a transplante de órgãos sólidos (até pelo menos quatro semanas antes do transplante); (iii) doadores de órgãos e de células-tronco hematopoiéticas; (iv) nefropatia crônica; (v) pacientes com doenças dermatológicas graves; (vi) asplenia anatômica ou funcional; e (vii) trissomias. Nos indivíduos com condições potencialmente imunossupressoras, como aqueles vivendo com HIV e deficiência isolada de imunidade humoral, a indicação de vacinar deve ser individualizada. Indivíduos com imunossupressão grave não podem ser vacinados. No pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas (TMO), a vacina apenas pode ser administrada após a recuperação do sistema imunológico e, geralmente, é administrada dois anos após o transplante, sendo contraindicada quando houver doença enxerto *versus* hospedeiro. Para as indicações previstas no CRIE, o esquema vacinal é de duas doses, com intervalo de quatro a oito semanas entre elas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

4.3.4 Sarampo

O sarampo é uma doença viral, infecciosa aguda, potencialmente grave, transmissível e extremamente contagiosa. O agente etiológico é um vírus RNA, com um sorotipo (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). O único reservatório é o ser humano.

O modo de transmissão ocorre diretamente, por meio de secreções nasofaríngeas expelidas ao tossir, espirrar, falar ou respirar. Por isso, a elevada contagiosidade da doença. Também tem sido descrito o contágio por dispersão de aerossóis com partículas virais no ar, em ambientes fechados, como escolas, creches e clínicas. Pela alta contagiosidade, até nove em cada dez pessoas suscetíveis com contato próximo a uma pessoa com sarampo desenvolverão a doença (GREKOUSIS; LIU, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). O quadro clínico caracteriza-se por febre alta, acima de 38,5°C, exantema maculopapular morbiliforme de direção cefalocaudal, tosse seca (inicialmente), coriza, conjuntivite não purulenta e manchas de Koplik (pequenos pontos brancos na mucosa bucal, na altura do terceiro molar, e ocasionalmente no palato mole, conjuntiva e mucosa vaginal, antecedendo o exantema) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

A vacina para sarampo pode ser administrada nas combinações sarampo e rubéola (dupla viral), sarampo, rubéola e caxumba (tríplice viral), e sarampo, rubéola, caxumba e varicela (tetraviral). Mais à frente, as combinações tríplice viral e tetraviral serão abordadas.

4.3.5 Caxumba

A caxumba é uma doença viral aguda, causada pelo vírus da caxumba, caracterizada por febre, dor, sensibilidade e aumento de volume de uma ou mais glândulas salivares, com predileção pelas parótidas (bochecha e área da mandíbula) e, às vezes, pelas sublinguais ou submandibulares. A caxumba foi uma doença muito comum na infância, mas com a implementação da vacinação generalizada, a incidência diminuiu substancialmente. O único reservatório é o ser humano. A doença é transmitida de pessoa para pessoa, por meio do contato direto com a saliva ou gotículas respiratórias de um indivíduo infectado com caxumba. O quadro clínico caracteriza-se por sintomas muito leves (como um resfriado), ou nenhum sintoma, e algumas pessoas podem não saber que têm a doença. A evolução é benigna e, em casos raros, a caxumba pode ser grave, chegando a determinar hospitalização do doente.

4.3.6 Rubéola

A rubéola é uma doença exantemática aguda, causada pelo vírus da rubéola, que apresenta alta contagiosidade. Sua importância epidemiológica está relacionada ao risco de abortos, natimortos e à síndrome da rubéola congênita (SRC), caracterizada por surdez, catarata, defeitos cardíacos, dificuldades intelectuais, atraso no desenvolvimento, danos no fígado e no baço, baixo peso e erupção cutânea ao nascer. O único reservatório é o ser humano. A transmissão ocorre por meio de contato com secreções nasofaríngeas de pessoas infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

4.3.7 Vacina para sarampo, caxumba e rubéola

As vacinas para sarampo, caxumba e rubéola administrada atualmente na rotina do PNI são a tríplice viral, administrada aos doze meses, e a tetraviral (sarampo, caxumba, rubéola e varicela), aos 15 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022e). As duas vacinas são de vírus vivo atenuado. Eventualmente, em campanhas de vacinação para sarampo e/ou rubéola, pode ser usada a vacina dupla viral. Em estudos clínicos, a vacina para sarampo, caxumba e rubéola (atenuada) demonstrou ser altamente imunogênica. As proporções de anticorpos detectados nos indivíduos vacinados, anteriormente soronegativos, foram de 98% contra sarampo, de 96,1% contra caxumba e de 99,3% contra rubéola (FIOCRUZ, 2022). Indivíduos acompanhados por até doze meses após a vacinação permaneceram todos soropositivos para rubéola e sarampo e 88,4% persistiram soropositivos para caxumba. Essa porcentagem está de acordo com o que foi observado com a vacina de referência contra sarampo, rubéola e caxumba. Crianças menores de dois anos não devem receber no mesmo dia as vacinas de tríplice viral (contra sarampo, caxumba e rubéola) e de febre amarela, pois alguns estudos indicam interferência na resposta imunológica dos componentes caxumba, rubéola e febre amarela (NASCIMENTO SILVA et al., 2011).

No CRIE, a vacina tríplice viral não tem nenhuma indicação adicional à da rotina e está disponível apenas para as situações em que haja necessidade de vacinar sob observação, em casos de pacientes com história de alergia grave à vacina ou a algum de seus componentes. Também poderá ser aplicada, nas indicações de rotina, quando o paciente receber outras vacinas especiais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b).

4.3.8 Hepatite A

Causada por um vírus hepatotrópico pertencente à família Picornaviridae, a Hepatite A tem o ser humano como o reservatório de maior importância epidemiológica. Por ter a via fecal-oral como meio de transmissão, está relacionada às más condições de saneamento básico, qualidade da água e dos alimentos, higiene pessoal e à relação sexual desprotegida quando há o contato oroanal. O seu período de transmissibilidade, de duas semanas antes do início dos sintomas até o final da segunda semana da doença, a faz um agravo relevante em Saúde Pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

O curso da infecção pelo HAV varia de acordo com a idade. Na sua maioria, a doença transcorre com apresentação leve, inclusive na forma assintomática ou inespecífica, com recuperação completa, como é mais comum nas crianças pequenas, mas pode causar sintomas debilitantes e, raramente, evoluir para a forma grave com insuficiência hepática aguda fatal (hepatite fulminante). Esse risco aumenta com a idade (WHO, 2022b).

A hepatite A não causa doença hepática crônica e os pacientes que se recuperam apresentam imunidade permanente (JACOBSEN, 2009). A vacinação, apesar de ser a melhor e principal forma de prevenção, não é a única. O saneamento, as boas condições habitacionais e a higiene pessoal adequada constituem fatores imprescindíveis que também favorecem a prevenção da transmissão do vírus da hepatite A.

A vacina de hepatite A inativada (HA) é altamente eficaz e de baixa reatogenicidade, com taxas de soroconversão de 94 a 100%. A proteção é de longa duração. Está disponível, em vários países, em programas nacionais de imunização infantil de rotina. No Brasil, ela faz parte do calendário básico do PNI desde 2014, e o esquema preconizado é de uma dose aos quinze meses de idade, podendo ser aplicada até 4 anos, 11 meses e 29 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022d).

Adicionalmente, a vacina contra hepatite A está disponível nos CRIE para pessoas suscetíveis de qualquer idade nas seguintes indicações: (i) hepatopatias crônicas; (ii) coagulopatias; (iii) hemoglobinopatias; (iv) asplenia anatômica ou funcional; (v) imunossuprimidos; (vi) doenças de depósito; (vii) fibrose cística; (viii) trissomias; (ix) pré ou pós-transplante de órgãos sólidos; (x) transplantados de células-tronco hematopoiéticas; e (xi) doadores de órgão sólido ou de células-tronco hematopoiéticas (medula óssea), cadastrados em programas de transplantes. Para essas indicações, o esquema recomendado é de duas doses com intervalo mínimo de seis meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b).

Segura e eficaz, a vacina da hepatite A não está indicada para pessoas que tiveram reação anafilática a algum

componente da vacina ou à dose anterior e encontra-se também acessível na rede privada para as demais faixas etárias não contempladas no PNI, como crianças a partir de cinco anos até a idade adulta, em duas doses com intervalo ideal de, no mínimo, seis meses.

4.3.9 Hepatite B

Com características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais distintas da hepatite A, o vírus da hepatite B pertence à família Hepadnaviridae. Em decorrência de sua alta especificidade, infecta somente o ser humano, que constitui o seu reservatório natural.

A hepatite B pode ser transmitida pelas vias sanguínea (parenteral, percutânea e vertical) e sexual (esperma e secreção vaginal). Na via sanguínea, há uma diversidade de meios de transmissão pelo compartilhamento de objetos contaminados. Esses objetos podem ser: lâminas de barbear e de depilar, escovas de dentes, alicates e acessórios de manicure e pedicure, materiais para colocação de *piercing* e para confecção de tatuagens, materiais para escarificação da pele para rituais, instrumentos para uso de substâncias injetáveis, inaláveis (cocaína) e pipadas (*crack*).

Existe a viabilidade de ocorrência da transmissão por acidentes com exposição a material biológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a), bem como em procedimentos cirúrgicos e odontológicos, hemodiálise, transfusão de hemoderivados, endoscopia, entre outros, quando as normas de biossegurança não são aplicadas. Dentre as possibilidades de transmissão, uma das mais importantes é a que ocorre de mãe para filho durante o trabalho de parto, chamada de transmissão vertical, devido ao alto risco de cronificação para o recém-nascido.

O período de incubação pode variar entre 30 e 180 dias (média de 60 a 90 dias) e o de transmissibilidade, de duas a três semanas antes dos primeiros sintomas até o período enquanto o antígeno estiver detectável. O portador crônico pode transmitir o HBV durante vários anos ou pelo resto da vida (SAÚDE EM MOVIMENTO, 2002).

Quanto à sintomatologia e evolução, o indivíduo pode desenvolver hepatite aguda assintomática, oligossintomática ou sintomática; hepatite crônica ou hepatite fulminante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). O risco de cronificação pelo HBV depende da idade na qual ocorre a infecção, sendo de 90% para os recém-nascidos (RN) de mães positivas, de 25 a 30% para lactentes a menores de 5 anos, até menos de 5% em adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). A OMS estima que 257 milhões de pessoas vivem com infecção crônica pelo HBV em todo o mundo e a cada ano essa infecção crônica causa cerca de 900 mil mortes, a maioria por complicações como cirrose e câncer de fígado (OPAS, 2022a).

Em todo o mundo, uma vez que as vias mais comuns de transmissão da hepatite B são a vertical e a horizontal da primeira infância, a prevenção dessas infecções é a estratégia mais importante para controlar a epidemia de HBV (OPAS, 2022a). Essa prevenção é de suma importância, pois quando a infecção aguda pelo HBV ocorre no primeiro trimestre da gestação, o risco de transmissão da infecção ao RN é pequeno, menor que 10%; porém, quando a infecção ocorre no segundo ou terceiro trimestres da gestação, o risco de transmissão se eleva a níveis superiores a 60% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022f).

A prevenção pode ocorrer pela vacinação contra hepatite B, que foi iniciada em alguns países em 1986 e no Brasil a partir de 1989, durante realização de campanha na área endêmica da Amazônia ocidental, seguindo-se, progressivamente, a oferta às demais áreas de acordo com as indicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Grandes avanços na resposta global à infecção pelo HBV foram feitos pela expansão dessa vacinação de rotina, que no Brasil tem como esquema preconizado uma dose inicial nos recém-nascidos nas primeiras 12 a 24 horas, ainda na maternidade, até 30 dias de vida, seguida de outras três doses aos dois, quatro e seis meses de idade e que ocorrem por meio da vacina pentavalente (difteria, tétano, pertussis, hepatite B e *Haemophilus influenzae* b). Em caso de atraso, ele pode ser iniciado ou complementado até 6 anos, 11 meses e 29 dias. A partir de sete anos, para os que não foram contemplados com esse esquema de vacinação de rotina, está indicado o esquema de três doses, com intervalo de 30 dias entre a primeira e a segunda doses e de seis meses entre a primeira e a terceira doses (0, 1 e 6 meses) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Para os recém-nascidos de mães portadoras da hepatite B, deve ser administrada, além da vacina, a imunoglobulina humana anti-hepatite B (IGHAHB), preferencialmente nas primeiras doze horas, podendo ser administrada no máximo até sete dias de vida, uma vez que ela consegue prevenir a transmissão perinatal em mais de 90% dos recém-nascidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A IGHAHB também é indicada para pessoas não vacinadas, ou com esquema incompleto, após exposição ao vírus da hepatite B (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

Em 2019, a cobertura de três doses da vacina atingiu 85% em todo o mundo, em comparação com cerca de 30% em 2000. No entanto, a cobertura da dose de nascimento da vacina contra hepatite B permanece irregular quando comparada entre os diferentes continentes. Mesmo assim, de acordo com estimativas mais recentes da OMS, a proporção de crianças menores de cinco anos

infectadas cronicamente com HBV caiu para pouco menos de 1% em 2019, abaixo dos cerca de 5% na era pré-vacina (período entre os anos 1980 e início dos anos 2000) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A vacina contra hepatite B está universalmente indicada para todas as idades, independente de comorbidades. Entretanto, deve-se atentar que para os pacientes renais crônicos (mesmo que em tratamento conservador), imunodeficientes e imunossuprimidos, o esquema recomendado deve ser de quatro doses com o dobro da dose para a idade, com os seguintes intervalos entre as doses: 0, 1, 2 e 6 a 12 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019c).

Está disponível na rede pública, bem como na privada, em apresentação monovalente ou com múltiplos outros antígenos. É altamente segura e imunogênica e seu esquema preconizado de três doses poderá gerar proteção duradoura, possivelmente por toda a vida.

Pode-se dizer que um dos maiores avanços da atualidade no campo da imunização é a vacina contra hepatite B, pois observa-se um decréscimo relevante na incidência dessa infecção nos diversos países que implantaram o esquema de rotina em seus programas. Foi a primeira vacina capaz de prevenir um tipo de câncer, o hepatocarcinoma. Sua incidência em crianças reduziu de 0,52 por 100 mil para 0,13 por 100 mil (CHANG et al., 1997; MARIA LUCIA GOMES FERRAZ, 2007).

4.3.10 Poliomielite

A poliomielite, também conhecida como paralisia infantil, é causada pelo poliovírus, sorotipos imunologicamente distintos 1, 2 e 3, pertencente ao gênero *Enterovirus*, da família Picornaviridae e tem o ser humano como seu reservatório, em especial as crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). A transmissão ocorre por contato direto pessoa a pessoa, pela via fecal-oral (por meio de objetos, alimentos e água contaminados com fezes de doentes ou portadores) ou pela via oral-oral (por gotículas de secreções da orofaringe). Esses meios de transmissão têm como fatores facilitadores a falta de saneamento, as más condições habitacionais e a higiene pessoal precária (FOCACCIA; VERONESI, 2005).

O período de incubação é, geralmente, de 7 a 12 dias, podendo variar de 2 a 30 dias, mas o período de transmissibilidade não é conhecido com precisão, sendo capaz de iniciar antes do aparecimento das manifestações clínicas. Na orofaringe, o vírus é encontrado nas secreções após 36 a 72 horas a partir da instalação da infecção e sua eliminação pode persistir por um período de aproximadamente uma semana. A eliminação pelas fezes pode ocorrer por volta de três a seis semanas, enquanto nos indivíduos reinfectados ocorre em menor

quantidade e por períodos mais reduzidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). O vírus é eliminado nas fezes do indivíduo infectado sintomático, bem como do assintomático, e neste com maior frequência.

Consiste em uma doença altamente contagiosa e pode se apresentar sob diversas formas clínicas: (i) inaparente ou assintomática, que ocorre em mais de 90% das infecções; (ii) abortiva, que ocorre em aproximadamente 5% dos casos e caracteriza-se por sintomas inespecíficos como febre, cefaleia, tosse, coriza e manifestações gastrointestinais; (iii) meningite asséptica, que, no início, apresenta-se com as mesmas características da forma abortiva e, posteriormente, surgem sinais de irritação meníngea e rigidez de nuca; e (iv) paralítica, que acomete em torno de 1 a 1,6% dos casos e suas características clínicas típicas permitem sugerir o diagnóstico de poliomielite.

Na poliomielite paralítica, observa-se febre associada a um súbito início de déficit motor assimétrico, com maior frequência em membros inferiores e características de flacidez muscular, com sensibilidade preservada e hipo ou arreflexia no segmento afetado. Em alguns casos, pode ocorrer um quadro de paralisia grave e levar à morte (FOCACCIA; VERONESI, 2005) ou à persistência de alguma paralisia residual (sequela) após 60 dias do início da doença.

Outro quadro que pode ser encontrado é a síndrome pós-poliomielite (SPP), na qual 15 a 40 anos após a recuperação de uma infecção inicial pelo poliovírus, cerca de 25 a 40% dos pacientes sobreviventes apresentam fraqueza e atrofia muscular, cansaço (mental e físico) e dores nas articulações. Esse quadro raramente representa risco de morte para o paciente, mas os sintomas podem prejudicar a independência e a qualidade de vida. Ao contrário do que acontece na fase aguda da doença, a pessoa com SPP não transmite a pólio (SBIM, 2022a).

Dos três sorotipos do poliovírus selvagem, apenas o 1 mantém sua circulação. O poliovírus tipo 2 teve seu último caso notificado em 1999 e foi declarado erradicado em 2015. O tipo 3 teve sua última notificação em 2012 e foi declarado erradicado em 2019. No Brasil, o último caso foi notificado em 1989, recebendo o certificado livre da Pólio em 1994 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022g).

Pode-se dizer que esse avanço se deve à realização das campanhas de vacinação, mas ainda há um sério risco de retorno em países onde foi eliminado. Isto porque a poliomielite ainda é endêmica no Paquistão e no Afeganistão e as coberturas vacinais vêm apresentando uma expressiva queda anual (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022g). Lamentavelmente foi o que ocorreu no Malawi, em fevereiro de 2022, quando foi declarado um surto pelas autoridades de saúde, uma vez que foi detectado

um caso de poliovírus selvagem tipo 1 em sua capital, cuja cepa é a mesma em circulação no Paquistão.

Vale ressaltar a importância da vigilância das paralisias agudas flácidas (PAF) (em conformidade com as metas estabelecidas pela OPAS/OMS), sendo possível a detecção rápida de um vírus importado. Para isso, todo caso de PAF em menores de quinze anos ou suspeita de poliomielite em indivíduo de qualquer idade procedente de países com circulação de poliovírus selvagem, nos últimos 30 dias, deve ser obrigatoriamente notificado e investigado imediatamente e ter o diagnóstico esclarecido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Uma vez que a poliomielite não tem tratamento específico, são indispensáveis o saneamento básico e, principalmente, a vacinação de rotina em conjunto com períodos de campanha. No Brasil, as vacinas disponíveis atualmente no calendário básico do PNI são: (i) a VOPb (vacina pólio oral atenuada bivalente); e a (ii) VIP (vacina pólio inativada) na apresentação injetável e que contempla os três sorotipos.

Inicialmente, desde a década de 1970, a VOP utilizada era a trivalente (VOPt), a qual continha os três tipos de poliovírus (1, 2 e 3). Apesar das vantagens, como por exemplo a indução da imunidade humoral, da imunidade celular de mucosa e da imunidade em contatos de indivíduos vacinados, alguns eventos indesejáveis e raros podem ocorrer associados ao seu uso, por conter vírus vivos atenuados. Esses eventos podem ser: (i) casos de paralisia associada à vacina (VAPP) e (ii) o surgimento do poliovírus derivado da vacina (VPDV). Devido à declaração de erradicação do poliovírus 2 em 2015, a partir de 2016 todos os países que usavam a vacina oral atenuada, incluindo o Brasil, simultaneamente substituíram a VOPt pela vacina VOPb (1 e 3) em seus calendários vacinais. Essa mudança também melhorou a imunogenicidade da vacina oral atenuada, pois o tipo 2 interfere na resposta imune dos poliovírus tipos 1 e 3 (ANVISA, 2014, 2021a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Assim como a VOP teve alteração na sua formulação, a VIP também sofreu uma melhoria com o aumento de sua potência em relação à versão anterior. É eficaz e segura e não provoca poliomielite vacinal. Por estimular baixa imunidade intestinal (imunidade de mucosa), não impede a circulação do vírus selvagem por via intestinal, não protegendo os comunicantes dos vacinados, por isso a necessidade de ainda se manter o uso da VOPb.

No esquema básico, preconizado pelo PNI, a VIP deve ser aplicada aos 2, 4 e 6 meses de idade e a VOP como reforço aos 15 meses e aos 4 anos, mas, como todas as decisões do MS, considerando os critérios epidemiológicos, as evidências relacionadas à vacina e as recomendações internacionais, o esquema básico

será atualizado. Haverá a substituição gradual das duas doses de reforço com a VOP por apenas uma dose da VIP, aos 15 meses. O novo esquema vacinal com quatro doses da vacina, de apresentação injetável, garantirá a proteção contra a pólio. Ambas são altamente imunogênicas e eficazes na prevenção da poliomielite. Após as três doses da VIP ocorre uma soroconversão de 99 a 100% (ANVISA, 2021b). A VOP é responsável pela imunização coletiva. Ambas conferem imunidade protetora por toda a vida.

A vacina VOPb está contraindicada em pessoas com imunodeficiência humoral ou mediada por células, neoplasias, uso de terapia imunossupressora; comunicantes de pessoas com imunodeficiência humoral ou mediada por células, neoplasias, uso de terapia imunossupressora; pessoas vivendo com HIV e seus comunicantes; história de alergia tipo anafilática a antibióticos contidos na vacina (neomicina, polimixina e estreptomicina); história de pólio vacinal associada à dose anterior e gestantes. Não está disponível no CRIE, apenas nas Unidades Básicas de Saúde e na rede privada.

A VIP tem como contraindicações apenas reação grave à dose anterior ou anafilaxia a algum componente da vacina. No CRIE, a VIP está disponível para crianças com imunodepressão ou imunossuprimidas, crianças que estejam em contato domiciliar ou hospitalar com pessoa imunodeprimida e crianças com história de paralisia flácida associada à VOP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019c). Nessas indicações, as crianças devem receber a VIP durante todo o esquema e reforços. A vacina está indicada em indivíduos de qualquer idade transplantados de órgãos sólidos ou de células-tronco hematopoiéticas (TMO). Crianças e adultos que se deslocarão para área de circulação do vírus selvagem da poliomielite ou poliovírus derivado vacinal devem fazer reforço antes de viajar com a vacina inativada (VIP) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019c).

4.3.11 Papilomavírus humano

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus que causa infecção epitelial ou nas mucosas e pode ser responsável por cânceres anogenitais. O agente etiológico é um vírus DNA de fita dupla, pertencente à família *Papillomaviridae*.

O HPV é diagnosticado em mais de 90% dos tipos de lesões oncogênicas cervicais e o quarto mais mortal em mulheres. São divididos em duas categorias: (i) HPVs de baixo risco responsáveis por verrugas anogenitais e cutâneas; e (ii) HPVs de alto risco responsáveis por infecções orofaríngeas e vários tipos de lesões oncogênicas anogenitais. Entrando em contato com o HPV, podemos ter as formas latente (DNA do vírus é detectado),

subclínica (alteração histológica) ou clínica (presença de verrugas) (FEBRASGO, 2017).

O HPV deve ser uma das doenças com preocupação em saúde pública em decorrência de sua prevalência ser duas vezes maior na América Latina quando comparado com o restante do mundo (DE OLIVEIRA et al., 2022; NOGUEIRA-RODRIGUES, 2019). Estima-se que, no Brasil, haja de 9 a 10 milhões de infectados pelo HPV, e que a cada ano 700 mil novos casos de infecção surjam. Cerca de 105 milhões de pessoas são positivas para o HPV 16 ou 18 no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022h).

A infecção genital é transmitida por via sexual, sendo assintomática na maioria das pessoas infectadas. Em alguns pacientes fica latente de meses a anos, apresentando sinais subclínicos ou sem apresentar sinais. A maioria dos casos tem resolução espontânea em aproximadamente 24 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022i). O período de incubação para o aparecimento das lesões é de 2 a 8 meses, podendo demorar até 20 anos em gestantes e imunocomprometidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022h). O longo intervalo entre a infecção e o câncer sugere que a infecção viral é necessária, mas não é suficiente. São necessários também fatores genéticos e ambientais, ainda não bem esclarecidos (PLOTKIN et al., 2018). A infecção pelo HPV tem relação direta com carcinoma de colo do útero e lesões de alto grau de displasia, sendo necessário um conjunto de determinantes genéticos e ambientais ainda não bem esclarecidos (PLOTKIN et al., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022i). Os papilomavírus são encontrados em muitas espécies de vertebrados e são altamente específicos para cada espécie (PLOTKIN et al., 2018). Nos humanos, existem doze tipos de HPV que são classificados como alto risco para câncer (HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) e oito como provável (HPV68) ou possivelmente oncogênicos (HPV: 26, 53, 66, 67, 70, 73 e 82). Os sorotipos 16 e 18 são os mais prevalentes em tumores cervicais em todo o mundo, sendo identificados em 60 a 80% dos casos. Ocorre diferenciação da prevalência dos outros sorotipos em diferentes regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022h).

A vacinação profilática é considerada uma das principais estratégias para diminuir a incidência da infecção e do câncer associado ao HPV, sendo a vacina atualmente aplicada composta por VLP, a qual é uma partícula que imita as partículas virais do HPV (WHO, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022h). No programa nacional de imunizações, a vacina quadrivalente confere proteção para os sorotipos HPV 6, 11, 16 e 18. Essa vacina foi incorporada no Sistema Único de Saúde escalonadamente a partir de 2014. Demonstrou eficácia para prevenção do HPV de cerca de 98% (WHO, 2020). Mais de 100 países utilizam a vacina para adolescentes e possuem

estudos com prevenção e redução das doenças ocasionadas pelo HPV, como câncer de colo do útero, vulva, vagina, região anal, pênis e orofaringe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022h). No programa nacional de imunizações, a vacina é aplicada em meninas e meninos de 9 a 14 anos com esquema de duas doses com intervalo de 6 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022i).

No CRIE, a vacina HPV quadrivalente está disponível para indivíduos imunodeficientes ou em uso de imunossuppressores não vacinados previamente, na faixa etária de 9 a 26 anos, em esquema de três doses, 0, 2 e 6 meses. Exclusivamente, para indivíduos com as seguintes condições: vivendo com HIV/AIDS, transplantados de órgãos sólidos ou medula óssea e pacientes oncológicos, a faixa etária para vacinação foi expandida até 45 anos para homens e mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022j).

4.3.12 Herpes-zóster

O herpes-zóster decorre da reativação do vírus da varicela, que permanece em latência no sistema nervoso após a infecção primária. A reativação ocorre na idade adulta, sendo mais comum em pessoas imunocomprometidas. É caracterizado por manifestações cutâneas dolorosas, com possibilidade de dor neuropática associada e neuralgia pós-herpética, quadro clínico que nos idosos pode resultar em redução de qualidade de vida e perda de autonomia. O quadro clínico manifesta-se desde a forma benigna até formas graves. O agente etiológico é o mesmo da varicela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

A vacina para herpes-zóster não está disponível no calendário de imunização do PNI e não está disponível no CRIE. Existem duas vacinas para herpes-zóster disponíveis nas clínicas privadas de vacinação, uma de vírus vivo atenuado, uma dose a partir de 60 anos, e uma vacina recombinante, de subunidade combinada com o adjuvante AS01, duas doses, a partir de 50 anos, podendo ser administrada em imunocomprometidos (SBIM, 2022b).

4.3.13 COVID-19

A Covid-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 e tem como principais sintomas febre, cansaço e tosse seca. Outros sintomas menos comuns e que podem afetar algumas pessoas são: (i) perda de paladar ou olfato; (ii) congestão nasal; (iii) conjuntivite; (iv) dor de garganta; (v) dor de cabeça; (vi) dores nos músculos ou juntas; (vii) diferentes tipos de erupção cutânea; (viii) náusea ou vômito; (ix) diarreia; (x) calafrios ou tonturas (OPAS, 2022b).

O vírus pode se propagar de pessoa para pessoa por meio de gotículas do nariz ou da boca que se espalham

quando alguém doente tosse ou espirra. A maioria dessas gotículas cai em superfícies e objetos próximos, como mesas ou telefones. As pessoas também podem se contaminar ao respirarem gotículas provenientes da tosse ou espirro de uma pessoa doente (ANVISA, 2022a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022k). As vacinas para Covid-19 que estiveram disponíveis no PNI durante o período de pandemia declarado pela OMS são:

- **Comirnaty (Pfizer/Wyeth) (PFIZER, 2022):** pode ser administrada a partir de seis meses de idade. O esquema primário é composto por três doses de seis meses a cinco anos, e depois por duas doses;
- **Coronovac (Butantan) (ANVISA, 2022a):** pode ser administrada em crianças a partir de três anos, duas doses, com intervalo de quatro semanas, adultos e idosos, intervalo de duas a quatro semanas;
- **Janssen (Janssen-Cilag) (ANVISA, 2022b):** pode ser administrada a partir de 18 anos, em dose única;
- **Oxford/Covishield (Fiocruz e Astrazeneca) (ANVISA, 2022c):** pode ser administrada a partir de 18 anos. O esquema primário de vacinação com a vacina Covid-19 (recombinante) consiste em duas doses.

A recomendação atualizada para a vacina Covid-19 se encontra no site do Ministério da Saúde.

No CRIE, a vacina contra Covid-19 não tem nenhuma indicação adicional à da rotina vigente nas unidades básicas de saúde. Está disponível apenas para as situações em que haja necessidade de vacinar sob observação, em casos de pacientes com história de Eventos Adversos Supostamente Atribuíveis à Vacinação ou Imunização (ESAVI), alergia grave à vacina ou a algum de seus componentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

4.3.14 Dengue

A dengue é a arbovirose urbana mais prevalente nas Américas, incluindo o Brasil, sendo uma importante suspeita em pacientes que apresentam quadro febril agudo. Sua ocorrência é ampla, atingindo principalmente os países tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas e ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. No Brasil, as evidências científicas, até o momento, comprovam que a transmissão do vírus da dengue ao ser humano ocorre pela picada de fêmeas infectadas da espécie *Aedes aegypti*. A dengue é uma doença febril aguda, sistêmica e dinâmica, que pode apresentar amplo espectro clínico, variando de casos assintomáticos a graves. No curso da doença – em geral debilitante e autolimitada –, a maioria dos pacientes apresenta evolução clínica benigna e se recupera. No entanto, uma

parte pode evoluir para formas graves, inclusive óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

As vacinas de dengue atualmente registradas no Brasil são vacinas atenuadas, compostas pelos quatro sorotipos vivos do vírus da dengue, obtidos separadamente por tecnologia de DNA recombinante usando vetor viral. A diferença entre as vacinas está no vírus vetor utilizado como estrutura genética de “base”: a Dengvaxia usa o vírus vacinal da febre amarela (17D), e a QDenga® usa o próprio DENV-2 atenuado.

Outra diferença está na indicação. Dengvaxia® em crianças a partir de 6 anos, adolescentes e adultos até 45 anos é recomendada somente para pessoas previamente infectadas por um dos vírus da dengue (soropositivos), enquanto a QDenga®, em crianças a partir de 4 anos, adolescentes e adultos até 60 anos, tanto soronegativos como soropositivos para dengue.

Os esquemas preconizados também se diferenciam. Dengvaxia®: três doses, com intervalo de seis meses, e QDenga®: duas doses, com intervalo de três meses.

As contraindicações são as mesmas, exceto a Dengvaxia® que também é contraindicada para pessoas sem contato prévio com o vírus da dengue (soronegativos). Ambas estão disponíveis somente na rede privada de vacinação:

- Alergia grave (anafilaxia) a algum dos componentes da vacina;
- Gestantes;
- Mulheres amamentando;
- Imunodeficiências primárias ou adquiridas, incluindo terapias imunossupressoras;
- Pessoas que vivem com o vírus HIV, sintomáticas ou assintomáticas, quando acompanhadas por evidência de função imunológica comprometida.

4.3.15 Monkeypox

Monkeypox é uma doença zoonótica viral causada pelo vírus do gênero *Orthopoxvirus* (DNA de fita dupla) da família Poxviridae, que inclui também *cowpox*, *vaccinia*, *camelpox* e *mousepox* (PLOTKIN et al., 2018). Essas espécies de vírus têm reatividade cruzada *in vitro*.

Os principais hospedeiros de poxvírus são roedores e podem ocasionalmente transmitir para humanos, facilitando a transmissão de humano para humano. O nome da doença se deve à primeira observação ter sido em um macaco, mas se tem conhecimento que esse não é o hospedeiro (PASCUM et al., 2022). O primeiro caso em humanos foi relatado em 1970 em uma criança de 9 meses na República Democrática do Congo.

Apesar de semelhante ao quadro clínico da varíola, as taxas de letalidade são muito menores. Até abril de

2022, a doença era mais restrita às áreas endêmicas na África e alguns raros casos em outras regiões. Após aparecimento de casos no Reino Unido e disseminação da doença para outros países, a doença passou a ter monitoramento em todo o mundo, inclusive no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022m). Em 7 de junho, o Brasil teve o primeiro caso confirmado.

Em 23 de julho de 2022, a OMS declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional, para tentar interromper a transmissão, a partir de uma resposta coordenada com o intuito de proteger o grupo de vulneráveis (WHO, 2022c). Com a notificação dos casos, observou-se a prevalência do sexo masculino, com predominância de homens que fazem sexo com homens, ressaltando que qualquer pessoa que tenha contato próximo com alguém com sintomas pode ter a doença, inclusive crianças (WHO, 2022c). A transmissão ocorre pelo material contendo vírus humano ou animal, por meio de contato próximo prolongado. A idade de acometimento prevalece em adultos jovens, o que parece estar relacionado com a descontinuação da vacina da varíola, que fornece proteção cruzada para *monkeypox* (WHO, 2022c). A varíola foi declarada erradicada pela OMS em 1980, razão pela qual a vacina foi descontinuada. Após a interrupção da administração da vacina contra varíola, os casos de *monkeypox* tornaram-se prevalentes (PASCUM et al., 2022).

O período de incubação geralmente é de 7 a 14 dias, com tempo máximo de 21 dias (KALER et al., 2022). Os sintomas mais comuns são febre, cefaleia, dor muscular e linfadenomegalia, seguidos ou acompanhados de lesões cutâneas que podem durar de duas a três semanas. A erupção cutânea pode afetar palma da mão, planta do pé, virilha, região genital e/ou anal e face. Pode também acometer mucosa da boca, garganta, ânus, vagina ou olhos. As lesões podem variar de poucas a milhares. Elas podem iniciar planas, passar à vesícula e, então, crosta. A transmissão pode ocorrer até a completa cicatrização da superfície (queda da crosta) (WHO, 2022c).

Existem três vacinas contra *monkeypox*: (i) vacina replicante baseada no vírus vaccinia modificado com cepa Ankara (MVA-BN); (ii) vacina minimamente replicante (LC16); e (iii) vacina replicante baseada em *Vaccinia* (ACAM2000). A última, por ser replicante, é contraindicada em imunocomprometidos, pessoas com doenças dermatológicas crônicas ou mulheres grávidas (HUNG et al., 2022). Além disso, deve-se ter cuidado com a transmissão da doença por meio da ferida causada pela vacinação.

O centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos recomenda a vacina ACAM2000 e a MVA-BN. A primeira com vacinação de uma dose percutânea por escarificação, sendo recomendado

revacinação a cada três anos. Para a MVA-BN, são necessárias duas doses com intervalo de quatro semanas (WHO, 2022c).

A OMS recomenda provisoriamente a vacinação preventiva em casos pós-exposição, com vacina de segunda ou terceira geração, antes do início de quaisquer sintomas. Recomenda, ainda, vacinação preventiva primária para pessoas com alto risco de exposição, como pessoas com múltiplos parceiros sexuais, homens que fazem sexo com homens, profissionais de saúde com alto risco de exposição e profissionais de laboratórios que trabalham com *orthopoxvirus* (WHO, 2022c). Esse imunizante é destinado a adultos com idade igual ou superior a 18 anos. Em 25 de agosto de 2022 a Anvisa aprovou a dispensa de registro para que o Ministério da Saúde importe a vacina MVA-BN e a utilize no Brasil (ANVISA, 2022d).

4.3.16 Rotavírus

O rotavírus pertence à família Reoviridae do gênero *Rotavirus*, sendo a espécie A o que mais infecta humanos em todo o mundo. O genoma do rotavírus é composto por 11 segmentos de RNA de fita dupla em um complexo capsídeo (MINOR, 2015). Duas proteínas VP4(P) e VP7(G) são alvo de anticorpos neutralizantes. A nomenclatura é baseada na sorologia e no genótipo da proteína P. Existem pelo menos 14 genótipos G e 23 genótipos P. Em humanos, o genótipo mais prevalente é G1P[8], sendo também comuns G2P[4], G3P[8] e G4P[8]. Esses genótipos modificam a cada ano e são diferentes em cada país.

O rotavírus é um dos mais importantes agentes causadores de diarreia grave. Esse quadro pode ser acompanhado de febre e vômito, podendo levar à desidratação e óbito. É um vírus presente em todo o mundo, independentemente do estado de saúde ou higiene, mas nos países ricos a mortalidade é muito menor devido aos melhores cuidados de saúde. Os primeiros anos de vida são mais críticos para infecção, tendo piores resultados. Crianças mais velhas e adultos também podem adoecer, mas tendem a ter sintomas mais leves (CDC, 2021).

A transmissão ocorre por via fecal-oral, e uma pequena quantidade é suficiente para causar a infecção. A eliminação do vírus pode ocorrer antes do início dos sintomas e três dias após o término. Alguns pacientes podem eliminar o vírus por mais dias (CDC, 2021).

Uma primeira vacina foi licenciada em 1998 para a cepa G3P[3], que foi retirada do mercado por incidência de intussuscepção intestinal (MINOR, 2015). Quatro vacinas são pré-qualificadas pela OMS, todas orais, vivas e atenuadas, mas com formulações diferenciadas:

(i) derivada de um genótipo humano G1P[8]; (ii) vacina pentavalente de rotavírus bovino e humano rearranjado; (iii) rotavírus neonatal rearranjado bovino humano; e (iv) rearranjo bovino humano.

As quatro vacinas são consideradas eficazes para prevenção de diarreia grave. Apesar da eficácia menor em países de menor renda, a redução do volume de gastroenterites graves e mortes foi expressiva (WHO, 2023).

No Brasil, em 2006 foi implementado no calendário básico do PNI a vacina rotavírus humano G1P[8] (atenuada), ocorrendo uma redução da mortalidade e morbidade infantil (GUTIERREZ et al., 2020). As vacinas contra rotavírus reduziram a gastroenterite aguda em todo o mundo, prevenindo doenças graves e mortes, principalmente em menores de cinco anos. Em 2008, a OMS estimou cerca de 450 mil mortes nessa faixa etária e, por esse motivo, foi recomendada a implementação das vacinas contra rotavírus pelos programas nacionais de imunização.

A vacina rotavírus humano G1P[8] (atenuada) tem o esquema vacinal composto por duas doses com intervalo mínimo de quatro semanas. O esquema padrão é a aplicação oral com 2 e 4 meses. Na rede particular, além dessa vacina, existe a vacina pentavalente de rotavírus bovino e humano, sendo preconizadas três doses com intervalo mínimo de quatro semanas, sendo o esquema padrão 2, 4 e 6 meses. Em ambas as vacinas, a idade máxima para realizar a vacinação é 3 meses e 15 dias. No caso da ocorrência do atraso da vacinação, esta não poderá ser iniciada. A idade máxima para a última dose é 7 meses e 29 dias.

Bio-Manguinhos/Fiocruz, em 2008, assinou acordo de transferência de tecnologia da vacina de rotavírus, devido ao caráter estratégico da produção nacional. Desde então, o Instituto fornece a vacina rotavírus humano G1P[8] (atenuada) para o PNI (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022d).

A vacina é contraindicada em pacientes que apresentem hipersensibilidade a qualquer componente da vacina, pacientes com história de intussuscepção, malformações do trato gastrointestinal que predisponham a intussuscepção, transtorno de imunodeficiência combinada grave e imunodeficiência (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2022). A eficácia da vacina em estudo realizado na América Latina com mais de 20 mil participantes avaliou a administração da vacina rotavírus humano. Após duas doses, a eficácia protetora contra gastroenterite grave por rotavírus que requer hospitalização foi de 84,7% (IC de 95%: 71,7; 92,4) durante o primeiro ano de vida e essa eficácia se manteve durante o segundo ano de vida com 79% (IC de 95%: 66,4; 87,4) (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2022).

4.3.17 Ebola

A doença do vírus ebola (EVD – do inglês *ebola virus disease*), anteriormente conhecida como febre hemorrágica do ebola, é causada por um vírus da família Filoviridae, do gênero *Ebolavirus*, chamado ebola. Foi identificada pela primeira vez em 1976, durante dois surtos ocorridos simultaneamente em duas regiões na África: Sudão e República Democrática do Congo, próximo ao Rio Ebola, originando o nome do vírus (WHO, 2022d).

A origem do vírus é desconhecida, mas infere-se que os hospedeiros prováveis sejam os morcegos frutívoros (WHO, 2022d). São conhecidas cinco espécies do gênero *Ebolavirus*, sendo seus nomes dados a partir dos locais de suas origens: (i) *Zaire ebolavirus*; (ii) *Sudão ebolavirus*; (iii) *Bundibugyo ebolavirus*; (iv) *Reston ebolavirus*; e (v) *Tai Forest ebolavirus* (MSF, 2018).

Para cada uma das cinco espécies, existe uma variação de letalidade, sendo a que apresenta o maior percentual, geralmente superior a 60% dos casos, o *Zaire ebolavirus*. O *Reston ebolavirus* é o único sem nenhum relato de fatalidade, pois até o momento não provocou doenças em humanos, somente em primatas não humanos (CDC, 2015; PLOTKIN et al., 2018).

A sua transmissão, que apenas acontece após o surgimento dos sintomas, pode ocorrer por meio do contato direto com sangue, tecidos ou fluidos corporais (sangue, urina, saliva, fezes, vômito, leite materno) de indivíduos e/ou animais infectados (chimpanzés, gorilas, morcegos-gigantes, antílopes e porcos-espinhos) ou do contato com superfícies e objetos contaminados por esses fluidos, inclusive durante os ritos funerários (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE CAMPINAS, 2014).

Em razão da alta capacidade de transmissão e da expressiva carga viral que permanece após o óbito, os processos de manuseio dos pacientes, bem como dos corpos das vítimas, devem seguir rigorosamente as medidas de segurança. Após um período de incubação que pode variar entre 1 e 21 dias e uma fase inicial inespecífica, alguns pacientes evoluem rapidamente (1 a 2 semanas após a infecção) para a forma hemorrágica grave, na qual há falência múltipla dos órgãos e óbito.

A doença do vírus Ebola é uma das doenças virais mais graves, com alta letalidade, e a imunização é essencial para ajudar a prevenir surtos e epidemias. A vacina rVSV-ZEBOV (Ervebo) é a única aprovada pela FDA, em dezembro de 2019. Também aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA – do inglês *European Medicines Agency*), em novembro do mesmo ano. É uma vacina recombinante de vetor viral replicativo (VSV). Fornece proteção contra espécies *Zaire ebolavirus*, mas não protege contra as outras espécies.

Está liberada para pessoas a partir de 18 anos (SAVOY, 2021). Apesar das preocupações iniciais sobre o uso de um vírus competente para replicação em indivíduos imunocomprometidos, essa vacina parece ser segura quando usada em indivíduos HIV positivos. Ensaios de vacinação em anel na Guiné mostraram eficácia da vacina de 100% e, em 2019, essa vacina foi implantada para controle de surtos de Ebola na República Democrática do Congo.

A Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo é uma combinação de duas vacinas, Ad26.ZEBOV e MVA-BN-Filo, e recebeu pela EMA, em maio de 2020, parecer positivo para autorização de comercialização em circunstâncias excepcionais (LUTMER et al., 2022). Nessa combinação, os dois vetores são geneticamente modificados para que não possam se replicar nas células humanas. Elas contêm o código genético de várias proteínas do vírus Ebola para desencadear uma resposta imune. Protege, também, somente contra a espécie *Zaire ebolavirus*, mas pode ser aplicada a partir de 1 ano de idade.

No Brasil, até o momento, não há registro de casos de Ebola, bem como as vacinas não estão disponibilizadas na rede pública ou privada (SAVOY, 2021). Vale ressaltar que além de todos os esforços para o desenvolvimento e a produção de vacinas contra o vírus Ebola, a agência da ONU e a OMS estão fortalecendo a prevenção e o controle de infecções nas instalações sanitárias, bem como ajudando as equipes de resposta rápida nas investigações de casos e rastreamento de contatos (ONU, 2022).

4.3.18 Raiva

É uma antroponose transmitida ao ser humano pela inoculação do vírus presente na saliva e nas secreções do animal infectado, principalmente pela mordedura e lambedura. Caracteriza-se como encefalite progressiva e aguda que apresenta letalidade de aproximadamente 100%. O agente etiológico é o vírus da raiva (*Rabies lyssavirus*). Apenas os mamíferos transmitem e são acometidos pelo vírus da raiva. O modo de transmissão ocorre pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura, e, mais raramente, pela arranhadura e lambedura de mucosas. Todos os mamíferos são suscetíveis. A imunidade é conferida por meio de vacinação, acompanhada, ou não, por soro. Dessa maneira, pessoas que se expuseram a animais suspeitos de raiva devem receber o esquema profilático, inclusive indivíduos com profissões que favorecem a exposição. A profilaxia da raiva humana é feita com o uso de vacinas e de soro, quando os indivíduos são expostos ao vírus rábico pela mordedura, lambedura de mucosas ou arranhadura provocada por animais transmissores da raiva. A vaci-

nação não tem contraindicação, devendo ser iniciada o mais breve possível e garantir o completo esquema de vacinação preconizado. As vacinas, humana e animal, são gratuitas. A profilaxia contra a raiva deve ser iniciada o mais precocemente possível. A vacina raiva (inativada) humana é indicada para a profilaxia da raiva humana, sendo administrada em indivíduos expostos ao vírus da doença, em decorrência de mordedura, lambedura de mucosa ou arranhadura provocada por animais transmissores, ou como profilaxia em pessoas que, por força de suas atividades ocupacionais, estão permanentemente expostas ao risco da infecção pelo vírus. Em algumas situações, a indicação da profilaxia é complementada com a administração de soro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotecnologia tem demonstrado sua importância para o desenvolvimento da saúde, principalmente na descoberta de novos medicamentos e na produção de vacinas. Por conta da ocorrência de muitas doenças, que mataram milhões de pessoas no mundo, foram desenvolvidas vacinas para controlar essas infecções e prevenir doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos, e até erradicá-las, como é o caso da varíola. Neste capítulo, apresentamos a evolução das vacinas virais, suas plataformas tecnológicas e características. Apresentamos também os principais tipos de vacinas virais e uma exposição sintetizada das doenças. Foram abordadas as vacinas direcionadas para cada doença, suas contraindicações e suas indicações habituais e especiais.

Ainda existem diversas barreiras a serem transpostas. As vacinas mais bem-sucedidas protegem contra infecções agudas (de curta duração), principalmente por meio da produção de anticorpos. Vacinas para infecções crônicas (de longa duração), especialmente para HIV, tuberculose e malária, continuam sendo um desafio (NOSSAL, 2011; RAPPUOLI; ADEREM, 2011). Uma das principais razões para isso é que os vírus, bactérias e parasitas que causam essas infecções se escondem do sistema imunológico dentro das células da pessoa.

A inovação pode melhorar a simplicidade e a eficiência da administração de vacinas. As empresas farmacêuticas não estão apenas procurando novas vacinas para doenças, buscam maneiras mais eficazes e fáceis de incorporá-las à rotina de vacinação. Nesse sentido, os fabricantes têm trabalhado na melhoria dos processos de produção, para fornecer doses de vacina mais rapidamente. Essas melhorias incluem o aumento da estabilidade das vacinas, facilitando o transporte e o armazenamento, reduzindo o desperdício no campo (EXCLER et al., 2021) e melhorar o acesso a comunidades

de difícil acesso. A combinação de vacinas também é foco de desenvolvimento, reduzindo a necessidade de múltiplas doses, diminuindo o número de injeções necessárias durante a vida. A administração sem agulha é possível para algumas vacinas, como vacinas vivas administradas por via oral (por exemplo, rotavírus). Pesquisadores vêm trabalhando em materiais adesivos de pele sem agulhas e tecnologias de injeção de microagulhas, o que torna a vacinação menos invasiva e facilita também o transporte e a distribuição dessas vacinas.

À medida que as sociedades crescem em tamanho e complexidade, uma variedade infinita de oportunidades é criada para que agentes infecciosos surjam nos nichos ecológicos não preenchidos que continuamos a criar (EXCLER et al., 2021). Esse é um dos maiores desafios para o desenvolvimento acelerado de vacinas contra doenças emergentes e reemergentes e o risco de evoluir rapidamente para surtos e pandemias devastadoras (EXCLER et al., 2021).

Entidades como o CEPI, uma parceria global entre organizações públicas, privadas, filantrópicas e da sociedade civil, trabalha para acelerar o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas emergentes e permitir acesso equitativo a essas vacinas para pessoas durante surtos. Entidades como CEPI e OMS precisam aumentar o acesso global a vacinas e a vacinação precisa ser priorizada em países de baixa e média renda (EXCLER et al., 2021).

REFERÊNCIAS

1. ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL LTDA. **Modelo de Bula do Profissional da Saúde**. Disponível em: <<https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/vacinainfluenza.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2022.
2. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. **Red Book 2000 - Relatório do Comitê de Doenças Infecciosas Vol. 3**. 1. ed. Itasca: AAP, 2001.
3. ANVISA. **Bulário Eletrônico Vacina Poliomielite 1, 2 E 3 (ATENUADA)**. Disponível em: <[https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q?nomeProduto=VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 \(ATENUADA\)](https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q?nomeProduto=VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (ATENUADA))>. Acesso em: 24 out. 2022.
4. ANVISA. **Andamento da Análise das Vacinas na ANVISA**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/andamento-da-analise-das-vacinas-na-anvisa>>. Acesso em: 5 jan. 2023.
5. ANVISA. **Bulário Eletrônico Vacina Poliomielite 1 e 3 (Atenuada)**. Disponível em: <[https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q?nomeProduto=VACINA POLIOMIELITE 1 E 3 \(ATE NUADA\)](https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q?nomeProduto=VACINA POLIOMIELITE 1 E 3 (ATE NUADA))>. Acesso em: 24 out. 2022a.
6. ANVISA. **Bulário Eletrônico Vacina Poliomielite 1, 2 E 3 (Inativada)**. Disponível em: <[https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q?nomeProduto=VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 \(INATIVADA\)](https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q?nomeProduto=VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA))>. Acesso em: 21 out. 2022b.
7. ANVISA. **Coronovac - bula paciente**. Disponível em: <

- rotulos/bulas-uso-emergencial/vacinas/bula-coronavac- atualizada.pdf/view>. Acesso em: 8 nov. 2022a.
8. ANVISA. **Bulário Eletrônico Vacina Covid- 19 (Recombinante)**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?numeroRegistro=112363438>>. Acesso em: 8 nov. 2022b.
 9. ANVISA. **Bulário Eletrônico Vacina Covid- 19 (Recombinante)**. Disponível em: <[https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=VACINA COVID-19 \(RECOMBINANTE\)](https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=VACINA COVID-19 (RECOMBINANTE))>. Acesso em: 8 nov. 2022c.
 10. ANVISA. **ANVISA aprova liberação de vacina para monkeypox para uso pelo Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-liberacao-de-vacina-para-monkeypox-para-uso-pelo-ministerio-da-saude>>. Acesso em: 2 dez. 2022d.
 11. BIO- MANGUINHOS/FIOCRUZ. **Rotavírus Humano**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/vacinas/rotavirus-humano>>. Acesso em: 18 out. 2022.
 12. BLOOM, D. E.; BLACK, S.; RAPPUOLI, R. Emerging infectious diseases: A proactive approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 16, p. 4055–4059, 18 abr. 2017.
 13. CARVALHO, L. H. F. R. et al. Imunizações: fundamentos e prática. In: FARHAT, C. K; WECKX, L. Y.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. (Eds.). **Imunizações: fundamentos e prática**. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2018. p. 586.
 14. CATE, T. R. et al. Clinical Trials of Monovalent Influenza A/New Jersey/76 Virus Vaccines in Adults: Reactogenicity, Antibody Response, and Antibody Persistence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 136, n. Supplement 3, p. S450–S455, 1 dez. 1977.
 15. CDC. **Ébola (Doença por Vírus Ébola)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vhf/ebola/pdf/ebola-factsheet-portuguese.pdf>>. Acesso em: 26 dez. 2022.
 16. CDC. **Rotavirus Symptoms**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/rotavirus/about/symptoms.html>>. Acesso em: 18 out. 2022.
 17. CHANG, M.- H. et al. Universal Hepatitis B Vaccination in Taiwan and the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 26, p. 1855–1859, 26 jun. 1997.
 18. CLINICALTRIALS, 2023. Disponível em: <<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04725877>>.
 19. DE OLIVEIRA, L. H. et al. HPV vaccine introduction in the Americas: a decade of progress and lessons learned. **Expert Review of Vaccines**, v. 21, n. 11, p. 1569–1580, 2 nov. 2022.
 20. ESCOSTEGUY, C. C. et al. Yellow fever: profile of cases and factors associated with death in a hospital in the State of Rio de Janeiro, 2017–2018. **Revista de Saúde Pública**, v. 53, p. 89, 21 out. 2019.
 21. EXCLER, J.- L. et al. Vaccine development for emerging infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 27, n. 4, p. 591–600, 12 abr. 2021.
 22. FEBRASGO. **HPV**. Disponível em: <<https://www.febasgo.org.br/pt/noticias/item/120-hpv#:~:text=Os HPV são divididos em,%2C68%2C73%2C82.>>. Acesso em: 22 nov. 2022.
 23. FIOCRUZ. **Vacinas virais**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas-menu-topo/131-plataformas/1574-vacinas-virais>>. Acesso em: 5 jan. 2023.
 24. FOCACCIA, R.; VERONESI, R. **Veronesi: tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
 25. GREKOUSIS, G.; LIU, Y. Digital contact tracing, community uptake, and proximity awareness technology to fight COVID- 19: a systematic review. **Sustainable Cities and Society**, v. 71, p. 102995, 2021.
 26. GUTIERREZ, M. B. et al. Rotavirus A in Brazil: Molecular Epidemiology and Surveillance during 2018–2019. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 515, 27 jun. 2020.
 27. HUNG, Y.- P. et al. A brief on new waves of monkeypox and vaccines and antiviral drugs for monkeypox. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 55, n. 5, p. 795–802, out. 2022.
 28. JACOBSEN, K. H. **The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review**. Geneva: World Health Organization, 2009 [s.n.].
 29. KALER, J. et al. Monkeypox: A Comprehensive Review of Transmission, Pathogenesis, and Manifestation. **Cureus**, 2022.
 30. LAUNAY, Odile et al. Safety and immunogenicity of a measles- vectored SARS- CoV- 2 vaccine candidate, V591/TMV- 083, in healthy adults: results of a randomized, placebo-controlled Phase I study. **EBioMedicine**, v. 75, 2022.
 31. LUTMER, H. et al. **Ebola Vaccine Regimen Zabdeno (Ad26.ZEBOV) and Mvabea (MVA- BN- Filo)**. Disponível em: <<https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/ebola-vaccine-regimen-zabdeno-ad26zebov-and-mvabea-mva-bn-filo>>. Acesso em: 26 dez. 2022.
 32. MARIA LUCIA GOMES FERRAZ. Editorial. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 5, 2007.
 33. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INFORME TÉCNICO DA INTRODUÇÃO DA VACINA INATIVADA POLIOMIELITE**. p. 18, 2012.
 34. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Imunizações (PNI) : 40 anos**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_imunizacoes_pni40.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.
 35. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_vacinacao.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.
 36. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT)**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeutica_atencao_integral_pessoas_infecoes_sexualmente_transmissiveis.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.
 37. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre amarela: guia para profissionais de saúde**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guiaprofissionais_saude.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.
 38. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019a.
 39. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_centros_imunobiologicos_especiais_5ed.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023b.
 40. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_centros_imunobiologicos_especiais_5ed.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023c.
 41. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós- vacinação**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epidemiologica_eventos_vacinacao_4ed.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.

42. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vacinacao-imunizacao-pni/manual_eventos-_adversos_pos_vacinacao_4ed_atualizada.pdf/view>. Acesso em: 21 dez. 2022.
43. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Imunizações - Vacinação**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/acesso-a-informacao/acoes-e-programas/programa-nacional-de-imunizacoes-vacinacao>>. Acesso em: 28 dez. 2022a.
44. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. 5. ed. Brasília: WHO, 2022b.
45. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **24ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza (Versão Atualizada)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/arquivos/informe-da-24a-campanha-nacional-de-vacinacao-contra-a-influenza.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2023c.
46. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Calendário Nacional de Vacinação 2022 - Criança**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/calendario-nacional-de-vacinacao-2022-crianca/view>>. Acesso em: 5 jan. 2023d.
47. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Calendário Nacional de Vacinação**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao>>. Acesso em: 15 mar. 2023e.
48. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis e hepatites virais**. Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_hiv_sifilis_hepatites.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023f.
49. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Poliomielite: assassino silencioso, que apesar de evitável, se espalha novamente após décadas**. Disponível em: <<https://bvsm.sau.gov.br/poliomielite-assassino-silencioso-que-apesar-de-evitavel-se-espalha-novamente-apos-decadas/>>. Acesso em: 19 out. 2022g.
50. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde amplia vacinação contra meningite e HPV; entenda o que muda**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/setembro/saude-amplia-vacinacao-contra-meningite-e-hpv-entenda-o-que-muda#:~:text=No caso do HPV%2C a,de idade%2C independentemente do sexo>>. Acesso em: 22 nov. 2022h.
51. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **HPV**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>>. Acesso em: 16 nov. 2022i.
52. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ofício N° 810/2022/CGPNI/DEIDT/SVS/MS**. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/oficio-810-2022-pni-deidt-svs-ms-hpvimunossuprimidoshomens45.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2022j.
53. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Novo Coronavírus (Covid-19): informações básicas**. Disponível em: <<https://bvsm.sau.gov.br/novo-coronavirus-covid-19-informacoes-basicas/>>. Acesso em: 20 dez. 2022k.
54. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota técnica N° 255/2022-CGPNI/DEIDT/SVS/MS**. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/nt-255-2022-cgpn-deidt-svs-ms.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2022l.
55. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Contingência Nacional para Monkeypox**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/resposta-a-emergencias/coes/monkeypox/plano-de-contingencia/plano-de-contingencia>>. Acesso em: 30 jan. 2023m.
56. MINOR, P. D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. **Virology**, v. 479–480, p. 379–392, maio 2015.
57. MONTO, ARNOLD S., and FARIDEH KIOUMEHR. The Tecumseh study of respiratory illness: IX. Occurrence of influenza in the community, 1966–1971. **American Journal of Epidemiology**, v. 102.6, p. 553–563, 1975.
58. MSF. **Se contraído, o Ebola é uma das doenças mais mortais que existem. É um vírus altamente infeccioso que pode matar mais de 90% das pessoas que o contraem, causando pânico nas populações infectadas**. Disponível em: <<https://www.msf.org/br/o-que-fazemos/atividades-medicas/ebola/>>. Acesso em: 26 dez. 2022.
59. NASCIMENTO SILVA, J. R. et al. Mutual interference on the immune response to yellow fever vaccine and a combined vaccine against measles, mumps and rubella. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6327–6334, 2011.
60. NOGUEIRA-RODRIGUES, A. HPV Vaccination in Latin America: Global Challenges and Feasible Solutions. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 39, p. e45–e52, 1 maio 2019.
61. NOSSAL, G. J. V. Vaccines of the future. **Vaccine**, v. 29, p. D111–D115, dez. 2011.
62. OLIVEIRA, A. C. V. et al. Occurrence of Autoimmune Diseases Related to the Vaccine against Yellow Fever. **Autoimmune diseases**, v. 2014, p. 473170, 2014.
63. ONU. **Com fim de surto de ebola na RD Congo, Uganda sobe resposta contra doença**. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2022/09/1802731>>. Acesso em: 26 dez. 2022.
64. OPAS. **Perguntas e respostas: hepatite aguda grave em crianças**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/3-5-2022-perguntas-e-respostas-hepatite-aguda-grave-em-criancas>>. Acesso em: 21 nov. 2022a.
65. OPAS. **Folha informativa sobre covid-19**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19#:~:text=Outros sintomas menos comuns e,%2C diarreia%2C calafrios ou tonturas>>. Acesso em: 20 dez. 2022b.
66. PASCOM, A. R. P. et al. Características epidemiológicas e clínicas dos casos de monkeypox no Brasil em 2022: estudo transversal. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, n. 3, 2022.
67. PETRAGLIA, T. C. DE M. B. et al. Falhas vacinais: avaliando vacinas febre amarela, sarampo, varicela e caxumba. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. suppl 2, 2020.
68. PFIZER. **Bula Pfizer vacina covid-19**. Disponível em: <<https://www.pfizer.com.br/bulas/comirnaty>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
69. PLOTKIN, S. History of vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12283–12287, ago. 2014.
70. PLOTKIN, S. A. et al. **Plotkin's Vaccines**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.
71. POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83–100, 22 fev. 2021.
72. RAPPUOLI, R.; ADEREM, A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 463–469, 2011.
73. RODHAIN, F. Yellow fever: A brief history of a tropical Virosis. **La Presse Médicale**, v. 51, n. 3, p. 104–132, set. 2022.

74. ROUX, E.; CHAMBERLAND, C. Immunité contre la septicémie conférée par des substances solubles. **Ann Inst Pasteur**, v. 1, p. 561–572, 1887.
75. SALK, J. E. et al. Formaldehyde Treatment and Safety Testing of Experimental Poliomyelitis Vaccines. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 44, n. 5, p. 563–570, maio 1954.
76. SALMON, D.; SMITH, T. On a new method of producing immunity from contagious diseases. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 3, p. 29–33, 1880.
77. SASSO, E. et al. New viral vectors for infectious diseases and cancer. **Seminars in immunology**, v. 50, p. 101–430, ago. 2020.
78. SAÚDE EM MOVIMENTO. **Hepatite B**. Disponível em: <http://www.saudeemmovimento.com.br/conteudos/conteudo_exibe.asp?cod_noticia=675#:~:text=Reservatório%3A%20devido%20a%20sua%20alta,mais%20evoluidos%20como%20o%20chimpanz%C3%A9>. Acesso em: 31 out. 2022.
79. SAVOY, M. L. **Vacina contra o Ebola**. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/infecções/imunização/vacina-contr-a-ebola>>. Acesso em: 26 dez. 2022.
80. SBIM. **Após caso no Malauí, SBIM pede ações para evitar o retorno da pólio ao Brasil**. Disponível em: <<https://sbim.org.br/noticias/1658-apos-caso-no-malau-i-sbim-pede-aco-es-para-evitar-o-retorno-da-polio-ao-brasil>>. Acesso em: 17 out. 2022a.
81. SBIM. **Nota Técnica – 08/06/2022**. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/nota-tecnica-sbim-vacinacao-herpes-zoster-shingrix-080622-v3.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2022b.
82. Secretaria Municipal de Saúde Campinas. **Ebola**. Disponível em: <<https://saude.campinas.sp.gov.br/doencas/ebola/ebola.htm>>. Acesso em: 18 jan. 2023.
83. THEILER, M.; SMITH, H. H. The Effect of Prolonged Cultivation In Vitro Upon The Pathogenicity of Yellow Fever Virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 6, p. 767–786, 1 jun. 1937.
84. THOMAS, F.; MAGILL, T. P. Vaccination of Human Subjects with Virus of Human Influenza. **Experimental Biology and Medicine**, v. 33, n. 4, p. 604–606, 1 jan. 1936.
85. Travieso, T.; Li, J.; Mahesh, S. et al. The use of viral vectors in vaccine development. **npj Vaccines** 7, 75 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00503-y>
86. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow fever**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 2 ago. 2021.
87. WHO. **How do vaccines work?** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-do-vaccines-work>>.
88. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations announced for influenza vaccine composition for the 2022-2023 northern hemisphere influenza season**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/25-02-2022-recommendations-announced-for-influenza-vaccine-composition-for-the-2022-2023-northern-hemisphere-influenza-season>>. Acesso em: 7 out. 2022a.
89. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab_1>. Acesso em: 29 ago. 2022b.
90. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monkeypox**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/monkeypox>>. Acesso em: 30 nov. 2022c.
91. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ebola virus disease**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/ebola#tab=tab_1>. Acesso em: 26 dez. 2022d.
92. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rotavirus**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/rotavirus>>. Acesso em: 30 jan. 2023.
93. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis: Preventing mother-to-child transmission of the hepatitis B virus**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/hepatitis-preventing-mother-to-child-transmission-of-the-hepatitis-b-virus>>. Acesso em: 23 nov. 2022.

Vacinas bacterianas

Ivna Alana F. B. da Silveira

Tatiana Guimarães de Noronha

Luciana Gomes Pedro Brandão

José Procópio Moreno Senna

Neste capítulo, são discutidos aspectos relacionados às vacinas bacterianas. O capítulo inicia pela apresentação das gerações e tipos de vacinas. Avança pelo detalhamento das plataformas tecnológicas, pesquisa, desenvolvimento e produção. Segue pelas aplicações clínicas e recomendações de uso e finaliza com a exploração do papel do Complexo Econômico-Industrial da Saúde (CEIS) no desenvolvimento dessas vacinas.

5.1 TIPOS DE VACINAS BACTERIANAS

Vacinas bacterianas são produtos farmacêuticos que contêm microrganismos mortos ou vivos com baixa virulência (bactérias atenuadas), bem como substâncias obtidas de microrganismos (vacinas de subunidades), capazes de induzir resposta imunológica e, assim, conferir proteção contra infecções e/ou doenças imunopreveníveis. As vacinas são consideradas o mais eficaz e acessível recurso em Saúde Pública para redução da mortalidade, aumento da qualidade e da expectativa de vida e crescimento da população (PLOTKIN et al., 2018; POLLARD; BIJKER, 2021).

Com o avanço tecnológico, as vacinas bacterianas evoluíram em gerações e tipos diferentes para assegurar a resposta imunológica contra patógenos específicos e reduzir a indução de eventos adversos. Com base nas características biológicas e químicas das bactérias patogênicas, e no tipo de imunidade desejada, pesquisadores desenvolveram várias plataformas para obtenção de diferentes tipos de vacinas bacterianas. Esses tipos são: (i) células inteiras vivas (atenuadas); (ii) células inteiras mortas (inativadas); (iii) subunidades baseadas em proteína nativa (iv); subunidades baseadas em toxinas bacterianas destoxificadas (anatoxinas); (v) subunidades baseadas em polissacarídeos capsulares; (vi) subunidades conjugadas; (vii) subunidades baseadas em vesículas de

membrana externa (VME); (viii) vacinas terapêuticas para bactérias multirresistentes (RAM); e (ix) vacinas baseadas em vetores bacterianos. No Quadro 5.1 são apresentadas as gerações e tipos de vacinas bacterianas licenciadas no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a).

Em geral, as vacinas de células inteiras, vivas atenuadas ou inativadas, são consideradas a primeira geração de vacinas; com plataformas clássicas e alta imunogenicidade, possuem como contramedida altos níveis de reatogenicidade. As vacinas de subunidades, consideradas de segunda geração, possuem um ou mais componentes do patógeno alvo e, apesar de serem seguras, induzem uma resposta imunológica mais fraca, o que torna necessário o uso de adjuvantes (PLOTKIN et al., 2018; POLLARD; BIJKER, 2021). Integrando a terceira geração, as vacinas de vetores bacterianos têm sido desenvolvidas nos últimos anos, mas ainda estão sendo avaliadas em caráter experimental.

5.1.1 Vacinas atenuadas (células inteiras vivas)

A plataforma de vacinas atenuadas utiliza células inteiras vivas da bactéria, quase ou completamente destituídas de patogenicidade, mas capazes de induzir uma resposta imunológica protetora. Essas cepas devem ser cultivadas sob condições especiais que permitam

QUADRO 5.1 Classificação das principais vacinas utilizadas no Brasil

Geração	Tipo	Vacinas licenciadas
1ª geração – Plataformas clássicas	Atenuadas (células inteiras vivas)	BCG
	Inativadas (células inteiras mortas)	<i>Pertussis</i> celular (wP)
2ª geração – Plataformas biotecnológicas	Subunidade – proteína nativa	<i>Pertussis</i> celular (aP)
	Subunidade – anatoxinas	Difteria, tétano
	Subunidade – polissacarídeos capsulares	Meningocócica dos grupos A, C e W* Pneumocócica 23-valente Polissacarídeo Vi (<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i>)
	Subunidade – conjugados (polissacarídeo-proteína carreadora)	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib) Meningocócica dos grupos A, C, W e Y Pneumocócica 10, 13-valente
	Subunidade – vesícula de membrana externa (VME)	Meningocócica do grupo B
	Vacinas para bactérias multirresistentes (RAM)	Pneumocócica 23-valente Pneumocócica 10, 13-valente
3ª geração – Plataformas inovadoras	Vetores bacterianos	Experimental

*Vacina não introduzida no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Brasil.

Fonte: Elaborado pelos autores, baseado em Ministério da Saúde (2022a).

sua perda de virulência ou propriedades causadoras de doenças, por meio de: (i) administração por uma via não natural de infecção; (ii) passagens seriadas sob condições laboratoriais (atenuação); ou (iii) tecnologia de DNA recombinante para geração de cepas bacterianas vivas, geneticamente atenuadas (LIN; VAN; SMOOKER, 2015).

Embora essas vacinas necessitem de manipulação e estocagem especiais para manter sua potência, induzem imunidade rápida, mediada por anticorpos (humoral e de mucosa) e resposta celular e, geralmente, requerem apenas uma dose de reforço ou dose adicional. Falhas vacinais primárias são incomuns e, em geral, estão relacionadas à estocagem ou administração inadequadas. As vacinas atenuadas têm custo reduzido de produção, são facilmente administradas (por via parenteral) e, com cuidado e monitoramento constantes, também são facilmente transportadas no campo. No entanto, existem possíveis riscos de segurança causados por atenuação deficiente, reversões virulentas, instabilidade da preparação, contaminação com outros microrganismos e labilidade ao calor. Dessa forma, essas vacinas não devem ser usadas em pessoas que estejam utilizando drogas imunossupressoras, pessoas com câncer, portadoras do vírus HIV e mulheres grávidas (LIN; VAN; SMOOKER, 2015).

A vacina contra tuberculose (Bacille Calmette-Guérin – BCG) foi a primeira vacina bacteriana atenuada a ser produzida e administrada em seres humanos. O bacilo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) foi isolado em 1902 por Edmond Nocard. Em 1906, Albert Calmette

e Camille Guérin isolaram o bacilo de bovinos (*Mycobacterium bovis*) e, por meio de 213 culturas sucessivas em presença de bile, obtiveram um bacilo atenuado que passou a constituir a vacina BCG. A partir de 1927, a vacina passou a ser utilizada como rotina em vários países (PLOTKIN et al., 2018; WHO, 2009). Esta é a única vacina existente para prevenção da doença causada pela bactéria, consiste em um produto com custo reduzido e seguro para prevenção da infecção (imunidade inata com *clearance* bacteriano) e doença (tuberculose e meningite). No Brasil, a vacina intradérmica é produzida apenas pela Fundação Ataulpho de Paiva, localizada no Rio de Janeiro. O tipo de resposta imunológica induzida é mediado por células Th1 CD4 com contribuição de células Th17 CD8, mas sem clareza do mecanismo que induz a morte bacteriana. Infelizmente não existe um completo conhecimento dos mecanismos de virulência da bactéria, o que impede o desenvolvimento de vacinas melhoradas. Várias formulações vacinais experimentais estão em avaliação clínica, contendo diversos componentes da bactéria (vacina de subunidades) em presença de diferentes adjuvantes (POOLMAN, 2020).

5.1.2 Vacinas inativadas (células inteiras mortas)

A plataforma de vacinas inativadas utiliza microrganismos patogênicos inteiros mortos. A inativação é obtida por meio de agentes químicos (formalina ou beta-propiolactona) ou pelo calor. Essas vacinas são de

fácil uso, estáveis e seguras, uma vez que não contêm material vivo e, conseqüentemente, não podem ser revertidas a formas virulentas. Entretanto, existem problemas relacionados à inativação incompleta, o que aumenta o risco de reações alérgicas devido à presença de expressiva quantidade de antígenos. Em outras palavras, para serem eficazes, as vacinas inativadas devem conter substancialmente mais antígenos do que as produzidas com células inteiras vivas. De maneira geral, as vacinas inativadas não requerem refrigeração, o que as torna acessíveis aos indivíduos de países em desenvolvimento, bem como aos membros das forças armadas, que estão em constante movimento. Da mesma forma, podem ser administradas em pacientes com imunodeficiências, pois o material que constitui essas vacinas está inativado, o risco de reversão do patógeno é mínimo e não oferece riscos a esses pacientes. Entretanto, a maioria das vacinas inativadas estimula uma resposta imunológica relativamente fraca, por isso devem ser administradas em mais de uma dose, o que limita a sua utilização, principalmente em áreas com pouco acesso aos sistemas de saúde. Essas vacinas também estimulam pouca imunidade de mucosa e têm custo de produção elevado (PLOTKIN et al., 2018).

Um desenvolvimento importante na área de vacinas bacterianas no início do século XX foi a vacina contra a coqueluche. Seu agente etiológico, o coccobacilo Gram-negativo *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), foi isolado por Jules Bordet e Octave Gengou em 1900 e cultivado pela primeira vez em 1907 (PLOTKIN et al., 2018). A vacina é composta por células bacterianas inteiras, inativadas térmica ou quimicamente (formaldeído). É uma vacina imunogênica, de alta reatogenicidade, capaz de induzir eventos adversos de relativa gravidade, sendo utilizada sobretudo em países em desenvolvimento. Durante muitos anos a vacina foi produzida pelo Instituto Butantan, como componente da vacina tríplice bacteriana (DTP), para prevenção das doenças causadas por *B. pertussis*, *Clostridium tetani* (*C. tetani*) e *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*). Entretanto, em função de problemas regulatórios, o Instituto Butantan não está produzindo essa vacina. Atualmente, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) do país adquire a vacina diretamente de fornecedores estrangeiros, para imunizar a população brasileira.

5.1.3 Vacinas de subunidades baseadas em proteínas nativas

As vacinas de subunidades possuem um ou mais componentes do patógeno, representam a 2ª geração de vacinas e são obtidas com o uso de plataformas biotecnológicas, desenvolvidas a partir da evolução de

ciências como Genética, Biologia Molecular, Proteômica, Genômica, Engenharia Genética, Imunologia etc. Essas vacinas são desenvolvidas a partir de fragmentos antigênicos capazes de provocar resposta imunológica e induzir eventos adversos pouco frequentes, quando comparados àqueles causados por vacinas de microrganismos inteiros. Apesar de seguras, as vacinas de subunidades induzem resposta imunológica mais fraca, sendo necessário o uso de adjuvantes (POLLARD; BIJKER, 2021).

As vacinas de subunidades podem ser produzidas após a obtenção e a purificação de partes constituintes dos patógenos (extracelulares ou produto do metabolismo), ou mesmo construídas por engenharia genética.

Em função dos eventos adversos induzidos pela vacina celular contra a coqueluche, foram desenvolvidas vacinas de subunidades acelulares compostas por proteínas nativas que são antígenos importantes, no que se refere à patogênese e indução de imunidade protetora, como, por exemplo: (i) toxina pertussis destoxificada; (ii) hemaglutinina filamentososa; (iii) antígenos de fímbria tipos 2 e 3; e (iv) pertactina. Essas vacinas são preparadas a partir de sobrenadantes de cultura livres de células, inativados com formaldeído. Os componentes são purificados de maneira individual ou simultânea por precipitação com sulfato de amônio (LIMA, 2019; WHO, 2009).

Apesar das vacinas acelulares prevenirem doenças severas e mortes em crianças, a proteção possui curta duração e pode ser menos efetiva contra a transmissão bacteriana. Esse tipo de vacina é menos reatogênico do que a vacina celular, tem custo de produção expressivamente maior e é utilizado em países desenvolvidos onde tem sido observado aumento de casos de coqueluche (SOLANS; LOCHT, 2018).

Existem novas vacinas contendo células vivas de virulência atenuada em desenvolvimento clínico (Fase I). De administração por inalação, essas vacinas são capazes de reproduzir melhor a patogênese da infecção natural por *B. pertussis*. Além disso, induzem uma potente imunidade de mucosa, com retorno de células de memórias residentes em tecidos de mucosa e produção de anticorpos. A esperança é que essa nova estratégia alcance não apenas o controle, mas também a eliminação da doença (POOLMAN, 2020; SOLANS; LOCHT, 2018).

5.1.4 Vacinas de subunidades baseadas em anatoxinas

As vacinas baseadas em anatoxinas tetânica e diftérica são compostas de toxinas bacterianas excretadas no meio de cultivo fermentado e foram as primeiras vacinas de subunidades desenvolvidas. Essas toxinas são destoxificadas com formaldeído, antes ou após o processo

de purificação, para neutralizar os efeitos tóxicos da substância prejudicial produzida pelo microrganismo, responsável pela indução da doença. As anatoxinas são utilizadas para prevenir doenças como difteria e tétano, causadas pelo *C. diphtheriae* (bacilo Gram-positivo) e *C. tetani* (bacilo Gram-positivo, anaeróbio, forma esporos termoestáveis), respectivamente.

Alexander Glenny, em 1904, foi o pioneiro na preparação da anatoxina diftérica a partir do tratamento da toxina bruta com formaldeído. O processo destruiu a atividade tóxica da toxina, preservando sua capacidade imunogênica. A vacina, introduzida em 1930, é segura e eficaz e amplamente utilizada atualmente (PLOTKIN et al., 2018).

O procedimento utilizado na produção da anatoxina diftérica foi, posteriormente, empregado na obtenção da anatoxina tetânica. A toxina tetânica é uma toxina muito potente, denominada tetanoespasmina, que também é excretada pela bactéria anaeróbica e destoxificada com formaldeído, para a produção da vacina. O processo de produção utiliza uma cepa de *C. tetani* altamente toxigênica, com histórico e verificação das características bioquímicas, moleculares e genéticas conhecidos e aprovados pela autoridade regulatória nacional. A cepa Harvard também é utilizada na produção de vacinas contra o tétano.

Essa produção deve ser realizada em área segregada, de contenção biológica de nível III, que além de possuir barreiras especiais para o fluxo de pessoas e materiais, também deve operar com pressão negativa em relação ao exterior. O ar que deixa a área de produção é incinerado para evitar o contato com esporos termoestáveis, formados pela bactéria (WHO, 1990). A vacina contra o tétano é segura e eficaz, e atualmente é utilizada na imunização da população brasileira e de outros países. As anatoxinas diftérica e tetânica também são empregadas como proteínas carreadoras de vacinas conjugadas, conforme exposto na próxima subseção.

5.1.5 Vacinas de subunidades baseadas em polissacarídeos capsulares

5.1.5.1 Vacinas polissacarídicas

Na década de 1930, foram descobertos os polissacarídeos capsulares como antígenos específicos de diferentes grupos de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), classificados como o principal fator de virulência das bactérias encapsuladas (SCHERP; RAKE, 1945). Os polissacarídeos recém-isolados deram origem aos primeiros produtos a serem testados em animais para a obtenção de proteção contra a doença meningocócica. Entretanto, as técnicas disponíveis na época produziram polissacarídeos de baixo peso molecular oriundos de cultivos de longa duração,

incapazes de induzir anticorpos nos modelos animais utilizados (SCHERP; RAKE, 1945). Na década de 1960, com a introdução de cultivos de curta duração e de novos processos de purificação, foi possível obter moléculas de alto peso molecular, imunogênicas em animais e com pouca contaminação de ácidos nucleicos e proteínas (GOTSCHLICH; LIU; ARTENSTEIN, 1969).

A produção dos polissacarídeos bacterianos é um processo de baixo custo e que consiste basicamente em duas etapas, uma de fermentação e outra de purificação, ambas considerando características inerentes a cada bactéria. O processo de purificação proposto por Gotschlich et al. em 1969 foi recomendado para a produção de vacinas polissacarídicas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e continua sendo amplamente utilizado (GOTSCHLICH; LIU; ARTENSTEIN, 1969; WHO, 1981). Entretanto, esse processo tem algumas desvantagens. Uma delas é o uso de substâncias tóxicas, como o fenol, para promover a desproteíntização. Outra é a necessidade de realização de múltiplos ciclos de ultracentrifugação para remover a endotoxina. Por fim, a última desvantagem é o pouco rendimento de polissacarídeo em função da elevada perda de material durante o processo. Dessa forma, novas metodologias foram desenvolvidas, como a proposta por De Souza et al. (2021), que utiliza a Celite como assistente de filtração, além do detergente Cetavlon, para tornar a etapa de separação e purificação, conhecida como *downstream*, mais efetiva, possibilitando altos rendimentos de polissacarídeo (DE SOUZA et al., 2021).

Os polissacarídeos meningocócicos constituíram as primeiras vacinas bacterianas definidas quimicamente e representam a plataforma de escolha para o desenvolvimento de vacinas eficazes para bactérias encapsuladas patogênicas como *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Essas bactérias são responsáveis pela indução de sintomas graves como pneumonia e meningite, podendo levar a muitos óbitos. Outra vacina que emprega a plataforma polissacarídica é a que previne contra a febre tifoide, doença bacteriana aguda causada pela bactéria encapsulada *Salmonella enterica* (*S. enterica*) serovar *Typhi*, na qual o polissacarídeo Vi é o principal componente vacinal. Esses antígenos são utilizados na formulação de vacinas polissacarídicas ou como matérias-primas para obtenção de vacinas conjugadas. Considerando que a estrutura da cápsula é conservada entre as cepas pertencentes ao mesmo grupo (*N. meningitidis*), sorotipo (*S. pneumoniae*) e tipo (*H. influenzae*), o importante é que elas sejam comprovadamente capazes de produzir polissacarídeo de forma eficiente e segura.

Existem vacinas polissacarídicas efetivas contra quatro dos seis grupos de *N. meningitidis* causadores

de epidemias e surtos epidêmicos. São elas: (i) vacinas monovalentes (A e C); (ii) bivalentes (AC); (iii) trivalentes (ACW); e (iv) tetravalentes (A, C, W e Y; Mencevax – GlaxoSmithKline e Menomune – Sanofi Pasteur). Da mesma forma, existe a vacina polissacarídica 23-valente para prevenção da doença pneumocócica e a vacina polissacarídica composta do antígeno Vi para prevenção de febre tifoide. No Brasil, Bio-Manguinhos/Fiocruz, instituição criada em 1976, motivada por duas epidemias de doença meningocócica, causadas pelos grupos A e C no início da década de 1970, é o único produtor de vacinas antimeningocócicas monovalentes (A e C) ou trivalentes (ACW) no país.

Entretanto, apesar de serem moléculas puras, isentas de massa bacteriana e atóxicas, os polissacarídeos são antígenos T-independentes do tipo 2 (TI-2), e a capacidade dos indivíduos responderem a eles depende da maturidade imunológica relacionada com a idade (STEFANETTI; MACLENNAN; MICOLI, 2022). Esses antígenos também não induzem memória imunológica e, por isto, as vacinas polissacarídicas não induzem proteção duradoura nos indivíduos e devem ser empregadas apenas em casos de surtos de doenças. As doenças causadas por bactérias encapsuladas têm prevalência em crianças de faixa etária inferior a 18 meses. Entretanto, as células B responsáveis pelo reconhecimento e resposta aos polissacarídeos têm ontogenia tardia e somente estão presentes na zona marginal do baço de crianças com mais de 18 meses de idade. Sendo assim, a utilização de antígenos TI-2 como vacinas apenas é eficaz em indivíduos com idade superior a 18 meses.

Apesar da eficácia das vacinas polissacarídicas estar amplamente comprovada no controle de surtos e epidemias em adultos, novas abordagens têm sido propostas para modificação da natureza da resposta imunológica induzida por essas moléculas. Além disso, diversos estudos têm revelado que o uso de repetidas doses de vacinas contendo polissacarídeo meningocócico do grupo C ou da vacina 23-valente polissacarídica contra pneumococo, administrada em adultos, crianças e idosos, respectivamente, induziu hiporresponsividade imunológica (GOLD et al., 1975; TÖRLING et al., 2003). Os casos de tolerância evidenciados reforçam a substituição do polissacarídeo pelo polissacarídeo conjugado a proteínas carreadoras para a obtenção de um antígeno T-dependente, como componente vacinal (STEFANETTI; MACLENNAN; MICOLI, 2022).

5.1.5.2 Vacinas conjugadas (polissacarídeo – proteína carreadora)

A conjugação química de polissacarídeos a carreadores proteicos tem sido empregada em moléculas bacterianas de diferentes origens por meio da transformação

dos antígenos em T-dependentes, conseqüentemente, capazes de induzir memória imunológica. Essa abordagem é baseada no conceito de hapteno-carreador utilizado por Avery & Goebel (1929) e visa aumentar a imunogenicidade de um polissacarídeo por meio de sua ligação covalente com uma proteína, direcionando assim a produção de anticorpos contra a porção glicídica da molécula (AVERY; GOEBEL, 1929). As características de resposta humoral secundária obtidas pela cooperação entre as células B e T CD4 auxiliares, após imunização com antígenos conjugados, são decorrentes da ação de citocinas liberadas. Essas moléculas atuam na mudança de classe de imunoglobulinas e maturação da afinidade dos anticorpos após estimulação antigênica repetida. Os anticorpos selecionados com alta afinidade são mais eficientes para neutralizar a infectividade de microrganismos (SIEGRIST, 2017).

A plataforma de conjugação foi aplicada na obtenção e no licenciamento de vacinas de Hib, na década de 1980, em que o polissacarídeo foi conjugado à anatoxina tetânica (GlaxoSmithKline) ou às vesículas de membrana externa (VME) de MenB (Merck). Posteriormente, vacinas glicoconjugadas contra *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *S. Typhi* foram licenciadas e muitas outras estão em desenvolvimento (STEFANETTI; MACLENNAN; MICOLI, 2022). Em curto prazo, a ampla utilização desse tipo de vacina em diversas faixas etárias, incluindo crianças menores de 1 ano, reduziu em mais de 90% a incidência das doenças causadas por Hib em populações vacinadas de países desenvolvidos. Além disso, também reduziu o estado de portador assintomático, reduzindo a transmissão do microrganismo. Esse tipo de resposta é reconhecido como imunidade de rebanho e é responsável pelo controle efetivo das doenças causadas por bactérias encapsuladas que colonizam a nasofaringe dos hospedeiros. Diversos estudos mostraram que poucas vacinas tiveram tanto sucesso como a vacina conjugada contra Hib, apesar do alto custo da plataforma (MÄKELÄ et al., 2003; PELTOLA, 2000; STEFANETTI; MACLENNAN; MICOLI, 2022).

Os polissacarídeos capsulares são produzidos e conjugados individualmente e, depois, formulados de acordo com o número de sorotipos ou grupos da vacina. Do ponto de vista tecnológico, as vacinas conjugadas são consideradas as mais complexas e caras para produzir. Além disso, exigem testes de controle de qualidade bastante sofisticados. Para a liberação de um lote da vacina pneumocócica 10-valente, produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz, por exemplo, são necessários mais de 500 testes de controle de qualidade, desde a produção e purificação dos polissacarídeos, componentes intermediários e conjugados, até a formulação do produto final (LIMA, 2019).

Em geral, os polissacarídeos produzidos, controlados e liberados para a produção das vacinas polissacarídicas podem ser utilizados na reação de conjugação com diferentes tamanhos moleculares, desde que seja mantida sua antigenicidade, que por sua vez tem relação direta com o tamanho molecular. Dessa forma, os oligossacarídeos ou polissacarídeos devem conter um número sequencial e não modificado de unidades repetidas dentro da cadeia. Isto para preservar a estrutura adequada à indução de anticorpos que se ligarão ao polissacarídeo capsular no momento em que o indivíduo for exposto à bactéria. Outro aspecto importante é a possibilidade do peso molecular do polissacarídeo afetar a eficiência de conjugação, uma vez que a densidade ótima de carga de açúcar no conjugado depende do tamanho da cadeia polissacarídica (LIMA, 2019).

Existem cinco proteínas carreadoras principais utilizadas na produção dos conjugados, são elas: (i) anatoxina tetânica; (ii) anatoxina diftérica; (iii) toxina diftérica obtida de *C. diphtheriae* mutante (CRM197); (iv) proteína D derivada de *H. influenzae* não tipável; e (v) proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* grupos B e C (PMEs). Vacinas conjugadas para Hib, meningococos e pneumococos têm demonstrado boa segurança e imunogenicidade, independente da proteína carreadora utilizada, embora a anatoxina tetânica seja a proteína mais imunogênica e, conseqüentemente, a que induz maior resposta imunológica aos conjugados obtidos (LIMA, 2019).

Na conjugação, o polissacarídeo deve ser modificado quimicamente no início do processo para gerar grupos reativos que se liguem à proteína. Em seguida,

são obtidos os conjugados empregando-se diferentes métodos químicos, dependendo do tipo de grupo funcional presente nos componentes a serem conjugados e do peso molecular do polissacarídeo (Figura 5.1) (MCCARTHY; SHARYAN; SHEIKHI MOGHADDAM, 2018; STEFANETTI; MACLENNAN; MICOLI, 2022). Posteriormente, os conjugados são purificados e avaliados em ensaios de controle de qualidade, envolvendo a determinação da taxa de açúcar e proteína, assim como a avaliação do perfil cromatográfico e da massa molecular por espalhamento de luz dos componentes intermediários e conjugados. Avalia-se, ainda, o teor de açúcar livre, a identidade e integridade estrutural do conjugado por técnicas de RMN, dentre outras análises (BASTOS et al., 2015).

Em relação às vacinas meningocócicas conjugadas, existem algumas licenciadas. Três delas em apresentação monovalente para o grupo C (Meningitec – Pfizer, Menjugate – GlaxoSmithKline e NeisVac-C - Pfizer), uma em apresentação monovalente de baixo custo para o grupo A (MenAfriVac – Serum Institute da Índia), utilizada no cinturão da meningite na África. Outras três vacinas tetravalentes, contendo polissacarídeos dos grupos A, C, W e Y (Menveo – GlaxoSmithKline, Menactra – Sanofi-Pasteur e Nimerix - Pfizer). Por fim, vacinas conjugadas, contendo 10 e 13 sorotipos de pneumococos, também estão licenciadas para uso, Synflorix – GlaxoSmithKline e Prevnar13[®] - Pfizer, respectivamente (MCCARTHY; SHARYAN; SHEIKHI MOGHADDAM, 2018).

No Brasil, Bio-Manguinhos/Fiocruz é o único produtor das vacinas conjugadas para Hib e 10-valente pneumocócica. Além disso, o Instituto desenvolveu

BOX 5.1

O PARADOXO DAS VACINAS POLISSACARÍDICAS

As vacinas baseadas em antígenos polissacarídicos têm sido empregadas com sucesso contra importantes patógenos bacterianos (p. ex., *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*), salvando diversas vidas, como no surto de meningite no Brasil, ocorrido entre 1971 e 1974. Entretanto, apesar dos resultados positivos, a diversidade de sorotipos bacterianos gera uma situação semelhante ao fenômeno de resistência aos antimicrobianos – a pressão de seleção. Na prática, cada vez que utilizamos uma vacina que não cobre todos os sorotipos, ao eliminar os sorotipos cobertos, seja pela vacinação ou imunidade de rebanho, os demais sorotipos podem se disseminar. Essa característica implica na necessidade de geração de novos protótipos vacinais, em formulações contendo diversos sorotipos de polissacarídeos, gerando um desafio tecnológico e econômico. O exemplo prático são as vacinas polissacarídicas para pneumococo que, atualmente, se encontram na versão 23-valente. Diante desse quadro, diversos pesquisadores têm desenvolvido vacinas baseadas em alvos conservados, independente do sorotipo bacteriano. Um exemplo é a vacina da GSK (Bexsero), para meningococo grupo B, para o qual não está disponível uma vacina baseada em polissacarídeo.

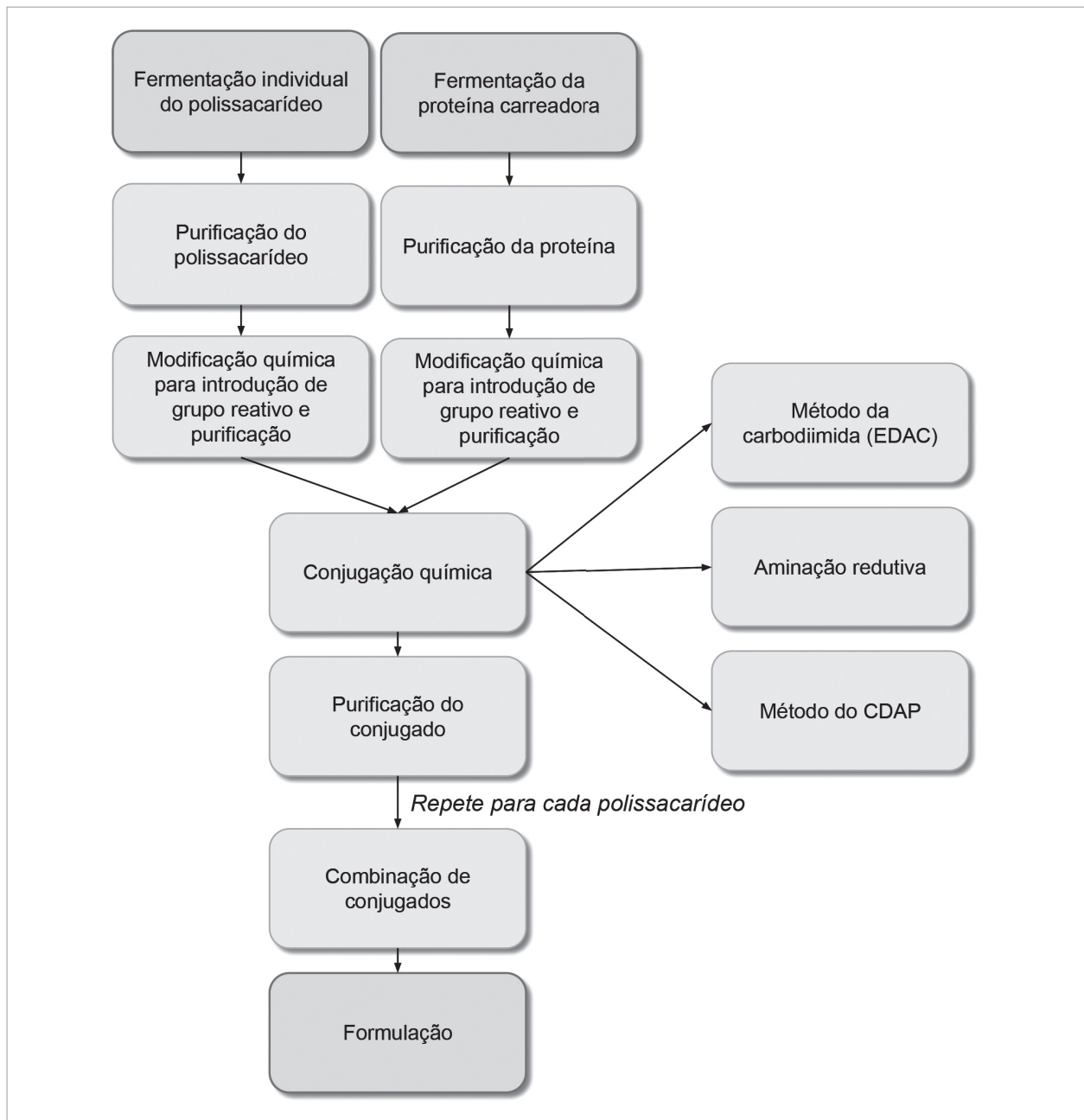


FIGURA 5.1 Fluxograma geral do processo de produção de vacinas conjugadas.

Fonte: adaptada de Josefsberg e Buckland (2012). CDAP: tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina.

todas as metodologias de conjugação, purificação, caracterização físico-química e imunológica e controle de qualidade da vacina meningocócica C conjugada, que foi avaliada no estudo clínico de Fase III em 2021 e, após a produção de lotes de consistência, será submetida ao registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para comercialização (SILVEIRA et al., 2007). O processo de desenvolvimento autóctone dessa vacina foi pioneiro no Brasil. Isto porque resultou não só em uma patente aprovada nos Estados Unidos como também

propiciou o estabelecimento de uma nova plataforma tecnológica de conjugação química. Essa plataforma foi utilizada, posteriormente, na obtenção de outras vacinas conjugadas contra bactérias encapsuladas de interesse epidemiológico no país, como, por exemplo, no desenvolvimento de uma vacina meningocócica W conjugada em escala piloto (DE SOUZA et al., 2021). Além disso, a plataforma também poderá ser utilizada na obtenção de biomoléculas conjugadas na área de Biofármacos e Reativos para Diagnóstico (JESSOUROUN et al., 2015).

5.1.6 Vacinas de subunidades baseadas em vesícula de membrana externa (VME)

A plataforma de utilização de VME como antígeno vacinal se aplica a bactérias Gram-negativas que têm a capacidade de gerar essas vesículas, de acordo com a Figura 5.2. As vesículas são estruturas esféricas e complexos antigênicos compostos de: (i) lipopolissacarídeo (LPS), (ii) fosfolipídeos, (iii) peptidoglicano, (iv) proteínas de membrana externa, (v) proteínas citoplasmáticas, (vi) proteínas do periplasma, (vii) componentes da parede celular, (viii) ácidos nucleicos, e (ix) metabólitos iônicos. Essas vesículas são liberadas para o meio, durante a fase exponencial de crescimento da bactéria. As vesículas constituem um importante fator de virulência do microrganismo. Elas desempenham um papel importante na aderência da bactéria com o hospedeiro, no envolvimento nas respostas ao estresse com a formação de biofilme, no *delivery* de moléculas inter e intraespécies, na resistência antimicrobiana e na modulação da resposta imunológica, induzindo evasão do sistema imunológico. As VME possuem ampla aplicação como componentes vacinais, adjuvantes, vetores vacinais capazes de expressar múltiplos antígenos após a bioengenharia das vesículas

e como veículos de *delivery* de drogas (CHENG et al., 2021; JAN, 2017).

A Figura 5.2 mostra a composição das VME, a seleção de carga e o carregamento como parte das VME. A produção de VME é obtida após o cultivo da bactéria. O processo fermentativo ocorre sob condições adequadas empregadas para aumentar o rendimento em VME, seguido de centrifugação do caldo fermentado para a retirada das células. Posteriormente, é realizada a concentração do sobrenadante empregando-se filtração tangencial e purificação por ultracentrifugação. As vesículas podem ser produzidas em larga escala e com rendimentos diferentes, dependendo do tipo de bactéria, mas representam uma produção de baixo custo (CHENG et al., 2021). Entretanto, esse complexo antigênico é muito reatogênico em função da presença de LPS residual. O LPS residual mantém a estrutura da vesícula intacta e, por ser potencialmente tóxico, deve ser depletado da VME pelo uso de detergentes, e avaliado em testes de controle de qualidade que assegurem uma baixa atividade pirogênica (JAN, 2017).

O polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* do grupo B (MenB) possui uma estrutura química semelhante a alguns tecidos humanos e, conseqüentemente, não é

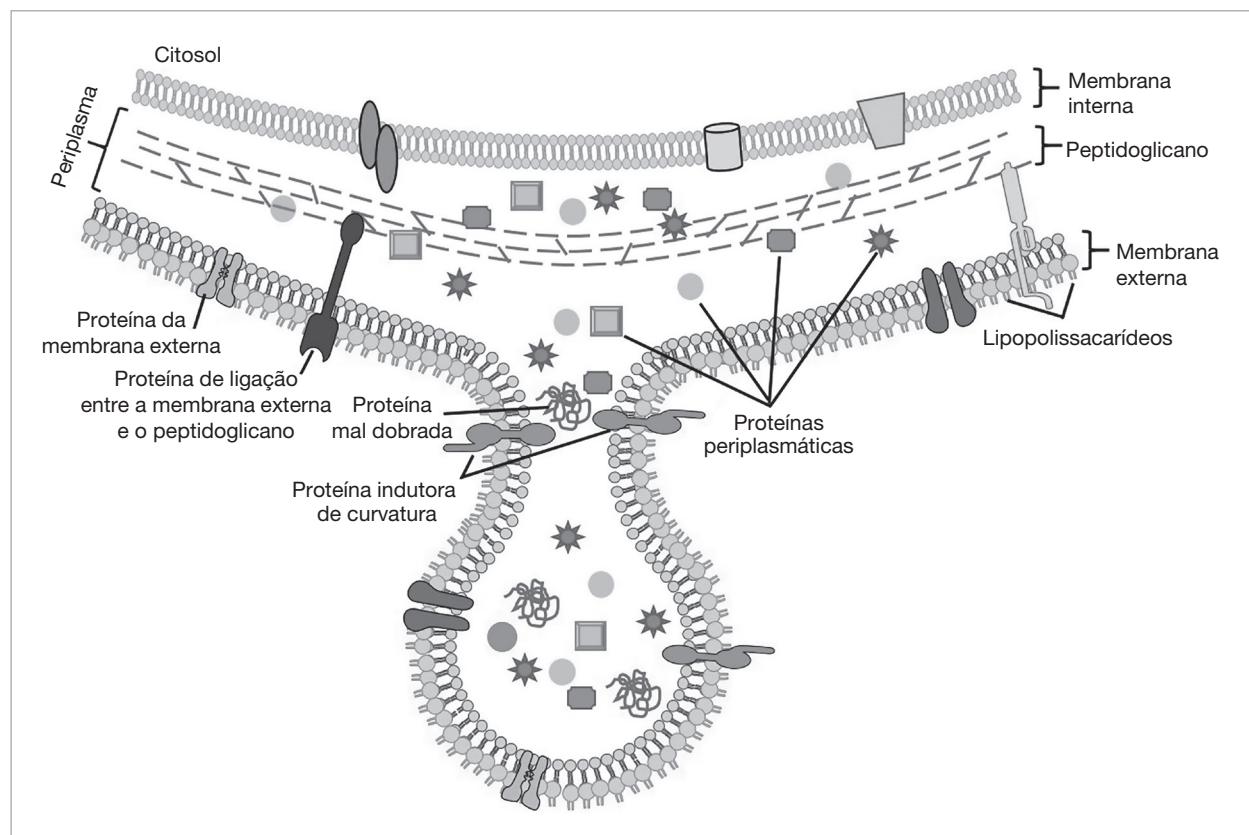


FIGURA 5.2 Biogênese da produção de vesícula de membrana externa (VME) na bactéria.

Fonte: traduzida de JAN (2017).

imunogênico. Dessa forma, o uso de VME como antígeno vacinal é muito promissor no desenvolvimento de vacinas efetivas contra o MenB. A primeira vacina baseada em VME foi licenciada para uso em Cuba, no ano de 1987 (MCCARTHY et al., 2018). Entretanto, apesar de a resposta imunológica induzida pelas proteínas de membrana externa ser relevante, existe a possibilidade de essas proteínas não serem conservadas nas cepas circulantes em diferentes regiões. Sendo assim, a utilização desse tipo de vacina é limitada, e elas são consideradas vacinas *tailor-made*, que devem ser produzidas empregando-se cepas circulantes selecionadas por meio de vigilância epidemiológica efetiva.

Existe outra vacina licenciada que utiliza VME da cepa NZ98/254 da Nova Zelândia. Essa vacina, conhecida como 4CMenB (Bexsero/GlaxoSmithKline), foi desenvolvida contendo três proteínas recombinantes: (i) proteína que liga a heparina – rNHBA, (ii) adesina A – rNadA e (iii) proteína que liga o fator H do complemento – rFHbp. Uma outra vacina também foi licenciada para MenB, composta de duas variantes antigênicas dos fatores de rFHbp (Trumenba/Wyeth). Ambas as vacinas foram desenvolvidas empregando-se uma abordagem que se baseia na análise do genoma da cepa de MenB MC58, com o intuito de identificar o repertório completo de antígenos de superfície (epítomos) que são antigênicos e altamente conservados em múltiplas cepas. Essa estratégia é denominada Vacinologia Reversa e foi aplicada para selecionar os epítomos com maior imunogenicidade presentes na bactéria. Os antígenos foram sequenciados, patenteados e avaliados em diferentes formulações vacinais. Nesse caso, objetivou-se alcançar um imunobiológico universal por meio do desenvolvimento de uma vacina que pudesse ser utilizada para a proteção de doenças causadas pelo MenB em todo o mundo. Inicialmente, 350 proteínas foram expressas e purificadas para utilização em imunização pré-clínica. Em seguida, 28 dessas proteínas foram selecionadas como capazes de induzir anticorpos com atividade bactericida, necessário para promover a morte bacteriana, além de serem conservadas entre cepas do grupo B (DELANY; RAPPUOLI; DE GREGORIO, 2014; MCCARTHY; SHARYAN; SHEIKHI MOGHADDAM, 2018).

Atualmente, está sendo observada a recrudescência gradual do estado de portador e da doença causada por MenB para os níveis de pré-vacinação. Sendo assim, com o objetivo de contornar a capacidade de extensa variação do microrganismo e consequente limitação de uso das atuais vacinas contra MenB, tem sido empregada recentemente outra abordagem conhecida como Vacinologia Reversa 2,0. Essa abordagem possibilita a identificação de células B presentes em indivíduos convalescentes da doença meningocócica causada pelo MenB ou em

indivíduos que foram vacinados com a vacina Bexsero, que sejam capazes de produzir anticorpos com atividade bactericida relevante. O isolamento desses anticorpos tem possibilitado a descoberta de novos epítomos/antígenos protetores que poderão ser incluídos em novas formulações vacinais para MenB ou outros grupos de meningococo e gonococo (BIDMOS et al., 2018).

Bio-Manguinhos/Fiocruz desenvolveu uma vacina baseada em VME de duas cepas prevalentes no país (N44/89 e N603/95) em combinação com o Lipo-oligosacarídeo (LOS) destoxificado da cepa N44/89, com o objetivo de aumentar a resposta cruzada e promover a prevenção mais eficaz da doença meningocócica causada pelo MenB. A vacina foi estudada em ensaios clínicos de fase II, nos quais demonstrou segurança e foi capaz de induzir uma boa resposta imunológica em crianças de 1 a 10 anos, que apresentaram elevados títulos de anticorpos com atividade bactericida. Entretanto, a limitação de uso desse tipo de vacina resultou na interrupção do projeto. As vacinas baseadas em VME não estão disponíveis para imunizar a população no PNI, estando disponíveis apenas em clínicas particulares.

5.1.7 Vacinas para bactérias multirresistentes

A resistência aos antimicrobianos (RAM) refere-se à crescente ameaça de bactérias e outros microrganismos que não respondem mais aos medicamentos antimicrobianos. As vacinas podem ser ferramentas altamente eficazes no combate à RAM. Reduzem a incidência de infecções resistentes e suscetíveis, diminuindo também o consumo de antibióticos. Os avanços na tecnologia de vacinas nas últimas décadas fizeram com que o desenvolvimento contra alvos anteriormente desafiadores fosse atualmente possível, com plataformas biotecnológicas (WHO, 2022). Com o passar do tempo, observou-se um aumento na oferta de vacinas e uma redução da oferta de novos antibióticos, conforme mostrado na Figura 5.3.

Os mecanismos de RAM podem ser divididos em três formas: (i) os que envolvem alvos ligados à biossíntese da parede celular (beta-lactâmicos e glicopeptídeos), (ii) alvos intracelulares, envolvidos na replicação do DNA (quinolonas) e na transcrição (rifamicinas); e (iii) alvos intracelulares envolvidos na síntese proteica (aminoglicosídeos, sinergistinas, macrolídeos e outras classes de antimicrobianos). Desse modo, as estruturas externas em bactérias resistentes e sensíveis são comuns. Em outras palavras, uma vacina desenvolvida contra uma bactéria sensível aos antimicrobianos será igualmente eficaz contra uma bactéria resistente.

Pode ser observado na Figura 5.3 que para algumas vacinas os candidatos são contados duas vezes, pois visam

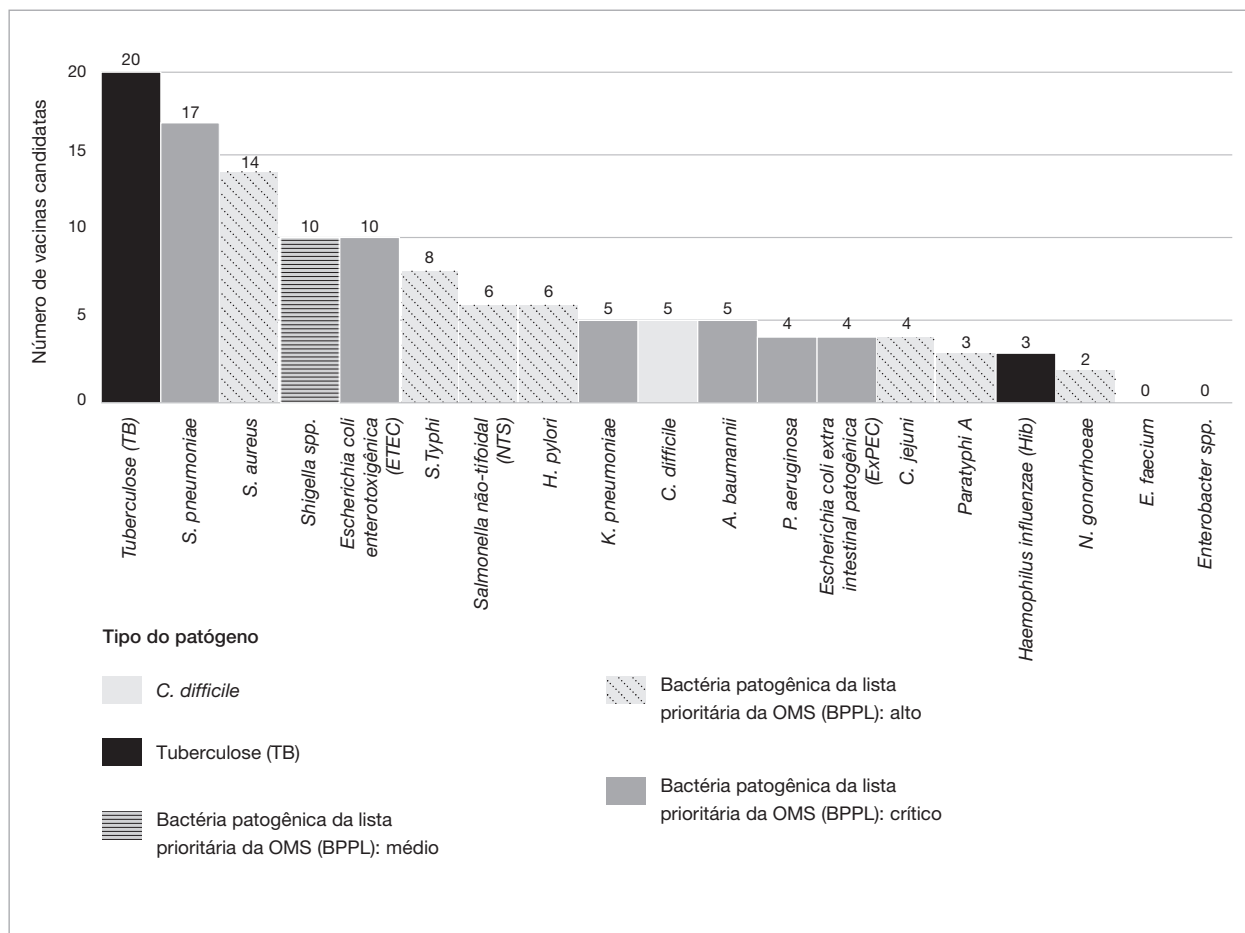


FIGURA 5.3 Total de vacinas candidatas em desenvolvimento pré-clínico por patógeno.

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica; ExPEC: *E. coli* patogênica extraintestinal; Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b; NTS: *Salmonella* não tifoide; lista de patógenos bacterianos prioritários; spp.: espécie; TB: tuberculose.

Fonte: adaptada de WHO (2022).

mais de um patógeno. O tipo de patógeno refere-se ao *status* definido pela lista de patógenos prioritários da OMS (WHO, 2022).

Embora a RAM tenha se manifestado frente a praticamente todos os antibióticos conhecidos, a resistência bacteriana a vacinas é uma questão menos preocupante. Em consequência, são altamente atraentes como ferramentas para combater a RAM. As vacinas fazem parte de uma resposta sustentável à RAM, pois previnem infecções sem selecionar para resistência a antibióticos, além de apresentarem uma relação custo-benefício mais vantajosa em relação ao uso de antimicrobianos.

Podem-se citar diversas vantagens na utilização dessas vacinas: (i) elas protegem a população de contrair infecções, diminuindo a incidência de infecções causadas por ambos os tipos de bactérias – resistentes e sensíveis aos antimicrobianos; (ii) previnem complicações, reduzindo as infecções secundárias, e diminuem a transmissão pela imunidade de rebanho (WHO, 2022);

(iii) uma vez efetivas, as vacinas levam à diminuição da utilização de antimicrobianos, o que proporciona a redução de pressão de seleção e a supressão da evolução da resistência; e (iv) expandem a vida útil dos antimicrobianos disponíveis, reduzindo a pressão pela busca de novas drogas para o tratamento das infecções por bactérias RAM.

5.1.7.1 Classificação das vacinas contra bactérias RAM

O recente documento da OMS – Vacinas Bacterianas em Desenvolvimento Clínico e Pré-Clínico em 2021: uma revisão e análise (WHO, 2022) – classificou em quatro grupos de patógenos, candidatos a vacinas em vários estágios de desenvolvimento clínico, com diferentes graus de viabilidade para o desenvolvimento de vacinas.

O primeiro grupo (Grupo A) contém patógenos com vacinas licenciadas. Existem vacinas contra quatro patógenos considerados prioritários para RAM: (i) *S.*

enterica serovar *Typhi*; (ii) *S. pneumoniae*; (iii) Hib; e (iv) *M. tuberculosis*. O segundo grupo (Grupo B) inclui patógenos com vacinas que estão em ensaios clínicos com alta viabilidade de desenvolvimento: (i) *Escherichia coli* (*E. coli*) patogênica extraintestinal (ExPEC); (ii) *S. enterica* serovar *Paratyphi A*; (iii) *Neisseria gonorrhoeae*; e (iv) *Clostridioides difficile*. O terceiro grupo (Grupo C) contém patógenos com candidatos a vacinas em ensaios clínicos iniciais ou com viabilidade de desenvolvimento de moderada a alta: (i) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *Klebsiella pneumoniae*; (ii) *Salmonella* não tifoide (NTS); (iii) *Campylobacter* spp; e (iv) *Shigella* spp. O quarto grupo (Grupo D) contém os seis patógenos restantes da lista de patógenos prioritários da OMS (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *E. faecium*, *S. aureus* e *H. pylori*). Esses patógenos foram considerados com baixa viabilidade para o desenvolvimento de vacinas devido aos desafios de desenvolvimento.

Além disso, outras prováveis razões para essa baixa prioridade devem-se às características dos quadros clínicos causados por esses patógenos (infecções hospitalares e dificuldade de identificação de uma população-alvo para vacinação em massa). Vacinas não estão disponíveis para o futuro imediato contra esses patógenos e mais pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de estratégias tradicionais (antibióticos) e alternativas

para o controle de infecções causadas por esse grupo de bactérias RAM.

De maneira geral, as infecções causadas por esses patógenos são oportunistas e necessitam de uma resposta imediata (terapêutica), inviabilizando as estratégias vacinais profiláticas. Na Figura 5.3, temos a distribuição de vacinas candidatas em fase pré-clínica por patógeno. Cita-se um exemplo de como essas vacinas podem atuar sobre a incidência de infecções por bactérias RAM: a introdução da vacina pneumocócica conjugada (PCV-7) em crianças nos EUA resultou em uma redução de 84% na doença invasiva causada pelos sorotipos de pneumococo (*S. pneumoniae*) resistentes a antimicrobianos, presentes na vacina, em crianças menores de 2 anos. Além disso, observou-se uma redução dos casos de doença invasiva pneumocócica na população acima de 65 anos em 49%, apesar de essa população não ter sido vacinada com a PCV-7, o que se subentende um efeito de imunidade de rebanho (GORDON et al., 2016).

Especial atenção deve ser direcionada às necessidades dos idosos que estão em alto risco de contrair doenças bacterianas graves, como pneumonia e bacteremia. Os adultos com mais de 65 anos são um grupo anteriormente negligenciado, porém as doenças bacterianas são responsáveis por mais morbidade e mortalidade do que em todos os demais grupos etários (POOLMAN, 2020).

BOX 5.2

COVID-19 E BACTÉRIAS RAM

A recente pandemia por SARS-CoV-2 levou a um aumento das infecções por bactérias RAM e que estão associadas a piores desfechos clínicos – internações prolongadas e aumento da mortalidade. Entre os fatores ligados a esse quadro, podem-se citar: (i) a sobrecarga da capacidade de atenção à saúde e às mudanças nas práticas rotineiras de prevenção e controle de infecções, como disponibilidade limitada e reutilização de luvas e aventais e modificação dos procedimentos de limpeza e desinfecção (OPAS, 2021); (ii) o uso de imunossupressores, que facilita a disseminação microbiana; e, principalmente, (iii) a utilização excessiva, muitas vezes desnecessária, de antimicrobianos, como a azitromicina, utilizada profilaticamente e sem comprovação científica de atividade contra SARS-CoV.

O aumento do uso de antibióticos acelerou a perda de atividade de medicamentos tanto de uso corrente, como os carbapenêmicos, uma classe de antibióticos altamente eficazes comumente usados para tratar infecções bacterianas graves ou de alto risco, quanto de medicamentos alternativos, como a colistina, usados como tratamento de último recurso para infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (OPAS, 2021). O uso de antibióticos em pacientes com SARS-CoV-2 durante a pandemia de covid-19 supera a incidência de infecções secundárias e coinfeções, o que sugere prescrição inadequada e excessiva. A taxa de uso de antibióticos no ambiente hospitalar (94 a 100%) foi muito superior à incidência notificada de infecção secundária (10 a 15%). Enquanto apenas 7 a 8% dos pacientes hospitalizados em geral e 14% dos pacientes de UTI apresentaram infecção secundária (sepsis, pneumonia nosocomial).

5.1.7.2 Vacinas virais e incidência de infecções bacterianas RAM

A vacinação contra vírus, embora fora do escopo das vacinas antibacterianas e RAM, reduz o número de pessoas que são suscetíveis a infecções bacterianas secundárias e requerem tratamento com antibióticos, assim como a quantidade de antibióticos prescritos inadequadamente para tratar infecções virais (WHO, 2022). Estima-se que a vacinação contra o rotavírus deverá prevenir 13,6 milhões de prescrições de antibióticos por ano para crianças menores de 5 anos em países de renda média e baixa (LEWNARD et al., 2020).

5.1.8 Vacinas de vetores bacterianos

As vacinas baseadas em vetores bacterianos têm se tornado cada vez mais atrativas devido à sua capacidade de induzir uma ampla gama de resposta imunológica, em especial imunidade de mucosa e sistêmica (humoral e celular). Elas podem ser baseadas em bactérias patogênicas geneticamente atenuadas ou por sucessivas passagens (cultivos) *in vitro*, bem como por bactérias não patogênicas. Entre as vantagens que as vacinas baseadas em vetores bacterianos apresentam, destacam-se: (i) facilidade de produção e escalonamento; (ii) baixo custo; (iii) múltiplas rotas de vacinação disponíveis, em especial a via oral para a geração de resposta imunológica de largo espectro; (iv) estratégias de atenuação de virulência conhecidas (exceção para vetores bacterianos não patogênicos); (v) os vetores vacinais bacterianos são em sua maioria suscetíveis aos antibióticos, de modo que em caso do surgimento de eventos adversos, o protocolo de vacinação possa ser interrompido com a eliminação do vetor bacteriano pelo uso de antimicrobiano adequado (LIN; VAN; SMOOKER, 2015); e (vi) as proteínas-alvo, carregadas por vetores bacterianos, ficam protegidas no interior da bactérias, garantindo maior estabilidade e menor degradação. Além disso, uma das principais vantagens dessas vacinas em relação à administração pelas vias de mucosa é sua capacidade de superar os obstáculos naturais frente ao antígeno administrado isoladamente nas mucosas. No caso de vetores bacterianos carregando informações genéticas, como vacinas de DNA, a proteína-alvo será processada corretamente pela célula hospedeira, sendo apresentada ao sistema imunológico para gerar resposta humoral e celular.

5.1.8.1 Vetores bacterianos atenuados por modificações genéticas

Basicamente, existem duas formas de atenuação genética: (i) pela deleção de genes essenciais envolvidos com sistemas de regulação/expressão de virulência; ou (ii) pela geração de mutantes auxotróficos (a bactéria

apenas sobrevive na presença de determinado composto essencial, que ela passa a não produzir mais) (LIN; VAN; SMOOKER, 2015). A maior parte das cepas de *S. enterica* utilizadas como vetores bacterianos é auxotrófica, gerada pela deleção ou mutação de genes essenciais para biossíntese de aminoácidos aromáticos (*aro*), guanidina (*gua*) ou purinas (*pur*) (LIN; VAN; SMOOKER, 2015). Nesse processo de atenuação, tanto em mutantes avirulentos ou auxotróficos, a imunogenicidade do vetor bacteriano é preservada. As vacinas baseadas em vetores bacterianos patogênicos atenuados, como os baseados em *Salmonella* e *Listeria*, conservam um nível residual de patogenicidade/virulência (essencial para indução de resposta imunológica). Além disso, apresentam possível risco de reversão do potencial patogênico, o que os torna não recomendados para vacinação em crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos (DUNSTAN; SIMMONS; STRUGNELL, 2003).

5.1.8.2 Vetores bacterianos baseados em bactérias não patogênicas (bactérias do ácido láctico)

As bactérias do ácido láctico (BAL), largamente utilizadas na indústria de alimentos (iogurtes e probióticos), estão presentes no intestino da maior parte dos mamíferos, incluindo o homem. Elas são classificadas como microrganismos GRAS (*generally recognized as safe*). Entre as BAL, *Lactococcus lactis* é a espécie que tem sido mais empregada como vetor vacinal bacteriano. Ela é a bactéria desse grupo (GRAS) mais bem caracterizada e considerada modelo, em razão das seguintes características: (i) possui seu genoma completamente sequenciado; (ii) é geneticamente fácil de ser manipulada; e (iii) muitas ferramentas genéticas foram desenvolvidas para essa bactéria. Elas podem ser desenvolvidas para a apresentação de proteínas terapêuticas (antígenos), nas mucosas, bem como veículo para vacinas de DNA, promovendo eficiente liberação de DNA em células eucarióticas (PONTES et al., 2011).

5.1.8.3 Vetores bacterianos baseados em BCG

Conforme relatado no tópico 5.1.1, a vacina BCG é a mais utilizada no mundo, com mais de três bilhões de pessoas vacinadas, desde 1921 (BASTOS et al., 2009). Devido às suas características de segurança, robustez e propriedades adjuvantes, o BCG vem sendo considerado um atrativo vetor para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (rBCG) para apresentação de antígenos diversos. Os avanços no conhecimento da genética do BCG aliados ao desenvolvimento de sistemas de clonagem e expressão proteica mais eficientes têm aumentado a quantidade de estudos utilizando o BCG como vetor vacinal. Por ser uma bactéria intracelular, ela é capaz de

gerar resposta imunológica celular e humoral. O rBCG mantém todas as características do BCG. O rBCG também foi investigado como um veículo para a entrega de antígeno contra diferentes patógenos. É possível construir cepas de rBCG que expressem diferentes antígenos de vírus, bactérias ou parasitas. Isto resulta na ativação de células e/ou resposta imunológica humoral dependendo do vetor e antígeno. Diferentes cepas de rBCG expressando antígenos específicos induziram proteção contra o desafio com o respectivo patógeno, incluindo *Borrelia burgdorferi*, *S. pneumoniae*, *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum* e *Schistosoma mansoni* (BASTOS et al., 2009). Os estudos de rBCG também estão focados em melhorar a eficácia da vacina BCG contra a tuberculose (DE QUEIROZ et al., 2020).

5.2 O PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE VACINAS BACTERIANAS E A PRESENÇA DA BIOTECNOLOGIA NESTE CONTEXTO

Instituições públicas e privadas têm investido significativamente no desenvolvimento rápido de novas vacinas e no processo de produção de imunobiológicos, reconhecendo sua importância no contexto da Saúde Pública. Isto porque as vacinas são a forma mais eficaz de prevenir morte e morbidade causadas por doenças infecciosas (DELANY; RAPPUOLI; DE GREGÓRIO, 2014; PLOTKIN et al., 2017). O investimento constante em Ciência e Tecnologia e a realização de estudos da capacidade produtiva e de absorção de novas tecnologias permitem a sustentabilidade da produção local de vacinas.

Nesse contexto, a Biotecnologia desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de plataformas tecnológicas que propiciem a obtenção de diferentes gerações de vacinas. Os avanços biotecnológicos impactam diretamente no processo de desenvolvimento de uma vacina, ou seja, deve-se ter constante atualização dos processos empregados durante as etapas de desenvolvimento, de acordo com as novas tecnologias emergentes, com o intuito de garantir maior segurança e eficácia dos produtos. Além disso, a Biotecnologia possibilita a resolução de gargalos e problemas tecnológicos, com o objetivo de melhorar o uso adequado das vacinas. Essas ações podem resultar na obtenção, por exemplo, de vacinas adaptadas aos países em desenvolvimento, que possuem dificuldades para a manutenção da cadeia de frio etc.

A escolha da plataforma tecnológica a ser empregada no desenvolvimento de uma vacina específica ou da estratégia vacinal pode ocorrer de diferentes formas, de acordo com as tecnologias vigentes e disponíveis.

As vacinas bacterianas de primeira geração foram inicialmente produzidas empregando-se a plataforma de células inteiras, vivas e atenuadas ou mortas e inativadas, baseadas no conhecimento disponível na época. Essas vacinas induziam boa resposta imunológica, mas eram altamente reatogênicas. Posteriormente, o processo biotecnológico evoluiu para a obtenção de vacinas de segunda geração, com o isolamento de componentes ou subunidades do microrganismo (toxinas, polissacarídeos e VME), o que propiciou redução da reatogenicidade e da resposta imunológica, exigindo, muitas vezes, o uso de adjuvantes. Em seguida, vieram as vacinas conjugadas, com uma plataforma de ligação química de polissacarídeos capsulares a uma proteína carreadora, acarretando maior complexidade ao processo produtivo, mas resultando em melhoria da resposta imunológica e ampliação da faixa etária a ser imunizada (POLLARD; BIJKER, 2021). A partir disso, é extremamente importante citar as promissoras abordagens/estratégias surgidas no século XXI, como a Vacinologia Reversa e, mais recentemente, a Vacinologia Reversa 2,0, com o intuito de identificar o repertório completo de antígenos de superfície ou epítomos que são antigênicos e altamente conservados em múltiplas cepas (DELANY; RAPPUOLI; DE GREGÓRIO, 2014; LIMA, 2019). Essas abordagens propiciaram a obtenção de vacinas de terceira geração, que ainda se encontram em estágio experimental, mas que constituem uma tecnologia portadora do futuro.

Considerando esse contexto, deve-se compreender a complexidade do processo que abrange as etapas de pesquisa e desenvolvimento de uma vacina, assim como os respectivos testes de controle de qualidade em processo e do produto final. Mesmo as etapas de fabricação mais simples são difíceis de executar, considerando a variabilidade dos resultados de bioprocessos. Dessa forma, a consistência torna-se um aspecto importante do processo de produção de vacinas. Os dados laboratoriais, pré-clínicos e clínicos, obtidos com o emprego das Boas Práticas (BPx) durante o desenvolvimento de uma nova vacina, devem ser revisados pela agência regulatória, para assegurar segurança, eficácia, pureza e potência.

Estudos adicionais também podem ser exigidos para esclarecer questões específicas sobre eficácia, efetividade ou possíveis eventos adversos. Todos esses resultados devem compor um dossiê que descreva metodologia, insumos, condições de trabalho etc. Essas ações garantem a rastreabilidade de todo e qualquer procedimento realizado durante o andamento do estudo, o que possibilita um processo de desenvolvimento mais fluido e com melhores resultados. Dessa forma, gerenciar esses riscos é extremamente importante, uma vez que a falha no gerenciamento pode afetar não apenas o pleno

andamento da produção, mas também o fornecimento de imunizantes à população.

Com o intuito de garantir segurança e eficácia, os órgãos regulatórios, no caso do Brasil a Anvisa, aprovam não apenas a vacina a ser comercializada, mas também os processos pelos quais ela é produzida, testada e liberada para uso (PLOTKIN et al., 2017). Salienta-se a descontinuidade a que essas etapas estão sujeitas, visto que nem sempre os resultados são satisfatórios. Porém, é essencial que tais resultados sejam revistos e, caso necessário, que os processos realizados sejam refeitos até que se alcance o resultado adequado. Além disso, a vacina desenvolvida deve estar de acordo com especificações de liberação que garantam armazenamento e estabilidade do produto, confirmados por meio de estudos de estabilidade a longo prazo. As atividades sempre devem ser realizadas de acordo com o processo produtivo da vacina em questão, uma vez que os diferentes tipos de vacina requerem diferentes desenvolvimentos com complexidades distintas (PLOTKIN et al., 2017).

Todo esse processo deve ser realizado em conformidade com as normas, procedimentos, regulamentos etc., o que significa que tal desenvolvimento não configura um processo linear, direto e simples, mas um processo complexo e que garante etapas e produto final obtidos com qualidade (GOMEZ; ROBINSON, 2018).

Durante o ciclo de desenvolvimento de uma vacina, ocorrem estudos que visam ampliar os conhecimentos acerca do aumento da escala do cultivo do microrganismo de interesse, com seleção dos parâmetros para o escalonamento do bioprocessamento e ensaios para determinar os rendimentos em diferentes condições de cultivo. Da mesma forma, devem ser estabelecidos procedimentos de purificação em volumes maiores, com o objetivo de avaliar o potencial da produção de um produto. Concomitantemente, a reprodutibilidade dos resultados deve ser testada por meio da repetição dos procedimentos com a produção de lotes de consistência, para garantir a estabilidade do processo de desenvolvimento, antes da solicitação do registro à agência regulatória (DOUGLAS; SAMANT, 2018).

A produção de vacinas bacterianas é composta de várias etapas que resultam no produto acabado. A primeira etapa é a geração do antígeno que será utilizado para induzir uma resposta imunológica por meio da realização de bioprocessos. Essa etapa, também chamada de *upstream*, inclui a obtenção do próprio patógeno para a subsequente inativação ou isolamento de algum componente ou, ainda, a obtenção de uma proteína recombinante derivada do microrganismo. As bactérias são cultivadas em biorreatores, em processos fermentativos, utilizando-se um meio de cultivo desenvolvido para otimizar o rendimento do antígeno e a manutenção

de sua integridade. Uma proteína recombinante pode ser produzida empregando-se uma bactéria, levedura ou cultura de célula. Nessa etapa deve ser estabelecido um banco de células *master* ou uma coleção inicial de células, completamente caracterizadas e mantidas para todo o processo de produção. A partir do banco de células *master*, é originado um banco de células de trabalho, que será utilizado na rotina para a produção dos lotes.

A próxima etapa é o isolamento do antígeno do meio de cultivo, constituindo a etapa de *downstream* ou purificação do produto de interesse. Durante a etapa de *downstream*, são empregadas operações unitárias de centrifugação e ultrafiltração para a retirada de células. As diferentes moléculas são obtidas com o emprego de diversas metodologias. Para os polissacarídeos capsulares são utilizados métodos de extração fenólica, precipitação com detergente e precipitação alcoólica, diafiltração ou cromatografia. O isolamento de proteínas é obtido com o fracionamento com sulfato de amônio, enquanto conjugados são produzidos com o emprego de ultrafiltração ou cromatografia etc. (GOMEZ; ROBINSON, 2018).

Finalmente, vale ressaltar que as etapas de desenvolvimento de uma vacina configuram um processo longo, em torno de 10 a 15 anos, complexo e de alto custo. Esse processo é minucioso, no que se refere ao cumprimento de normas e procedimentos cada vez mais exigentes e necessita de equipes multidisciplinares, capazes de atender a todos os requerimentos de regulamentação, garantindo, assim, um desenvolvimento seguro e um produto final eficaz e de alta qualidade. Porém, deve ser considerado que o aumento na demanda por vacinas e o aprimoramento das tecnologias envolvidas têm influenciado fortemente no desenvolvimento de novas vacinas e tecnologias de fabricação. Citam-se como exemplo as vacinas destinadas a covid-19, que foram desenvolvidas em tempo recorde e com tecnologias inovadoras, como a vacina da Pfizer/BioNTech, que utiliza a tecnologia de RNA mensageiro (vacina de ácido nucleico). A aceleração do desenvolvimento dessas vacinas ressalta a importância do estabelecimento de plataformas tecnológicas, que disponibilizam conhecimentos e informações relacionados às vacinas que já vêm sendo desenvolvidas. Dessa forma, as plataformas tecnológicas possibilitam desenvolvimento rápido e seguro de novos produtos em situações sanitárias emergenciais (DOUGLAS; SAMANT, 2018).

5.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS E RECOMENDAÇÕES SOBRE VACINAS BACTERIANAS

Diversas doenças de etiologia bacteriana são evitadas por vacinas. Parte dessas vacinas é disponibilizada pelo Ministério da Saúde no Brasil, conforme apresentado no

QUADRO 5.2 Vacinas bacterianas relevantes no contexto epidemiológico atual do Brasil

Vacina	Agente infeccioso	Doença evitada
BCG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose
DT	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Clostridium tetani</i>	Difteria Tétano
DTP	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Bordetella pertussis</i>	Difteria Tétano Coqueluche
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib)	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib)	Doença invasiva por Hib
DTP + Hib + Hepatite B (HB)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib) Vírus da hepatite B*	Difteria Tétano Coqueluche Doença invasiva por Hib Hepatite B
Meningocócica C conjugada	<i>Neisseria meningitidis</i> grupo C	Meningite e infecções generalizadas
Meningocócica ACWY conjugada	<i>Neisseria meningitidis</i> grupos A, C, W e Y	Meningite e infecções generalizadas
Pneumocócica conjugada 10-valente	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	Doença pneumocócica invasiva, pneumonia e otite média aguda
Pneumocócica conjugada 13-valente	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	Doença pneumocócica invasiva, pneumonia e otite média aguda
Pneumocócica 23-valente	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F	Doença pneumocócica invasiva e pneumonia
Febre tifoide	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	Febre tifoide

*Componente não bacteriano da vacina Pentavalente.

Fonte: Elaborado pelos autores, baseado em Ministério da Saúde (2019, 2022b e 2022c).

Quadro 5.2 e descrito nas seções que seguem. Entretanto, outras vacinas estão apenas disponíveis em clínicas privadas de vacinação.

5.3.1 Tuberculose

Tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *M. tuberculosis*, que afeta predominantemente os pulmões, podendo acometer também outros órgãos e sistemas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). É uma doença de transmissão aérea que ocorre a partir da inalação de aerossóis produzidos pela tosse, espirros ou fala de indivíduos com tuberculose pulmonar ou laríngea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). O risco de adoecimento é maior nos primeiros dois anos após a primoinfecção, porém, uma vez infectado, o indivíduo pode adoecer em qualquer momento da vida. Os bacilos ficam encapsulados em estado latente, em pequenos focos quiescentes que não progridem nem provocam o adoecimento, fenômeno que é conhecido como infecção latente da tuberculose (ILT). A probabilidade de uma pessoa com a ILT desenvolver a tuberculose ativa

depende de múltiplos fatores relacionados ao bacilo, ao ambiente e à competência imunológica do hospedeiro. Há maior risco de adoecimento em pessoas com doenças imunossupressoras ou em vigência de tratamentos imunossupressores, além de menores de 2 anos ou maiores de 60 anos e pessoas desnutridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). A ocorrência da tuberculose não confere proteção contra infecções futuras ou recidivas da doença.

5.3.1.1 Vacina BCG

Vacina contra tuberculose disponível no Brasil, distribuída gratuitamente pelo PNI, no calendário rotineiro de vacinação das crianças, composta por bacilos vivos atenuados. É administrada por via intradérmica, em dose única, o mais precocemente possível, idealmente, logo após o nascimento. Pode ser aplicada até os 4 anos, 11 meses e 29 dias, sendo permitida aplicação simultânea com outras vacinas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). Essa vacina não previne a forma pulmonar da doença, mas previne o desenvolvimento de formas graves, como a tuberculose miliar e a meníngea. A vacina faz parte do calendário básico de vacinação das crianças

e não está disponível nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIEs) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

5.3.2 Difteria

A difteria é uma doença infecciosa aguda, contagiosa, potencialmente fatal, causada pelo *C. diphtheriae*. O microrganismo é um bacilo Gram-positivo irregular, pleomórfico, não esporulado, que pode produzir uma exotoxina de origem proteica, a toxina diftérica. Essa toxina consiste no principal fator de virulência da bactéria (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). O bacilo, frequentemente, se aloja nas amígdalas, faringe, laringe, fossas nasais e, ocasionalmente, em outras mucosas e na pele, causando placas pseudomembranosas típicas da difteria. Sua transmissão ocorre pelo contato direto de pessoa doente ou portadora com pessoa suscetível, por meio de gotículas de secreção respiratória, eliminadas por tosse, espirro ou ao falar. Em casos raros, pode ocorrer a contaminação por fômites. O período de incubação, em geral, é de um a seis dias, podendo ser mais longo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). A difteria é uma doença imunoprevenível e existem algumas vacinas disponíveis no calendário básico de vacinação do Ministério da Saúde, segundo a faixa etária, e vacinas indicadas para grupos específicos, oferecidas nos CRIEs (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). As vacinas contra difteria são combinadas, isto é, indicadas para prevenção de mais doenças e estão descritas a seguir.

5.3.2.1 Vacina dupla bacteriana – contra difteria e tétano (DT ou dT)

Existem duas vacinas combinadas que protegem contra duas doenças, a difteria e o tétano, oferecidas gratuitamente pelo Ministério da Saúde. A dupla bacteriana do tipo infantil (DT) apresenta na sua composição uma menor concentração da anatoxina diftérica em comparação com a vacina dupla bacteriana do tipo adulto (dT), cuja concentração é a mesma da vacina DTP.

A vacina dupla do tipo infantil (DT) é indicada para crianças com menos de sete anos para as quais haja contra-indicação de receberem a vacina contra a coqueluche (componente pertussis = P) da vacina tríplice DTP. O esquema de administração é o mesmo utilizado para a vacina tríplice DTP. Nos CRIEs, a vacina DT (crianças) está disponível para os casos de encefalopatia nos sete dias subsequentes à administração de dose anterior das vacinas Penta, DTP ou DTPa (LIN; VAN; SMOOKER, 2015). A vacina dupla do tipo adulto (dT) é indicada a partir de sete anos a pessoas que não receberam nenhuma dose da vacina tríplice DTP ou da vacina dupla do tipo infantil (DT), ou ainda não completaram o

esquema básico com uma dessas vacinas. Pessoas cujo estado vacinal não seja conhecido também devem ser vacinadas com a vacina dT. É, ainda, empregada como reforço da vacinação efetuada com a tríplice DTP ou com a dupla do tipo infantil (DT). Está disponível no calendário básico de vacinação e pode ser adotado um dos seguintes esquemas (por questão operacional tem-se optado por um ou outro esquema nas diferentes regiões do país) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014):

- Três doses aplicadas com intervalo de dois meses, mínimo de um mês entre a primeira e a segunda, e de seis meses entre a segunda e a terceira (esquema 0, 2, 8);
- Três doses aplicadas com intervalos de dois meses, mínimo de um mês (esquema 0, 2, 4).

Além dessas doses, reforços são indicados de dez em dez anos, por toda a vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Nos CRIEs, a dT (adultos) não tem nenhuma indicação adicional à rotina e está disponível para as situações em que haja necessidade de vacinar sob observação, como pacientes com história de alergia grave à vacina ou a algum de seus componentes. Também poderá ser aplicada, nas indicações de rotina, concomitantemente com vacinas especiais quando essas justificarem a visita ao CRIE (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

5.3.3 Tétano

O tétano é uma doença infecciosa não contagiosa, causada pela ação de exotoxinas produzidas pelo *C. tetani*, um bacilo Gram-positivo, anaeróbico, que é, normalmente, encontrado na natureza, sob a forma de esporos, podendo ser identificado em pele, fezes, terra, galhos, arbustos, águas putrefatas, poeira das ruas e trato intestinal dos animais, sem causar doença. A infecção do homem ocorre pela introdução de esporos em solução de continuidade da pele e de mucosas (ferimentos superficiais ou profundos de qualquer natureza). Em condições favoráveis de anaerobiose (tecidos desvitalizados, corpos estranhos, isquemia), os esporos se transformam em formas vegetativas, e os bacilos, responsáveis pela produção das toxinas tetanolisina e tetanospasmina, provocam estado de hiperexcitabilidade do sistema nervoso central.

O tétano pode acometer também os recém-nascidos (primeiros 28 dias de vida) a partir da contaminação do cordão umbilical, durante a sua manipulação, ou por meio de procedimentos inadequados realizados no coto umbilical, quando se utilizam substâncias, artefatos ou instrumentos contaminados com esporos. É uma doença imunoprevenível e para sua profilaxia estão indicadas

as vacinas DT e dT, nos mesmos esquemas e condições descritas no item 5.3.2.

5.3.4 Coqueluche

A coqueluche é uma doença infecciosa aguda, de alta transmissibilidade, importante causa de morbidade e mortalidade infantil. Compromete especificamente o aparelho respiratório (traqueia e brônquios) e se caracteriza por paroxismos de tosse seca, podendo evoluir com complicações e óbitos em lactentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). É causada pela *B. pertussis*, um cocobacilo Gram-negativo, aeróbio, não esporulado, provido de cápsula (formas patogênicas) e de fímbrias. O ser humano é o único reservatório natural e a sua transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto entre a pessoa doente e a pessoa suscetível, por meio de gotículas de secreção da orofaringe eliminadas durante a fala, a tosse e o espirro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). O período de incubação é de 5 a 10 dias em média, podendo variar de 4 a 21 dias e chegar, raramente, até 42 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). As manifestações clínicas clássicas apresentam-se em três fases: (i) catarral; (ii) paroxística; e (iii) convalescente. Os lactentes com idade inferior a 6 meses de vida constituem o grupo especialmente propenso a apresentar formas graves, potencialmente fatais. Para prevenção da coqueluche, estão disponíveis as vacinas combinadas DTP, DTPa e dTpa, que agregam o componente pertussis às vacinas DT e dT, que mantêm a sua indicação para prevenção do tétano e difteria, além da profilaxia para coqueluche. As vacinas DTP, DTPa e dTpa são oferecidas pelo Ministério da Saúde.

No calendário rotineiro de vacinação das crianças, são indicadas três doses de vacina contendo o componente pertussis (atualmente, é feita a vacina penta DTP + Hib + Hepatite B, que será descrita adiante) e reforços aos 15 meses com a vacina tríplice bacteriana (DTP). Em situações especiais, está contraindicada a vacina DTP, sendo indicada sua substituição pela vacina DTPa (com componente pertussis acelular – vacina de subunidade), aplicada nos CRIEs (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

5.3.4.1 Vacina DTP

A vacina DTP (tríplice bacteriana) agrega o componente pertussis de célula inteira (vacina inativada) à vacina contendo os componentes difteria e tétano, sendo indicada para a prevenção dessas três doenças. Em função da maior reatogenicidade do componente pertussis celular, o principal responsável por eventos adversos indesejáveis, tais como febre, choro e irritabilidade, além de outros potencialmente mais graves, como

convulsões e síndrome hipotônico-hiporresponsiva, está contraindicada a vacina DTP em situações especiais, sendo indicada sua substituição por vacinas contendo o componente pertussis acelular (subunidade), menos reatogênicas, DTPa ou dTpa, disponibilizadas pelo PNI nos CRIEs, de acordo com a faixa etária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

5.3.4.2 Vacina DTPa

A vacina DTPa apresenta o componente pertussis acelular que é menos reatogênico que o componente celular presente na DTP ou na Pentavalente (DTP+Hib+HB). A vacina DTPa está disponível nos CRIEs, nas indicações específicas até a idade de seis anos, 11 meses e 29 dias. A partir dessa idade, a literatura recomenda a vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis acelular adulto (dTpa).

Indicações de DTPa (criança) no CRIE (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019):

- Eventos adversos graves ocorridos após a aplicação de DPT ou Penta: convulsão nas primeiras 72 horas após a vacinação; síndrome hipotônico-hiporresponsiva nas primeiras 48 horas após a vacinação.
- Crianças com risco aumentado de desenvolvimento de eventos graves à vacina com o componente pertussis celular: doença convulsiva crônica; cardiopatias ou pneumopatias crônicas com risco de descompensação em vigência de febre; doenças neurológicas crônicas incapacitantes; recém-nascido (RN) que permaneça internado na unidade neonatal por ocasião da idade de vacinação; prematuro extremo (menos de 1.000 g ou 31 semanas).
- Preferencialmente, nas seguintes situações de imunodepressão: pacientes com neoplasias e/ou que necessitem de quimioterapia, radioterapia ou corticoterapia; pacientes com doenças imunomediadas que necessitem de quimioterapia, corticoterapia ou imunoterapia; transplantados de órgãos sólidos e células-tronco hematopoiéticas (transplante de medula óssea – TMO).

5.3.4.3 Vacina dTpa

Aplicada nos CRIEs, em adultos, respeitando as seguintes indicações do Ministério da Saúde:

- Gestantes a partir de 20 semanas de gestação e puérperas;
- Todos os profissionais de saúde, principalmente os grupos de profissionais de saúde que atuam em maternidades e em unidades de internação neonatal (UTI/UCI convencional e UCI Canguru);
- Transplantados de células-tronco hematopoiéticas (TMO).

Para gestantes, puérperas e profissionais de saúde, essa vacina (dTpa) está disponível na rede de saúde. Nos CRIEs, poderá ser aplicada, nas indicações preconizadas, quando o paciente receber outras vacinas especiais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

5.3.5 Doença invasiva causada por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)

O *H. influenzae* é uma bactéria Gram-negativa que pode ser classificada em seis sorotipos (A, B, C, D, E, F), a partir da diferença antigênica da cápsula polissacarídica. O *H. influenzae*, desprovido de cápsula, encontra-se nas vias respiratórias de forma saprófita, podendo causar infecções assintomáticas ou doenças não invasivas, tais como bronquite, sinusite e otite, tanto em crianças quanto em adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). A doença invasiva pelo Hib é caracterizada por ocorrência de sepsse ou meningoencefalite. A sua transmissão ocorre de pessoa a pessoa, pelas vias respiratórias, a partir de gotículas e secreções de nasofaringe. As crianças com idade inferior a 5 anos, especialmente, aquelas menores de 1 ano, são mais suscetíveis à doença invasiva. É uma doença imunoprevenível, com vacina específica para o Hib disponibilizada pelo Ministério da Saúde, tanto no calendário rotineiro de vacinação das crianças quanto para grupos especiais nos CRIEs (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

5.3.5.1 Vacina penta (DTP + Hib + hepatite B)

A vacina é indicada para prevenção da difteria, tétano, coqueluche, doença invasiva por Hib e hepatite B. Faz parte do calendário rotineiro de vacinação das crianças menores de 5 anos pelo PNI, sendo recomendada a sua aplicação aos 2, 4 e 6 meses de idade. São necessárias doses de reforço com a vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis (DTP), que devem ser administradas aos 15 meses e aos 4 anos de idade.

5.3.5.2 Vacina *Haemophilus influenzae* tipo b

A vacina isolada para o Hib é restrita a situações especiais e está disponível nos CRIEs para as seguintes indicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019): necessidade de substituição de pentavalente por DTPa + Hib + hepatite B; transplantados de células-tronco hematopoiéticas; asplenia anatômica ou funcional; HIV; imunodeficiências congênitas; imunossupressão por medicamentos ou devido a câncer; diabetes mellitus; doença renal crônica; trissomias; cardiopatias crônicas; pneumopatias crônicas; fibrose cística; fistula liquórica; doenças de depósito; transplante de órgãos sólidos; doença neurológica incapacitante; implante de cóclea. O número de doses vai depender da idade do indivíduo:

- **2 a 6 meses:** três doses no esquema primário, com intervalo de 60 dias e reforço entre 12 e 15 meses;
- **7 a 11 meses:** duas doses no esquema primário, com intervalo de 4 a 8 semanas e reforço entre 12 e 15 meses;
- **Maiores de 12 meses:** duas doses, com intervalo de 4 a 8 semanas se imunocomprometido ou dose única se imunocompetente.

5.3.6 Doença meningocócica

A doença meningocócica é uma infecção bacteriana aguda que pode se apresentar como doença invasiva, sendo a meningite meningocócica a forma mais frequente, e a meningococcemia a mais grave. É causada pela *N. meningitidis* (meningococo), um diplococo Gram-negativo, cuja composição antigênica da cápsula polissacarídica permite a sua classificação em 12 diferentes grupos: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z. Os grupos A, B, C, Y, W e X são os principais responsáveis pela ocorrência da doença invasiva e epidemias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). O ser humano é o reservatório do meningococo, sendo a nasofaringe o local de colonização do microrganismo.

A colonização assintomática da nasofaringe pela *N. meningitidis* caracteriza o estado de portador, mais frequente em adolescentes, adultos jovens e em camadas socioeconômicas menos privilegiadas. Após a colonização da nasofaringe, a probabilidade de desenvolver doença meningocócica invasiva depende da virulência da cepa, das condições imunológicas do hospedeiro e da capacidade de eliminação do agente na corrente sanguínea, pela ação de anticorpos séricos com atividade bactericida mediada pela ativação do complemento, além da função esplênica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). O grupo etário de maior risco para o adoecimento é composto pelas crianças menores de 5 anos, especialmente as menores de 1 ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). A transmissão do meningococo ocorre pelo contato direto pessoa a pessoa, a partir de secreções respiratórias de pessoas infectadas, assintomáticas ou doentes. O seu período de incubação é curto, de três a quatro dias em média, podendo variar de dois a dez dias. A infecção meningocócica pode apresentar um amplo espectro clínico, variando desde febre transitória e bacteremia oculta até formas mais graves, como a meningite meningocócica e a meningococcemia, que são as formas clínicas mais frequentes, internacionalmente conhecidas por doença meningocócica. A doença meningocócica é uma condição imunoprevenível para a qual existem vacinas disponíveis, algumas das quais são disponibilizadas pelo PNI.

5.3.6.1 Vacina meningocócica C conjugada

Vacina composta por polissacarídeo capsular purificado de *N. meningitidis* do grupo C conjugado a um carreador proteico, indicada para prevenção da doença meningocócica do grupo C. No calendário rotineiro de vacinação do PNI, está indicada no primeiro ano de vida, com duas doses no esquema primário (aos 3 e 5 meses de idade), com intervalo recomendável de 60 dias, e mínimo de 30 dias entre elas, seguidas de um reforço aos 12 meses. Deve-se administrar uma dose em crianças a partir de 1 até 4 anos (4 anos 11 meses e 29 dias), que tenham perdido a oportunidade de se vacinar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). No CRIE, a vacina meningocócica C conjugada está disponível para indivíduos de qualquer idade dentro das seguintes indicações: (i) asplenia anatômica ou funcional e doenças relacionadas; deficiência de complemento e frações; terapia com eculizumabe; (ii) pessoas com HIV/aids; (iii) imunodeficiências congênicas e adquiridas; (iv) transplantados de células-tronco hematopoiéticas (TMO); (v) transplantados de órgãos sólidos; (vi) fístula liquórica e derivação ventrículo-peritoneal (DVP); (vii) implante de cóclea; microbiologistas; (viii) trissomias; (ix) doenças de depósito; (x) hepatopatia crônica; e (xi) doença neurológica incapacitante.

Em pessoas acima dos 12 meses com imunodeficiência, administrar duas doses com intervalo de 8 a 12 semanas, de acordo com a condição de risco, e uma dose de reforço a cada cinco anos. Para as situações de risco significativo para doença meningocócica, porém sem imunodeficiência (como fístula liquórica e derivação ventrículo-peritoneal (DVP), implante de cóclea e microbiologistas), administrar uma dose com reforço a cada 5 anos. Para as demais indicações (trissomias, doenças de depósito, hepatopatia crônica e doença neurológica incapacitante), recomenda-se uma dose da vacina, sem reforço.

5.3.6.2 Meningocócica ACWY conjugada

Vacina composta por polissacarídeos capsulares purificados de *N. meningitidis* dos grupos A, C, W e Y, indicada para a prevenção da doença meningocócica causada pelos grupos A, C, W ou Y. No calendário rotineiro de vacinação do PNI, está indicada para todos os adolescentes, com idade entre 11 e 14 anos, em dose única. No CRIE, a vacina Meningocócica ACWY conjugada é disponibilizada para os portadores de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) que irão iniciar o tratamento com eculizumabe. Deve-se administrar uma dose no mínimo duas semanas antes de iniciar o tratamento com eculizumabe e manter o reforço a cada três anos.

5.3.7 Doença invasiva causada por pneumococo

O *S. pneumoniae* (pneumococo) é uma bactéria Gram-positiva com característica morfológica esférica (cocos), disposta aos pares. Existem mais de 90 sorotipos capsulares imunologicamente distintos, que causam doença pneumocócica invasiva (meningite, pneumonia bacterêmica, sepse e artrite) e não invasiva (sinusite, otite média aguda, conjuntivite, bronquite e pneumonia).

5.3.7.1 Vacina pneumocócica conjugada 10-valente (Pneumo 10)

Vacina preparada a partir de polissacarídeos capsulares bacterianos purificados de *S. pneumoniae*, com 10 sorotipos de pneumococo (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F). Está indicada para prevenir contra infecções invasivas (sepse, meningite, pneumonia e bacteremia) e otite média aguda (OMA) causadas pelos 10 sorotipos da bactéria contidos na vacina em crianças menores de 2 anos. No calendário rotineiro de vacinação, em crianças menores de 1 ano, está indicada em duas doses, aos 2 e 4 meses de idade, com intervalo recomendável de 60 dias, e mínimo de 30 dias entre as doses. O reforço deve ser feito aos 12 meses, com intervalo mínimo de 60 dias a partir da segunda dose. Em crianças de 1 até 4 anos, 11 meses e 29 dias de idade que tenham perdido a oportunidade de se vacinar, sem comprovação vacinal ou com esquema incompleto, deve-se administrar uma única dose. Pode ser administrada simultaneamente (ou com qualquer intervalo) com outras vacinas do calendário nacional de vacinação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b).

No CRIE, a vacina Pneumo 10-valente seguida da vacina Pneumo 23-valente está indicada em menores de cinco anos nas seguintes condições: HIV/aids; pacientes oncológicos; transplantados de órgãos sólidos; transplantados de células-tronco hematopoiéticas (TMO); asplenia anatômica ou funcional e doenças relacionadas; fístula liquórica; implante de cóclea; imunodeficiências congênicas; nefropatias crônicas/hemodiálise/síndrome nefrótica; pneumopatias crônicas; fibrose cística (mucoviscidose); cardiopatias crônicas; hepatopatias crônicas; doenças neurológicas crônicas incapacitantes; trissomias; diabetes mellitus; doenças de depósito.

5.3.7.2 Vacina pneumocócica conjugada 13-valente (Pneumo 13)

Não está indicada no calendário rotineiro de vacinação da criança. No CRIE, a vacina Pneumo 13-valente seguida da vacina Pneumo 23-valente está disponível

QUADRO 5.3 Esquema de vacinação antipneumocócica com Pneumo 10 e Pneumo 23-valente, conforme idade, para crianças menores de 5 anos de acordo com as indicações citadas

Faixa Etária de Início	Esquema Primário	Reforços	
	Pneumo 10	Pneumo 10	Pneumo 23
2 a 6 meses	3 doses (0, 2 e 4 meses)	De 12 a 15 meses	A partir de 2 anos:
7 a 11 meses	2 doses (0 e 2 meses)	De 12 a 15 meses	1ª dose: pelo menos 6 a 8 semanas após a última dose da Pneumo 10.
12 a 59 meses	2 doses (0 e 2 meses)	Nenhum	2ª dose: 5 anos após a 1ª dose de Pneumo 23

Fonte: elaborado pelos autores, baseado em Ministério da Saúde (2019, 2022b e 2022c).

a partir de cinco anos para HIV/AIDS, pacientes oncológicos, pacientes sob imunossupressão terapêutica, transplantados de órgãos sólidos e transplantados de células-tronco hematopoiéticas (TMO). A vacina é administrada em dose única, com exceção dos transplantados de células-tronco hematopoiéticas, que devem receber três doses com intervalo de 30 a 60 dias entre cada dose.

5.3.7.3 Vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente

Composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos de pneumococos, está indicada para a prevenção de meningite, sepse, pneumonias, sinusite, otite e bronquite. No calendário rotineiro de vacinação da criança, está indicada em uma dose, a partir dos 5 anos, especificamente para povos indígenas sem comprovação de vacinação com a Pneumo 10, além de idosos (acima de 60 anos) acamados ou institucionalizados, nos quais está indicada uma dose de reforço 5 anos após a dose inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b, 2022c). A vacina Pneumo 23-valente está indicada a partir dos dois anos e encontra-se disponível no CRIE nas seguintes situações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019): (i) HIV/AIDS; (ii) pacientes oncológicos ou sob imunossupressão terapêutica; (iii) transplantados de órgãos sólidos; (iv) transplantados de células-tronco hematopoiéticas (TMO); (v) asplenia anatômica ou funcional e doenças relacionadas; (vi) fístula liquórica; (vii) implante de cóclea; (viii) imunodeficiências congênitas; (ix) nefropatias crônicas/hemodiálise/síndrome nefrótica; (x) pneumopatias crônicas; (xi) fibrose cística (mucoviscidose); (xii) cardiopatias crônicas; (xiii) hepatopatias crônicas; (xiv) doenças neurológicas crônicas incapacitantes; (xv) trissomias; (xvi) diabetes mellitus; e (xvii) doenças de depósito.

Deve-se administrar uma dose seguida de uma única revacinação cinco anos após a dose inicial. Nos esquemas sequenciais, a Pneumo 23 deve ser feita pelo menos 6 a 8 semanas após a última dose da Pneumo 10 e pelo

menos 8 semanas após a Pneumo 13. Caso o indivíduo já tenha recebido a vacina Pneumo 23, deve-se esperar pelo menos um ano para fazer a Pneumo 13.

5.3.8 Febre tifoide

A febre tifoide é uma doença infecciosa aguda, potencialmente fatal, que cursa com bacteremia. Classicamente, é causada por uma bactéria *S. enterica serovar Typhi*. A principal forma de transmissão é a ingestão de água ou de alimentos contaminados com fezes humanas ou, menos frequentemente, com urina contendo a *S. enterica*. O tempo entre a exposição e o início dos sintomas (período de incubação) pode variar de 3 a 60 dias, ficando entre 7 e 14 dias na maioria das vezes (UFRJ, 2023). Ao término do período de incubação, coincidindo com a fase de bacteremia contínua, surgem febre, cefaleia, alteração intestinal (diarreia ou constipação), mialgia e prostração. Em alguns casos, há o aparecimento de manchas róseas no tórax (*roséola tífica*), que pode ajudar na suspeição diagnóstica. Os casos não tratados evoluem com hepatoesplenomegalia e podem cursar com manifestações neuropsiquiátricas. A distribuição da doença é universal, porém é mais prevalente em países e regiões onde o saneamento básico é inadequado. Estima-se a ocorrência de 11 a 21 milhões de casos por ano no mundo, com aproximadamente 200 mil óbitos. A maioria dos casos notificados ocorre na Ásia e 35% na África (CDC, 2021).

A vacinação contra febre tifoide não está recomendada de rotina no Brasil, mas pode estar indicada para viajantes que se dirigem para regiões de alta endemicidade da doença. A vacina contra febre tifoide não é disponibilizada pelo PNI, mas pode ser encontrada em clínicas privadas. A vacina de subunidade é composta pelo polissacarídeo Vi, é aplicada em dose única acima dos 2 anos e deve ser administrada pelo menos 2 semanas antes da viagem. Em caso de exposição contínua ao risco ou reexposição, dose de reforço deve ser feita a cada 2 a 3 anos.

5.4 O PAPEL DAS VACINAS BACTERIANAS PARA O CEIS

Nos anos 1970, um surto de meningite ocorrido no país, aliado à falta de vacinas disponíveis naquele momento, tornou claro para o Estado Brasileiro que uma indústria nacional capaz de produzir vacinas bacterianas e para outros agentes infecciosos era uma questão estratégica. A autossuficiência do país na produção de insumos para a saúde é uma ideia que ganhou corpo, sendo um aspecto de extrema importância na elaboração e construção do CEIS. A recente pandemia de covid-19 veio confirmar a importância de uma indústria da saúde ágil e eficaz – a rápida produção da vacina contra a covid-19 pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (MS) (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e pelo Instituto Butantan de São Paulo evitaram uma perda maior de vidas na população brasileira.

A ausência de uma indústria nacional, voltada para a produção de vacinas estratégicas para a saúde da população brasileira, tornaria o país refém da indústria privada, que atende prioritariamente as necessidades de seus países de origem, colocando os demais em segundo plano.

O contexto de Saúde Pública no Brasil possui um sistema universal de saúde que provê acesso à saúde para toda a população, abrangendo dos grupos mais remotos aos mais urbanos. Sendo assim, é fundamental o investimento no Sistema Único de Saúde (SUS), o que, conseqüentemente, resulta em maior prioridade dada ao aumento de qualidade de vida para a população brasileira. Concomitantemente, o PNI, programa de imunizações mais bem-sucedido do mundo, atua em conjunto ao SUS na garantia da saúde por das vacinações em massa, considerando que as vacinas são instrumentos eficazes com maior relação custo-benefício em Saúde Pública.

Sendo assim, considerando a importância da ação das vacinas bacterianas, o processo de desenvolvimento dessas vacinas é aprimorado de acordo com os avanços científicos da biotecnologia, em especial no campo da vacinologia. Esses avanços são fundamentais para o desenvolvimento de novas formas de obtenção de vacina, possibilitando a proteção da população de novas doenças imunopreveníveis, causadas por diferentes bactérias. Sendo assim, devem-se também estabelecer programas de vigilância epidemiológica ativa e robusta, para monitoramento de novos patógenos e de doenças emergentes causadas por bactérias.

O desenvolvimento biotecnológico de vacinas bacterianas deve ser sustentado por políticas públicas integradas e sistêmicas, capazes de fortalecer a Pesquisa & Desenvolvimento, para garantia de acesso e soberania

nacional. Além disso, é importante ressaltar a necessidade de fontes múltiplas de financiamento, que propiciem a produção local, garantida por diferentes estratégias, como estímulo à inovação, parceria entre empresas públicas e privadas ou uma maior interação entre os grandes laboratórios e os menores, durante os processos de transferência de tecnologia.

Outro aspecto importante é o fortalecimento dos setores do Complexo-Econômico Industrial da Saúde (CEIS), principalmente àqueles relacionados às indústrias de base química e biotecnológica e indústrias de base mecânica, eletrônica e de materiais e setores prestadores de serviço, com a garantia de um fornecimento sustentado de matérias-primas de qualidade a partir de fornecedores de confiança (DOUGLAS; SAMANT, 2018). Dessa forma, deve ser considerada a cadeia de valor, fortalecendo a produção local de insumos e matérias-primas e diminuindo o monopólio de fornecedores globais.

Ressalta-se a importância do desenvolvimento de novas vacinas terapêuticas para proteção de infecções hospitalares de mucosa, como pneumonias e doenças de tecidos moles e pele em idosos hospitalizados, causadas por todos os grupos de bactérias resistentes a antimicrobianos (RAM). Além disso, é importante também destacar a necessidade de melhoria da resposta imunológica de vacinas já existentes para a proteção da doença pneumocócica e doenças causadas por *M. tuberculosis*. Essas melhorias podem ser alcançadas com o estudo de novos adjuvantes, novas plataformas inovadoras para obtenção de vacinas multivalentes e de novas vias de administração que privilegiem a indução de respostas celulares, com fenótipo Th1/Th17 e o retorno de células de memória residentes às mucosas. Em concomitância, o rigor na validação e na regulamentação dos métodos e dos procedimentos empregados na produção das vacinas bacterianas progride de modo a garantir a liberação de produtos seguros e eficazes que possam cumprir os resultados previstos nas etapas de estudo clínico (POOLMAN, 2020). Nesse contexto, é de suma importância que o CEIS esteja apto a incorporar, desenvolver e disponibilizar para a população brasileira as novas tecnologias no campo da vacinologia, principalmente àquelas relacionadas às vacinas bacterianas.

Finalmente, todas essas ações visam fortalecer os outros setores do CEIS, relacionados com assistência e atenção à população, como hospitais, ambulatórios e serviços de diagnóstico e tratamento, que poderão contar com procedimentos inovadores e eficazes para tratamento e proteção da população brasileira de forma adequada.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos maiores desafios de Saúde Pública do século XXI é a prevenção e o tratamento das infecções bacterianas causadas por diferentes microrganismos. Existem diferentes gerações e tipos de vacinas bacterianas, produzidas por meio da utilização de diversas plataformas tecnológicas, empregando-se metodologias que assegurem alta qualidade, segurança e eficácia das vacinas, com a aplicação das Boas Práticas (BPx). A escolha da estratégia vacinal, por sua vez, contempla os estudos de interação patógeno-hospedeiro, conhecimento dos fatores de virulência dos patógenos e da forma de instalação das doenças. Além disso, devem ser avaliados a resposta imunológica induzida pelos diversos antígenos bacterianos e o estudo de novos adjuvantes e de novas formas de administração. Todos esses aspectos devem sempre acompanhar os avanços tecnológicos. Considerando o alto custo do processo de uma vacina, principalmente quando ocorre a transferência de tecnologia de empresas farmacêuticas estrangeiras para o enfrentamento de emergências sanitárias, destaca-se a importância do desenvolvimento autóctone de plataformas nacionais de produção de vacinas bacterianas para prevenção de doenças com relevância epidemiológica no Brasil. Por outro lado, é importante assimilar as lições aprendidas com a pandemia de covid-19, que promoveu um desenvolvimento acelerado de vacinas, empregando-se novas plataformas tecnológicas como a tecnologia do mRNA. Além disso, ressalta-se a necessidade de desenvolvimento de vacinas terapêuticas, que tenham impacto positivo no controle de infecções hospitalares causadas por bactérias RAM em indivíduos com idade superior a 65 anos, e a melhoria constante da resposta imunológica induzida por vacinas já existentes. A produção dessas vacinas por Bio-Manguinhos/Fiocruz visa atender ao PNI, com preços acessíveis e em quantidades adequadas para ampliação da cobertura vacinal de diferentes faixas etárias susceptíveis às doenças imunopreveníveis, promovendo, assim, a autossuficiência em imunobiológicos e contribuindo com a Saúde Pública brasileira.

REFERÊNCIAS

1. AVERY, O. T.; GOEBEL, W. F. Chemo-Immunological Studies On Conjugated Carbohydrate-Proteins : II. Immunological Specificity Of Synthetic Sugar-Protein Antigens. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 50, n. 4, p. 533–550, set. 1929.
2. BARBOSA, A. P. R.; SILVEIRA, I. A. B.; SOUZA, M. C. O.; LEAL, M. L. M. Desenvolvimento e produção de vacinas para uso humano. In: LIMA, U. A. (Ed.). **Biotechnologia Industrial - vol. 3 Processos fermentativos e enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: Blucher; 2001. p. 427–463.
3. BASTOS, R. C. et al. Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4281–4287, ago. 2015.
4. BASTOS, R. G. et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495–6503, nov. 2009.
5. BIDMOS, F. A. et al. Cross-Reactive Bactericidal Antimeningococcal Antibodies Can Be Isolated From Convalescing Invasive Meningococcal Disease Patients Using Reverse Vaccinology 2.0. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1621, 2018.
6. CDC. **Information for Healthcare Professionals**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/typhoid-fever/health-professional.html>>. Acesso em: 3 jan. 2023.
7. CHENG, K. et al. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2041, 6 abr. 2021.
8. DE QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Vaccines for COVID-19: perspectives from nucleic acid vaccines to BCG as delivery vector system. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 10, p. 515–524, 2020.
9. DE SOUZA, I. M. et al. Development and Immunogenicity of a Brazilian Glycoconjugate vaccine against Meningococcal W in a Pilot Scale. **Glycoconjugate Journal**, v. 38, n. 5, p. 539–549, 2021.
10. DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E. Vaccines for the 21st century. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 708–720, jun. 2014.
11. DOUGLAS, R.; SAMANT, V. The vaccine Industry. In: **Plotkin's vaccines**. Philadelphia: Elsevier, 2018. p. 41–50.
12. DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUGNELL, R. A. In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of Salmonella enterica var. Typhimurium. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 37, n. 2–3, p. 111–119, jul. 2003.
13. FERNANDES SILVA, V. et al. A comparison of pyrogen detection tests in the quality control of meningococcal conjugate vaccines: The applicability of the Monocyte Activation Test. **Alternatives to Laboratory Animals : ATLA**, v. 46, n. 5, p. 255–272, nov. 2018.
14. GOLD, R. et al. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 56, n. 6, p. 1536–1547, dez. 1975.
15. GOMEZ, P. L.; ROBINSON, J. M. **Vaccine Manufacturing Plotkin's Vaccines**, 2018.
16. GORDON, J. et al. A Call for Greater Consideration for the Role of Vaccines in National Strategies to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria: Recommendations from the National Vaccine Advisory Committee: Approved by the National Vaccine Advisory Committee on June 10, 2015. **Public Health Reports** (Washington, D.C. : 1974), v. 131, n. 1, p. 11–16, 2016.
17. GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 129, n. 6, p. 1349–1365, jun. 1969.
18. JAN, A. T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1053, 2017.
19. JESSOUROUN, E. et al. Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines. 2015.
20. JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B. Vaccine process technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1443–1460, jun. 2012.

21. LEWNARD, J. A. et al. Childhood vaccines and antibiotic use in low- and middle-income countries. **Nature**, v. 581, n. 7806, p. 94–99, maio 2020.
22. LIN, I. Y. C.; VAN, T. T. H.; SMOOKER, P. M. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. **Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 940–972, nov. 2015.
23. MÄKELÄ, P. H. et al. Long-term persistence of immunity after immunisation with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 2, p. 287–292, dez. 2003.
24. MCCARTHY, P. C.; SHARYAN, A.; SHEIKHI MOGHADDAM, L. Meningococcal Vaccines: Current Status and Emerging Strategies. **Vaccines**, v. 6, n. 1, fev. 2018.
25. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_vacinacao.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.
26. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_centros_imunobiologicos_especiais_5ed.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.
27. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5. ed. Brasília: WHO, 2022a.
28. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Calendário Nacional de Vacinação 2022 - Criança**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/calendario-nacional-de-vacinacao-2022-crianca/view>>. Acesso em: 5 jan. 2023b.
29. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Calendário Nacional de Vacinação**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/anexo-calendario-de-vacinacao-da-crianca_atualizado-final-20-09-2022.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2022c.
30. OPAS. **A Resistência aos Antimicrobianos, Acelerada Pela Pandemia de Covid-19**. [s.l.] OPAS, 2021. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55936/OPAS-CDEAMRCOVID19220006_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 15 nov. 2022.
31. PELTOLA, H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 302–317, abr. 2000.
32. PLOTKIN, S. et al. The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview. **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4064–4071, 2017.
33. PLOTKIN, S. A. et al. **Plotkin's Vaccines**. 7. ed. Elsevier: Elsevier, 2018.
34. POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83–100, 22 fev. 2021.
35. PONTES, D. S. et al. Lactococcus lactis as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein Expression and Purification**, v. 79, n. 2, p. 165–175, out. 2011.
36. POOLMAN, J. T. Expanding the role of bacterial vaccines into life-course vaccination strategies and prevention of antimicrobial-resistant infections. **NPJ Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 84, 2020.
37. SCHERP, H. W.; RAKE, G. Studies on Meningococcal Infection: Xiii. Correlation Between Antipolysaccharide and the Antibody Which Protects Mice Against Infection With Type I Meningococci. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 81, n. 1, p. 85–92, jan. 1945.
38. SIEGRIST, C. A. Vaccine immunology. **Plotkin's Vaccines**, p. 16–34, 2017.
39. SILVEIRA, I. A. F. B. et al. Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7261–7270, 2007.
40. SOLANS, L.; LOCHT, C. The Role of Mucosal Immunity in Pertussis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3068, 2018.
41. STEFANETTI, G.; MACLENNAN, C. A.; MICOLI, F. Impact and Control of Sugar Size in Glycoconjugate Vaccines. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 19, set. 2022.
42. TÖRLING, J. et al. Revaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and elderly persons previously treated for pneumonia. **Vaccine**, v. 22, n. 1, p. 96–103, dez. 2003.
43. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Informação sobre Febre Tifoide**. Disponível em: <<http://www.cives.ufrj.br/informacao/ftifoide/ft-iv.html>>. Acesso em: 14 jan. 2023.
44. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. **World Health Organization technical report series**, 1981.
45. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines**. Geneva: WHO Expert Committee on Biological Standardization, 1990.
46. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Informal Consultation on Standardization and Evaluation of BCG Vaccines**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/BCG-meeting-report-2009v7>>. Acesso em: 15 jan. 2023.
47. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bacterial vaccines in clinical and preclinical development 2021**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240052451>>. Acesso em:

Parte III

Biotecnologia para testes de diagnóstico

Reativos para diagnóstico de doenças infecciosas

Christiane de Fátima Silva Marques

Wagner José Tenório dos Santos

Patrícia Alvarez

Ricardo Machado Xavier

Estevão Portela Nunes

Raouf Emile Gerhard Sykora

Marcos da Silva Freire

Este capítulo apresenta uma visão ampla sobre os testes para diagnósticos e os reativos para diagnóstico de doenças infecciosas. O capítulo se inicia pela apresentação da definição e do histórico da Biotecnologia em testes para diagnóstico no mundo e no Brasil. Avança pela caracterização das plataformas tecnológicas para o diagnóstico de doenças infecciosas, seguida pela descrição do diagnóstico molecular. Depois, o capítulo aborda as principais tendências tecnológicas atuais, além do processo de desenvolvimento, produção e controle de qualidade dos reativos para diagnóstico de doenças infecciosas. Por fim, aponta os impactos atuais e futuros do uso de reativos para diagnóstico no Complexo Econômico Industrial da Saúde.

6.1 EXAMES LABORATORIAIS E TESTES PARA DIAGNÓSTICO: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO

Os exames laboratoriais são parte essencial da prática médica. Estima-se que a participação das informações oriundas do laboratório clínico na tomada de decisões seja de 70%, e esse valor é crescente, a partir do rápido desenvolvimento de novos testes, especialmente nas áreas da biologia celular e molecular (FORSMAN, 1996). Os exames laboratoriais são usados para avaliar a função de um órgão, a atividade metabólica, o estado nutricional, na detecção e no monitoramento das diversas doenças, como de natureza neoplásica, genética, imunológica e infecciosa, e para monitorar a utilização de agentes terapêuticos. Portanto, os exames laboratoriais contribuem para diagnóstico, rastreamento, monitoramento e avaliação prognóstica das doenças, que vêm inclusive sendo continuamente identificadas, em especial a partir das técnicas de sequenciamento genômico.

Os profissionais de saúde diretamente ligados à assistência não são os únicos que se valem dos exames laboratoriais. Os gestores dos serviços de saúde, tanto privado quanto público, também estão interessados no desempenho do teste diagnóstico, uma vez que a obtenção da informação pode ser onerosa, bem como estar associada a riscos. Dessa forma, o desenvolvimento de novas tecnologias e insumos para a área de diagnóstico laboratorial está entre as contribuições mais relevantes da biotecnologia para otimizar os desfechos clínicos dos pacientes e a situação do sistema de saúde em geral (XAVIER; BARROS, 2016).

A utilidade clínica dos exames laboratoriais depende de uma série de indicadores que caracterizam o seu desempenho para o diagnóstico, cujo conhecimento é fundamental tanto para sua adoção como na interpretação dos resultados (XAVIER; BARROS, 2016). O desempenho técnico do exame depende de questões relacionadas ao ensaio analítico, e inclui diversas características, como as mostradas no Quadro 6.1.

QUADRO 6.1 Ensaio analítico

Ensaio analítico	Característica
Acurácia analítica (exatidão)	Proximidade entre o resultado obtido na mensuração de um analito e o seu valor verdadeiro
Precisão	Reprodutibilidade dos valores, obtidos em medidas sucessivas de uma mesma amostra. Pode ser intraensaio (repetibilidade, obtida sob mesmas condições de medida) ou interensaio (reprodutibilidade, ensaios conduzidos de maneiras diversas – momentos, laboratoristas etc.)
Sensibilidade analítica	Capacidade de detectar uma quantidade especificada do analito
Especificidade analítica	Capacidade de não detectar componentes que não o analito de interesse
Linearidade	Capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à quantidade do analito, dentro de uma faixa especificada
Estabilidade	Estabilidade dos insumos do ensaio
Efeito matriz	Interferência de componentes presentes na amostra sobre a quantificação do analito em questão
Robustez	A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Essas características técnicas dos testes laboratoriais estão diretamente associadas com o setor de biotecnologia, responsável pelo desenvolvimento dos insumos e ensaios para exames laboratoriais. Novos testes devem ser validados conforme essas características e submetidos à aprovação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) antes de sua comercialização no Brasil (ANVISA, 2022a). A Anvisa é reconhecida por ser criteriosa e exigente em relação à regulamentação de novos produtos na saúde, o que impacta também o segmento de diagnósticos laboratoriais, promovendo um aumento na carga de trabalho necessário para atender às reivindicações de normas e resoluções para garantia da qualidade desses testes.

O desempenho diagnóstico refere-se às informações obtidas com o uso do teste em populações e define sua utilidade na prática clínica. A interpretação do resultado de um teste é baseada nos seus valores de referência, usualmente definido como os valores encontrados em 95% de sujeitos saudáveis (dois desvios-padrão do valor

médio). Isso quer dizer, por consequência, que 5% dos pacientes podem apresentar um teste positivo (fora do valor de referência, “anormal”) que não corresponde a nenhuma doença. A definição de normalidade (Quadro 6.2) implica que, quando se requisita determinado teste, a probabilidade de obter um resultado anormal é de 5%, sendo este um falso-positivo (XAVIER; DORA; BARROS, 2018).

QUADRO 6.2 Definição de normalidade

Normalidade	Definição
Sensibilidade clínica (diagnóstica)	É a probabilidade de um teste positivo em pacientes nos quais a doença está presente.
Especificidade clínica (diagnóstica)	É a probabilidade de um teste negativo em pacientes que não têm a doença.
Valor preditivo positivo	Proporção de verdadeiros-positivos entre os indivíduos com teste positivo.
Valor preditivo negativo	Proporção de verdadeiros-negativos entre os indivíduos com teste negativo.
Razão de verossimilhança (<i>likelihood ratio</i> – LR)	Definida como a relação entre a probabilidade de um dado resultado na população com a doença-alvo e a probabilidade desse mesmo resultado entre os não doentes. Os LR positivos e negativos (ou os LR para resultados positivos e negativos) representam a frequência do resultado do teste (positivo ou negativo) na presença da doença, dividida pela frequência do resultado do teste na ausência da doença.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

A sensibilidade e a especificidade clínicas são características intrínsecas do teste, e não necessariamente indicam sua utilidade na prática clínica. Os valores de sensibilidade e especificidade de um teste com resultados quantitativos contínuos dependem do nível previamente definido a partir do qual se considera que um resultado é positivo (anormal). Assim, conforme o ponto em que se define o limite (*cut-off point*), o teste apresentará sensibilidade e especificidade variáveis, isto é, quanto mais sensível, menos específico e vice-versa.

O valor preditivo positivo e negativo e a razão de verossimilhança (*likelihood ratio*) são características de desempenho diagnóstico que levam em consideração a prevalência da doença na população em estudo (probabilidade pré-teste) e, portanto, de maior interesse para o clínico.

No que se refere ao benefício clínico, o impacto (ou benefício clínico) do teste é a evidência mais difícil de encontrar na literatura, que está concentrada nos desempenhos técnico e diagnóstico (XAVIER; BARROS, 2016). O impacto clínico pode ser segregado no efeito que o uso do teste terá: (i) na estratégia diagnóstica (melhora do desempenho diagnóstico); (ii) na estratégia terapêutica (uso e otimização de terapia, evitar complicações); e (iii) no desfecho clínico (consequência dos itens anteriores).

A avaliação da efetividade do laboratório clínico e de sua contribuição para os desfechos clínicos tem sido matéria de crescentes discussões na literatura (RODGER; RAMSAY; FERGUSON, 2012). A solicitação e a interpretação correta dos testes laboratoriais, dentro de uma visão centrada no paciente, melhoram os desfechos clínicos e, por isso, também têm impacto positivo nos custos globais da assistência à saúde. Ainda, existe a necessidade de uma melhor definição de indicadores para quantificar a eficiência desses testes, ou seja, da relação custo/efetividade favorável. É importante que o clínico tenha ciência do questionamento sobre o impacto que a informação oriunda da solicitação de determinado teste terá no desfecho clínico do seu paciente, maximizando, dessa forma, o aproveitamento dos recursos de saúde.

Mesmo diante desse cenário, percebe-se que recentemente houve expressivas transformações nos exames laboratoriais. O progresso observado na ciência e na tecnologia médicas teve impacto significativo na maneira como os laboratórios realizam os exames, promovendo não somente um aumento quantitativo e qualitativo de produtividade, como também na velocidade e precisão em que os resultados são disponibilizados. Novas metodologias oriundas da pesquisa básica, como a citometria de fluxo, a espectrometria de massa *in tandem* e técnicas de amplificação e sequenciamento de nova geração de ácidos nucleicos, vêm sendo rapidamente adaptadas para o laboratório clínico, proporcionando uma quantidade crescente de novos e complexos testes.

Técnicas tradicionais também vêm sofrendo sucessivos aprimoramentos. Por exemplo, os imunoenaios, que, com a utilização de anticorpos monoclonais, evoluíram do radioimunoensaio para o ELISA. Outros exemplos são a nefelometria e a quimiluminescência. Esses aprimoramentos permitem que um volume crescente de analitos seja testado de maneira totalmente automatizada, com benefícios em termos de precisão e reprodutibilidade dos resultados.

O uso de biomarcadores, principalmente moleculares, para orientar abordagens preventivas e terapêuticas específicas tem recebido a denominação de medicina personalizada. A Farmacogenética, ciência que procura

definir determinantes genéticos para os efeitos terapêuticos e adversos dos fármacos, tem atingido recentemente alguns progressos significativos. Esses avanços ocorrem, especialmente, na definição de genótipos associados à toxicidade e, na área de oncologia, na identificação de pacientes com maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias e resposta aos diversos tratamentos. O aprofundamento no conhecimento relacionado ao genoma humano permite diagnosticar tendência ou probabilidade de indivíduos desenvolverem no futuro determinadas doenças, permitindo orientação e cuidados antecipados.

6.2 BIOTECNOLOGIA EM TESTES PARA DIAGNÓSTICO: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO

A atividade de diagnóstico, além de apoiar a conduta clínica, é essencial na orientação das políticas de manejo, controle e prevenção das doenças e um dos pilares da vigilância em saúde. Faz-se necessário o esclarecimento de conceitos comumente utilizados na atividade de diagnóstico, visando o entendimento das ferramentas nela empregadas.

A primeira definição importante nesse contexto refere-se aos insumos, que são materiais fundamentais para o desenvolvimento ou produção de *kits* que, por sua vez, combinam diversos desses materiais, viabilizando a realização de um teste. Considerando, especificamente, a experiência de Bio-Manguinhos/Fiocruz, pode-se dizer que em um momento inicial o Instituto atuou na produção de insumos como antissoros, conjugados e antígenos necessários para o diagnóstico de doenças infectocontagiosas. Outra definição necessária é a de biomarcador diagnóstico, como um componente biológico objetivamente detectável ou mensurável, clinicamente relevante e/ou capaz de identificar um processo patológico (STRIMBU; TAVEL, 2010).

Em um conceito geral, os reativos para diagnósticos são insumos ou kits usados na detecção de biomarcadores – geralmente representados por material genético, antígenos ou anticorpos – em amostras biológicas ou ambientais. Incluem-se nesse grupo os “instrumentos e sistemas que, em conjunto com as instruções para seu uso, contribuem para efetuar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semiquantitativa em uma amostra biológica” (ALMEIDA, 2014).

A tecnologia tem sido a chave facilitadora do crescimento da indústria de diagnóstico laboratorial *in vitro* (IVD), e os reativos constituem-se como principal ferramenta de suporte à essa atividade, seja ela clínica ou laboratorial. Desde o desenvolvimento do radioimunoen-

saio*, a área diagnóstica tem sido um campo fértil para a inovação, e o desenvolvimento de novas tecnologias tem produzido expressivos avanços (FERREIRA, 2005).

Os marcos da biotecnologia moderna, termo aplicado aos avanços tecnológicos ocorridos após a descrição da dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), em 1953, foram importantes possibilitadores do desenvolvimento de métodos, técnicas e ferramentas para uso em diagnóstico. A década de 1960 trouxe ensaios laboriosos e inovadores, como ELISA e imunofluorescência indireta, metodologias que, posteriormente, tiveram importância para o diagnóstico e o enfrentamento da doença de Chagas. A partir de 1970, os avanços foram ocorrendo aceleradamente, relacionados à engenharia genética, à obtenção dos primeiros anticorpos monoclonais, culminando com o advento da reação em cadeia da polimerase (SAIKI, 1985), das técnicas de sequenciamento e dos testes para detecção de doenças em menos de 20 minutos no final do século XX (VERMA et al., 2011). Uma representação esquemática da evolução das tecnologias, ao longo das últimas décadas, está representada pela Figura 6.1 e será apresentada nas próximas seções.

Diferentes tipos de reativos estão amplamente adaptados às distintas fases de uma doença infecciosa, moldados pelas necessidades para trazer uma maior eficácia. A

Figura 6.2 exemplifica essa afirmação com o uso dos reativos no enfrentamento da Covid-19 (doença causada pelo vírus SARS-CoV-2), na qual as ferramentas para diagnóstico laboratorial e não laboratorial – também denominado *point-of-care* (POC, ou beira de leito) – foram amplamente aplicadas em momentos distintos da pandemia, em resposta à sua evolução epidemiológica rápida (LIPPI; PLEBANI, 2020).

Nesse setor, a trajetória tecnológica é baseada em avanços científicos, aliados a uma estrutura de mercado em que grandes empresas atuam em espaço altamente competitivo (TIDD, 2001). Dessa forma, a inovação é reconhecida como fonte de vantagem competitiva, o que se reflete na intensa ligação entre a evolução da ciência e as atividades de P&D (pesquisa e desenvolvimento) das empresas, possibilitadas por investimentos de cerca de 10% de seu faturamento (GADELHA, 2012).

No entanto, as inovações radicais, e mesmo boa parte das inovações incrementais da indústria IVD (diagnóstico *in vitro*), têm uso limitado em países em desenvolvimento devido à alta complexidade tecnológica e necessidade de uso de equipamentos que, na maioria dos casos, apresentam alto custo, inviabilizando sua adoção e ampla utilização (FERREIRA, 2005). A relação custo-benefício dos reativos para diagnóstico é aprimorada pela integração de conhecimentos tecnoló-

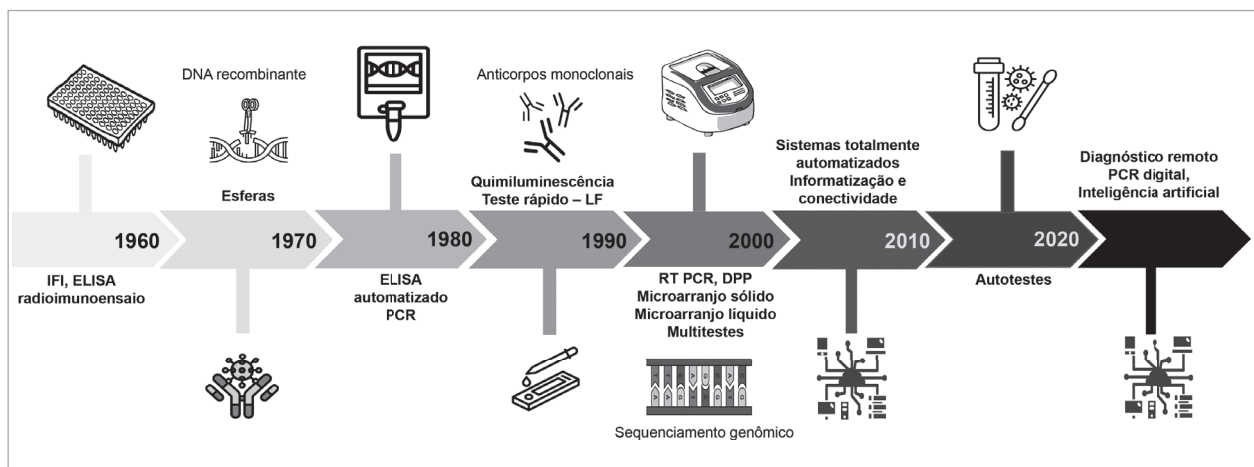


FIGURA 6.1 Linha do tempo da evolução das tecnologias utilizadas em métodos diagnósticos, impulsionada por alguns marcos da biotecnologia moderna.

Fonte: adaptada de Ferreira (2005); canva.com.

* O radioimunoensaio (RIA) foi desenvolvido a partir da introdução do I125 como marcador (YALOW; BERSON, 1959). Embora métodos RIA sejam confiáveis e precisos, por utilizarem radioisótopos como marcadores possuem problemas a eles associados, incluindo meia-vida curta e questões relacionadas à biossegurança, que restringem seu uso a laboratórios especializados (ZHAO; SUN; CHU, 2009).

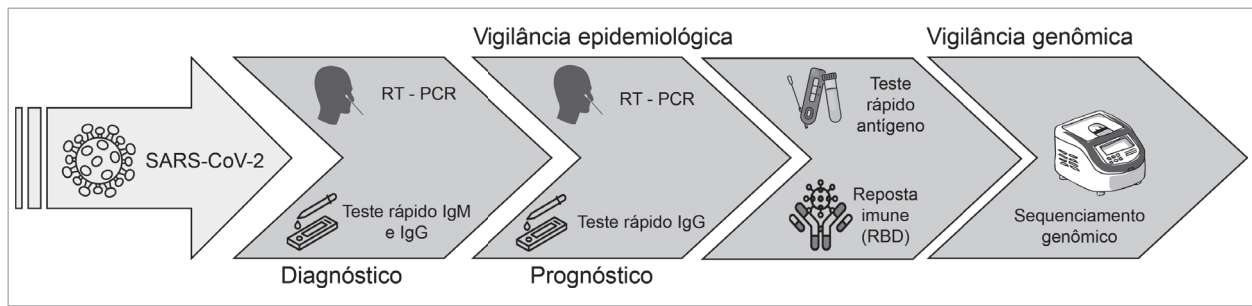


FIGURA 6.2 Evolução da resposta para o melhor diagnóstico. O papel das ferramentas diagnósticas na infecção pelo vírus causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) como exemplo da instanciação dos reativos no diagnóstico de doenças infecciosas.

Fonte: elaborada pelos autores, baseada em Lippi e Plebani (2020), utilizando elementos do canva.com.

gicos disponíveis aos mais avançados, bem como pela adaptação da oferta de produtos a contextos regionais, iniciativas que reduzem o tempo até o lançamento (TTM, do inglês, *time-to-market*) e asseguram a possibilidade de aplicação ou uso do produto em cenários específicos. A exploração de áreas em franco crescimento, com taxas de retorno acima da média do setor, também é uma forma de as grandes empresas ampliarem os lucros, revertendo os elevados investimentos realizados nas atividades de P&D.

Nessa perspectiva, o desenvolvimento de novos reagentes para diagnóstico tem se voltado, principalmente, para uma melhor orientação da conduta terapêutica, com diagnósticos mais precisos, precoces, rápidos e diferenciais, muitas vezes buscando a realização dos testes nos próprios locais de atendimento de pacientes. A essas características associam-se a redução dos custos e o aumento da eficiência, visando maior facilidade para o processamento de grandes quantidades de amostras, incluindo a possibilidade de execução de testes simultâneos para patologias diversas (FERREIRA, 2005).

6.3 PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

O desenvolvimento de produtos para diagnóstico de doenças infecciosas é, geralmente, baseado em plataformas tecnológicas, apresentadas detalhadamente nesta seção por meio de exemplos de reativos classificados em três principais categorias: (i) diagnóstico parasitológico; (ii) imunodiagnóstico; e (iii) diagnóstico molecular.

Para melhor entendimento e contextualização, serão apresentadas algumas aplicações desses produtos de acordo com as características das doenças e dos requisitos epidemiológicos específicos. Dentro de cada categoria, são citadas as principais tecnologias aplicadas ao desenvolvimento dos produtos, em resposta às demandas de mercado, conforme apresentado no Quadro 6.3.

QUADRO 6.3 Relação entre demandas de mercado de plataformas tecnológicas utilizadas no desenvolvimento de produtos para diagnóstico de doenças infecciosas

Demanda de mercado para doenças infecciosas	Plataformas tecnológicas recomendadas
Acurácia, alta sensibilidade e alta especificidade	Testes moleculares (qPCR)
Diagnóstico precoce (rápido) de fácil manuseio, alta sensibilidade	Testes rápidos (TR e DPP)
Diagnóstico diferencial, alta especificidade	Testes moleculares e testes rápidos (TR e DPP)
Facilidade de utilização, <i>point-of-care</i>	Testes rápidos, diagnóstico remoto
Diagnóstico diferencial (multitestes)	Testes moleculares, testes rápidos, microarranjos
Vigilância epidemiológica (diagnóstico com maior capacidade)	ELISA
Diagnósticos não invasivos (fluidos corporais, saliva, urina, <i>swab</i> nasal e fezes)	Teste rápidos, ELISA e RT-PCR

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*; TR: teste rápido; DPP: *dual path platform*; ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*.

Fonte: Adaptado de Medeiros (2004).

Cabe ressaltar que a disponibilidade de testes sensíveis e específicos é imprescindível, mas não suficiente, porque os resultados dos ensaios dependem consideravelmente de dois fatores. Esses fatores são a correta utilização e a qualidade da amostra utilizada. As características funcionais dos testes, descritas em seu manual de instruções de uso, são determinantes para o desfecho esperado. Da mesma forma, a fonte e o volume adequado da amostra, atrelados à realização de sua coleta no momento correto, resultam em maior confiabilidade

do resultado obtido. Conseqüentemente, iniciativas que viabilizem a captação ou acesso a amostras biológicas são fundamentais para as atividades de P&D no setor diagnóstico e, muitas vezes, se constituem como fatores limitantes para a velocidade ou êxito dessas atividades.

A utilização de mais de uma plataforma traz maior sensibilidade e especificidade para a estratégia diagnóstica. Em alguns casos (que são descritos nas próximas seções) são recomendados ensaios de metodologias distintas para ampliar a capacidade diagnóstica, maximizando a combinação dos seus parâmetros de qualidade (Quadro 6.1, Quadro 6.2 e Quadro 6.4), que definem suas aplicabilidades.

6.3.1 Diagnóstico parasitológico

Esse tipo de teste, muitas vezes limitado aos laboratórios de análises clínicas, tem uma importância significativa para determinadas patologias, como, por exemplo, doenças causadas por helmintos (esquistossomose, estrogiloidiase, teníase etc.) e protozoários (giardíase, malária, leishmaniose etc.). O Helm Teste, por exemplo, é um ensaio qualitativo-quantitativo baseado no método de Kato-Katz (Figura 6.3). Esse exame parasitológico permite revelar ovos de helmintos presentes nas amostras de fezes, tais como: *Ascaris*, *Schistosoma*, ancilostomídeos, *Trichuris*, *Taenia* e, com

QUADRO 6.4 Parâmetros de qualidade dos testes para uso diagnóstico

Termo	Definição
Sensibilidade	Probabilidade de que um resultado de teste seja positivo quando a doença estiver presente (taxa de verdadeiro positivo).
Especificidade	Probabilidade de um resultado de teste ser negativo quando a doença não está presente (taxa de verdadeiro negativo).
Valor Preditivo Positivo	Probabilidade de que a doença esteja presente quando o teste for positivo.
Valor Preditivo Negativo	Probabilidade de que a doença não esteja presente quando o teste for negativo.
Acurácia	Probabilidade geral de que um paciente seja classificado corretamente.
Precisão	Probabilidade de fornecer os mesmos resultados quando repetido (confiabilidade).

Fonte: adaptado de Medcalc (2023).

menos frequência, de *Enterobius* e *Strongyloides*. O kit, fornecido por Bio-Manguinhos/Fiocruz, identifica a prevalência de enfermidades como a esquistossomose, permitindo ao Ministério da Saúde ampliar as ações de

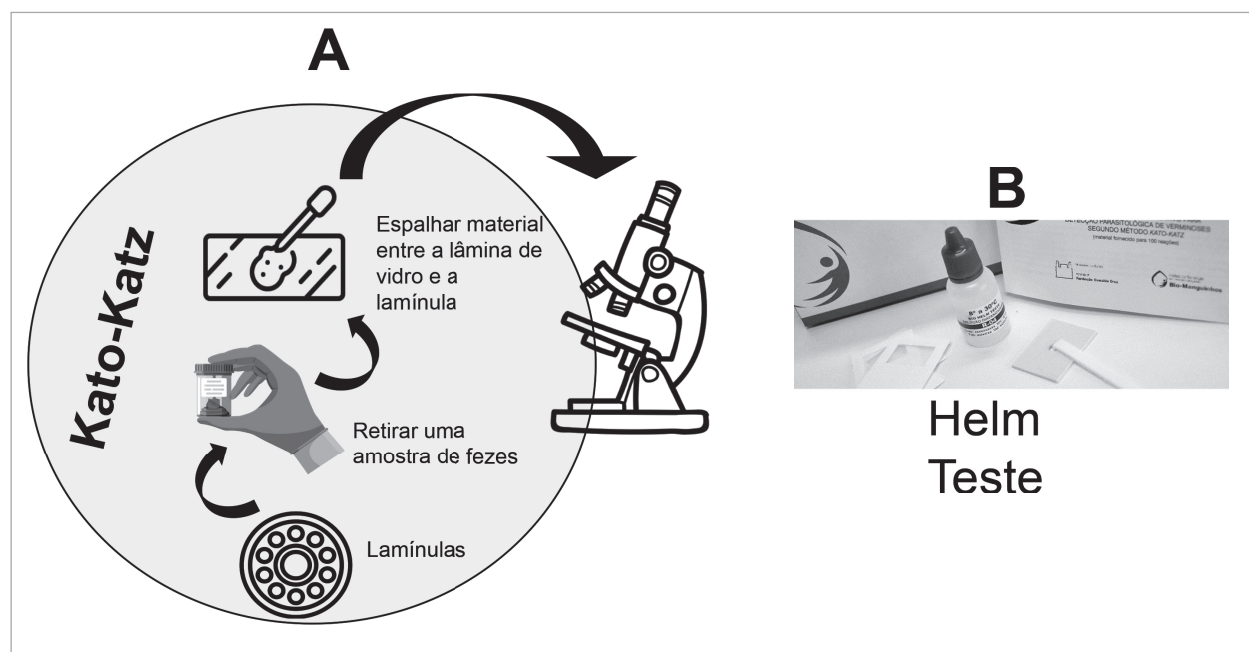


FIGURA 6.3 Teste parasitológico Helm Teste.

A: Método de Kato-Katz para detecção qualitativa e quantitativa de ovos de helmintos. B: Foto do Helm Teste.

Fonte: Elaborada pelos autores, baseada em Fiocruz (2018).

Nota: Para o desenvolvimento da figura, foram utilizados elementos visuais da Wikimedia e Picry.com licenciados pela Creative Commons.

vigilância e monitoramento das doenças parasitárias, além de trabalhar na sua prevenção.

6.3.2 Imunodiagnóstico

Em uma definição tradicional, testes sorológicos são aqueles capazes de detectar, em amostra de soro, a presença de imunoglobulinas especificamente produzidas em resposta ao contato com patógenos ou indutores de resposta imune contidos em vacinas (NOGUEIRA; SILVA, 2020). Entretanto, um conceito abrangente é amplamente aceito, em que os ensaios sorológicos passam a ser denominados imunoenaios, para também englobar a detecção de componentes antigênicos (ou antígenos) em amostras de sangue total, plasma, saliva, urina e outras matrizes biológicas. Os imunoenaios, tanto para uso laboratorial quanto não laboratorial, serão detalhados a seguir.

6.3.2.1 Testes laboratoriais

De maneira geral, alguns reativos para diagnóstico são tradicionalmente utilizados dentro de uma estrutura laboratorial, com ou sem o apoio de equipamentos específicos. Nessa classe de testes, uma série de técnicas distintas serve como base tecnológica para a detecção dos biomarcadores, em maior ou menor grau de automação aplicado ao processamento das amostras, mistura de componentes e interpretação/liberação de resultados.

Os imunoenaios podem ser baseados em detecção colorimétrica, fluorescência ou quimiluminescência (ZHAO; SUN; CHU, 2009). Em cada caso, o desempenho do teste dependerá do método imunológico envolvido (afinidade e especificidade do anticorpo, monoclonal ou policlonal) e do marcador para o complexo enzima/sistema de detecção escolhido (MARQUETTE et al., 2006). A seguir, serão apresentadas as principais tecnologias empregadas em reativos para diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas, bem como seus principais benefícios e limitações.

6.3.2.1.1 Imunofluorescência (IF)

Ensaio baseado na técnica de imunofluorescência geralmente são utilizados para confirmação sorológica nos casos em que as reações antígeno-anticorpo podem ser observadas a partir da utilização de um fluorocromo (fluoresceína) conjugado às regiões de fragmento cristalizável (Fc) de uma molécula de anticorpo (específico ou não). Os complexos imunes contendo esses anticorpos marcados podem ser detectados pela emissão de luz fluorescente, quando excitados por um feixe de menor comprimento de onda, que pode ser visto com o auxílio de um microscópio de fluorescência após imobilização do material em lâminas (COONS; KAPLAN, 1949).

Essa técnica pode ser realizada em uma variedade de materiais clínicos, sempre que houver a presença de células que potencialmente possam estar infectadas com o vírus ou parasita de interesse. Os materiais mais comumente utilizados são: (i) células de cultivo (após a inoculação com o material suspeito); (ii) tecidos de necropsia ou biópsia (impressão direta de tecido na lâmina-*clap*); (iii) tecidos congelados e cortados no criostato (tecidos fixados em formol e incluídos em parafina); (iv) células sanguíneas (leucócitos); e (v) células presentes em secreções (nasais, prepuciais, vaginais e no leite) (MORRISON, 1999). Neles, são considerados reagentes os soros que apresentam fluorescência e não reagentes os soros que apresentam ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

Há duas abordagens possíveis na aplicação da técnica que são a IF direta e a IF indireta. Na IF direta, geralmente, utiliza-se anticorpo policlonal (soro hiperimune produzido em animais), ou anticorpos monoclonais (Mabs) marcados com fluoresceína para detecção de antígenos. A IF direta tem como vantagens a rapidez e a simplicidade, por exemplo, em alguns protocolos o resultado é obtido em menos de uma hora. As desvantagens referem-se a reações inespecíficas que ocasionalmente ocorrem, sobretudo com o uso de anticorpos policlonais. A sensibilidade também é menor do que na IF indireta. Na IF indireta, o material a ser analisado é fixado em lâminas de microscópio. As células (portadoras de antígenos) são incubadas com o soro que se deseja testar, sendo então tratadas com outro soro que contenha anticorpos específicos para imunoglobulina humana (anti-Ig) conjugada a um fluorocromo, como a fluoresceína. A presença de anticorpos é revelada por meio de microscopia de fluorescência. Na reação positiva, aparecerá a coloração esverdeada (presença de antígenos), resultado da fluorescência emitida pela fluoresceína (Figura 6.4).

A IF indireta é indicada, por exemplo, para detectar a presença do protozoário *Trypanosoma cruzi* no organismo, devido às suas características de elevada especificidade e sensibilidade e da padronização de sua execução. Esse método permite identificar os anticorpos do tipo IgG, relacionados à fase crônica da doença de Chagas, bem como anticorpos do tipo IgM, associados à fase aguda da doença. De fato, a IF indireta foi uma das mais importantes inovações dentro da evolução do diagnóstico da doença de Chagas que, até hoje, afeta muitos brasileiros e habitantes de outros países da América do Sul. A IF indireta também é frequentemente empregada na detecção de anticorpos contra *Leishmania sp.* para confirmar os resultados positivos, duvidosos ou negativos obtidos com os métodos de IHA (inibição

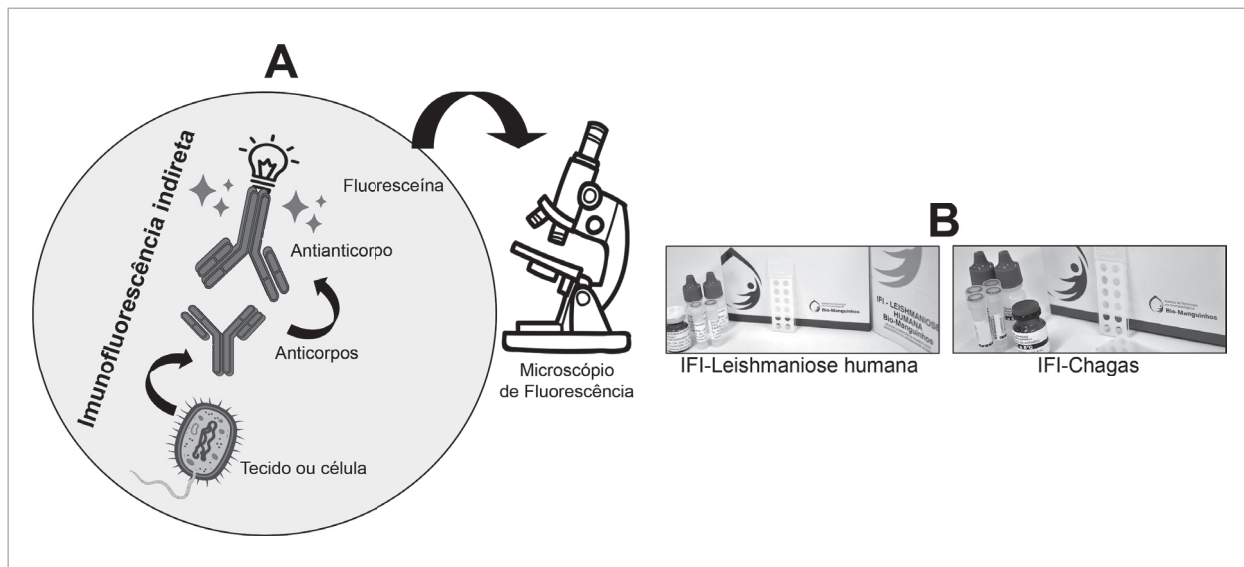


FIGURA 6.4 Técnica de imunofluorescência.

Fonte: elaborada a partir de Schwanke et al. (2014).

A: Esquema da reação. B: Foto de microscopia apresentando resultados positivos (amarelo-esverdeado) e negativos (vermelho). (C) Produtos fornecidos por Bio-Manguinhos baseados na IF indireta.

Nota: Para o desenvolvimento desta figura foram utilizados elementos da Wikimedia licenciados por Creative Commons e imagens da Galeria Fiocruz.

da hemaglutinação) e de EIE (ensaio imunoenzimático – ELISA) e chegou a ter grande importância na confirmação diagnóstica da infecção pelo HIV, bem antes da disponibilidade dos métodos moleculares. Embora esse método exigisse um treinamento contínuo da equipe e da rede de execução, o aspecto estigmatizante do diagnóstico no início da pandemia levava à necessidade do apoio desse suporte laboratorial, que apresentava maior especificidade do que os utilizados nos exames iniciais de triagem.

6.3.2.1.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Um dos imunoenaios mais comumente utilizado no diagnóstico laboratorial é o teste ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), que utiliza extrato bruto de parasitas, antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos adsorvidos à superfície de cavidades de micropelículas. Essa técnica é amplamente utilizada devido à facilidade de automação e custo relativamente baixo, além de alta sensibilidade e especificidade (LUQUETTI; RASSI, 2000).

As variações da técnica, apresentadas a seguir, permitem a detecção e a quantificação tanto de antígeno quanto de anticorpo:

I. **ELISA indireto:** mais comumente utilizado em diagnóstico, nessa abordagem pesquisam-se anticorpos circulantes, utilizando-se antígenos adsorvidos em fase sólida que podem ser de origem sintética, ou

pode-se também utilizar o próprio agente inativado. Após a adsorção na placa, adiciona-se o soro do paciente que, possuindo anticorpos específicos, serão fixados sobre os antígenos. Enzimas como a peroxidase são conjugadas às anti-imunoglobulinas humanas e, em caso de positividade das amostras, ocorre uma reação corada ao se adicionar o substrato específico da enzima (Figura 6.5).

II. **ELISA de competição:** as placas são adsorvidas com anticorpos específicos contra o agente em questão. É chamado de teste de competição devido ao fato de o soro testado ser incubado previamente com o antígeno, antes de ser adicionado à placa. Se houver anticorpos no soro, haverá a formação de complexo antígeno-anticorpo. Quando essa mistura for adicionada à placa, o antígeno não vai ligar-se no anticorpo fixado, pois já está ocupado. A lavagem remove a mistura antígeno-anticorpo. Então se adiciona o anticorpo secundário marcado com a enzima, lava-se e adiciona-se o substrato. Quando houver anticorpos no soro, não haverá mudança de coloração do substrato (resultado positivo). Se não houver anticorpos no soro, o antígeno ficará livre e irá ligar-se no anticorpo que está fixado na placa, não sendo removido pela lavagem. Então, o anticorpo secundário marcado com a peroxidase liga-se no anticorpo primário. A lavagem não removerá o anticorpo marcado e a adição do substrato será seguida de mudança de coloração (reação negativa).

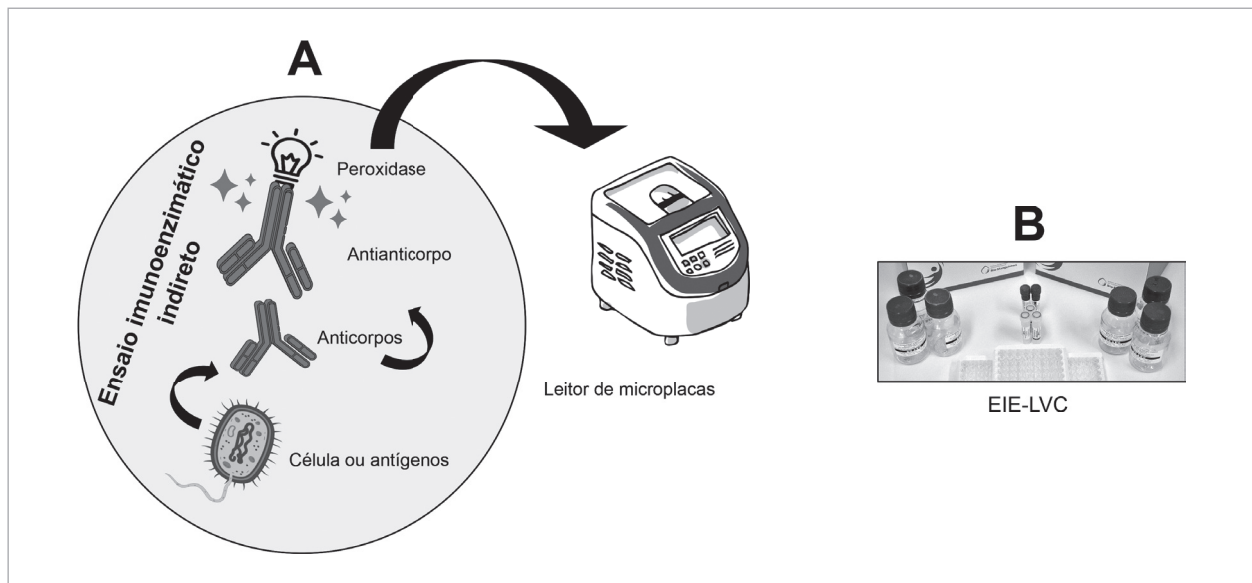


FIGURA 6.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA).

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

(A) Esquema da reação. (B) Kit fornecido por Bio-Manguinhos baseado em ELISA.

Nota: Para o desenvolvimento desta figura foram utilizados elementos da Wikimedia licenciados por Creative Commons.

III. **ELISA do tipo sanduíche:** consiste na fixação de um anticorpo específico contra o agente em questão, na placa de poliestireno. Adiciona-se posteriormente a amostra suspeita, seguida de incubação e lavagem. O anticorpo específico (pode ser o mesmo que foi adsorvido na placa) conjugado com a enzima é acrescentado. Finalmente, adiciona-se o substrato que dará coloração ao sobrenadante. A quantidade do substrato que foi modificada pela ação da enzima é proporcional à quantidade de antígeno presente.

Os ensaios do tipo ELISA têm sido reportados na detecção, a partir do 5º dia, de IgM contra o vírus da febre chikungunya (CHKV) ou da dengue (CUNHA; TRINTA, 2017), bem como da proteína NS1 do vírus da dengue (DENV) (DUONG et al., 2011), em testes especialmente sensíveis em amostras coletadas até três dias após o aparecimento dos sintomas. No caso do vírus da febre amarela (YFV), o ELISA (tendo a imunofluorescência como alternativa) é incluído como um dos parâmetros do diagnóstico laboratorial, quando identificada a presença de IgM YFV-específica, ou aumento de 4 vezes ou mais dos níveis de IgG em amostras obtidas entre a fase aguda e a convalescente, na ausência de vacinação recente (GARDNER; RYMAN, 2010). O ELISA indireto é utilizado como forma de diagnóstico para confirmar ou não a Leishmaniose visceral canina (LVC).

6.3.2.1.3 Imunoensaios de quimiluminescência (CLIA)

Os ensaios baseados em imunoensaios de quimiluminescência (CLIA, do inglês *chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay*) combinam uma reação imunológica a um sistema quimiluminescente para determinar a concentração de analitos por sondas que geram luz por meio de uma reação química (XIAO; XU, 2020) e foram desenvolvidos para ampliar a sensibilidade da detecção colorimétrica convencional (MARQUETTE et al., 2006). A técnica, que representa uma ferramenta versátil e ultrasensível com uma ampla gama de aplicações em biotecnologia, é comumente usada com base em atividade enzimática ou nanopartículas. Tradicionalmente, os substratos mais populares são luminol, isoluminol e seus derivados, éster de acridínio e derivados, peroxidase e fosfatase alcalina (ALP) (WANG et al., 2012).

O CLIA convencional é limitado quando se trata de sinais fracos e tempo de luminescência curto. Para ampliar esses sinais, foram adicionados intensificadores ao sistema, que desempenham um papel mediador na reação, aumentando a ativação eletrônica e elevando a sensibilidade analítica. Tanto mecanismos de CLIA aprimorados quanto a aplicação de intensificadores químicos vêm sendo descritos (XIAO; XU, 2020).

Nos últimos anos, ensaios CLIA tornaram-se muito populares em química clínica e análise ambiental. Isso

ocorreu devido à sua ampla faixa dinâmica, automação completa e às combinações com novos materiais, nanopartículas e instrumentos para detecção automatizada e integrada (MARQUETTE et al., 2006; XIAO; XU, 2020; ZHAO; SUN; CHU, 2009).

Como marcadores, as nanopartículas apresentam muitas vantagens, entre elas a facilidade com que diversas nanoestruturas com propriedades únicas em dimensões nanométricas podem ser preparadas. Além disso, pode-se acrescentar o fato de serem mais adequadas para conjugação com sistemas biológicos, por apresentarem boa biocompatibilidade e serem semelhantes a muitas macromoléculas em tamanho (LI et al., 2005). Um exemplo emblemático do reconhecimento do alto grau de sensibilidade dos ensaios CLIA reside em sua aplicação na triagem sorológica das bolsas de sangue doado no Brasil, ou seja, como ferramenta laboratorial para garantir a segurança transfusional em relação às doenças transmitidas pelo sangue e seus componentes ou derivados (CARBONI et al., 2020).

6.3.2.1.4 Citometria de fluxo (CF)

O princípio da citometria de fluxo foi idealizado por Andrew Moldavan, em 1934, e aperfeiçoado ao longo de décadas até sua forma final, que foi estabelecida por Bonner et al. (1972). O princípio da citometria de fluxo é baseado na análise individual de células ou partículas marcadas com fluorocromos em suspensão, a partir de múltiplos parâmetros fluorimétricos, enquanto passam por um ou mais feixes de *laser* (*light amplifications by stimulated emission of radiation*) (SILVA, 2021).

A dispersão pela luz visível, que é independente da fluorescência, indica o tamanho e a complexidade interna do analito, como a granulação celular, por exemplo. De forma complementar, amostras podem ser preparadas para a análise da fluorescência, feita a partir da excitação de um fluorocromo e da mensuração da luminescência gerada. Esses fluoróforos podem ser obtidos por transfeção e expressão de proteínas fluorescentes, marcação a partir de corantes ou por anticorpos monoclonais conjugados a moléculas fluorescentes ligados à partícula de interesse (CARVALHO; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2010; MCKINNON, 2018).

A CF analisa, multiparametricamente, as características físico-químicas e biológicas de uma única célula ou de determinada população celular heterogênea, a partir de uma gama diversificada de tipos amostrais. Uma abordagem mais recente dessa metodologia emprega o uso de arranjo de esferas citométricas (CBA, do inglês *cytometric bead array*), permitindo a identificação de múltiplos analitos simultaneamente, incluindo citocinas, sinalizadores intracelulares, mediadores inflamatórios, entre outros (MEDEIROS; GOMES, 2019; SILVA, 2021).

Aplicações da técnica residem, principalmente, em ensaios de imunofenotipagem, a exemplo da contagem de linfócitos CD4 e CD8 no acompanhamento de pacientes com HIV. Além disso, pode-se considerar o uso em diagnóstico bacteriano, viral e de enfermidades hematopoiéticas, investigação de sensibilidade aos antibióticos, entre outros (DE ALMEIDA SANTIAGO et al., 2016).

6.3.2.1.5 Microarranjos líquidos (MBBA)

A metodologia de microarranjos líquidos, ou ensaios múltiplos baseados em microesferas (do inglês, *multiplex bead-based array*), foi originada a partir da associação da citometria de fluxo ao uso de microesferas como substrato imobilizado para acoplamento de antígenos e anticorpos. Ela tem se mostrado uma ferramenta útil na triagem de insumos para uso diagnóstico e no desenvolvimento de ensaios para mensuração de múltiplos biomarcadores (DUNBAR, 2013; FONSECA et al., 2011; GRAHAM; CHANDLER; DUNBAR, 2019).

Nas variadas plataformas disponíveis, diferentes populações de microesferas são formadas a partir de processos de pigmentação interna com quantidades específicas de dois ou mais fluorocromos, que criam padrões excitatórios similares, mas perfis de emissão sutilmente diferentes e únicos. As microesferas, magnetizadas ou não, e com superfície modificada para permitir a ligação de peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, são sensibilizadas com moléculas de captura e mantidas em suspensão para propiciar a ligação com o alvo. Após exposição a uma solução com a molécula marcada, o material é aspirado para dentro de um sistema de leitura, ocorrendo a excitação. Então, a excitação é identificada por um gerador de imagens após exposição a dois feixes de *laser*, um para diferenciação da população de microesferas e, conseqüentemente, do alvo, e outro para detecção da formação do complexo imune por meio da ligação entre molécula de captura – alvo – molécula de detecção marcada.

Os tipos de ensaios possíveis remetem aos princípios do ELISA, ou seja, podem ser via captura sanduíche, competitiva ou indireta. O arranjo baseado em microesferas é utilizado para o diagnóstico ou triagem de biomarcadores em amostras clínicas, permitindo detectar, quantificar e caracterizar uma gama de alvos de interesse relevantes para doenças infecciosas em imunoenaios, genotipagem, bem como nas atividades de pesquisa e otimização do diagnóstico laboratorial. São as vantagens relacionadas aos períodos reduzidos de incubação, volume reduzido de amostra, aumento de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade em relação aos testes tradicionais, realizados em plataformas bidimensionais (SILVA, 2021).

Variações da tecnologia podem ser exemplificadas com o uso de micro/nanopartículas cujas populações distintas são formadas a partir de processos de marcações químicas ou físicas que, alternativamente, permitem a identificação e/ou quantificação simultânea de diferentes alvos a partir de sistemas de detecção bastante sensíveis, baseados, em geral, em fluorescência. Adicionalmente, cabe citar também o microarranjo sólido planar, que também possibilita a realização de múltiplos diagnósticos, simultaneamente (DUNBAR; HOFFMEYER, 2013; FONSECA et al., 2011; PARSA et al., 2018).

Um microarranjo proteico para detecção de NS1 (YFV) foi desenvolvido para identificação e diferenciação de flavivírus (infecção × vacinação) com sucesso (CLETON et al., 2015). Essa tecnologia também vem sendo aplicada à determinação da expressão de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ou antígenos leucocitários humanos (HLA), essenciais na avaliação da equivalência entre células, tecidos e órgãos. Esses testes para determinação da presença e diferenciação de anticorpos HLA são parte essencial da avaliação de compatibilidade entre doador e receptor e tornaram-se padrão internacional para a realização de transplantes a partir de 1970 (KLEIN; WILEY, 1988).

6.3.2.1.6 Detecção de anticorpos neutralizantes (NAb)

O teste de neutralização por redução de placa (*plaque reduction neutralization test*, PRNT) é considerado padrão-ouro para o diagnóstico confirmatório de infecções por *Flavivirus* a partir da identificação de anticorpos neutralizantes (SIMÕES et al., 2019). Antes da epidemia da febre Zika, a tecnologia era utilizada há muitos anos na medição de anticorpos específicos para neutralização do vírus da dengue (RUSSELL; NISALAK, 1967), para o qual permaneceu como ensaio padrão. Uma variedade de ensaios baseados em PRNT é usada por grupos que desenvolvem vacinas contra Dengue, para determinação da imunogenicidade de candidatos vacinais, pesquisadores e laboratórios de saúde pública, para apoiar estudos epidemiológicos e de patogênese da doença em sua forma grave (JARMAN et al., 2009).

Resumidamente, o ensaio se inicia a partir de diluições de amostras de soro e adição do vírus em estudo, para permitir a ocorrência da reação de neutralização caso anticorpos específicos estejam presentes na amostra. Em seguida, o sobrenadante contendo vírus é transferido para uma cultura celular e incubado para permitir a verificação do efeito. O material é fixado e ocorre a contagem das unidades formadoras de placas, que indicam a permanência da atividade viral, seguida pelos cálculos que fazem a correlação da diluição da amostra com o título de anticorpos presentes, em geral quando há

redução do número de placas em 50 ou 90% (COHEN; DOBLAS; ANDREWS, 2008; SIMÕES et al., 2012).

As características técnicas do ensaio, que demandam intensa padronização e avaliação de reagentes, incluindo linhagens celulares e virais utilizadas, além de infraestrutura laboratorial aderente às Boas Práticas e diretrizes de Biossegurança, dificultam sua ampla utilização e harmonização entre laboratórios. Essas dificuldades, também, inibem seu uso em demandas de processamento de grande número de amostras, uma vez que é muito limitada sua automação e extenso o tempo requerido para a execução do teste e liberação dos resultados, bem como obstáculos relacionados à validação do processo de análise dos resultados (BEWLEY et al., 2021).

Em virtude das razões expostas, diversas versões alternativas ao PRNT têm sido pesquisadas e disponibilizadas, com o intuito de simplificar e ampliar o uso do conceito metodológico do ensaio, sendo denominadas ensaios de soroneutralização, microneutralização, neutralização com pseudovírus, entre outras (BEWLEY et al., 2021; SIMÕES et al., 2019). Essas derivações foram impulsionadas mais uma vez durante a pandemia da Covid-19, em que o PRNT foi o ponto de partida para estudos de neutralização viral e para o desenvolvimento de ensaios visando à determinação da duração dos títulos de anticorpos após infecção natural e/ou vacinação que pudessem estar atrelados a uma potencial imunidade à doença (BEWLEY et al., 2021; LU et al., 2021; MATUSALI et al., 2021).

6.3.2.2 Testes rápidos

São chamados de testes rápidos os ensaios de triagem que produzem resultados em, no máximo, 30 minutos, de fácil execução e dispensando infraestrutura laboratorial (FERREIRA, 2005). Apesar da metodologia simples, esses produtos são baseados em princípios técnicos relativamente complexos para oferecer a oportunidade de acesso a resultados importantes obtidos longe dos principais hospitais ou instalações laboratoriais, onde há necessidade de obtenção de resultados imediatamente.

A introdução dos testes rápidos pode ser considerada uma quebra de paradigmas na área da saúde. Isso ocorre no sentido de que o diagnóstico pode ir rapidamente até onde está o paciente, possibilitando expressivos avanços na obtenção de dados epidemiológicos e na resposta a uma determinada situação clínica ou emergência sanitária.

Exemplos da aplicação dos testes rápidos são gestantes em trabalho de parto que desconhecem seu estado sorológico para HIV ou Sífilis, indivíduos que se encontram em localidades isoladas e com acesso restrito aos serviços de atenção básica em saúde, além de contextos

em que o volume de amostras a ser testado não justifica a realização dos testes laboratoriais complexos em termos de custo-efetividade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Os testes rápidos foram também muito utilizados, com a contribuição de Bio-Manguinhos/Fiocruz, no diagnóstico da Leishmaniose, principalmente em locais de difícil acesso. Esse tipo de ensaio obteve maior popularidade a partir do começo dos anos 1990, porém, apesar da aparente simplicidade, os testes rápidos devem ser realizados por profissionais de saúde devidamente capacitados em serviços submetidos a programas de controle de qualidade, como é feito para os laboratórios que realizam a sorologia convencional (SILVA, 2016).

Os testes rápidos apresentam sensibilidade e especificidade similares aos ensaios laboratoriais, mas em populações com baixa prevalência da doença a proporção de resultados falso-positivos pode ser maior. Em função disso, uma das utilidades dos testes rápidos reside em situações nas quais o seu uso não seja dirigido primariamente para fins de diagnóstico, mas quando existe a necessidade de avaliar e decidir rapidamente sobre a utilização de profilaxia medicamentosa para determinadas infecções. Nestes casos, pode ser aceita a realização de um único teste rápido para se tomar uma decisão terapêutica de emergência, sendo, entretanto, imprescindível encaminhar a amostra ou o(a) paciente, o mais rápido possível, para a realização de outros testes para esclarecimento do diagnóstico (SILVA, 2016).

6.3.2.2.1 Testes rápidos para detecção de anticorpos

Várias nanopartículas têm sido usadas como marcadores biológicos, sendo as de ouro coloidal as mais

utilizadas em sistemas biotecnológicos devido às suas excelentes características físicas e químicas (LI et al., 2005). O teste rápido tradicional é um ensaio que se vale da tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral (LF, do inglês *lateral flow*), realizado a partir de amostra de sangue total venoso ou obtido a partir de punção digital, de soro ou plasma. O princípio de funcionamento do teste envolve a utilização de um ou mais antígenos recombinantes ligados a uma membrana (fase sólida) e um conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal.

A amostra é aplicada à posição designada “S” (*sample*, em inglês) na cartela plástica que serve como base de apoio (também denominada cassete). Posteriormente, é adicionado um tampão de corrida, que propicia o fluxo lateral dos componentes do conjugado, e uma linha roxa/rosa evidencia a interação dos anticorpos específicos da amostra com o antígeno.

Na ausência de anticorpos específicos, essa linha não se forma na área do TESTE (T), mas a amostra continua migrando ao longo da membrana, produzindo uma linha de mesma cor na área de CONTROLE (C). Isso demonstra o funcionamento adequado dos reagentes. Os resultados reativos são evidências de exposição ao patógeno e podem ser usados como suporte ao diagnóstico clínico (FIOCRUZ, 2022). Essa estratégia de montagem de um teste rápido de fluxo lateral está representada na Figura 6.6.

Variações de sua utilização incluem uma combinação de dois antígenos para detecção de anticorpos contra um único protozoário, de três antígenos distintos para detecção de anticorpos contra dois subtipos virais, ou

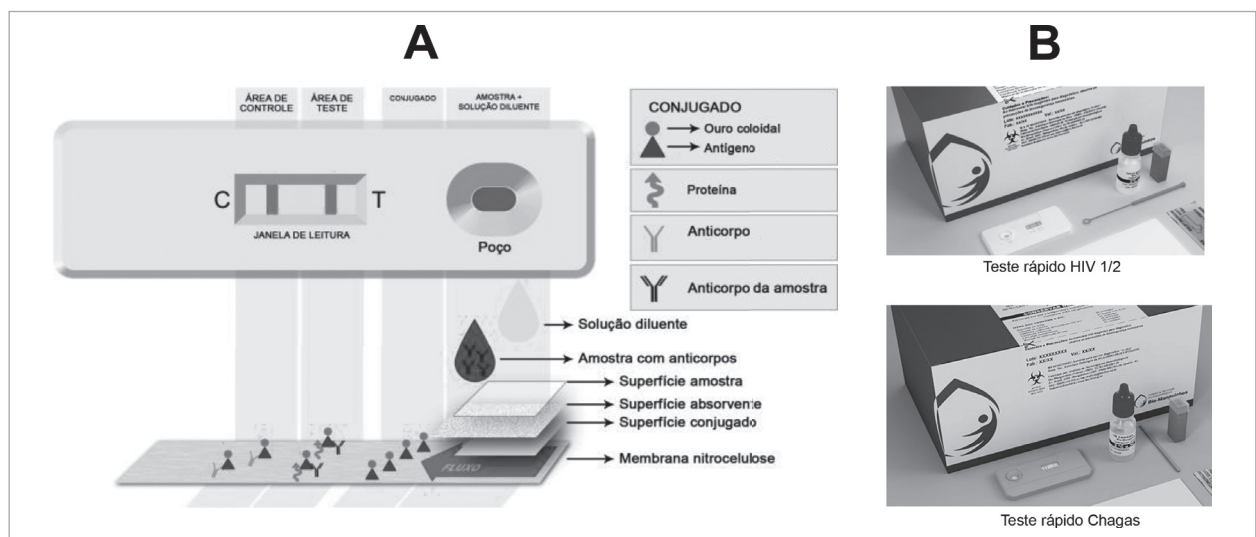


FIGURA 6.6 Esquema geral de um teste rápido para detecção de anticorpos utilizando a tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral (*Lateral Flow*, LF).

Fonte: adaptada de Fiocruz (2022); canva.com.

de antígenos para detecção de imunoglobulinas de classes distintas (IgM e IgG) contra o mesmo vírus. Essas características são consideradas nos kits fornecidos por Bio-Manguinhos/Fiocruz para diagnóstico de doença de Chagas, infecção por HIV e SARS-CoV-2, respectivamente (FIOCRUZ, 2022).

Uma segunda geração de teste rápido, também denominada imunoblot rápido, baseia-se na tecnologia de imunocromatografia de duplo percurso (*Dual Path Platform*, DPP®). Nela, ocorre a mesma combinação antígeno(s)-membrana-proteína A-ouro coloidal, porém a amostra colhida é aplicada na posição designada “amostra + tampão” e o tampão propicia o fluxo lateral na direção das duas janelas do cassete, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos.

Após a migração da solução (tampão + amostra) ao longo do suporte de teste, adiciona-se o tampão de corrida à posição “tampão”. Isso possibilita a ligação do conjugado ao complexo antígeno-anticorpo nas áreas TESTE (T) superior e inferior, produzindo a linha (roxa/rosa) nesta área e permitindo a visualização individualizada dos diferentes tipos de anticorpos (geralmente IgM na janela superior e IgG na janela inferior) (Figura 6.7).

Em relação aos testes Imunoblot, tem especial importância o desenvolvimento de um teste confirmatório para HIV por Bio-manguinhos/Fiocruz, estabelecendo um processo da triagem até a confirmação do diagnóstico de 30 a 40 minutos. Além da economia de tempo, é importante pensar na economia de recursos, porque os testes confirmatórios eram muito caros e demorados.

Outros exemplos de ensaios imunocromatográficos deste tipo incluem os testes produzidos em Bio-Manguinhos/Fiocruz para detecção de anticorpos contra os vírus chikungunya, dengue, HIV 1/2, zika, teste duplo HIV/sífilis, teste triplo ZDC (zika, dengue e chikungunya), entre outros (CUNHA; TRINTA, 2017; FIOCRUZ, 2020).

6.3.2.2 Testes rápidos para detecção de antígenos

Nos ensaios imunocromatográficos, a capacidade de detecção pode ser antecipada e a sensibilidade, ampliada com a alteração dos insumos utilizados, visando à detecção de antígenos ao invés de anticorpos. O princípio básico do teste permanece o mesmo, mas a membrana recebe anticorpos (geralmente monoclonais) que reconhecem com avidéz os antígenos.

Este é o caso dos testes rápidos amplamente utilizados durante a pandemia de Covid-19, quando foram disponibilizados kits para detecção individual de antígenos de SARS-CoV-2, além de testes duplos para diferenciar essa infecção da influenza, que circulava simultaneamente e apresenta manifestações clínicas bastante semelhantes na maioria dos pacientes (FIOCRUZ, 2022). A Figura 6.8 mostra como proceder para realização de um teste de detecção de antígenos para SARS-CoV-2.

Para eliminar uma possível subjetividade na interpretação dos resultados e, principalmente, permitir o armazenamento e transmissão de dados, viabilizando a conectividade entre locais de testagem e processamento de resultados em inquéritos epidemiológicos, por exemplo, os testes rápidos têm sido oferecidos com a possibili-

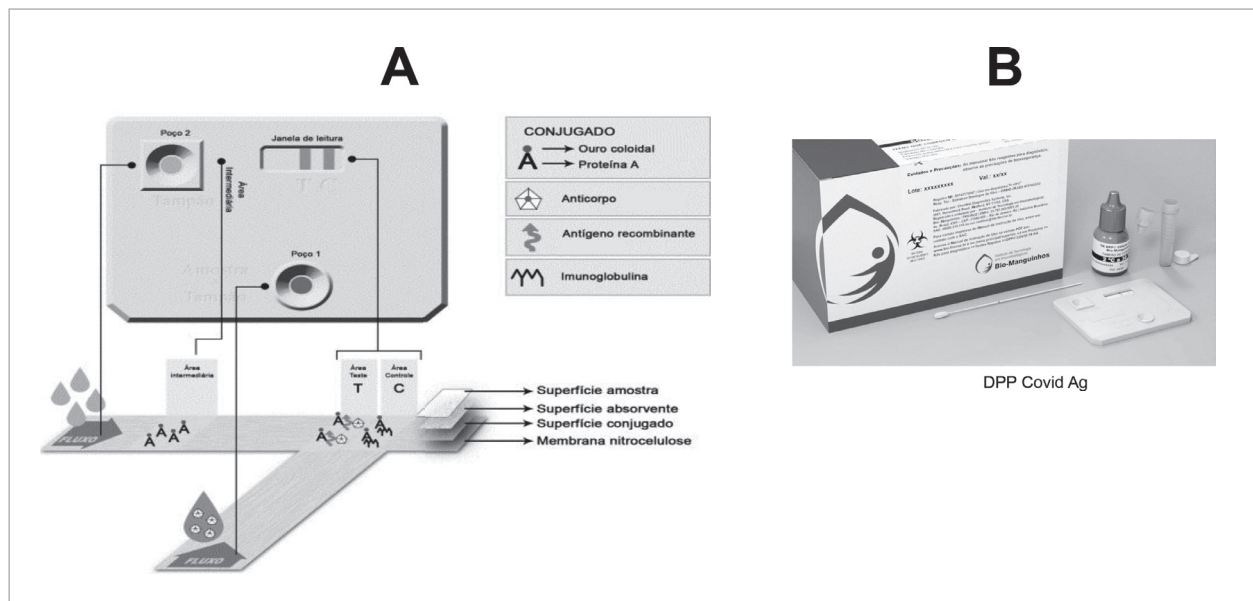


FIGURA 6.7 Esquema geral de um teste rápido para detecção de anticorpos utilizando a tecnologia de imunocromatografia de duplo percurso (*Dual Path Platform*, DPP®).

Fonte: adaptada de Fiocruz (2020); canva.com.

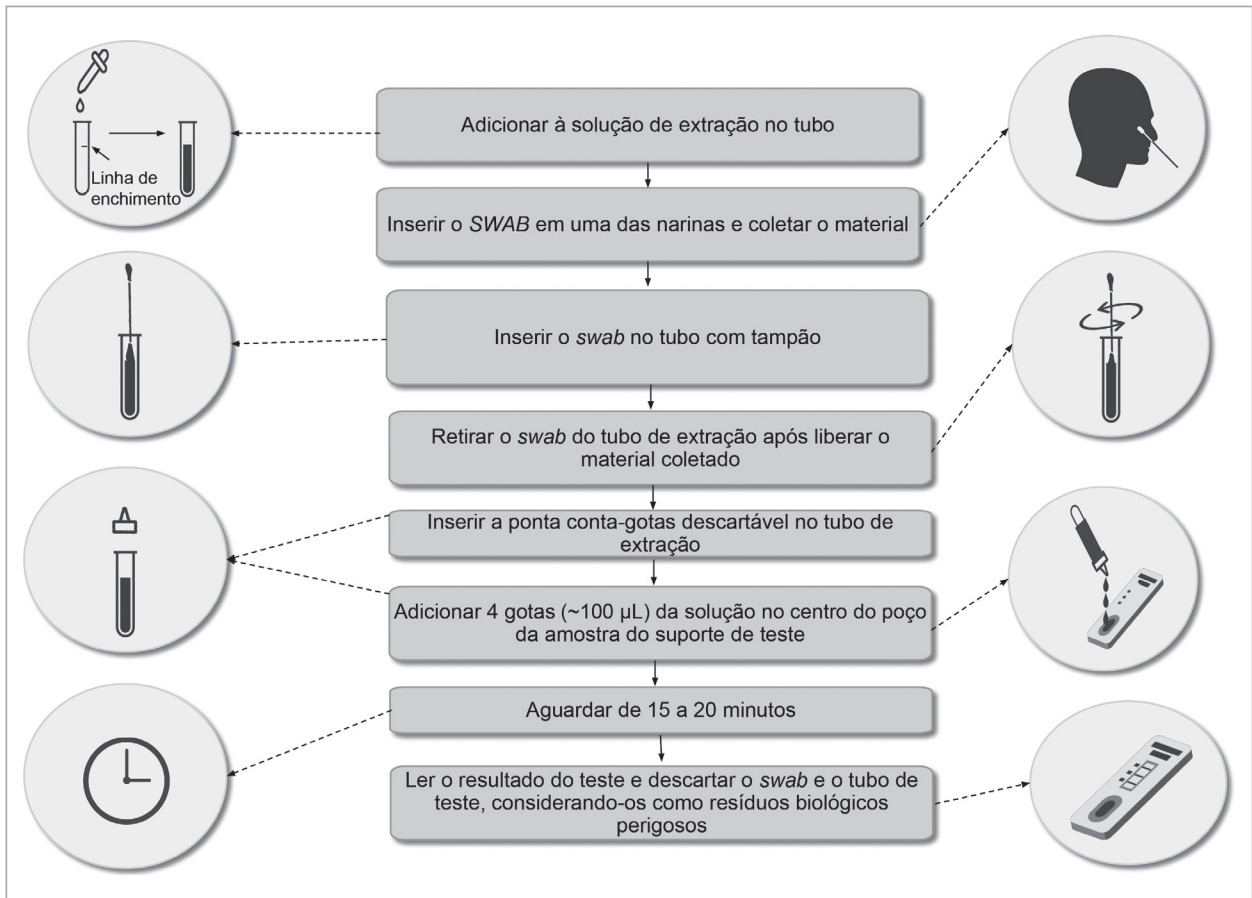


FIGURA 6.8 Esquema geral da realização de um teste rápido para detecção de antígenos utilizando a tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral (*Lateral Flow*, LF).

Fonte: elaborada a partir de Fiocruz (2022); canva.com.

dade de leitura automatizada por dispositivos eletrônicos (leitores), disponíveis em diferentes formatos. Além de portáteis, tais equipamentos são de fácil manuseio, não requerem manutenção e podem ser adaptados para uso em mais de um teste, ou seja, aplicados a produtos distintos desenvolvidos na mesma plataforma, o que otimiza recursos e reduz o custo agregado.

6.3.3 Diagnóstico molecular

Muitos dos conceitos relacionados à biologia molecular foram estabelecidos em meados do século XX, principalmente após a determinação da ultraestrutura da dupla hélice de ácido desoxirribonucleico (DNA), evidenciada pela primeira vez em 1953, por Watson & Crick. O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) permitiu consolidar nas últimas três décadas o desenvolvimento de novas linhas de pesquisa básica e aplicada (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985). Grande parte desses avanços metodológicos ocorreu após a desco-

berta da enzima polimerase termoestável, proveniente da bactéria extremófila *Thermus aquaticus* (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988).

Os testes baseados na PCR são testes moleculares com muitas vantagens sobre os testes imunológicos, que são baseados em anticorpos e antígenos. Os PCR permitem detectar a presença de patógenos mais cedo que os métodos imunológicos, uma vez que o paciente pode levar dias ou semanas para desenvolver anticorpos contra um agente infeccioso. A presença de ácido nucleico detectável do patógeno antecede também a presença de antígenos em quantidade suficiente para serem detectados em testes imunológicos. Geralmente, a detecção de antígeno é um pouco menos sensível, uma vez que identifica partes da estrutura viral em quantidades dependentes de expressão do material genético do patógeno e, muitas vezes, não ocorre tão precocemente a replicação do material genético para a expressão subsequente de seus peptídeos antigênicos (WÖLFL-DUCHEK et al., 2022). As metodologias diagnósticas por biologia molecular apresentam um conjunto de avanços tecnológicos,

conferindo desempenho, sensibilidade e especificidade satisfatórios para a detecção com precisão de patógenos e perfis genéticos (ENQUIST, 2009).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de diferentes técnicas de diagnóstico molecular revolucionou a medicina diagnóstica (ANGRIST et al., 2021). O segmento de diagnóstico molecular movimentou anualmente bilhões de dólares, em escala mundial, configurando um setor extremamente dinâmico (*Global Molecular Diagnostics Industry 2022-2026*). Nessa perspectiva, as tendências de desenvolvimento de novos produtos estão voltadas para uma melhor orientação da conduta terapêutica, com diagnósticos mais precisos e precoces das doenças. A detecção mais precoce da infecção tem papel fundamental na redução da morbidade e da mortalidade de diversas doenças, permitindo a introdução mais ágil de tratamentos específicos para cada indivíduo, além de sua utilidade para decisões a respeito de isolamento, controle de contactantes e interrupção nas cadeias de transmissão.

6.3.4 PCR em tempo real

A técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) é composta por três etapas: (i) desnaturação da dupla fita de DNA gerada pelo aumento de temperatura; (ii) anelamento dos oligonucleotídeos, em sequências específicas do alvo a ser amplificado; e (iii) extensão da cadeia de DNA pela enzima *Taq* DNA Polimerase. A evolução da PCR convencional para a PCR em tempo real permitiu a detecção em “tempo real” do produto amplificado marcado com fluoróforo, durante a fase exponencial da reação de PCR, combinando a amplificação e a detecção da região alvo de interesse diagnóstico em uma única etapa e em um único equipamento, excluindo a eletroforese em gel (HOLLAND et al., 1991) e o risco potencial de contaminação de amostras por aerossol. Além disso, a emissão fluorescente adiciona uma amplificação fotoquímica à reação, justaposta à própria amplificação exponencial do ácido nucleico, dada a natureza bioquímica da PCR, o que proporciona um aumento significativo da sensibilidade, alcançado pela PCR em tempo real, em relação à sua precursora PCR simples. A PCR em tempo real utiliza como molde o ácido desoxirribonucleico (DNA –do inglês *deoxyribonucleic acid*). Caso o material a ser amplificado seja Ácido Ribonucleico (no inglês RNA, ou ARN em português), faz-se necessária uma etapa de transcrição reversa do RNA em uma molécula complementar ao DNA (cDNA) por meio da reação com a enzima Transcriptase Reversa.

Diferentes sistemas de fluorescência podem ser utilizados para a técnica de PCR em tempo real. Os sistemas TaqMan, Molecular Beacons, sondas Scorpions,

HybProbe, Plexor, LNA e outros permitem a detecção por sequência específica. No entanto, os fluoróforos intercalantes de DNA, como SYBRGreen, não são específicos a sequências, revelando qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. Comparativamente à PCR convencional, a PCR em tempo real tem como vantagem a possibilidade de ser um ensaio qualitativo (RT-PCR) ou quantitativo direto (qRT-PCR). Métodos derivados do PCR em tempo real vêm cumprindo importante papel para a saúde pública no Brasil na testagem dos exames das bolsas de sangue, permitindo que sejam identificados patógenos como HIV ou HCV em fases precoces de infecção, antes do tempo necessário para o surgimento de anticorpos detectáveis nos exames tradicionais de triagem.

Para reações multiplex de PCR em tempo real (com detecção de mais de um alvo), é necessário utilizar fluoróforos com comprimentos de ondas distintos. A faixa da emissão espectral dos equipamentos de PCR em tempo real é de 500 a 700 nm. No mercado, existem equipamentos com dois ou mais filtros; quanto maior o número de filtros, maior a possibilidade de processar ensaios multiplex. A quantidade de filtros de um equipamento de PCR em tempo real define a quantidade de alvos que poderá conter um ensaio multiplex. Isto tem o potencial de aumentar a velocidade com que novos alvos são incorporados às ferramentas diagnósticas, como aconteceu com os testes para Covid-19 que, em um momento inicial, contemplavam apenas a cepa original e, posteriormente, puderam incluir de maneira rápida as variantes que foram surgindo. O uso dessa ferramenta permite, também, a realização simultânea de exames de PCR diagnóstico para diversos patógenos associados a condições clínicas em diferentes sítios (infecção de sistema nervoso central, pneumonias virais, entre outras).

A reação multiplex permite ainda que mais de um alvo de interesse seja analisado na mesma reação, incluindo a amplificação do controle interno, que tem a função de validar o processamento individual de cada amostra. Ademais, a PCR em tempo real caracteriza-se por apresentar alta sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade nos resultados. Pode ser utilizada para quantificação de carga viral, expressão gênica, terapia gênica, detecção de patógenos, determinação da eficácia de terapia, genotipagem (*single nucleotide polymorphism* – SNP), perfil de resposta inflamatória, detecção de organismos transgênicos (OGM – organismo geneticamente modificado), qualidade de alimentos, controle de qualidade e validação de ensaios etc. A versatilidade para aplicações em diagnósticos e a possibilidade de automação fazem dessa metodologia a escolha diagnóstica de muitos laboratórios clínicos, laboratórios de pesquisa e empresas do segmento de diagnóstico (COBO, 2012).

6.3.5 Amplificação isotérmica

A amplificação isotérmica, diferente da PCR, é uma tecnologia dependente de iniciadores que pode ser usada para a amplificação contínua de ácidos nucleicos em uma única temperatura e reação (COMPTON, 1991). Os principais métodos de amplificação isotérmica são: LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* e *CRISPR-Associated Protein - Cas System*), 3SR (*Self-Sustained Sequence Replication*), SDA (*Strand Displacement Amplification*), RCA (*Rolling Circle Amplification*), HDA (*Helicase Dependent Amplification*), CPA (*Cross Priming Amplification*), PSR (*Polymerase Spiral Reaction*), NASBA™ (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), TMA™ (*Transcription Mediated Amplification*), entre outros (BOONBANJONG et al., 2022).

A técnica LAMP foi desenvolvida, nos anos 2000, para a amplificação de DNA e a RT-LAMP, combinação com a enzima Transcriptase Reversa, para detecção de RNA. Ao longo dos anos, passou por várias adaptações, tendo como base metodológica a amplificação isotérmica mediada por *loop*, na presença de conjunto de iniciadores (sequências-alvo) distintos e enzima DNA polimerase (*phi29 DNA polymerase* ou *Bst DNA polymerase*). Pode ser detectada por: (i) turbidimetria – por meio da turbidez da quantidade crescente de pirofosfato de magnésio precipitado na solução como um subproduto da amplificação, (ii) colorimetria – pela detecção de mudança de cor devido à adição de indicadores de pH, como o vermelho de fenol; ou por (iii) fluorescência – usando corantes intercalantes, por exemplo SYBR green e SYTO 9 (BOONBANJONG et al., 2022).

A LAMP vem sendo amplamente utilizada como ferramenta diagnóstica e se destaca por ser uma metodologia rápida, simples, de baixo custo. Além disso, ela não possui a necessidade de estrutura complexa laboratorial (ZENG; WU; HE, 2022).

6.3.6 Microarranjos sólidos e líquidos

O microarranjo surgiu como um método flexível para analisar grandes números de fragmentos de ácidos nucleicos em paralelo, sendo adequado para diagnósticos por permitir a multiplexação, ou a capacidade de testar vários alvos simultaneamente. As tecnologias de microarranjos comumente usadas para a detecção e a identificação de alvos incluem microarranjos sólido, líquido e eletrônico (MILLER et al., 2015).

Os microarranjos sólidos podem ser vistos como um desenvolvimento contínuo dos métodos de biologia molecular, biologia celular, bem como um ensaio de diagnóstico. A convergência de ideias e princípios

utilizados nesses campos, juntamente com os avanços tecnológicos da impregnação de alvos em suportes sólidos ou chip, contribuíram para o surgimento de tecnologias de microarranjos e microchip.

Os microarranjos sólidos podem ser definidos como um conjunto de *spots* microscópicos impressos de moléculas de oligonucleotídeos, ou sondas; sendo essas de DNA, cDNA ou produtos de PCR dispostos espacialmente em uma ordem predefinida em um substrato sólido, conhecido como chip ou biochip (MILLER et al., 2015). As amostras são, normalmente, amplificadas usando conjuntos de primers multiplex, seguidos de hibridização, lavagem e detecção de sinal. Vários métodos de microarranjo sólido estão disponíveis e diferem no tipo de sonda, no suporte sólido e nos métodos usados para guiar a sonda e detectar o alvo (MILLER et al., 2015).

As tecnologias de microarranjo líquido são matrizes tridimensionais que usam micropartículas (microesferas ou esferas) como suporte sólido para a reação de ligação e citometria de fluxo ou imagem CCD (*charge-coupled device*) para detecção da esfera e alvo associado. As partículas podem ser distinguidas em subconjuntos por diferentes características de classificação, como fluoróforos absorvidos internamente, tamanho ou diâmetro e superfície ou características de composição, e a multiplexação é alcançada pelas características únicas dos subconjuntos de partículas.

Com mais avanços nos métodos automatizados de processamento de microarranjos e algoritmos de previsão genótipo-fenótipo, esses testes se tornarão úteis como um complemento ou substituto para testes de suscetibilidade convencionais, permitindo uma seleção mais rápida de terapia direcionada para doenças infecciosas. Adicionalmente, os métodos de microarranjos têm sido aplicados para detecção de patógenos, genotipagem, detecção de genes de resistência, diferenciação de espécies, expressão gênica, podendo também impactar na proteômica e auxiliando na descoberta de marcadores tumorais.

6.3.7 Point-of-care (POC) molecular

O modelo de diagnóstico molecular “*point-of-care*” (MPOC) é um sistema inovador que apresenta benefícios expressivos no diagnóstico e no manejo clínico de pacientes, uma vez que permite realização no próprio local da coleta, resultado rápido, identificação e diagnóstico discriminatório de vários patógenos de importância clínica e epidemiológica e com custo viável. Com requisitos mínimos tanto na capacidade técnico-operacional quanto nas estruturas laboratoriais para a execução dos ensaios, em sua grande maioria “*plug and play*”, a plataforma MPOC pode ser amplamente utilizada. Desse modo, além de promover um diagnóstico mais precoce

e um tratamento possivelmente mais eficaz, favorece a interrupção da cadeia de transmissão do patógeno, em casos de doenças infectocontagiosas.

As tecnologias mais utilizadas em MPOC são amplificação isotérmica, PCR e RT-PCR, garantindo alta eficiência diagnóstica. Durante a pandemia de Covid-19, foram amplamente disponibilizados ensaios para o diagnóstico MPOC baseados em LAMP e RT-PCR (ZENG; WU; HE, 2022).

O modelo MPOC com processamento em chip é inovador e tecnologicamente atualizado, baseando-se na tecnologia de semicondutores em sensores fotográficos semicondutor de óxido metálico complementar (CMOS, do inglês *complementary metal-oxide-semiconductor*) em um dispositivo de qPCR compacto “*plug and play*”. Apresenta vantagens expressivas, podendo ser processado com, ou sem, extração de ácidos nucleicos, agregando mais inovação. Trata-se de um dispositivo que processa chip de PCR de nove poços, ou mais, contendo *spots* de iniciadores/sondas, agregando precisão, redução do tempo, alto desempenho, otimização de processamento, multiplexação, *softwares* que garantam a qualidade dos dados e segurança da informação.

6.3.8 A plataforma MPOC pode evitar atrasos no diagnóstico correto para o paciente e para o médico, auxiliando diretamente na condução clínica e manejo dos pacientes (PCR digital)

Os principais conceitos da PCR digital (dPCR) foram descritos nos anos 1990, nos quais avaliou-se a possibilidade de quantificar um alvo de interesse realizando diluição limitante, seguida de repetidas reações de PCR, ficando evidente que a frequência de amplificações detectáveis seguiu a distribuição de Poisson. Dessa forma, o número de moléculas-alvo na amostra original poderia ser calculado a partir do fator de diluição e da frequência de amplificações negativas ou positivas (SIMMONDS et al., 1990; SYKES et al., 1992). Como o efeito da distribuição nas partições é estocástico, o padrão de particionamento dos alvos será diferente, refletindo em valores variantes de partições positivas e negativas (PINHEIRO; EMSLIE, 2018; TZONEV, 2018). A razão entre poços mutantes e poços selvagens demonstrou o quanto a dPCR é precisa para a diferenciação de duas populações (SYKES et al., 1992).

Ao longo das últimas décadas, alguns equipamentos foram desenvolvidos e, basicamente, a diferença entre esses sistemas ocorre na forma de particionamento e/ou detecção dos alvos pelo sistema (SREEJITH et al., 2018):

- Base sólida: QIAcuity® Digital PCR System (QIAGEN®), *microfluidic-chamber-based* (BioMark®),

dPCR system (Fluidigm®), *micro-well chip-based* QuantStudio 12k flex dPCR e 3D dPCR systems (Life Technologies®/ ThermoFisher Scientific®) e LOAA® (Optolane technologies);

- Gotas: *droplet-based* ddPCR QX100/QX200/QX600 (Bio-Rad®) e o *RainDrop system* (RainDance®).

Os sistemas permitem a quantificação a partir da detecção das moléculas que ocupam a mesma partição, sendo que cada partição é uma pequena subamostra. A quantificação torna-se possível ao assumir que os alvos são distribuídos entre as partições independentemente e com igual probabilidade, sendo aplicada a distribuição de Poisson (TZONEV, 2018).

Diferentemente da qRT-PCR, a dPCR não necessita de uma curva-padrão para quantificar amostras absolutamente. Além de eliminar a necessidade do uso de padrões de referência, tem a capacidade de gerar resultados com precisão, sensibilidade e especificidade (RASO; BIASSONI, 2020).

6.3.9 Sequenciamento e NGS

Em biologia molecular, sequenciamento é o processo que determina a ordem sequencial de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, resultando em uma representação linear simbólica conhecida como sequência. Esse método é utilizado para sequenciamento de genomas, expressão gênica, epigenética, diagnóstico de doenças genéticas e doenças infecciosas, identificação de microrganismos, estudos filogenéticos e evolutivos, clonagem gênica e reprodução, entre diversas outras aplicações.

O surgimento do sequenciamento ocorreu a partir das descobertas da estrutura do DNA (WATSON; CRICK, 1953) e do dogma central da biologia molecular (CRICK, 1970), nas quais se demonstra que uma sequência de um ácido nucleico pode codificar uma proteína, entretanto o contrário não é possível. A tecnologia de sequenciamento de primeira geração, também conhecida como sequenciamento clássico, foi pioneira, sendo o sequenciamento de Sanger conhecido como o método de terminação de cadeia ou método didesoxi. Foi utilizado no desenvolvimento de projetos como Projeto Genoma Humano, e teve como objetivo sequenciar o DNA humano pela primeira vez.

A partir de 2005, surgiu a segunda geração do sequenciamento, os NGS (*next generation sequencing*), caracterizada por gerar milhões de leituras em paralelo. Existem três tipos principais de sequenciamento de DNA feito por NGS: (i) sequenciamento de genoma completo; (ii) exoma completo; e (iii) painéis com alvos específicos. Esses tipos de sequenciamento permitem

uma ampla aplicabilidade em pesquisa ou diagnóstico (HEATHER; CHAIN, 2016).

Diversas técnicas de sequenciamento automático estão estabelecidas e auxiliam no diagnóstico e no monitoramento de doenças. Os principais métodos NGS de sequenciamento são: pirosequenciamento (Roche/454), Illumina/Solexa, ABI/SOLiD, Ion Torrent, PacBio e MinION (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). No entanto, mesmo com importantes avanços, o sequenciamento apresenta algumas limitações para o diagnóstico, como necessidade de a amostra ter boa qualidade e quantidade não limitante de ácido nucleico, análise dos dados por bioinformática e custo elevado (DANIELSON et al., 2017).

6.4 TENDÊNCIAS TECNOLÓGICAS

A área de diagnóstico é um campo de desenvolvimentos rápido e de evolução contínua, que incorpora avanços tecnológicos de maneira dinâmica. Dessa forma, novas gerações de testes sorológicos e moleculares surgem a intervalos mais ou menos regulares, promovendo melhorias aos ensaios, ocupando espaços específicos ou criando oportunidades de triagem, diagnóstico ou vigilância de doenças que não eram possíveis com os métodos tradicionalmente utilizados.

Avanços tecnológicos e tendências de pesquisa nas áreas da biologia molecular, microbiologia, bacteriologia, protozoologia e imunologia podem ser identificados e monitorados por meio da prospecção tecnológica. Esse processo inclui diversas etapas (ver Figura 6.9), como a formulação do problema, a coleta de dados (a partir da consulta a especialistas e/ou a bases de dados especializados em publicações científicas, patentes, *press releases*, entre outras fontes de informação), a preparação de dados e a visualização, reporte e comunicação dos

resultados (MARQUES; FONSECA, 2014; MEDEIROS et al., 2022).

A prospecção tecnológica reúne informações qualificadas para garantir um importante apoio à PD&I e um acesso antecipado a novas abordagens e possibilidades tecnológicas. Além disso, pode auxiliar na identificação e no estabelecimento de parcerias e alianças estratégicas formais com outros institutos de pesquisa e/ou empresas transnacionais que possam alavancar iniciativas internas. Não estando restrita apenas a suportar os processos decisórios referentes a produtos existentes e à gestão de portfólio, tais ações, quando integradas ao processo de gestão tecnológica institucional, tendem a contribuir na consolidação de infraestrutura científica e tecnológica capaz de responder rapidamente às demandas emergenciais de novos produtos para a área de saúde.

Exemplos de tendências tecnológicas no setor diagnóstico que podem ser mapeadas por meio de atividades de monitoramento e prospecção incluem os imunoenaios usando microesferas sensibilizadas com antígenos recombinantes para fornecimento de resultados precisos em testes simultâneos (multiplex). Aplicações desses ensaios múltiplos remetem ao diagnóstico simultâneo diferencial, a exemplo de arboviroses como dengue, zika e chikungunya (frequentes e com sintomas semelhantes), bem como a um conjunto de doenças de impacto neonatal (cuja detecção durante o acompanhamento pré-natal e logo após o parto pode evitar sequelas graves e mortes). De fato, é possível prever que os exames diagnósticos para uma doença isoladamente serão cada vez menos frequentes.

A disponibilidade de testes contemplando diversos alvos é de grande ajuda para o SUS, reduzindo o tempo até o diagnóstico e o custo atrelado a esse processo de inovação e melhoramento no diagnóstico. Uma plataforma para diagnóstico diferencial, rápida e eficaz, de

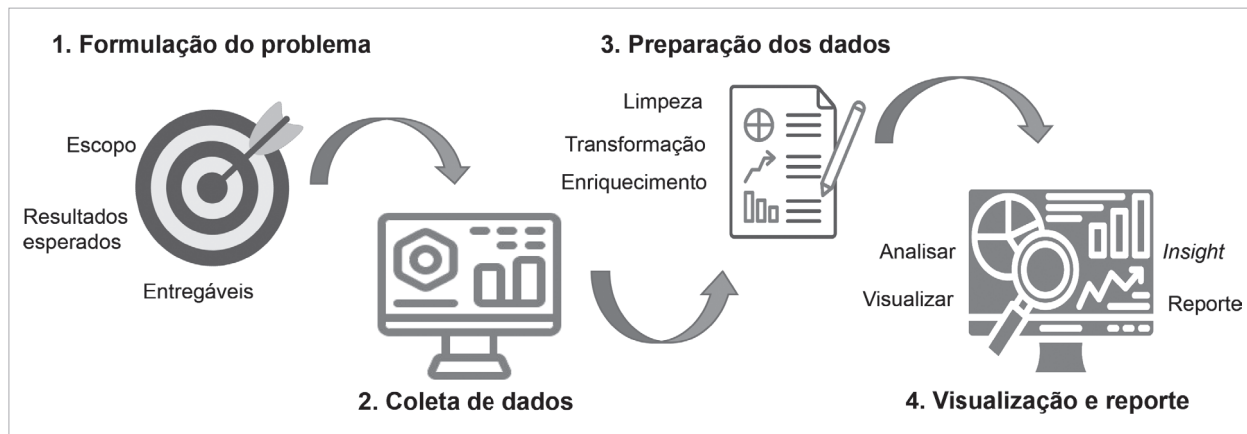


FIGURA 6.9 Etapas do processo de prospecção.

Fonte: adaptada de Medeiros et al. (2022); canva.com.

agravos de interesse em saúde pública pode ser amplamente utilizada em unidades de saúde por todo o país, ou, ainda, de maneira centralizada, em laboratórios de referência e centrais de testagem.

Outra linha de produtos para uso diagnóstico que vem sendo bastante explorada são os testes *point-of-care* (POC) ou testes laboratoriais remotos (TLR), aqueles realizados no local de atendimento ou cuidado do paciente (ANVISA, 2005). Para além dos testes rápidos, abordados na seção 6.3.2 deste capítulo, os ensaios POC são uma alternativa aos exames laboratoriais por sua ampla aplicabilidade nos casos em que o volume de amostra é um fator limitante, quando a experiência do paciente é importante para garantir o ciclo completo (diagnóstico e tratamento), em casos de urgência do resultado para guiar a tomada de decisão médica e em áreas remotas (Figura 6.10). Por outro lado, muito interesse vem surgindo em relação aos testes rápidos de hepatite B e C que permitam testar e imediatamente tratar os pacientes identificados. Dessa forma, é possível eliminar o tempo até o retorno do resultado do teste, que habitualmente acaba levando à perda de seguimento e ao comprometimento do alcance às metas da OMS, para 2030, em relação às cascatas de cuidados dessas condições clínicas.

Os testes POC têm sido amplamente utilizados em distintas áreas. Por exemplo, em laboratórios periféricos, emergências hospitalares, clínicas de imagem, clínicas e consultórios médicos, bancos de sangue, farmácias, assim como para monitoramento doméstico pós-cirúrgico, acompanhamento de atletas de alta *performance*, no pré-parto e em neonatos.

O uso dos diversos POC (Figura 6.10) disponíveis tem alterado o curso dos desfechos clínicos e otimizado os resultados em saúde, e por isso se consolidam como uma

tendência do mercado diagnóstico, em que se observa um número cada vez maior de fornecedores para esse tipo de ensaio e a diversidade de dispositivos para leitura, interpretação, exibição e transmissão dos resultados. A facilidade de transporte, robustez, operação simples e rapidez na obtenção dos resultados são características que vêm permitindo a adaptação dos aparelhos a diferentes estabelecimentos de assistência à saúde, incluindo farmácias comunitárias (ANVISA, 2019).

Ainda neste contexto, outra tendência importante no campo que visa melhorar o serviço de entrega rápida e eficaz de diagnóstico aos pacientes, para além da ampliação do uso dos chamados testes rápidos, é a oferta de ensaios de uso individualizado e não profissional, ou autotestes. A exemplo do autoteste rápido qualitativo para detecção de anticorpos contra HIV 1/2, esse tipo de produto, sem fins diagnósticos, é fornecido quando é importante conhecer o *status* após uma exposição voluntária ou mediante suspeita de exposição involuntária a um agente infeccioso (ANVISA, 2021a).

Nesses casos, é importante esclarecer ao usuário que o resultado negativo não elimina a possibilidade de infecção, além de orientar a manter práticas (profissionais, sociais ou sexuais) seguras e, muitas vezes, recomendar que novo teste seja realizado em um intervalo que pode variar de 30 até 120 dias. De maneira complementar, deve ser informado que os resultados positivos precisam ser confirmados, direcionando o potencial paciente à unidade de saúde para confirmação do resultado.

A disponibilidade de testes e equipamentos POC em farmácias é uma ação derivada das políticas públicas de ampliação do acesso e melhoria na assistência em saúde (ANVISA, 2019). A acessibilidade, a localização conveniente e a disponibilidade de um profissional, que pode auxiliar a realização do teste e orientar quanto

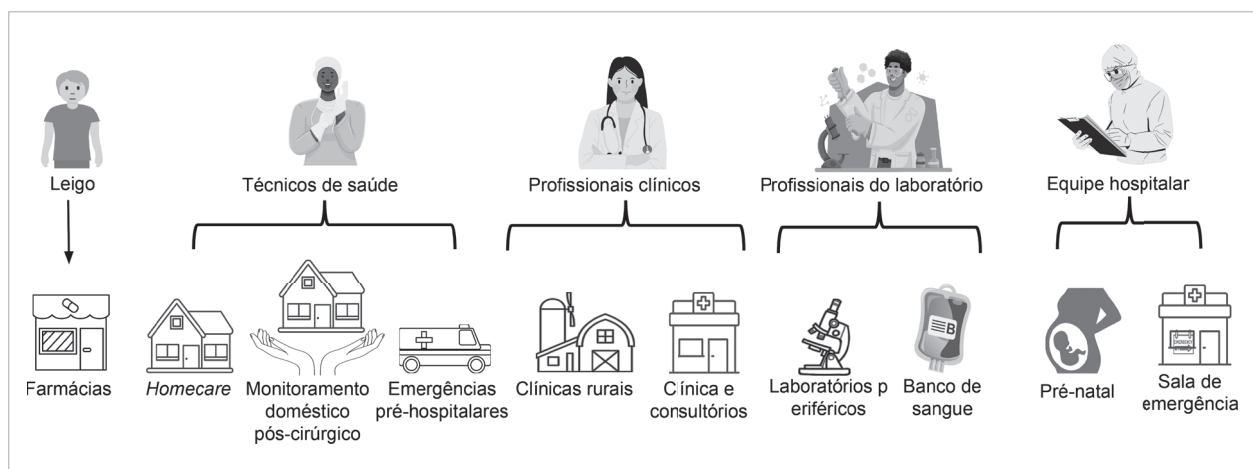


FIGURA 6.10 Aplicabilidade do conceito de testes POC (*point-of-care*).

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

ao resultado obtido (farmacêutico), favorecem o uso desses estabelecimentos comerciais como unidades capilarizadas do sistema de saúde, com o objetivo de reduzir os altos índices de diagnósticos inadequados, subnotificações e, em última instância, o aumento da transmissão de algumas doenças, internações hospitalares e complicações clínicas evitáveis. Desde o início da pandemia de Covid-19, principalmente nos períodos de maior restrição à circulação de pessoas, a disponibilização de testes POC para diagnóstico de infecção pelo HIV para os usuários de PREP foi também muito importante para o acompanhamento remoto deles.

A implementação de sistemas integrados para diagnóstico remoto (Figura 6.11) também se caracteriza como uma tendência importante nessa área, e tem o potencial de dar mais velocidade ao tratamento e mapeamento epidemiológico para os serviços de vigilância em saúde situados nas unidades básicas e democratizar ainda mais o acesso à saúde no país. Além disso, tais sistemas buscam otimizar a vigilância epidemiológica, entender a dinâmica de imunidade populacional, conhecer

fatores de risco relacionados às infecções e, com essas informações, subsidiar a tomada de decisão em saúde pública. Esses objetivos se tornam possíveis à medida em que os dados epidemiológicos são acompanhados em tempo real, a partir de conhecimentos de *big data* e análises de inteligência artificial que, depois de armazenados na nuvem, passam a ser duplamente verificados por profissionais habilitados que geram e confirmam os resultados dos exames laboratoriais, permitindo que, em até 30 minutos, estes cheguem por mensagem de texto via celular ou correio eletrônico até o paciente e, se autorizado por ele, também ao médico solicitante (NICOLLETE et al., 2023).

Os testes são utilizados nas unidades de saúde, os resultados são enviados para centrais analíticas e os laudos, emitidos por profissionais e liberados em até 30 minutos.

Antagonicamente, outra tendência é a implantação de centrais de testagem, ou centrais de processamento de testes (Figura 6.12). Essas instalações são braços de apoio ao diagnóstico em situações convencionais, servindo

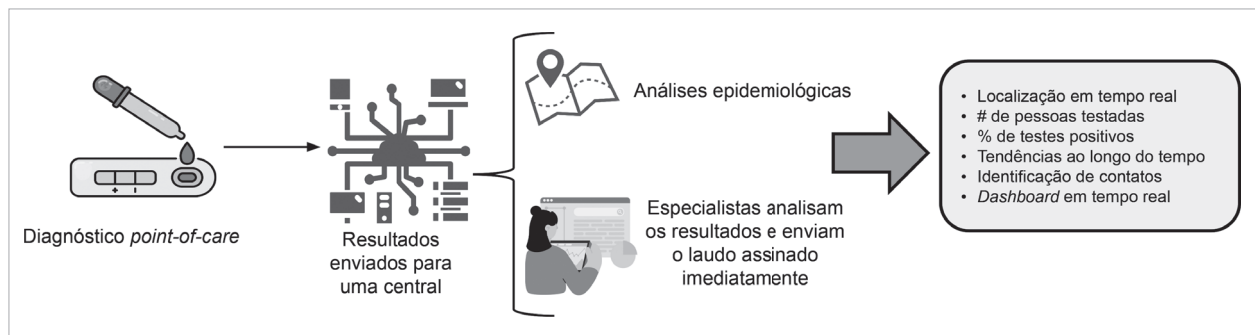


FIGURA 6.11 Esquema de representação de um sistema integrado de diagnóstico remoto.

Fonte: elaborada pelos autores (2023); canva.com.



FIGURA 6.12 Esquema ilustrativo da operação de centrais analíticas.

Fonte: elaborada pelos autores (2023) utilizando elementos do canva.com e imagem de Rodrigo Meixas (2020).

tanto para otimizar os recursos destinados à aquisição de testes para diagnóstico de doenças menos frequentes, centralizando amostras suspeitas em um único ou em poucos locais, quanto para padronizar controles e fluxogramas de diagnóstico de tais enfermidades.

As centrais ainda têm papel fundamental em situações não convencionais, como epidemias e pandemias, em que o número de casos e, conseqüentemente, de amostras a serem testadas ultrapassa as capacidades dos laboratórios instalados no país. Cabe ressaltar a importância dos processos de logística necessários para apoiar tanto a coleta e o envio de amostras para as centrais de testagem quanto o encaminhamento dos resultados obtidos, fazendo-os chegar ao solicitante o mais rapidamente possível.

A partir da coleta, realizada em diferentes locais, as amostras são encaminhadas a laboratórios com capacidade de processamento automatizado para execução dos testes e geração de resultados, garantindo padronização, rastreabilidade e confiabilidade ao longo de todo o processo.

Por fim, também merece destaque o conceito de teranóstico, que aproxima a terapia do diagnóstico, atualmente aplicado em medicina nuclear, utilizando uma molécula radioativa que atua tanto no diagnóstico quanto no tratamento de doenças, usualmente câncer. Por meio da crescente disponibilidade de testes cada vez mais sensíveis baseados em biologia molecular, o teranóstico vem se apresentando como uma possibilidade na área de doenças infecciosas para propiciar a obtenção de resultados rápidos e mais informativos que possibilitam melhor intervenção terapêutica nos pacientes e melhor uso de antimicrobianos, por exemplo (PICARD; BERGERON, 2002).

6.5 DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO

O desenvolvimento de um reagente para diagnóstico é um processo dinâmico, mais barato e rápido do que o de uma vacina ou medicamento. O fato de não serem requeridos testes pré-clínicos e, sobretudo clínicos, reduz consideravelmente os investimentos necessários e encurta o tempo entre as fases de descoberta e de início do processo de produção. Respeitando as especificidades de cada instituição na qual o desenvolvimento de novos produtos IVD (diagnóstico *in vitro*) ocorre, um modelo genérico contendo as sete etapas do ciclo de vida de um reativo para diagnóstico inclui as etapas de: pesquisa, desenvolvimento experimental, escalonamento, validação, registro, produção industrial e pós-marketing.

A etapa inicial de pesquisa inclui, além da descoberta científica, as atividades de pré-desenvolvimento até a obtenção de uma prova de conceito, com a caracterização do antígeno, dos anticorpos, a seleção e a definição de métodos diagnósticos, por exemplo. Essa fase pode se estender por até cinco anos, dependendo da complexidade da tecnologia envolvida ou do patógeno-alvo.

A etapa seguinte é do desenvolvimento experimental propriamente dito. O desenvolvimento pode levar entre dois e três anos, e deve ser realizado em laboratórios específicos, dotados de instalações validadas, equipamentos calibrados e mediante o uso de insumos certificados, nos quais os requisitos de Boas Práticas de Laboratórios (BPL) devem ser adotados. Nessa fase, os parâmetros direcionadores são mais rigorosos do que os utilizados na pesquisa, sendo necessário treinamento técnico e experiência dos profissionais envolvidos, além de comprometimento com os processos de registro e documentação dos procedimentos, desenho de experimentos e análise de resultados, bem como familiaridade com processos produtivos e requisitos dos usuários dos produtos. Dentre as atividades específicas dessa fase sobressaem-se a padronização dos insumos, as condições de realização dos ensaios, a definição de protótipos, a árvore de materiais, entre outras. Em seguida, os processos de escalonamento são iniciados, visando a definição de processos que promovam consistência da produção do insumo ou kit, incluindo determinação da estabilidade, viabilidade econômica e tecnológica de produção.

A quarta fase, que precede o registro do produto, é sua validação, em que são avaliadas e validadas, de forma ampliada, suas principais características básicas, ou seja, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade, limites de detecção, entre outros parâmetros. Nessa fase também é avaliada a adaptação do produto a um representante da rede de usuários-alvo, com o objetivo de garantir suas condições de implantação.

Todos os resultados e documentos acumulados durante as fases anteriores são consolidados em um dossiê técnico, que é a base para a petição de registro do produto junto à autoridade regulatória, neste caso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As diretrizes, gerais e específicas, para registro de reativos para diagnóstico *in vitro* estão descritas em Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa (ANVISA, 2015, 2022a).

Após a obtenção do registro, os processos industriais ocorrem e são seguidos pela distribuição do produto, que pode incluir ou não a necessidade de treinamento dos usuários. Por fim, as atividades de tecnovigilância (detalhes na seção 6.5.3) são conduzidas, acompanhando a utilização do produto no mercado, registrando e

investigando ocorrências e retroalimentando o processo com oportunidades de melhorias identificadas nessa interação com os clientes, usuários e público em geral, a depender da natureza do produto.

Com o início de implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF), regulamentado pela Portaria 686, de 27 de agosto de 1998, da Anvisa, todos os estabelecimentos que fabricam produtos para diagnóstico de uso *in vitro* passaram por reformulações em seus processos produtivos e de controle de qualidade visando obter ou manter tal certificação. Desde então, auditorias internas e externas passaram a ser frequentes e a busca pela melhoria contínua tornou-se um dos princípios da qualidade, ressaltando o foco nos requisitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF) tanto para o produto acabado quanto para as matérias-primas necessárias à fabricação dos produtos. Também fazem parte dessas exigências a existência de instalações adequadas e validadas, evitando cruzamento de fluxos de pessoal e materiais, equipamentos calibrados e dedicados por linha de produção, insumos certificados, documentação do processo produtivo lote a lote (dossiês de produção), uso de procedimentos operacionais padronizados (POP) em todas as atividades relacionadas à produção, pessoal qualificado e permanentemente submetido a treinamentos, entre outras (ALMEIDA, 2014; ANVISA, 1998; FERREIRA, 2005; FONSECA et al., 2011).

Outro requisito importante de BPF refere-se aos testes e procedimentos para assegurar o controle e a garantia da qualidade dos lotes produzidos. Esses testes e procedimentos devem ser realizados por profissionais devidamente treinados e em instalações independentes daquelas encontradas na área de produção e pela referida autoridade regulatória que, por sua vez, analisa os protocolos de controle de qualidade e de produção, além de realizar análises no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Atividades de suporte são igualmente importantes dentro do processo de desenvolvimento de um insumo ou *kit* para diagnóstico. Iniciativas referentes à captação e caracterização de amostras para constituição de painéis internos, por exemplo, são imprescindíveis para a padronização e validação dos produtos em desenvolvimento. É por meio de amostras de referência obtidas localmente, ou por meio de parcerias com instituições de atendimento clínico, ambulatorial ou hospitalar, e não somente dos caros e nem sempre disponíveis painéis, controles e amostras de referência internacionais, que se dão os experimentos. Esses experimentos visam determinar a sensibilidade e especificidade de um kit, bem como de outros parâmetros que definem sua qualidade.

Do mesmo modo, atividades de capacitação e treinamento de clientes ou usuários fazem parte do plano

de implantação de produtos, especialmente quando estão envolvidas questões relacionadas à automação, seja do processamento de amostras, seja do processo de geração, interpretação e emissão de resultados. Mesmo o fornecimento dos testes rápidos muitas vezes exige treinamento dos operadores, visando dirimir dúvidas e evitar problemas técnicos de coleta de amostra, manipulação dos insumos ou interpretação de resultados que possam afetar sua aplicação e eficiência.

Também cabe à equipe de desenvolvimento de produtos a consultoria nas etapas de incorporação e ampliação da capacidade de produção industrial dos insumos e *kits*. A transferência do conhecimento gerado durante as várias etapas de desenvolvimento experimental e validação dos produtos é essencial na definição dos protocolos de produção e de controle de qualidade que serão implementados. Isto porque os processos devem considerar o entendimento do papel de cada componente dos kits, as limitações referentes à estabilidade das matérias-primas utilizadas e os requisitos das reações que ocorrem até a obtenção de um produto final, que deve possuir as mesmas características daquele que foi padronizado e validado. Dessa forma, fica estabelecido um processo de produção robusto e reprodutível, gerando mínima e aceitável variação entre lotes, ou seja, garantindo consistência de produção, que é um dos requisitos básicos das BPF.

Por fim, cabe menção às exceções à tramitação padrão de registro sanitário, previstas em legislação para o caso de protocolos *in house** para uso em pesquisa, apoio ao diagnóstico e vigilância epidemiológica. Não há exigência de produção dos insumos utilizados em ambiente BPF, mas esses protocolos, desenvolvidos por pesquisadores ou grupos de pesquisa, devem ser detalhados e sistematicamente documentados, validados e submetidos para aprovação da Anvisa, sendo essas excepcionalidades que estão sob a tutela do arcabouço regulatório (ANVISA, 2005). O uso dessas metodologias, desde que cumpridos os requisitos normativos, e sem que haja comercialização, tem auxiliado significativamente as ações de saúde para enfrentamento inicial de doenças emergentes e reemergentes, como o nupérrimo surto de *monkeypox* (Mpox) (ANVISA, 2022b).

* Trata-se de metodologia própria, desenvolvida em laboratório clínico ou de pesquisa, com reagentes ou sistemas analíticos produzidos pelo próprio laboratório, para uso exclusivo no local (ANVISA, 2005).

6.5.1 Desenvolvimento e produção de reativos em Bio-Manguinhos/Fiocruz

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/Fiocruz vem fazendo, ao longo dos anos, intenso investimento em projetos de P&D, bem como na aquisição e incorporação de novas tecnologias para a produção, em escala industrial, de produtos capazes de suprir as demandas dos programas nacionais de saúde pública do Ministério da Saúde. Em 1982, apenas seis anos após a sua criação, Bio-Manguinhos/Fiocruz iniciou as atividades produtivas de reagentes para diagnóstico laboratorial, aproveitando a experiência dos laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Desde então, a participação de Bio-Manguinhos/Fiocruz na área de reativos para diagnóstico ocorre de maneira complementar, atuando em áreas em que empresas privadas não possuem interesse, ou seja, no diagnóstico de doenças órfãs/negligenciadas, ou em apoio aos programas prioritários de saúde pública, em total alinhamento com a missão institucional (FONSECA et al., 2011).

Diante do grande potencial comercial existente no mercado público e do fato de Bio-Manguinhos/Fiocruz ser o único produtor público em condições de estabelecer processos de produção de reativos para diagnóstico em maior escala, além de possuir plataformas tecnológicas consolidadas, *expertise* técnica e parcerias estabelecidas com outras instituições nacionais e internacionais, o Instituto pode oferecer ferramentas de uso diagnóstico com preços competitivos e qualidade assegurada ao Sistema Único de Saúde (SUS) (MEDEIROS, 2004).

Apesar do menor porte em relação ao segmento de vacinas, e da necessidade de manter em linha produtos de menor valor comercial para atender demandas estratégicas de saúde pública, é fundamental a adoção de estratégias e práticas de gestão que assegurem autosustentabilidade econômica e tecnológica para a área de reativos para diagnóstico. Estas, muitas vezes, estão ancoradas em processos de transferência de tecnologia de produtos estratégicos, de elevada demanda e maior valor agregado, além de focar a absorção de tecnologias de ponta passíveis de serem aplicadas à obtenção de novos produtos e oferta de serviços a eles atrelados, fomentando um ciclo virtuoso de desenvolvimento para o segmento (BARBOSA, 2009; FERREIRA, 2005).

Importante ator na cadeia de inovação do país, Bio-Manguinhos/Fiocruz constrói sua base tecnológica por meio do estabelecimento de parcerias com instituições públicas e privadas, nacionais e internacionais, incluindo grandes *players* mundiais do segmento diagnóstico. Tais parcerias permitem a introdução de novos produtos no portfólio do Instituto que visam responder com agilidade às demandas da saúde pública e ampliar o acesso da

população a produtos de qualidade, além de fomentar a cadeia de inovação. Tal estratégia tecnológica vem sendo realizada por meio de três principais modelos de negócios, que são:

- **Transferência de tecnologia (TT):** o parceiro transfere completamente a tecnologia necessária para a produção de um determinado produto, incluindo seu fornecimento durante as fases no período de transferência. Dessa forma, ao entrar na carteira de projetos de TT, o produto também entra no portfólio de Bio-Manguinhos/Fiocruz e pode ser fornecido ao Ministério da Saúde. Cabe destacar que, ao fim da TT, Bio-Manguinhos/Fiocruz será autônomo na produção do objeto da transferência para fornecer o produto totalmente nacionalizado ao Ministério da Saúde. Geralmente, a transferência de tecnologia é iniciada pelas etapas produtivas menos complexas e avança para as etapas mais complexas à medida que os investimentos necessários para a incorporação da tecnologia vão sendo realizados.
- **Desenvolvimento tecnológico (DT):** Bio-Manguinhos/Fiocruz, exclusivamente por meio de sua capacidade de inovação ou por meio do estabelecimento de parcerias, desenvolve a tecnologia e, consequentemente, o produto. Dessa forma, ao entrar na carteira de projetos de DT, o produto será desenvolvido e entrará no portfólio de Bio-Manguinhos/Fiocruz quando o registro na Anvisa for obtido, ao fim do desenvolvimento. Quando há parceria, também ocorre um intercâmbio efetivo de conhecimentos e estruturas e a propriedade intelectual gerada é partilhada entre as instituições, conforme a atuação de cada uma no desenvolvimento do produto.
- **Desenvolvimento tecnológico conjunto (CoDT):** as iniciativas de DT com base em parcerias para desenvolvimento conjunto (CoDT) também têm sido extremamente relevantes para dar impulso à área de reativos para diagnóstico e ampliar o portfólio dessa linha de produtos de Bio-Manguinhos/Fiocruz fornecidos ao MS. Além de permitir acesso a insumos estratégicos, novas tecnologias e proximidade com a fronteira do conhecimento científico e tecnológico, essas parcerias promovem capacitação dos profissionais do Instituto e estimulam a avaliação crítica de processos internos, visando melhoria contínua e geração de valor.

Recentemente, o Instituto adotou as Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP, Figura 6.13), originadas de política pública implementada pelo Ministério da Saúde em 2014, que estimula a capacitação dos laboratórios públicos para o desenvolvimento e transferência

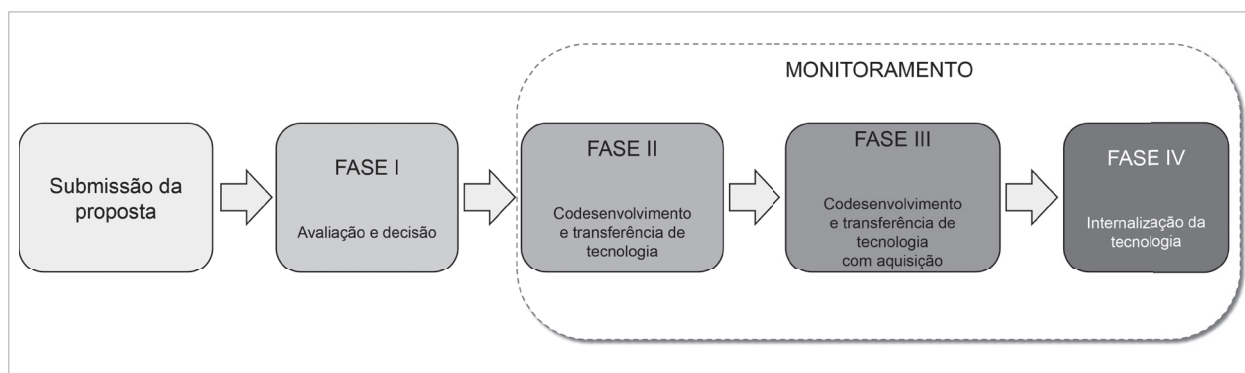


FIGURA 6.13 Etapas de uma parceria para desenvolvimento produtivo.

Fonte: adaptada de Anvisa (2022b).

tecnológica de produtos estratégicos no atendimento às demandas do SUS. Como principais objetivos dessa política encontram-se o de ampliar o acesso da população a produtos estratégicos e diminuir a vulnerabilidade do SUS, bem como reduzir as dependências produtiva e tecnológica do país no atendimento às necessidades de saúde da população brasileira (ANVISA, 2022b).

A atuação no desenvolvimento tecnológico é estratégica para a consolidação das plataformas tecnológicas estabelecidas. Além disso, é estratégica para a ampliação de atuação ou modernização por meio de novas plataformas, para absorção de conhecimentos, por meio da capacitação e qualificação dos colaboradores da unidade em processos de referência para a saúde pública, assim como para posicionamento do Instituto frente a acordos de transferência de tecnologia e alianças estratégicas.

O investimento contínuo e consistente na cadeia de inovação e na modernização das áreas físicas, aquisição e manutenção de equipamentos, assim como o domínio de tecnologias de ponta e parcerias com outras instituições – públicas e privadas – contribuem para o reconhecido nível de excelência do desenvolvimento tecnológico realizado em Bio-Manguinhos/Fiocruz. A manutenção das plataformas de expressão, conjugação, produção e processamento final, tanto quanto nas plataformas analíticas, é base para fortalecimento e desenvolvimento de competências e de infraestrutura para apoiar os esforços em PD&I.

Nos diferentes laboratórios do Instituto estão instaladas e operantes as plataformas para expressão de antígenos recombinantes, purificação e caracterização físico-química de proteínas, cultivo de células eucariotas e procariotas, desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais, sequenciamento nucleotídico, produção e caracterização viral, fermentação bacteriana em diferentes escalas, conjugações de moléculas ativas, imunoenaios e testes moleculares, métodos para detecção de resposta imune e processos de apoio. Adicional-

mente, há suporte de núcleos, como de Biossegurança, Lavagem e Esterilização. Essas plataformas também estão disponíveis para prestação de serviços externos, contribuindo para os avanços na área de biotecnologia do país (MEDEIROS, 2004) (Figura 6.14).

Bio-Manguinhos/Fiocruz fornece uma completa linha de kits de reativos para diagnóstico e painéis sorológicos para suprir as demandas dos programas de controle de endemias e agravos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), por meio do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), e da Hemorrede Brasileira por meio da Secretaria de Atenção à Saúde (SAS). Recentemente, a participação em redes e grupos de pesquisa permitiu ampliar a atuação do Instituto para alcançar também os laboratórios dos hospitais universitários e outras instituições de ciência e tecnologia coordenadas pelo Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), que passaram a ser clientes dos reativos para diagnóstico produzidos no contexto da Covid-19, e que potencializam a gama de fornecimento de produtos de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Esse fornecimento é realizado por meio de convênios que permitem a distribuição dos kits aos laboratórios públicos, bem como por atendimento a pedidos de doações feitos por instituições públicas. Em 2021, mais de 26,5 milhões de reações foram entregues por Bio-Manguinhos/Fiocruz (FIOCRUZ, 2022).

6.5.2 Implementação de testes para diagnóstico

A adoção ou incorporação de uma nova tecnologia e de um novo produto de fim diagnóstico requer avaliações criteriosas. Essas avaliações são realizadas em diversas instâncias além do produtor, incluindo a Anvisa, que é responsável pelo parecer regulatório, concessão de registro e controle sobre comercialização, e da Secre-

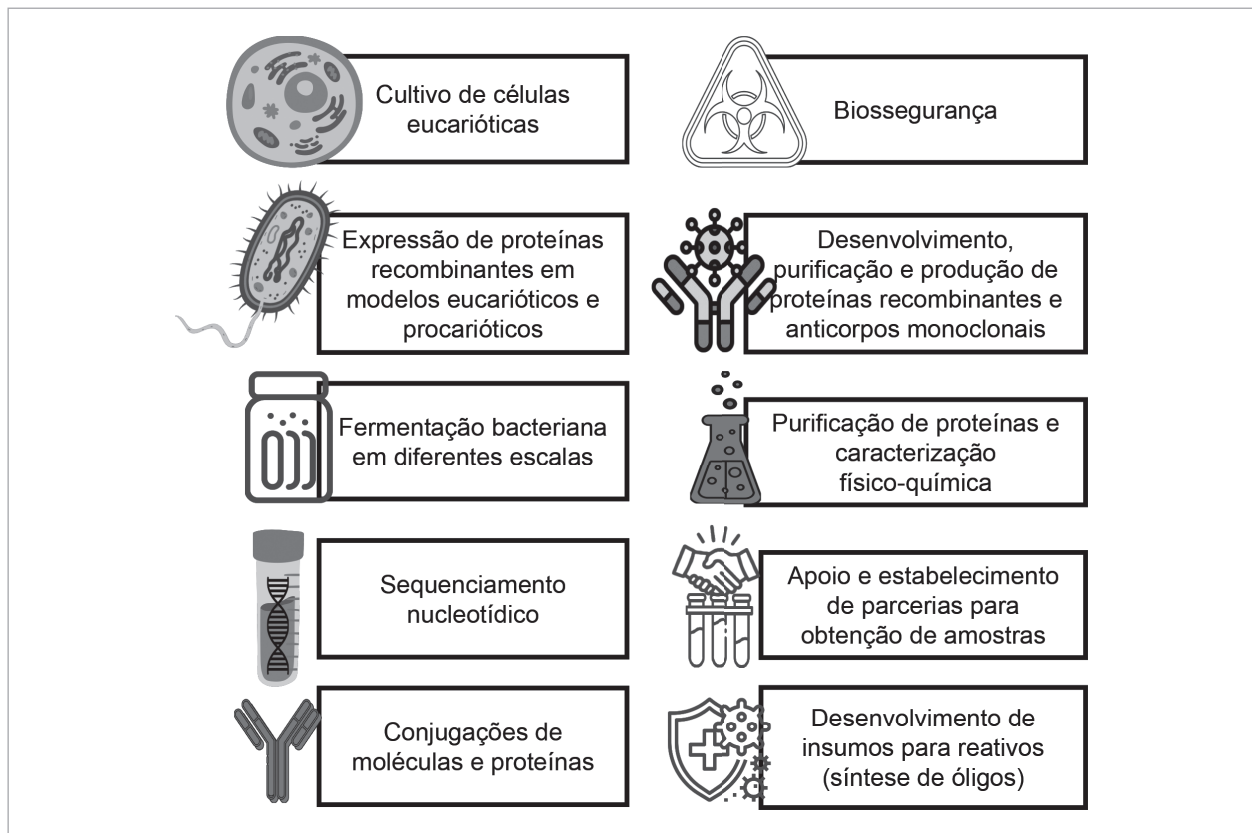


FIGURA 6.14 Plataformas tecnológicas e processos que apoiam o desenvolvimento de Reativos para Diagnóstico em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

taria de Insumos Estratégicos (SCTIE/MS), que avalia a aplicabilidade e custo-efetividade no âmbito do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O campo da Avaliação de Tecnologias em Saúde (ATS), que são “todas as formas de conhecimento que podem ser aplicadas para a solução ou a redução dos problemas de saúde de indivíduos ou populações” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), se propõe a contrabalançar o peso da demanda social por inovação (seja oriunda de profissionais de saúde, sociedade civil, ou grandes empresas) às políticas vigentes e aos pilares estabelecidos na Constituição para o SUS. Esses pilares são a descentralização com direção única no processo de tomada de decisão em cada esfera do governo, o atendimento integral e a participação da comunidade.

A partir de 2004, quando formalizada a proposta de ATS no âmbito do MS, a atividade tomou impulso e passou a ser efetiva e integrada às instâncias regulatórias (NOVAES; SOÁREZ, 2020). Na classificação das tecnologias em saúde, os métodos diagnósticos ocupam posições tanto quanto à natureza material (categoria equipamentos e suprimentos) quanto ao propósito (triagem ou diagnóstico). A avaliação de métodos diagnósticos compreende uma série de aspectos, como: (i)

ser um teste relevante; (ii) descrito adequadamente; (iii) validado em estudo utilizando um padrão de referência confiável e interpretado de maneira independente do teste avaliado; (iv) ter número reduzido e aceitável de resultados indeterminados; e (v) informar aplicações e limitações do ensaio, sua eficiência, possíveis riscos nas etapas prévias e analíticas, bem como o balanço entre custos e impactos sociais, éticos e legais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). De acordo com essa avaliação, com o uso proposto pelo fabricante, as características da enfermidade e das políticas de prevenção e controle, os insumos e kits podem ser utilizados para fins de triagem, diagnóstico e/ou vigilância epidemiológica.

Em termos gerais, a triagem é a ação que visa detectar a doença em pessoas assintomáticas, enquanto o diagnóstico busca identificar a causa e a natureza ou extensão de uma doença em pessoas com sinais clínicos ou sintomas. Adicionalmente, a vigilância epidemiológica é “um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva. A finalidade é de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos” (BRASIL, 1990).

Essa tríade tem como principal objetivo fornecer orientação técnica para os profissionais de saúde, que decidirão sobre a execução de intervenções voltadas ao controle de doenças e agravos tanto em nível individual quanto em uma população definida, ou mesmo em uma determinada área geográfica.

6.5.3 Tecnovigilância

A tecnovigilância compreende o sistema de vigilância de eventos adversos e queixas técnicas de produtos para a saúde (equipamentos, materiais, artigos médico-hospitalares, implantes, produtos para diagnóstico de uso *in vitro*) disponibilizados no mercado, com vistas a recomendar a adoção de medidas que garantam a segurança sanitária do uso desses produtos na promoção e proteção da saúde da população (ANVISA, 2022c). Para o alcance de tal objetivo são realizados estudos, análises e investigações a partir de um conjunto de informações reunidas a respeito do desempenho do produto, obtidas a partir das notificações enviadas aos órgãos de vigilância sanitária.

Notificar um evento adverso ou queixa técnica associado ao uso de um produto para saúde significa comunicar um agravo à saúde do(s) paciente(s) ou usuário(s), efeito inesperado ou indesejável, ou falha, entre outros, que comprometam a segurança sanitária do produto e, ainda:

- Avaliar os perfis benefício-risco dos produtos para diagnóstico *in vitro* no pós-registro;
- Pesquisar, notificar e/ou acompanhar Eventos Adversos (EA) e/ou Queixas Técnicas (QT) no sistema NOTIVISA;
- Pesquisar, relatar e/ou acompanhar EA e/ou QT;
- Analisar os desvios conforme forem sendo evidenciados;
- Elaborar ações de campo;
- Colaborar com visitas técnicas;
- Colaborar com qualificações de fornecedores;
- Participar de reuniões científicas, regulatórias e técnicas;
- Realizar pesquisas bibliográficas;
- Designar colaborador(es) como gestor(es) de auto-treinamento da unidade organizacional (UO);
- Participar de solicitações de melhorias do produto, manual de instrução, descontinuidades de produto, recolhimento etc.;
- Participar efetivamente na pesquisa e desenvolvimento de futuros kits para diagnóstico de interesse para a saúde pública e Ministério da Saúde;
- Participar interinamente de reuniões pertinentes aos processos produtivos.

Qualquer profissional de saúde pode notificar uma suspeita de evento adverso ou queixa técnica acessando o formulário eletrônico de notificação disponibilizado pelo Centro de Vigilância Sanitária Estadual de São Paulo (CVS/SP). Essa via de notificação proporciona agilidade, maior segurança e, principalmente, confidencialidade dos dados informados (ANVISA, 2021b).

6.6 O PAPEL DOS REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO NO CEIS

O Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS) é um sistema produtivo e de inovação em saúde composto por setores industriais: (i) indústrias de base química e biotecnológica; e (ii) de base mecânica, eletrônica e de materiais e setores prestadores de serviço; (iii) hospitais; (iv) ambulatórios; e (v) serviços de diagnóstico e tratamento (GADELHA et al., 2017). As atividades que têm alto impacto nos processos de transformação, e articulam as diversas áreas do sistema de inovação e do CEIS, incluem a tecnologia diagnóstica, envolvendo plataformas tecnológicas para testes de diagnóstico de grande escala, com alta facilidade e precisão, incluindo a utilização intensiva de tecnologia da informação nos serviços e nos equipamentos para diagnóstico (CASSIOLATO et al., 2010).

Os impactos, atuais e futuros dos reativos para diagnóstico em cada uma dessas cinco dimensões é amplamente reconhecido (FERREIRA, 2005), principalmente naquelas associadas à vigilância em saúde. No CEIS, a utilização coletiva ocorre como elemento decisivo para a transformação do conhecimento em produtos apropriados, seja pela economia ou pelo uso social no âmbito dos sistemas nacionais de saúde, em um típico processo de convergência tecnológica que lhe confere uma característica sistêmica e constitui um bloco dinâmico interligado de investimento e de inovação decisivo para o padrão de desenvolvimento global, regional e nacional.

A dependência tecnológica, evidenciada pelo déficit na balança comercial nesses setores, se contrapõe à percepção da saúde como um direito a ser garantido pela efetividade do SUS, por meio da oferta de bens e serviços cada vez mais ampla, ao contrário do modelo de padrão tecnológico em que as tecnologias geradas desfavorecem a equidade e o acesso integral à saúde. Nesse cenário, os principais desafios para a saúde pública do futuro, que vislumbra o envelhecimento e maior peso das doenças crônicas, “*exigem disponibilidade de tratamentos permanentes, medicina personalizada, redes de atenção, envolvendo o nível local e domiciliar articulado com níveis produtivo-tecnológicos sub-regionais, regionais e nacionais, entre outros, aliados à dimensão política de garantia de direitos*” (CASSIOLATO et al., 2010).

Há, portanto, uma demanda por inovações visando reduzir o hiato entre o potencial de pesquisa e inovação, possibilitadas por capital privado e público associados e consistentes, e o fortalecimento da dimensão estratégica do Estado na promoção, indução e regulação desse sistema produtivo, incluindo capacitação econômica, produtiva e tecnológica em saúde.

O cenário apresentado reforça, ainda mais, a importância de combinar estratégias de inovação tecnológica que harmonizem iniciativas de TT, CoDT e DT para ampliar a atuação dos produtores, aumentando a diversidade e a velocidade de disponibilização de novos produtos no mercado e o acesso ao diagnóstico pela população. Diante desse contexto, o ecossistema de inovação da Fiocruz*, em que Bio-Manguinhos/Fiocruz é um dos protagonistas, é componente de grande valor para a consolidação do CEIS, o enfrentamento de seus desafios e o alcance dos seus objetivos. Por meio da oferta de produtos e serviços de fins diagnósticos, pavimentam-se o caminho para o padrão tecnológico perseguido, aquele em que o sistema produtivo é alvo de modernização e custo-efetividade, trilhando uma rota de independência e sustentabilidade (GADELHA et al., 2017).

6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresentou um resumo sobre o tema diagnóstico, sua importância como ferramenta de apoio à conduta clínica e às políticas de saúde pública, as principais tecnologias envolvidas no desenvolvimento de produtos nesse setor, bem como o ciclo de vida dos produtos, tendências e direcionamentos futuros em relação ao tema. Considerando as diferentes demandas advindas do perfil epidemiológico, imunológico e impacto social de cada doença, atreladas à aplicabilidade de cada teste em função de suas vantagens e limitações específicas, estabelece-se um panorama de possibilidades de esquemas ou algoritmos diagnósticos, visando complementar ou embasar a avaliação clínica, viabilizar o diagnóstico diferencial, quando necessário, apoiar ações de vigilância epidemiológica e orientar políticas de manejo, controle e prevenção das doenças.

A oferta de soluções integradas de diagnóstico, que possam ser utilizadas para executar diferentes imunoenaios, ou testes moleculares, conforme demandas do Ministério da Saúde, e com a possibilidade de inclusão de novos biomarcadores a uma lista inicialmente formulada

de infecções de interesse é alvo de diversos atores do ecossistema de inovação em reativos para diagnóstico. Uma vez estabelecido o sistema-teste, processos relativamente simples de validação de novos alvos podem ser adotados, otimizando as etapas de desenvolvimento, validação, registro e produção de novos insumos e kits para que possam ser prontamente adotados pelos serviços de saúde em todo o país.

No contexto do diagnóstico, o cenário ideal é aquele em que um teste sensível, específico e adequado aos aspectos epidemiológicos é disponibilizado em hora oportuna, permitindo uma efetiva intervenção positiva, além de retroalimentação dos sistemas de informação por meio de conectividade na transmissão e registro dos dados. Situações como a observada durante a pandemia de Covid-19, em que mais de 80 milhões de testes diagnósticos foram fornecidos para a população brasileira, mas apenas 2% dos dados obtidos com essa testagem retornaram ao sistema (FRANÇA et al., 2022), estão na contramão das propostas de melhoria dos sistemas de conectividade e de notificação compulsória, como o Conecte SUS, que poderia concentrar e disponibilizar dados preciosos para acompanhamento e aperfeiçoamento das políticas em execução.

De maneira complementar, investimentos em instrumentos de apoio (insumos, equipamentos e sistemas de informação), bem como o financiamento garantido para toda a atividade, incluindo demandas pontuais, são imprescindíveis para possibilitar a continuidade das ações e previsibilidade da disponibilidade dos produtos e serviços diagnósticos, a exemplo do que possibilitam os contratos plurianuais. Por fim, uma logística robusta, que viabilize a distribuição racional dos produtos, com gestão eficiente dos estoques, pode garantir que não haja desabastecimento nem desperdícios.

Outro aspecto relevante para o campo do diagnóstico trata da importância do monitoramento e da prospecção tecnológica no apoio aos processos de PD&I, conforme mencionado anteriormente (ver seção 6.4). Também por meio da formação contínua de recursos humanos altamente capacitados, atores do segmento diagnóstico podem consolidar uma gestão tecnológica que propicie a proximidade com a fronteira do conhecimento, estimule a formação de parcerias profícuas e o desenvolvimento de produtos importantes para a saúde humana e animal. Esse cenário inclui a participação ativa em redes de colaboração, no âmbito da inovação aberta, nas quais intercâmbios técnico-científicos sejam estimulados e frequentes.

O dinamismo do setor diagnóstico e a constante emergência de agentes infecciosos de impacto em saúde pública exigem velocidade e flexibilidade de processos internos para garantir atualização de competências e

* O ecossistema de inovação da Fiocruz é composto por suas unidades técnico-científicas, de assistência e ensino, assim como seus parceiros tecnológicos e comerciais, que atuam em estreita colaboração visando ampliar a oferta de produtos e serviços em saúde e o acesso às inovações adotadas pelo SUS.

portfólios em acordo com as demandas do mercado. Somente por meio de expertise acumulada e rapidamente disponibilizada, aliada à infraestrutura e base de conhecimento instaladas, foi possível acelerar as respostas exigidas pela recente epidemia de zika e pela pandemia de Covid-19.

Resumidamente, esses aspectos sinalizam a necessidade de adoção do conceito de Gestão do Sistema, ou seja, a organização e sistematização de demandas, recursos e aquisições de maneira centralizada, autônoma e inequívoca. Iniciativas de P&D embasadas em conhecimentos científico, tecnológico e mercadológico qualificados e atualizados, combinadas às ações de ATS alinhadas às tendências tecnológicas e demandas epidemiológicas e a um arcabouço regulatório robusto e eficiente, são elementos fundamentais para o sucesso de iniciativas no campo do diagnóstico. Estando consolidada a Gestão do Sistema, amplifica-se a potencialidade de práticas e políticas e, consequentemente, os efeitos positivos no desejado e necessário fortalecimento do CEIS.

Finalmente, cabe destacar que as informações apresentadas neste capítulo, longe de serem exaustivas, descrevem um retrato atual do segmento do diagnóstico de doenças infecciosas. É esperado que esse panorama sofra alterações continuamente, em se tratando de um setor altamente dinâmico, em que a velocidade das inovações geradas resulta em constante atualização da oferta de tecnologias, metodologias, produtos e serviços com aplicação ampla ou específica, além da própria configuração do mercado.

AGRADECIMENTOS

Este capítulo foi idealizado por Antônio Gomes Pinto Ferreira e elaborado com gentis contribuições da equipe do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), além de Diana Freire, Ramon Lemos e Raouf Sykora, colaboradores do Grupo de Trabalho de Prospecção, da Divisão de Novos Negócios (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e da Tecnovigilância /ASCLIN, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. C. DE. **Controle de Qualidade de Reativos para Diagnósticos de Bio-Manguinhos/ Fiocruz**. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/11125/27.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- ANGRIST, N. et al. Measuring human capital using global learning data. *Nature*, v. 592, n. 7854, p. 403–408, 15 abr. 2021.
- ANVISA. **Portaria n. 686, de 27 de Agosto de 1998**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1998/prt0686_27_08_1998.html. Acesso em: 28 out. 2022.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - Rdc nº 302, de 13 de Outubro de 2005**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5919009/RDC_302_2005_COMP.pdf/bf588e7a-b943-4334-aa70-c0ea690bc79f. Acesso em: 10 nov. 2022.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 36, de 26 de Agosto de 2015**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2979365/%288%29RDC_36_2015_COMP.pdf/1ef4765f-ee2a-4ea6-b4b2-d2c68ba0ff7f. Acesso em: 17 maio. 2023.
- ANVISA. **Point-of-Care Testing (POCT) em Farmácias Comunitárias**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/temas-em-destaque/arquivos/7891j-son-file-1>. Acesso em: 10 nov. 2022.
- ANVISA. **Testes rápidos de HIV e Sífilis na Atenção Básica**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saps/rede-cegonha/testes-rapidos-de-hiv-e-sifilis-na-atencao-basica>. Acesso em: 13 set. 2022a.
- ANVISA. **Manual de Tecnovigilância: Uma abordagem sob a ótica da Vigilância Sanitária**. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/monitoramento/tecnovigilancia/manual-tecnovigilancia-2021-v4.pdf/@download/file/MANUAL_TECNOVIGILANCIA_2021_v4.pdf. Acesso em: 13 set. 2022b.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 665, de 30 de Março de 2022**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6415268/RDC_665_2022_.pdf/100f65fb-335c-459f-aa1c-b30c995dc9d9. Acesso em: 10 fev. 2023a.
- ANVISA. **Nota Técnica n. 15/2022**. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/SEI_ANVISA-2026654NotaTecnica.pdf. Acesso em: 10 nov. 2022b.
- ANVISA. **Tecnovigilância**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/tecnovigilancia>. Acesso em: 28 dez. 2022c.
- BARBOSA, A. D. P. R. **A Formação de Competências para Inovar através de Processos de Transferência de Tecnologia: um estudo de caso**. Disponível em: <http://www.tpqb.eq.ufrj.br/download/a-formacao-de-competencias-para-inovar.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- BEWLEY, K. R. et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, micro-neutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*, v. 16, n. 6, p. 3114–3140, 23 jun. 2021.
- BOONBANJONG, P. et al. Isothermal Amplification Technology for Disease Diagnosis. *Biosensors*, v. 12, n. 9, p. 677, 24 ago. 2022.
- BRASIL. **Lei nº 8.080, de 19 de Setembro de 1990**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm. Acesso em: 24 jan. 2023.
- CARBONI, G. et al. Análise Comparativa de Métodos para Triagem de HCV em Serviços de Hemoterapia. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, v. 32, n. 4, p. 336–345, 8 dez. 2020.
- CARVALHO, A. T. DE; RIBEIRO, G. A.; NOGUEIRA, R. F. **Citometria de Fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**. Disponível em: https://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso_Ferias2010.pdf. Acesso em: 23 set. 2022.
- CASSIOLATO, J. E. et al. **Perspectivas do Investimento na 3 Economia do Conhecimento**. 3. ed. Rio de Janeiro: UFRJ, 2010.
- CLETON, N. B. et al. Spot the Difference: Development of a Syndrome Based Protein Microarray for Specific Serological Detection of Multiple Flavivirus Infections in Travelers. *PLOS*

- Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003580, 13 mar. 2015.
20. COBO, F. Application of Molecular Diagnostic Techniques for Viral Testing. **The Open Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 104–114, 30 nov. 2012.
 21. COHEN, B. J.; DOBLAS, D.; ANDREWS, N. Comparison of plaque reduction neutralisation test (PRNT) and measles virus-specific IgG ELISA for assessing immunogenicity of measles vaccination. **Vaccine**, v. 26, n. 50, p. 6392–6397, nov. 2008.
 22. COMPTON, J. Nucleic acid sequence-based amplification. **Nature**, v. 350, n. 6313, p. 91–92, mar. 1991.
 23. COONS, A. H.; KAPLAN, M. H. **Localization of Antigen in Tissue Cells**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2135948/pdf/1.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2023.
 24. CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561–563, ago. 1970.
 25. CUNHA, R. V. DA; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, ago. 2017.
 26. DANIELSON, K. M. et al. High Throughput Sequencing of Extracellular RNA from Human Plasma. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0164644, 6 jan. 2017.
 27. DE ALMEIDA SANTIAGO, M. et al. Flow Cytometry as a Tool for Quality Control of Fluorescent Conjugates Used in Immunoassays. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167669, 9 dez. 2016.
 28. DUNBAR, S. A. Bead-Based Suspension Arrays for the Detection and Identification of Respiratory Viruses. In: **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology**. Boston, MA: Springer US, 2013. p. 813–833.
 29. DUNBAR, S. A.; HOFFMEYER, M. R. Microsphere-Based Multiplex Immunoassays. In: **The Immunoassay Handbook**. Philadelphia: Elsevier, 2013. p. 157–174.
 30. DUONG, V. et al. Clinical and Virological Factors Influencing the Performance of a NS1 Antigen-Capture Assay and Potential Use as a Marker of Dengue Disease Severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, p. e1244, 19 jul. 2011.
 31. ENQUIST, L. W. Virology in the 21st Century. **Journal of Virology**, v. 83, n. 11, p. 5296–5308, jun. 2009.
 32. FERREIRA, A. G. P. **Processo de Transferência da Tecnologia de Produção do Teste Rápido de HIV-1 e HIV-2 em Bio-Manguinhos: Um Modelo para a Incorporação de Novas Tecnologias**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/5762/antonio-gomes-pinto-ferreira.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
 33. FIOCRUZ. **Relatório de Atividades**. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/relatorio-atividades-2020.pdf>. Acesso em: 22 set. 2022.
 34. FIOCRUZ. **Inovação**. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/home/inovacao-bio>. Acesso em: 13 set. 2022.
 35. FONSECA, B. P. F. et al. Development of a Multiplex Bead-Based Assay for Detection of Hepatitis C Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 5, p. 802–806, maio 2011.
 36. FORSMAN, R. W. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? **Clinical chemistry**, v. 42, n. 5, p. 813–816, maio 1996.
 37. FRANÇA, E. B. et al. Measuring misclassification of Covid-19 as garbage codes: Results of investigating 1,365 deaths and implications for vital statistics in Brazil. **PLOS Global Public Health**, v. 2, n. 5, p. e0000199, 5 maio 2022.
 38. GADELHA, C. A. G. A dinâmica de inovação e a perspectiva do complexo produtivo da saúde uma nova abordagem. In: **A dinâmica do sistema produtivo da saúde: inovação e complexo econômico-industrial**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2012. p. 13–20.
 39. GADELHA, C. A. G. et al. **Brasil Saúde Amanhã: complexo econômico-industrial da saúde**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2017.
 40. GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 237–260, mar. 2010.
 41. GRAHAM, H.; CHANDLER, D. J.; DUNBAR, S. A. The genesis and evolution of bead-based multiplexing. **Methods**, v. 158, p. 2–11, abr. 2019.
 42. HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1–8, jan. 2016.
 43. HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 15 ago. 1991.
 44. JARMAN, R. et al. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 825–833, 1 nov. 2009.
 45. KLEIN, J.; WILEY, J. Natural history of the major histocompatibility complex. **Cell Biochemistry and Function**, v. 6, n. 3, p. 222–222, jul. 1988.
 46. LI, Z.-P. et al. Development of chemiluminescence detection of gold nanoparticles in biological conjugates for immunoassay. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, n. 1–2, p. 85–91, out. 2005.
 47. LIPPI, G.; PLEBANI, M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 7, p. 1063–1069, 25 jun. 2020.
 48. LU, Y. et al. Advances in Neutralization Assays for SARS-CoV-2. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 94, n. 3, 16 set. 2021.
 49. LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z. A.; BARRAL-NETTO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 344–378.
 50. MARQUES, C. DE F. S.; FONSECA, M. V. A. Fontes de Informação Tecnológica em Biotecnologia: Variedade, Confiabilidade e Uso por Sistemas de Informação, Organizações e Grupos de Pesquisa. **Cadernos de Prospecção**, v. 7, n. 2, p. 164–177, 30 jun. 2014.
 51. MARQUETTE, C. A. et al. Macro-molecular chemiluminescent complex for enhanced immuno-detection onto microtiter plate and protein biochip. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 113, n. 2, p. 664–670, fev. 2006.
 52. MATUSALI, G. et al. SARS-CoV-2 Serum Neutralization Assay: A Traditional Tool for a Brand-New Virus. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 655, 10 abr. 2021.
 53. MCKINNON, K. M. Multiparameter Conventional Flow Cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 1678, p. 139–150, 2018.
 54. MEDCALC. **MedCalc Software Ltd**. Disponível em: <https://www.medcalc.org/calc/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

55. MEDEIROS, M. Z. **Reagentes para Diagnóstico: Estratégias para a Produção e Desenvolvimento em Bio-Manguinhos**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/35571/mauricio_zuma_medeiros.pdf?sequence=2&isAllowed=y.
56. MEDEIROS, M. Z. et al. **A primeira vacina 100% brasileira contra a Covid-19: a conquista de Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos, 2022.
57. MEDEIROS, N. I.; GOMES, J. A. S. Cytometric Bead Array (CBA) for Measuring Cytokine Levels in Chagas Disease Patients. **Methods Mol Biol**, vol. 1955. p. 309–314, 2019.
58. MILLER, S. et al. Solid and Suspension Microarrays for Microbial Diagnostics. p. 395–431, 2015.
59. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Avaliação de Tecnologias em Saúde**. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/avaliacao_tecnologias_saude_ferramentas_gestao.pdf. Acesso em: 17 maio. 2023.
60. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Testes rápidos de HIV e Sífilis na Atenção Básica**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saps/rede-cegonha/testes-rapidos-de-hiv-e-sifilis>. Acesso em: 17 maio. 2023.
61. MORRISON, L. H. When to request immunofluorescence: practical hints. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 18, n. 1, p. 36–42, mar. 1999.
62. MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, vol. 155, p. 335–350, 1987.
63. NICOLLETE, D. R. P. et al. Enhancing a SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen test sensitivity with cost efficient strategy through a cotton intermembrane insertion. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4690, 22 mar. 2023.
64. NOGUEIRA, J. M. DA R.; SILVA, L. O. P. DA. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, 2020.
65. NOVAES, H. M. D.; SOÁREZ, P. C. DE. A Avaliação das Tecnologias em Saúde: origem, desenvolvimento e desafios atuais. Panorama internacional e Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 9, 2020.
66. PARSA, S. F. et al. Early diagnosis of disease using microbead array technology: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1032, p. 1–17, nov. 2018.
67. PICARD, F. J.; BERGERON, M. G. Rapid molecular theranostics in infectious diseases. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 21, p. 1092–1101, nov. 2002.
68. PINHEIRO, L.; EMSLIE, K. R. Basic Concepts and Validation of Digital PCR Measurements. In: **Methods in Molecular Biology**. 1. ed. New York: Humana Press, 2018. p. 11–24.
69. RASO, A.; BIASSONI, R. A Quarter Century of PCR-Applied Techniques and Their Still-Increasing Fields of Use. **Methods Mol Biol**, vol. 2065, p. 1–4, 2020.
70. RODGER, M.; RAMSAY, T.; FERGUSSON, D. Diagnostic randomized controlled trials: the final frontier. **Trials**, v. 13, n. 1, p. 137, 16 dez. 2012.
71. RUSSELL, P. K.; NISALAK, A. Dengue Virus Identification by the Plaque Reduction Neutralization Test. **The Journal of Immunology**, v. 99, n. 2, p. 291–296, 1 ago. 1967.
72. SAIKI, R. K. et al. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 20 dez. 1985.
73. SAIKI, R. K. et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 29 jan. 1988.
74. SCHWANKE, K. et al. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-Leishmania infantum chagasi em cães do município de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 255–260, mar. 2014.
75. SILVA, E. D. **Desenvolvimento de ensaio multiplex para o diagnóstico da doença de Chagas utilizando plataformas de testes rápidos**. Paraná: Instituto Carlos Chagas, 2021.
76. SILVA, J. G. **Avaliação do Antígenos do vírus SARS-CoV-2 na Plataforma de Microarranjos Líquidos Visando Uso em Diagnóstico**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2021.
77. SIMMONDS, P. et al. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. **Journal of Virology**, v. 64, n. 2, p. 864–872, fev. 1990.
78. SIMÕES, M. et al. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. **Biologicals**, v. 40, n. 6, p. 399–404, nov. 2012.
79. SIMÕES, M. et al. **Standardization of Plaque Reduction Neutralization Test on 96-well Plates (micro-PRNT) for Zika Virus**. Anais do IV International Symposium on Immunobiological e VII Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos. **Anais...Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos**, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/32803>
80. SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 122, n. 1, 16 abr. 2018.
81. SREEJITH, K. R. et al. Digital polymerase chain reaction technology – recent advances and future perspectives. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 24, p. 3717–3732, 2018.
82. STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010.
83. SYKES, P. J. et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. **BioTechniques**, v. 13, n. 3, p. 444–449, set. 1992.
84. TIDD, J. Innovation management in context: environment, organization and performance. **International Journal of Management Reviews**, v. 3, n. 3, p. 169–183, set. 2001.
85. TZONEV, S. Fundamentals of Counting Statistics in Digital PCR: I Just Measured Two Target Copies–What Does It Mean? **Methods Mol Biol**, vol. 1768, In: p. 25–43, 2018.
86. VERMA, A. et al. Biotechnology in the realm of history. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 321, 2011.
87. WANG, C. et al. Chemiluminescent Immunoassay and its Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 3–10, jan. 2012.
88. WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 25 abr. 1953.
89. WÖLFEL-DUCHEK, M. et al. Sensitivity and Specificity of SARS-CoV-2 Rapid Antigen Detection Tests Using Oral, Anterior Nasal, and Nasopharyngeal Swabs: a Diagnostic Accuracy Study. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, 23 fev. 2022.
90. XAVIER, R. M.; BARROS, E. O Médico e o Laboratório. In: ART-MED (Ed.). **Laboratório na Parte Clínica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 1–12.

91. XAVIER, R. M.; DORA, J. M.; BARROS, E. A Interpretação de exames laboratoriais. In: ARTMED (Ed.). **Laboratório na Prática Clínica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. p. 64–78.
92. XIAO, Q.; XU, C. Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 124, p. 115780, mar. 2020.
93. YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. **Nature**, v. 184, n. 4699, p. 1648–1649, nov. 1959.
94. ZENG, Y.; WU, C.; HE, Y. Loop-Mediated Isothermal Amplification–Based Microfluidic Platforms for the Detection of Viral Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 24, n. 12, p. 205–215, 2 dez. 2022.
95. ZHAO, L.; SUN, L.; CHU, X. Chemiluminescence immunoassay. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 404–415, abr. 2009.

Biomarcadores para decisão terapêutica

Tatiana Martins Tilli
Nayara Salgado Carvalho
Adriana Ribas Andrade
Adriana Danowski
Verônica Goulart Moreira

Este capítulo apresenta uma visão ampla sobre biomarcadores, contemplando seu histórico na medicina personalizada, principais tipos (prognóstico, predição, farmacodinâmica e *endpoint* substituto) e formas de uso. Devido ao elevado volume de biomarcadores existentes, foram destacados os mais importantes na área de oncologia, gastroenterologia e reumatologia. O capítulo apresenta uma contextualização apontando os impactos atuais e futuros do uso de biomarcadores na saúde.

7.1 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são alterações celulares, bioquímicas ou moleculares mensuráveis e que ocorrem em meios biológicos como tecidos, células ou fluidos humanos (HULKA; WILCOSKY, 1988). Em 1993, a Organização Mundial de Saúde definiu que biomarcadores incluem praticamente qualquer medida que reflita a interação entre o sistema biológico e uma ameaça, que pode ser química, física ou biológica. A resposta aferida pode ser funcional, fisiológica, bioquímica em nível celular, ou uma interação molecular (STRIMBU; TAVEL, 2010).

Em 1998, o NIH (*National Institute of Health*), por meio do seu grupo de trabalho *Biomarker and Surrogate Endpoint*, definiu biomarcador como uma característica objetivamente mensurável e avaliável como indicador de um processo biológico normal, de um processo patogênico ou a resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (HECKMAN-STODDARD, 2012). Ainda, desenvolveu uma classificação que inclui: (i) tipo 0 (medem a história natural da doença e devem ao longo do tempo se correlacionar com indicadores clínicos); (ii) tipo I (associados com a efetividade de agentes farmacológicos); e (iii) tipo II (biomarcadores

de desfecho substituto, cuja intenção é substituir um desfecho clínico) (HULKA; WILCOSKY, 1988). Os biomarcadores também podem ser classificados em dois grupos: (i) os de exposição, que são utilizados como preditores de risco; e (ii) os de doença, que são usados para triagem, diagnóstico e monitoramento de progressão de doença (MAYEUX, 2004). Em muitos casos, uma única molécula pode desenvolver todos esses papéis, sendo um marcador de risco, preditivo de resposta a uma intervenção e de desfecho substituto, e ser, ainda, um alvo terapêutico, como será discutido adiante quando é abordado o receptor de estrogênio (SMITH; DUNN, 2012).

O principal catalisador para o avanço do conhecimento sobre as doenças e que permitiu a caracterização de novas ferramentas biotecnológicas foi o progresso tecnológico. As atuais abordagens moleculares em grande escala, como os microarranjos de DNA, RNA e tecidos, assim como a caracterização de modificações no genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma, constituem avanços importantes para estudos em grande escala de mudanças da expressão gênica relacionadas às doenças. Além disso, permitem a identificação e caracterização de biomarcadores para o diagnóstico,

prognóstico e tomada de decisão terapêutica. Um dos exemplos mais expressivos do avanço tecnológico foi a concretização do Projeto Genoma Humano (PGH). O PGH foi realizado por uma equipe internacional de pesquisadores com o objetivo de sequenciar e mapear todos os genes humanos (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004). Iniciado em 1º de outubro de 1990 e concluído em abril de 2003, o PGH viabilizou, pela primeira vez, a leitura de 95% dos genes da sequência humana com precisão de 99,99% e disponibilizados para a comunidade científica. Os dados que surgiram, desde 2003, apoiam o valor desta visão e mudaram a maneira como as doenças são pesquisadas, compreendidas e tratadas.

Os dados do PGH, em conjunto com o avanço tecnológico, revolucionaram o conhecimento sobre muitas doenças; e um dos exemplos clássicos é a revolução oncológica. Um dos primeiros tumores a serem sequenciados foi o câncer de mama por Shah e colaboradores (SHAH et al., 2009). Esses autores usaram o sequenciamento de nova geração (NGS) para sequenciar os genomas (cobertura > 43 vezes) e transcriptomas de câncer de mama lobular metastático positivo para receptor de estrogênio (ER). Os autores compararam mutações presentes na metástase e quantificaram a frequência dessas mutações somáticas no DNA do tumor primário do mesmo paciente, que surgiu 9 anos antes. Cinco das 32 mutações (em ABCB11, HAUS3, SLC24A4, SNX4 e PALB2) foram prevalentes no DNA do tumor primário removido no diagnóstico 9 anos antes, seis (em KIF1C, USP28, MYH8, MORC1, KIAA1468 e RNASEH2A) estiveram presentes em frequências mais baixas (1–13%), 19 não foram detectados no tumor primário e dois foram indeterminados.

A análise combinada dos dados do genoma e do transcriptoma revelou dois novos eventos de edição do RNA que codificam a sequência de aminoácidos de SRP9 e COG3. Esses dados mostraram que a heterogeneidade mutacional de nucleotídeo único pode ser uma propriedade de grau baixo ou intermediário no câncer de mama e que pode ocorrer evolução significativa durante a progressão da doença. Esses dados, em conjunto, sustentaram novas oportunidades no avanço do conhecimento sobre os tumores, mas também permitiram novas oportunidades na pesquisa translacional, com a caracterização de novos biomarcadores. Neste cenário de genômica e oncologia, surgiram diversas bases de dados com o objetivo de compilar diversos dados genômicos de pacientes oncológicos em uma oferta de dados de acesso aberto (TILLI, 2021). Em resumo, a revolução tecnológica fomentou novos conceitos sobre doenças complexas e raras, e novas oportunidades na medicina de precisão, como a descrição de biomarcadores.

Um dos principais objetivos da medicina de precisão é o uso do crescente conhecimento biológico para que o paciente tenha acesso ao fármaco mais adequado para sua doença, na dosagem correta, no momento correto. A terapia ideal baseia-se na seleção da intervenção farmacológica específica ao paciente mais apropriada em uma dose individualizada e no momento certo no processo de doença do paciente. Biomarcadores de diagnóstico, prognóstico, preditivo, farmacodinâmico e farmacocinético são críticos para garantir a seleção correta do paciente, dosagem e monitoramento da segurança e eficácia de muitas terapias na prática clínica. Os biomarcadores incluem produtos de expressão gênica, metabólitos, polissacarídeos, outras moléculas como ácidos nucleicos circulantes no sangue e no plasma, polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) e variantes gênicas – biomarcadores genômicos.

De acordo com a Agência Europeia de Medicina (EMA), o biomarcador genômico é definido como “características mensuráveis do DNA e/ou RNA que são indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos, e/ou respostas à terapia ou outras intervenções”. Esses marcadores incluem a expressão, regulação e função de um determinado gene. No DNA, essas características podem ser definidas como SNPs, deleções ou inserções de nucleotídeos, variações no número de cópias e rearranjos citogenéticos. As técnicas genômicas hoje disponíveis utilizadas para a identificação de biomarcadores incluem hibridização genômica comparativa (CGH), *microarray*, sequenciamento do exoma e sequenciamento completo do genoma. Além disso, técnicas como estudos de associação genômica (GWAS) têm permitido a identificação de biomarcadores genômicos potenciais para diversas doenças complexas.

O biomarcador transcriptômico é definido como um conjunto de moléculas de RNA em uma célula ou população celular em um estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica. Dessa forma, o transcriptoma é afetado de maneira dinâmica, refletindo o estado celular. As abordagens proteômicas constituem um método para determinar o perfil de algumas doenças, devido ao fato de terem origem a partir de amostras de sangue total ou plasma, por exemplo, que são amplamente utilizadas na prática clínica, configurando uma metodologia minimamente invasiva. As abordagens metabolômicas de biomarcadores ainda são recentes, mas têm demonstrado um enorme potencial, especialmente para o desenvolvimento de alvos terapêuticos. O metaboloma é relativamente mais dinâmico e sensível ao tempo do que o proteoma ou genoma, por exemplo, e então pode oferecer uma medida direta da atividade e fisiologia celular. Alterações no metaboloma podem ser consequência da interação entre estilo de vida e

fatores genéticos, ambientais, do desenvolvimento e patológicos. Dessa forma, biomarcadores metabólicos são de grande interesse, pois capturam a dinâmica da natureza da doença.

Os biomarcadores epigenéticos, por sua vez, podem oferecer uma interface funcional muito interessante entre genótipo, exposição ao meio ambiente e fenótipo. Até o momento, diversas formas diferentes de regulação epigenética foram identificadas; dessa forma, identificar quais alterações nesse cenário estão associadas às doenças, e quais fatores promovem tais alterações, pode permitir a identificação de potenciais biomarcadores bem diversos e específicos.

Assim como na oncologia, as doenças inflamatórias intestinais, a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistêmico indicam a premência na caracterização de novos biomarcadores, especialmente devido aos altos índices de incidência, complexidade e morbimortalidade. O estudo do perfil de expressão e do papel funcional de produtos gênicos envolvidos na progressão destas doenças é especialmente importante para a caracterização e descrição de novos biomarcadores, alvos terapêuticos e compreensão dos complexos mecanismos que levam ao desenvolvimento patológico.

Neste capítulo, pretende-se discutir a relevância da biotecnologia em diferentes aspectos, como a compreensão biológica detalhada destas doenças, mas também a classificação molecular e novas ferramentas nas diferentes áreas da prática clínica, incluindo a medicina personalizada, decisões e práticas de acompanhamento baseadas nos avanços tecnológicos. Os biomarcadores apresentam impacto direto sobre as taxas de sobrevivência, qualidade de vida e manejo clínico, além de serem críticos para o desenvolvimento racional de medicamentos e dispositivos médicos (CAGNEY et al., 2018).

Os biomarcadores ideais para utilização no diagnóstico e prognóstico, e para o desenvolvimento de drogas e tratamentos, devem ser altamente específicos e sensíveis. Eles podem ser divididos nas seguintes categorias principais: (i) biomarcadores de diagnóstico; (ii) de prognóstico; (iii) preditivos; e (iv) de resposta. Nas próximas seções é explicada cada categoria.

7.1.1 Biomarcadores de diagnóstico

Os biomarcadores de diagnóstico distinguem os pacientes com uma determinada doença e aqueles que não têm a doença. Assim, podem ser utilizados para garantir que os pacientes selecionados para um estudo clínico têm a doença ou o subconjunto de doenças de interesse (Figura 7.1). Um biomarcador apenas terá utilidade enquanto ferramenta de diagnóstico se for possível obter uma amostra onde este possa ser detectado. A

monitorização da glicemia dos doentes diabéticos, dosagem de troponina I para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio e o teste do cloreto de sódio no suor são úteis na investigação da fibrose cística e são exemplos de avaliações de rotina no diagnóstico de doenças, e consequentemente orientam a melhor escolha terapêutica (DE BOECK; VERMEULEN; DUPONT, 2017).

7.1.2 Biomarcadores de prognóstico

Os biomarcadores de prognóstico fornecem informações sobre o curso provável da doença em um indivíduo não tratado. Um biomarcador de prognóstico informa sobre a agressividade da doença e/ou a expectativa de como um determinado paciente se sairia na ausência de intervenção terapêutica (Figura 7.1). Normalmente, os biomarcadores de prognóstico identificam pacientes que estão provavelmente em maior risco de eventos adversos relacionados à doença ou em uma taxa mais rápida de declínio em seu estado de saúde (Figura 7.1). Em ensaios clínicos, os biomarcadores de prognóstico são usados rotineiramente para definir os critérios de entrada e exclusão do estudo para identificar populações de alto risco. Adicionalmente, podem ser usados para estratificar os pacientes em subgrupos homogêneos no momento da randomização e/ou análise. Essas informações são fundamentais para decisões sobre o tempo de permanência no hospital e/ou em unidade de terapia intensiva.

Na oncologia, um exemplo de biomarcador de prognóstico é a mutação BRCA1 ou BRCA2, que pode aumentar o risco de um segundo câncer de mama primário que, geralmente, ocorre na mama contralateral. Para mulheres portadoras da mutação BRCA1 ou 2, a chance de um câncer de mama contralateral 10 anos após o diagnóstico do primeiro câncer é de cerca de 10% a 30% em comparação com cerca de 5% a 10% para mulheres sem uma mutação de BRCA1/2 diagnosticada com câncer de mama. O risco ao longo da vida de um segundo câncer de mama contralateral primário é de cerca de 40% a 80% para mulheres portadoras de BRCA1 ou 2 (MOLINA-MONTES et al., 2014). Outro exemplo pode ser observado na leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia adulta mais prevalente com alta heterogeneidade no mundo ocidental, e o status da mutação TP53/del 17p apresenta valor prognóstico (YUN; ZHANG; WANG, 2020).

7.1.3 Biomarcadores preditivos

Um biomarcador é preditivo se o desfecho clínico (p. ex., resposta ou toxicidade à terapia, sobrevivência) depende do tratamento administrado (Figura 7.1).

Assim, são aqueles que distinguem entre os pacientes que responderão a determinado tipo de tratamento. Ele difere de um biomarcador prognóstico em que o último está correlacionado com o resultado independentemente do tratamento empregado (BALLMAN, 2015). Para validação de preditividade, testes estatísticos de interação do tratamento são necessários (BALLMAN, 2015; BUYSE et al., 2010). Uma revisão aprofundada sobre as características e diferenças entre biomarcadores prognósticos e preditivos foi publicada por Ballman (2015). Um biomarcador preditivo bem reconhecido é a mutação da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (IGHV) em pacientes com leucemia linfocítica crônica. Por um lado, pacientes com IGHV mutante apresentam melhor resposta terapêutica com fármacos à base de fludarabina do que com ibrutinib. Por outro lado, pacientes com IGHV não mutado têm uma progressão livre de doença encurtada com terapia baseada em fludarabina em comparação a ibrutinib (SHANAFELT et al., 2019).

Os biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e predição são ferramentas importantes e uma necessidade premente na medicina de precisão para as doenças complexas. O avanço tecnológico permitiu uma melhor compreensão das bases moleculares fisiopatológicas. Assim, nos últimos anos, muitos estudos experimentais e clínicos tiveram como objetivo identificar novos biomar-

cadores para estas doenças. Os biomarcadores de diagnóstico identificam os indivíduos doentes daqueles que não têm a doença. Já os biomarcadores de prognóstico fornecem informações sobre o curso provável da doença no indivíduo não tratado. Enquanto os biomarcadores preditivos estão ligados ao tratamento, pois fornecem uma previsão do potencial para um paciente responder, de alguma maneira identificada (que pode ser favorável ou desfavorável), a um ou mais tratamentos específicos.

7.1.4 Biomarcadores de resposta

Os biomarcadores de resposta são avaliações dinâmicas que evidenciam se uma resposta biológica ocorreu em um paciente após ter recebido uma intervenção terapêutica. Podem ser organizados em subcategorias, considerando os biomarcadores de segurança, farmacodinâmicos e de resposta de eficácia ou *endpoints* substitutos.

7.1.4.1 Biomarcadores de segurança

Os biomarcadores de segurança podem indicar efeitos adversos na biologia em resposta ao tratamento. Ademais, podem ter papéis importantes na avaliação de segurança durante o desenvolvimento de fármacos, especialmente se for sensível a alterações fisiopatológicas precoces bem antes da toxicidade evidente. Ainda,

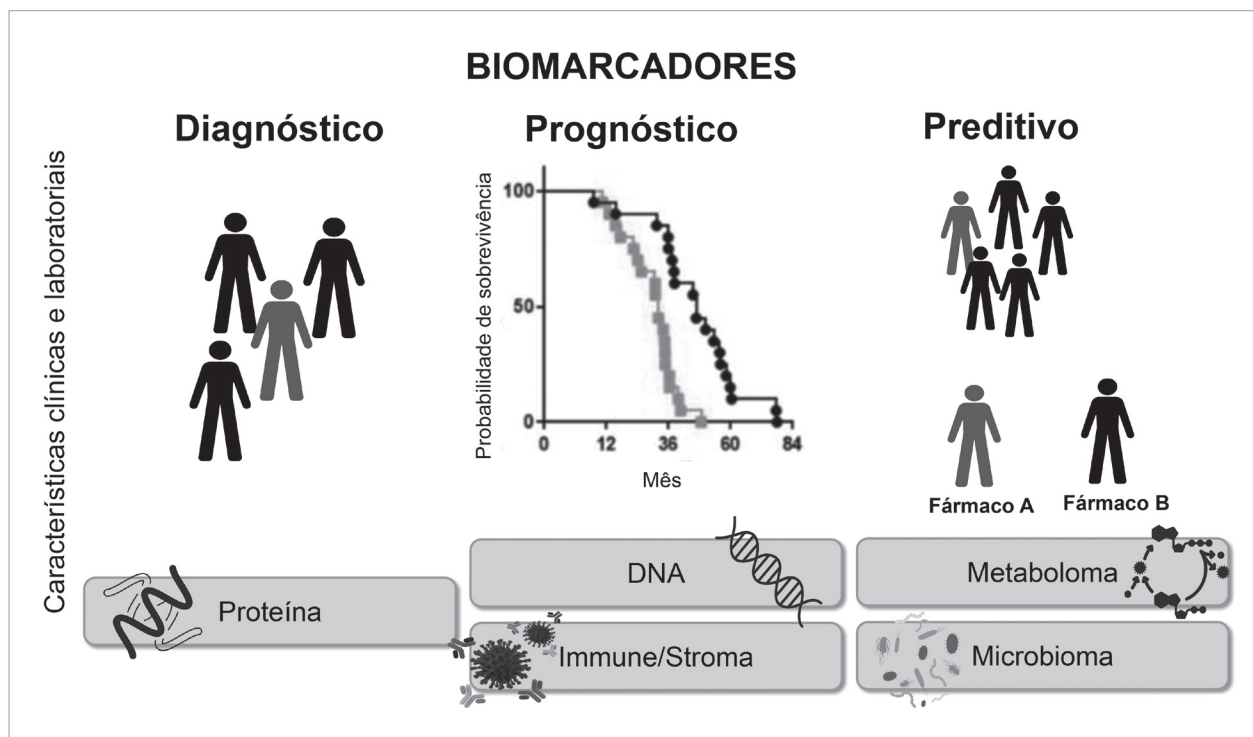


FIGURA 7.1 Principais classes de biomarcadores.

Fonte: traduzida de Khomiak et al. (2020). <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

preditores de toxicidade futura também são extremamente valiosos.

Como exemplo, a insuficiência hepática aguda é uma consequência rara e grave de lesão abrupta dos hepatócitos, podendo evoluir ao longo de dias ou semanas para um desfecho letal. Uma variedade de insultos às células hepáticas resulta em elevação rápida das aminotransferases (alanina aminotransferase [AST], aspartato aminotransferase [ALT] ou ambas), alteração mental e distúrbios da coagulação. A ausência de doença hepática existente distingue insuficiência hepática aguda de cirrose descompensada ou insuficiência hepática aguda sobre crônica. As causas para insuficiência hepática aguda incluem toxicidade por medicamentos ou drogas, isquemia hepática, hepatite viral e autoimune. O diagnóstico requer uma revisão cuidadosa dos medicamentos tomados e testes sorológicos ou moleculares para possível exposição viral (STRAVITZ; LEE, 2019).

A lesão renal aguda é uma complicação comum de doenças agudas e está associada ao aumento da morbidade e mortalidade. O biomarcador atualmente utilizado na prática clínica é a dosagem sérica de creatina; contudo, esta elevação pode estar associada com muitos fatores renais e não renais independentes da função renal. Nos últimos anos, vários biomarcadores de lesão renal aguda foram caracterizados com aplicação no diagnóstico, tomada de decisão e prognóstico de lesão renal aguda e seus resultados foram validados. Entre esses biomarcadores, o inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2) e a proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP7), nomeados como biomarcadores de parada do ciclo celular, apresentaram um perfil superior de precisão e estabilidade mesmo em pacientes com comorbidades substanciais. Portanto, em 2014, a *Food and Drug Administration* dos EUA aprovou o uso do produto de TIMP-2 e IGFBP7 ([TIMP-2] × [IGFBP7]), para auxiliar médicos intensivistas e nefrologistas na previsão precoce de lesão renal aguda em ambiente de cuidados intensivos. Até o momento, Nephrocheck® é o único teste disponível comercialmente para [TIMP-2] × [IGFBP7]. Atualmente, o Nephrocheck® encontra-se em implementação clínica (ILARIA et al., 2021).

7.1.4.2 Biomarcadores farmacodinâmicos

Os biomarcadores farmacodinâmicos são indicadores moleculares do efeito terapêutico no organismo. Um biomarcador farmacodinâmico pode ser usado para avaliar o efeito do regime terapêutico e a resposta biológica. Assim, são biomarcadores de resposta sobre a atividade biológica de um fármaco sem necessariamente tirar conclusões sobre eficácia ou resultado da doença, ou ainda, sem necessariamente vincular essa atividade

a um mecanismo de ação estabelecido. Os usos potenciais de um biomarcador farmacodinâmico incluem o estabelecimento de prova de conceito, auxiliando na seleção de dose ou medindo uma resposta.

Muitas vezes é difícil, do ponto de vista estatístico, um ensaio clínico de fase inicial demonstrar uma mudança significativa em um resultado clínico, e os resultados clínicos requerem um longo período antes que uma mudança significativa possa ser evidenciada. Assim, os biomarcadores farmacodinâmicos podem ser úteis para estabelecer a prova de conceito, ou seja, que uma intervenção médica produz uma resposta farmacológica em humanos. Essas informações podem ser usadas para orientar mais especificamente os estudos dose-resposta (GIACOMELLI et al., 2019), ou ainda para determinar quais doses devem ser consideradas em ensaios que avaliam um resultado clínico (LIN; COOLES; ISAACS, 2022). Alguns exemplos de biomarcadores farmacodinâmicos podem ser:

- Os linfócitos B circulantes podem ser usados como um biomarcador farmacodinâmico em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico para avaliar a resposta ao belimumab. Belimumab bloqueia a ligação da proteína humana solúvel estimuladora dos linfócitos B (BLyS solúvel, um fator de sobrevivência celular), aos seus receptores nas células B. Belimumab não se liga às células B diretamente, mas ao ligar-se ao BLyS, Belimumab inibe a sobrevivência das células B, incluindo as células B autorreativas, e reduz a diferenciação das células B em células plasmáticas produtoras de imunoglobulinas (STOHL; HILBERT, 2012).
- A supressão de linfócitos B tem sido usada para encontrar doses de terapias direcionadas a linfócitos B necessárias para reduzir ao máximo essa população de células, que se presume ser a base dos benefícios clínicos desses fármacos no tratamento do câncer.
- O cloreto de sódio no suor pode ser usado como um biomarcador farmacodinâmico ao avaliar pacientes com fibrose cística, para avaliar a resposta aos fármacos que tenham como alvo o gene regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (DURMOWICZ et al., 2013).
- A razão normalizada internacional (INR) pode ser usada como um biomarcador farmacodinâmico ao avaliar a resposta de um paciente ao tratamento com varfarina para prevenção de trombose (HOLBROOK et al., 2012).
- O nível urinário de glicosaminoglicanos pode ser usado como um biomarcador farmacodinâmico ao avaliar a resposta à terapia de reposição enzimática (Aldurazyme®) para pacientes com mucopolissacaridose tipo 1 (JAMESON; JONES; REMMINGTON, 2016).

- Os níveis de fluoroestradiol ($18F$ ou ^{18}FES) visualizados por tomografia por emissão de pósitrons (PET) podem ser usados como um biomarcador farmacodinâmico para detectar a resposta à terapia endócrina em pacientes com câncer de mama metastático ou recorrente positiva para receptores de estrogênio (ER) (LIAO et al., 2016).
- Os níveis de fosfo-AKT podem ser usados como um biomarcador farmacodinâmico para medir a inibição da via de sinalização de PI3K, como uma resposta aos inibidores (copanlisibe) desta via em pacientes com linfoma ou tumores sólidos (MORSCHHAUSER et al., 2020).
- Os níveis de anticorpo antidroga (*anti-drug antibody* – ADA) na terapia com anti-TNF, principalmente no manejo terapêutico do infliximabe, nos pacientes com doença de Crohn ou retocolite ulcerativa moderada a grave, são biomarcadores farmacodinâmicos na medida em que níveis elevados de anticorpo antidroga podem indicar falha a essa classe terapêutica, anulando o efeito da droga, principalmente se os níveis séricos de anti-TNF estão baixos e o paciente encontra-se em atividade da doença.
- A redução do RNA viral do HIV é um *endpoint* substituto validado para o controle clínico da doença pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tem sido usada como base para a aprovação de medicamentos destinados ao tratamento do HIV (AASLD, 2017).
- A redução do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) é um desfecho substituto validado para a redução de eventos cardiovasculares e tem sido usada como base para a aprovação de estatinas e outros medicamentos redutores de LDL, como inibidores de PCSK9 e ezetimiba (STONE et al., 2014).
- A redução da pressão arterial é um desfecho substituto validado para a redução das taxas de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e mortalidade, e tem sido usada como base para a aprovação de medicamentos e em ensaios essenciais de dispositivos médicos destinados a tratar a hipertensão (JAMES et al., 2014).

Para obter mais exemplos de *endpoints* substitutos validados, pode-se consultar a tabela de *endpoints* substitutos que foram a base da aprovação ou licenciamento de medicamentos (FDA, 2022).

Em resumo, na prática clínica, os biomarcadores são fundamentais para a realização de um diagnóstico mais preciso, minimizar as chances de erros ou para identificar o risco de ocorrência de uma doença. Podem ser um recurso importante na hora de estratificar doentes e de observar o agravamento e a progressão de uma determinada patologia, monitorizando o tratamento escolhido, até mesmo para que seja menos provável que surjam muitos dos efeitos adversos e colaterais. Com o objetivo de aprofundar essa discussão, foram selecionadas algumas doenças complexas, como os tumores, as doenças inflamatórias intestinais, a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistêmico.

7.1.4.3 Biomarcadores de resposta de eficácia ou *endpoints* substitutos

Os biomarcadores de resposta de eficácia são um subconjunto de biomarcadores de resposta que preveem um resultado clínico específico relacionado à doença e podem servir como substitutos para um desfecho de eficácia clínica. É importante reconhecer a contribuição da variação interindividual para as diferenças na susceptibilidade à doença, progressão da doença e resposta aos fármacos e, ainda, que os biomarcadores podem ser usados para identificar a susceptibilidade à exposição de um fármaco ou biológico em indivíduos. Dos tipos de biomarcadores descritos, os *endpoints* substitutos validados foram os mais difíceis de estabelecer. Um *endpoint* substituto é “um biomarcador que se destina a substituir um desfecho clínico”.

Em resumo, espera-se que um desfecho substituto preveja o benefício clínico (ou falta de benefício, ou dano) com base em evidências epidemiológicas, terapêuticas, fisiopatológicas ou outras evidências científicas. Alguns exemplos de biomarcadores *endpoint* substituto podem ser:

- A redução da hemoglobina A1c (HbA1c) é um desfecho substituto validado para a redução de complicações microvasculares associadas ao diabetes mellitus e tem sido usada como base para a aprovação de medicamentos destinados ao tratamento do *diabetes mellitus* (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

7.2 BIOMARCADORES EM ONCOLOGIA

São inúmeros os biomarcadores de interesse em oncologia e os mesmos podem ser identificados no sangue e outros líquidos corporais e obtidos através da análise das células do próprio tumor. O primeiro biomarcador relacionado à neoplasia descrito foi a proteína de Bence-Jones. Em 1847, Henry Bence-Jones identificou que ao aquecer a urina de pacientes com mieloma múltiplo ocorria a desnaturação das proteínas, que correspondem às cadeias leves de imunoglobulina produzidas pelos plasmócitos neoplásicos. Além do mieloma múltiplo, tais proteínas também são encontradas na urina de pacientes com macroglobulinemia de Waldenström (DELMAN; GALLY, 1962; KIANG, 1977).

Em patologia, o surgimento da técnica de imuno-histoquímica, na década de 1970, possibilitou o desenvolvimento crescente de um elevado volume de biomarcadores, grande parte deles com relevância nas doenças oncológicas. A técnica de imuno-histoquímica consiste, resumidamente, na detecção de um antígeno proteico por um anticorpo. A visualização da ligação entre o antígeno e o anticorpo pode ser obtida de diversas maneiras; na maioria das vezes, o anticorpo é conjugado com uma enzima (peroxidase, p. ex.) que tem a capacidade de catalisar uma reação cromógena. Os principais biomarcadores em oncologia são descritos nas próximas seções.

7.2.1 Receptor de estrogênio (RE)

Dentre os biomarcadores em oncologia, o primeiro a ser relacionado com a terapia-alvo foi o receptor de estrogênio. Além de ser o alvo dos moduladores seletivos do receptor de estrogênio, trata-se de um marcador preditivo e cuja presença está relacionada a bom prognóstico. O principal modulador seletivo do receptor de estrogênio, o tamoxifeno, teve aprovação inicial do FDA, em 1977, para o tratamento de câncer de mama metastático. O RE interage com o estrogênio nas células tumorais, determinando sua proliferação; uma vez ligado ao tamoxifeno essa proliferação é inibida (FITZGIBBONS; CONNOLLY, 2022; MUHLEMANN; COOK; WEISS, 1994).

O RE pode ser detectado no tecido tumoral por meio da realização de imuno-histoquímica, teste estabelecido como padrão-ouro na rotina clínica de hospitais privados e do Sistema Único de Saúde (SUS). A porcentagem e a intensidade da reação devem ser avaliadas e estão correlacionadas com a resposta terapêutica e com o prognóstico (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011).

Para o carcinoma invasivo da mama, é utilizado o escore de Allred, o qual combina a porcentagem de células marcadas com a intensidade dessa marcação. Assim, existe uma variação de 0 a 8 (Tabela 7.1). Escores mais altos estão relacionados a grau histológico mais baixo e maior probabilidade de resposta à terapia hormonal, enquanto escores inferiores a grau histológico mais alto. Escores 0 e 2 são considerados negativos, enquanto 3 a 8 são positivos. Para pacientes com baixa expressão de RE (1-10% de células fracamente positivas), a decisão sobre hormonioterapia deve ser baseada na análise dos riscos e potenciais benefícios (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011).

7.2.2 HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)

Outro biomarcador descoberto inicialmente como tendo relevância no câncer de mama, mas que também

TABELA 7.1 Escore de Allred

Escore de proporção	% de células positivas	Intensidade	Escore de intensidade
0	0	nenhuma	0
1	<1	fraca	1
2	1 a 10	intermediária	2
3	11 a 33	forte	3
4	34 a 66		
5	> ou = a 67		

Fonte: adaptada de Curtis et al., (2012).

tem importância nos carcinomas do tubo digestivo, é o HER2. O HER2 é um receptor tirosina quinase transmembrana, que faz parte de uma família de quatro receptores, e está implicado na patogênese e progressão do câncer de mama. Desde a descoberta da sua importância, a amplificação do HER2 e a resultante superexpressão proteica têm mostrado importante papel em vias de sinalização de proliferação e sobrevivência celular; com isso, diversos fármacos têm sido desenvolvidos, tendo tais vias como alvo. Assim, a detecção de HER2 tem se tornado rotina na determinação prognóstica e preditiva no câncer de mama (SUBRAMANIAN; MOKBEL, 2008).

A amplificação do gene ou a superexpressão proteica está presente em cerca de 15-20% dos cânceres de mama e está associada com subtipos mais agressivos. O domínio tirosina quinase encontra-se constitutivamente ativo quando superexpresso devido à homo e à heterodimerização (XU et al., 2002). Além do carcinoma invasivo, a superexpressão já é vista na hiperplasia ductal atípica e no carcinoma ductal *in situ* (PALUCH-SHIMON et al., 2008). A terapia anti-HER2, através do anticorpo monoclonal, trastuzumabe, reduz recorrência, metástase e mortalidade e aumenta a sobrevida em pacientes com metástases (VIANI et al., 2007; XU et al., 2002; ZHAO et al., 2002).

A detecção da amplificação/superexpressão de HER2 pode ser realizada por meio de algumas metodologias, como a imuno-histoquímica, a hibridização *in situ* (ISH) e a PCR (reação em cadeia da polimerase). A hibridização pode ser fluorescente (FISH – *fluorescent in situ hybridization*) ou cromógena (CISH – *chromogenic in situ hybridization*) (GONG; GILCREASE; SNEIGE, 2005; HANNA; KWOK, 2006; PENAULT-LLORCA et al., 2009; VAN DE VIJVER et al., 2007). No FISH, utiliza-se uma sonda dupla fluorescente que marca o centrômero do cromossomo 17 (CEP17) e locus do HER2 no braço longo desse cromossomo. Na ISH devem ser analisados ao menos 20 núcleos de células tumorais invasivas para se estimar o número de cópias do gene HER2 e do centrômero por célula e realizar a relação HER2/ CEP17.

No CISH utiliza-se uma sonda marcada com peroxidase com detecção cromógena, o que permite a análise em microscópio óptico; e o sinal, ao contrário do FISH, não decai com o passar do tempo (UYGUR; GÜMÜŞ, 2021). Na imuno-histoquímica analisa-se a expressão proteica do HER2 na membrana celular. A análise se baseia em um escore que avalia a intensidade e frequência da marcação, no qual 3+ (marcação intensa completa em mais de 10% das células tumorais invasivas) é um resultado positivo, 2+ (marcação fraca e moderada completa em mais de 10% das células tumorais invasivas), equívoco/indeterminado e 1+ (marcação fraca e incompleta em mais de 10% das células tumorais invasivas) e 0 (sem marcação ou marcação fraca/pouco perceptível e incompleta em 10% ou menos das células tumorais invasivas) negativo. Os casos com resultados 2+ devem ser submetidos ao FISH ou CISH para avaliação da amplificação. São considerados amplificados aqueles em que se observam seis ou mais cópias do HER2 por células e aqueles em que a relação HER2/CEP17 é maior ou igual a dois. Casos em que a relação HER2/CEP17 é maior ou igual a dois, porém a média de sinais de HER2 por células é inferior a 4, apenas são considerados positivos se a IHQ tiver resultado 3+ (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011).

7.2.3 Antígeno carcinoembrionário

Antígeno carcinoembrionário (CEA) é um grupo de glicoproteínas glicosil fosfatidil inositol da superfície celular que atuam como ligantes de diversas selectinas. Estão presentes durante o desenvolvimento fetal e associado ao tubo digestivo; e podem ser detectadas no sangue ou soro de pacientes com diversos tipos de cânceres.

Patologicamente possui expressão em diversos tumores, em especial os do tubo digestivo, o que denota sua especificidade reduzida. É detectado por meio do estudo imuno-histoquímico, e a marcação obtida é variável, podendo ser citoplasmática ou membranar. Positividade é encontrada em adenocarcinomas pulmonares, gástricos, de vesícula biliar, de esôfago, colorretal, pancreáticos, hepatocarcinomas, carcinomas de mama, colangiocarcinomas, carcinomas uroteliais, cervicais, carcinomas medulares da tireoide, alguns carcinomas cutâneos, hepatoblastoma, carcinomas hepatoides e escamosos do pulmão, tumores mucinosos de ovário, doença de Paget extramamária, dentre outros (AHMADI et al., 2014; HALL et al., 2019; PAKDEL; MALEKZADEH; NAGHIBALHOSSAINI, 2016; RAMPHAL et al., 2019; SACHAN et al., 2020; TURKDOGAN et al., 2018; VAN DER KAAIJ et al., 2019; WANG et al., 2020). Os níveis sorológicos podem estar associados à doença metastática e pior prognóstico. No pós-operatório, a não redução a

patamares normais indica doença residual ou recorrência (KIM et al., 2015). Em adenocarcinomas pulmonares, a manutenção dos níveis elevados no pós-operatório pode indicar recorrência precoce (HUANG; REICHARDT, 2003).

7.2.4 NTRK (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*)

Família de receptores tirosina quinase, NTRK1, 2 e 3 que codificam proteínas quinase Trk-A, Trk-B e Trk-C. A ativação desses receptores pela neurotrofina desencadeia vias envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, particularmente no sistema nervoso embrionário (HUANG; REICHARDT, 2001; RUDZINSKI et al., 2018). Diversos tumores, com tipos histológicos e localizações diferentes exibem fusões NTRK. Tais tumores são elegíveis para tratamento com inibidores TRK, larotrectinibe e entrectinibe. Os que mais frequentemente exibem fusões são o fibrosarcoma infantil (CHIANG et al., 2018; DAVIS et al., 2018; HUNG; FLETCHER; HORNICK, 2018), nefroma mesoblástico (DAVIS et al., 2018), sarcomas uterinos (HECHTMAN et al., 2017) e os carcinomas secretórios da mama e das glândulas salivares (CHOU et al., 2020). Outros com menor frequência são adenocarcinoma colorretal, glioblastoma, adenocarcinoma pulmonar e melanoma (CHOU et al., 2020; SOLOMON et al., 2020) (Figura 7.2).

O anticorpo pan-TRK reconhece o domínio C terminal de Trk-A, Trk-B e Trk-C, podendo auxiliar na identificação de neoplasias que possuem fusões NTRK1/2/3. Estão disponíveis dois clones, EPR17341 e A7H6R. Há variação na imunoexpressão de acordo com o gene NTRK envolvido. A sensibilidade também varia e é menor nas fusões de NTRK3. Considera-se positiva marcação igual ou superior a 1% das células neoplásicas, particularmente para fusões NTRK3 que podem mostrar somente marcação esparsa (FEHRENBACHER et al., 2016). A interpretação deve ser cuidadosa e deve sempre levar em consideração os aspectos morfológicos. Falsos-positivos foram relatados em diversos contextos, alguns deles relacionados a rearranjos estruturais e amplificações, sem a presença de fusões (CHIANG et al., 2018; FEHRENBACHER et al., 2016).

7.2.5 PD-1 (*programmed cell death 1*)/PDL-1 (*programmed-death ligand 1*)

PD-1 é um receptor de superfície celular que faz parte da superfamília das imunoglobulinas, que é expressa por linfócitos T ativado. Inicialmente, foi considerado como regulador da morte celular; entretanto, atualmente é compreendido como um receptor inibitório chave do ponto

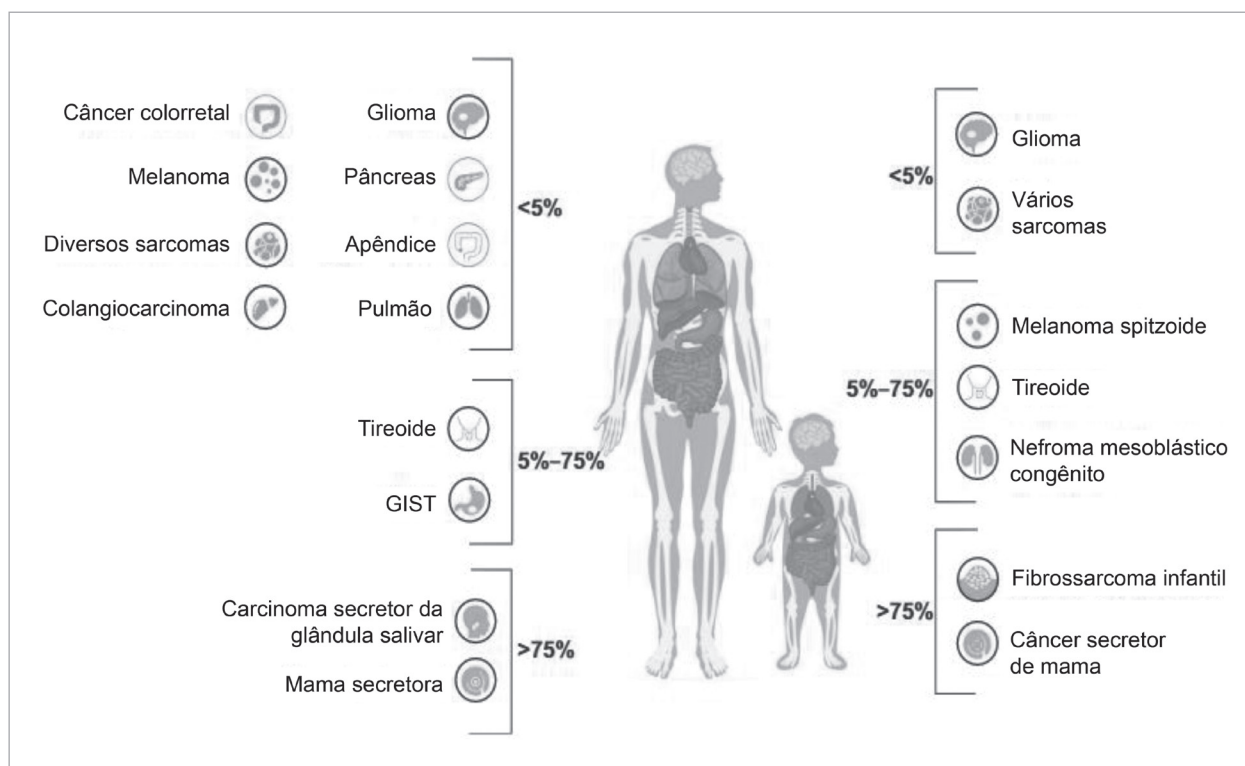


FIGURA 7.2 Frequência de fusões NTRK (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*) em neoplasias na população adulta e pediátrica.

Fonte: Elaborada com base em Alard et al. (2020).

de verificação imune. Seu ligante principal, o PD-L1, é uma proteína transmembrana expressa em diversos tipos celulares, inclusive em células apresentadoras de antígeno, e outras como células cardíacas, pulmonares etc., além de células tumorais. A ligação PD-1/PD-L1 inibe as células T ativadas. As células tumorais que expressam PD-L1 com consequente ligação ao PD-1 e inibição das células T conseguem assim um mecanismo para evadir-se do sistema imune e, portanto, crescer (ALARD et al., 2020).

Fármacos que têm como alvo a via PD-1/PD-L1 têm mostrado resultados promissores em diversos cenários, como o carcinoma de mama triplo negativo, melanoma, carcinoma de pulmão não pequenas células, carcinoma urotelial, carcinoma escamoso e adenocarcinoma do colo uterino, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, adenocarcinoma gástrico e da junção esôfago-gástrica. Trata-se de anticorpos monoclonais anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Dentre os fármacos anti-PD-1 temos, por exemplo, o pembrolizumabe e o nivolumabe e dentre os anti-PD-L1 o atezolizumabe, o avelumabe e o durvalumabe (BALAR et al., 2017).

A avaliação da elegibilidade de uma neoplasia à imunoterapia depende da imunexpressão de PD-1 ou PD-L1, que deve ser avaliada por meio de estudo

imuno-histoquímico. Essa detecção é anticorpo-droga específica. Por exemplo, para a utilização do pembrolizumabe deve-se utilizar o anticorpo anti-PD-1 – 22C3 – e para o atezolizumabe o anticorpo anti-PD-L1 – SP142. O escore que define se um determinado tumor é positivo ou negativo é tipo histológico-dependente. A avaliação deve ser feita nas células neoplásicas e/ou nas células imunes que infiltram o tumor. Qualquer intensidade de marcação em uma célula faz com que esta seja considerada como positiva, nas células neoplásicas deve ser avaliada a marcação de membrana e nas imunes, membrana e citoplasma. Para contagem, devem ser evitadas áreas de necrose e devem ser avaliadas de 50 a 100 células tumorais, a depender do anticorpo utilizado. O cuidado pré-analítico com a amostra deve incluir um tempo de fixação em formol tamponado que varia entre 6 e 72 horas.

7.3 BIOMARCADORES NAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

A Gastroenterologia é considerada uma especialidade vasta com campos de ação variáveis, e, portanto, com diversos biomarcadores de relevância para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. Nesta seção,

são descritos aqueles de fundamental importância no manejo de pacientes com distúrbios intestinais, mais precisamente, com enfoque nas doenças inflamatórias intestinais (DII). As DII compreendem a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). A DC e a RCU são caracterizadas por inflamação crônica do tubo digestivo, originadas a partir de uma microbiota intestinal disfuncional em indivíduos geneticamente predispostos, levando à resposta imune exacerbada e a sintomas que oscilam em surto e remissão. Essas doenças eram mais prevalentes nos países desenvolvidos, mas nos últimos anos tem-se verificado um aumento da incidência e prevalência em países orientais e sul-americanos, entre eles o Brasil (GALHARDI GASPARINI; SASSAKI; SAAD-HOSSNE, 2018; GOMES et al., 2021; KAPLAN; NG, 2017; KOTZE et al., 2020; PARENTE, 2015; SENGER et al., 2021; VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009). As doenças afetam principalmente jovens adultos e podem ter consequências devastadoras na sua qualidade de vida, produtividade laboral e relações íntimas. Além disso, os gastos em saúde pública com tratamento e manejo destas doenças são exorbitantes.

No Brasil, estudos revelam que pacientes com DII apresentam alto índice de absentismo (uma vez que a doença compromete primariamente indivíduos em sua idade laboral) com gastos ao sistema público que ultrapassam US\$ 90 milhões, no período de 2010 a 2014 (DE S. B. FRÓES et al., 2018). Apesar dos progressos dos últimos anos, que permitiram um melhor conhecimento da patogênese da doença e melhores tratamentos médicos, ainda não existe cura e muitos doentes são refratários aos tratamentos disponíveis, realçando a importância de desenvolver novas estratégias.

Além disso, um outro problema envolvido é o *gap* entre o início dos sintomas (conhecidos como *red flags*: diarreia com sangue ou alteração do hábito intestinal por mais de 4 semanas, dor abdominal de predomínio noturno, perda ponderal > 10%, manifestações extraintestinais, fístulas/fissuras perianais de difícil cicatrização, antecedente pessoal ou familiar de distúrbios imunomediados) (COLOMBEL; MAHADEVAN, 2017) e o diagnóstico. Isso ocorre porque existe uma demanda reprimida importante de exames endoscópicos (como endoscopia, colonoscopia, cápsula endoscópica e enteroscopia) e radiológicos (como enterorressonância magnética, ultrassom de intestino e enterotomografia) no SUS. Portanto, ferramentas que encurtem esse período são de fundamental importância.

Na prática clínica da gastroenterologia é consenso que a calprotectina fecal (CalproF) é um dos principais biomarcadores no manejo desses pacientes, com superioridade em relação à proteína C-reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação (VHS), demais marcadores para

avaliação de atividade de doença (PANES; JAIRATH; LEVESQUE, 2017). Caracteriza-se por ser uma proteína ligadora de cálcio e zinco encontrada no citoplasma dos neutrófilos, liberada quando há dano à mucosa do trato gastrointestinal. Tem propriedade bacteriostática e fungistática e é encontrada nas fezes com concentração seis vezes maior do que no plasma (BUNN et al., 2001; CARROCCIO et al., 2003). Lactoferrina fecal também é um biomarcador bastante estudado; entretanto, por sua correlação positiva com a CalproF, e por ter um custo ainda maior ao da calprotectina, ela não é tão disponível na prática clínica do Brasil, portanto não detalharemos neste capítulo (MOSLI et al., 2015; VIEIRA et al., 2009).

Dentre as utilidades da CalproF destacam-se primeiro diagnóstico de DII, avaliação de atividade de doença durante o tratamento nos pacientes com DII (como preditor de recidiva) e no diagnóstico diferencial entre DII e síndrome do intestino irritável (SII) (BUNN et al., 2001; CARROCCIO et al., 2003; D'HAENS et al., 2012; MOSLI et al., 2015; ROKKAS; PORTINCASA; KOUTROUBAKIS, 2018; TOYONAGA et al., 2017; TURSI et al., 2015). É um teste não invasivo, fidedigno e de baixo custo, com trabalhos na atenção primária em saúde demonstrando custo-efetividade no manejo dos pacientes com DII (ZHANG et al., 2019). Existe boa correlação da CF com o grau de atividade endoscópica por meio do escore de atividade endoscópica tanto na DC (SES-CD) quanto na RCU (*Mayo Score*). Entretanto, sabe-se que seus níveis são mais elevados quanto mais distal a doença, podendo se apresentar com valores normais em pacientes com DC de intestino delgado (DOLWANI et al., 2004). Sua melhor performance é quando apresenta resultado negativo, em geral com *cut-off* < 50 mcg/g, podendo corresponder a desordem funcional no diagnóstico diferencial entre DII e SII, ou ao paciente com DII com mucosa cicatrizada. Nesses dois cenários, uma CF negativa pode implicar a não necessidade de realização de colonoscopia ou de exames radiológicos, com consequente redução dos riscos e custos ao SUS (YANG; CLARK; PARK, 2014; ZHANG et al., 2019).

Ao longo das últimas décadas, diversos ensaios para a extração e quantificação da calprotectina fecal foram introduzidos por inúmeros fabricantes (Quadro 7.1). Os métodos de extração e quantificação de calprotectina fecal evoluíram significativamente desde que Roseth et al. desenvolveram o primeiro método por ensaio imunoenzimático (ELISA) em 1992 (RØSETH et al., 1992). Na técnica desenvolvida por Ton et al., a preparação de amostras de fezes era feita em tubos fechados, o que permitia uma menor contaminação bacteriana; a alta concentração de ureia na solução associada ao vórtex aumentaram sobremaneira a liberação de calprotectina das fezes (TØN et al., 2000). Ensaios mais automatizados

que permitem alto rendimento, como imunoenaios ligados a enzimas (ELISA), imunoenaios de quimioluminescência (CLIA), imunoenaios fluoroenzimáticos (FEIA) e imunoenaios turbidimétricos aprimorados por partículas (PETIA) estão agora sendo usados para quantificação de calprotectina fecal (Quadro 7.1). O imunoenensaio de calprotectina executado na plataforma ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suécia) foi possivelmente o primeiro ensaio automatizado de calprotectina fecal comercializado (PATHIRANA et al., 2018).

QUADRO 7.1 Ensaio automatizados que apresentam alto rendimento para a quantificação de calprotectina fecal

Plataforma	Ensaio de calprotectina fecal
ELISA (anticorpos policlonais)	CALPRO AS, Lysaker, Noruega
ELISA (anticorpos monoclonais)	Calprotectina fCAL ELISA, Suíça
CLIA (anticorpos monoclonais)	DiaScorin Liaison, ensaio
PETIA (anticorpos policlonais)	Itália fCAL turbo, Suíça

Fonte: adaptado de Pathirana et al. (2018).

Para avaliação quantitativa de calprotectina fecal por ELISA (método mais utilizado) o anticorpo monoclonal de captura específico para complexos da calprotectina fecal heterodiméricos e poliméricos é revestido na placa de microtitulação. A quantidade de fezes e o tubo de extração podem variar de acordo com o fabricante; entretanto, quando não analisadas no mesmo dia, as fezes podem ser armazenadas em freezer a -20°C até a leitura do teste; e no dia da realização do exame, são descongeladas em temperatura ambiente, conforme orientação do fabricante. As fezes são pesadas em uma balança de precisão, necessitando de 100 mg para análise. Controles, calibradores e amostras, diluídas em 1:50, são incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Depois da etapa de lavagem, o anticorpo de detecção (Ab) conjugado com peroxidase de raiz-forte (HRP) detecta moléculas de calprotectina ligadas ao anticorpo monoclonal recoberto na placa. Depois de nova incubação e lavagem, a tetrametilbenzina (TMB) é acrescentada formando a cor azul seguida de uma reação de interrupção (solução stop de ácido sulfúrico), formando a cor amarela. A absorção é medida no leitor de ELISA na faixa de 450 nm, interpolados com a curva padrão de cinco pontos. Os valores da calprotectina são expressos em $\mu\text{g/g}$ de fezes e valores acima de 200 $\mu\text{g/g}$ em geral são considerados como indicativos de inflamação

do trato gastrointestinal, conforme demonstrado em estudo brasileiro desenvolvido por Vieira et al. (2009).

Como o teste ELISA tem muitas desvantagens – como sua natureza demorada, um longo tempo de resposta e a necessidade de conhecimento científico – os testes rápidos com metodologia Lateral Flow Imunoassays (LFIA), considerados testes *point-of-care* (POC), vêm ganhando cada vez mais espaço pela praticidade, facilidade de leitura (tanto profissionais de saúde quanto o próprio paciente faz a coleta e a leitura do exame), possibilitando uma melhor qualidade no acompanhamento à distância dos pacientes. Os testes POC para calprotectina fecal tornaram-se populares em clínicas, embora ainda exijam a extração da amostra de fezes, o que reduz a utilidade dessa abordagem. O método frequentemente usado no teste POC é a imunocromatografia quantitativa (Quantum Blue – Buhlmann-Alere) e um teste POC baseado em um método quantitativo de imunocromatografia de fluxo lateral sanduíche IBDoc (Buhlmann Laboratoies AG, Schonenbuch, Suíça). Associado ao teste, há um aplicativo de software para medição de calprotectina fecal com base em cromatografia de fluxo lateral que transforma a câmera de um smartphone em um leitor de resultados. Este teste rápido permite que os pacientes meçam seus próprios valores de calprotectina fecal em casa (COOREVITS; BAERT; VANPOUCKE, 2013; HEIDA et al., 2017).

É importante considerar que os níveis de calprotectina podem estar alterados em uma série de situações, como: i) neoplasias; ii) infecções parasitárias, bacterianas, fúngicas ou virais; iii) uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINE) ou demais medicamentos como inibidores de bomba de prótons; iv) doenças ácidas relacionadas e úlcera péptica; v) fibrose cística; vi) doença gastrointestinal enxerto \times hospedeiro (GvHD), a seguir, mais bem destrinchados:

7.3.1 Neoplasias

A expressão de calprotectina em tecido de carcinoma colorretal, mucosa adjacente ao tumor e pólipos adenomatosos em biópsias colônicas foi investigada. Os níveis teciduais de calprotectina foram maiores no carcinoma colorretal e pólipos adenomatosos em comparação com os da mucosa de controles saudáveis e da mucosa adjacente ao tumor; portanto, a expressão da calprotectina fecal parece ser um passo inicial na transformação neoplásica durante a carcinogênese colorretal (LULEY et al., 2011).

7.3.2 Infecções

Em um grande estudo de pacientes com diarreia aguda, Shastri et al., (2008) demonstraram que a cal-

protectina fecal identificou infecção bacteriana com uma sensibilidade de 83% e 87%, respectivamente, considerando um *cut-off* de 15 mg/L e mostrou melhor precisão diagnóstica do que a lactoferrina fecal e o teste de sangue oculto. Os valores de calprotectina fecal foram maiores na diarreia aguda bacteriana em comparação com diarreia viral (SHASTRI et al., 2008).

7.3.3 Uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE)

Em relação à enteropatia do intestino delgado induzida por AINE, a toxicidade gastrointestinal afeta até 70% dos pacientes com uso prolongado de AINE, mas pode ser subestimada na prática clínica, pois a maioria desses pacientes permanece oligossintomática. Um estudo de Maiden et al. (2005) em 40 indivíduos saudáveis mostrou que 75% dos indivíduos apresentavam calprotectina fecal elevada após duas semanas de tratamento com diclofenaco (MAIDEN et al., 2005; WALLACE, 2013).

7.3.4 Doenças ácido-relacionadas e úlcera péptica

Também utilizada para diagnósticos diferenciais nas doenças ácido-relacionadas e úlcera e péptica, CF com 50 mcg/g como *cut-off* previu achados endoscópicos no trato gastrointestinal superior com 59% de sensibilidade e 82% de especificidade. Os valores de calprotectina fecal também aumentaram com a gravidade da doença (MAIDEN et al., 2005; WALLACE, 2013).

7.3.5 Fibrose cística

Na fibrose cística os níveis de calprotectina fecal diferem em lactentes com fibrose cística em comparação com os lactentes saudáveis, indicando que um ambiente intestinal alterado está presente desde o início da vida. A calprotectina fecal está elevada em pacientes com fibrose cística, particularmente em pacientes com insuficiência pancreática (GARG et al., 2017).

7.3.6 Doença gastrointestinal enxerto vs. hospedeiro (GvHD)

Estudos investigaram a calprotectina fecal como um teste não invasivo para substituir a histologia na doença gastrointestinal enxerto vs. hospedeiro (GvHD) após o transplante alogênico de células tronco. A sensibilidade para detectar envolvimento gastrointestinal em GvHD e sua capacidade para prever resposta a terapia com esteroides foram avaliadas. Os resultados mostraram que a CF foi significativamente maior em paciente com

GvHD intestinal do que em pacientes com envolvimento de outros órgãos e correlacionados com achados histológicos, ajudando a discriminar entre GvHD intestinal e outras causas de diarreia em tais pacientes (METAFUNI et al., 2017).

O benefício também pode ser verificado na gastroenterologia pediátrica pela possibilidade de se rastrear a DII com este exame, reduzindo a indicação de ileocolonoskopias e a utilização de todo o aparato necessário para sua realização (preparo do exame, internação, uso de centro cirúrgico, anestesia geral) (BUNN et al., 2001). Consideramos de suma importância a utilização deste exame no acompanhamento do paciente com DII em tratamento nos centros terciários e quaternários ou de Referência para DII, e como triagem na atenção primária à saúde para diagnóstico precoce das DII, evitando complicações como estenoses, fistulas, cirurgias e neoplasias.

Outros marcadores também utilizados na prática clínica em pacientes com DII são os marcadores sorológicos. Desde o início dos estudos direcionados às DII, quando evidências demonstraram anticorpos contra células epiteliais do cólon em pacientes com retocolite ulcerativa, marcadores imunológicos têm sido usados, tanto individualmente quanto em painéis de anticorpos. A presença de anticorpos contra componentes de agentes microbianos, ASCA principalmente, e anticorpos anticitoplasma de eutrófilos, ANCA, têm sido utilizados (DANESE; FIOCCHI, 2006; RUMP et al., 1990; VASILIAUSKAS, 2000). Anticorpos antiglicanos são direcionados contra polissacarídeos da parede celular de agentes microbianos como fungos, leveduras e bactérias. Anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) são direcionados contra um polímero de manose da levedura *Saccharomyces* homólogo de bactérias intestinais e são bem mais prevalentes na doença de Crohn (DC) (PRIDEAUX et al., 2012). Os anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA, do inglês *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) são autoanticorpos direcionados contra constituintes dos grânulos de neutrófilos. São encontrados em uma variedade de patologias autoimunes, como a granulomatose de Wegener, artrite reumatoide e na DII. Existem três tipos de ANCA, citoplasmáticos, perinucleares (pANCA) e atípico, baseados no padrão de coloração dos neutrófilos à imunofluorescência, e dentre eles o pANCA atípico parece estar mais associado a DII, sendo mais prevalente na colite ulcerativa (PRIDEAUX et al., 2012).

O diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes com DII dependem essencialmente de parâmetros clínicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos. A análise laboratorial é aditiva e acessória. Existem algumas limitações inerentes ao uso de métodos convencionais devido à presença de casos não classificáveis, caráter oneroso e invasivo. Os biomarcadores parecem po-

der dar resposta a essas limitações na medida em que fornecem dados reprodutíveis, quantitativos, rápidos e menos dispendiosos, sendo já utilizados na prática clínica no acompanhamento e diagnóstico das DII. Os anticorpos não são tão sensíveis no diagnóstico de DII, mas são importantes na diferenciação dos subtipos da doença. Talvez a importância maior seja a estratificação de pacientes de acordo com o risco para fenótipos agressivos e complicações associadas. Tal escore de risco, que integre marcador de resposta imune, características clínicas e também genéticas, poderia permitir a aplicação de estratégias terapêuticas personalizadas e melhor monitorização dos pacientes em risco. Os marcadores fecais, como a CF, pela especificidade ao trato gastrointestinal, revelam-se altamente úteis na diferenciação de DII e doenças gastrointestinais não inflamatórias com clara superioridade em relação a outros biomarcadores.

Melhorias nos estudos genômicos, proteômicos e metabolômicos têm facilitado a descoberta de novos biomarcadores. Essas descobertas são promissoras e podem abrir um novo caminho na etiopatogenia dessas doenças com conseqüente revolução no tratamento e acompanhamento dos pacientes com DII.

7.4 A IMPORTÂNCIA DOS BIOMARCADORES NA REUMATOLOGIA

Como descrito anteriormente, os biomarcadores são instrumentos importantes e de muito potencial para guiar o diagnóstico, manejo e tratamento das doenças. Suas inúmeras utilidades são ilustradas na Figura 7.3. No entanto, poucos biomarcadores foram adotados para a prática clínica da reumatologia e o cuidado com o paciente ainda está baseado principalmente na combinação da avaliação clínica tradicional e exames laboratoriais padrão (GIACOMELLI et al., 2019). O progresso no desenvolvimento de biomarcadores foi atrasado por inúmeros desafios inerentes às doenças reumáticas: heterogeneidade na fisiopatologia, curso da doença e resposta terapêutica; necessidade de procedimentos invasivos como biópsia sinovial, muscular e renal; origem multifatorial (LIN; COOLES; ISAACS, 2022). Os principais biomarcadores na reumatologia são descritos nas próximas seções.

7.4.1 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) se caracteriza por inflamação e destruição articular com evolução para limitação funcional, incapacidade laboral e redução da qualidade de vida. Tem uma prevalência mundial estimada de 0,8%

e frequência maior na população feminina (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

7.4.2 Biomarcadores para diagnóstico e prognóstico

A presença de autoanticorpos como o fator reumatoide (FR) e os anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA) são parte do critério diagnóstico da AR EULAR/ACR publicados em 2010 (ALETAHA et al., 2010). Pacientes que possuem FR positivo geralmente desenvolvem doença mais agressiva e maior impacto funcional. No entanto, isolado, não é suficiente para o diagnóstico, já que pode estar presente em 15% da população saudável em títulos baixos e essas proporções aumentam com a idade (CASTRO; GOURLEY, 2010). Da mesma forma, aqueles pacientes ACPA positivos desenvolvem mais erosões ósseas e maior progressão de doença. Esses anticorpos estão presentes muito tempo antes do aparecimento dos sintomas em pacientes com AR (SZODORAY et al., 2010).

7.4.3 Biomarcadores para monitoramento da doença

Biomarcadores como velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C-reativa são informativos sobre atividade de doença, mas individualmente não são suficientemente preditivos para serem utilizados para o processo de mudança terapêutica (SOKKA; PINCUS, 2009). A recomendação é a utilização de escores combinados (clínicos e laboratoriais) para monitorar a evolução da doença. Os escores combinados mais recomendados para uso na prática clínica para avaliação de atividade de doença são: *Clinical Disease Activity Index* (CDAI), *Simplified Disease Activity Index* (SDAI), *Disease Activity Score* (DAS) ou DAS com avaliação de 28 articulações (DAS28) (SMOLEN et al., 2016).

No sentido de reduzir a subjetividade dos escores, foi desenvolvido um painel de biomarcadores para monitoramento de atividade de doença da AR (CURTIS et al., 2012). O desenvolvimento deste algoritmo combina os níveis de 12 biomarcadores em um escore composto chamado MBDA (EGF, VEGF-A, leptina, IL-6, SAA, CRP, VCAM-1, MMP-1, MMP-3, TNFRI, *human cartilage glycoprotein 39* (YKL-40), e resistina). Recentemente uma revisão sistemática com metanálise encontrou correlação moderada entre o MBDA e o DAS-28 (JOHNSON et al., 2019). O produto está disponível comercialmente, mas sua custo-efetividade ainda permanece controversa.

7.4.4 Biomarcadores preditivos de resposta terapêutica

Esses biomarcadores permitiriam ao reumatologista avaliar a probabilidade de resposta antes de iniciar uma determinada terapia. Atualmente, 30 a 40% dos pacientes recebendo terapia biológica não respondem ao biológico prescrito. Além disso, esses tratamentos não são isentos de eventos adversos, como infecções oportunistas (CUPPEN et al., 2016).

A estratégia utilizada na prática clínica é prescrever o primeiro biológico; se a resposta for inadequada (sem redução da atividade de doença) nos primeiros 3 a 6 meses, esse biológico é trocado e o processo é repetido. Essa estratégia de erro e acerto não é eficiente no sentido de os pacientes manterem a doença em atividade e o risco potencial de dano articular irreversível. Ainda, temos que lembrar do custo associado a essas medicações. Portanto, uma estratégia mais refinada com utilização de biomarcadores na definição personalizada da melhor medicação para cada paciente é o cenário ideal (LIN; COOLES; ISAACS, 2022).

7.4.5 Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica multissistêmica com uma apresentação clínica bastante variada e manifestações que podem ser leves, graves e até fatais. A doença pode acometer múltiplos órgãos e sistemas como: musculoesquelético, mucocutâneo, cardiopulmonar, renal, neurológico e hematológico. A maioria dos pacientes com LES apresenta um padrão de doença com períodos de atividade clínica seguidos por intervalos de doença inativa, apesar de 20 a 30% apresentarem doença cronicamente ativa ou quiescente (TSELIOS et al., 2019).

Os biomarcadores que permitem a monitoração da atividade de doença, como VHS, PCR e frações do complemento C3 e C4, fornecem informações sobre a atividade de doença, mas não exibem utilidade preditiva suficiente para que seus resultados possam ser usados isoladamente. Títulos aumentados de anticorpos anti-DNA foram relacionados à exacerbação da doença, incluindo doença renal, embora com resultados heterogêneos, e são considerados modestamente preditivos (FU et al., 2015).

Na prática clínica são utilizados escores combinados clínicos e laboratoriais para melhor avaliação da atividade de doença: *SLE Disease Activity Index* (SLEDAI) (BOMBARDIER et al., 1992), *British Isles Lupus Assessment Group Index 2004* (BILAG 2004) (ISENBERG et al., 2005) e *Safety of Estrogens in Lupus National Assessment* (SELENA-SLEDAI) (PETRI et al., 2005) são utilizados com maior frequência. Inúmeros novos biomarcadores

estão em estudo atualmente, em março de 2023, mas nenhum ainda validado para prática clínica.

Biópsias renais seriadas para o diagnóstico inicial e subsequente monitoramento da nefrite lúpica são o método ouro, mas permanecem um desafio em muitos centros além do inconveniente de ser um procedimento invasivo. Portanto, biomarcadores não invasivos são absolutamente necessários.

Moléculas de adesão celular (CAMs, do inglês *cell adhesion molecules*) são mediadores importantes do processo inflamatório e participam da transmigração leucocitária através do endotélio dos tecidos afetados interagindo com as integrinas expressas nas superfícies dos leucócitos. Entre elas, *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) e molécula de adesão de células de leucócitos ativada (ALCAM, do inglês *activated leukocyte cell adhesion molecule*) são os biomarcadores mais estudados e relacionados a nefrite lúpica (PARODIS et al., 2020; SINGH et al., 2012). ALCAM, PF4 e VCAM-1 urinários foram identificados como biomarcadores em potencial para predição de atividade de doença em LES juvenil, ALCAM sendo o melhor preditor isoladamente (SOLIMAN et al., 2022). Em um estudo fase 3 que incluiu 321 pacientes com nefrite, a combinação de quatro biomarcadores: adiponectina, MCP-1, sVCAM-1, e PF4, teve o maior valor preditivo para detecção de nefrite proliferativa ativa (WHITTALL-GARCIA et al., 2022).

Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) é uma pequena glicoproteína cuja expressão é suprarregulada em várias condições patológicas, incluindo doenças renais inflamatórias. NGAL urinário demonstrou ser um biomarcador versátil em estudos de nefrite lúpica (GAO et al., 2020) e também demonstrou boa habilidade diagnóstica em duas coortes independentes, onde foram identificados níveis urinários mais elevados em pacientes com nefrites quando comparados àqueles pacientes com LES sem acometimento renal (GÓMEZ-PUERTA et al., 2018; LI et al., 2019).

Destaca-se, entre os novos biomarcadores estudados para nefrite lúpica, o CD163. Esse marcador de membrana do macrófago está aumentado em regiões de injúria tubular e glomerular, enquanto tem uma função fisiológica de reparação tecidual e pode ser importante na formação de crescentes e fibrose intersticial (MEJIA-VILET et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Em dois estudos, CD163 urinário demonstrou ser um preditor confiável de doença renal proliferativa, distinguindo entre pacientes com e sem nefrite proliferativa (ENDO et al., 2016; GAO et al., 2020). Quando avaliado em coortes independentes, teve habilidade de discriminar entre pacientes com nefrite lúpica ativa, inativa e LES não renal (FAVA et al., 2022).

Em relação às manifestações do sistema neuropsiquiátrico (NPSLE), o desafio permanece na distinção

entre as inúmeras manifestações do sistema NPSLE relacionadas ou não a doença de base e fundamenta-se em investigação multidisciplinar, laboratorial e neuroimagem para excluir possíveis outras causas. A associação entre o anticorpo anti-p ribossomal foi recentemente corroborada em metanálise especialmente para o envolvimento do sistema nervoso central difuso como psicose (CHOI et al., 2020).

Biomarcadores para manifestações NPSLE são obtidos através do sangue ou líquido cefalorraquidiano (CSF). Dos novos biomarcadores, vale destacar os anticorpos contra o receptor N-metil-D-aspartato (anti-NMDAR) no CSF, que estão associados com manifestações NPSLE como estado confusional agudo, distúrbios da ansiedade, distúrbios do humor e psicose, também conseguindo distinguir entre pacientes com manifestações centrais e periféricas (ARINUMA; YANAGIDA; HIROHATA, 2008).

É pouco provável que um único marcador seja adequado para capturar todas as nuances das diferentes manifestações do LES. Seria mais concebível a criação de painéis acessíveis que fornecessem informação confiável sobre atividade de doença, envolvimento de órgão específico e predição de resposta ao tratamento. A Figura 7.3 mostra um panorama da utilização dos biomarcadores e sua utilização em seus respectivos estágios de evolução das doenças reumatológicas.

7.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos 10 anos, a tecnologia teve um grande impacto no diagnóstico, na terapia e ajudou na tomada

de decisão terapêutica na área de doenças complexas. O acesso aos dados genômicos apoiaram e fomentaram o grande avanço na identificação de biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico, preditivos e farmacodinâmicos; e ainda no suporte na tomada de decisão terapêutica. A medicina personalizada evoluiu e tem bases sólidas para continuar esse crescimento em escala logarítmica. Neste capítulo, os principais pontos fortes foram destacados, mas novos problemas surgem neste cenário. Quais são os obstáculos para que todos os pacientes diagnosticados com doenças complexas usem painéis moleculares para orientar o atendimento ao paciente? O que precisa ser feito nos próximos 10 anos para isso se tornar uma realidade? Especialmente em países de renda média-baixa, a resposta para essas perguntas está longe de ser alcançada. É urgente discutir a acessibilidade de novos tratamentos e painéis moleculares de diagnóstico. Como é possível implementar tratamentos caros como a imunoterapia na prática clínica? Por exemplo, o *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) aumentou em 11% o acesso a terapias direcionadas em ensaios clínicos, devido à alta eficácia na identificação molecular de populações enriquecidas, ou seja, identificar através de biomarcadores os pacientes que poderiam se beneficiar de tratamentos específicos. A presença de um programa de triagem universal será útil para abordar essas questões. Os próximos 10 anos serão necessários para o avanço do desenvolvimento científico e tecnológico, mas as discussões econômicas e políticas precisam andar na mesma velocidade, só assim, então, os próximos 10 anos serão frutíferos para os pacientes.

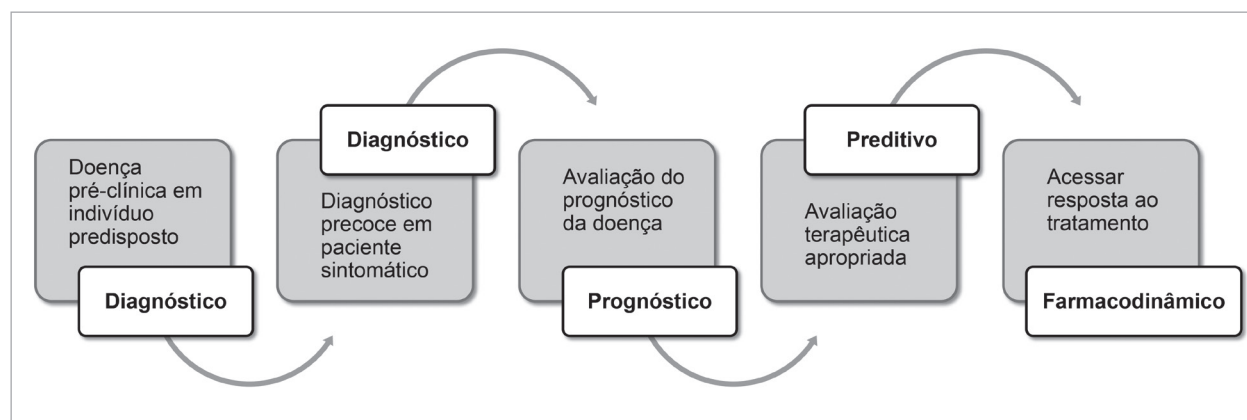


FIGURA 7.3 Utilização dos biomarcadores em diferentes estágios de evolução das doenças reumatológicas. Fonte: elaborada com base em Robinson e Mao (2016).

REFERÊNCIAS

1. AASLD. **Department of Health and Human Services (DHHS). Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents living with HIV.** Disponível em: <<https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv/0>>. Acesso em: 22 jun. 2023.
2. AHMADI, H. et al. Precystectomy serum levels of carbohydrate antigen 19-9, carbohydrate antigen 125, and carcinoembryonic antigen: Prognostic value in invasive urothelial carcinoma of the bladder. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 5, p. 648–656, jul. 2014.
3. ALARD, E. et al. Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1826, 7 jul. 2020.
4. ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 9, p. 1580–1588, 1 set. 2010.
5. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetes Care. **Diabetes Care**, v. 39, n. Supplement_1, p. S1–S2, 1 jan. 2016.
6. ARINUMA, Y.; YANAGIDA, T.; HIROHATA, S. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 4, p. 1130–1135, abr. 2008.
7. BALAR, A. V. et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **The Lancet**, v. 389, n. 10064, p. 67–76, jan. 2017.
8. BALLMAN, K. V. Biomarker: Predictive or Prognostic? **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 33, p. 3968–3971, 20 nov. 2015.
9. BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 6, p. 630–640, jun. 1992.
10. BUNN, S. K. et al. Fecal Calprotectin: Validation as a Noninvasive Measure of Bowel Inflammation in Childhood Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 14–22, jul. 2001.
11. BUYSE, M. et al. Biomarkers and surrogate end points – the challenge of statistical validation. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 6, p. 309–317, 6 jun. 2010.
12. CAGNEY, D. N. et al. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. 9, p. 1162–1172, 2 ago. 2018.
13. CARROCCIO, A. et al. Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin Assay in Distinguishing Organic Causes of Chronic Diarrhea from Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Study in Adults and Children. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 861–867, 1 jun. 2003.
14. CASTRO, C.; GOURLEY, M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S238–S247, fev. 2010.
15. CHIANG, S. et al. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 42, n. 6, p. 791–798, jun. 2018.
16. CHOI, M. Y. et al. A review and meta-analysis of anti-ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 3, p. 102463, mar. 2020.
17. CHOU, A. et al. NTRK gene rearrangements are highly enriched in MLH1/PMS2 deficient, BRAF wild-type colorectal carcinoma – a study of 4569 cases. **Modern Pathology**, v. 33, n. 5, p. 924–932, maio 2020.
18. COLOMBEL, J.-F.; MAHADEVAN, U. Inflammatory Bowel Disease 2017: Innovations and Changing Paradigms. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 309–312, jan. 2017.
19. COOREVITS, L.; BAERT, F. J.; VANPOUCKE, H. J. M. Faecal calprotectin: comparative study of the Quantum Blue rapid test and an established ELISA method. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 51, n. 4, p. 825–831, 1 abr. 2013.
20. CUPPEN, B. V. J. et al. Personalized biological treatment for rheumatoid arthritis: a systematic review with a focus on clinical applicability. **Rheumatology**, v. 55, n. 5, p. 826–839, maio 2016.
21. CURTIS, J. R. et al. Validation of a novel multibiomarker test to assess rheumatoid arthritis disease activity. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 12, p. 1794–1803, 28 dez. 2012.
22. DANESE, S.; FIOCCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 30, p. 4807, 2006.
23. DAVIS, J. L. et al. Infantile NTRK -associated Mesenchymal Tumors. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 21, n. 1, p. 68–78, 6 jan. 2018.
24. DE BOECK, K.; VERMEULEN, F.; DUPONT, L. The diagnosis of cystic fibrosis. **La Presse Médicale**, v. 46, n. 6, p. e97–e108, jun. 2017.
25. DE S. B. FRÓES, R. et al. The socio-economic impact of work disability due to inflammatory bowel disease in Brazil. **The European Journal of Health Economics**, v. 19, n. 3, p. 463–470, 18 abr. 2018.
26. DELMAN, G. M.; GALLY, J. A. THE NATURE OF BENCE-JONES PROTEINS. **Journal of Experimental Medicine**, v. 116, n. 2, p. 207–227, 1 ago. 1962.
27. DOLWANI, S. et al. Diagnostic accuracy of faecal calprotectin estimation in prediction of abnormal small bowel radiology. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 6, p. 615–621, set. 2004.
28. DURMOWICZ, A. G. et al. Change in Sweat Chloride as a Clinical End Point in Cystic Fibrosis Clinical Trials. **Chest**, v. 143, n. 1, p. 14–18, jan. 2013.
29. D'HAENS, G. et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 12, p. 2218–2224, dez. 2012.
30. ENDO, N. et al. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 12, p. 2023–2033, dez. 2016.
31. FAVA, A. et al. Urine Proteomics and Renal Single-Cell Transcriptomics Implicate Interleukin-16 in Lupus Nephritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 74, n. 5, p. 829–839, 16 maio 2022.
32. FDA. **Table of Surrogate Endpoints That Were the Basis of Drug Approval or Licensure.** Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/development-resources/table-surrogate-endpoints-were-basis-drug-approval-or-licensure>>. Acesso em: 14 set. 2022.
33. FEHRENBACHER, L. et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 387, n. 10030, p. 1837–1846, abr. 2016.
34. FITZGIBBONS, P. L.; CONNOLLY, J. L. **Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens from Patients with Carcinoma of the Breast.** Disponível em: <https://documents.cap.org/protocols/Breast.Bmk_1.5.0.0.REL_CAPCP.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2023.

35. FU, S. M. et al. Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus. **F1000Research**, v. 4, p. 939, 1 out. 2015.
36. GALHARDI GASPARINI, R.; SASSAKI, L. Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. Volume 11, p. 423–429, out. 2018.
37. GAO, Y. et al. Elevated Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a Biomarker for Lupus Nephritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–18, 30 jun. 2020.
38. GARG, M. et al. Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, n. 5, p. 631–636, set. 2017.
39. GIACOMELLI, R. et al. Guidelines for biomarkers in autoimmune rheumatic diseases – evidence based analysis. **Autoimmunity Reviews**, v. 18, n. 1, p. 93–106, jan. 2019.
40. GOMES, T. N. F. et al. Clinical and Demographic Profile of Inflammatory Bowel Disease Patients in a Reference Center of São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. Volume 14, p. 91–102, mar. 2021.
41. GÓMEZ-PUERTA, J. A. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and monocyte chemoattractant protein 1 as biomarkers for lupus nephritis in Colombian SLE patients. **Lupus**, v. 27, n. 4, p. 637–646, 26 abr. 2018.
42. GONG, Y.; GILCREASE, M.; SNEIGE, N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. **Modern Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1015–1021, ago. 2005.
43. GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 1, p. 55–62, 1 jan. 2011.
44. HALL, C. et al. A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. **Annals of Coloproctology**, v. 35, n. 6, p. 294–305, 31 dez. 2019.
45. HANNA, W. M.; KWOK, K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. **Modern Pathology**, v. 19, n. 4, p. 481–487, mar. 2006.
46. HECHTMAN, J. F. et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 41, n. 11, p. 1547–1551, nov. 2017.
47. HECKMAN-STODDARD, B. M. Oncology Biomarkers: Discovery, Validation, and Clinical Use. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 28, n. 2, p. 93–98, maio 2012.
48. HEIDA, A. et al. Agreement Between Home-Based Measurement of Stool Calprotectin and ELISA Results for Monitoring Inflammatory Bowel Disease Activity. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 11, p. 1742–1749.e2, nov. 2017.
49. HOLBROOK, A. et al. Evidence-Based Management of Anticoagulant Therapy. **Chest**, v. 141, n. 2, p. e152S–e184S, fev. 2012.
50. HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 677–736, mar. 2001.
51. HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 609–642, jun. 2003.
52. HULKA, B. S.; WILCOSKY, T. Biological Markers in Epidemiologic Research. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 43, n. 2, p. 83–89, abr. 1988.
53. HUNG, Y. P.; FLETCHER, C. D. M.; HORNICK, J. L. Evaluation of pan-TRK immunohistochemistry in infantile fibrosarcoma, lipofibromatosis-like neural tumour and histological mimics. **Histopathology**, v. 73, n. 4, p. 634–644, out. 2018.
54. ILARIA, G. et al. Clinical adoption of Nephrocheck® in the early detection of acute kidney injury. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 58, n. 1, p. 6–15, 17 jan. 2021.
55. INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931–945, out. 2004.
56. ISENBERG, D. A. et al. BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 44, n. 7, p. 902–906, 1 jul. 2005.
57. JAMES, P. A. et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults. **JAMA**, v. 311, n. 5, p. 507, 5 fev. 2014.
58. JAMESON, E.; JONES, S.; REMMINGTON, T. Enzyme replacement therapy with laronidase (Aldurazyme®) for treating mucopolysaccharidosis type I. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 1 abr. 2016.
59. JOHNSON, T. M. et al. Correlation of the Multi-Biomarker Disease Activity Score With Rheumatoid Arthritis Disease Activity Measures: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Arthritis Care & Research**, v. 71, n. 11, p. 1459–1472, 29 nov. 2019.
60. KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 313–321.e2, jan. 2017.
61. KHOMIAK, A. et al. Recent Discoveries of Diagnostic, Prognostic and Predictive Biomarkers for Pancreatic Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3234, nov. 2020.
62. KIANG, D. T. Tamoxifen (Antiestrogen) Therapy in Advanced Breast Cancer. **Annals of Internal Medicine**, v. 87, n. 6, p. 687, 1 dez. 1977.
63. KIM, J. J. et al. The Significance of Serum Carcinoembryonic Antigen in Lung Adenocarcinoma. **The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 48, n. 5, p. 335–344, 5 out. 2015.
64. KOTZE, P. G. et al. Review of the epidemiology and burden of ulcerative colitis in Latin America. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 13, p. 175628482093173, 9 jan. 2020.
65. LI, Y.-J. et al. Polyomavirus BK, BKV microRNA, and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin can be used as potential biomarkers of lupus nephritis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210633, 14 jan. 2019.
66. LIAO, G. J. et al. 18 F-Fluoroestradiol PET: Current Status and Potential Future Clinical Applications. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 8, p. 1269–1275, ago. 2016.
67. LIN, C. M. A.; COOLES, F. A. H.; ISAACS, J. D. Precision medicine: the precision gap in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 18, n. 12, p. 725–733, 10 dez. 2022.
68. LULEY, K. et al. Local calprotectin production in colorectal cancer and polyps – active neutrophil recruitment in carcinogenesis. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 26, n. 5, p. 603–607, 5 maio 2011.

69. MAIDEN, L. et al. A Quantitative Analysis of NSAID-Induced Small Bowel Pathology by Capsule Enteroscopy. **Gastroenterology**, v. 128, n. 5, p. 1172–1178, maio 2005.
70. MAYEUX, R. Biomarkers: Potential uses and limitations. **NeuroRX**, v. 1, n. 2, p. 182–188, abr. 2004.
71. MEJIA-VILET, J. M. et al. Urinary Soluble CD163: a Novel Non-invasive Biomarker of Activity for Lupus Nephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 31, n. 6, p. 1335–1347, jun. 2020.
72. METAFUNI, E. et al. Fecal but not serum calprotectin is a potential marker of GVHD after stem cell transplantation. **Annals of Hematology**, v. 96, n. 6, p. 929–933, 14 jun. 2017.
73. MOLINA-MONTES, E. et al. Cumulative risk of second primary contralateral breast cancer in BRCA1/BRCA2 mutation carriers with a first breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **The Breast**, v. 23, n. 6, p. 721–742, dez. 2014.
74. MORSCHHAUSER, F. et al. On-Target Pharmacodynamic Activity of the PI3K Inhibitor Copanlisib in Paired Biopsies from Patients with Malignant Lymphoma and Advanced Solid Tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 468–478, 1 fev. 2020.
75. MOSLI, M. H. et al. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 6, p. 802–819, jun. 2015.
76. MUHLEMANN, K.; COOK, L. S.; WEISS, N. S. The incidence of hepatocellular carcinoma in US white women with breast cancer after the introduction of tamoxifen in 1977. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 30, n. 2, p. 201–204, 1994.
77. PAKDEL, A.; MALEKZADEH, M.; NAGHIBALHOSSAINI, F. The association between preoperative serum CEA concentrations and synchronous liver metastasis in colorectal cancer patients. **Cancer Biomarkers**, v. 16, n. 2, p. 245–252, 23 fev. 2016.
78. PALUCH-SHIMON, S. et al. High efficacy of pre-operative trastuzumab combined with paclitaxel following doxorubicin & cyclophosphamide in operable breast cancer. **Acta Oncologica**, v. 47, n. 8, p. 1564–1569, 8 jan. 2008.
79. PANES, J.; JAIRATH, V.; LEVESQUE, B. G. Advances in Use of Endoscopy, Radiology, and Biomarkers to Monitor Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 362–373, e3, jan. 2017.
80. PARENTE, J. M. L. Inflammatory bowel disease in an under-developed region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1197, 2015.
81. PARODIS, I. et al. ALCAM and VCAM-1 as urine biomarkers of activity and long-term renal outcome in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 59, n. 9, p. 2237–2249, 1 set. 2020.
82. PATHIRANA, W. G. W. et al. Faecal Calprotectin. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 39, n. 3, p. 77–90, ago. 2018.
83. PENAULT-LLORCA, F. et al. Emerging Technologies for Assessing HER2 Amplification. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, n. 4, p. 539–548, 1 out. 2009.
84. PETRI, M. et al. Combined Oral Contraceptives in Women with Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 24, p. 2550–2558, 15 dez. 2005.
85. PRIDEAUX, L. et al. Serological Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1340–1355, jul. 2012.
86. RAMPHAL, W. et al. Serum carcinoembryonic antigen to predict recurrence in the follow-up of patients with colorectal cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 34, n. 1, p. 60–68, 11 mar. 2019.
87. ROBINSON, W. H.; MAO, R. Biomarkers to guide clinical therapeutics in rheumatology? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 28, n. 2, p. 168–175, mar. 2016.
88. ROKKAS, T.; PORTINCASA, P.; KOUTROUBAKIS, I. E. Fecal Calprotectin in Assessing Inflammatory Bowel Disease Endoscopic Activity: a Diagnostic Accuracy Meta-analysis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 27, n. 3, p. 299–306, 30 set. 2018.
89. RØSETH, A. G. et al. Assessment of the Neutrophil Dominating Protein Calprotectin in Feces: A Methodologic Study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 9, p. 793–798, 8 jan. 1992.
90. RUDZINSKI, E. R. et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 42, n. 7, p. 927–935, jul. 2018.
91. RUMP, J. A. et al. A New Type of Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody (p-ANCA) in Active Ulcerative Colitis but not in Crohn's Disease. **Immunobiology**, v. 181, n. 4–5, p. 406–413, nov. 1990.
92. SACHAN, A. et al. Raised CA19–9 and CEA have prognostic relevance in gallbladder carcinoma. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 826, 31 dez. 2020.
93. SENGER, P. C. et al. Inflammatory bowel disease epidemiology data from a prospective registry in Córdoba, Argentina: Raising the bar for future studies in Latin America. **Digestive and Liver Disease**, v. 53, n. 9, p. 1212–1213, set. 2021.
94. SHAH, S. P. et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 809–813, out. 2009.
95. SHANAFELT, T. D. et al. Ibrutinib–Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 5, p. 432–443, 1 ago. 2019.
96. SHASTRI, Y. M. et al. Prospective Multicenter Study Evaluating Fecal Calprotectin in Adult Acute Bacterial Diarrhea. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 12, p. 1099–1106, dez. 2008.
97. SINGH, S. et al. Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 4, p. R164, 2012.
98. SMITH, J. J.; DUNN, B. K. Biomarkers as Molecular Targets of Drug Interventions. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 28, n. 2, p. 109–115, maio 2012.
99. SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 1, p. 3–15, jan. 2016.
100. SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, out. 2016.
101. SOKKA, T.; PINCUS, T. Erythrocyte Sedimentation Rate, C-Reactive Protein, or Rheumatoid Factor Are Normal at Presentation in 35%–45% of Patients with Rheumatoid Arthritis Seen Between 1980 and 2004: Analyses from Finland and the United States. **The Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 7, p. 1387–1390, jul. 2009.
102. SOLIMAN, S. A. et al. Urine ALCAM, PF4 and VCAM-1 Surpass Conventional Metrics in Identifying Nephritis Disease Activity

- in Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 26 maio 2022.
103. SOLOMON, J. P. et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. **Modern Pathology**, v. 33, n. 1, p. 38–46, jan. 2020.
 104. STOHL, W.; HILBERT, D. M. The discovery and development of belimumab: the anti-BLyS–lupus connection. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 69–77, 9 jan. 2012.
 105. STONE, N. J. et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 25, p. 2889–2934, jul. 2014.
 106. STRAVITZ, R. T.; LEE, W. M. Acute liver failure. **The Lancet**, v. 394, n. 10201, p. 869–881, set. 2019.
 107. STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010.
 108. SUBRAMANIAN, A.; MOKBEL, K. The role of Herceptin in early breast cancer. **International Seminars in Surgical Oncology**, v. 5, n. 1, p. 9, 28 dez. 2008.
 109. SZODORAY, P. et al. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 3, p. 140–143, jan. 2010.
 110. TILLI, T. M. Precision Medicine: Technological Impact into Breast Cancer Diagnosis, Treatment and Decision Making. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 12, p. 1348, 10 dez. 2021.
 111. TØN, H. et al. Improved assay for fecal calprotectin. **Clinica Chimica Acta**, v. 292, n. 1–2, p. 41–54, fev. 2000.
 112. TOYONAGA, T. et al. Usefulness of fecal calprotectin for the early prediction of short-term outcomes of remission-induction treatments in ulcerative colitis in comparison with two-item patient-reported outcome. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185131, 21 set. 2017.
 113. TSELIOS, K. et al. Disease course patterns in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 28, n. 1, p. 114–122, 8 jan. 2019.
 114. TURKDOGAN, S. et al. Carcinoembryonic antigen levels correlated with advanced disease in medullary thyroid cancer. **Journal of Otolaryngology – Head & Neck Surgery**, v. 47, n. 1, p. 55, 17 dez. 2018.
 115. TURSI, A. et al. Accuracy of Rapid Fecal Calprotectin Test in Monitoring Inflammatory Bowel Diseases Under Treatment with TNF α Antagonists. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 5, p. 1406–1413, 2 maio 2015.
 116. UYGUR, M. M.; GÜMÜŞ, M. The utility of serum tumor markers CEA and CA 15–3 for breast cancer prognosis and their association with clinicopathological parameters. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 28, p. 100402, 2021.
 117. VAN DE VIJVER, M. et al. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. R68, 8 out. 2007.
 118. VAN DER KAAIJ, R. T. et al. Elevated Pretreatment CEA and CA19–9 Levels are Related to Early Treatment Failure in Esophageal Adenocarcinoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 42, n. 4, p. 345–350, abr. 2019.
 119. VASILIAUSKAS, E. A. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 487–496, 1 out. 2000.
 120. VIANI, G. A. et al. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. **BMC Cancer**, v. 7, n. 1, p. 153, 8 dez. 2007.
 121. VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. DE C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, mar. 2009.
 122. VIEIRA, A. et al. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 1, p. 221, 2009.
 123. WALLACE, J. L. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 12, p. 1861, 2013.
 124. WANG, K. et al. The significance of preoperative serum carcinoembryonic antigen levels in the prediction of lymph node metastasis and prognosis in locally advanced gastric cancer: a retrospective analysis. **BMC Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 100, 10 dez. 2020.
 125. WHITTALL-GARCIA, L. et al. Identification and Validation of a Urinary Biomarker Panel to Accurately Diagnose and Predict Response to Therapy in Lupus Nephritis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 30 maio 2022.
 126. XU, R. et al. Amplification of Her-2/neu Gene in Her-2/neu-Overexpressing and -Nonexpressing Breast Carcinomas and Their Synchronous Benign, Premalignant, and Metastatic Lesions Detected by FISH in Archival Material. **Modern Pathology**, v. 15, n. 2, p. 116–124, fev. 2002.
 127. YANG, Z.; CLARK, N.; PARK, K. T. Effectiveness and Cost-effectiveness of Measuring Fecal Calprotectin in Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Adults and Children. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 2, p. 253–262, e2, fev. 2014.
 128. YUN, X.; ZHANG, Y.; WANG, X. Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia. **Biomarker Research**, v. 8, n. 1, p. 40, 7 dez. 2020.
 129. ZHANG, T. et al. Association of Urine sCD163 With Proliferative Lupus Nephritis, Fibrinoid Necrosis, Cellular Crescents and Intrarenal M2 Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 15 abr. 2020.
 130. ZHANG, W. et al. Cost-effectiveness of faecal calprotectin used in primary care in the diagnosis of inflammatory bowel disease. **BMJ Open**, v. 9, n. 4, p. e027043, 14 abr. 2019.
 131. ZHAO, J. et al. Determination of HER2 Gene Amplification by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) in Archival Breast Carcinoma. **Modern Pathology**, v. 15, n. 6, p. 657–665, jun. 2002.

Parte IV

Biotecnologia em biofármacos

Introdução da biotecnologia em biofármacos

Aline de Almeida Oliveira

Carla Lemos Gottgroy

Amanda de Miranda Marques

Este capítulo apresenta uma visão ampla sobre a biotecnologia em biofármacos e seu papel na saúde pública, em particular na atividade de tratamento medicamentoso. Além disso, aborda a contribuição da biotecnologia para o desenvolvimento tecnológico na área. O capítulo inicia pela apresentação da definição e histórico dos biofármacos no mundo e no Brasil. Avança pela classificação dos biofármacos (anticorpos, proteínas recombinantes, DNA e RNA e terapia celular), seguida pela descrição dos processos de pesquisa, desenvolvimento e produção. De maneira subsequente, aborda o papel da biotecnologia no desenvolvimento destes processos e finaliza apontando direcionamentos futuros.

8.1 BIOTECNOLOGIA EM BIOFÁRMACOS: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO

Segundo a ONU, “*biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica*” (MMA, 2000). A biotecnologia, em termos gerais, pode ser entendida como a engenharia de organismos para uso humano. Embora não seja conhecida por este nome, vem sendo utilizada há séculos para gerar produtos (Figura 8.1). Conforme referenciado no Capítulo 3, a biotecnologia existe desde a antiguidade e suas formas mais primitivas são o cultivo de plantas e a domesticação de animais, que se iniciaram 10.000 anos atrás. Posteriormente, iniciaram-se os processos de fermentação, em que microrganismos são utilizados para gerar produtos como queijos, vinhos, cervejas e outras bebidas alcoólicas. A primeira evidência científica para fermentação foi descrita por Pasteur no final do século XVII. Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA por

Watson e Crick; e o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante ocorreu nos anos 1970. A biotecnologia médica ou biotecnologia vermelha revolucionou o tratamento de diversas doenças, e os primeiros produtos biotecnológicos para a saúde foram aprovados na década de 1980 (BHATIA, 2018).

A aplicação da tecnologia do DNA recombinante transformou a indústria farmacêutica, levando a identificação mais precisa de alvos terapêuticos, redução de efeitos adversos e tratamento de novas doenças. Na biotecnologia moderna o princípio ativo do medicamento é obtido por meio do emprego industrial de células ou organismos modificados geneticamente (MEIRELLES et al., 2020). O bioprocesso é uma parte crucial da biotecnologia e envolve diversas tecnologias diferentes. Acredita-se que, na próxima década, mais de 50% de todos os medicamentos em desenvolvimento serão biofármacos (JOZALA et al., 2016).

A partir da década de 1990, as indústrias farmacêuticas aumentaram os investimentos nos produtos biológicos, o que gerou um aumento significativo do

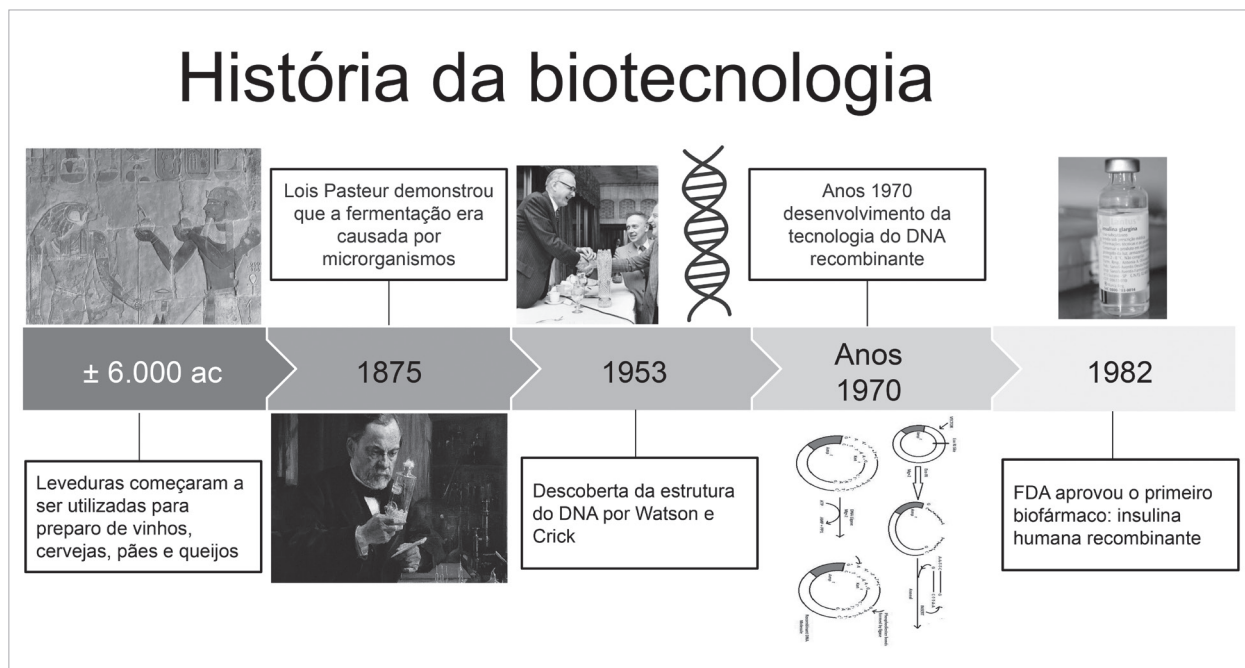


FIGURA 8.1 História da biotecnologia desde a antiguidade até a aprovação do primeiro biofármaco em 1982. Fonte: elaborada pelos autores (2023) utilizando elementos da Wikimedia licenciados com Creative Commons.

volume de produtos lançados no mercado (Figura 8.2). Essa mudança de foco de moléculas pequenas sintéticas para produtos biológicos ocorreu por diversos motivos. Entre eles destaca-se a dificuldade de trazer novas drogas sintéticas ao mercado por um aumento da regulação e a expiração de patentes, que gerou um aumento na competição com a chegada dos genéricos (WANG; SINGH, 2013).

Os produtos biológicos são uma das classes de medicamentos de crescimento mais rápido da indústria farmacêutica. O último levantamento mostra 374 biofármacos aprovados no mundo, contendo 285 distintos ingredientes farmacêuticos ativos (IFA). Este mercado vem evoluindo cada vez mais rápido. No quadriênio entre 2014 e 2018 foram aprovados 155 biofármacos, dos quais 129 novas IFA, ou seja, quase metade do total de biofármacos existentes em apenas 4 anos (WALSH, 2018).

Biofármacos, ou produtos biológicos, são substâncias ativas derivadas de organismos vivos ou produzidos utilizando biotecnologia e são compostos por entidades biológicas como proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos ou células. Os biológicos tradicionais que chegaram ao mercado incluem vacinas e fatores sanguíneos. O termo biofármacos surgiu nos anos 1980 para designar produtos obtidos por técnicas modernas de biotecnologia como proteínas recombinantes e vacinas. Em contraste com as drogas sintéticas, os produtos biológicos são complexos e, geralmente, manufaturados por organismos vivos e compostos por proteínas, peptídeos

ou materiais genéticos. Existem diversas definições para produtos biológicos, podendo variar por agência regulatória (TORRES-OBREQUE et al., 2022; WANG; SINGH, 2013).

Os biofármacos movimentam cerca de US\$ 300 bilhões em vendas. Em 2018, o mercado global de anticorpos monoclonais (uma das principais categorias de biofármacos) foi avaliado em US\$ 115,2 bilhões e a expectativa é que alcance US\$ 300 bilhões em 2025. Por exemplo, dos 10 produtos farmacêuticos mais vendidos de 2022, 7 são biofármacos (Figura 8.3) (CARRARA et al., 2021; EVALUATE, 2020; URQUHART, 2022).

Entre os dez produtos farmacêuticos com maior faturamento apenas Revlimid, Eliquis e Biktarvy são moléculas pequenas (Figura 8.3). Todos os outros são produtos biológicos, incluindo vacinas de mRNA para Covid-19, anticorpos monoclonais terapêuticos e proteínas de fusão.

8.2 CLASSIFICAÇÕES DE BIOFÁRMACOS

O avanço da biotecnologia moderna trouxe novas classes, como os anticorpos monoclonais (mAbs), proteínas de fusão Fc, terapias de RNA e terapias celulares (WANG; SINGH, 2013). Assim, a Figura 8.4 resume as principais classes de biofármacos que serão abordadas ao longo deste livro.

As próximas seções caracterizam as principais classes de biofármacos, iniciando pelas proteínas recombinantes.

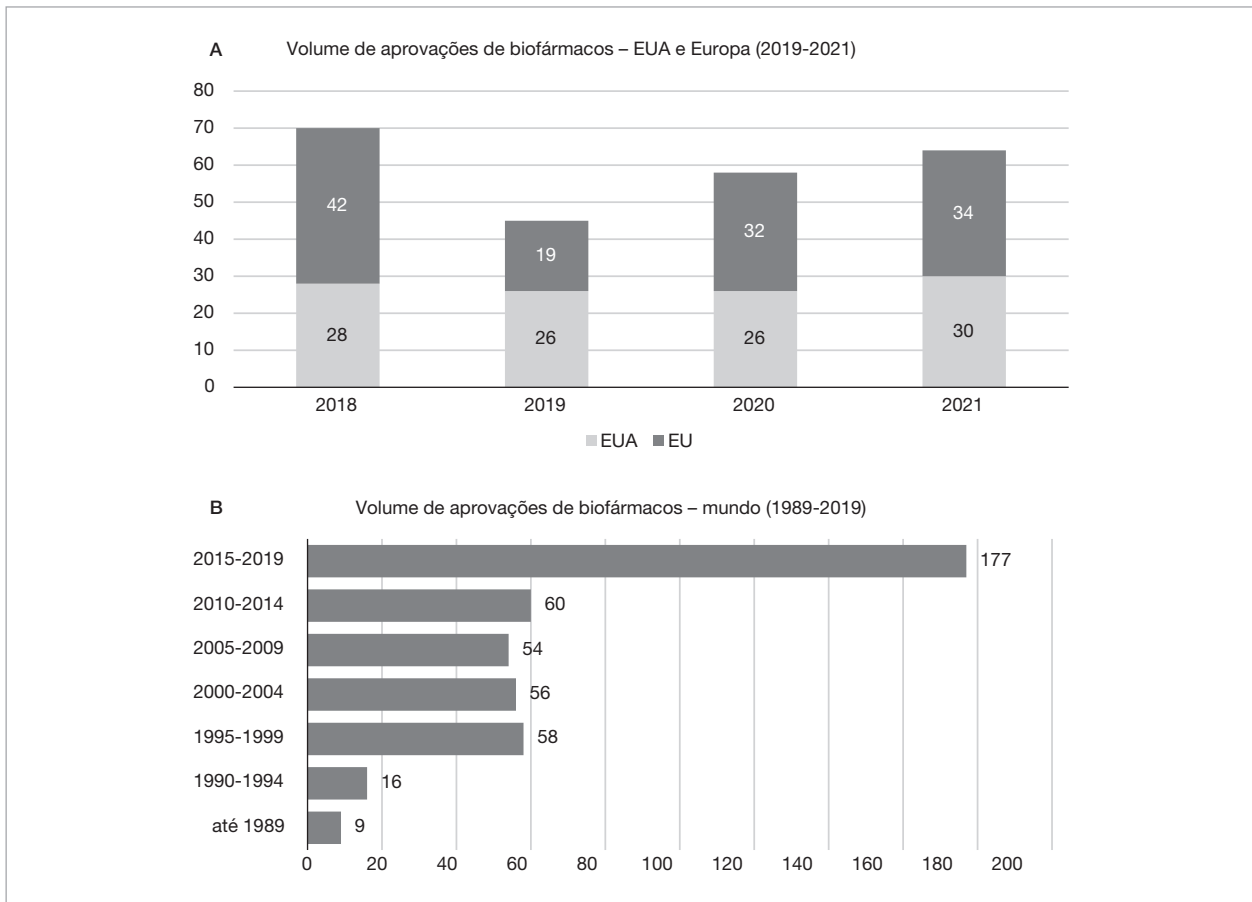


FIGURA 8.2 Volume de biofármacos aprovados.

Fonte: Walsh e Walsh (2022).

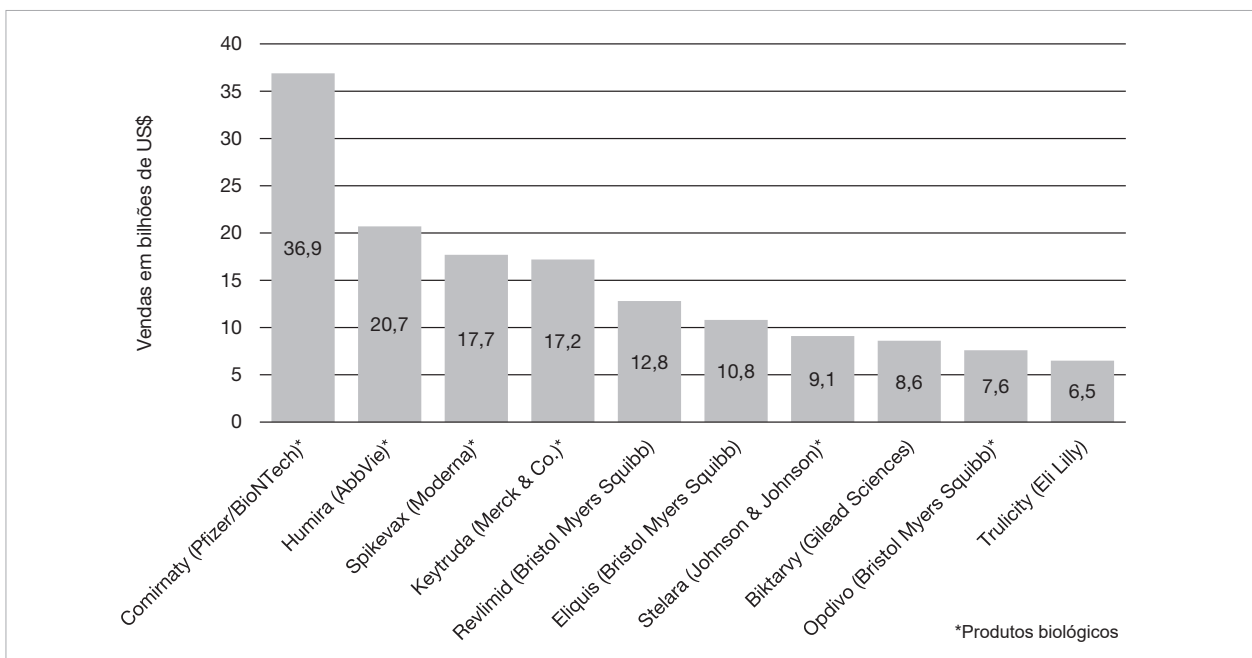


FIGURA 8.3 Os 10 produtos farmacêuticos com maior faturamento em 2021.

Fonte: adaptada de Urquhart (2022).

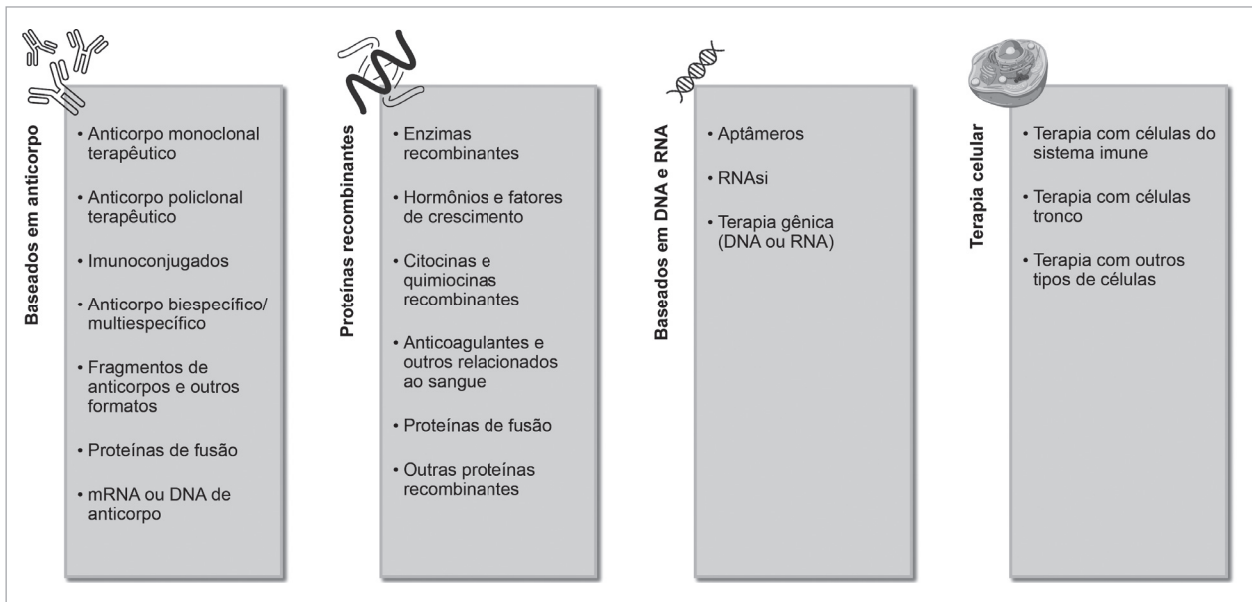


FIGURA 8.4 Principais classes de biofármacos.

Fonte: elaborada pelas autoras (2023); canva.com.

8.2.1 Proteínas recombinantes

A classe mais tradicional de biofármacos são as proteínas recombinantes, e serão discutidas com maior profundidade no Capítulo 9. O primeiro biofármaco aprovado foi a insulina, em 1982. Na década de 1980 o foco da indústria farmacêutica eram proteínas recombinantes que são versões recombinantes de moléculas humanas endógenas (p. ex., hormônios, citocinas e enzimas). Esse primeiro grupo de biológicos trouxe grande impacto à medicina humana.

A descoberta da insulina foi um marco, na medida em que revolucionou verdadeiramente a terapia e o prognóstico do diabetes. Esta é uma das doenças mais estudadas na história da medicina. Tendo a era pré-insulina se caracterizado pelos esforços de controle do diabetes por meio de tratamentos farmacológicos insólitos, como o uso de ópio ou intervenções dietéticas com base na convicção de que pacientes diabéticos deveriam se submeter a dietas hipercalóricas prescritas para combater a perda urinária de calorias. Conforme se avançava no entendimento da anatomia e fisiologia pancreáticas, surgiam os primeiros extratos que utilizavam macerados pancreáticos de animais que, quando administrados aos pacientes, conferiam alguma melhora dos sintomas. Em 1921, a insulina é descoberta por um jovem médico canadense, Banting. Em 1963 e 1965, de forma independente, os autores P.G. Vendo, nos EUA, Wangyu, na República Popular da China, e H. Zahn na Alemanha Ocidental foram capazes de sintetizar a insulina (VECCHIO et al., 2018).

As técnicas de purificação da insulina foram aprimoradas até se chegar a uma preparação de insulina com uma estrutura química semelhante à humana, mas somente com a técnica de DNA recombinante foi possível produzir insulina totalmente humana. A partir deste momento, a situação de saúde das pessoas com diabetes melhorou de maneira determinante, considerando que no período pré-insulina essa era uma condição mortal. Além disso, a insulina humana resultou em tratamento com menos efeitos adversos alérgicos e em tratamento mais personalizado que segue sendo aprimorado. Esse aprimoramento é obtido por meio da melhoria da insulina em suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, na tentativa de reproduzir as flutuações fisiológicas diurnas na insulina plasmática, bem como da melhoria da forma como é aplicada. Existem hoje dispositivos implantáveis que são capazes de detectar a glicemia e ajustar a dose de insulina necessária (VECCHIO et al., 2018).

Ainda no campo da endocrinologia, as proteínas recombinantes tiveram grande impacto por meio do hormônio recombinante de crescimento humano (rhGH). Extremos de estatura, inicialmente, não eram vistos por uma perspectiva médica, mas sim como uma anomalia e curiosidade representadas nas artes ou mesmo exibidos em circos ou “shows de aberrações” durante o século XIX. O reconhecimento dos efeitos do hormônio do crescimento (GH) hipofisário e sua purificação e síntese química em várias espécies estão intimamente relacionados com o trabalho de Evans e seus eminentes pesquisadores associados da Universidade da Califórnia

em San Francisco (RANKE; WIT, 2018). Neste sentido, o pesquisador Li, que é o principal químico do grupo de Evans, isolou GH pituitário bovino e humano à pureza, descreveu sua estrutura primária – uma proteína de 191 aminoácidos com duas ligações de sulfeto – e finalmente alcançou a síntese química do GH humano (hGH).

Durante as décadas de 1940 e 1950, preparações de GH de diferentes espécies foram purificadas e testadas em animais e humanos. Guiados pela experiência adquirida com a insulina, os pesquisadores esperavam um grande êxito de suas preparações. No entanto, embora GH bovino tenha se mostrado eficaz em ratos, não teve qualquer efeito terapêutico em humanos. Em 1979, a tecnologia de DNA recombinante permitiu a expressão da sequência de DNA que codifica hGH. Em 1985, o primeiro hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) foi produzido a partir de *E. coli* e foi aprovado pelo FDA nos EUA para deficiência de GH na infância. A partir de então, as crianças diagnosticadas com deficiência de GH idiopática tiveram acesso a tratamento eficaz, seguro e capaz de atingir a altura potencial da criança na vida adulta (RANKE; WIT, 2018).

De uma maneira similar, as doenças inflamatórias imunomediadas também tiveram sua história natural alterada pelo advento das proteínas recombinantes. As doenças inflamatórias imunomediadas reumatológicas implicam quadro de dor articular acompanhada de intenso processo inflamatório capaz de comprometer a anatomia da articulação e resultar em danos irreversíveis à capacidade física do acometido. Exemplo mais comum deste tipo de condição é a artrite reumatoide (AR), com prevalência de 1% da população mundial. O tratamento desta condição foi revolucionado pela chegada de terapias alvo, dentre elas a proteína de fusão etanercepte.

Este medicamento compõe a classe de inibidores do fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa). Os receptores de TNF são encontrados na maioria dos tecidos e, quando ativados pelo TNF em resposta a um estímulo, desencadeiam reação inflamatória na forma de resposta imune. O TNF está envolvido no processo inflamatório da AR e etanercepte é um agente capaz de inibir a ligação do TNF alfa aos receptores da superfície celular, reduzindo, portanto, a resposta inflamatória relacionada à doença. Antes disso, o tratamento da AR era amplamente limitado a anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), como aspirina, e corticoesteroides. Embora essas medicações sejam capazes de reduzir a inflamação e proporcionar alívio sintomático, não impedem a destruição da articulação (HYNDMAN, 2017). As drogas modificadoras da doença sintéticas (DMARD), como metotrexato e leflunomida, seguem sendo importantes no tratamento da AR, seja pela sua utilização em fases iniciais da doença, seja pela associação com outros imunobiológicos.

Os medicamentos biológicos anti-TNF alfa representaram, e ainda representam, uma mudança de paradigma no tratamento da AR e de outras doenças reumatológicas imunomediadas. Esses medicamentos proporcionaram o controle de sintomas dolorosos e a prevenção da destruição articular ocasionada pelo processo inflamatório descontrolado ocasionado pela doença (HYNDMAN, 2017).

8.2.2 Anticorpos monoclonais terapêuticos

A partir dos anos 1990, surgiu uma nova onda focada em proteínas mais complexas como anticorpos monoclonais terapêuticos (JOZALA et al., 2016). São a classe dominante de biofármacos, representando mais de 60% dos produtos da categoria aprovados por ano (WALSH, 2018). Além disso, esta é a classe de biofármacos mais lucrativa, conforme observado na lista dos mais vendidos, conforme a Figura 8.5.

Cada anticorpo reconhece um único antígeno; desta forma, são considerados altamente específicos e, consequentemente, geram menos efeitos adversos. Outra grande vantagem vem da versatilidade como agente terapêutico, pois podem ser desenvolvidos para uma grande diversidade de alvos, o que possibilita a atuação em diferentes mecanismos de ação. A evolução da engenharia de anticorpos tem tornado estas moléculas ferramentas potentes para tratar virtualmente qualquer doença, mas são usadas principalmente para câncer e doenças autoimunes. Assim, esses produtos são considerados com bom perfil de segurança, assim como qualidade e eficácia comprovadas. Os anticorpos monoclonais terapêuticos serão discutidos de forma mais detalhada no Capítulo 10.

A compreensão de como esses anticorpos interagem com os alvos das células cancerígenas ajudou a revolucionar os métodos usados para tratar o câncer. Além disso, resultou em um perfil de toxicidade mais tolerado do que a quimioterapia padrão. Ao utilizar mAbs em oncologia, existem vários mecanismos de ação para destruir as células cancerígenas; saiba mais no Box 8.1.

Esses mecanismos conseguem impedir as cascatas de sobrevivência das células tumorais, inibir o crescimento tumoral por interferir na angiogênese do tumor, evitar a morte celular programada e evitar os pontos de controle (*checkpoints*) imunológicos. As indicações para uso dos mAbs na oncologia incluem tumores sólidos e neoplasias hematológicas. A descoberta dessas moléculas revolucionou a batalha contra o câncer, permitindo abordagens mais diretas para matar células cancerígenas ao se direcionarem a antígenos específicos para essas células (BAYER, 2019).

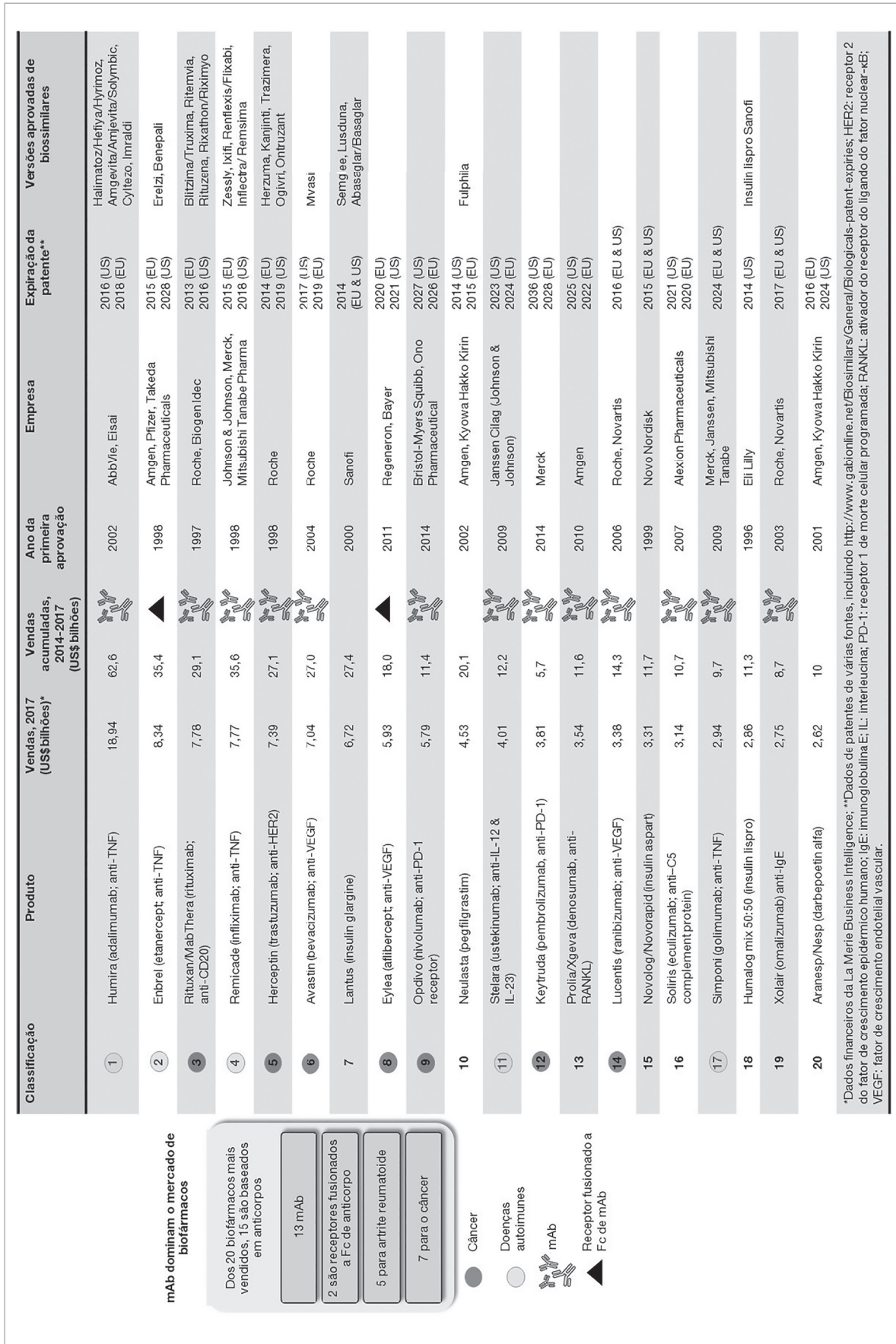


FIGURA 8.5 Biofármacos mais vendidos, a grande maioria são mAbs para o tratamento de câncer ou doenças autoimunes. Fonte: elaborada pelas autoras com base em Walsh (2018).

BOX 8.1

Saiba mais sobre os mecanismos de ação para destruir as células cancerígenas:



O primeiro anticorpo monoclonal a ser aprovado pela Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – traduzido do inglês *Food Drug Administration*), foi o muromonab-CD3, usado como medicamento antirrejeição em pacientes submetidos a transplantes de órgãos. O primeiro anticorpo monoclonal considerado bem-sucedido no tratamento de tumores sólidos foi o trastuzumabe, direcionado ao bloqueio do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Esse anticorpo abriu caminho para uma medicina personalizada, direcionada aos biomarcadores presentes no paciente na ocasião do diagnóstico (BAYER, 2019). Por exemplo, o câncer de mama é uma doença heterogênea com diversos subtipos caracterizados de acordo com a presença ou ausência de determinados biomarcadores. Aproximadamente 25% dos cânceres de mama possuem o gene HER2 superexpresso, resultando num fenótipo mais agressivo e, portanto, com pior prognóstico. O desenvolvimento do trastuzumabe, anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao domínio extracelular do HER2, revolucionou o tratamento deste subtipo de câncer de mama, trazendo respostas clínicas e tempo livre de doença melhores quando comparado ao tratamento quimioterápico tradicional. Também se mostrou eficaz nos casos metastáticos da doença quando associado à quimioterapia padrão, resultando em aumento de sobrevida global das pacientes (BAE et al., 2021).

Outro exemplo de mAb com grande impacto na medicina foi o rituximabe, um anticorpo monoclonal quimérico de camundongo/humano geneticamente modificado direcionado ao antígeno da superfície celular CD20, expresso seletivamente nas células B. Tem sido utilizado para tratar doenças que são induzidas pela superexpressão ou disfunção/hiperatividade de células B presentes em condições neoplásicas e autoimunes (EMA, 2022). Desde sua aprovação no FDA, revolucionou o tratamento do linfoma não Hodgkin

(LNH) de células B, melhorando significativamente a resposta ao tratamento e os resultados de sobrevida do paciente. Compõe, também, tratamento do linfoma folicular (LF) (LF guideline) e do linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) (LF guideline) (DREY-LING et al., 2016). Dentre condições autoimunes, o rituximabe tem sido utilizado em combinação com o Metotrexato no tratamento da artrite reumatoide grave, que falhou a diversas tentativas de tratamentos prévios com medicamentos sintéticos e biológicos, incluindo ao menos um anti-TNF alfa (COHEN et al., 2006), ampliando o arsenal terapêutico para esta doença que pode ser incapacitante se não adequadamente tratada. É importante para o tratamento em duas outras doenças autoimunes raras e extremamente graves, que são a granulomatose com poliangiíte e a poliangiíte microscópica, tendo se mostrado igualmente eficaz à ciclofosfamida (RTX VASCULITE ANCA – RAVE), droga com pior perfil de toxicidade.

A introdução de drogas imuno-oncológicas, ou imunoterapia, que aproveitam o sistema imunológico do paciente para atacar as células cancerígenas, se baseia na descoberta de que as células T podem ser ativadas ou desativadas com os chamados “pontos de controle imunológicos” ou inibidores de *checkpoint*. Um regulador mestre desta via foi identificado como antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxico (CTLA-4). O ipilimumabe, um anticorpo CTLA-4, foi aprovado, em 2011, para câncer de mama metastático, marcando a primeira aprovação de uma imunoterapia.

A novidade do mecanismo de ação do ipilimumabe exigia o estabelecimento de novos paradigmas regulatório e clínico, avaliando desfechos clínicos relacionados à resposta imunológica ao tratamento. Os tipos de respostas avaliadas, até então em ensaios clínicos, não eram capazes de mensurar os critérios de resposta desta nova classe de terapia. Além disso, o tempo para atingir certas respostas (p. ex., sobrevida) foi mais longo comparativamente à quimioterapia tradicional. Em 2014, o pembrolizumabe, agente bloqueador do receptor de morte programada-1 (PD-1), foi a primeira droga da segunda geração de drogas imuno-oncológicas a ser aprovada. PD-1 tem dois ligantes conhecidos, a proteína ligante 1 de superfície celular de morte celular programada (PD-L1) e PD-L2. Uma variedade de células tumorais expressa PD-1, que interage com PD-L1 nas células T para inibir a função das células T. Assim, anticorpos que bloqueiam PD-1 em células tumorais os impedem de evadir a imunovigilância por células T. Pembrolizumabe recebeu sua primeira aprovação para melanoma inicial, ou avançado, ou irrecorrível, ou metastático. Antes da chegada dos inibidores de *checkpoint*, a quimioterapia tradicional não era capaz de prolongar a sobrevida

de pacientes com melanoma metastático (BROWN; WOBST, 2021).

A inovação do mecanismo de ação das imunoterapias do tipo inibidores de *checkpoint*, que estimulam o próprio sistema imunológico do paciente a eliminar as células cancerosas, resulta hoje em número cada vez maior de biofármacos desta classe. Além disso, existe um aumento progressivo das indicações em bula desses produtos.

8.2.3 Terapias baseadas em ácidos nucleicos

A indústria de biofármacos tem desenvolvido novas estratégias terapêuticas e tecnologias, com foco cada vez maior em medicina personalizada, como nas terapias celulares, baseadas em ácidos nucleicos e terapias gênicas. Essas últimas categorias de biofármacos serão aprofundadas nos capítulos 15 e 16. A terapia celular inclui imunoterapia, vacinas para câncer e outros tipos de células autólogas ou alogênicas para determinadas indicações terapêuticas, incluindo as células tronco hematopoéticas, assim como células tronco embrionárias ou de adultos. A terapia gênica humana visa modificar ou manipular a expressão de genes ou alterar as propriedades biológicas de células vivas para uso terapêutico. Cerca de 30 terapias gênicas e/ou celulares foram aprovadas pelo FDA (FDA, 2022).

As terapias baseadas em ácidos nucleicos surgiram como uma promessa para revolucionar o tratamento de diversas doenças, tais como: doenças genéticas hereditárias (fibrose cística, hemofilia, imunodeficiências, entre outras), câncer, Parkinson, Alzheimer, artrite, diabetes e doenças cardiovasculares. Essa categoria de biofármacos pode ser baseada em DNA ou RNA e inclui diversos produtos distintos, como: terapia gênica, vacinas de DNA e RNA, RNAi (interferência), entrega de proteínas por meio de mRNA, aptâmeros, entre outros. Os primeiros produtos dessas categorias chegaram recentemente ao mercado, incluindo terapias gênicas, CAR-T e RNAi. Ainda, mais recente, tiveram notoriedade durante a pandemia de SARS-CoV-2 com vacinas de mRNA (VETTER; WAGNER, 2022; WALSH, 2018; WANG; SINGH, 2013).

Estas últimas terapias avançadas representaram um avanço na terapia do câncer na última década. A edição de genes experimenta crescimento representativo. A descoberta, em 2012, de que a ferramenta imune microbiana CRISPR (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas) pode ser reaproveitada como uma ferramenta para edição eficiente de gene acelerou consideravelmente esse crescimento. Várias terapias CRISPR foram iniciadas, com a maioria focada em edição *ex vivo* de células T ou células-tronco

hematopoéticas. Em 2019, o primeiro estudo CRISPR *in vivo* em humanos foi iniciado, visando mutações no gene CEP290, que causam uma doença ocular rara e sem tratamento chamada amaurose congênita de Leber (BROWN; WOBST, 2021).

Outro conceito em desenvolvimento acelerado é o das vacinas terapêuticas para câncer. Com o advento dos inibidores de *checkpoint*, tem havido um entendimento crescente dos fatores envolvidos no sucesso ou insucesso terapêutico. A distribuição espacial dos linfócitos T CD8+ no microambiente tumoral (TME) parece ter influência, sendo os tumores segregados em três imunofenótipos: (i) deserto imunológico (células imunes estão ausentes do tumor e sua periferia); (ii) excluídos imunológicos (células imunes se acumulam, mas não se infiltram de forma eficiente); e (iii) imunoinflamados (as células imunes se infiltram, mas seus efeitos são inibidos).

Os fenótipos de deserto imunológico e excluído imunológico compõem os chamados tumores frios e possuem baixa resposta terapêutica aos inibidores de *checkpoint*, enquanto os imunoinflamados são considerados tumores quentes e com excelente resposta a este tipo de terapia. Vacinas terapêuticas (como vacinas de células e peptídeos tumorais; vacinas de nucleotídeos que codificam novos epítomos; vacinas de células dendríticas) encorajam avanços clínicos na medida em que proporcionam expansão do *pool* de células T tumor específicas e aumentam a migração de linfócitos T ao microambiente tumoral (*turning cold tumors into hot tumors*). Esta estratégia é uma das utilizadas para tornar tumores imunologicamente frios em quentes. Sipuleucel-T foi a primeira vacina terapêutica aprovada pelo FDA, em 2010, para tratamento do câncer de próstata resistente à castração. Consiste na proteína de fusão PA2024 construída a partir de fosfatase ácida prostática, o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e células dendríticas (CD) autólogas, aumentando o efeito antitumoral (FDA, 2010).

8.2.4 Terapia celular

Dentre as terapias celulares, o transplante de células tronco hematopoéticas representa a forma mais antiga de terapia celular em aplicação clínica, tendo sido considerado pioneiro o trabalho de E. Donnell Thomas na década de 1950 (THOMAS et al., 1957). Ele estabeleceu os conceitos básicos que permitiram o primeiro transplante de medula óssea bem-sucedido em humanos, procedimento que permanece, até agora, a única opção curativa para uma variedade de doenças hematológicas malignas.

Desde o estabelecimento dos transplantes de medula óssea, muito se avançou em relação à terapia imunológica, seja humoral ou celular. Como citado anteriormente, os anticorpos monoclonais e os inibidores de *checkpoint* representaram expressivo avanço no combate às neoplasias malignas, dentre outras condições. Mais recentemente, a aprovação em 2017 de terapia de células T com receptor antigênico quimérico (CAR-T, do inglês *chimeric antigen receptor T-cell therapy*) para tratar neoplasias de células B promete novos avanços na área. Notavelmente, o sucesso clínico das células CAR-T no cenário do câncer abriu um novo horizonte de possibilidades, não apenas para o tratamento do câncer, mas também para uma variedade de doenças em que antígenos de membrana específicos se tornam expressos ou regulados positivamente em células patológicas. Estas células podem ser imunologicamente direcionadas e, como tal, podem se beneficiar da terapia com células CAR-T, especialmente doenças crônicas para as quais a memória imunológica pode fornecer ganho de longo prazo, tais como: HIV, HCV, HBV, CMV, EBV, *Aspergillus*, lúpus eritematoso sistêmico, *CAR-T*. Nesta última condição, há inclusive estudos relatando grande sucesso desta terapia que vislumbra a cura (MACKENSEN et al., 2022; MOUGIAKAKOS et al., 2021).

Resta evidente, portanto, que o avanço da biotecnologia tem impacto direto no tratamento de condições médicas carentes de terapias eficazes ou com perfil de segurança desfavorável. Além disso, pode conferir um ritmo de inovação em doenças graves, ainda não contempladas por tratamentos na medicina.

8.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO (P&D) DE BIOFÁRMACOS

A descoberta e desenvolvimento de drogas é um processo desafiador. Comumente chamado de “*pipeline*” por ser um fluxo unidirecional do candidato terapêutico da pesquisa básica, passando pela etapa de descoberta até chegar a utilizar a droga na prática clínica (WAGNER et al., 2018). Pode levar cerca de 15 anos desde a ideia inicial ser transformada em produto final por meio de pesquisas intensas, o custo de desenvolvimento de uma nova droga normalmente excede US\$ 2 bilhões (JOZALA et al., 2016). Um resumo das fases de desenvolvimento de um produto biológico (descoberta, desenvolvimento pré-clínico e desenvolvimento clínico) é apresentado na Figura 8.6.

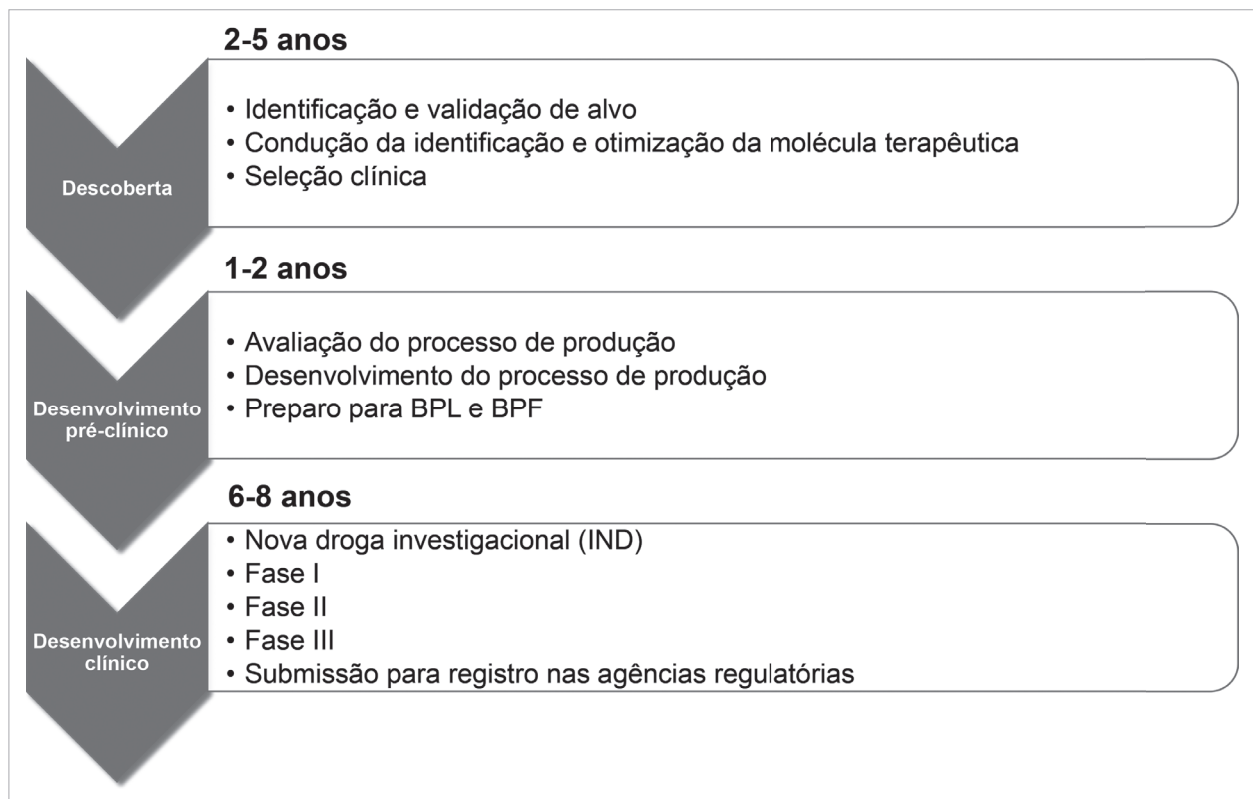


FIGURA 8.6 Fases de desenvolvimento de produtos biológicos.

Fonte: Elaborada a partir de Wang e Singh (2013).

8.3.1 Fase de descoberta de biofármacos

O desenvolvimento de um novo produto biológico se inicia com a seleção do alvo. Normalmente, novos alvos são identificados durante estudos de fisiopatologia das doenças, utilizando principalmente tecnologias de ômicas, como proteômica, genômica, transcriptoma, entre outros. O novo alvo precisa ser validado antes de iniciar o programa de descobertas. Essa etapa consiste em coletar dados clínicos e experimentais para prever um desfecho terapêutico benéfico (WANG; SINGH, 2013).

Quando existe evidência suficiente de que um alvo pode ser utilizado para o tratamento de uma doença, inicia-se o processo de seleção de candidatos à droga. Primeiro são gerados todos os reagentes, ensaios funcionais, modelos animais e celulares para poder realizar uma variedade de análises funcionais a fim de selecionar o melhor candidato para o desenvolvimento clínico. São incluídos no planejamento um cronograma estimado para cada etapa, momentos de decisão de continuidade ou encerramento do projeto, desafios previsíveis e planos de mitigação de riscos. Após esta etapa de planejamento, começa a rigorosa seleção de candidato a droga que se adequa aos critérios de propriedades moleculares e funcionais planejados. Essas propriedades podem ser otimizadas utilizando uma grande variedade de tecnologias, principalmente de engenharia de proteínas, para se obter um candidato clínico viável.

A atividade biológica se refere às funções biológicas desejáveis que serão caracterizadas por uma combinação de sistemas *in vitro*, sistemas celulares e modelos animais. A partir destes resultados é avaliado se a molécula candidata se adequou aos critérios pré-definidos de segurança e eficácia. A fase de descoberta se encerra com a seleção do candidato clínico (WANG; SINGH, 2013). Um resumo da fase de descoberta é apresentado na Figura 8.7.

8.3.2 Fase pré-clínica

Na fase pré-clínica ocorrem tanto os modelos animais quanto a etapa de desenvolvimento de processo (WANG; SINGH, 2013). O desenvolvimento de processo produtivo e o escalonamento de laboratório para os lotes clínicos e industriais são etapas críticas nos biofármacos, pois a sua otimização determina a viabilidade econômica do produto (REIS et al., 2009). Existe um intenso esforço da comunidade científica para melhorar o processo produtivo de biofármacos, focando principalmente em reduzir o tempo de processamento, o custo por biofármaco, variações, impurezas no processo e conseguir manter a consistência entre diferentes lotes (CARRARA et al., 2021).

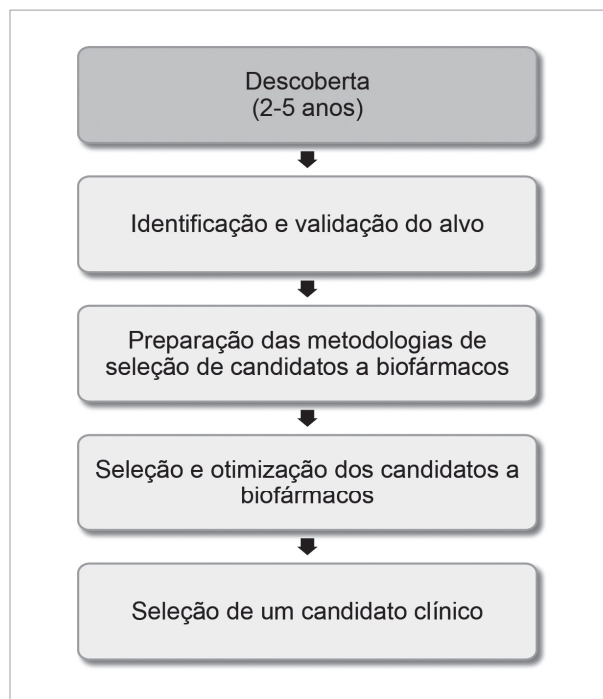


FIGURA 8.7 Fase de descoberta de biofármacos.

Fonte: elaborada pelas autoras (2023).

O desenvolvimento de processo pode ser resumido em 5 etapas principais: (i) desenvolvimento de uma linhagem celular estável e produtiva expressando o gene de interesse; (ii) otimização da expressão para obter um alto título do produto por célula hospedeira; (iii) recuperação e purificação; (iv) etapas de formulação e dosagem (chamado *Fill and Finish* ou processamento final); e v) desenvolvimento de métodos analíticos para monitorar o processo e avaliar o produto acabado (CARRARA et al., 2021). As etapas 1 e 2 correspondem ao desenvolvimento da operação de *upstream*, em que a engenharia e o desenvolvimento da linha celular visam alcançar maiores títulos para melhorar a produtividade e a qualidade do produto (CARRARA et al., 2021).

Existem diversos sistemas de expressão disponíveis, cada um com suas vantagens e desvantagens, em relação a custo, modificações pós-traducionais, segurança e escalonamento. Além desses quesitos, questões regulatórias, estabilidade e segurança devem ser levadas em consideração. O uso de procariotos para a expressão de proteínas é vantajoso por ser mais barato, gerar altas quantidades de proteínas, porém não é adequado para proteínas complexas como anticorpos monoclonais devido à necessidade de modificações pós-traducionais. Nos dias atuais, na indústria de biotecnologia existe um domínio do uso de sistemas de expressão de células de mamíferos nos produtos aprovados, 84% dos produtos aprovados são expressos em células de mamífero

(ASSENBERG et al., 2013; RASKIN et al., 2002; WALSH, 2018). Os principais sistemas de expressão foram discutidos no Capítulo 2.

Os esforços de otimização são focados no meio de cultivo, desenvolvimento de método de alimentação da célula (*batch*, *fed-batch* ou perfusão), desenvolvimento de bioprocessos e experimentos de escalonamento. Na alimentação por *batch*, ou batelada, todos os nutrientes são adicionados no meio inicial. No *fed-batch* ou batelada alimentada, os nutrientes são adicionados à medida que forem depletados. Na perfusão o meio de cultivo fica circulando através da cultura em crescimento, mantendo as células no biorreator via filtração, retirada de rejeitos e suprimento de novos nutrientes para as células. Ao final do processo, espera-se obter em torno de 1-5 g/L de produto, mas processos muito otimizados podem atingir marcas maiores, como 13 g/L (CARRARA et al., 2021).

O processo de propagação celular é classificado em duas categorias: batelada e contínuo. No cultivo em batelada, há o preenchimento do reator com a quantidade desejada de matéria-prima, é efetuado o processo e, em seguida, os produtos são removidos. Ele pode ser tipificado em simples (*batch*) – no qual, ao adicionar as células no reator, não há qualquer manutenção de substrato no meio – ou em alimentado (*feed batch*) – tem-se a adição de substrato ao longo do cultivo, à medida que são consumidos pelas células (PIMENTEL et al., 2012).

Apesar de os avanços tecnológicos na etapa de *upstream* levarem a um aumento considerável de rendimento (de alguns miligramas por litro para alguns gramas por litro), o custo total de manufatura de biofármacos continua alto, principalmente devido à etapa seguinte de *downstream*, que pode representar de 50 a 80% do custo de produção. A etapa 3 – recuperação e purificação – inclui o isolamento e purificação de produtos biológicos a partir de culturas de células complexas. Independentemente da aplicação do produto, a estrutura geral de *downstream* é a mesma para proteínas e peptídeos derivados de células. Dependendo do sistema de expressão utilizado ou da localização do produto (intracelular ou extracelular) o material que sai do biorreator contém a proteína desejada numa mistura complexa de células, restos de célula, proteínas da célula hospedeira, ácidos nucleicos, endotoxinas, vírus e outros contaminantes que precisam ser eliminados ou reduzidos para níveis aceitáveis (WANG; SINGH, 2013).

O objetivo principal da recuperação e clarificação é liberar o produto da célula (se a proteína expressa não for secretada para o meio) e remover células e restos celulares. Essa etapa pode incluir uma série de métodos distintos, destacando-se: centrifugação, microfiltração, homogeneização e permeabilização celular por ação mecânica, enzimas ou produtos químicos. Em seguida,

o produto passa por inativação de protease, remoção de ácidos nucleicos, concentração e pré-condicionamento. Após estes passos ainda existe uma mistura complexa que segue para a purificação, necessária para atingir a qualidade desejada do produto. Normalmente, a purificação é dividida em captura do produto e polimento, que envolvem uma ou mais cromatografias. Então, é realizada a redução ou inativação de vírus para começar a formulação (WANG; SINGH, 2013).

A etapa 4 (formulação e dosagem) é crítica, pois todas as proteínas são sujeitas a degradação. Desta forma, é importante compreender a via de degradação (física e química) de cada molécula para manter os atributos de qualidade adequados. A via de degradação pode estar relacionada com a sequência de aminoácidos, que é única para cada molécula. Além disso, pode variar com diversas condições, como pH, temperatura, concentração e condições de processamento e manipulação. Deste modo, a formulação ideal é única para cada candidato a droga. Uma das questões críticas é a dosagem, pois altas concentrações de proteína geram desafios únicos como possibilidade de agregados, precipitação e alta viscosidade, o que pode dificultar a administração da droga aos pacientes (WANG; SINGH, 2013).

A etapa 5 (desenvolvimento de métodos analíticos) é considerada importante para entender como o processo produtivo, formulação, manipulação e condições de armazenamento afetam os atributos críticos de qualidade do produto. Uma das questões mais críticas é medir e monitorar impurezas relacionadas ao produto e processo, que podem afetar a estabilidade, segurança e eficácia de um candidato a droga (WANG; SINGH, 2013).

Uma vez que o composto esteja formulado e produzido, começam os ensaios não clínicos ou pré-clínicos em modelos animais. O objetivo desta fase é analisar farmacocinética e farmacodinâmica do biofármaco, assim como definir a dose e avaliar a toxicidade. Como os biofármacos são altamente específicos para moléculas alvo em humanos é necessário encontrar um modelo animal, mais próximo possível. Portanto, embora a prova de princípio inicial possa ser feita em espécies distintas como roedores e camundongos, normalmente é necessária uma etapa em primatas não humanos (PNH), como macacos *rhesus* ou *cynomolgus*. Como os PNH apresentam características mais semelhantes a pacientes humanos, as avaliações de eficácia e segurança nestes animais apresentam maior poder preditivo que em outros animais (MUNDAE; OSTOR, 2010). Um resumo de todas as etapas de desenvolvimento pré-clínico é apresentado na Figura 8.8. Quando esta etapa é concluída, um dossiê do produto é entregue para a agência regulatória, solicitando autorização para iniciar os ensaios clínicos.

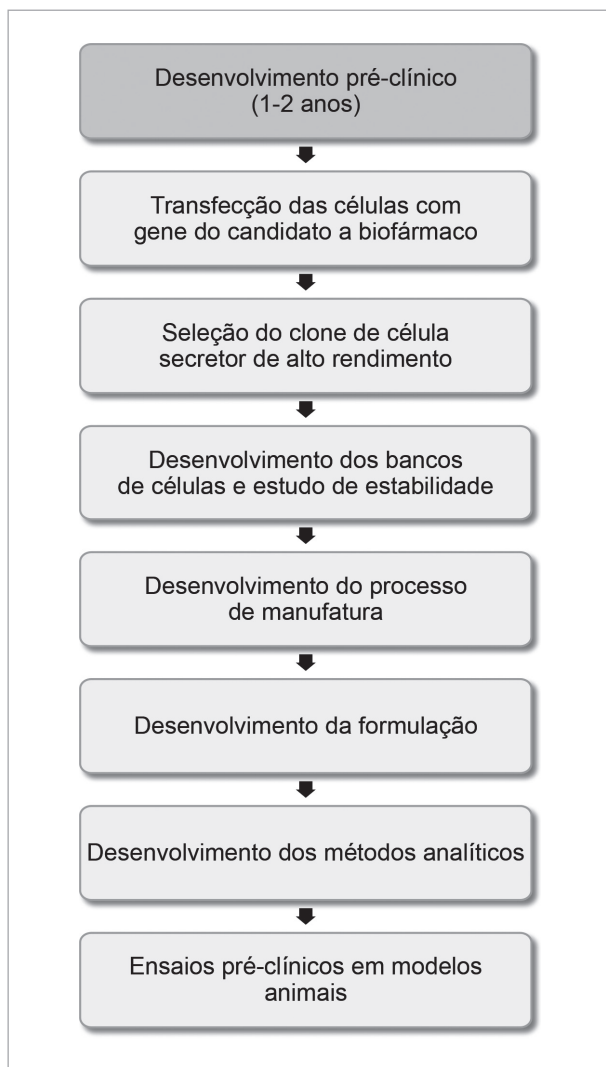


FIGURA 8.8 Fase de desenvolvimento pré-clínico de biofármacos.

Fonte: Elaborada pelas autoras (2023).

8.3.3 Fase de desenvolvimento clínico

Embora a pesquisa pré-clínica responda a perguntas básicas sobre a segurança de um medicamento, não substitui os estudos sobre como o medicamento irá interagir com o corpo humano. A “pesquisa clínica” refere-se a estudos ou ensaios realizados em pessoas. À medida que os desenvolvedores projetam o protocolo do estudo clínico, consideram o que desejam realizar para cada uma das diferentes fases da pesquisa clínica e iniciam o processo de investigação de novos medicamentos (IND), um processo pelo qual devem passar antes do início da pesquisa clínica (FDA, 2018).

Os desenhos dos estudos clínicos devem responder a perguntas específicas relacionadas ao novo medicamento, que resultarão num protocolo de estudo desenvolvido

pelo pesquisador ou produtor. Nesta etapa, é importante definir: critérios de seleção (quem poderá participar da pesquisa); quantos indivíduos serão necessários ao estudo; quanto tempo será necessário para desenvolver o estudo; se será necessário grupo controle e outras maneiras de limitar vieses da pesquisa; como deverá ser administrada a droga e em que dosagem; quais avaliações serão necessárias, com qual intervalo de tempo deverão ser acessadas e quais dados são relevantes; como os dados gerados serão revisados e analisados. Os estudos clínicos para aprovação de novas drogas seguem um fluxo típico de pequenos estudos de fase 1 até estudos amplos de fase 3 (FDA, 2018).

Estudos clínicos de fase 1 envolvem entre 20 e 100 participantes saudáveis, ou pessoas convivendo com a doença (como no caso de novas drogas para tratamento do câncer). Estes ensaios necessitam de alguns meses para serem realizados, e pretendem responder a questões relativas à segurança e à posologia da nova droga. Com base nos estudos pré-clínicos em animais, os pesquisadores ajustam esquemas de diferentes doses com a finalidade de descobrir o quanto o corpo humano tolera o novo medicamento e seus efeitos adversos agudos. Aproximadamente 70% das drogas seguem para a próxima etapa (FDA, 2018).

Estudos clínicos de fase 2 envolvem algumas centenas de participantes portadores da doença em questão, precisam de vários meses – chegando até 2 anos – e buscam respostas relacionadas à eficácia, à segurança a curto prazo e à avaliação dose-resposta. Os estudos desta etapa não possuem um volume elevado de participantes que seja suficiente para determinar se a nova droga será benéfica ou não. No entanto, fornecem dados adicionais de segurança e proporcionam refinamento das perguntas a serem respondidas na próxima fase, bem como para o desenvolvimento dos métodos de pesquisa para o protocolo de fase 3. Cerca de 33% das novas drogas avançam para a próxima fase (FDA, 2018).

Estudos clínicos de fase 3 envolvem de 300 a 3.000 voluntários que possuem a doença em questão, e podem levar de 1 a 4 anos para serem realizados, em que se pretende determinar a eficácia da droga, bem como monitorar eventos adversos. Por incluírem maior volume de participantes e por demandarem um maior período de tempo, são os estudos de fase 3 que fornecem os dados mais robustos de segurança de longo prazo relacionados a efeitos adversos raros. Apenas 25-30% caminham para aprovação regulatória (FDA, 2018). Após a aprovação regulatória da nova droga, esta entra no mercado e passa a ser utilizada por milhares de pessoas portadoras das doenças. O medicamento segue sujeito à farmacovigilância, responsável pelo acompanhamento de dados de segurança ao longo de todo o processo de

desenvolvimento, aprovação e pós-registro (abordada em profundidade no capítulo 13) ao longo de todo o seu ciclo de vida, bem como aos estudos de fase 4, considerados os estudos que monitoram a segurança do produto (FDA, 2018). Um resumo de todas as etapas de desenvolvimento clínico para aprovação pela agência regulatória de um novo medicamento é apresentado na Figura 8.9.

8.4 ASPECTOS POLÍTICO-ESTRUTURAIS RELACIONADOS À PRODUÇÃO E AO DESENVOLVIMENTO PARA ACESSO A BIOFÁRMACOS

A evolução da biotecnologia no campo dos biofármacos traz desafios em termos de produção e acesso farmacêutico. A Organização das Nações Unidas (ONU), em 2015, fixou os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), uma agenda global de objetivos até 2030. Entre as 169 metas são apontados como questões prover acesso e apoiar a pesquisa e o desenvolvimento a medicamentos e vacinas para todos (UNITED NATIONS, 2015).

No caso das medicações biológicas, assim como nas vacinas, o acesso é ainda mais crítico, pois, conforme exposto, apesar de o mercado ter crescido exponen-

cialmente, as dificuldades de produção dos produtos biológicos são consideravelmente maiores em comparação com moléculas pequenas obtidas por síntese química. Acrescida a dificuldade na produção *per se*, a indústria biotecnológica é fortemente regulamentada e tem necessidade de uma força de trabalho altamente qualificada. Desta forma, o volume de produtos biológicos no mercado é limitado em comparação com a quantidade de drogas sintéticas e geralmente custam muito mais caro, fazendo que sejam menos acessíveis, principalmente em países de baixa renda e sistemas de saúde públicos (TORRES-OBREQUE et al., 2022).

A ONU retoma o desafio do acesso farmacológico nos países em desenvolvimento apontando para a possibilidade da estratégia de flexibilização de patentes (licenças compulsórias). O objetivo desta ação é proteger a saúde pública, esta é prevista entre as disposições do acordo TRIPS (ver Box 8.2) e apontada na Declaração de Doha com a finalidade de aumentar o acesso a medicamentos para todos (UNITED NATIONS, 2015).

Os aspectos sociais, políticos e determinantes econômicos do acesso aos biológicos ainda são pouco estudados, sendo os esquemas de copagamento no âmbito da saúde privada o foco principal dos estudos de acesso farmacêutico. O estudo dos determinantes

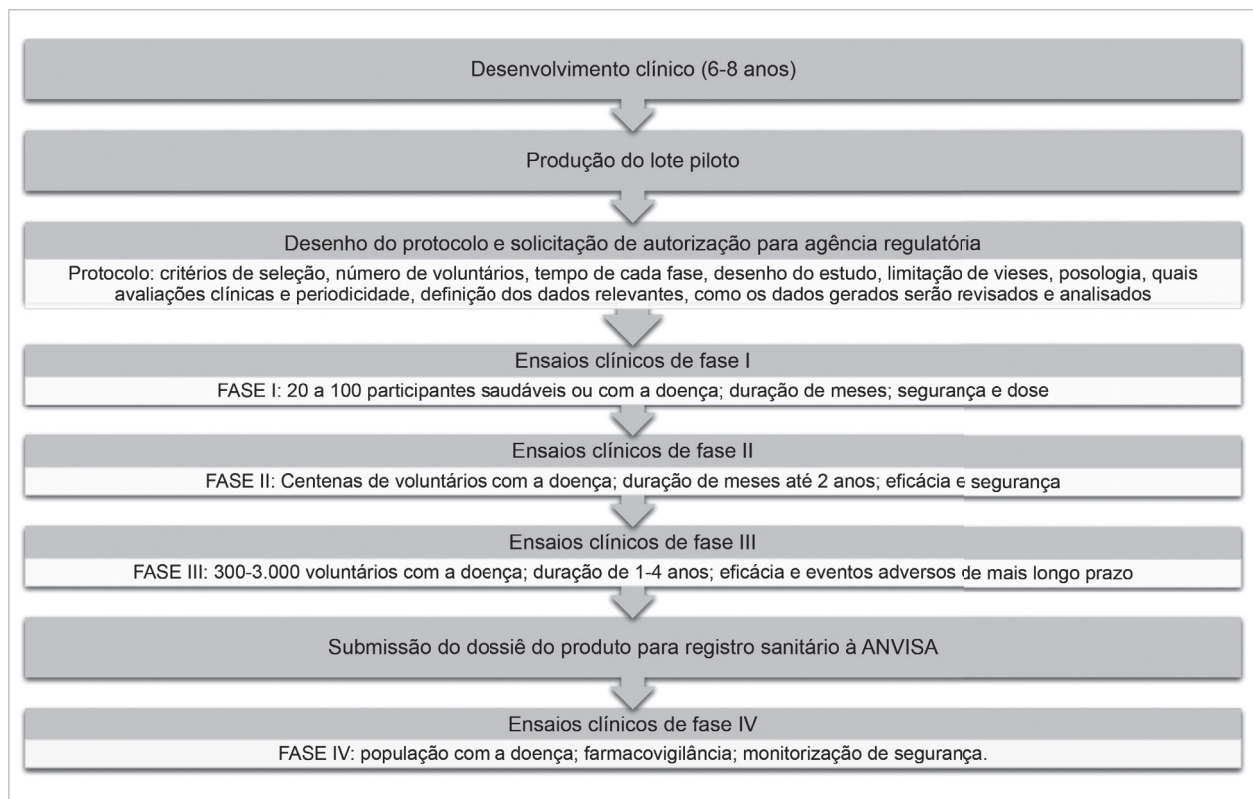


FIGURA 8.9 Fase de desenvolvimento clínico de biofármacos.

Fonte: elaborada pelas autoras (2023).

BOX 8.2

O Acordo TRIPS (*Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights*) de 1994, da Organização Mundial de Comércio (OMC), mudou normas internacionais dos direitos de propriedade intelectual. Com a assinatura, os membros da OMC passaram a adotar medidas paritárias acerca de direitos de propriedade intelectual e patentes do setor farmacêutico. As regras impostas tiveram forte impacto em questões de saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento. Em 2001, o acordo foi revisto na Declaração de Doha, que ressalta os aspectos de inequidade na saúde pública, criados pelo acordo, e reforça o direito à flexibilidade, previsto no artigo 31, que previa licenças compulsórias (CORREA, 2005; OLIVEIRA; SANTOS, 2017).

das disparidades em saúde e questões relativas à etnia e *status* socioeconômico também necessitam de melhor elucidação.

Uma revisão de literatura incluiu 100 estudos sobre disparidades no acesso a medicamentos biológicos aprovados pela agência regulatória americana e apenas 48 deles analisaram características étnicas e de raça. Em termos econômicos, 10 estudos analisaram a cadeia de suprimentos e 8 estudos consideraram processos de P&D. As moléculas mais estudadas foram adalimumabe, trastuzumabe, rituximabe e etanercepte (SARIAHMED et al., 2022).

O desafio da aplicação das metas mundiais no tocante aos medicamentos biológicos no Brasil passa por investimentos em políticas nacionais de desenvolvimento biotecnológico. O histórico desse desenvolvimento é retratado no Capítulo 2. O fato é que o mercado brasileiro de biofármacos é dominado por produtos biológicos importados, o que, somado ao valor agregado dessas medicações e à crescente incorporação tecnológica do SUS, cria uma balança comercial desfavorável ao país. A estratégia adotada pelo governo federal foi focar em parcerias de desenvolvimento produtivo (PDP). O Quadro 8.1 sintetiza as PDP de produtos biológicos vigentes no momento com suas indicações terapêuticas e instituições envolvidas. Podemos destacar no quadro a atuação de Bio-Manguinhos e Butantan como principais laboratórios públicos envolvidos na política.

A expectativa das PDPs é reduzir custos de importação de fármacos estratégicos e de alto valor agregado, desenvolver competências de fabricação e assimilar tecnologia (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). As PDPs de produtos biológicos vigentes incluem medicamentos biológicos originais, por meio de acordo de transferência de tecnologia com o desenvolvedor (parceiro privado internacional), como também de biossimilares.

Os biossimilares serão alvo de discussão no Capítulo 14. Para entendimento geral, com a expiração

da patente de um medicamento biológico originador é possível a produção e comercialização de medicamentos biológicos biossimilares que têm a mesma sequência de aminoácidos, mas são produzidos por clones e processos de manufatura distintos e, como consequência, podem ter microvariações (BECK, 2011; TORRES-OBREQUE et al., 2022). Diferentemente dos medicamentos sintéticos genéricos, pelas microvariações inevitáveis no desenvolvimento dos biossimilares são necessários estudos analíticos e funcionais extensos, além de ensaios clínicos para demonstrar não haver impacto na segurança, eficácia e potência em relação ao originador, garantindo que as microvariações não terão impacto na clínica. O papel dos estudos clínicos nesse cenário vem sendo relativizado e rediscutido quando a molécula apresenta testes pré-clínicos bem caracterizados (KURKI et al., 2022). O fluxo para aprovação de um biossimilar segue as vias regulatórias diferentes das propostas para aprovação de moléculas originadoras, visto que o objetivo é comprovar equivalência ao produto referência em termos de eficácia, segurança, imunogenicidade. Esse assunto será abordado no Capítulo 14 (EMA; MHRA; OMS).

Outro ponto importante decorrente da introdução de biossimilares a ser discutido é a chamada “*patent cliff*”, um fenômeno de mercado bem descrito em que ocorre uma queda acentuada nas vendas de um produto de sucesso à medida que se aproxima o fim de vigência da patente. No Brasil, essa queda chega a ser 10.000% menor que o preço máximo permitido na Câmara de Medicamentos (CMED) quando em relação a medicamentos sintéticos (OLIVEIRA; SANTOS, 2017).

No caso dos medicamentos biológicos, podemos analisar o fenômeno observando o comportamento de preços das compras centralizadas pelo Ministério da Saúde pelo Departamento de Assistência Farmacêutica (DAF) de 2014 a 2021. Na Audiência Pública com tema Biossimilares – a importância da produção no Brasil e incorporação de novas tecnologias, em 27 de abril de 2022, na Câmara dos Deputados foram publiciza-

QUADRO 8.1 Parcerias de desenvolvimento produtivo (PDP) vigentes em medicamentos biológicos

Produto	Indicação (conforme PCDT)	Instituição pública	Parceiro privado (nacional)	Parceiro privado (internacional)
Adalimumabe	Artrite psoriásica, artrite reumatoide, doença de Crohn, espondilite ancilósante, hidradenite supurativa ativa moderada a grave, psoríase, uveítes não infecciosa intermediária, posterior e pan-uveítes ativa	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A. – Companhia Brasileira de Biotecnologia Farmacêutica	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
		Butantan	x	Sandoz AG
Betainterferona 1 ^a	Esclerose múltipla	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A.	Merck S.A.
Etanercepte	Artrite reumatoide, artrite psoriásica, espondilite ancilósante	Butantan	X	Sandoz AG
		Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A.	Samsung Bioepis
Golimumabe	Artrite reumatoide, artrite psoriásica, espondilite ancilósante, retocolite ulcerativa moderada a grave	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A.	Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.
Infliximabe	Artrite reumatoide, artrite psoriásica, doença de Crohn, espondilite ancilósante, retocolite ulcerativa moderada a grave	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A.	Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.
Insulina (NPH e Regular)	Diabetes	Funed	Bionovis S.A.	Wockhardt Ltd.
Palivizumabe	Prevenção da infecção pelo vírus sincicial respiratório	Butantan	X	AstraZeneca
Rituximabe	Artrite reumatoide linfoma não Hodgkin de células B, (folicular e difuso de grandes células B)	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A.	Sandoz AG
Rituximabe	Artrite reumatoide, linfoma não Hodgkin de células B, folicular, CD20 positivo	Butantan	x	x
Somatropina	Hipopituitarismo, síndrome de Turner	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.	X
Tocilizumabe	Artrite reumatoide	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis S.A.	Fresenius-Kabi Deutschland GmbH

Fonte: elaborado pelos autores, com base em Ministério da Saúde (2023).

dos dados que mostram redução de 35% do preço de compra unitária de etanercepte e 78% de redução do preço unitário de adalimumabe após a introdução dos biossimilares no mercado brasileiro (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2022).

Fomentar a P&D de produtos biossimilares, no final da fase de vida do produto, pode trazer riscos em termos de obsolescência na prática clínica. A melhora das tecnologias dos processos produtivos e o avanço contínuo da biologia molecular permitem aprimorar os produtos biológicos

gerando os chamados “*biobetters*”, que são desenvolvidos por modificações químicas ou moleculares a partir do produto original (TORRES-OBREQUE et al., 2022). Além disso, pode-se considerar a conjugação deles em outras moléculas, como no caso do trastuzumabe-entansina. As principais características dos produtos biológicos, biossimilares e *biobetters* são resumidas na Figura 8.10.

A efetivação do acesso aos medicamentos perpassa também pelo fortalecimento do sistema de saúde como um todo, garantindo prevenção, diagnóstico e

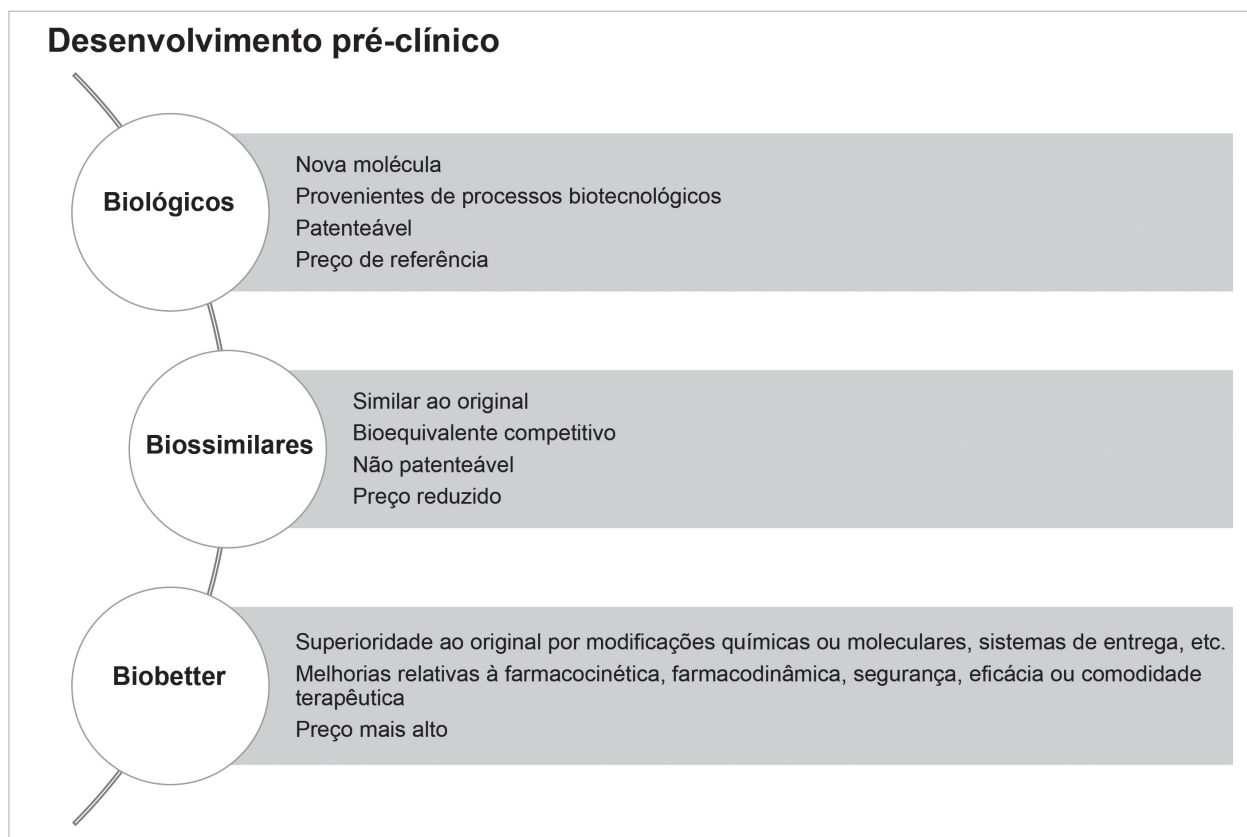


FIGURA 8.10 Comparação das principais características de biossimilares, *biobetter*s e produtos biológicos. Fonte: elaborada pelos autores com base em Torres-Obreque et al. (2022).

acompanhamento para então alcançarmos uma etapa de tratamento.

8.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biofármacos representam uma mudança de paradigma no desenvolvimento de novos tratamentos, incorporando conhecimentos de engenharia genética cada vez mais sofisticados e com participação cada vez maior da inteligência artificial (Capítulo 17). Na medicina, impactaram positivamente o tratamento, principalmente, de doenças inflamatórias imunomediadas, oncológicas e raras, para as quais os recursos disponíveis são insuficientes em termos de eficácia e/ou segurança.

Os avanços permitiram desde fabricar hormônios totalmente humanos, modificar o funcionamento da maquinaria celular por alterações de sinalizações até alterar o material genético dos pacientes. A cada dia não apenas novos alvos, mas também novas abordagens terapêuticas se tornam viáveis. Em contrapartida, surgiram novos desafios aos sistemas de saúde, em função de seu elevado custo de desenvolvimento e preço de mercado praticado sob proteção patentária, aprofun-

dando diferenças em relação ao acesso a esse tipo de medicamento entre países desenvolvidos e aqueles em desenvolvimento.

Entender a complexidade do processo de desenvolvimento e produção dessa classe de medicações é essencial para compreender que para efetivação do avanço tecnológico do país há uma curva de aprendizado científico e institucional em vários campos. Esses campos perpassam a biologia, a química, a farmácia, a medicina e a engenharia genética, além de saberes regulatórios e desafios em termos de pesquisa clínica.

No Brasil, o fomento à aquisição tecnológica ocorre por meio das parcerias para o desenvolvimento produtivo (PDP), focadas nos medicamentos biossimilares (Capítulo 14). Estas parcerias resultam em aprendizado tecnológico associado ao medicamento biológico referido e, também, promovem a aquisição de conhecimentos transversais em termos de biotecnologia. A construção de um parque industrial biotecnológico nacional com a produção dos insumos farmacêuticos ativos (IFA) no país diminui a vulnerabilidade externa do Sistema Único de Saúde (SUS) e abre as portas para a inovação tecnológica autóctone.

REFERÊNCIAS

- ASSENBERG, R. et al. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p. 393–402, jun. 2013.
- BAE, S. J. et al. Real-World Clinical Outcomes of Biosimilar Trastuzumab (CT-P6) in HER2-Positive Early-Stage and Metastatic Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 4 jun. 2021.
- BAYER, V. An Overview of Monoclonal Antibodies. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, p. 150927, out. 2019.
- BECK, A. Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. **mAbs**, v. 3, n. 2, p. 107–110, 27 mar. 2011.
- BHATIA, S. History, scope and development of biotechnology. **Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 1**, 2053-2563. p. 1–61, 2018.
- BROWN, D. G.; WOBST, H. J. A Decade of FDA-Approved Drugs (2010–2019): Trends and Future Directions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 2312–2338, 11 mar. 2021.
- CÂMARA DOS DEPUTADOS. **CESP – Combate ao Câncer no Brasil – Audiência pública, requerimentos e eleição – 27/04/2022**. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=TGsBxOGANBI&t=6871s>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- CARRARA, S. C. et al. From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 594, p. 120164, fev. 2021.
- COHEN, S. B. et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 9, p. 2793–2806, set. 2006.
- CORREA, C. M. O Acordo TRIPS e o acesso a medicamentos nos países em desenvolvimento. **Sur. Revista Internacional de Direitos Humanos**, v. 2, n. 3, p. 26–39, dez. 2005.
- DREYLING, M. et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 27, p. v83–v90, set. 2016.
- EMA. **MabThera**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mabthera>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- EVALUATE. **Evaluate Pharma World Preview 2020, Outlook to 2026**. Disponível em: <https://www.evaluate.com/thought-leadership/pharma/evaluatepharma-world-preview-2020-outlook-2026>. Acesso em: 19 nov. 2022.
- FDA. **HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION**. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/78511/download>. Acesso em: 14 abr. 2023.
- FDA. **Step 3: Clinical Research**. Disponível em: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research>. Acesso em: 14 abr. 2023.
- FDA. **Cellular & Gene Therapy Products**. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- HYNDMAN, I. J. Rheumatoid arthritis: past, present and future approaches to treating the disease. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 20, n. 4, p. 417–419, abr. 2017.
- JOZALA, A. F. et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 51–63, dez. 2016.
- KURKI, P. et al. Regulatory Evaluation of Biosimilars: Refinement of Principles Based on the Scientific Evidence and Clinical Experience. **BioDrugs**, v. 36, n. 3, p. 359–371, 21 maio 2022.
- MACKENSEN, A. et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. **Nature Medicine**, v. 28, n. 10, p. 2124–2132, 15 out. 2022.
- MEIRELLES, B. B. et al. Balanço da estratégia de desenvolvimento da biotecnologia farmacêutica no Brasil: 2009-2019. **Produção BNDES – Artigos**, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Medicamento, Vacina e Hemoderivados – Parcerias Vigentes – Parcerias Vigentes**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/deceiis/pdp/medicamentos-vacinas-e-hemoderivados/medicamento-vacina-e-hemoderivados-parcerias-vigentes-parcerias-vigentes/view>. Acesso em: 5 maio. 2023.
- MMA. **A Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000.
- MOUGIAKAKOS, D. et al. CD19-Targeted CAR T Cells in Refractory Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 6, p. 567–569, 5 ago. 2021.
- MUNDAE, M. K.; OSTOR, A. J. K. The long road of biopharmaceutical drug development: from inception to marketing. **QJM**, v. 103, n. 1, p. 3–7, 1 jan. 2010.
- OLIVEIRA, L. F. C.; SANTOS, A. DE O. Patentes e o direito à saúde: análise sobre as discussões de propriedade intelectual na Organização Mundial da Saúde, entre 2006 e 2016. **Cadernos Ibero-Americanos de Direito Sanitário**, v. 6, n. 4, p. 130–146, 28 dez. 2017.
- PIMENTEL, V. P. et al. Saúde como desenvolvimento: perspectivas para atuação do BNDES no complexo industrial da saúde. In: BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (Ed.). **BNDES 60 anos: perspectivas setoriais**. 1. ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2012. p. 329–332.
- RANKE, M. B.; WIT, J. M. Growth hormone – past, present and future. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 285–300, 16 maio 2018.
- RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–531, dez. 2002.
- REIS, C. et al. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. In: BNDES (Ed.). **BNDS Setorial**. Rio de Janeiro: BNDES, 2009. p. 359–392.
- SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERAZ, I. **Texto para discussão: biofármacos no brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento**. São Paulo: IPEA, 2018.
- SARIAHMED, K. et al. Social, political, and economic determinants of access to biologics: A scoping review of structural determinants in the clinical disparities literature. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v. 18, n. 12, p. 4038–4047, dez. 2022.
- THOMAS, E. D. et al. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 257, n. 11, p. 491–496, 12 set. 1957.
- TORRES-OBREQUE, K. M. et al. Building better biobetters: From fundamentals to industrial application. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 65–81, jan. 2022.
- UNITED NATIONS. **Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015**. Disponível em: <https://www.un.org/>

- en/development/desa/population/migration/generalassembly/docs/globalcompact/A_RES_70_1_E.pdf. Acesso em: 24 abr. 2023.
36. URQUHART, L. Top companies and drugs by sales in 2021. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 4, p. 251–251, 11 abr. 2022.
37. VECCHIO, I. et al. The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 23 out. 2018.
38. VETTER, V. C.; WAGNER, E. Targeting nucleic acid-based therapeutics to tumors: Challenges and strategies for polyplexes. **Journal of Controlled Release**, v. 346, p. 110–135, jun. 2022.
39. WAGNER, J. et al. A dynamic map for learning, communicating, navigating and improving therapeutic development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 2, p. 150–150, 22 fev. 2018.
40. WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 6 dez. 2018.
41. WALSH, G.; WALSH, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 12, p. 1722–1760, 5 dez. 2022.
42. WANG, W.; SINGH, M. **Biological Drug Products: Development and Strategies**. North Carolina: WILEY, 2013.

Proteínas recombinantes

Maíra Peixoto Pellegrini

Daniel André Ribeiro

Ana Carolina Magalhães Andrade

Helena de Almeida Tupinambá

Carla Lemos Gottgroy

Amanda de Miranda Marques

Neste capítulo são discutidas as proteínas recombinantes. O capítulo se inicia com uma contextualização sobre o tema. Em seguida, é realizada uma discussão sobre definições, aspectos estruturais e de fabricação de biofármacos. Além disso, é descrita a evolução histórica dos biofármacos. Na sequência, são abordadas as principais classes de proteínas recombinantes e de uso terapêutico. Os conceitos discutidos são ilustrados, historicamente, a partir do caso da insulina. Além disso, é discutido sobre o uso e recomendações clínicas das proteínas recombinantes. Por fim, são expostos os impactos atuais e futuros do uso das proteínas recombinantes no Complexo Econômico Industrial da Saúde.

9.1 PROTEÍNAS RECOMBINANTES: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO

Proteínas são macromoléculas presentes no corpo humano, que estão envolvidas em diferentes funções cruciais: (i) participando de reações bioquímicas; (ii) formando receptores ou canais através das membranas; (iii) participando de sinalizações intra ou extracelulares; (iv) transportando moléculas dentro da célula ou entre órgãos; e (v) atuando como agentes de defesa; entre outros (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Qualquer tipo de deficiência na produção de determinadas proteínas (seja por mutação, deleção parcial ou total do gene, seja por mal enovelamento, que resulte na perda ou diminuição da sua concentração ou de sua atividade biológica) levará ao desenvolvimento de uma doença. Em teoria, a reposição da proteína ativa pode reverter a manifestação clínica da doença.

De fato, o tratamento de algumas doenças ocorre desta maneira, há décadas, pela denominada terapia de reposição. No passado, as proteínas eram obtidas e

purificadas não apenas de fonte humana, mas também de fonte animal. O exemplo clássico deste procedimento é a insulina, utilizada no tratamento da diabetes. Em 1922, a insulina foi purificada, pela primeira vez, a partir do pâncreas bovino ou suíno e utilizada para tratar, com injeções diárias, pacientes diabéticos do tipo I (BANTING et al., 1922). Entretanto, nem toda proteína animal tem funcionalidade no organismo humano. O hormônio de crescimento, por exemplo, utilizado para tratar a deficiência de crescimento, é espécie-específica. Portanto, a partir de 1957, este hormônio foi isolado de glândulas pituitárias de cadáveres humanos para utilização terapêutica (STROBL; THOMAS, 1994).

Outras terapias de reposição foram sendo aperfeiçoadas ao longo do tempo, como é o caso do tratamento da hemofilia. Os primeiros tratamentos surgiram nas primeiras décadas dos anos 1900, com a transfusão de sangue total, evoluindo para os preparados de plasma, seguidos pelos fatores crioprecipitados e plasma fresco congelados. A partir da década de 1970, vieram os concentrados dos fatores de coagulação, purificados a partir

de *pools* de plasma de doadores de sangue, que permitiriam um tratamento eficaz, não apenas sob demanda, nos episódios agudos de sangramento, mas também seu uso profilático a longo prazo (MANNUCCI, 2020).

No entanto, nem todas as proteínas com potenciais aplicações terapêuticas conseguem ser obtidas e purificadas a partir de fontes naturais. Este é o caso da eritropoetina (EPO). A EPO é um fator de crescimento hematopoiético que atua na diferenciação e proliferação das hemácias e, portanto, utilizada no tratamento de anemias em pacientes com doença renal crônica. O uso terapêutico a partir da EPO endógena foi inviabilizado por dificuldades na sua purificação, como limitação técnica (liberação de enzimas proteolíticas durante a obtenção de EPO direto do rim) e quantidade insuficiente (a concentração de EPO nos fluidos corporais é baixíssima) (BUNN, 2013; MORADI et al., 2020). Com isso, o controle da anemia, em 25% dos pacientes com doença renal crônica, era realizado mediante transfusão de sangue de maneira regular (JELKMANN, 2007).

Apesar da disponibilidade de tratamento, as terapias de reposição existentes até o início da década de 1980 ainda conferiam algumas desvantagens. A utilização de medicamentos extraídos de fontes animais, como a insulina, por exemplo, podia desencadear uma forte reação imunológica (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Alguns produtos purificados obtidos tinham uma disponibilidade bastante limitada, impactando a sua aplicação médica. A terapia de reposição com o hormônio de crescimento humano, por exemplo, era restrita apenas às crianças com os casos mais graves de baixa estatura (HØYBYE et al., 2015). No entanto, a principal desvantagem era a possibilidade de transmissão de patógenos. Em 1985, um paciente jovem faleceu pela doença de Creutzfeld-Jakob, devido à transmissão do príon em purificados de hormônio de crescimento humano. Imediatamente, o tratamento foi suspenso pela NPA (*National Pituitary Agency* dos EUA) e por outras agências no mundo. Após esse caso, vários outros relatos também foram reportados (GRABER; REITER; ROGOL, 2021; RANKE; WIT, 2018). Porém, a maior tragédia ocorreu no início dos anos de 1980, período em que os concentrados dos fatores de coagulação sanguíneos foram os responsáveis por transmitir HIV (vírus da imunodeficiência humana), HCV (vírus da hepatite C) e HBV (vírus da hepatite B) para uma expressiva quantidade de pacientes hemofílicos. Nos EUA, 78% dos hemofílicos contraíram HIV e 74-90% contraíram HCV (GUPTA et al., 2017).

Felizmente, a década de 1970 também testemunhou avanços na biologia molecular e o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, o que permitiu expressar um gene de um organismo em um outro or-

ganismo diferente, uma vez que a síntese proteica é um processo universalmente conservado (COHEN et al., 1973; JACKSON; SYMONS; BERG, 1972). Com isso, o gene humano da proteína de interesse pôde ser isolado, manipulado e inserido em um organismo heterólogo (sendo os mais utilizados bactérias, leveduras e células de mamíferos) para a síntese e obtenção da molécula. O processo produtivo de proteínas recombinantes não apenas abriu caminhos para a produção de quantidades ilimitadas de produtos terapêuticos, possibilitou, também, a produção de proteínas que não eram obtidas a partir das fontes naturais, além de gerar produtos mais seguros para serem aplicados em humanos.

A primeira proteína recombinante aprovada e comercializada para uso em humanos foi a insulina. Em 1982, a empresa Genentech, em parceria com a Eli Lilly, lançou no mercado o medicamento Humulin®, utilizado no controle da diabetes, produzido pela bactéria *E. coli*. A partir deste momento, proteínas recombinantes passaram a ser produzidas, pela indústria biotecnológica, tornando-se uma importante classe (ainda em crescimento), de medicamentos terapêuticos com aplicabilidade clínica, no diagnóstico e tratamento de diversas doenças. Exemplos são (i) o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), empregado no combate ao infarto agudo do miocárdio; (ii) a EPO, empregada no combate à anemia associada à insuficiência renal e aos efeitos colaterais dos tratamentos oncológicos; (iii) os fatores estimuladores de colônias (como o G-CSF), utilizados no tratamento de deficiências de glóbulos brancos para o fortalecimento do sistema imune; (iv) os fatores de coagulação sanguínea VIII e IX, usados no tratamento de hemofílias; (v) enzimas lisossomais, empregadas para corrigir erros inatos do metabolismo (como a betaglucocerebrosidase, utilizada no tratamento da doença de Gaucher); e (vi) anticorpos monoclonais, usados tanto na detecção (em exames *in vivo*) quanto no tratamento de diversos tipos de câncer e doenças inflamatórias; dentre outros.

9.2 BIOFÁRMACOS: DEFINIÇÕES, ASPECTOS ESTRUTURAIS E DE FABRICAÇÃO

Os medicamentos produzidos pela tecnologia do DNA recombinante passaram a ser classificados como biofármacos. Apesar de o termo não ter uma definição universal, podendo abranger produtos oriundos desde os primeiros processos biotecnológicos de produção de vacinas em cultivos de células e produtos biológicos obtidos por meio de fontes naturais (como produtos purificados do plasma humano), utilizamos uma definição mais específica. Biofármacos são produtos manipulados por engenharia genética e produzidos a partir de pro-

cessos biotecnológicos, utilizando organismos vivos, com aplicação farmacêutica (KESIK-BRODACKA, 2018). Apesar de englobar quase que exclusivamente proteínas recombinantes, outros produtos, como ácidos nucleicos (oligonucleotídeos antissenso, aptâmeros, RNA interferente, vacinas de DNA ou RNA e terapia gênica), peptídeos e terapia celular, também, podem ser classificados como biofármacos (RADER, 2008). Este capítulo tratará apenas das proteínas recombinantes. Os outros produtos serão tratados nos capítulos 15 (terapia gênica e celular) e 16 (ácido nucleico).

Diferentemente dos fármacos convencionais, que são pequenos, simples e produzidos por síntese química, as proteínas recombinantes de uso terapêutico são moléculas grandes, complexas e produzidas em sistemas biológicos, ou seja, células vivas. Um fármaco convencional como o ácido acetilsalicílico (mais conhecido como aspirina) é composto por 21 átomos e possui a massa molar de 180 Da. Os biofármacos, no entanto, em sua maioria, são proteínas compostas por 2.000 a 25.000 átomos, variando de 19.000 a 200.000 Da (19-200 kDa), ou seja, 100 a 1.000 vezes maiores (Figura 9.1) (KESIK-BRODACKA, 2018). Além disso, são mais complexos estruturalmente, pois são formados por cadeias polipeptídicas enoveladas de maneira específica a manter sua atividade biológica, formando estruturas secundária, terciária e quaternária (nem todas as proteínas possuem estrutura quaternária). Muitos biofármacos também necessitam de modificações que ocorrem após a síntese proteica (chamadas de modificações pós-traducionais) para serem biologicamente ativos.

Dentre as principais modificações, destacam-se: formação de pontes dissulfeto, clivagem proteolítica, glicosilação, gama-carboxilação, fosforilação, hidroxilação, sulfatação e acetilação. Essas modificações ocorrem por vias enzimáticas específicas, que precisam estar disponíveis na célula hospedeira produtora e, por isso, é tão importante a escolha do sistema de expressão. A maioria das modificações é exclusiva de proteínas direcionadas para a via de secreção e, portanto, ocorrem durante a passagem da proteína pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi (WALSH, 2010).

A modificação pós-traducional mais importante, mais frequente e a mais complexa é a glicosilação. Ela consiste na adição enzimática de oligossacarídeos (glicanos) à cadeia peptídica nascente no retículo endoplasmático. Os glicanos adicionados ao grupamento amina de um resíduo de asparagina são denominados de N-glicanos. Os glicanos ligados à hidroxila de resíduos de serina ou treonina são denominados de O-glicanos. A N-glicosilação é a mais importante e, portanto, a mais estudada. Após a adição do bloco de oligossacarídeos pré-formado, ocorre uma série de processamentos enzimáticos envolvendo uma variedade de glicosidases e glicosiltransferases, responsáveis pela remoção e adição de monossacarídeos.

Essas reações de maturação, que ocorrem no retículo endoplasmático, são altamente conservadas entre os eucariotos inferiores e superiores. Entretanto, por apresentarem um repertório genético diferente e, conseqüentemente, um repertório enzimático também diferente, as reações que ocorrem no complexo de Golgi

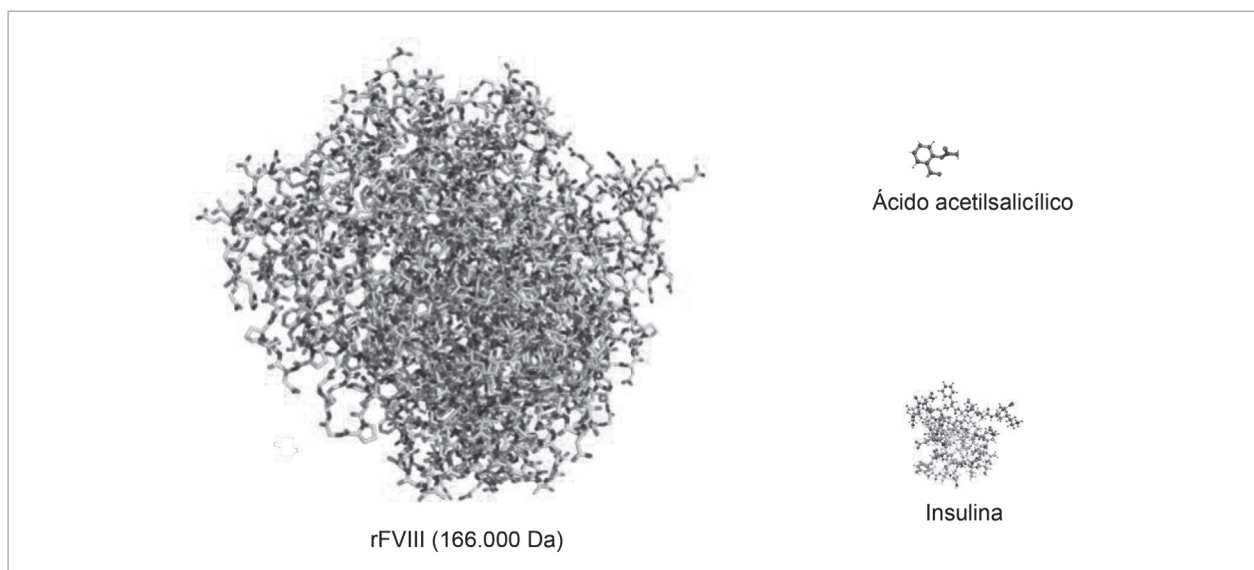


FIGURA 9.1 Comparação entre as estruturas moleculares do ácido acetilsalicílico, fator VIII recombinante e insulina recombinante.

Fonte: adaptada de Lagassé et al. (2017) utilizando elementos da Wikimedia licenciados por Creative Commons.

variam entre as espécies e tipos celulares, resultando em estruturas glicanas bastante distintas (Figura 9.2). Devido à biossíntese dos glicanos não ser guiada por um molde, a síntese de glicoproteínas resulta em um conjunto extremamente diverso de glicofomas, variando na composição monossacarídica, nos tipos de ligações glicosídicas, na sua estrutura (p. ex., ramificações) e no seu nível de maturação (GOH; NG, 2018; KHAN et al., 2017). São conhecidos mais de 200 genes que expressam diferentes glicosiltransferases, que contribuem para a glicosilação em células de mamíferos e, pelo menos, 176 têm função definida em 16 vias de glicosilação para formar a diversidade de estruturas glicosiladas presentes em glicoproteínas.

Quando presente, a glicosilação é um dos atributos de qualidade mais importantes nas proteínas terapêuticas, uma vez que o conjunto de glicanos influenciará as suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, como sua carga, proteção contra degradação proteolítica, conformação, secreção, taxa de eliminação, solubilidade, estabilidade, interação com o seu receptor e, principalmente, a sua atividade biológica e imunogenicidade (BUTLER, 2011; GOMORD; FAYE, 2004; NARIMATSU et al., 2021; SCHJOLDAGER et al., 2020).

Além das diferenças estruturais, em relação aos fármacos convencionais, outra característica marcante dos biofármacos é a variabilidade dos seus processos produtivos. Por serem produzidos por organismos vivos (bactérias, leveduras, células de mamíferos, células humanas ou células vegetais), os ambientes intracelular e extracelular têm influência no produto gerado. O ambiente intracelular é determinado pela fisiologia celular, que é relacionada com a taxa de crescimento, viabilidade e ciclo celular, por exemplo. O ambiente extracelular é caracterizado pelas variáveis de cultivo, como temperatura, pH, osmolalidade, concentração de nutrientes, concentração de metabólitos, agitação mecânica, oxigênio dissolvido, tensão de cisalhamento, dentre outros.

Por esse motivo, infere-se que “o processo define o produto”, ou seja, qualquer variação no processo produtivo pode impactar a qualidade do produto gerado. Desta forma, é esperado que as proteínas recombinantes produzidas sejam um conjunto de formas heterogêneas (principalmente quando se trata de proteínas glicosiladas, gerando um conjunto de glicofomas) e, conseqüentemente, existe um potencial de variabilidade entre os lotes produzidos pelo mesmo fabricante, mesmo com todos os controles de parâmetros críticos de produção (KESIK-BRODACKA, 2018; RADER, 2008).

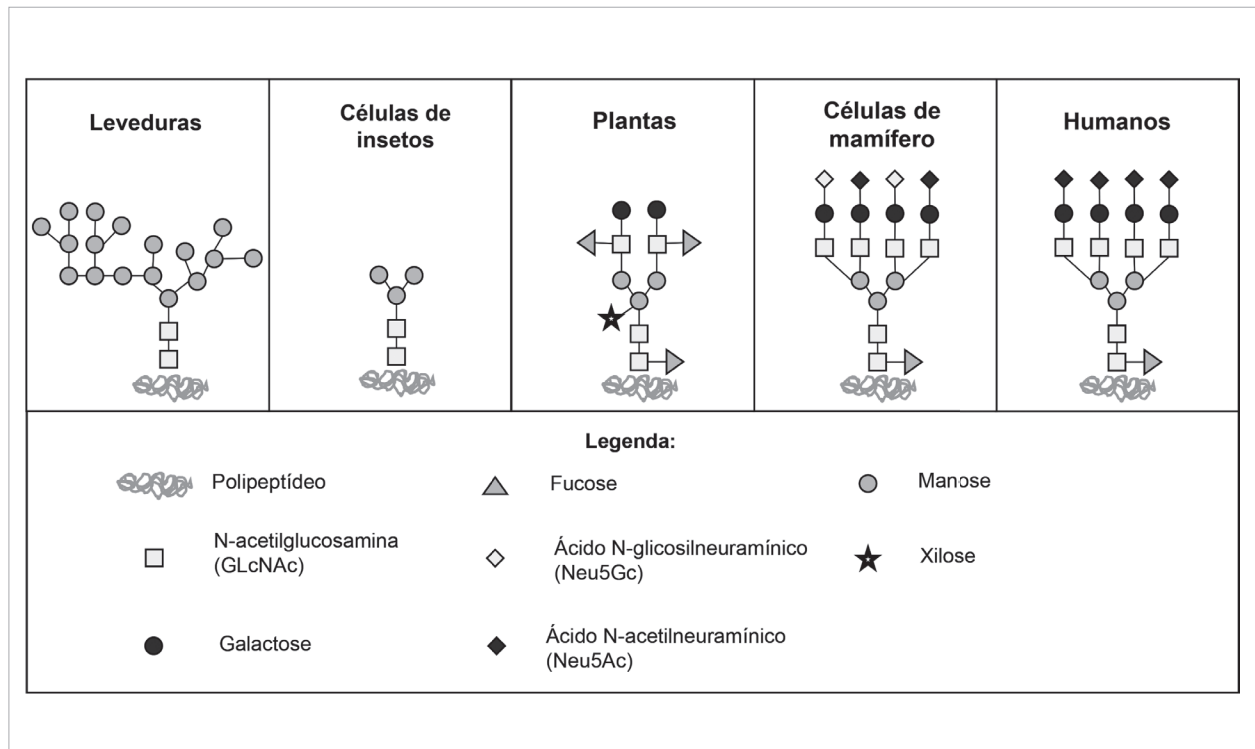


FIGURA 9.2 Comparação do perfil de N-glicosilação em diferentes sistemas de expressão.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Khan et al. (2017).

Os fármacos convencionais são fabricados como substâncias ultrapuras, praticamente idênticas, e a composição do produto gerado é verificada facilmente. No entanto, os biofármacos, por apresentarem essa variabilidade intrínseca do processo produtivo biológico, precisam ter suas propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas monitoradas por uma quantidade maior de análises, envolvendo metodologias mais específicas e com resultados em conformidade com as faixas de aceitação pré-definidas.

As proteínas, geralmente, desempenham funções muito específicas e complexas, nas quais seu mecanismo de ação, muitas vezes, é desconhecido. Os fatores de crescimento, por exemplo, são proteínas sintetizadas por determinadas células presentes em um órgão. Ao serem liberados na corrente sanguínea, irão percorrer um trajeto até o seu alvo específico, reconhecendo e se ligando a receptores presentes na superfície de progenitores celulares. Essa ligação desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, com a regulação de diversos genes, o que resulta na proliferação da célula na sua forma diferenciada. Fármacos químicos não conseguem atuar desta forma. Sua ação é genérica, atuando no corpo inteiro. Os biofármacos possuem um potencial menor de interferir nos processos biológicos e, por isso, são menos propensos a causar reações adversas (LEADER; BACA; GOLAN, 2008).

Entretanto, devido à sua complexidade, os biofármacos são moléculas mais sensíveis e, conseqüentemente, apresentam algumas desvantagens e enfrentam diversos desafios. As proteínas recombinantes são propensas à degradação, tanto química quanto enzimática, e possuem penetrabilidade limitada, devido ao seu grande tamanho e hidrofobicidade, o que dificulta, ou inviabiliza, a utilização de vias de administração não parenterais, principalmente oral (AGU et al., 2001). No entanto, mesmo sendo largamente administrados de maneira injetável, os biofármacos, ainda, sofrem com baixa estabilidade da proteína e meias-vidas curtas de circulação, o que resulta em regimes de tratamentos de reposição mais frequentes.

Este é o caso da insulina, que geralmente precisa ser administrada, via subcutânea, no mínimo três vezes por dia, para o controle da glicemia; assim como o hormônio de crescimento, que precisa ser administrado diariamente, via subcutânea, para o tratamento da baixa estatura; e do fator de coagulação sanguínea VIII, que precisa ser administrado a cada 2-3 dias, via intravenosa, para o tratamento profilático de hemorragias. Estes regimes de terapia são muito exigentes, desconfortáveis e inconvenientes para o paciente (especialmente criança) e para a família, comprometendo a qualidade de vida. Esse cenário favorece uma adesão parcial ao tratamento,

podendo resultar em menor eficácia (KAPOOR et al., 2008; MANNUCCI; TUDDENHAM, 2001).

Somado às questões expostas, outro desafio imposto pela sensibilidade e baixa estabilidade dos biofármacos é o seu armazenamento. Diferentemente dos fármacos convencionais, o produto gerado precisa ser formulado com estabilizantes e possuir a logística de cadeia de frios para seu armazenamento e distribuição. Além disso, durante as diversas etapas do processo produtivo (desde a sua síntese até o armazenamento), as proteínas podem sofrer modificações estruturais que impactam sua farmacologia, como formação de agregados, desnaturação e/ou degradação.

Moléculas que apresentam características estruturais diferentes das proteínas nativas têm a capacidade de desencadear uma resposta imunogênica no paciente, o que é altamente indesejável. Um caso impressionante foi a alteração de formulação no produto Eprex® (eritropoetina recombinante), em 1998. Para prevenir a transmissão de príons, o fabricante Ortho-Biotech substituiu a albumina sérica humana por polisorbato-80 (PS-80) e glicina, como estabilizantes, na formulação final. Em conjunto, foi realizada outra alteração: a introdução da apresentação do produto em seringas pré-preenchidas utilizando rolhas de borracha não revestidas. No período entre 1998 e 2003, a incidência de pacientes com doença renal crônica apresentando PRCA (aplasia eritrocitária pura) mediada por anticorpo anti-EPO aumentou, totalizando quase 200 casos em todo o mundo (antes desse período, só haviam sido descritos três casos). Após a substituição por rolhas revestidas por Teflon®, a incidência de PRCA mediada por anticorpo anti-EPO diminuiu, retomando a taxas muito baixas. Algumas hipóteses foram levantadas, como (i) a liberação de lixiviados das rolhas de borracha pelo PS-80, atuando como adjuvantes; (ii) a formação de micelas carregadas com agregado de EPO recombinante em PS-80; ou (iii) a baixa estabilidade do PS-80 deixou o produto mais susceptível ao estresse da cadeia de frios, resultando na formação de proteína desnaturada ou agregada (MCKOY et al., 2008). Isto demonstra como modificações estruturais na molécula (ou impurezas) podem ocorrer durante alguma etapa do processo produtivo.

Apesar de a produção em larga escala contornar os problemas relacionados à disponibilidade dos biofármacos para a terapia dos pacientes, o processo produtivo também apresenta diversos desafios. A começar pela escolha do sistema de expressão. Diversos são os sistemas de expressão que podem ser empregados na produção de proteínas recombinantes terapêuticas. Nem sempre a escolha do sistema será baseada naquele que oferece o melhor rendimento com menor custo. A definição da escolha ocorre principalmente pelas características

estruturais (sobretudo as modificações pós-traducionais) necessárias para a atividade biológica da molécula. Por exemplo, proteínas aglicosiladas ou que não dependem da glicosilação para exercerem a sua função podem ser sintetizadas em sistemas procarióticos ou em sistemas eucarióticos inferiores. Entretanto, proteínas que apresentam glicosilação complexa precisam ser sintetizadas em sistemas que realizam esse tipo de modificação, como células de mamíferos, células humanas e plantas.

O sistema de expressão mais utilizado para a produção de glicoproteínas é o de células de mamífero, sendo a célula CHO (célula de ovário de hamster chinês) a mais importante. No entanto, as células CHO podem apresentar desafios relacionados ao rendimento (principalmente quando produzem biofármacos grandes e complexos, como o fator de coagulação sanguíneo VIII) e ao custo de cultivo (por conta de seus requerimentos nutricionais) quando comparadas a outros sistemas.

A proteína terapêutica, por ser produzida a partir do gene humano que expressa a proteína natural, confere, em teoria, a vantagem de o organismo humano reconhecer o medicamento como próprio (*self*) e não desencadear uma resposta imunológica contra ele. Porém, mesmo com a escolha criteriosa do sistema de expressão, o padrão de glicosilação (quando presente) impõe mais um desafio na produção dos biofármacos. A célula CHO, de fato, entrega o perfil de glicosilação mais próximo ao dos humanos. No entanto, o mecanismo de glicosilação é tipo celular espécie e específica e, portanto, diferenças serão encontradas, como a adição do ácido siálico N-glicolilneuramínico (NGNA), inexistente em humanos, mas presente em roedores. Além disso, impurezas relacionadas ao processo produtivo (como DNA e proteínas da célula hospedeira) e impurezas relacionadas ao produto (como os agregados e produtos de degradação e desnaturação, mencionados anteriormente) também podem estar presentes no produto gerado e resultarem em imunogenicidade.

Embora possa ocorrer a indução da formação de anticorpos contra as proteínas recombinantes terapêuticas, isso geralmente não é um impedimento à sua utilização. A produção de anticorpos, quando ocorre, geralmente é transiente e, na maioria das vezes, não tem ação neutralizante (PORTER, 2001). No entanto, quando ocorrem de maneira neutralizante, podem gerar efeitos adversos graves, pois não irão apenas inibir a proteína recombinante, mas também a proteína endógena. Portanto, é extremamente importante o monitoramento de determinadas características dos biofármacos, não apenas durante o seu processo produtivo (controle em processo), mas também na liberação dos lotes (controle de qualidade) e durante o seu armazenamento (estudo de estabilidade).

Como discutido, os biofármacos se diferem bastante dos fármacos convencionais devido à sua complexidade estrutural, funcional e de fabricação. As instalações, equipamentos, infraestruturas e equipe especializada também são bastante diferenciados, o que se reflete no custo de produção. O processo de desenvolvimento de um biofármaco, desde sua concepção até sua liberação no mercado, envolve intensa pesquisa e dedicação (geralmente, 10-20 anos) e investimento (geralmente alcançando a ordem de bilhões de dólares). Na fase de produção, além de o investimento em capital (construção da fábrica) ser maior em comparação ao medicamento químico, o operacional também tem um custo elevado.

Um dos motivos do alto custo do processo de obtenção de biofármacos é a etapa de purificação, pois os níveis de contaminantes no produto final devem ser extremamente reduzidos. Por exemplo, para os dois principais contaminantes, HCP (proteínas da célula hospedeira, do inglês *Host Cell Proteins*) e DNA residual, os níveis requeridos são de 100 ppm (recomendado por um consenso na indústria) e 10 ng/dose (exigência regulatória), respectivamente. Isso acarreta pelo menos três etapas cromatográficas para purificar um biofármaco (mais detalhes no Capítulo 11). Portanto, o uso de diversas etapas cromatográficas (operação mais cara de um processo de produção de biofármaco, em termos de insumos necessários), acrescidas de etapas de filtração (para redução de carga microbiana, vírus e condicionamento do produto) incorpora muito custo ao processo. Além disso, quanto menor for a atividade específica do biofármaco (unidade de atividade/massa de proteína recombinante) mais massa de proteína será necessário adicionar por frasco para que o tratamento seja efetivo. Isso remete que alguns biofármacos tenham valores de mercado exorbitantes, uma vez que, apesar do aprimoramento dos rendimentos, a célula produz uma quantidade de massa de proteína limitada por cultivo. Adicionalmente, as diversas etapas de purificação implicam perdas significativas de rendimento ao longo do processo.

A seguir serão apresentadas as principais classes de proteínas recombinantes e alguns de seus respectivos exemplos, destacando a vasta possibilidade de tratamentos disponíveis a partir desses biofármacos.

9.3 PRINCIPAIS CLASSES DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE USO TERAPÊUTICO

As proteínas recombinantes terapêuticas podem ser segregadas em seis principais classes: (i) fatores de coagulação sanguínea; (ii) hormônios; (iii) citocinas; (iv) enzimas; (v) proteínas de fusão; e (vi) anticorpos monoclonais. O objetivo dessa seção é apresentar o

conceito de cada categoria e mostrar a diversidade de moléculas recombinantes aprovadas para uso terapêutico (SEKHON, 2010).

9.3.1 Fatores de coagulação sanguínea

Esta classe inclui qualquer proteína que participa do processo de coagulação sanguínea. A coagulação do sangue é o principal mecanismo do corpo para controlar perdas sanguíneas excessivas. Uma lesão externa ou interna, de um animal ou ser humano, desencadeia inúmeras reações de proteólise, responsáveis por ativar diversas proteínas precursoras circulantes no sangue, os chamados fatores de coagulação sanguíneos. O resultado desta cascata de ativação é a formação de expressiva quantidade de fibrina para a formação de um coágulo no local do dano tecidual, interrompendo então o sangramento. A deficiência ou ausência de algum desses fatores resulta em distúrbios de coagulação. As mais frequentes e, conseqüentemente, mais conhecidas são as que afetam os fatores VIII (FVIII) e IX (FIX), que resultam nas hemofilias A e B, respectivamente.

Os fatores são denominados em sua maioria por números em algarismo romano e, quando acompanhados da letra “a”, isso indica que é a forma ativada do fator. A maioria dos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX, X, XI, XII, por exemplo), quando ativados, são convertidos em enzimas serino-proteases, enquanto outros se tornam cofatores (FV, FVIII e FvW), e o FXIII se torna uma transglutaminase. Apesar de muitos fatores de coagulação serem enzimas, eles não são classificados nesta categoria pela especificidade de ação, dentro do processo de coagulação.

Os fatores de coagulação recombinantes aprovados para uso em humano são, até o momento, os fatores de von Willebrand, IIa (trombina), VIIa, VIII, IX, Xa e XIII, sendo aplicados, respectivamente, para os casos de: doença de von Willebrand; controle do sangramento em cirurgias; hemofilia A e B; algumas outras formas específicas de hemofilia; reversão de inibidores do fator Xa, que correspondem aos medicamentos apixaban e rivaroxaban; deficiência da subunidade A do fator XIII. O primeiro fator de coagulação recombinante aprovado foi o fator VIII, medicamento denominado de Recombinate®, da empresa Baxter Healthcare, em 1992 nos EUA, utilizado no tratamento da hemofilia do tipo A, doença genética caracterizada pela ausência ou deficiência na produção do fator VIII (WALSH; WALSH, 2022).

9.3.2 Hormônios

Esta classe inclui proteínas produzidas e secretadas por glândulas endócrinas (glândulas que secretam

substâncias diretamente na corrente sanguínea ou vasos linfáticos) e que exercem um efeito fisiológico específico no organismo, como regular o crescimento, por exemplo.

Dentro do desenvolvimento da biotecnologia, a classe de hormônios foi a primeira categoria explorada com sucesso. O primeiro biofármaco aprovado para uso em humanos foi a insulina, em 1982. No item 7 será apresentado, detalhadamente, o desenvolvimento de diferentes tipos de insulina, o que ilustra bem os benefícios da tecnologia do DNA recombinante.

Esta classe é vastamente explorada na biotecnologia, devido à possibilidade de ações terapêuticas que vão além do controle da diabetes, como: (i) no combate a osteoporose (p. ex., Forteo®, teriparatida, fragmento do hormônio paratireoide humano recombinante, aprovado em 1987 pelo EUA); (ii) infertilidade (p. ex., Follistim®, folitropina beta, hormônio folículo-estimulante recombinante, aprovado em 1997 nos EUA; Luveris®, alfalutropina, hormônio luteinizante recombinante, rLH, aprovado em 2000 na Europa); (iii) detecção e tratamento do câncer de tireoide (p. ex., Thyrogen®, alfatirotropina, hormônio estimulador da tireoide recombinante, rTSH, aprovado em 1998 nos EUA); (iv) controle da hipocalcemia em pacientes com hipoparatiroidismo crônico (p. ex., Natpar, hormônio da paratireoide recombinante, rPTH, aprovado em 2017 na Europa); e (v) deficiência do hormônio do crescimento, GH, em crianças (p. ex., Humatrope®, somatropina – hormônio do crescimento recombinante, rGH, aprovado em 1987 nos EUA). Além disso, o glucagon recombinante é utilizado para tratar hipoglicemia em pacientes com diabetes submetidos ao tratamento com insulina (p. ex., Glucagen®, glucagon recombinante, aprovado 1998 nos EUA), pelo fato de esse hormônio ser responsável pela manutenção dos níveis de glicose em jejum e por estimular a produção de glicose hepática, promovendo a gliconeogênese e glicogenólise (WALSH; WALSH, 2022).

9.3.3 Citocinas

Citocinas são proteínas que desempenham a função de comunicação intercelular. Elas atuam se ligando a receptores nas membranas plasmáticas, induzindo a ativação de cascatas bioquímicas. A sinalização intracelular culmina em processos de divisão, proliferação, diferenciação e/ou migração celular e sobrevivência da célula. Outra função destas moléculas é regular a produção e atividade de outras citocinas que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória.

As famílias de citocinas que possuem moléculas recombinantes aprovadas para uso em humano são: interleucinas (IL), interferons (INF), fator de necrose

tumoral (TNF) e fatores de crescimento hematopoiéticos. A seguir tem-se uma breve descrição dessas famílias ou subfamílias de citocina, acompanhada de alguns exemplos de moléculas recombinantes terapêuticas:

(i) Fator de necrose tumoral: o TNF é membro de uma superfamília de proteínas que contém também várias proteínas transmembranares que possuem domínios homólogos ao TNF. A principal função do TNF é na regulação de células imunes. Como um pirogênio endógeno, é capaz de induzir febre, morte celular apoptótica, caquexia (perda de tecido adiposo e muscular dos ossos) e inflamação, inibir a tumorigênese e a replicação viral e responder à sepse (quando a resposta inflamatória do corpo a uma infecção causa danos ao próprio corpo) via células produtoras de IL-1 e IL-6. Existe apenas um produto biofarmacêutico recombinante aprovado (nome do princípio ativo: tasonermina), que consiste no TNF- α humano recombinante. O TNF- α consiste em uma adipocina, citocina secretada por células do tecido adiposo. É indicado como adjunto a cirurgias para subsequente remoção de tumor, para prevenir ou retardar amputação. Além de ser utilizado como um biofármaco, o TNF ou receptores do TNF são alvos de outros biofármacos utilizados no tratamento principalmente de doenças inflamatórias autoimunes, porém de forma a neutralizar a atividade TNF alfa (SETHI; HOTAMISLIGIL, 2021; WALSH; WALSH, 2022).

(ii) Interleucinas: é uma família de proteínas produzidas por diferentes tipos de células, dentre elas os macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais, ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Cada molécula possui uma função específica; contudo, a maioria delas está envolvida na ativação ou supressão do sistema imune e na indução da divisão de outras células. Existem somente três produtos recombinantes que são interleucinas ou que têm relação com a ativação de uma interleucina, sendo eles: (a) o antagonista de receptor da interleucina-1 recombinante (rhIL-1ra), utilizado no tratamento da artrite idiopática juvenil; (b) a interleucina-11 recombinante (com ausência da prolina N-terminal), utilizada para prevenir trombocitopenia decorrente de quimioterapia; (c) a interleucina-2 recombinante (ausência de alanina N-terminal e substituição de aminoácido C125S), que estimula linfócitos T e é utilizada no tratamento de carcinoma de células renais (KAISER, 2004; WALSH; WALSH, 2022).

(iii) Interferons: é um grupo de citocinas imunorreguladoras de amplo espectro, organizadas em três classes: tipo I, II e III. Essa classificação ocorre de acordo com o complexo receptor pelo qual sinalizam. Em humanos, existem 7 subtipos de IFNs do tipo I: IFN α , IFN β , IFN κ ,

IFN ϵ , IFN ω , IFN τ e IFN δ , sendo o IFN α e o IFN β os mais estudados. Este tipo de IFN se liga ao complexo IFNAR (receptor de IFN α) e possui atividade antiviral de amplo espectro contra vírus de RNA, induzindo a própria célula infectada e células próximas a produzirem proteínas que impedem a replicação do vírus. Além disso, também induz atividade antiproliferativa e imunomoduladora em vários tipos de células. O interferon-gama é do tipo II, sendo o único que se liga ao complexo receptor interferon-gama (IFNGR) e induz uma ampla resposta imune a patógenos que não sejam vírus. Os interferons do tipo III incluem três membros, IFN- λ (lambda) 1, 2 e 3, que apresentam atividades antiproliferativas e antivirais, produzidos principalmente por células dendríticas plasmocitoides. Contudo, não existem biofármacos baseados em interferons do tipo III. Existem sete princípios ativos de interferons com registro ativo na Europa e nos EUA (Tabela 9.1), a diferença entre eles é o sistema de expressão (CHO ou *E. coli*), a ligação com o polietilenoglicol (PEG); o interferon beta 1b difere da molécula nativa por possuir uma alteração na cadeia de aminoácidos (substituição cisteína por serina na posição 17) e o ropeginterferon alfa-2b, que possui uma prolina N-terminal conjugada ao PEG ramificado (2 cadeias) de 40 kDa (DE ANDREA et al., 2002; VILCEK, 2003; WALSH; WALSH, 2022).

(iv) Fatores de crescimento hematopoiéticos: são substâncias naturais capazes de estimular a proliferação celular, a cicatrização de feridas e a diferenciação celular. Os fatores de crescimento normalmente atuam como moléculas de sinalização entre as células. A família dos fatores de crescimento hematopoiéticos é bastante explorada pela biotecnologia por meio do desenvolvimento de diversos produtos. Os biofármacos desenvolvidos dentro dessa classe têm como principais moléculas a eritropoetina (EPO), o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).

A EPO é a responsável por regular a produção de glóbulos vermelhos (hemácias), atuando como fator de sobrevivência, de proliferação e de diferenciação celular, tendo como função global a manutenção da quantidade de hemácias e a oxigenação tecidual no nível fisiológico. A molécula é indicada para o tratamento, principalmente de pacientes com anemia associada à doença renal crônica. A primeira EPO recombinante foi desenvolvida pela Amgen, aprovada em 1989 nos EUA e comercializada pela Amgen, Johnson & Johnson/Janssen e Kirin, sob diferentes nomes. Até o momento, existem cinco princípios ativos análogos à EPO (com diferenças estruturais entre si) e dois bioequivalentes aprovados nos EUA e/ou na Europa e em vários outros países ao redor do mundo. Por se tratar de uma glicoproteína, em que os

TABELA 9.1 Interferons recombinantes aprovados nos Estados Unidos e Europa

Princípio ativo	Sistema de expressão	Nome comercial	Indicação	Ano da 1ª aprovação
Interferon gama-1b	<i>E. coli</i>	Actimmune®	Doença crônica granulomatosa	1990
Interferon beta-1b	<i>E. coli</i>	Betaseron® Betaferon® Extavia®	Esclerose múltipla recorrente-remitente/ esclerose múltipla/esclerose múltipla progressiva recorrente	1993 1995 2008
Interferon beta-1 ^a	CHO	Avonex® Rebif®	Esclerose múltipla progressiva recorrente/esclerose múltipla recorrente-remitente	1996 1998
Peginterferon beta-1 ^a	CHO	Plegridy®	Esclerose múltipla	2014
Interferon alfa-2b (ribavirin)	<i>E. coli</i>	Alfatronol® Rebetron®	Câncer, verrugas genitais, hepatite B e C, HPV/hepatite C crônica	1986 1999
Peginterferon alfa-2b	<i>E. coli</i>	PEG-Intron® Pegasys®	Hepatite C crônica/hepatite C	2001 2002
Ropeginterferon alfa-2b	<i>E. coli</i>	Besremi®	Policitemia vera	2019

Fonte: adaptada de Walsh e Walsh (2022).

N-glicanos desempenham um papel muito importante na secreção, estabilidade, solubilidade e eliminação da molécula, o sistema de expressão utilizado é baseado em células de mamífero, principalmente células CHO (JELKMANN, 2007; WALSH; WALSH, 2022).

O G-CSF é responsável pelo estímulo à produção de neutrófilos, sendo indicado para o tratamento de neutropenia, principalmente oriunda de tratamento contra o câncer. O primeiro G-CSF recombinante foi desenvolvido pela Amgen e aprovado em 1991 nos EUA sob o nome de Neupogen® (princípio ativo filgrastima). Apesar de a molécula de G-CSF possuir uma O-glicosilação, esta não possui influência na sua atividade biológica e, por isso, Neupogen® foi produzido em *E. coli*. O filgrastima se difere do G-CSF natural por possuir uma metionina adicional no N-terminal e por não possuir a O-glicosilação. Mesmo não sendo estruturalmente idênticas, as propriedades farmacológicas das proteínas são bastante similares.

Existem três princípios ativos diferentes de G-CSF (filgrastrima, pegfilgrastrima e lipegfilgrastrima). A diferença entre eles consiste no fato de as duas últimas moléculas serem peguiladas em sítios distintos e por processos de peguilação diferentes. Apesar das diferenças, as moléculas apresentaram o mesmo comportamento em termos de eficácia e segurança. O último possui uma O-glicosilação formada enzimaticamente, a qual é utilizada na ligação com o polietilenoglicol (MAHLERT et al., 2013). O objetivo dessas mudanças foi aumentar a meia-vida da molécula no organismo. Após o ano de 2008 uma série de produtos biossimilares (20 biofármacos) foram aprovados nos EUA e na Europa (MEHTA; MALANDRA; COREY, 2015; WALSH; WALSH, 2022).

O GM-CSF é um fator de crescimento hematopoiético que regula a proliferação e diferenciação de

macrófagos e granulócitos. Existe apenas um GM-CSF recombinante aprovado para uso em humano, o Leukine®, cujo princípio ativo é chamado de sargramostima. A molécula recombinante é produzida em *E. coli* e se diferencia da nativa pela substituição R23L, que consiste na substituição do aminoácido arginina por leucina na posição 23. O medicamento foi aprovado em 1991 nos EUA com indicação para uso em transplante autólogo de medula óssea (LOTFI et al., 2019).

9.3.4 Enzimas

As enzimas são proteínas com o papel de catalisar reações químicas no organismo, fundamentais para o apropriado funcionamento do metabolismo. Além disso, participam na construção das proteínas produzidas pelas células. Atualmente existem seis classes principais: (i) oxido-redutases; (ii) transferases; (iii) hidrolases; (iv) liases; (v) isomerases; e (vi) ligases.

Com relação às enzimas recombinantes utilizadas para fins terapêuticos, as mais relevantes pertencem à classe das hidrolases, dentre as quais pode-se destacar: (i) betaglucocebrosidase; (ii) alfa-glicosidase ácida; (iii) alfa-galactosidase A; e; (iv) L-asparaginase. As três primeiras são utilizadas em terapias de reposição enzimática (TRE) para tratamento de doenças lisossomais raras, respectivamente, doença de Gaucher, doença de Pompe e doença de Fabry. A L-asparaginase é utilizada como agente anticancerígeno (BATTOOL et al., 2016; LEADER; BACA; GOLAN, 2008). A maioria das enzimas recombinantes são para tratamento de doenças raras. De maneira a ilustrar melhor a variedade de doenças tratadas com enzimas recombinantes, a Tabela 9.2 contém a lista das enzimas terapêuticas aprovadas para uso humano.

TABELA 9.2 Exemplos de enzimas terapêuticas recombinantes de uso humano aprovadas pelo FDA/EMA

Enzimas recombinantes de uso terapêutico aprovadas para uso humano (FDA ou EMA)					
Enzima natural	Atividade catalítica	Nome do princípio ativo da enzima recombinante	Sistema de expressão	Indicação clínica	Ano da 1ª aprovação
Alfa-galactosidase A	Enzima lisossômica que atua no catabolismo de glicoesfingolipídios	Agalsidase alfa; agalsidase beta	CHO	Doença de Fabry (acúmulo de glicoesfingolipídios neutros com terminal α -galactosil no plasma e tecidos)	2001 2001
11-17-adenosina desaminase bovina (ADA)	Catalisa, irreversivelmente, o nucleosídeo adenosina (Ado) e 2' desoxiadenosina (dAdo) em inosina e 2' desoxinosina (diminui os níveis tóxicos de nucleotídeos de adenosina e desoxiadenosina)	Elapegademase-livr <i>E. coli</i>		Imunodeficiência combinada grave (ADA-SCID) – deficiência da enzima ADA	2018
Alfaglicosidase ácida	Hidrolase lisossômica que atua na degradação da molécula de glicogênio	Alglucosidase alfa; avalglucosidase alfa	CHO	Doença de Pompe (acúmulo de glicogênio dentro do lisossomo, impedindo que seja liberado para conversão em energia)	2006 2021
Alfa-L-iduronidase	Glicosidase que hidrolisa resíduos terminais ácidos α -L-idurônicos dos glicosaminoglicanos (GAGs), sulfato de dermatina e sulfato de heparina (GAGs produzidos por células de mamíferos que não podem se acumular no organismo)	Laronidase	CHO	Mucopolissacaridose I (deficiência da enzima Alfa-L-iduronidase)	2003
Alfamanosidase lisossomal	Catalisa a hidrólise de resíduos terminais não redutores de α -D-manose em α -D-manosídeos, liberando moléculas de manoses.	Velmanase alfa	CHO	Deficiência de alfa-D-manosidase lisossomal (acúmulo de oligossacarídeos causa danos neurodegenerativos)	2018
Betaglucocerebrosidease	Enzima lisossômica que tem como principal substrato a glicosilceramida (acúmulo causa inchaço em macrófagos)	Imiglucerase; velaglucerase; Alfataligicerase	CHO, células de fibrossarcoma humano, células de cenoura	Doença de Gaucher tipo I (deficiência da enzima betaglucocerebrosidease)	1994 2010 2012
Betaglucuronidase	Catalisa a hidrólise de resíduos de ácido β -D-glucurônico da extremidade não redutora de mucopolissacarídeos, como sulfato de heparan (tóxico para o organismo caso acumule nas células)	Vestronidase alfa	CHO	Mucopolissacaridose VII (síndrome de Sly) – deficiência da enzima betaglucuronidase	2017

(continua)

TABELA 9.2 Exemplos de enzimas terapêuticas recombinantes de uso humano aprovadas pelo FDA/EMA (continuação)

Enzima natural	Atividade catalítica	Nome do princípio ativo da enzima recombinante	Sistema de expressão	Indicação clínica	Ano da 1ª aprovação
Carboxypeptidase G2 de <i>Pseudomonas</i> sp.	Hidrolisa o resíduo de glutamato carboxil-terminal do ácido fólico e moléculas estruturalmente relacionadas, tais como o metotrexato (MTX)	Glucarpidase	<i>E. coli</i>	Concentrações tóxicas de metotrexato devido à depuração renal prejudicada	2012
Desoxirribonuclease I	Enzima que cliva por hidrólise o DNA, envolvida no reparo das moléculas de DNA (degrada DNA acumulado nos glóbulos brancos aliviando a formação de muco)	Dornase alfa (inalatório)	CHO	Fibrose cística (doença genética que afeta as células que produzem muco, suor e sucos digestivos. Isso faz que esses fluidos se tornem espessos e com viscosidade elevada, comprometendo pulmões e sistema digestivo – em pacientes com fibrose cística glóbulos brancos com DNA acumulam-se no muco)	1993
Esfingomielinase ácida	Enzima que catalisa a hidrólise da esfingomielina para gerar fosforicolina e ceramida (molécula associada a funções reguladoras do organismo)	Olipudase alfa	CHO	Deficiência de esfingomielinase ácido tipo A/B ou tipo B (doença de Niemann-Pick tipo B)	2022
Fenilalanina hidroxilase	Converte a fenilalanina no fígado no aminoácido L-Tirosina, que é precursor de adrenalina, noradrenalina e dopamina	Pegvaliase	<i>Anabaena variabilis</i>	Fenilcetonúria (acúmulo do aminoácido fenilalanina no sangue e aumento da excreção urinária de ácido fenilpirúvico)	2018
Hialuronidase	Enzima que despolimeriza reversivelmente o ácido hialurônico existente no cimento ao redor das células do tecido conjuntivo, reduzindo assim temporariamente a viscosidade desse tecido e tornando-o mais permeável à difusão de líquidos	Hialuronidase	CHO	Câncer – adjuvante para outras drogas (modifica a permeabilidade do tecido pela hidrólise do ácido hialurônico e ajuda a dispersar os alcaloides da vinca do tecido promovendo a reabsorção – antídoto usado no extravasamento de quimioterápicos – prevenção de lesões)	2013
Isoenzima tecidual não específica da fosfatase alcalina (FA)	A FA tem por ação catalisar a hidrólise de ésteres de ácido fosfórico, removendo o grupo fosfato em ambiente com pH alcalino (importante para atividade do fígado e saúde dos ossos)	Asfotase alfa	CHO-DG44	Hipofosfatase (deficiência da enzima fosfatase alcalina)	2015

(continua)

TABELA 9.2 Exemplos de enzimas terapêuticas recombinantes de uso humano aprovadas pelo FDA/EMA (continuação)

Enzimas recombinantes de uso terapêutico aprovadas para uso humano (FDA ou EMA)					
Enzima natural	Atividade catalítica	Nome do princípio ativo da enzima recombinante	Sistema de expressão	Indicação clínica	Ano da 1ª aprovação
L-Asparaginase	Hidrolisa o aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônio (células neoplásicas não sintetizam asparagina, ou seja, depende da asparagina circulante para sobreviver. Células normais sintetizam esse aminoácido)	Asparaginase <i>Escherichia coli</i> ; Asparaginase <i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Câncer (leucemia linfoblástica aguda)	2016 2021
Lipase ácida lisossomal	Degrada colesterol estratificado e triglicérides	Sebelipase alfa	Clara de ovo de galinhas transgênicas	Deficiência de lipase ácida lisossomal (acúmulo de gordura no fígado, intestino e parede dos vasos sanguíneos)	2015
N-acetilgalactosamina 6-sulfatase	Enzima lisossomal que degrada o queratan sulfato e condroitina-6-sulfato (p. ex., esses glicosaminoglicanos podem se acumular nas vias aéreas superiores e amídalas, causando obstrução)	Elosulfase alfa	CHO	Mucopolissacaridose IV tipo A (deficiência da enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatase)	2014
N-acetilgalactosamina-4-sulfatase	Responsável pela degradação dos glicosaminoglicanos sulfato de dermatina e sulfato de condroitina (são importantes componentes do tecido conjuntivo, desempenhando papel estrutural em todo o corpo, especialmente na pele, tendões, vasos sanguíneos, vias e válvulas cardíacas)	Galsulfase	CHO	Mucopolissacaridose VI (deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase)	2005
N-iduronato-2-sulfatase	Degrada os glicosaminoglicanos (GAGs), sulfato de dermatina e sulfato de heparina (exo-sulfatase que hidrolisa a ligação éster C2-sulfato de resíduos de ácido α -L-idurônico terminais não redutores de sulfatos de heparina e dermatina)	Idursulfase	Células de fibrossarcoma humano	Mucopolissacaridose II (síndrome de Hunter – deficiência da enzima N-iduronato-2-sulfatase)	2006
Plasmina humana	Limita crescimento do coágulo por meio da degradação da fibrina por hidrólise (um agente que tem propriedades líticas na interface vitreoretiniana)	Ocriplasmina	<i>Pichia pastoris</i>	Adesão vitreomacular sintomática (VMA) – o racional terapêutico tem como alvo liberar a adesão vitreomacular	2012

(continua)

TABELA 9.2 Exemplos de enzimas terapêuticas recombinantes de uso humano aprovadas pelo FDA/EMA (continuação)
Enzimas recombinantes de uso terapêutico aprovadas para uso humano (FDA ou EMA)

Enzima natural	Atividade catalítica	Nome do princípio ativo da enzima recombinante	Sistema de expressão	Indicação clínica	Ano da 1ª aprovação
Protease derivada de <i>Streptococcus pyogenes</i>	Degrada IgG na região da dobradiça inferior	Imlifidase	<i>E. coli</i>	Prevenção de rejeição em transplante de rins (dessensibilização de doentes adultos transplantados renais hiperimunizados com prova cruzada positiva contra um doador cadáver disponível)	2020
Tripeptidil-peptidase 1 (TPP1)	Capaz de clivar os tripeptídeos de proteínas. Esta atividade proteolítica reduz o acúmulo lisossomal de substâncias indesejáveis relacionadas à doença neurodegenerativa	Alfacerliponase	CHO	Lipofuscinose ceróide neuronal tipo 2 (CLN2) – deficiência da enzima TPP1	2017
Uricase (urato oxidase) derivada de <i>Aspergillus</i>	Catalisa a oxidação do ácido úrico em 5-hidroxisourato e alantoina	Rasburicase	<i>S. cerevisiae</i>	Prevenção e tratamento da síndrome da lise tumoral; gota	2001
Uricase (urato oxidase) derivada de porco	Catalisa a oxidação do ácido úrico em 5-hidroxisourato e alantoina	Pegloticase	<i>E. coli</i>	Gota tofácea crônica grave (distúrbio no metabolismo das purinas, com consequente hiperuricemia e deposição de sais de urato monossódico nas articulações, tendões e cartilagens, resultando em inflamação e dor nestas estruturas)	2010

Fonte: elaborada pelos autores com base em Aldoss, Pourhassan, Douer (2022); Baldo (2015); Cioni et al. (2022); Marchetti, Faggiano, Mozzarelli (2022) e Walsh e Walsh (2022).

9.3.5 Proteínas de fusão

As proteínas de fusão são proteínas que possuem uma outra porção proteica ligada (fusionada) à sua estrutura física. Essa segunda porção pode ser um peptídeo, um fragmento proteico ou outra proteína inteira. A junção é realizada pela tecnologia do DNA recombinante, ainda nas etapas iniciais de clonagem. O objetivo de gerar uma proteína fusionada é o de adicionar uma funcionalidade, característica ou propriedade à proteína original. Esta pode ser de maior estabilidade da molécula (aumentando a meia-vida de circulação no organismo), facilidade de recuperação do produto durante o processo de produção ou melhor biodisponibilidade no organismo (facilidade de penetração em determinado tipo de célula), dentre

outras. Esta classe de proteínas será mais explorada no item 9.4.1.4. A Tabela 9.3 mostra algumas proteínas de fusão aprovadas nos EUA e/ou Europa.

9.3.6 Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais são proteínas glicosiladas de alta massa molecular (~150 kDa) do sistema imunológico dos organismos. São a principal defesa da resposta humoral contra agentes infecciosos ou organismos estranhos, sendo capazes de se ligar a um alvo específico (antígeno). Podem ser produzidos em laboratório, através da tecnologia de hibridomas, ou de maneira recombinante, utilizando técnicas de clonagem e expressão. Os anticorpos monoclonais são utilizados

TABELA 9.3 Lista de proteínas de fusão disponíveis no mercado

Nome comercial	Tipo de proteína de fusão utilizada	Empresa	Data de aprovação	Indicação de uso
Enbrel®	IgG1 Fc fusionado ao receptor de fator de necrose tumoral (TNFR)	Amgen	1998	Artrite reumatoide
Ontak®	IL-2 fusionada a toxina diftérica	Eisai	1999	Oncologia
Orencia®	CTLA4-Fc fusionada à porção Fc modificada	BMS	2005	Artrite reumatoide
Arcalyst®	Domínio extracelular do receptor de interleucina-1 fusionado ao domínio Fc de IgG1	Regeneron	2008	Tratamento da síndrome periódica associada à criopirina (<i>cryopyrin-associated periodic syndrome</i> , CAPS)
N-plate®	Proteína de fusão Fc-peptídeo (pepticorpo)	Amgen	2008	Trombocitopenia
Elonva®	FSH fusionado a CTP (peptídeo C terminal) do HCG	Merck	2010	Fertilidade
Nulojix®	CTLA4-Fc fusionada à porção Fc	BMS	2011	Transplante renal
Eylea®	VEGFR fusionada à porção Fc	Bayer-Schering Pharma/ Regeneron	2011	Degeneração macular relacionada à idade, neovascular (DMRI) (úmida); edema macular secundário a oclusão da veia retiniana
Zaltrap®	VEGFR fusionada à porção Fc	Sanofi/Regeneron	2012	Câncer colorretal metastático
Alprolix®	Fator rh IX fusionado ao domínio Fc	Biogen IDEC/ Biovitrum/SOBI	2014	Hemofilia B
Eloctate®	Fator VIII de coagulação humano fusionado ao domínio Fc de IgG humana	Biogen IDEC/ SOBI	2014	Hemofilia A
Trulicity®	GPL-1 fusionado à proteína Fc	Eli Lilly	2014	T2DM
Idelvion®	Fator IX recombinante fusionado à alumina humana	CSL Behring	2016	Hemofilia B

(continua)

TABELA 9.3 Lista de proteínas de fusão disponíveis no mercado (*continuação*)

Nome comercial	Tipo de proteína de fusão utilizada	Empresa	Data de aprovação	Indicação de uso
Lumoxiti®	Proteína de fusão r-imunotoxina consistindo em um domínio variável de cadeia leve de IgG (VL) e domínio variável de cadeia pesada (VH) geneticamente fundido a uma forma truncada da exotoxina de <i>Pseudomonas</i>	AstraZeneca	2018	Leucemia de células pilosas
Elzonris®	Isoleucina-3 conjugada a uma toxina diftérica truncada	Stemline Therapeutics	2018	Neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides
Reblozyl®	Consiste em dois domínios extracelulares modificados do receptor de ativina humana tipo IIB (ActRIIB) ligado ao domínio Fc de IgG1	Bristol Myers Squibb Pharma EEIG	2019	Certas formas (raras) de anemia
Ngenla®	Hormônio de crescimento humano recombinante (hGH) fusionado ao peptídeo C-terminal da cadeia β da gonadotrofina coriônica humana (uma cópia na posição N-terminal e duas cópias na posição C-terminal do hGH)	Pfizer Europe MA EEIG	2022	Distúrbios do crescimento devido à deficiência do hormônio de crescimento
Kimtrak®	Proteína de fusão biespecífica – receptor das células T (TCR; domínio de direcionamento) fundido com um fragmento de anticorpo direcionado para o CD3 (<i>cluster</i> de diferenciação 3: domínio efector)	Immunocore	2022	Melanoma uveal (tipo de câncer de olho)

BMS: Bristol-Myers Squibb; CD: grupamento de diferenciação; CTLA: antígeno de linfócito T citotóxico; EMA: Agência Europeia de Medicamentos; Fc: região do fragmento cristalizável; FDA: agência reguladora ligada ao departamento de saúde do governo norte-americano; FSH: hormônio folículo-estimulante; GH: hormônio de crescimento; GLP: peptídeo semelhante ao glucagon; HCG: gonadotrofina coriônica humana; Ig: imunoglobulina; IL: interleucina; LFA: antígeno associado a função linfocitária; rh: humano recombinante; TNF: fator de necrose tumoral; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral; T2DM: diabetes melito tipo 2; VEGFR: receptor do fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: adaptada de Strohl (2015) e Walsh e Walsh (2022).

em análises clínicas (*kit* diagnóstico), controle de qualidade de insumos farmacêuticos e em imunoterapias (tratamento do câncer e de doenças autoimunes, por exemplo). Devido a sua relevância na indústria biotecnológica, o Capítulo 10 deste livro será dedicado a essa classe de proteínas.

9.4 EVOLUÇÃO DOS BIOFÁRMACOS

Desde o surgimento dos biofármacos, no início da década de 1980, muito conhecimento científico, clínico, farmacológico, relacionado ao processo de fabricação e de regulação foi gerado e aplicado no desenvolvimento, aperfeiçoamento, produção e aprovação das moléculas. O primeiro biofármaco aprovado (insulina recombinante) foi produzido em sistema bacteriano devido ao alto rendimento, baixo custo de fabricação e facilidade de manuseio e produção (como rápido tempo de dupli-

cação celular, genética conhecida e utilização de meios de cultivo simples). Seguindo o exemplo da insulina, o hormônio de crescimento (Protropin®) também foi produzido da mesma maneira, em 1985, nos Estados Unidos.

No entanto, em 1986, quatro produtos aprovados (Roferon A®, Intron A®/Alfatronol®, Recombivax® e Orthoclone OKT3®) nos EUA fugiram ao cenário que estava sendo estabelecido até o momento: (i) nenhum dos produtos foi utilizado em terapia de reposição (em que são fornecidas, aos pacientes, as proteínas ausentes ou produzidas em baixas concentrações), como foram os casos da insulina e do hormônio de crescimento; (ii) dois dos produtos (Recombivax® e Orthoclone®) foram produzidos em sistemas de expressão diferentes da bactéria *E. coli* (*Saccharomyces cerevisiae* e pela tecnologia de hibridoma, respectivamente). Essas moléculas serão detalhadas a seguir.

O Roferon A[®] e o Intron A[®]/Alfatronol[®] (INF-a2a e INF-a2b, respectivamente) possuem indicação clínica no tratamento de tumores nos sistemas linfático e hematopoiético, de melanoma maligno, do sarcoma de Kaposi relacionado à Aids e de hepatite viral crônica B e C. O Intron A[®]/Alfatronol[®] também é indicado no tratamento de verrugas anogenitais associadas a infecções causadas pelo HPV (Papilomavírus humano). Ambos foram produzidos em *E. coli*.

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) foi a primeira proteína recombinante a ser produzida em um sistema de expressão, não apenas diferente de *E. coli*, mas em um sistema não bacteriano e, também, a primeira proteína recombinante a ser utilizada em uma vacina. O HBsAg foi produzido na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e utilizado como imunizante na vacina Recombivax[®] contra o vírus da hepatite B.

Em sequência, o anticorpo monoclonal murino anti-CD3 foi o primeiro anticorpo a entrar na lista dos biofármacos, tendo sido comercializado sob o nome de Orthoclone OKT3[®] e indicado na prevenção e tratamento da rejeição a órgãos sólidos transplantados. Este anticorpo foi o primeiro produto obtido por meios diferentes da tecnologia do DNA recombinante, sendo produzido pela tecnologia de hibridomas, que será explorada no Capítulo 10.

A aprovação destes medicamentos biológicos abriu caminho para novas aplicações dos biofármacos, além da terapia de reposição. Eles passaram a ser utilizados como imunizantes e no tratamento ou controle do câncer, de doenças autoimunes, de agentes infecciosos, dentre outros.

Algumas limitações apresentadas pelo sistema de expressão bacteriano ficaram muito evidentes para a produção de determinados biofármacos, uma vez que essas células não são capazes de realizar processamentos proteolíticos (como a remoção de pré- e/ou pró-peptídeos), a formação de pontes dissulfeto, o enovelamento proteico e, principalmente, as modificações pós-traducionais, como a glicosilação. Portanto, novos sistemas de expressão passaram a ser explorados. Apesar de as leveduras serem capazes de realizar glicosilação, ela é muito simples e se difere bastante do padrão humano. Em 1987, foi aprovado, nos EUA, o primeiro produto recombinante produzido em células de mamíferos, o ativador de plasminogênio tecidual humano (tPA), sob o nome comercial de Activase[®], utilizado no tratamento de infarto agudo do miocárdio (WALSH; WALSH, 2022).

A partir deste momento, as células de mamíferos (principalmente as células CHO) ganharam espaço na indústria biofarmacêutica e, por volta dos anos 2000, dominaram o cenário. Em torno de 70% dos novos registros de produtos (incluindo registros de biossimi-

lares) utilizam as células de mamíferos como sistema de expressão (Figura 9.3). No entanto, ao considerar somente produtos novos (também chamados de originais ou inovadores), essa quantidade sobe para 85%. As células CHO são utilizadas em quase 90% dos produtos expressos em células de mamíferos (WALSH; WALSH, 2022). As características que fizeram essa plataforma de expressão ser considerada o principal hospedeiro para a produção de biofármacos estão descritas no Capítulo 2.

Apesar da vantagem conferida pelas células de mamíferos, outros sistemas de expressão foram explorados. Nos anos 2000, os animais transgênicos tornaram-se uma opção para produção de proteínas recombinantes, sendo o Atryn[®] (antitrombina recombinante usada no tratamento de deficiência de antitrombina) o primeiro produto aprovado para uso em humano produzido em animal transgênico (extração do leite de cabra). Este foi aprovado em 2006 na Europa e 2009 nos EUA (foi retirado do mercado somente na Europa, em 2018). Em 2020, o fator de coagulação VII ativado, produzido em leite de coelho (Sevenfact[®]), foi aprovado, nos EUA, para tratamento de hemofilia A e B. Contudo, ainda são restritas as aprovações de biofármacos neste tipo de sistema, apenas existem quatro aprovados, até o momento (WALSH; WALSH, 2022). Provavelmente, por ser uma plataforma de difícil manutenção e controle, aumentando o risco de transmissão de patógenos.

O sistema de expressão mais recente utilizado para produção de proteínas recombinantes para uso em humanos foi o de expressão em vegetais pelo cultivo de células de cenoura geneticamente modificadas. As plantas não eram consideradas como opção por acreditar-se que algumas estruturas glicosiladas causavam reações alérgicas em humanos. Contudo, a aprovação, em 2012, pelo FDA, da alfataliglicerase (Eleyso[®]), uma glucocerebrosidase (GBA) recombinante usada no tratamento da doença de Gaucher, e a experiência que se adquiriu com o produto ao longo dos anos (a eficácia e eventos adversos foram semelhantes aos produtos originários de células de mamífero), vem demonstrando que o sistema vegetal é seguro.

Esse sistema mostrou-se útil também para o processamento de determinadas proteínas recombinantes (ricas em manose). Por exemplo, a própria glucocerebrosidase contém cinco sítios de N-glicosilação que são ricos em manose. Esse tipo de estrutura glicosilada é fundamental para penetração da GBA no lisossomo via receptores de manose-6-fosfato (importante para a molécula exercer sua atividade biológica). Contudo, a síntese da proteína recombinante em células CHO, linhagem mais utilizada para expressão de proteínas recombinantes glicosiladas, adiciona ácidos siálicos terminais nos glicanos, o que impede a conexão para a entrada da molécula no lisos-

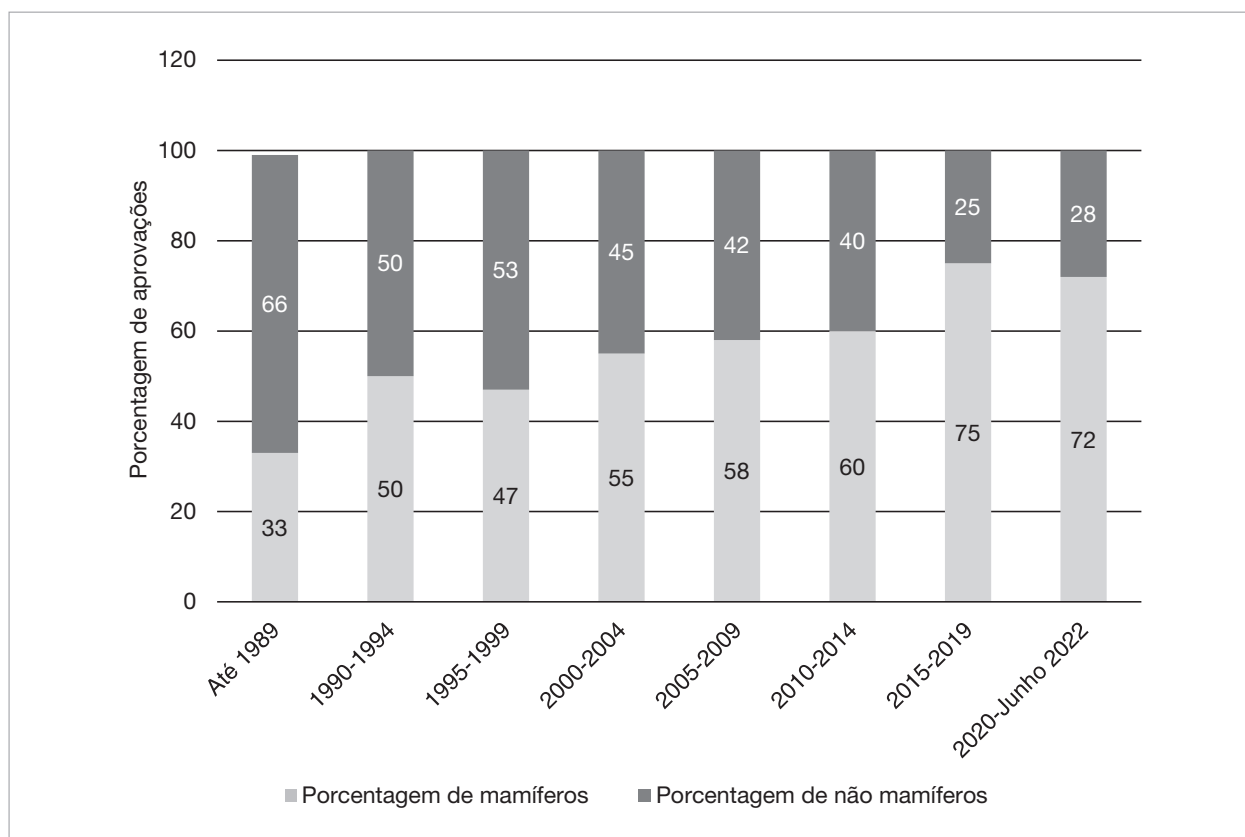


FIGURA 9.3 Comparação relativa entre o uso dos sistemas de expressão de mamíferos *versus* não mamíferos para produzir os biofármacos aprovados nos períodos indicados.

Fonte: adaptada de Walsh e Walsh (2022).

somo, requerendo uma etapa de clivagem enzimática (para remoção dos ácidos siálicos) no processo de purificação. A produção em células vegetais não adiciona os ácidos siálicos na molécula, gerando uma molécula com alto teor de manose na estrutura, dispensando a etapa de clivagem enzimática durante o processo. O sistema vegetal é a base de diversas pesquisas para produção de novos biofármacos (BEN BDIRA et al., 2017; BEUTLER; KUHL, 1986; SCHARENBERG et al., 2020; WAGNER, 2016).

Mesmo sendo considerados produtos bastante seguros, inicialmente os biofármacos utilizavam componentes de origem animal e/ou humano em seu processo produtivo, principalmente quando as células de mamíferos eram aplicadas como sistema de expressão. Essas células necessitam de meios de cultivo mais ricos e, por isso, eram suplementados com soros de origem animal (p. ex., soro fetal bovino). Além disso, a formulação de determinados biofármacos tinha (e ainda tem) a albumina humana como estabilizante. No entanto, componentes de origem animal ou humana são potenciais transmissores de patógenos e, por esta razão, as agências reguladoras tornaram-se mais rigorosas quanto ao uso dessas subs-

tâncias na fabricação de biofármacos (BUTLER, 2005). Hoje em dia, os meios de cultivo preferencialmente utilizados são quimicamente definidos (ou seja, todos os componentes são conhecidos) e livres de componentes de origem animal e humana (as proteínas adicionadas são de origem recombinante).

9.4.1 Biosuperiores (*biobetters*)

Os primeiros produtos recombinantes aprovados eram, invariavelmente, moléculas idênticas à proteína natural, com exceção de alguns biofármacos que continham uma metionina na extremidade N-terminal, como o hormônio de crescimento e o G-CSF. A preocupação em sintetizar as proteínas recombinantes como cópias fiéis da proteína endógena tinha como objetivo não impactar suas propriedades farmacológicas, principalmente sua atividade biológica, e não induzir imunogenicidade potencialmente danosa ao paciente. No entanto, passados alguns anos, modificações estruturais deliberadas foram realizadas para redesenhar algumas moléculas com a finalidade de superar limitações relacionadas à expressão, meia-vida de circulação, imunogenicidade,

toxicidade, eficácia, entre outras. Além do aprimoramento de características inerentes das moléculas, as novas gerações podem apresentar características adicionais que trazem benefícios terapêuticos, como a incorporação de novas funções. Extensos estudos clínicos e/ou de comparabilidade são necessários para comprovar a qualidade, eficácia e segurança destas novas versões de biofármacos, denominados de biossuperiores (do inglês, *biobetter*).

9.4.1.1 Modificações estruturais

Apesar de o termo *biossuperior* ter sido cunhado apenas em 2007 (SHARMA et al., 2019), em 1996 foram aprovados pela primeira vez dois produtos apresentando melhorias, mediante modificações estruturais quando comparadas à proteína natural: o Humalog® (uma insulina análoga; nome do princípio ativo: insulina Lispro) e o Rapilysin®/Retavase®/EcoKinase® (um tPa análogo) (WALSH; WALSH, 2022). Embora a insulina recombinante de uso terapêutico tenha representado um marco no tratamento da diabetes, também trouxe algumas limitações. A insulina recombinante é administrada pela via subcutânea e apresenta uma difusão lenta do espaço subcutâneo para a circulação sanguínea, resultando na necessidade de administração muito tempo antes das refeições (de 1 a 1,5 hora). Isso ocorre devido à forma como a insulina recombinante é comercializada: em hexâmeros (a partir da associação de dímeros), para conferir estabilidade. Por conta disso, a duração de sua ação é mais prolongada do que a insulina natural, o que pode resultar na principal reação adversa dos tratamentos de reposição de insulina: picos de hipoglicemia (mais detalhes nas seções 9.4.2.1 e 9.5). Portanto, ficou clara a necessidade de desenvolver uma insulina de difusão mais rápida (e rápida ação), que pudesse ser administrada logo anteriormente à refeição. A insulina Lispro foi então construída revertendo a posição de dois aminoácidos da cadeia B: de prolina-lisina em lisina-prolina nas posições B28-B29. Essa modificação estrutural impede estericamente a capacidade dos monômeros de insulina de manear dímeros (mas não a associação de hexâmeros, importante para a sua estabilidade), aumentando o seu potencial de difusão para a circulação sanguínea (HOLLEMAN; HOEKSTRA, 1997). Desta forma, a insulina lispro pôde ser administrada 30 min antes das refeições.

O caso do tPa é curioso, pois apesar de ter sido o primeiro biofármaco produzido em células de mamíferos, a segunda versão do tPa foi produzida em *E. coli*, uma vez que a sua atividade biológica não é dependente da glicosilação. O análogo ao tPa (nome do princípio ativo: reteplase) possui três domínios deletados: (i) o domínio *kringle* 1; (ii) o domínio EGF (fator de crescimento epi-

dermal; e (iii) o domínio *finger*. Desta forma, o reteplase é idêntico ao tPa nativo apenas nos aminoácidos de 1–3 e 176–527. Os domínios *kringle* 1 e EGF se ligam a receptores do fígado, participando do processo de eliminação do medicamento do organismo. A deleção destes domínios confere ao reteplase uma menor ligação aos receptores hepáticos; consequentemente, uma menor eliminação do organismo e, portanto, uma meia-vida de circulação maior. Com isso, a sua administração pode ser feita em duas injeções intravenosas rápidas, ao invés de infusão intravenosa lenta por 90 minutos. O domínio *finger* confere ao tPa uma maior afinidade de ligação à fibrina (componente formador do coágulo). Apesar de a deleção deste domínio a princípio parecer desvantajosa, na verdade ela permite que o reteplase não se ligue tão fortemente à fibrina, podendo a mesma molécula estar disponível para atuar em outro local do trombo, repetidamente. Além disso, pelo reteplase ter um tamanho menor, ele tem um maior potencial de penetração no coágulo (WOOSTER; LUZIER, 1999). Como pode ser observado, as mudanças estruturais (deleção de domínios da proteína) conferiram aprimoramentos à nova proteína, quando comparadas à proteína nativa, como aumento da meia-vida de circulação e aumento do seu potencial trombolítico.

O melhoramento do biofármaco não se limita a modificações na sequência de aminoácidos da cadeia peptídica. Esse objetivo também pode ser alcançado por alterações nas modificações pós-traducionais, como a glicosilação. Um exemplo clássico de alteração na glicosilação foi o primeiro biossuperior da EPO: a Aranesp® (nome do princípio ativo: darbepoetina alfa), um análogo de EPO de ação prolongada, aprovado em 2001. A atividade biológica da EPO está intimamente relacionada à presença de resíduos de ácido siálico nas extremidades dos seus três N-glicanos.

A ausência de ácido siálico resulta em uma rápida eliminação da proteína da circulação sanguínea por interação com receptores presentes no fígado e em macrófagos (SPIVAK; HOGANS, 1989). A nova molécula recombinante foi modificada geneticamente pela alteração de cinco aminoácidos, gerando dois novos sítios de N-glicosilação. Desta forma, a darbepoetina alfa apresenta um total de cinco N-glicosilações e um máximo de 22 ácidos siálicos (em comparação a três N-glicosilações e um máximo de 14 ácidos siálicos na molécula nativa). Como resultado, a meia-vida de circulação aumentou três vezes (de 7-8 h para aproximadamente 22 h), permitindo, assim, utilizar intervalos maiores de administração (uma vez por semana, em comparação a três vezes por semana, como ocorre para a EPO recombinante original) (EGRIE et al., 2003).

9.4.1.2 Modificações de formulação

Não somente alterações na estrutura da molécula geram o aperfeiçoamento dos biofármacos. Este também pode ser alcançado por melhorias em sua formulação, de modo a influenciar, por exemplo, na sua biodisponibilidade (liberação da proteína na circulação sanguínea). O primeiro produto com formulação de depósito foi licenciado em 1999, com o nome de Nutropin Depot®. Neste produto, o hormônio de crescimento recombinante, produzido em *E. coli*, era encapsulado por microesferas de PLGA (ácido polilactocoglicólico – um polímero biocompatível e biodegradável) durante a etapa de formulação. Isto resultou na liberação gradual do hormônio e, com isso, a administração variava de duas vezes na semana a uma vez mensal. No entanto, Nutropin Depot® foi descontinuado em 2004, devido a algumas desvantagens, como problemas com a produção em larga escala, formulação mais viscosa (necessitando agulhas de grande calibre), entre outros (GRABER; REITER; ROGOL, 2021; LAL; HOFFMAN, 2020). Outro exemplo é o Declage®/Eutropin Plus®/Somatropina Biopartners®. Sua formulação consiste no hormônio de crescimento recombinante, produzido em *S. cerevisiae*, incorporado em microesferas de hialuronato de sódio. A administração ocorre uma vez por semana e, após ser injetado, hialuronidases teciduais quebram a microesfera, liberando lentamente o hormônio no paciente. Apesar de ter sido aprovado na Europa em 2013, ele nunca foi comercializado e perdeu sua licença em 2017. Entretanto, encontra-se disponível na Coreia do Sul (GRABER; REITER; ROGOL, 2021; LAL; HOFFMAN, 2020).

9.4.1.3 Modificações na via de administração

Conforme mencionado, as proteínas recombinantes terapêuticas são administradas, em quase sua totalidade, por via parenteral (subcutânea, intramuscular ou intravenosa) devido à sua instabilidade e baixa permeabilidade por barreiras biológicas, como pele, mucosa e membrana celular, o que dificulta sua difusão para a circulação. O desenvolvimento ou melhoria de produtos que confirmam vantagens em sua administração é muito importante para uma boa adesão dos pacientes, principalmente quando o tratamento ocorre de maneira contínua e com alta frequência de aplicação. No entanto, isto ainda é um desafio. Até hoje, apenas quatro peptídeos/proteínas recombinantes de uso terapêutico foram aprovados para administração não parenteral nos EUA e Europa: Fortical®, Exubera®, Afrezza® e Rybelsus® (WALSH; WALSH, 2022).

O Fortical® contém a calcitocina de salmão como princípio ativo para o tratamento de hipercalcemia, como tratamento de segunda linha da doença de Paget (um distúrbio ósseo) e como tratamento alternativo da

osteoporose em mulheres no pós-menopausa, quando outros tratamentos não são indicados. Em 2005, foi aprovada a versão administrada por spray intranasal, o Fortical®, primeiro biofármaco administrado por via não parenteral. O Rybelsus®, um agonista de receptor de GLP-1 (peptídeo semelhante a glucagon 1), utilizado no tratamento da diabetes tipo 2, foi o primeiro biofármaco aprovado para administração oral nos EUA (2017) e na Europa (2020). Por se tratar de peptídeos, esses produtos não serão detalhados neste capítulo.

Em 2006, foi aprovado o primeiro biofármaco administrado por inalação pulmonar, a insulina, com nome comercial de Exubera®. A via pulmonar, há anos, vinha sendo vista como uma promissora via de administração alternativa à parenteral por possuir algumas características, como: (i) grande área de superfície de absorção devido aos alvéolos; (ii) altamente vascularizada; (iii) barreira alveolar-capilar fina, permitindo uma difusão rápida; (iv) baixas taxas de eliminação mucociliar; (v) degradação enzimática reduzida; e (vi) maior biodisponibilidade quando comparada a outras vias (mas ainda inferior à via parenteral). No entanto, algumas limitações precisavam ser contornadas para que esta via pudesse ser de fato utilizada, como: (i) a obtenção de partículas adequadas quanto ao tamanho, densidade, forma, carga e higroscopicidade; (ii) entregues na velocidade adequada; (iii) direcionadas para o trato respiratório inferior (onde ocorre a rápida absorção); e (iv) entregues em dosagem precisa e consistente. O tamanho da partícula é crucial para a entrega da insulina no fundo do pulmão. Partículas variando entre 1 e 3 µm em diâmetro são endereçadas para o local correto e apresentam alta absorção, enquanto partículas maiores se depositam nas vias aéreas superiores ou são engolidas e partículas menores têm mais propensão a serem exaladas (AGU et al., 2001; SANTOS CAVAIOLA; EDELMAN, 2014).

Para se obter sucesso com essa via de administração, muitos estudos foram realizados no campo da formulação e no desenvolvimento de dispositivos de inalação. Exubera® foi formulada como pó seco (mediante secagem por pulverização da insulina recombinante regular junto com os excipientes), permitindo uma maior estabilidade à temperatura ambiente. O dispositivo de inalação oral (Inhance®) liberava a insulina, contida no *blister*, na câmara de retenção. O desenho do dispositivo facilitava o processo de dispersão do pó gerando o aerossol de insulina pela inalação do próprio paciente (AL-TABAKHA, 2015). Em razão da rápida difusão oferecida pela via de administração pulmonar, Exubera® tinha um início de ação mais rápida que a insulina lispro e, portanto, era administrada 10 minutos antes das refeições (em contraste a 30 minutos; Figura 9.7c).

Embora Exubera® tenha se mostrado seguro, eficaz e com maior tolerabilidade (principalmente entre os pacientes iniciantes na terapia de insulina), ele apresentou algumas desvantagens (descritas na seção 9.4.2). Além disso, Exubera® não apresentou grandes progressos em relação às limitações dos análogos de insulina, como os possíveis eventos de hipoglicemia após as refeições (por apresentarem um período de ação ainda prolongado) e ainda sem alcançar um controle glicêmico mais rigoroso (AL-TABAKHA, 2015). Em um movimento inesperado, o seu fabricante, Pfizer, anunciou sua retirada do mercado com menos de um ano e meio de comercialização. O motivo apresentado foi devido às vendas abaixo do esperado e baixa aceitação. No entanto, é necessário tempo para que se ganhe a confiança dos médicos e adesão dos pacientes (MACK, 2007).

Após o fracasso da Exubera®, outras empresas descontinuaram seus estudos clínicos ou de desenvolvimento de insulinas inaladas, com exceção da empresa MannKind, que aprovou, em 2014, a segunda insulina inalada, comercializada pelo nome de Afrezza®. Afrezza® também é formulada como um pó seco contendo insulina recombinante regular adsorvida eletrostaticamente no carreador FDKP (fumaril dicetopiperazina – um excipiente inerte), formando micropartículas que permitem a entrega aos alvéolos por inalação oral. Após a inalação, a insulina é liberada para absorção (LEDET et al., 2015; RENDELL, 2014). Afrezza® apresentou melhorias em relação ao Exubera®, que estão detalhadas na seção 9.4.2.

9.4.1.4 Modificação da meia-vida de circulação plasmática

De maneira geral, um dos maiores inconvenientes do uso das proteínas recombinantes terapêuticas é a alta frequência de administração, devido à sua meia-vida de circulação plasmática curta. As condições que impactam a meia-vida de circulação podem ser: (i) a instabilidade da molécula; (ii) a degradação enzimática; e (iii) a taxa de eliminação, que pode estar relacionada a tamanho, raio hidrodinâmico, forma, carga e composição química da proteína. A eliminação dos biofármacos da circulação plasmática ocorre pela combinação de eventos que podem incluir proteólise, filtração renal, remoção pelo fígado, eliminação pelo sistema imune e utilização do biofármaco pelo seu alvo (CALICETI, 2003). A maioria das macromoléculas menores que 70 kDa é eliminada do organismo mediante filtração renal. Portanto, a principal estratégia utilizada para melhorar a farmacocinética dos biofármacos menores é a de aumentar a massa molar e o raio hidrodinâmico da proteína. Isto pode ser alcançado pela conjugação a polímeros hidrofílicos.

O PEG (polietilenoglicol) é um polímero hidrofílico, biocompatível, não tóxico (nas concentrações utilizadas

na biotecnologia), majoritariamente não imunogênico, sem carga, não biodegradável e seguro, aprovado para uso em medicamentos pelas agências reguladoras internacionais, como FDA, EMA e Anvisa. Apesar de não ser biodegradável, as proteínas conjugadas ao PEG são eliminadas do organismo pelas mesmas vias citadas para os biofármacos (JEVSIČEEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010). A ligação covalente do PEG a uma molécula é denominada de peguilação. A reação química de conjugação ocorre pela ligação de uma extremidade do PEG ativado (PEG contendo um grupo químico funcional reativo) a resíduos específicos da proteína, como os grupos amino dos resíduos de lisina e do N-terminal proteico, o grupo tiol dos resíduos de cisteína e os grupos carboxila e hidroxila (SANTOS et al., 2018). Inicialmente, o processo de peguilação dos biofármacos ocorria de maneira aleatória (tanto em relação à quantidade de moléculas de PEG conjugadas quanto aos sítios de ligação), gerando processos com reprodutibilidade limitada e misturas heterogêneas de produtos com propriedades variáveis. No entanto, com a evolução da tecnologia de peguilação, atualmente, há uma tendência para a utilização de peguilação sítio-dirigida, na qual há um controle maior da quantidade de moléculas de PEG adicionadas e do sítio de ligação desejado, obtendo, assim, produtos mais homogêneos e potencialmente mais eficazes (TORRES-OBREQUE et al., 2022).

A tecnologia de peguilação está bastante estabelecida e é a mais utilizada para aumentar a meia-vida de circulação de biofármacos, por aumentar sua massa molar e seu raio hidrodinâmico, geralmente sem interferir em sua estrutura tridimensional. Entretanto, ela não confere apenas essa vantagem farmacocinética. As proteínas peguiladas também apresentam: (i) imunogenicidade reduzida, pois potenciais epítomos imunogênicos encontram-se estericamente bloqueados; (ii) proteção contra proteólise e endocitose, pois a cadeia peptídica encontra-se estericamente bloqueada; (iii) maior solubilidade, o que diminui a formação de agregados devido à repulsão estérica entre as superfícies peguiladas; e (iv) maior estabilidade térmica e mecânica (TORRES-OBREQUE et al., 2022).

No entanto, algumas possíveis limitações devem ser levadas em consideração durante o desenvolvimento de um produto, que podem impactar sua eficácia e segurança, como: (i) a redução da afinidade ao seu alvo em decorrência do impedimento estérico, podendo afetar, conseqüentemente, sua atividade biológica; (ii) obtenção de produtos heterogêneos; (iii) indução de vacuolização citoplasmática (que parece não apresentar significância toxicológica); e (iv) geração inesperada de uma resposta imunológica à molécula de PEG (foi

observado que alguns pacientes podem desenvolver anticorpos anti-PEG). Essas limitações podem ser contornadas por uma análise cuidadosa da estratégia de peguilação e escolha de: conjugação sítio-dirigida, ligação reversível do polímero à proteína (estratégia na qual o PEG é removido da proteína dentro do organismo por instabilidade química ou ação enzimática de maneira fisiológica) e/ou seleção de molécula de PEG, que pode variar em tamanho e estrutura (linear ou ramificado). Geralmente, moléculas de PEG com cadeias mais longas conferem maior meia-vida de circulação da proteína conjugada a ela, mas podem resultar na baixa afinidade ao seu alvo. Moléculas de PEG ramificadas também conferem uma meia-vida de circulação maior do que o formato linear de mesmo tamanho. A estrutura ramificada também confere menor imunogenicidade, porém pode resultar em uma menor atividade biológica (JEVŠIČEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010; TORRES-OBREQUE et al., 2022). Os reagentes de PEG estão disponíveis comercialmente em diferentes tamanhos e formatos e com diferentes grupos químicos funcionais que permitem sua ligação covalente com determinados grupos reativos presentes nas proteínas.

O primeiro biofármaco peguilação foi aprovado em 1994, nos EUA, com o nome comercial de Oncaspar®. Este produto tem como princípio ativo a pegaspargase, uma enzima L-asparaginase (derivada de *E. coli*) peguilação. Oncaspar® é um componente fundamental do tratamento quimioterápico com multicompostos em pacientes com LLA (leucemia linfoblástica aguda). Foi inicialmente utilizada como alternativa à L-asparaginase original em pacientes com hipersensibilidade a esta proteína. A asparagina é um aminoácido considerado essencial para a sobrevivência de células leucêmicas (diferentemente das células normais, que não dependem de fonte exógena deste aminoácido para seu crescimento celular). A administração de L-asparaginase (responsável por hidrolisar asparagina em ácido aspártico e amônia) resulta na redução da fonte de asparagina, matando especificamente as células tumorais. O processo de fabricação da pegaspargase é realizado pela conjugação aleatória de múltiplas cadeias de monometoxipolietilenoglicol (mPEG) de 5 kDa nos grupos amino dos resíduos de lisina da proteína, gerando um produto heterogêneo, diferindo nos níveis de peguilação (variando de 69 a 82 moléculas de mPEG); no entanto, mantendo eficácia similar às versões não peguilação. Além de apresentar uma menor imunogenicidade, Oncaspar® possui uma meia-vida de circulação mais prolongada quando comparada às versões não peguilação (5,7 dias versus 1,3 ou 0,65 dias, dependendo da versão não peguilação) e, portanto, pode ser administrada uma vez a cada quinzena (em

contraste a três vezes por semana) (FDA, 2020; HEO; SYED; KEAM, 2019; VERONESE; MERO, 2008).

Até o momento, pelo menos, mais 17 proteínas recombinantes terapêuticas peguilação foram aprovadas nos EUA e na Europa, destacando-se: (i) PegIntron®, um IFN- α 2b peguilação, aprovado, em 2000, para o tratamento de hepatite C; (ii) Pegasys®, um IFN- α 2a peguilação, aprovado em 2002 para o tratamento de hepatite C; (iii) Neulasta®, um G-CSF peguilação, aprovado em 2002 para o tratamento de neutropenia induzida por quimioterapia; (iv) Micera®, uma EPO peguilação, aprovada em 2007 para o tratamento de anemia associada a insuficiência renal crônica; (v) Plegridy®, um IFN- β -1a peguilação, aprovado em 2014 para o tratamento da esclerose múltipla; (vi) Adynovate®, um FVIII peguilação, aprovado em 2015 para o tratamento da hemofilia A; (vii) Rebinyn®, um FIX peguilação, aprovado em 2017 para o tratamento da hemofilia B; e (viii) Skytrofa®, um hormônio de crescimento peguilação, aprovado, em 2021, para o tratamento da deficiência de crescimento.

A peguilação não é a única estratégia utilizada para aumentar a meia-vida de circulação das proteínas recombinantes terapêuticas. A fusão a outras proteínas ou fragmentos proteicos, mediante manipulação genética, também pode melhorar a farmacocinética dos biofármacos. Algumas proteínas de alta massa molar, presentes no organismo humano, possuem meia-vida plasmática longa, permanecendo na circulação por vários dias. Esta característica pode ser transferida para a proteína terapêutica pela fusão de suas sequências genéticas. Desta forma, a proteína resultante passa a ter duas porções que conferem propriedades diferentes: uma porção responsável pela atividade terapêutica e a outra responsável pela meia-vida de circulação. As proteínas (ou porções proteicas) utilizadas como par de fusão, que tiveram produtos aprovados até o momento, foram: o fragmento Fc de imunoglobulina, a albumina sérica humana (HSA) e o domínio CTP (peptídeo C-terminal) da subunidade β do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG).

A imunoglobulina e a albumina juntas correspondem a 80% da massa de proteínas presentes no plasma. Para minimizar o gasto de energia na produção dessa quantidade toda, é favorável, para o organismo, a existência de um mecanismo que mantenha essas proteínas circulantes por um longo período. Portanto, a meia-vida de circulação longa que essas proteínas apresentam (em torno de duas a três semanas para a imunoglobulina e 19 dias para a albumina) ocorre por um mecanismo de reciclagem, que dribla a via de degradação. O receptor FcRn (receptor de fragmento cristalizável [Fc] neonatal) é um componente essencial nesse processo. Este receptor está presente em vesículas intracelulares das células

endoteliais, das células epiteliais de diversos órgãos e das células hematopoiéticas, dentre outros tecidos, e, portanto, distribuído por todo corpo. A região Fc das imunoglobulinas e a albumina possuem resíduos específicos que se ligam a diferentes regiões do receptor FcRn, respectivamente, por interação dependente de pH ácido (ambiente encontrado nas vesículas endossomais), após serem internalizadas de maneira passiva por processos fisiológicos, como pela pinocitose. Uma vez que as proteínas estão ligadas ao receptor FcRn, as vesículas, ao invés de seguirem a via de degradação lisossomal, seguem a via de secreção e devolvem a imunoglobulina ou albumina à circulação plasmática. O pH neutro no ambiente extracelular favorece a dissociação entre as proteínas e o receptor FcRn (BAKER et al., 2009).

Portanto, a via de reciclagem pelo receptor FcRn é bastante atrativa para ser explorada pela indústria biofarmacêutica com o intuito de aumentar a meia-vida de circulação das proteínas recombinantes terapêuticas. Esta estratégia vem obtendo bastante sucesso, visto o volume crescente de biofármacos desenhados com este racional (principalmente utilizando a fusão com o fragmento Fc de imunoglobulinas), que estão sendo desenvolvidos e aprovados nos últimos anos. Os exemplos desses produtos podem ser encontrados na Tabela 9.3. Destaque para os produtos Alprolix® e Idelvion®, fatores de coagulação sanguínea IX (FIX), aprovados em 2014 e 2016, respectivamente. As primeiras versões de FIX recombinante e o FIX endógeno possuem meia-vida de circulação em torno de 19-26 horas. Alprolix®, versão de FIX fusionada à porção Fc, possui meia-vida de circulação de 82,1 horas e Idelvion®, versão de FIX fusionada à albumina, possui meia-vida de circulação de 92-94,8 horas. As versões fusionadas aumentaram a meia-vida de circulação em 3-4 vezes e 4-5 vezes, respectivamente, e aumentaram o intervalo de administração intravenosa para uma vez a cada 1-2 semanas e uma vez a cada 14 dias, respectivamente, em contraste à administração a cada 3-4 dias (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2017).

A primeira proteína de fusão aprovada e a mais conhecida é o etanercepte, princípio ativo do Enbrel®, licenciado, em 1998, nos EUA e, em 2000, na Europa, para o tratamento da artrite reumatoide, doença caracterizada por intensa inflamação. O seu tratamento tem como estratégia o combate a essa inflamação. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória com implicação clínica na patogênese da artrite reumatoide. A estrutura do etanercepte compreende dois monômeros do domínio extracelular do receptor de TNF- α fusionados à porção Fc de imunoglobulina (Figura 9.4). Desta forma, a proteína recombinante terapêutica atua como um inibidor competitivo do TNF- α solúvel, impedindo que ele se ligue ao seu receptor natural presente na superfície celular,

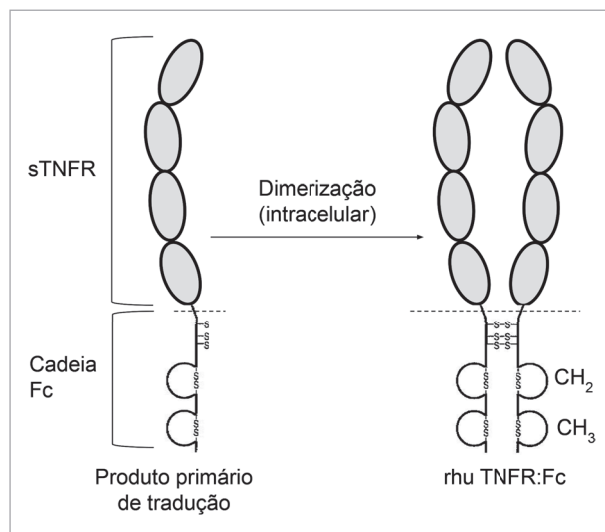


FIGURA 9.4 Estrutura do etanercepte.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Jacobs e Smith (1997).

bloqueando sua ação pró-inflamatória. A porção Fc, além de conferir um aumento na meia-vida de circulação, também provoca a dimerização da estrutura, aumentando a afinidade de ligação com o TNF- α , conferindo, assim, uma vantagem competitiva em relação ao receptor monomérico solúvel (que é um regulador natural do processo inflamatório, atuando como um inibidor, com função anti-inflamatória). A estrutura dimerizada também permite a ligação a duas moléculas de TNF- α ao mesmo tempo (ZHAO; MYSLER; MOOTS, 2018).

A terceira molécula (neste caso, domínio peptídico) utilizada para aumentar a meia-vida de circulação plasmática das proteínas recombinantes é o domínio CTP do hormônio hCG. Este hormônio é um membro da família dos hormônios gonadotróficos e possui, no C-terminal da sua subunidade β , um domínio estendido, provavelmente oriundo de uma duplicação gênica de um gene ancestral, com posterior deleção durante a sua evolução. O domínio C-terminal gerado (domínio CTP) é uma porção hidrofílica e flexível com cerca de 30 aminoácidos que contém quatro sítios de O-glicosilação em resíduos de serina e treonina. Foi observado que este domínio confere uma maior sobrevivência na circulação do hCG quando comparado aos outros membros da família, como o hormônio folículo-estimulante (FSH), utilizado no tratamento de infertilidade. A partir deste conhecimento, foi desenvolvida a proteína de fusão corifoliotropina alfa (nome do princípio ativo). Essa proteína recombinante de fusão é um heterodímero formado pela ligação não covalente da subunidade α (comum entre a família dos hormônios gonadotróficos; sem modificação) com a subunidade β do hormônio FSH fusionado, no

C-terminal, ao domínio CTP do hCG. O produto, com nome comercial de Elonva®, foi aprovado em 2010, na Europa, e é utilizado na estimulação ovariana controlada. O domínio CTP foi capaz de aumentar a meia-vida de circulação do hormônio FSH, resultando em uma única aplicação na primeira semana de tratamento, em contraste a injeções diárias por sete dias, utilizando o FSH recombinante regular (BEN-MENAHM, 2018).

Esta estratégia de sucesso também foi utilizada para desenvolver um hormônio de crescimento de meia-vida prolongada: Ngenla®, aprovado em 2022, para o tratamento de distúrbios de crescimento. Ngenla® tem como princípio ativo a somatogona, proteína de fusão composta pelo hormônio de crescimento fusionado a três cópias do domínio CTP da subunidade β do hCG: uma cópia do domínio CTP está fusionada ao N-terminal do hormônio de crescimento e as outras duas cópias estão fusionadas ao C-terminal. O hormônio de crescimento fusionado aos domínios CTP apresentou um aumento da meia-vida de circulação de 5 a 10 vezes, resultando em uma administração semanal, em contraste com a administração diária utilizando o hormônio recombinante regular (DEAL et al., 2022).

A estratégia de fusionar proteínas (ou fragmentos delas) não é aplicada apenas com o objetivo de aumentar a meia-vida de circulação plasmática dos biofármacos. Esta estratégia também pode adicionar uma propriedade à proteína terapêutica, como uma nova função, uma nova ligação a um alvo ou um componente de toxicidade, por exemplo, podendo gerar uma proteína totalmente nova, sem precedentes no organismo. O primeiro exemplo desta aplicação foi o desenvolvimento do Ontak®, que tinha como princípio ativo a denileucina diftotox, uma proteína de fusão com dois domínios: a citocina IL-2 e a toxina diftérica. Ontak® era utilizado no tratamento de linfoma cutâneo de células T (LCCT), que expressam na superfície celular o CD25 (receptor de IL-2). O domínio IL-2 da proteína de fusão recombinante direcionava a ligação ao receptor CD25, que mediava a internalização da molécula. No interior do endossoma, ocorria uma clivagem subsequente que liberava a toxina diftérica no citoplasma. Uma vez no interior da célula, a toxina diftérica inibia a síntese proteica, resultando na morte celular. Ontak® foi descontinuado em 2014, devido a questões técnicas de produção (FOSS, 2006; WANG et al., 2017).

Apesar de Ontak® e Enbrel® não serem enquadrados como bio superiores, pelo fato de não ter um medicamento de referência aprovado anteriormente para a mesma doença, eles foram exemplificados nesta seção para demonstrar o potencial da tecnologia da proteína de fusão, que pode ser aplicada tanto para o desenvolvi-

to de um bio superior quanto para o desenvolvimento de uma nova molécula.

9.4.2 Estudo de caso

Para a plena compreensão do potencial da biotecnologia no desenvolvimento de proteínas terapêuticas, a história da insulina será detalhada por meio de um estudo de caso, explorando as diversas modificações da molécula de insulina ao longo do tempo, fruto do conhecimento aprimorado da tecnologia do DNA recombinante. A insulina foi selecionada por ser um caso emblemático: (i) foi o primeiro biofármaco desenvolvido; (ii) foi o primeiro biofármaco que apresentou modificações estruturais objetivando melhorias farmacológicas; (iii) foi a primeira proteína terapêutica com formulação não parenteral; (iv) possui o maior número de versões aprovadas para uso clínico; e (v) mesmo com todo o histórico de desenvolvimento, é uma proteína que ainda apresenta desafios por não existir, ainda, nenhuma versão que mimetize, por completo, a ação da insulina fisiológica.

9.4.2.1 A história da insulina

A insulina é uma proteína com duas cadeias peptídicas relativamente pequenas, cadeia A – com 21 aminoácidos – e cadeia B – com 30 aminoácidos –, unidas por duas pontes dissulfeto (sendo que a molécula como um todo possui três pontes dissulfeto). A biossíntese da insulina se inicia pela pré-pró-insulina, que possui um peptídeo sinalizador responsável por facilitar a translocação da pré-pró-insulina através da membrana do retículo endoplasmático rugoso até o lúmen. A sequência sinalizadora é clivada por uma peptidase, gerando a pró-insulina, que é o precursor biológico da insulina, e consiste em uma única cadeia peptídica, que após a formação das pontes dissulfeto sofre clivagem em dois sítios, destacando uma cadeia de peptídeos denominada de cadeia C, formando a molécula de insulina madura (Figura 9.5). A insulina é armazenada na célula como um hexâmero formado pela ligação de 3 dímeros e na presença de íon zinco (essa forma estabiliza a molécula até que seja liberada para sua forma monomérica ativa). Foi observado que três características são conservadas nas moléculas de insulina de todas as espécies: (i) as três ligações dissulfeto são sempre na mesma posição; (ii) os aminoácidos das posições N e C terminal da cadeia A; e (iii) os resíduos hidrofóbicos da cadeia B. Moléculas de insulina humana regular formam dímeros em solução, e na presença de átomos de zinco (Zn^{2+}) esses dímeros se associam para formar hexâmeros, forma mais estável da insulina.

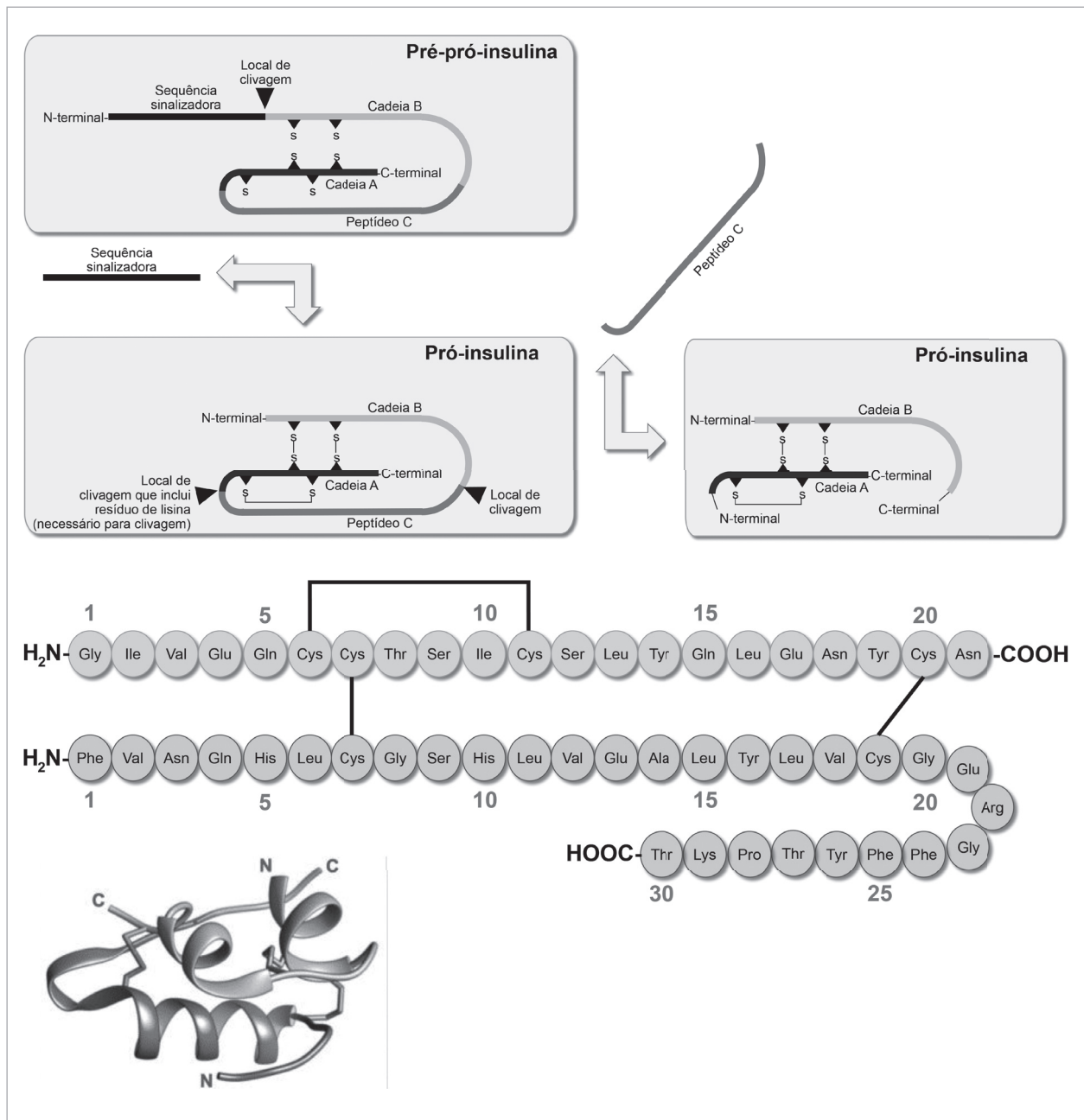


FIGURA 9.5 Ilustração esquemática da síntese de insulina pela clivagem da pró-insulina, sequência de aminoácidos e estrutura 3D da insulina.

Fonte: Elaborada pelos autores com base em Hörber et al. (2020), Patel e Dutta (2018) e Paiva (2014).

As primeiras insulinas comercializadas eram extraídas de tecidos animais (bovino e porcino) e foram utilizadas comercialmente entre 1922 e 1974 (SANDOW et al., 2015). Contudo, apresentavam um nível elevado de imunogenicidade. No desejo de reduzir a imunogenicidade e não ficar restrito a fontes animais, desencadeou-se a busca de métodos para obtenção da insulina humana. Quatro métodos foram explorados: a extração do pâncreas humano, a síntese química dos aminoácidos,

a conversão da insulina porcina em humana e a produção da insulina humana recombinante por fermentação de microrganismos geneticamente modificados. Porém, somente os dois últimos foram possíveis de serem escalonados (LADISCH; KOHLMANN, 1992).

A empresa Novo Nordisk S.A. lançou, nos anos 1970, a insulina humana obtida pela conversão da insulina porcina, processo conhecido como sendo semissintético. Neste processo a enzima tripsina hidrolisa

a insulina entre os resíduos B29 (Lys)-B30 (Ala), ao mesmo tempo que catalisa a reação inversa na qual o éster de treonina desloca a alanina da posição B-30 na molécula de insulina, substituindo assim a Ala pela Thr na posição B30, única diferença entre a insulina porcina e humana. Esta transpeptidação de insulina porcina para insulina humana foi otimizada para 97% de rendimento usando tripsina solúvel e estabelecida industrialmente (LADISCH; KOHLMANN, 1992). Contudo, esse método era limitado em termos de escala, pois ainda dependia da extração animal, condição que poderia ser superada com o desenvolvimento de uma insulina recombinante. Entretanto, não havia, até o momento, nenhuma molécula utilizando a tecnologia do DNA recombinante no mercado.

A grande demanda mundial impulsionou para que a insulina fosse a primeira proteína terapêutica recombinante desenvolvida, uma vez que a principal vantagem da tecnologia do DNA recombinante é a possibilidade de escalonamento do processo e o fato de a matéria prima ser ilimitada. O Humulin® foi a primeira insulina recombinante aprovada para uso humano por agências reguladoras, em 1982, molécula desenvolvida e produzida pela associação de duas empresas (Eli Lilly & Co. e Genentech), sendo um marco na indústria biotecnológica (LADISCH; KOHLMANN, 1992). Devido à sua simplicidade e comprovada capacidade de produção de uma molécula quimicamente, fisicamente e imunologicamente idêntica à insulina do pâncreas humano, o sistema bacteriano de *Escherichia coli* foi a escolha ideal para produção da primeira insulina recombinante, além do profundo conhecimento acumulado sobre esse sistema de expressão.

Para produzir a primeira insulina humana recombinante comercial (Humulin®) foi utilizada uma técnica de expressão em linhagem *E. coli* K2 baseada em dois cultivos em separado. Na técnica, o gene que codifica a cadeia A foi clonado em um plasmídeo (pBR322) in frame com o gene para a betagalactosidase (β -gal), sistema operon lac, gerando uma proteína fusionada: betagalactosidase (porção N-terminal) /cadeia A da insulina, conectadas por um resíduo de metionina (Met). O mesmo procedimento foi feito com a cadeia B da insulina, gerando dois plasmídeos. Os dois plasmídeos foram transformados em *E. coli* K2 e os clones cultivados separadamente. Após a extração dos corpos de inclusão, as moléculas de betagalactosidase, por possuírem a função de auxiliar na seleção dos clones transformados, por ser um gene induzível, são removidas utilizando brometo de cianogênio (CNBr), que cliva o resíduo de Met entre a β -gal e as cadeias A e B. Na fase de reenovelamento, as pontes dissulfeto são criadas, por sulfitolise (redução das ligações dissulfeto, formando

as pontes dissulfeto), para conectar as cadeias A e B, formando a molécula de insulina. O sistema operon lac tem como desvantagem o grande tamanho da proteína de fusão β -gal (~1.000 aminoácidos), o que influencia no rendimento da produção de insulina.

A substituição do operon lac pelo operon triptofano (sistema Trp-LE'-Met) clonado in place com as cadeias A e B da insulina produziu uma proteína de fusão menor, o que acarretou aumento da produção das proteínas de fusão até 30%. Além disso, contribuiu para aumento da produção o fato de o promotor de triptofano ser forte para *E. coli*, sendo essa a primeira melhoria do processo de produção da insulina recombinante, que passou a ser utilizada junto com a rota da pró-insulina no desenvolvimento dos produtos subsequentes. A rota da pró-insulina com o sistema Trp-LE'-Met tem como vantagens a utilização de uma única fermentação e obtenção de rendimentos maiores, tornando o processo mais eficiente (o produto Insuman®, aprovado em 1997, foi desenvolvido com essa técnica).

Nesta estratégia, assim como na rota com 2 clones, a pró-insulina pode ser liberada do fragmento da enzima bacteriana (Trp-LE'-Met) rompendo-se a ligação no resíduo de metionina. A cadeia de pró-insulina é submetida a um processo de dobramento para permitir a formação de pontes dissulfetos intermoleculares (como na via com 2 clones), e o peptídeo C pode então ser clivado, enzimaticamente, para produzir a insulina humana, que é submetida a etapas de purificação até obter-se o princípio ativo purificado (LADISCH; KOHLMANN, 1992). Portanto, as diferenças entre as vias de obtenção da insulina estão no fato de a rota da pró-insulina utilizar uma fermentação e ser necessária uma clivagem enzimática durante o processo. A Figura 9.6 mostra as duas rotas de produção da insulina humana recombinante, ambas utilizando o sistema Trp-LE'-Met (KROEF et al., 1989; LADISCH; KOHLMANN, 1992).

Além do sistema bacteriano, as leveduras também são utilizadas para produção de insulinas comerciais, sendo as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (p. ex., Novolin®) e *Pichia pastoris* (p. ex., Myxredlin®) as mais utilizadas. O sistema de expressão baseado em leveduras produz precursores de insulina solúveis que são secretados no sobrenadante da cultura. A expressão em leveduras tem como vantagem recuperar o produto direto no sobrenadante, sem necessidade de implementar operações de rompimento celular, que normalmente possuem maior investimento em capital. Porém, o fato de a produção em sistema bacteriano produzir a pró-insulina em corpos de inclusão faz que as moléculas estejam mais protegidas contra degradação proteolítica e mecânica, acarretando maior rendimento, além da obtenção de um produto mais concentrado. A separação de corpos de inclusão

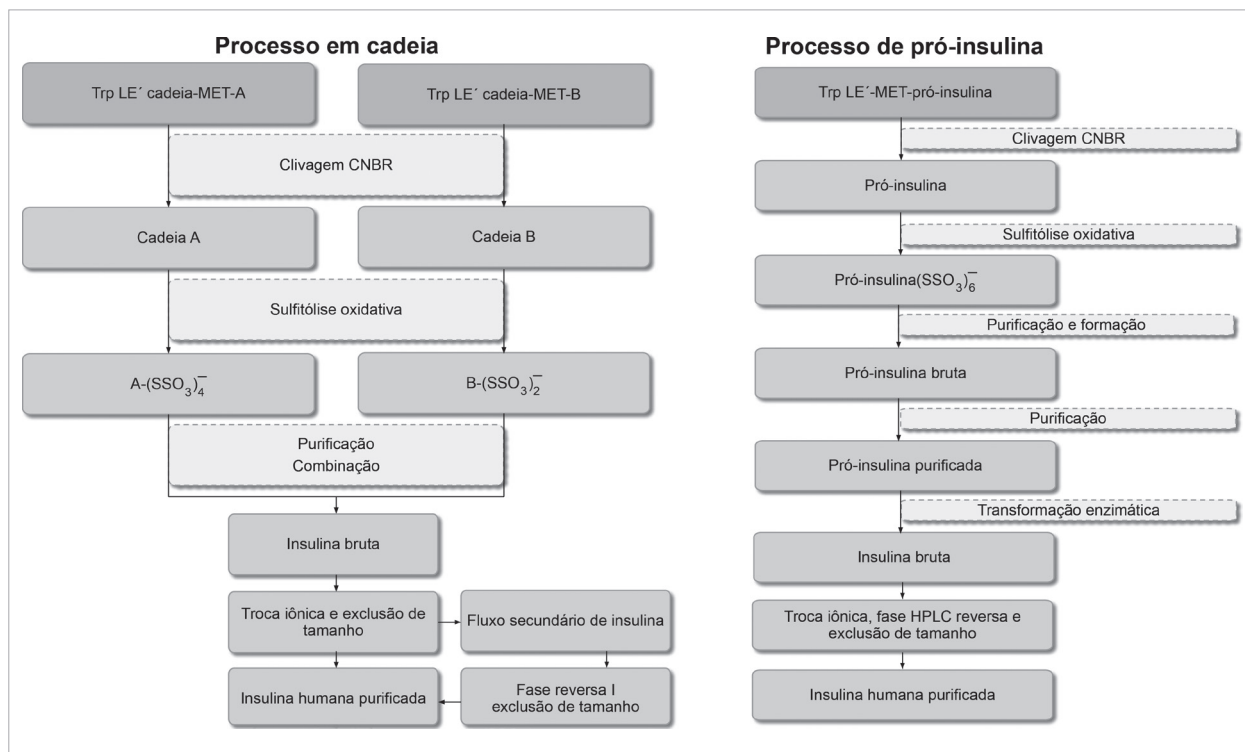


FIGURA 9.6 Vias de produção da insulina recombinante. A: produção de duas cadeias (duas fermentações). B: Via da pró-insulina (uma fermentação).

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Kroef et al. (1989)

das outras proteínas contaminantes tende a ser mais fácil do que se o produto de interesse estivesse livre no sobrenadante, isso por causa da diferença de tamanho e densidade dos corpos de inclusão em comparação às proteínas do hospedeiro, que devem ser separadas do produto de interesse. Portanto, para definir o sistema de expressão é preciso avaliar todos esses critérios citados (BAESHEN et al., 2014; SIEW; ZHANG, 2021).

O maior desafio na administração de insulina é a manutenção dos níveis basais da molécula no organismo, evitando assim picos de hiperinsulinemia e consequente hipoglicemia no organismo. Após a insulina ser administrada pela via subcutânea, os hexâmeros formam depósitos que precisam ser desassociados em dímeros e, em seguida, em monômeros para conseguirem entrar na circulação sanguínea, o que leva a uma difusão lenta. Desta forma, a insulina recombinante regular demora a alcançar a concentração do pico sérico (em torno de 2h após a aplicação, em contraste a alguns minutos, quando a insulina é aplicada intravenosamente), sendo necessária sua aplicação de 1 a 1,5 hora antes das refeições. Por conta desta difusão lenta, a ação da insulina recombinante é mais prolongada, durando algumas horas (em contraste a menos de 1 hora, quando aplicada intravenosamente) e, por isso, pode causar os eventos de hiperinsulinemia pós-prandial, com consequente hipo-

glicemia. Para contornar essas limitações (difusão lenta e ação prolongada), ao longo dos anos muitas versões da insulina recombinante foram desenvolvidas e aprovadas para uso humano. Técnicas de engenharia genética e diferentes formulações/misturas foram utilizadas para produzir moléculas com difusão mais rápida e de ação ultrarrápida, rápida, curta, intermediária, prolongada ou ultraprolongada, dependendo do controle desejado para o paciente.

Por exemplo, nas insulinas de ação mais rápida, a insulina está disponível para o organismo em pouco tempo e com um período de ação mais curto e, por isso, deve ser administrada um pouco antes das refeições. O paciente precisa controlar bem a administração e tomar várias vezes ao dia. Mais informações sobre a administração dos tipos de insulina e o impacto para o paciente podem ser obtidas no item 9.5 deste capítulo.

Diferentes formulações/misturas de insulinas são disponibilizadas com o intuito de modificar a ação da molécula. A adição de protamina, proteína obtida de peixes, à formulação de insulinas é a estratégia mais comum para prolongar a duração da insulina no organismo. A protamina tem ação de inibir a heparina (anticoagulante natural), que por sua vez interage com a insulina inibindo a ação da molécula. Hagerdorn adicionou protamina à insulina pela primeira vez, entre

1930 e 1940, desenvolvendo a insulina denominada de NPH, *Neutral Protamine Hagerdorn* (PIRES; CHACRA, 2008). Outros termos são utilizados quando a protamina é misturada com a insulina lispro (NPL – *Neutral Protamine Lispro*) e com a insulina Asparte de Protamina Neutra (NPA – *Neutral Protamine Aspart*). A dinâmica de utilização das diferentes insulinas será abordada também na seção seguinte (uso e recomendações clínicas), item 9.5.1, que descreve melhor o diabetes.

Neste contexto, a Novo Nordisk lançou, em 2002, uma série de insulinas produzidas em *S. cerevisiae* que se diferenciavam pela formulação, modificando, assim, a ação da insulina. Dentre as que ainda possuem aplicabilidade clínica, citamos: (i) o medicamento Actrapid® é uma insulina de ação rápida que consiste em uma preparação com zinco para administração subcutânea e intravenosa; (ii) o Insulatard® é uma insulina de ação prolongada que consiste em uma suspensão de insulina isofânica (suspensão cristalina de insulina com protamina e zinco) para administração subcutânea; e (iii) o Mixtard® é uma insulina de ação dupla que consiste em uma suspensão com a combinação de insulina dissolvida e insulina isofânica para administração subcutânea (SPADA; WALSH, 2004).

As modificações na estrutura da molécula de insulina regular (produção de análogos de insulina) têm como objetivo alterar a capacidade de absorção da insulina, que consiste na disponibilização na corrente sanguínea, que é influenciada pela dinâmica de manobração e difusão dos hexâmeros de insulina (todas as insulinas terapêuticas contêm Zn^{2+} para formação de hexâmero na formulação) do espaço subcutâneo para o sangue. Sendo assim, o início lento ou a prolongada duração da ação da insulina recombinante regular injetada subcutaneamente pode ser atribuída à tendência das moléculas de insulina humana de se associarem para formar dímeros e hexâmeros. Outro desafio é tornar a molécula mais estável no sangue sem comprometer sua atividade biológica, ou seja, preservando o sítio de ligação com o receptor. A propensão do monômero de insulina em formar fibrilação pode acarretar problemas para os pacientes, como a formação de amiloidose nas áreas de injeção, o que pode levar a deficiência na absorção da insulina injetada e alterações na resposta imune. Por esse fato, torna-se uma preocupação a mais a construção de análogos de insulina que aumentem a concentração do monômero. Além disso, todas as modificações não podem resultar em uma molécula mais imunogênica.

A insulina lispro foi a primeira insulina desenvolvida com uma modificação na cadeia de aminoácidos provocada por técnicas de engenharia genética. A homologia da insulina com o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) inspirou o desenvolvimento da insu-

lina lispro, pois, apesar da estrutura similar à insulina, o IGF-1 tem pouca tendência a se autosassociar, resultado da diferença nos aminoácidos da região N-terminal da cadeia B em comparação com a insulina. Com base nessa premissa, para formar a insulina lispro foi realizada a inversão da posição dos aminoácidos lisina e prolina, que na molécula natural de insulina ocupavam as posições B28 e B29, respectivamente. Essa inversão produziu uma alteração conformacional na região N-terminal da cadeia B que gerou um impedimento estérico na molécula, comprometendo a habilidade do monômero de manear dímeros, mas não de manear hexâmero (mantendo a estabilidade da molécula). Assim, a constante de associação para formar dímeros se reduziu em 300 vezes, tornando o monômero mais disponível em comparação à insulina regular. O monômero possui uma capacidade de difusão mais rápida da região subcutânea para o sangue. Por isso, a absorção e conseqüentemente a ação da insulina lispro é mais rápida (HOLLEMAN; HOEKSTRA, 1997).

A insulina glargina foi o primeiro análogo de insulina de ação prolongada geneticamente modificado a ser introduzido na prática clínica. Nesta molécula, a extremidade C-terminal da cadeia B é estendida com dois resíduos de arginina, além da substituição de asparagina A21 por glicina. Isso aumenta a carga positiva da molécula e eleva o ponto isoelétrico da insulina de pH 5,4 para neutro. Assim, a insulina glargina é menos solúvel em pH fisiológico e se cristaliza no local da injeção subcutânea, proporcionando um atraso prolongado na absorção e uma duração de ação prolongada, com um pico de concentração plasmática muito reduzido em relação às preparações convencionais de ação prolongada, por alteração na formulação (FURMAN, 2017). Os diferentes tipos de insulina são utilizados dependendo da necessidade do paciente. A Tabela 9.4 lista as insulinas recombinantes aprovadas para uso terapêutico (SIEW; ZHANG, 2021).

Devido à alta frequência de administração subcutânea, muitos pacientes demoravam a aderir ao tratamento com insulina. Portanto, existe um esforço grande para desenvolver outro método de administração que não seja por injeções. O biofármaco Exubera® foi desenvolvido para ser administrado na via pulmonar, por inalação oral. Apesar de ter alcançado uma difusão mais rápida do que as insulinas desenvolvidas anteriormente, inclusive mais rápida que a lispro (o que conferiu a administração da insulina junto com a refeição), alguns pontos negativos foram observados, como: (i) o dispositivo de inalação, que para cumprir a entrega da insulina em aerossol era pesado e grande (do tamanho de uma lanterna de 30 cm; Figura 9.7a), sendo considerado um incômodo pelos pacientes, gerando constrangimento em público; (ii) a

biodisponibilidade de cerca de 10% em relação à insulina regular administrada por via subcutânea (o que resultava na necessidade de administrar grandes doses de insulina); (iii) o desenvolvimento de anticorpos anti-insulina (mas sem impactar a eficácia e segurança terapêutica); (iv) o desenvolvimento de tosse, principalmente após a inalação (com diminuição na frequência e intensidade ao longo do tratamento); (v) o declínio da função pulmonar (que se mostrou reversível ao suspender o uso da insulina inalável), consequentemente excluindo sua utilização por pacientes com doenças pulmonares; (vi) o ganho de peso; (vii) a suspeita em promover o desenvolvimento de câncer de pulmão (embora sem comprovação clínica); e (viii) o alto custo, quando comparado com a insulina subcutânea (AL-TABAKHA, 2015).

A segunda insulina inalada aprovada, denominada de Afrezza® (detalhada no item 9.4.1.3) apresentou algumas melhorias em relação às limitações conferidas pela Exubera®, como: (i) um dispositivo de inalação pequeno e discreto, denominado DreamBoat® (cerca de 5 cm; Figura 9.7b); (ii) uma biodisponibilidade um pouco maior, entre 21 e 30% em relação à insulina regular administrada por via subcutânea; (iii) um início de ação mais rápido, resultando em uma administração durante a refeição (insulina de ação ultrarrápida); (iv) uma duração de ação mais curta que as insulinas regular,

lispro e Exubera®, levando a eventos de hipoglicemia menos frequentes e menos graves; e (v) um incremento de peso menor. Em relação às outras limitações, Afrezza® se mostrou similar à Exubera® (AL-TABAKHA, 2015). Embora seja comercializada até o momento, Afrezza® ainda não ganhou a participação esperada no mercado.

A insulina é um caso de sucesso do uso da tecnologia do DNA recombinante para aprimorar uma proteína natural. Contudo, mesmo com toda a evolução conquistada, nenhuma insulina análoga possui comportamento exatamente igual à insulina endógena no organismo. A insulina não é o único exemplo de proteína que foi modificada ao longo do tempo. Na prática, todas as moléculas possuem desafios e cada uma tem sua própria história de evolução. Ainda existe muito a ser explorado no desenvolvimento de biofármacos, uma área que ocupa uma posição relevante na indústria farmacêutica e tende a crescer cada vez mais.

9.5 USO E RECOMENDAÇÕES CLÍNICAS

Ao longo do capítulo, foram apresentados diversos exemplos de proteínas recombinantes que são capazes não apenas de substituir uma série de moléculas endógenas, tratando, principalmente, condições de insuficiência congênita ou adquirida, como proteínas

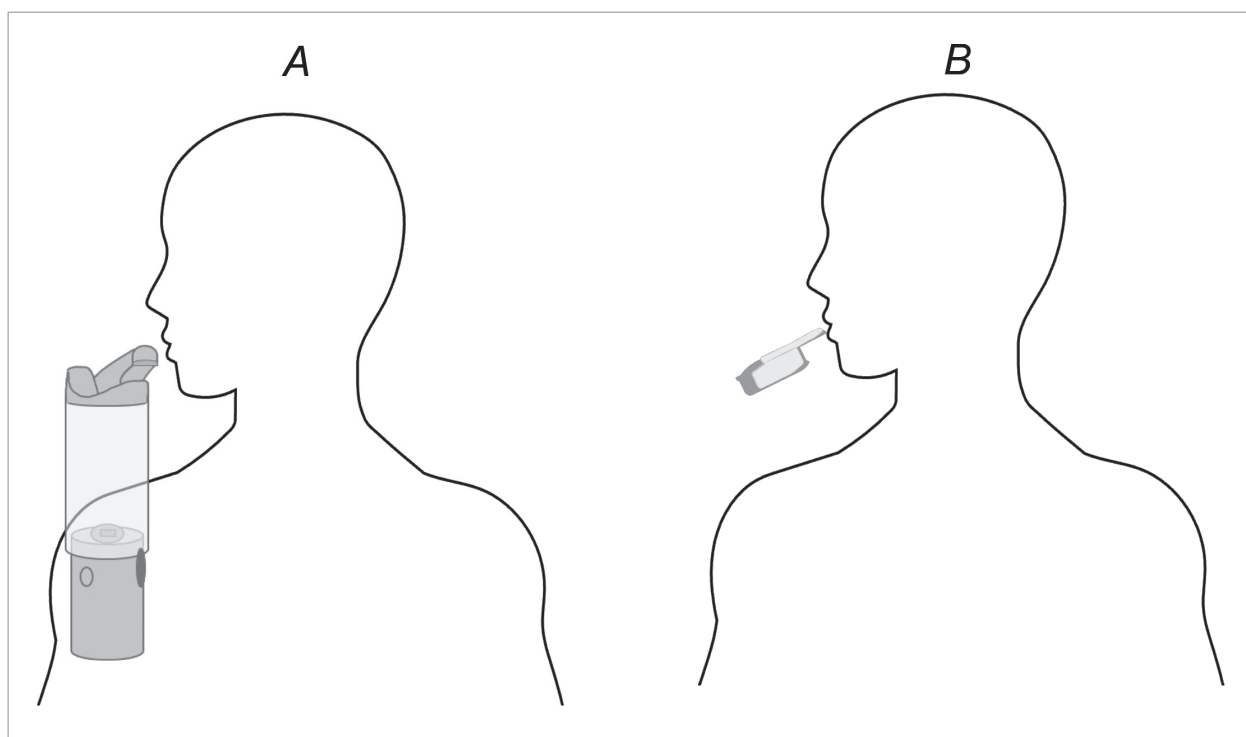


FIGURA 9.7 Insulinas inaladas. (A) Inhance®: Representação do dispositivo de inalação da Exubera®; (B) DreamBoat®: Representação do dispositivo de inalação da Afrezza®.

Fonte: elaborada pelos autores. Elementos do canva.com foram utilizados.

TABELA 9.4 Insulinas recombinantes comerciais

Tipo de insulina	Estrutura	Ação	Sistema hospedeiro	Produtor	Nome comercial	Ano da primeira aprovação pelo FDA/EMA				
Insulina humana	Idêntica à insulina nativa humana	Ação rápida/curta/intermediária/longa, dependendo da formulação	<i>E. coli</i>	Eli Lilly & Co	Humulin®	1982 (EUA)				
				Sanofi	Insuman®	1997 (EU)				
				Baxter Healthcare	Myxredlin®	2019 (EUA)				
Insulina lispro	Inversão de posições dos aminoácidos prolina (B28) e lisina (B29) na cadeia B da insulina humana, tornando-a similar à estrutura química do Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)	Ação rápida	<i>S. cerevisiae</i>	Baxter Holding	Inpremiza®	2022 (EU)				
				Novo Nordisk*	Actrapid®, Insulatard®, Mixtard®, Monotard®, Ultratard®, Velosulin®	Todos em 2002 (EU) (Monotard e Ultratard retirados do mercado em 2006 e Velosulin em 2009)				
				Novo Nordisk	Novolin®	1991 (EUA) (retirado do mercado em 2010)				
				MannKind	Afrezza®	2014				
Insulina glargina	Na cadeia A21, a asparagina é substituída pela glicina e duas moléculas de argininas são acrescentadas na posição B31 e B32 alongando a cadeia	Ação longa	<i>E. coli</i>	Eli Lilly & Co	Humalog®	1996 (EUA e EU)				
					Humalog® (biossimilar)	2017 (EU)				
				Sanofi	Admelog®	2017 (EUA)				
					Eli Lilly Nederland	Lyumjev®	2020 (EUA e EU)			
				Insulina glargina	Na cadeia A21, a asparagina é substituída pela glicina e duas moléculas de argininas são acrescentadas na posição B31 e B32 alongando a cadeia	Ação longa	<i>P. pastoris</i>	Sanofi	Lantus®	2000 (EUA e EU)
								Sanofi	Toujeo®	2000 (EU)
Eli Lilly & Co	Abasaglar®, Basaglar® (biossimilar)	2014 (EUA)								
Eli Lilly & Co	Rezvoglar® (biossimilar)	2021 (EUA)								
Insulina glargina	Na cadeia A21, a asparagina é substituída pela glicina e duas moléculas de argininas são acrescentadas na posição B31 e B32 alongando a cadeia	Ação longa	<i>P. pastoris</i>	Mylan	Semglee® (biossimilar)	2018 (EU)				
				Novo Nordisk	NovoRapid®	1999 (EU)				
Insulina glargina	Na cadeia A21, a asparagina é substituída pela glicina e duas moléculas de argininas são acrescentadas na posição B31 e B32 alongando a cadeia	Ação longa	<i>P. pastoris</i>	Novo Nordisk	Novolog®	2001 (EUA)				

(continua)

TABELA 9.4 Insulinas recombinantes comerciais (continuação)

Tipo de insulina	Estrutura	Ação	Sistema hospedeiro	Produtor	Nome comercial	Ano da primeira aprovação pelo FDA/EMA
Insulina asparte	Substituição do aminoácido prolina na posição B28 da cadeia B da insulina pelo ácido aspártico	Ação rápida	<i>S. cerevisiae</i>	Sanofi	Apidra®	2004 (EUA e EU)
Insulina glulisina	Na cadeia B da insulina a asparagina da posição B3 é substituída por lisina e a lisina da posição B29 é substituída por ácido glutâmico	Ação rápida	<i>E. coli</i>	Novo Nordisk	Levemii®	2004 (EU)
Insulina detemir	Remoção da treonina da posição B30 da cadeia B e um ácido graxo (C14) é ligado covalentemente à lisina da posição B29	Ação longa	<i>S. cerevisiae</i>	Novo Nordisk	Xultophy®**	2014 (EU)
Insulina degludeca	Remoção de treonina da posição B30 e conjugação do ácido hexadecanóico via espaçador gama-glutamil com a lisina da posição B29	Ação ultralonga	<i>S. cerevisiae</i>	Novo Nordisk	Ryzodeg® 70/30	2013 (EU)
Misturas de diferentes tipos de insulina recombinantes	Mistura de insulina degludeca com insulina asparte	Ação ultralonga e rápida (atende aos dois propósitos)	<i>S. cerevisiae</i>			

*Alguns desses produtos possuem nomes comerciais diferentes nos EUA: Actrapid® (Novolin® R nos EUA); Insulatard® (Photaphane® ou Novolin® R nos EUA); Mixtard® (Actraphane® ou Novolin® 70/30 nos EUA); Monotard® (Novolin® L ou Lente® nos EUA); e Ultratard® (Novolin® ultralente nos EUA).

** Combinação de 2 produtos aprovados, Victoza® e Tresiba®.

Fonte: adaptada de Siew e Zhang (2021) e Walsh e Walsh (2022).

de fusão e citocinas que atuam na fisiopatologia de uma série de doenças imunomediadas. O desenvolvimento dessas proteínas promoveu um expressivo avanço no tratamento de diversas patologias que antes careciam de opções terapêuticas.

Nesta seção, será dedicada maior atenção às indicações clínicas que podem ser tratadas com algumas das proteínas recombinantes comerciais, fornecendo mais exemplos de tratamentos relacionados às moléculas e explorando com mais detalhes alguns tratamentos.

O uso da insulina no tratamento de diabetes melito e das enzimas recombinantes de GBA no tratamento de doença de Gaucher será abordado mais profundamente dada sua importância histórica e impacto na saúde pública brasileira. A Tabela 9.5 expõe alguns exemplos de patologias que podem ser tratadas por algumas das moléculas descritas.

9.5.1 Diabetes melito

O diabetes melito (DM) pode ser definido como um conjunto de alterações metabólicas caracterizadas por níveis sustentadamente elevados de glicemia, decorrentes de deficiência na produção de insulina ou de sua ação, levando a complicações de longo prazo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) recomenda a classificação baseada na etiopatogenia do diabetes, que compreende o diabetes tipo 1 (DM1), o diabetes tipo 2 (DM2), o diabetes melito gestacional (DMG) e os outros tipos de diabetes. O DM2 é o tipo mais comum e está frequentemente associado à obesidade e ao envelhecimento. Tem início insidioso e é caracterizado por resistência à insulina e deficiência parcial de secreção de insulina pelas células β pancreáticas, além de alterações

TABELA 9.5 Uso terapêutico de proteínas recombinantes na prática clínica

Molécula recombinante (nome do princípio ativo)	Classe	Indicação clínica
Eritropoetina (rHuEPO)	Citocina	Tratamento de anemia em pacientes com insuficiência renal; anemia associada ao câncer e utilização de quimioterápicos; anemia em pacientes HIV-positivo submetidos ao AZT; em procedimentos pré e perioperatórios, em doenças crônico-degenerativas.
Betainterferona	Citocina	Tratamento da esclerose múltipla caracterizada pela presença de surtos com comprovada eficácia na redução do número e gravidade destes, assim como na estabilização da progressão da doença.
Etanercepte	Proteína de fusão – anti-TNF alfa	Redução dos sinais e sintomas e inibição da progressão do dano estrutural em pacientes com as doenças reumatológicas e/ou dermatológicas imunomediadas: artrite reumatoide, espondiloartrites, artrite psoriásica e psoríase.
Folitropina alfa (FSHr)	Hormônio	Anovulação (incluindo a doença do ovário poliquístico, estimulação do desenvolvimento multifolicular para reprodução assistida, associado ao LH em preparação, para mulheres com insuficiência grave de LH e FSH), estimulação da espermatogênese no homem com hipogonadismo hipogonadotrófico congênito ou adquirido (INDÚSTRIA FARMACÊUTICA SERONO, 2023).
Somatropina	Hormônio	Distúrbio do crescimento por insuficiência na secreção do hormônio do crescimento ou associado a síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi; baixa estatura idiopática (ANVISA, 2023).
Alfaturctocogue	Fator VIII de coagulação recombinante	Tratamento e profilaxia de hemorragias em pacientes com Hemofilia A Bula – Zonovate® alfaturctocogue, fator VIII de coagulação recombinante (NOVO NORDISK, 2023). Frequência, dose e duração do tratamento de reposição dependem da gravidade da deficiência do fator VIII, da localização e extensão da hemorragia e da condição clínica do paciente.
Alfanonacogue	Fator IX de coagulação recombinante	Tratamento e profilaxia de hemorragias em pacientes com Hemofilia B, incluindo controle e prevenção de sangramento em procedimentos cirúrgicos (PFIZER, 2023).

*As indicações clínicas de eritropoetina podem variar de acordo com a bula dos diferentes fabricantes.

Fonte: elaborada pelos autores, com base em MSIF (2020), Saúde (2022) e Da Gama Pereira et al. (2015).

na secreção de incretinas. Apresenta frequentemente características clínicas associadas à resistência à insulina, como acantose nigricans (aparecimento de manchas aveludadas e escuras na pele, em dobras e vincos do corpo) e hipertrigliceridemia.

O DM1 é mais comum em crianças e adolescentes. Apresenta deficiência grave de insulina devido à destruição imunomediada das células β . A apresentação clínica é abrupta, com propensão à cetose (produção de energia a partir da gordura) e à cetoacidose (acúmulo de corpos cetônicos no sangue gerando alteração do pH), com necessidade de insulino terapia plena desde o diagnóstico ou após curto período (SBD, 2021).

A forma mais prevalente de hiperglicemia na gestação é o DMG. O DMG é definido como uma intolerância aos carboidratos de gravidade variável, que se inicia durante a gestação, porém não preenche critérios diagnósticos de DM fora da gestação (NIH, 2014). O DMG afeta de 3 a 25% das gestações, dependendo do grupo étnico e do critério diagnóstico utilizado (GUARIGUATA et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a).

O diagnóstico de DM deve ser estabelecido pela identificação de hiperglicemia. Para isto, podem ser usados a glicemia plasmática de jejum, o teste de tolerância oral à glicose (TOTG) e a hemoglobina glicada (A1c), como descrito na Tabela 9.6. Na presença de sintomas inequívocos de hiperglicemia, é recomendado que o diagnóstico seja realizado por meio de glicemia ao acaso ≥ 200 mg/dL (COBAS et al., 2022).

TABELA 9.6 Critérios laboratoriais para definição dos estados de hiperglicemia

Critérios	Normal	Pré-DM	DM2
Glicemia de jejum (mg/dL)*	< 100	100 a 125	> 125
Glicemia 2h após TOTG (mg/dL)**	< 140	140 a 199	> 199
HbA1c (%)	< 5,7	5,7 a 6,4	> 6,4

DM2: diabetes tipo 2; GJ: glicemia de jejum; HbA1c:

hemoglobina glicada; TOTG: teste de tolerância oral à glicose.

* Considera-se como jejum a cessação de ingestão calórica por ≥ 8 horas. ** Carga oral equivalente a 75 g de glicose anidra diluída em água.

Fonte: Cobas et al. (2022).

Os sintomas clássicos são poliúria, polidipsia, polifagia e perda ponderal (os quatro “Ps”) que podem estar presentes em ambos os tipos de diabetes, porém são mais agudos e mais intensos no DM1. O DM2 costuma ter evolução insidiosa, podendo permanecer assintomático por vários anos. Ao diagnóstico, o paciente pode apresentar complicações como: (i) retinopatia; (ii) neuropatia; (iii) doença renal; (iv) doenças macrovas-

culares (doença ateromatosa cardiovascular (DACV); e (v) doença ateromatosa cardiovascular coronariana, cerebral e periférica (DAP). Outras manifestações graves podem ocorrer, como úlceras nos pés, amputações, insuficiência renal, infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

A hiperglicemia é um fator de risco contínuo para desfechos micro e macrovasculares. Tanto o tempo como a intensidade da hiperglicemia estão associados ao desenvolvimento e à progressão de complicações micro e macrovasculares (SILVA FILHO et al., 2022). A principal medida na prevenção de DM2 é a mudança de estilo de vida (MEV), incluindo adesão a uma dieta saudável visando à redução do peso corporal em pelo menos 5% nos indivíduos com sobrepeso ou obesidade, combinada com atividade física regular (DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP, 2002). As medidas de estilo de vida, por sua vez, nem sempre são satisfatórias.

Existem muitas opções terapêuticas para tratar a hiperglicemia do DM2, com eficácia demonstrada na redução da glicemia e com segurança cardiovascular estabelecida. No Brasil, estão disponíveis medicamentos para tratamento combinado: os agonistas do receptor de GLP-1, inibidores de SGLT2, inibidores da DPP-4, sulfonilureias, pioglitazonas, inibidores de alfa glicosidase e glinidas. As opções de tratamento, no entanto, precisam ser individualizadas de acordo com as características clínicas do paciente, considerando o risco de hipoglicemia, a tolerabilidade, os efeitos adversos e o custo (SILVA FILHO et al., 2022). O tratamento deve se basear na presença de comorbidades e sintomas, como exemplificado no fluxograma da Figura 9.8.

A SBD recomenda que, em adultos não gestantes com diagnóstico recente de DM2, sem doença cardiovascular ou renal, assintomáticos, em que a HbA1c é $> 9,0\%$, a terapia dupla com metformina associada à insulina deve ser considerada para melhorar o controle glicêmico. Em comparação com os agentes orais, a terapia intensiva com insulina precoce em pacientes com DM2 recém-diagnosticada está associada a impacto favorável na recuperação e manutenção da função das células beta, bem como à remissão glicêmica prolongada. Além disso, em adultos com DM2 sintomáticos (poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso) e que apresentam HbA1c $> 9\%$ ou glicemia de jejum ≥ 250 mg/dL, a terapia à base de insulina é recomendada para melhorar o controle glicêmico, mesmo que de maneira transitória.

No momento da escolha pelo início de insulino terapia, é importante ter em mente que existem diversos tipos de insulina, variando em seu tempo de início, pico e duração de ação. A prescrição das diferentes formulações

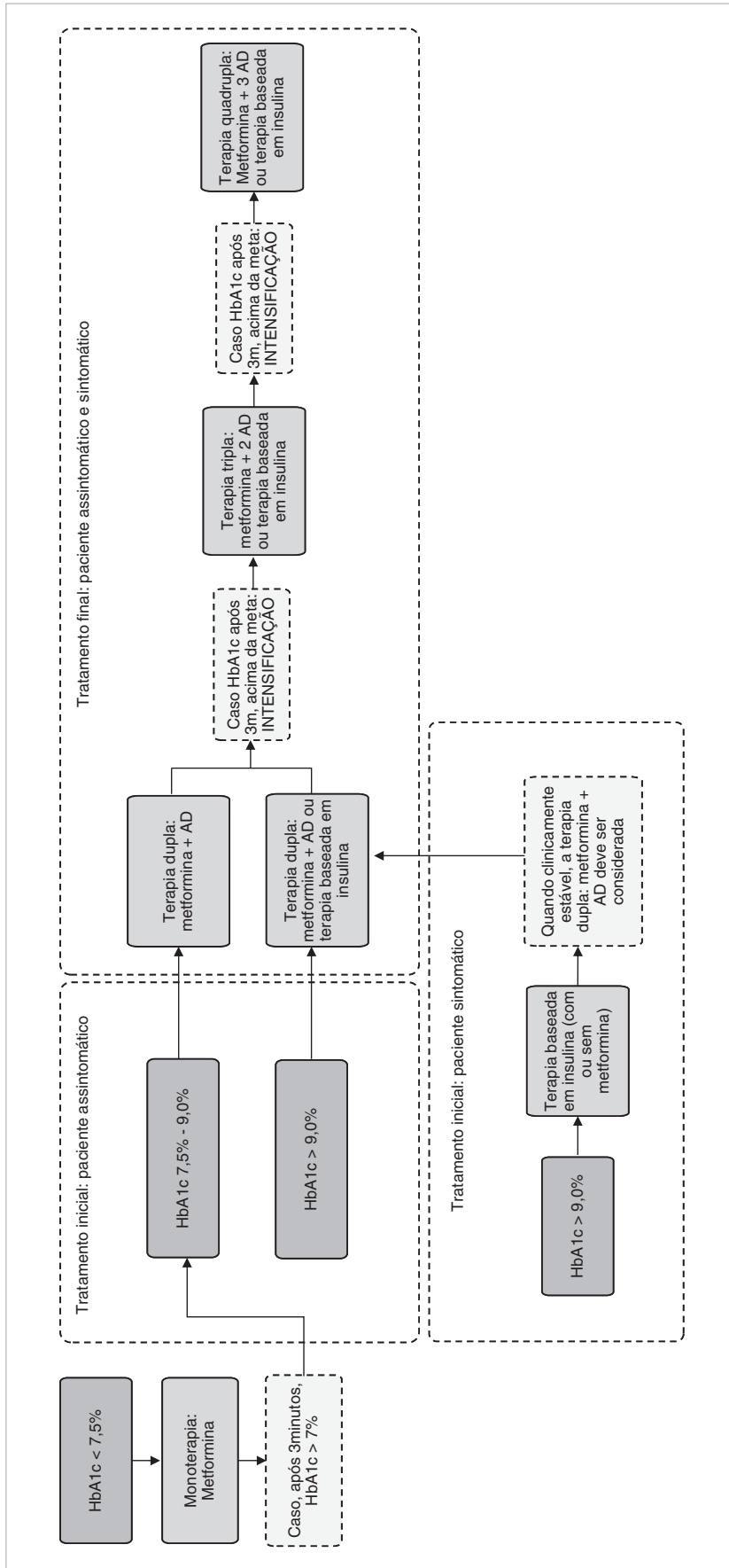


FIGURA 9.8 Diabetes melito tipo 2 (DM2) sem complicações cardiovasculares ou renais. AD: antidiabético; HbA1c: hemoglobina glicosilada. Fonte: elaborada pelos autores com base em Silva Filho et al. (2022).

é baseada na secreção basal de insulina por indivíduos saudáveis. A insulina é secretada, fisiologicamente, em níveis baixos no jejum, com picos estimulados pela alimentação. As modificações na molécula de insulina ao longo de seu desenvolvimento resultaram em análogos que prolongam sua ação (usados como uma insulina basal, que imita a secreção normal de insulina durante a noite e entre as refeições) ou encurtam sua ação (usados de modo pré-prandial para imitar a resposta da insulina a uma refeição), como destacado na seção 9.4.2.1. As insulinas NPH ou isofano têm durações de ação intermediária entre os análogos de ação basal e rápida. O pico e a duração da ação da insulina variam consideravelmente entre os indivíduos. Em doses mais altas, a duração de ação é mais prolongada.

As insulinas chamadas basais se propõem a manter os níveis basais e fisiológicos de insulina durante todo o período do dia, não apresentando períodos de pico. Os análogos de insulina de ação ultrarrápida são administrados 0 a 15 minutos antes das refeições, assemelhando-se com a secreção endógena fisiológica de insulina após a alimentação. As insulinas rápidas de ação curta, a exemplo da insulina regular, devem ser administradas de 30 a 60 minutos antes da refeição (WALLIA; MOLITCH, 2014).

A prescrição, em geral, se inicia com uma dose fixa de insulina basal, com ajustes periódicos e acréscimo de

outros tipos, quando indicado, com o objetivo de atingir um bom controle da glicemia de jejum e, no longo prazo, a meta de HbA1c definida para cada paciente. É importante ter em mente o risco de hipoglicemia e de possível ganho ponderal com tratamento. Na Tabela 9.7 estão descritas as formulações dos diferentes tipos de insulina disponíveis no Brasil.

9.5.2 Doença de Gaucher

A doença de Gaucher é uma das doenças de depósito lisossômico mais comuns e pode ser classificada em três tipos: (i) tipo 1 (DG1), forma não neuropática, é o tipo mais prevalente e ocorre com maior frequência na população judaica Ashkenazi; (ii) tipo 2 (DG2), forma neuropática aguda, ocorre em todos os tipos étnicos, tem incidência estimada de 1 em 150.000; e (iii) tipo 3 (DG3), forma neuropática subaguda ou crônica, com incidência estimada de 1 em 200.000 e prevalência consideravelmente maior do que a DG2 devido à maior sobrevida destes pacientes (HUGHES; SIDRANSKY, 2022). Segundo dados do Ministério da Saúde, há 670 pacientes com DG em tratamento no Brasil, sendo que aproximadamente 96% fazem uso de terapia de reposição enzimática (TRE) e 4% de inibição de síntese de substrato (ISS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a). Trata-se de doença rara com 95% dos casos classifica-

TABELA 9.7 Formulações das insulinas disponíveis no Brasil

Tipo	Nome científico (comercial)	Início	Pico	Duração
Insulinas basais				
Insulina intermediária	Insulina NPH (Humulin N®/NovolinN®)	2-4h	4-10h	10-18h
Análogo de ação longa	Glargina (Basaglar®, Lantus®)	2-4h	–	20-24h
Análogo de ação intermediária	Detemir (Levemir)	1-3h	6-8h	18-22h
Análogo de ação longa	Glargina U300 (Toujeo®)	6h	–	36h
	Degludeca (Tresiba®)	< 4h	–	42h
Insulinas prandiais (bolus)				
Insulina rápida	Insulina regular (Humulin R/Novolin R)	30-60 min	2-3h	5-8h
Análogo de ação ultrarrápida	Asparte (Novorapid)	5-15 min	0,5-2h	3-5h
	Lispro (Humalog)			
	Glulisina (Apidra)			
Análogo de ação ultra+rápida	Fast Asparte (Fiasp)	2,5 min	1-3h	5h
	Insulina Humana Inalada (Afrezza)	imediatamente	10-20 min	1-2h
Insulinas pré-misturadas				
Insulina NPH + Regular	70% NPH/ 30% R (Humilin 70/30)	0,5-1h	3-12h	10-16h
Insulina NPL + Lispro	75% NPL/ 25% Lispro (Humalog Mix 25)	5-15 min	1-4h	10-16h
	50% NPL/ 50% Lispro (Humalog Mix 50)			
Insulin NPA + Asparte	70% NPA/ 30% Asparte (NovoMix70/30)	5-15 min	1-4h	10-16h

Fonte: adaptada de Silva Filho et al. (2022).

dos como tipo 1. Dessa forma, ensaios clínicos sobre o tipo 3 com tamanho amostral adequado são de difícil execução e bastante raros na literatura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

Até o momento, duas opções estão disponíveis para terapia específica de pacientes com DG tipo 1. O tratamento de referência é a TRE e foi a DG que serviu de doença-modelo para estabelecer a eficácia desta abordagem terapêutica. Em 1993, a enzima recombinante imiglicerase (GBA humana recombinante; Cerezyme, Genzyme Corporation) foi introduzida e numerosos estudos documentaram segurança e eficácia em relação aos principais sintomas no primeiro ano de tratamento, à exceção da resposta às anormalidades ósseas, que podem levar vários anos, levando à conclusão dos estudos de menor eficácia. Duas outras formas de TRE foram aprovadas na sequência: alfavelaglicerase (VPRIV; Shire, Wayne, PA); alfataliglicerase (UPLYSO; Protalix Biotherapeutics, Carmiel, Israel). Aproximadamente 15% dos pacientes tratados com alfataliglicerase desenvolveram anticorpos IgG contra a enzima recombinante e aproximadamente metade desses pacientes apresentaram eventos adversos leves a moderados de sintomas alérgicos, particularmente durante o primeiro ano de tratamento. Na maioria dos pacientes, os anticorpos desapareceram quando a TRE foi continuada com a mesma dosagem e apenas alguns pacientes desenvolveram anticorpos inibitórios limitantes da terapia (WANG et al., 2011).

Em linhas gerais, os objetivos básicos do tratamento com TRE são a eliminação ou melhora dos sintomas, prevenção de complicações irreversíveis e melhora da qualidade de vida. Nas crianças, um objetivo adicional é a otimização do crescimento. São escassos estudos comparando diretamente os três tipos de TRE citadas, sendo a literatura vigente sugestiva de equivalência entre elas em termos de eficácia (HUGHES; SIDRANSKY, 2022).

A SRT (*Substrate Reduction Therapy*, terapia de redução de substrato) com N-butil-desoxinojirimicina (Miglustat; Zavesca; Actelion Pharmaceuticals, Basel, Suíça) possui eficácia limitada em melhorar a doença óssea, sendo atualmente recomendada apenas como terapia de segunda linha (WANG et al., 2011). Devido a sua rápida evolução clínica, não há terapia específica disponível para pacientes que apresentam fenótipo DG tipo 2. Para pacientes com DG tipo 3, a TRE não atravessa a barreira hematoencefálica e não contribui para melhora neurológica, mas é eficaz para as manifestações não neuropáticas. Na era pré-TRE, tentou-se transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), mas os resultados a longo prazo foram fracos e a terapia não é recomendada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a; WANG et al., 2011).

9.6 O PAPEL DOS BIOFÁRMACOS NO CEIS

O domínio do processo produtivo das proteínas recombinantes é de grande relevância, pois sendo o Brasil um país de dimensões continentais, com sistema de saúde universal, o impacto do desabastecimento farmacêutico no tratamento de patologias crônicas é imenso.

A insulina é a principal proteína recombinante, tanto em termos de volume em unidades consumidas quanto em impacto clínico, uma vez que o Brasil é o quarto país com maior prevalência de diabéticos no mundo. Em 2017, havia uma população estimada de 12,5 milhões de diabéticos entre 20 e 79 anos. Fatores como obesidade, sedentarismo, mudança do padrão alimentar populacional e atraso diagnóstico aumentam o risco de complicações do DM e criam uma maior demanda de maior utilização de insulinas no tratamento desse perfil de pacientes (GOLBERT et al., 2019).

Entre 2015 e 2020, o Ministério da Saúde adquiriu 121 milhões de unidades de insulina, correspondendo a dois bilhões de doses diárias definidas (DDD) com gasto total de 1,4 bilhões de reais (CATÃO et al., 2022). Somente em 2020, o Departamento de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde adquiriu 166.125.064 de unidades de insulinas humanas (BRASIL, 2022).

O mercado das insulinas é consolidado, ou seja, é dominado por poucos players, o que leva a grande dependência internacional. Segundo relatório da *Health Action International* em 2017, considerando vínculos com outras empresas e acordos de licenciamento, existiam cerca de apenas 10 fabricantes independentes de insulina em todo o mundo (BERAN et al., 2017).

O expressivo volume de doses necessárias para atender o país requer estratégias de aquisição que resultaram em uma tendência de queda para os gastos médios por DDD das insulinas.

Em 2023, o Tribunal de Contas da União (TCU), solicitado pelo Congresso Nacional, emitiu relatório devido ao alto risco de desabastecimento das insulinas análogas de ação rápida no SUS. A situação ocorreu pelo fracasso dos pregões, exigindo processo de dispensa de licitação emergencial por parte do Ministério da Saúde. Os motivos alegados pelas multinacionais para não participação foram restrição de capacidade fabril na etapa de embalagens, restrição de fornecimento por aumento inesperado de demanda e preços de referência abaixo do esperado (TCU, 2023).

Para minimizar o risco de novo fracasso de compra, foi realizado ajuste nos termos de referência, possibilitando a participação de empresas internacionais sem registro na Anvisa. Essa possibilidade é prevista na RDC 203/2017 desde que os fabricantes possuam registro vá-

lido em país cuja autoridade reguladora competente faça parte do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

O Brasil enfrenta um cenário de dependência internacional para efetivar o cuidado do DM, com falta de produção nacional de maneira sustentável. Há apenas uma Parceria para o Desenvolvimento Produtivo ativa, na Fundação Baiana de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico, Fornecimento e Distribuição de Medicamentos, a Bahiafarma, que no período de 2015

a 2020 proveu 28% do volume em DDDs, consumindo 19% do orçamento (CATÃO et al., 2022).

Cenário análogo pode ser vislumbrado em relação às demais proteínas recombinantes. A Tabela 9.8 descreve as principais proteínas incorporadas pela CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias) no SUS até 2022.

Um horizonte é apontado pela OMS em seu Programa de Pré-qualificação para insulina humana, o de expandir o mercado com foco em proteínas recombinantes biossimilares (ver Capítulo 14, específico de biossimilares) (WHO, 2021). A situação vivenciada no cenário do DM permite dimensionar a necessidade do fortalecimento de

TABELA 9.8 Proteínas de uso terapêutico incorporadas para distribuição pelo Sistema Único de Saúde

Medicamentos	Patologia tratada	Classificação
Alfa- <i>alglicosidase</i>	Doença de Pompe de início tardio	Enzimas
Aflibercepte	Degeneração macular relacionada à idade (DMRI) neovascular	Proteínas de fusão
Alfacerliponase	Lipofuscinose ceróide neuronal tipo 2 (CLN2)	Enzimas
Alfadamocotocogúe pegol	Hemofilia A	Proteínas do sistema sanguíneo
Alfaelossulfase	Mucopolissacaridose tipo IVa (síndrome de Morquio A)	Enzimas
Alfaepoetina	Síndrome mielodisplásica de baixo risco	Proteínas do sistema sanguíneo
Alfainterferona	Melanoma cutâneo	Citocinas
Alfapeginterferona 2a e Alfapeginterferona 2b	Hepatite crônica viral B	Citocinas
Alfataliglicerase	Doença de Gaucher	Enzimas
Alfavestronidase	Tratamento da mucopolissacaridose VII (síndrome de Sly)	Enzimas
Alteplase	Embolia pulmonar aguda	Enzimas
Betainterferona 1 ^a	Esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR)	Citocinas
Enoxaparina	Gestantes com trombofilia	Proteínas do sistema sanguíneo
Etanercepte	Artrite reumatoide e psoríase em crianças	Proteínas de fusão
Fator VIII de origem recombinante	Hemofilia A	Proteínas do sistema sanguíneo
Galsulfase	Mucopolissacaridose tipo VI	Enzimas
Idursulfase	Mucopolissacaridose tipo II	Enzimas
Insulinas análogas de ação rápida (lispro, asparte ou glulisina)	Diabetes melito tipo I	Hormônios
Insulinas análogas de ação prolongada	Diabetes melito tipo I e tipo II	Hormônios
Laronidase	Mucopolissacaridose tipo I	Enzimas
Onabotulinotóxina	Incontinência urinária de urgência (IUU)	Citocina
Somatropina	Síndrome de Turner e hipopituitarismo	Hormônios
Toxina botulínica	Bexiga hiperativa	Citocina

Fonte: elaborada pelos autores, com base em Ministério da Saúde (2022).

um complexo industrial voltado para o setor de saúde, com potencial ainda a ser explorado pela alta demanda nacional a essas tecnologias.

REFERÊNCIAS

- AGU, R. U. et al. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. **Respiratory Research**, v. 2, n. 4, p. 198-209, 2001.
- AL-TABAKHA, M. M. Future prospect of insulin inhalation for diabetic patients: The case of Afrezza versus Exubera. **Journal of Controlled Release**, v. 215, p. 25-38, out. 2015.
- ALDOSS, I.; POURHASSAN, H.; DOUER, D. SOHO State of the Art Updates and Next Questions | Asparaginase – Understanding and Overcoming Toxicities in Adults with ALL. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 22, n. 11, p. 787-794, nov. 2022.
- ANVISA. **Versão para o Mercado Privado: CRISCY**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=CRISCY>>. Acesso em: 3 jan. 2023.
- BAESHEN, N. A. et al. Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 141, 2 dez. 2014.
- BAKER, K. et al. Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 223-236, 3 jul. 2009.
- BALDO, B. A. Enzymes Approved for Human Therapy: Indications, Mechanisms and Adverse Effects. **BioDrugs**, v. 29, n. 1, p. 31-55, 4 fev. 2015.
- BANTING, F. G. et al. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. **Canadian Medical Association journal**, v. 12, n. 3, p. 141-6, mar. 1922.
- BATTOOL, T. et al. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900-923, 7 mar. 2016.
- BEN-MENACHEM, D. Preparation, characterization and application of long-acting FSH analogs for assisted reproduction. **Theriogenology**, v. 112, p. 11-17, maio 2018.
- BEN BDIRA, F. et al. Stabilization of Glucocerebrosidase by Active Site Occupancy. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 1830-1841, 21 jul. 2017.
- BERAN, D. et al. **Access to insulin: current challenges and constraints**. 1. ed. Amsterdam: Health Action International, 2017.
- BERTOLUCI, M. C. et al. Portuguese-Brazilian evidence-based guideline on the management of hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 1, p. 45, 24 dez. 2020.
- BEUTLER, E.; KUHL, W. Glucocerebrosidase processing in normal fibroblasts and in fibroblasts from patients with type I, type II, and type III Gaucher disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 19, p. 7472-7474, out. 1986.
- BRASIL. **Ações e resultados DAF/SCTIE/MS : biênio 2019/2020**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
- BUNN, H. F. Erythropoietin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 3, p. a011619-a011619, 1 mar. 2013.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 283-291, 16 ago. 2005.
- BUTLER, M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In: ROCA (Ed.). **Tecnologia de Cultivo de Células Animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2011. p. 122-135.
- CALICETI, P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 10, p. 1261-1277, 26 set. 2003.
- CATÃO, T. P. et al. Perfil de compras federais de insulinas no Brasil: o impacto da entrada de biossimilares. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e1511427073, 9 mar. 2022.
- CIONI, P. et al. Use of Exogenous Enzymes in Human Therapy: Approved Drugs and Potential Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 411-452, fev. 2022.
- COBAS, R. et al. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. In: **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l.] Conectando Pessoas, 2022.
- COHEN, S. N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, nov. 1973.
- DA GAMA PEREIRA, A. B. C. N. et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, n. 6, p. 572-579, nov. 2015.
- DE ANDREA, M. et al. The interferon system: an overview. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 6, p. A41-A46, maio 2002.
- DEAL, C. L. et al. Efficacy and Safety of Weekly Somatrogen vs Daily Somatropin in Children With Growth Hormone Deficiency: A Phase 3 Study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 107, n. 7, p. e2717-e2728, 16 jun. 2022.
- DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 6, p. 393-403, 7 fev. 2002.
- EGRIE, J. C. et al. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 4, p. 290-299, abr. 2003.
- FDA. **Highlights of Prescribing Information**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/103411s51981bl.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2023.
- FOSS, F. Clinical Experience With Denileukin Diftitox (ONTAK). **Seminars in Oncology**, v. 33, p. 11-16, fev. 2006.
- FURMAN, B. L. **Glargine Insulin**. Glasgow: Elsevier, 2017.
- GOH, J. B.; NG, S. K. Impact of host cell line choice on glycan profile. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 851-867, 18 ago. 2018.
- GOLBERT, A. et al. **Diretrizes Da Sociedade Brasileira De Diabetes 2019-2020**. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5730478/mod_resource/content/0/Diretrizes-SBD-2019-2020.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2023.
- GOMORD, V.; FAYE, L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 171-181, abr. 2004.
- GRABER, E.; REITER, E. O.; ROGOL, A. D. Human Growth and Growth Hormone: From Antiquity to the Recombinant Age to the Future. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 5 jul. 2021.
- GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 176-185, fev. 2014.
- GUPTA, V. et al. Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. In: **Basic and Applied Aspects of Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 77-101.

38. HEO, Y.-A.; SYED, Y. Y.; KEAM, S. J. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Drugs**, v. 79, n. 7, p. 767-777, 27 maio 2019.
39. HOLLEMAN, F.; HOEKSTRA, J. B. L. Insulin Lispro. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 3, p. 176-183, 17 jul. 1997.
40. HÖRBER, S. et al. Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. **Biotechnology Advances**, v. 39, p. 107359, mar. 2020.
41. HØYBYE, C. et al. Status of long-acting-growth hormone preparations – 2015. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 25, n. 5, p. 201-206, out. 2015.
42. HUGHES, D.; SIDRANSKY, E. Gaucher disease: Pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis. **Uptodate**, 2022.
43. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA SERONO. **Anexo I Resumo das Características do Medicamento**.
44. JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, out. 1972.
45. JACOBS, C. A.; SMITH, C. A. **United States Patent. Patent Number: 5,605,690**. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/f4/41/f2/508b2b68a918aa/US5605690.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2023.
46. JELKMANN, W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. **European Journal of Haematology**, v. 78, n. 3, p. 183-205, mar. 2007.
47. JEVŠIČEVAR, S.; KUNSTELJ, M.; POREKAR, V. G. PEGylation of therapeutic proteins. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p. 113-128, jan. 2010.
48. KAISER, P. Evolution of the interleukins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 375-394, 3 maio 2004.
49. KAPOOR, R. R. et al. Monitoring of concordance in growth hormone therapy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 93, n. 2, p. 147-148, fev. 2008.
50. KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306-322, 2 maio 2018.
51. KHAN, A. H. et al. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 4, 11 jan. 2017.
52. KROEF, E. P. et al. Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 461, p. 45-61, jan. 1989.
53. LADISCH, M. R.; KOHLMANN, K. L. Recombinant human insulin. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 6, p. 469-478, nov. 1992.
54. LAGASSÉ, H. A. D. et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. **F1000Research**, v. 6, p. 113, 7 fev. 2017.
55. LAL, R. A.; HOFFMAN, A. R. Perspectives on long-acting growth hormone therapy in children and adults. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 63, n. 6, p. 601-607, 10 jan. 2020.
56. LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 21-39, jan. 2008.
57. LEDET, G. et al. A second-generation inhaled insulin for diabetes mellitus. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 72, n. 14, p. 1181-1187, 15 jul. 2015.
58. LOTFI, N. et al. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 4 jun. 2019.
59. MACK, G. S. Pfizer dumps Exubera. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 1331-1332, dez. 2007.
60. MAHLERT, F. et al. Rational Development Of Lipegfilgrastim, a Novel Long-Acting Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Using Glycopegylation Technology. **Blood**, v. 122, n. 21, p. 4853-4853, 15 nov. 2013.
61. MANNUCCI, P. M. Hemophilia therapy: the future has begun. **Haematologica**, v. 105, n. 3, p. 545-553, mar. 2020.
62. MANNUCCI, P. M.; TUDDENHAM, E. G. D. The Hemophilias – From Royal Genes to Gene Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 23, p. 1773-1779, 7 jun. 2001.
63. MARCHETTI, M.; FAGGIANO, S.; MOZZARELLI, A. Enzyme Replacement Therapy for Genetic Disorders Associated with Enzyme Deficiency. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 489-525, fev. 2022.
64. MCKOY, J. M. et al. Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations. **Transfusion**, v. 48, n. 8, p. 1754-1762, ago. 2008.
65. MEHTA, H. M.; MALANDRA, M.; COREY, S. J. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 4, p. 1341-1349, 15 ago. 2015.
66. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Conjunta nº 4, de 22 de Junho de 2017**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2022/portaria-conjunta-no-04-2017-pcdt-gaucher.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2023a.
67. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução – RDC nº 203, de 26 de Dezembro de 2017(*)**. Disponível em: <https://dintegcgcin.saude.gov.br/attachments/download/87/RDC_203-2017_Importação_sem_registro_da_Ansiva.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2023b.
68. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020a.
69. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria SCTIE/MS nº 54, de 11 de Novembro de 2020**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2020/20201113_pcdt_diabete_meli-to_tipo_2_29_10_2020_final.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023b.
70. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tecnologias demandadas**. Disponível em: <<https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/avaliacao-de-tecnologias-em-saude/tecnologias-demandadas>>. Acesso em: 11 jan. 2023.
71. MORADI, Z. et al. Updates on Novel Erythropoiesis-Stimulating Agents: Clinical and Molecular Approach. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 36, n. 1, p. 26-36, 16 jan. 2020.
72. MSIF. **Atlas da Esclerose Múltipla**. Disponível em: <https://www.abem.org.br/wp-content/uploads/2020/09/AtlasOfMS_3rdEdition_traduzido.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.
73. NARIMATSU, Y. et al. Genetic glycoengineering in mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100448, jan. 2021.
74. NIH. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: A World Health Organization Guideline. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 3, p. 341-363, mar. 2014.

75. NOVO NORDISK. **Zonovate® alfaturctocogue**. Disponível em: <https://www.novonordisk.com.br/content/dam/brazil/affiliate/www-novonordisk-br/Profissionais_da_Saude/Bulas-profissionais-de-saude/Zonovate_Bula_Profissional.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2023.
76. PAIVA, M. C. O papel fisiológico da insulina e dos hormônios contrarregulatórios na homeostase glicêmica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional**, v. 61, p. 1-9, 2014.
77. PATEL, S.; DUTTA, S. Insulin. **RCSB Protein Data Bank**, 1 ago. 2018.
78. PFIZER. **BeneFix® alfanonacogue**. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/files/Benefix_Profissional_de_Saude_18.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2023.
79. PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 268–278, mar. 2008.
80. PORTER, S. Human Immune Response to Recombinant Human Proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 1, p. 1-11, jan. 2001.
81. RADER, R. A. (Re)defining biopharmaceutical. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 743-751, jul. 2008.
82. RANKE, M. B.; WIT, J. M. Growth hormone – past, present and future. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 285-300, 16 maio 2018.
83. RENDELL, M. Technosphere inhaled insulin (Afrezza). **Drugs of Today**, v. 50, n. 12, p. 813, 2014.
84. SANDOW, J. et al. Equivalent Recombinant Human Insulin Preparations and their Place in Therapy. **European Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 10, 2015.
85. SANTOS CAVAIOLA, T.; EDELMAN, S. Inhaled Insulin: A Breath of Fresh Air? A Review of Inhaled Insulin. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 8, p. 1275-1289, ago. 2014.
86. SANTOS, J. H. P. M. et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. spe, 8 nov. 2018.
87. SAÚDE, M. DA. **Portaria Conjunta nº 1, de 07 de Janeiro de 2022**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2022/portaria-conjunta-no-1-pcdt-esclerose-multipla.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
88. SBD. **Classificação do diabetes**. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/?utm_source=google-ads&utm_medium=search&gclid=Cj0KCQiAo-yfBhD_ARISAnR56g5E7RdUUTKTQOuZq365KmVMD-69XE2Euu7sAvU-YulOZaN9G0xEVsaAtfSEALw_wcB>. Acesso em: 21 fev. 2023.
89. SCHARENBERG, S. G. et al. Engineering monocyte/macrophage-specific glucocerebrosidase expression in human hematopoietic stem cells using genome editing. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3327, 3 jul. 2020.
90. SCHJOLDAGER, K. T. et al. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 729-749, 21 dez. 2020.
91. SEKHON, B. S. **Biopharmaceuticals: an overview**. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/pscad123/biopharmaceuticals-an-overview>>. Acesso em: 1 jun. 2023.
92. SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. **Nature Metabolism**, v. 3, n. 10, p. 1302-1312, 14 out. 2021.
93. SHARMA, A. et al. Biologics, biosimilars, and biobetters: different terms or different drugs? **Eye**, v. 33, n. 7, p. 1032-1034, 7 jul. 2019.
94. SIEW, Y. Y.; ZHANG, W. Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from E. coli inclusion bodies. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 65, 27 dez. 2021.
95. SILVA FILHO, R. L. DA et al. Tratamento farmacológico da hiperglicemia no DM2. In: **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l.] Conectando Pessoas, 2022.
96. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2017-2018**. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4925460/mod_resource/content/1/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2023.
97. SPADA, S.; WALSH, G. **Directory of Approved Biopharmaceutical Products**. 1. ed. England: Taylor & Francis, 2004.
98. SPIVAK, J.; HOGANS, B. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 90-99, 1 jan. 1989.
99. STROBL, J. S.; THOMAS, M. J. Human growth hormone. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 1, p. 1-34, mar. 1994.
100. STROHL, W. R. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. **BioDrugs**, v. 29, n. 4, p. 215-239, 16 ago. 2015.
101. SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells? **Bioengineered**, v. 8, n. 5, p. 462-470, 3 set. 2017.
102. TCU. **Acórdão 1110/2023 – Plenário**. Disponível em: <<https://pesquisa.apps.tcu.gov.br/documento/acordao-completo/insulina/%2520/DTRELEVANCIA%2520desc%252C%2520NUMACORDAOINT%2520desc/0/%2520>>. Acesso em: 2 jun. 2023.
103. TORRES-OBREQUE, K. M. et al. Building better biobetters: From fundamentals to industrial application. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 65-81, jan. 2022.
104. VERONESE, F. M.; MERO, A. The Impact of PEGylation on Biological Therapies. **BioDrugs**, v. 22, n. 5, p. 315-329, 2008.
105. VILCEK, J. Novel interferons. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 8-9, jan. 2003.
106. WAGNER, E. S. M. **Purificação da enzima glucocerebrosidase humana produzida no leite do primeiro clone caprino transgênico da América Latina**. Disponível em: <<https://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/7008>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
107. WALLIA, A.; MOLITCH, M. E. Insulin Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. **JAMA**, v. 311, n. 22, p. 2315, 11 jun. 2014.
108. WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-18, p. 773-780, set. 2010.
109. WALSH, G.; WALSH, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 12, p. 1722-1760, 5 dez. 2022.
110. WANG, R. Y. et al. Lysosomal storage diseases: Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 5, p. 457-484, maio 2011.
111. WANG, Z. et al. Ontak-like human IL-2 fusion toxin. **Journal of Immunological Methods**, v. 448, p. 51-58, set. 2017.
112. WHO. **Keeping the 100-year-old promise: making insulin access universal**. World Health Organization. Geneva: WHO, 2021.
113. WOOSTER, M. B.; LUZIER, A. B. Reteplase: A New Thrombolytic for the Treatment of Acute Myocardial Infarction. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 33, n. 3, p. 318-324, 26 mar. 1999.
114. ZHAO, S.; MYSLER, E.; MOOTS, R. J. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. **Immunotherapy**, v. 10, n. 6, p. 433-445, 1 maio 2018.

Anticorpos monoclonais terapêuticos

Aline de Almeida Oliveira

Patrícia Cristina da Costa Neves

Fabiana Pompêo de Pina

Andreia Cristina de Melo

Desde o início do novo milênio, os anticorpos monoclonais (mAb) transformaram a medicina moderna e a indústria farmacêutica. Cerca de 1.500 anticorpos diferentes alcançaram estudos clínicos e mais de 90 foram aprovados pela Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – traduzido do inglês *Food Drug Administration*) (KINCH; KRAFT; SCHWARTZ, 2023). Embora estes números sejam relativos aos anticorpos convencionais (KINCH; KRAFT; SCHWARTZ, 2023), novas tecnologias fruto da engenharia de anticorpos vêm avançando e chegando à prática clínica, destacando-se os anticorpos conjugados a droga (ADC – do inglês *antibody drug conjugate*) e anticorpos biespecíficos (LABRIJN et al., 2019; SCHMID; NERI, 2019; TONG et al., 2021).

Neste capítulo são abordadas a estrutura e função dos anticorpos monoclonais e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos, enfatizando as etapas de descoberta, engenharia de anticorpos e desenvolvimento de processos produtivos.

10.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DE ANTICORPOS

Cada molécula de anticorpo é composta de duas cadeias pesadas idênticas (HC) e duas cadeias leves (LC) idênticas (ver Figura 10.1). Na região N-terminal ficam localizadas as sequências variáveis, que conferem a especificidade e diferenciam cada anticorpo. Os dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) são formados pela cadeia leve e pesada e têm como função ligar ao alvo molecular específico com grande afinidade. As partes das cadeias leve e pesada que formam o Fab também são chamadas de região variável, onde se destacam as três regiões de determinação de complementaridade (CDR). Cada cadeia contém estas sequências hipervariáveis, que são cruciais para a especificidade e atuam

na interface de interação com antígeno (CARRARA et al., 2021; GOULET; ATKINS, 2020).

A cadeia pesada, além de compor o Fab, tem como principal função estruturar a região constante, onde se localiza o fragmento Fc, responsável pela ligação a receptores do sistema imune, gerando a resposta efetora. Nesta região destaca-se a posição N297, onde ocorre uma glicosilação que também contribui para a função efetora (CARRARA et al., 2021; GOULET; ATKINS, 2020).

A função mais básica de um anticorpo é neutralizar o antígeno-alvo. Ao se ligar aos epítomos (região dentro do antígeno reconhecida pelo anticorpo) alterações conformacionais podem ser induzidas, o que poderia impedir a ligação deste alvo aos seus receptores. A partir da neutralização é possível impedir a entrada de um vírus na célula, bloquear ou modular uma via de sinalização,

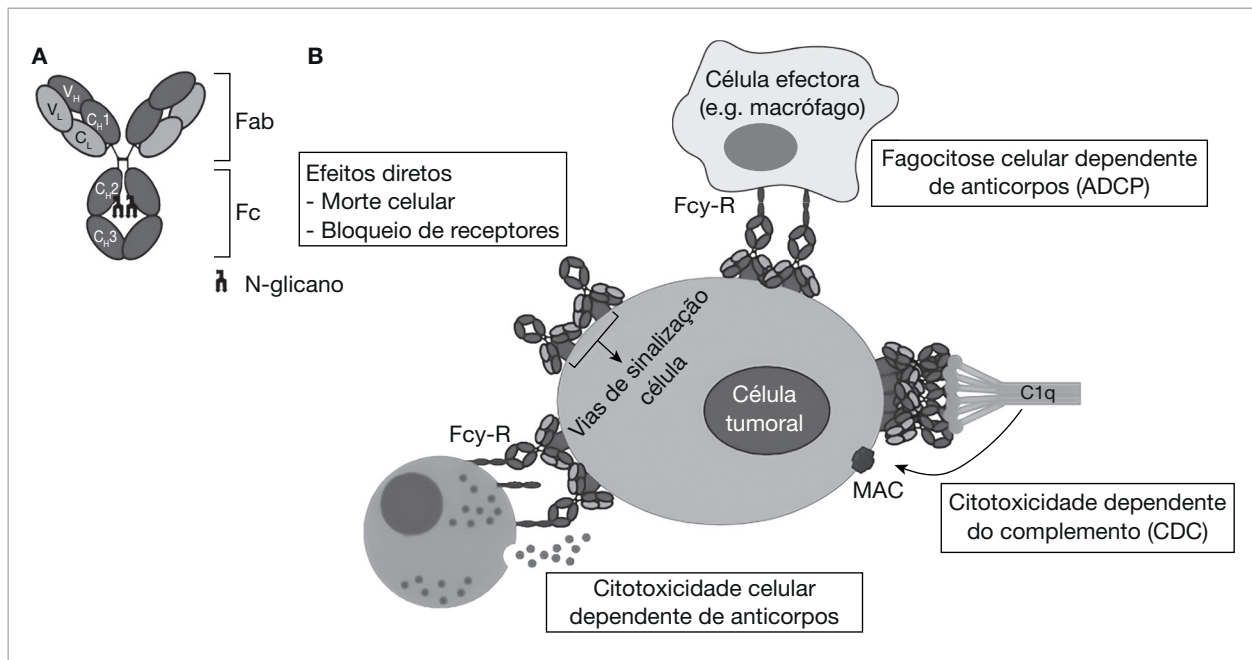


FIGURA 10.1 Estrutura e função de anticorpos.

Fonte: Van Der Horst et al. (2020).

neutralizar toxinas e outros mecanismos de ação que podem impedir infecções ou a patogênese da doença (GOULET; ATKINS, 2020).

As outras funções dos anticorpos são mediadas pela região Fc. Existem diversas classes de receptores para Fc, destacando-se os FcγRs, que são de 6 diferentes tipos em humanos (FcγRI/CD64, FcγRIIa/CD32a, FcγRIIb/CD32b, FcγRIIc/CD32c, FcγRIIIa/CD16a e FcγRIIIb/CD16b), e cada um deles possui diferentes afinidades e respostas. A expressão de cada um destes receptores é restrita a tipos específicos de células, como, por exemplo, células NK, induzindo a resposta celular dependente de anticorpos (ADCC). Os receptores para Fc de células mieloides como macrófagos, monócitos e células dendríticas levam a fagocitose induzida por anticorpos (ADCP), mecanismo relevante para câncer e infecções. A região Fc também é reconhecida pelo sistema complemento, levando a citotoxicidade de complemento dependente de anticorpos (CDC). Todos estes mecanismos efetores são utilizados na terapia com anticorpos para o tratamento de diversas doenças (GOULET; ATKINS, 2020).

10.2 O DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS TERAPÊUTICOS PELAS TECNOLOGIAS DE HIBRIDOMAS E DE PHAGE DISPLAY

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos revolucionou o tratamento de diversas doenças crônicas, como o câncer e as doenças autoimunes. Essas

terapias, chamadas de terapias-alvo, têm como característica principal a especificidade para atingir a célula doente, característica conferida pela natureza do anticorpo, ao contrário dos tratamentos tradicionais, como a quimioterapia do câncer, em que as células normais são também alvejadas. Esta revolução somente foi possível graças ao surgimento de tecnologias que permitiram selecionar cuidadosamente o anticorpo com a especificidade ideal para o alvo desejado. As tecnologias de seleção de anticorpos monoclonais foram tão importantes na evolução da medicina que deram aos seus inventores o Prêmio Nobel em suas respectivas áreas, como será visto mais adiante neste capítulo.

10.2.1 Tecnologia de hibridomas

A tecnologia de hibridomas foi descrita, pela primeira vez, em 1975 por Kohler & Milstein (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Mais tarde, em 1984, eles receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por esta descoberta. Esta tecnologia tornou possível o isolamento de anticorpos mono-específicos, ou seja, produzidos por clones de células B idênticas contra um epítipo em particular do alvo desejado, com alta afinidade e especificidade. Devido a essas características, o uso dos anticorpos monoclonais se expandiu para a pesquisa biomédica imediatamente, permitindo sua utilização para caracterização de células e proteínas de interesse, com o desenvolvimento de técnicas como a citometria de fluxo, ELISA, *western blot* e outras.

O conceito de desenvolvimento de anticorpos monoclonais utilizando hibridomas é simples e robusto. A base da tecnologia é a obtenção de células B maduras nos órgãos linfoides secundários. Estas células são clonadas e imortalizadas por fusão com células mieloides cancerosas, obtendo-se, portanto, células híbridas, e por isso a denominação de hibridomas. Uma vez obtidos, os hibridomas podem ser indefinidamente cultivados e permanecem produzindo o anticorpo de interesse. Cada uma destas etapas está ilustrada na Figura 10.2.

A primeira etapa para obtenção dos hibridomas é a imunização. Esta etapa é fundamental para a qualidade dos anticorpos, pois é nela que serão induzidos os linfócitos B, que são os produtores de anticorpos de alta afinidade. Na imunização pode-se utilizar várias espécies de animais, como camundongos, coelhos, cabras, galinhas e ratos (ANDRABI et al., 2012, 2013; FANG; BODEUS; BURTONBOY, 1991; FLYNN; HARKISS; HOPKINS, 1989; KUO et al., 1985; NISHINAKA et al., 1991; SHARMA et al., 2015; TUCKER et al., 1984). Os camundongos são os mais utilizados, pela sua facilidade de manipulação e pelas semelhanças estruturais que possuem com os anticorpos humanos. Acrescenta-se que outras espécies de animais não têm células de mieloma estáveis para gerar os híbridos, dificultando sua utilização.

Durante a imunização, os animais em questão são injetados diversas vezes com intervalos de tempo pré-estabelecidos entre as injeções, com o antígeno de interesse, que é formulado com uma substância chamada de adjuvante. Ao longo das imunizações, o sangue do animal é retirado antes e após cada uma delas, para que seja possível averiguar a formação de anticorpos de alta afinidade e especificidade contra o imunógeno em questão. A presença de altos títulos de anticorpos no sangue do animal indica que as células B foram adequadamente estimuladas e os clones específicos para o antígeno entraram em processo de expansão nos órgãos linfoides secundários. A cada nova imunização, os clones de células B entram em processo de maturação por afinidade, fazendo que os anticorpos amplifiquem ainda mais sua afinidade (PARRAY et al., 2020).

Após a etapa de imunização, os linfócitos B estão prontos a serem utilizados para produzirem os anticorpos de interesse. Desta forma, passa-se à etapa de fusão (Figura 10.2). Nesta etapa, os linfócitos B são isolados do baço dos animais imunizados no caso da utilização dos camundongos. Quando se utilizam outros animais, é possível retirar as células de outros órgãos linfoides secundários ou sangue. Após o isolamento das células produtoras dos anticorpos, elas são fusionadas a células de mieloma murino. As células de mieloma murino são provenientes de linhagens celulares específicas. As mais

utilizadas são X63-Ag 8.6539 e Sp2/0-Ag 1410 (KEARNEY et al., 1979; SHULMAN; WILDE; KÖHLER, 1978).

As células são fusionadas utilizando-se agentes biológicos (vírus), físico (eletrofusão) ou químicos (agentes fusogênicos). Em geral, o protocolo mais difundido e utilizado é realizar a fusão com polietilenoglicol (PEG). O objetivo da etapa de fusão é obter células híbridas, por isto o nome hibridomas, uma vez que a célula mielóide é capaz de imortalizar o linfócito B produtor dos anticorpos de interesse. O aspecto mais relevante desta tecnologia acontece nesta etapa, pois considerando que o processo de fusão é aleatório, existe a necessidade de garantir que serão selecionados apenas os hibridomas. Neste sentido, os hibridomas são selecionados pela utilização de um meio específico, chamado de meio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina). As células mieloides são deficientes no gene da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), necessário para a síntese de nucleotídeos pelas vias de novo ou de resgate e, por consequência, são sensíveis ao cultivo em meio HAT. Desta forma, as células de mieloma, como não possuem a enzima HGPRT, não podem usar a hipoxantina na síntese de DNA. A aminopterina é um análogo do ácido fólico que bloqueia as coenzimas requeridas para a síntese de ácido nucleico. Assim, essas células de mieloma são incapazes de usar qualquer das duas vias de síntese de DNA e morrem no meio HAT. As células B, por sua vez, possuem esta via plenamente ativa; no entanto, morrem em um curto período na ausência de estímulos. Portanto, neste meio de cultivo somente os híbridos são capazes de sobreviver. As células híbridas são então ressuspensas em meio HAT e passamos à etapa de clonagem (ver “clonagem e seleção” na Figura 10.2).

Como descrito anteriormente, a resposta de um animal a um dado antígeno é uma resposta policlonal. Portanto, quando são isolados os linfócitos B do baço deste animal, também são isolados diversos clones diferentes, que foram então fusionados às células mieloides. Em seguida, é necessário isolar estas células com diferentes especificidades. Para este fim, a suspensão celular é diluída para que, de acordo com a contagem, seja selecionada apenas uma célula em cada parte da placa onde as células serão colocadas. Outras metodologias mais modernas podem ser utilizadas, como o isolamento celular por citometria de fluxo, ou por clone pix, utilizando-se equipamentos especializados.

A viabilidade dos clones é avaliada pelo monitoramento a cada dois ou três dias por microscopia, e quando possuem o tamanho adequado, o sobrenadante deste cultivo é avaliado pela metodologia de ELISA, quando a quantidade e qualidade do anticorpo produzido é avaliada. O hibridoma que sobrevive a esta clonagem e permanece produzindo o anticorpo de interesse passa

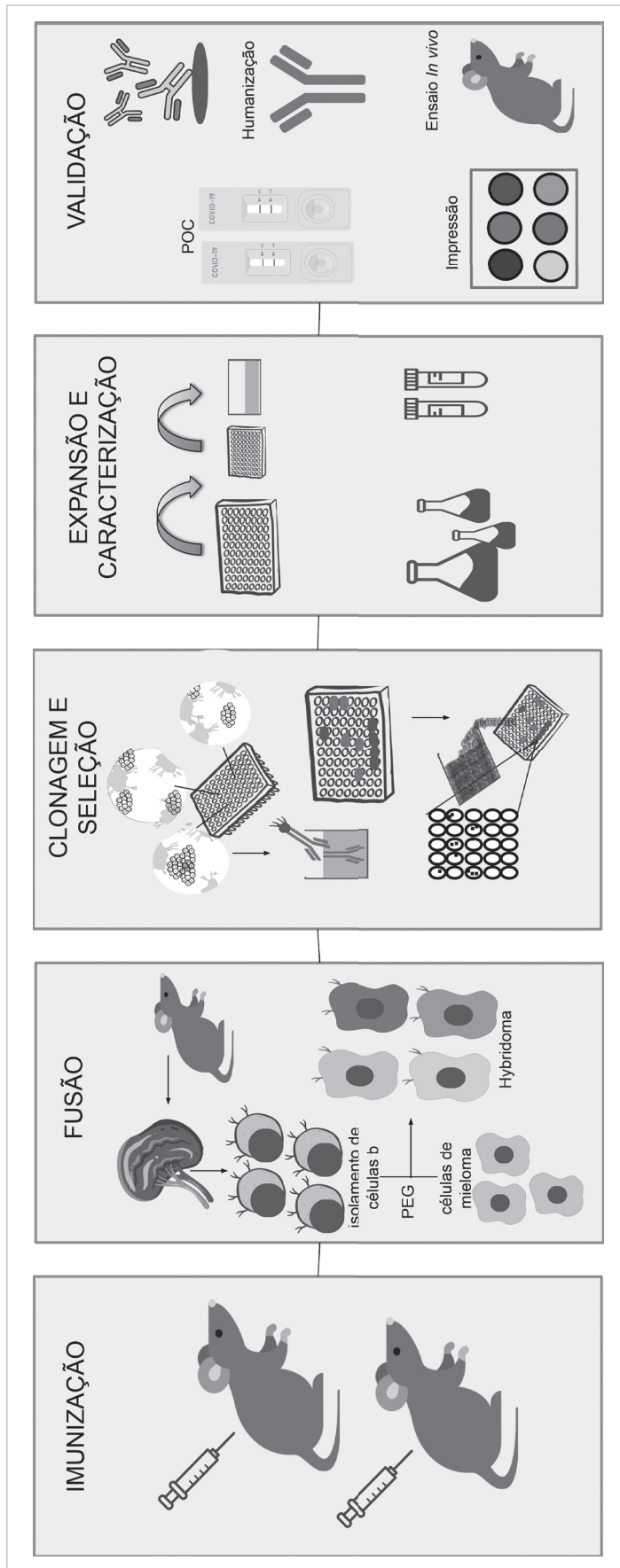


FIGURA 10.2 Etapas de obtenção dos hibridomas.
Fonte: elaborada pelos autores com base no Curso de Biotecnologia, módulo Anticorpos Monoclonais (2021).

para a fase de expansão. Durante a expansão, os hibridomas clonados são gradativamente transferidos para placas de poços maiores, até chegarem ao cultivo em garrafas de 25 cm e depois 75 cm. Ao sobreviver a estas etapas, os hibridomas estarão prontos para produzirem os anticorpos de interesse indefinidamente, em processos de cultivo específicos.

Após a consolidação dos hibridomas e a construção de um banco destas células, congelado a uma temperatura de -196°C , em nitrogênio líquido, para sua conservação, cada anticorpo monoclonal produzido por cada hibridoma isolado poderá ser então caracterizado e validado de acordo com as suas características funcionais. Diversas técnicas podem ser utilizadas para validar a função do anticorpo, como, por exemplo, testes de determinação do subtipo de anticorpo e testes de ligação por ELISA, *western blot* e citometria de fluxo. Outras podem ser utilizadas para validar a função biológica do anticorpo, por exemplo, testes de neutralização viral, inibição da formação de placas, ensaios de fixação de proteínas do complemento e de citotoxicidade mediada por células. Os hibridomas, também, devem ser sequenciados para que seja comprovado que a clonagem ocorreu corretamente e trata-se de um anticorpo monoclonal e não policlonal (PARRAY et al., 2020).

Apesar de ser uma tecnologia robusta e largamente utilizada no desenvolvimento de anticorpos, a tecnologia de hibridomas traz também algumas desvantagens. Por exemplo, o processo de desenvolvimento dos hibridomas é longo e laborioso, levando-se em média entre 4 e 6 meses para se obter os clones estáveis. Como o processo de obtenção é totalmente aleatório, não há controle sobre os epítomos para os quais os anticorpos são formados e seu isolamento em clones exige robótica cara ou muitas horas de trabalho no laboratório para rastrear milhares de clones. A principal desvantagem, em termos terapêuticos, é que os anticorpos de origem não humana não podem ser utilizados diretamente para tratamento em humanos. Isso ocorre, pois as proteínas, no caso, anticorpos não humanos, podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico humano como proteínas estranhas, gerando reações anafiláticas. Desta forma, os anticorpos gerados por hibridoma exigem etapas adicionais de desenvolvimento por bioinformática, em que estes epítomos “estranhos” são desarmados utilizando-se técnicas de CDR Graft. No item 9.4.1 abordamos a engenharia de anticorpos utilizada para melhoria destas moléculas (GRISWOLD; BAILEY-KELLOGG, 2016; LING; LUA; GAN, 2020; NAGATA; PASTAN, 2009).

Outras limitações da tecnologia estão diretamente ligadas à natureza do antígeno, como antígenos sensíveis (p. ex., proteínas difíceis de expressar, compostos intracelulares, epítomos conformacionais e outros) que

podem ser impossíveis de obter; e antígenos tóxicos (p. ex., toxinas bacterianas) podem matar o animal hospedeiro antes mesmo de os anticorpos serem produzidos. Em vista dessas limitações, outras importantes estratégias de obtenção de anticorpos foram desenvolvidas para contornar estas dificuldades, conforme descreveremos nas próximas seções.

10.2.2 Tecnologia de *phage display*

Em 1985, George Smith descreveu pela primeira vez a tecnologia de *phage display*. Da mesma forma que seus antecessores que descreveram a obtenção de anticorpos por meio de hibridomas, Smith foi laureado com o Prêmio Nobel pela descoberta desta tecnologia que permite selecionar anticorpos humanos a partir de uma biblioteca (MIMMI et al., 2019).

Esta tecnologia se baseia na utilização de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) M13. Estes fagos (*phage*, em inglês) têm uma configuração genética particular que permite a exposição (*display*) de pedaços de anticorpos humanos em sua superfície. Um resumo da tecnologia pode ser visto na Figura 10.3.

A primeira etapa consiste na coleta de sangue de indivíduos saudáveis, quando se pretende montar uma biblioteca dita virgem (*naive*) ou na coleta de indivíduos doentes, no caso de se montar uma biblioteca imune (ver “doadores” na Figura 10.3). Por exemplo, para selecionar anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 foram utilizadas células de indivíduos em fase convalescente após se contaminarem com a Covid-19 (ANAND et al., 2021). As células brancas do sangue destes indivíduos são isoladas em gradiente de densidade e seu RNA é então extraído e convertido à cDNA. A partir de *primers* específicos, as sequências de VH e VL são amplificadas nestas amostras. Diversos formatos de bibliotecas podem ser construídos, porém a mais utilizada e descomplicada é a utilização de uma biblioteca scFv na superfície do fago filamentosso M13. Esta biblioteca é obtida por meio da combinação de populações de domínios VH e VL, que são unidos por uma haste (*linker*) de glicina-serina flexível e resistente a proteases (Gly4Ser)₃, em uma única sequência de DNA e são combinadas aleatoriamente para formar a biblioteca na superfície dos fagos M13, conforme a Figura 10.4.

Uma biblioteca é considerada adequada ao atingir uma diversidade entre 10^8 - 10^{10} combinações. Esses fagos são então colocados para serem amplificados em bactérias *E. coli*, na presença de fagos auxiliares. A coinfeção de *E. coli* abrigando um fagomídeo com um fago auxiliar é essencial para a formação de partículas funcionais exibindo a biblioteca de anticorpos. O fago auxiliar comumente utilizado é o M13KO7, derivado do

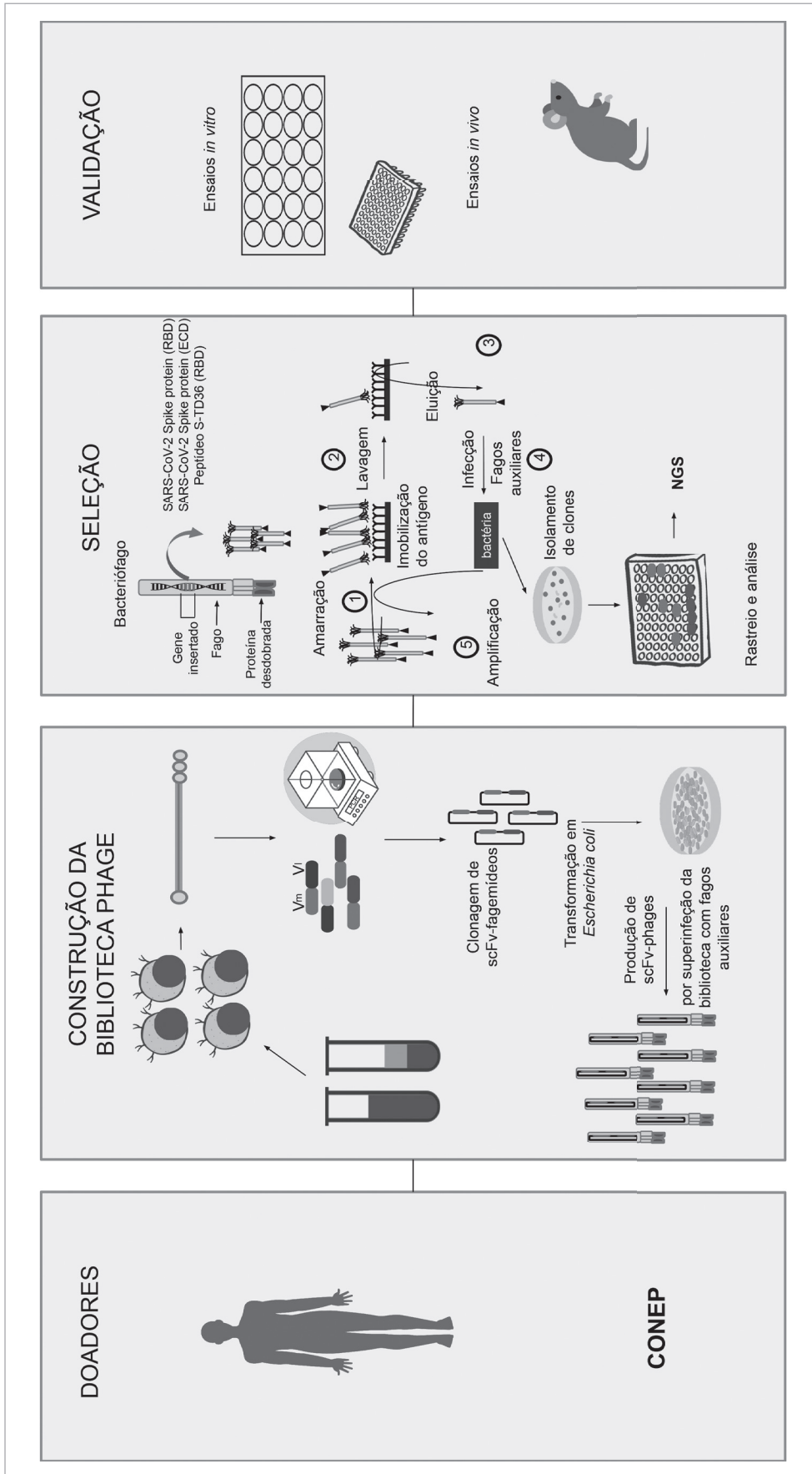


FIGURA 10.3 Processo de obtenção de anticorpos monoclonais utilizando a metodologia de *phage display*. Fonte: elaborada pelos autores, com base no Curso de Biotecnologia, módulo Anticorpos Monoclonais (2021).

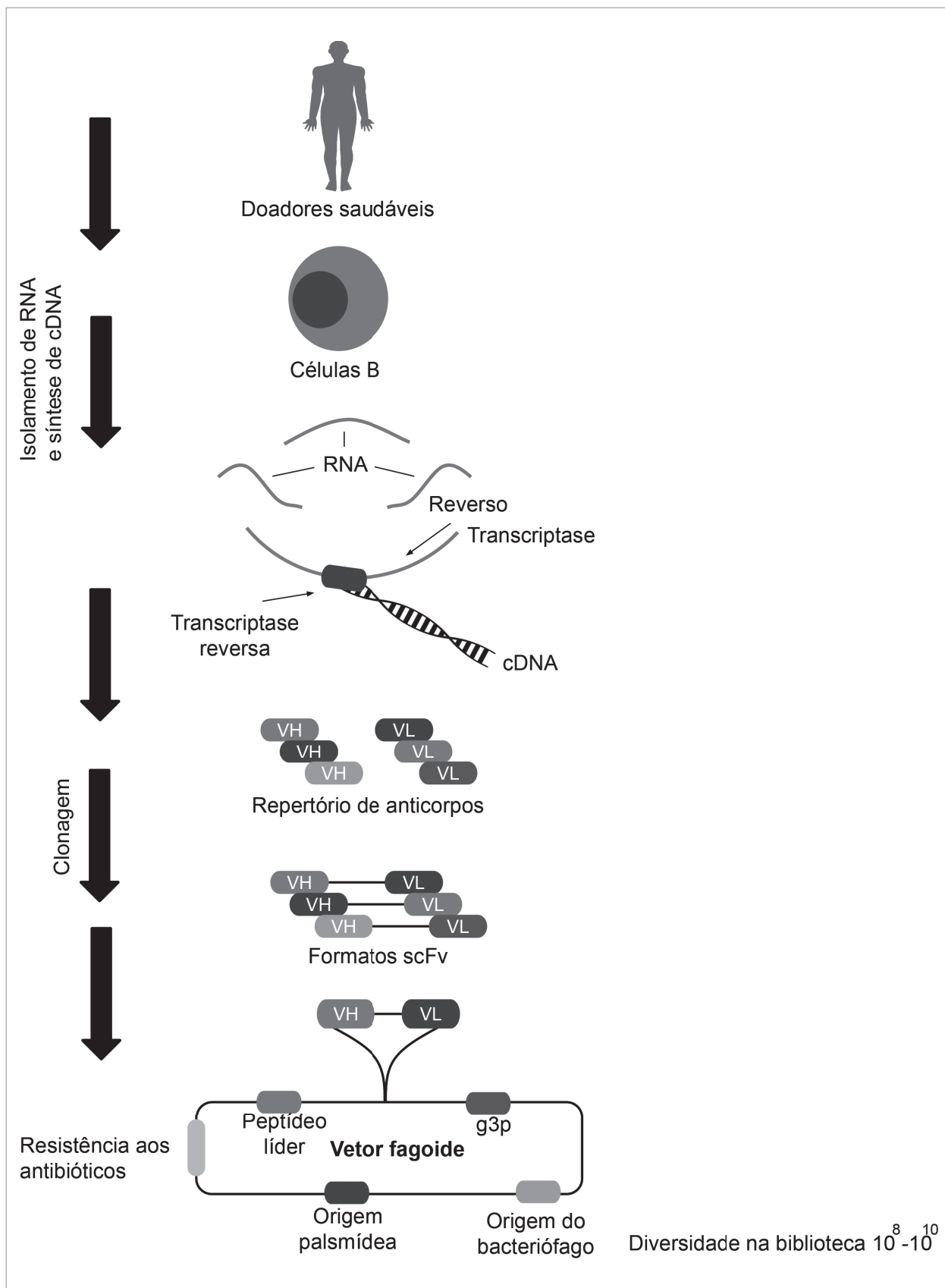


FIGURA 10.4 Construção da biblioteca de fagos a partir de sequências de células B humanas.
 Fonte: Alfaleh et al. (2020).

M13 contendo um gene de resistência à canamicina e a origem de replicação P15A que permite que o genoma se replique como um plasmídeo em *E. coli* e que os fagos exibindo a biblioteca sejam plenamente formados.

A partir desta biblioteca, pode-se prosseguir para a etapa de seleção (Figura 10.3, Quadro 2). Durante esta etapa, a biblioteca de fagos é exposta ao antígeno imobilizado em superfícies sólidas, como placas e tubos de poliestireno ou membranas de nitrocelulose. Geralmente, utilizam-se soluções de bloqueio, como albumina bovina ou leite desnatado, para evitar ligações inespecíficas. Após determinado tempo de exposição, os fagos que não ligaram ao antígeno são lavados e eliminados do sistema. Estas etapas de lavagem são críticas para permitir algum controle sobre as propriedades de ligação, manipulando o tampão de lavagem e o rigor da lavagem. Por exemplo, tempos maiores de lavagem podem ser utilizados para garantir que apenas clones com taxas de dissociação lentas sejam selecionados. Os detergentes, geralmente, são incluídos nos tampões de lavagem, mas também podem ser alterados por fatores como pH e concentração de sal. As etapas de lavagem são aumentadas gradualmente a cada rodada de *biopanning* para aumentar o rigor, a fim de isolar clones específicos de maior afinidade. Normalmente, são utilizadas de 3-5 etapas de seleção para se obter uma boa quantidade de fagos ligantes de alta afinidade para um antígeno. A cada rodada, os fagos que entram e saem da rodada são contados para se observar quando não é mais possível realizar rodadas adicionais, quando a quantidade de fagos na entrada é a mesma que a encontrada na saída daquela rodada. O enriquecimento dos fagos ligantes também é verificado por testes de ligação semelhantes ao ELISA, chamados de *phage ELISA* (MENENDEZ; SCOTT, 2005; SHEN et al., 2012; SMITH; SCOTT, 1993).

Assim que é finalizada a seleção, as seqüências VH e VL dos fagos selecionados são determinadas por sequenciamento. Quando a técnica foi descrita em 1985, era necessário também realizar a clonagem dos fagos e determinar o sequenciamento de cada clone pela metodologia Sanger. Atualmente, com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*) é possível realizar o sequenciamento de todo o conjunto de fagos resultante da seleção, gerando uma significativa redução de tempo nesta etapa. No entanto, o NGS exige uma etapa adicional de tratamento dos dados por bioinformática e a predição de estruturas combinatórias entre os VH e VL formados que tenham maior probabilidade de interação de alta afinidade com o antígeno.

Os avanços nesta área têm sido tão significativos que Raftery et al. (2019) descreveram uma seleção rápida de scFv-fago (*PhageXpress*) usando manipulação eletro-

-hidrodinâmica de uma solução contendo partículas de biblioteca de fagos em combinação com o sequenciador MinION da Oxford Nanopore Technologies. Após uma única rodada de *biopanning* e dentro de 2 dias, em comparação com várias semanas se aplicassem o *biopanning* tradicional, foram capazes de identificar 14 proteínas não estruturais 1 scFv anti-vírus da dengue (KELLEY, 2020; RAFTERY et al., 2019). A adoção deste tipo de abordagem reduz significativamente o tempo e a quantidade de esforço necessários para desenvolver novos anticorpos, que são os principais obstáculos no método tradicional de *biopanning*, e ajuda a acelerar o desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos durante surtos infecciosos emergentes e para doenças de difícil tratamento.

Após a seleção dos ScFvs, as seqüências selecionadas podem ser montadas em diferentes formatos para utilização direta em humanos. Para isto, estes genes, com as seqüências de interesse, são montados e inseridos em plasmídeos que permitem sua expressão em células de mamíferos próprias para este fim, como a célula CHO.

10.3 OS CAMUNDONGOS HUMANIZADOS E SINGLE CELL SEQUENCING

Apesar da vasta utilização das tecnologias de hibridomas e de *phage display* para a imensa maioria dos anticorpos atualmente utilizados, mesmo em terapias, diversos avanços tecnológicos buscam acelerar e aperfeiçoar, ainda mais, o processo de obtenção de anticorpos. Dentre estes, destacam-se os dois principais avanços. A utilização de animais humanizados e, mais recentemente, a utilização das técnicas de sequenciamento de células únicas (*single cell sequencing*).

O início da utilização de animais transgênicos data do começo dos anos 1990, quando Lonberg et al. (2005) e Green et al. (1994) descreveram pela primeira vez a geração de camundongos com quatro modificações germinativas diferentes: duas interrupções direcionadas (os genes endógenos de cadeia pesada e leve κ de camundongo) e dois transgenes humanos introduzidos (que codificam a cadeia pesada e a cadeia leve κ). A geração destes animais, contendo apenas parte do repertório de diversidade humana, não somente possibilitou a utilização da metodologia clássica de hibridomas para selecionar anticorpos diretamente humanos, sobrepondo uma importante limitação da técnica, mas principalmente possibilitou estudos sobre a diversidade do repertório humano de anticorpos. Além disso, possibilitou verificar qual é a importância de cada elemento das cadeias variáveis de anticorpos, ou mais especificamente das regiões hipervariáveis (CDR), na geração dos anticorpos com alta especificidade e afinidade (GREEN et al., 1994;

LONBERG, 2005; LONBERG et al., 1994; MENDEZ et al., 1997).

A Figura 10.5 ilustra a utilização dos animais transgênicos. A tecnologia utilizada se baseia nas mesmas etapas descritas para a tecnologia de hibridomas. Por fim, recentemente o avanço mais importante para a obtenção de anticorpos terapêuticos se baseia na abordagem por sequenciamento de célula única (FITZGERALD; LEONARD, 2017).

Em termos de descoberta de anticorpos, a separação e o sequenciamento de células únicas têm o potencial de identificar clones produtores de anticorpos muito raros e desejáveis que, de outra forma, seriam ignorados ou perdidos na triagem em massa. A tecnologia consiste em separar, primeiramente por citometria de fluxo, as células de interesse. Por exemplo, pode-se utilizar amostras de sangue de indivíduos com determinada doença para a qual se deseja selecionar um anticorpo, como dengue, Covid-19 ou mesmo câncer. Nestas amostras marcam-se as células de interesse, no caso as células B produtoras de anticorpos naquela condição. Na sequência, utilizando a citometria de fluxo, pode-se determinar a seleção destas células marcadas, conforme a Figura 10.6.

Tendo selecionado as células de interesse, diversas metodologias podem ser empregadas para a seleção dos clones de interesse, conforme a Figura 10.7.

As técnicas de sequenciamento de célula B única e réplica de célula B, ainda, repousam em metodologias de culturas de células posteriores às etapas de seleção das células por FACS. No entanto, nesta seção, optou-se por abordar especificamente o *Single Cell Sequencing*[®],

que traz avanços expressivos ao eliminar diversas etapas de seleção e cultivo celular. Neste caso, as células B previamente selecionadas são separadas individualmente. Cada uma delas tem seu RNA extraído e sequenciado, para que logo após a realização do NGS as estruturas de anticorpos de cada uma destas células possam ser completamente remontadas, evidenciando o repertório completo de resposta contra aquele antígeno em um dado indivíduo.

Os repertórios podem, então, ser diretamente correlacionados com os dados clínicos do indivíduo, bem como permitem a utilização de modelagens por bioinformática para seleção *in silico* dos anticorpos mais promissores. Assim se economiza tempo e recursos para obter genes sintéticos para expressão destes anticorpos em sistemas recombinantes mais assertivamente (PEDRIOLI; OXENIUS, 2021; VAN LENT et al., 2021).

10.4 DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS TERAPÊUTICOS

Depois da etapa de descoberta (descrita na seção 10.2 e 10.3) é feita uma seleção baseada na afinidade do antígeno e função biológica do anticorpo. Uma vez que tenha(m) sido selecionado(s) o(s) melhor(es) candidato(s), o desenvolvimento de mAb muitas vezes passa por vários estágios de otimização por meio da engenharia de anticorpos. Essa etapa visa aumentar a eficácia terapêutica, a segurança e facilitar o desenvolvimento de processo, aumentando, desta forma, as chances do

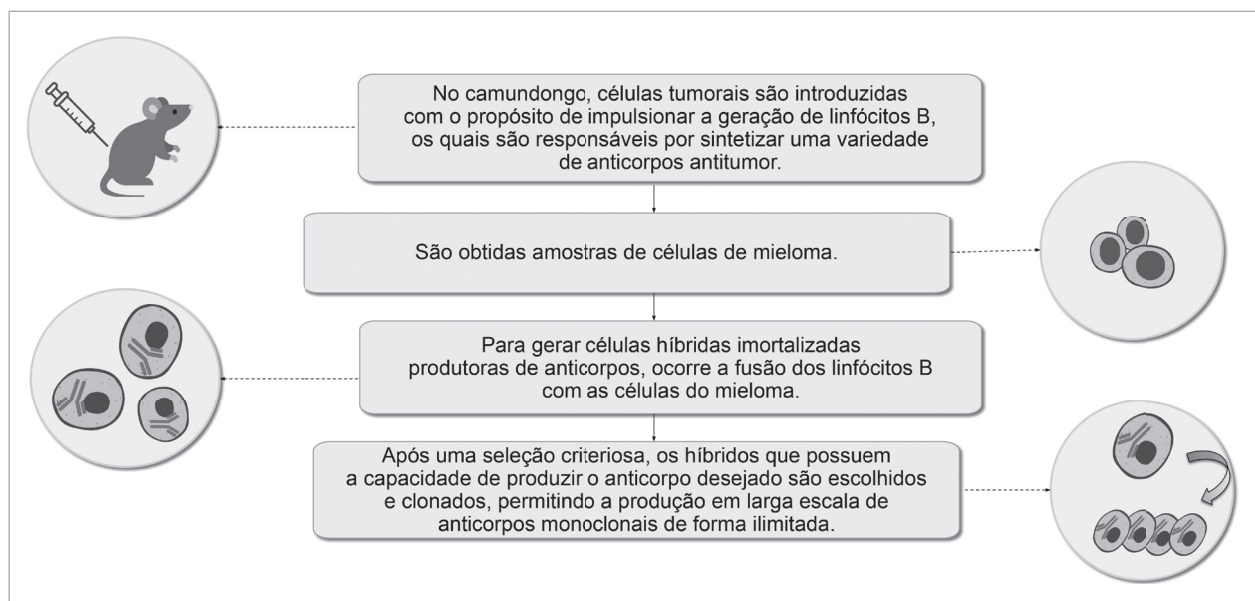


FIGURA 10.5 Utilização de animais transgênicos para obtenção de anticorpos monoclonais humanos.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Rosaly et al. (2006).

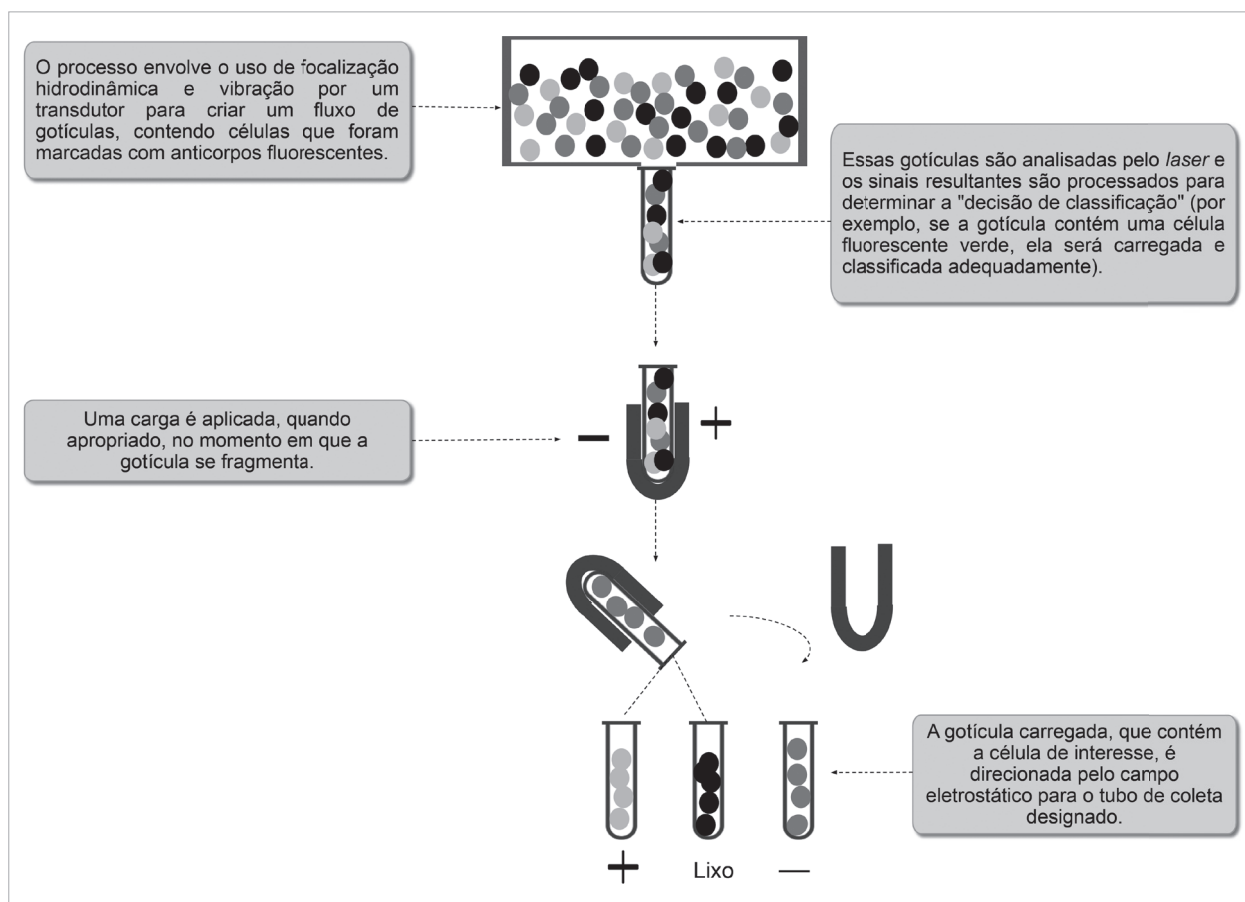


FIGURA 10.6 Utilização da metodologia de separação celular por citometria de fluxo para obtenção de células produtoras de anticorpos.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Fitzgerald e Leonard (2017) e Mehanna (2017).

sucesso clínico do produto (GOULET; ATKINS, 2020; WANG et al., 2021).

No desenvolvimento de anticorpos, muitos parâmetros importantes devem ser considerados como afinidade do anticorpo (força de interação antígeno-anticorpo), avidéz (total de forças de interação entre o anticorpo e seu alvo por meio de vários sítios de ligação), tamanho e interação com receptores através do Fc (SCHMID; NERI, 2019). Alterações estruturais dos mAb podem afetar aspectos funcionais que são relacionados às funções biológicas e clínicas, como especificidade e afinidade da ligação com o antígeno, eficácia biológica, farmacocinética, farmacodinâmica, imunogenicidade (principal efeito adverso de mAb) e características físico-químicas (que influenciam no desenvolvimento de processo), conforme mostrado na Figura 10.8. Todas essas características podem ser modificadas pela engenharia de anticorpos, que envolve diversas metodologias, desde algumas consideradas tradicionais até novas ferramentas baseadas em bioinformática que evoluem constantemente (GOULET; ATKINS, 2020; WANG et al., 2021).

10.4.1 Engenharia de anticorpos e variações de formatos

Uma das características críticas que pode ser otimizada por engenharia de anticorpos é a imunogenicidade, que ocorre quando o sistema imune do paciente pode reconhecer e agir contra o agente terapêutico e pode afetar tanto a segurança quanto a eficácia. A administração de uma proteína exógena pode gerar anticorpos antidroga (ADA), que podem neutralizar o agente terapêutico reduzindo a eficácia, além de poder causar diversos efeitos adversos que podem variar desde erupções cutâneas a respostas inflamatórias sistêmicas. A imunogenicidade é afetada por diversos fatores, como dose, via de administração, contaminação por impurezas, agregados e características estruturais dos anticorpos, incluindo a sequência de aminoácidos e padrão de glicosilação (LU et al., 2020).

Os anticorpos obtidos por *phage display*, camundongos humanizados e tecnologia de *sequenciamento de célula única* são 100% humanos, mas os obtidos por

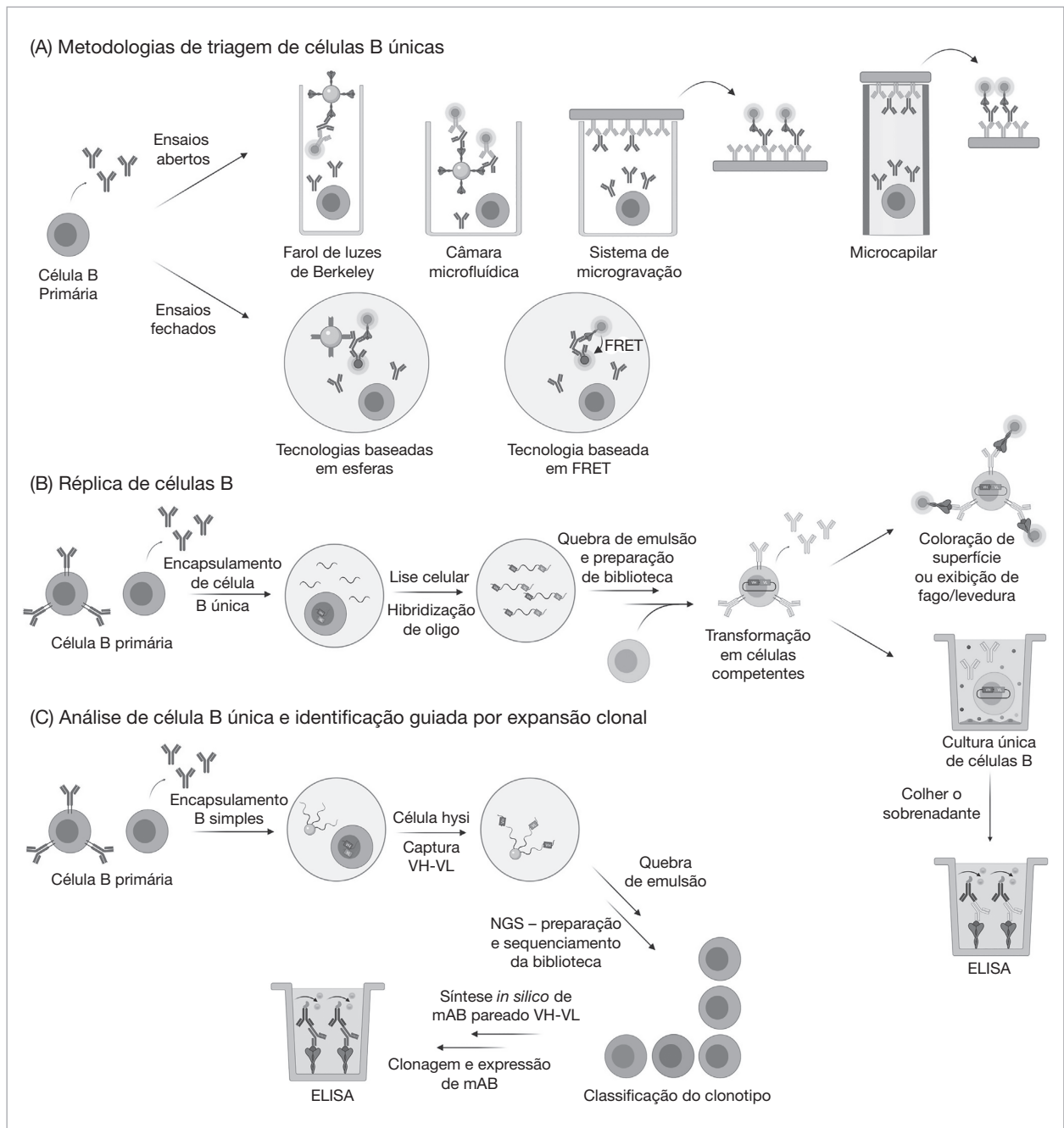


FIGURA 10.7 Sequenciamento de célula B única e replicação de célula B para obtenção de anticorpos monoclonais.

Fonte: traduzida de Pedrioli e Oxenius (2021).

hibridoma podem ter origem animal. Para reduzir a imunogenicidade, por meio da engenharia de anticorpos, a região variável de um anticorpo obtido de camundongo ou outro animal pode ser fusionada à região constante de um anticorpo humano, gerando um anticorpo quimérico. Para diminuir, ainda mais, a resposta contra a terapia baseada em mAb, podem ser gerados os anticorpos humanizados, cuja sequência na região constante e na

maior parte da região variável é de origem humana, tendo apenas os CDR de origem murina. De acordo com a origem e estágio de humanização o anticorpo recebe um prefixo diferente, conforme observado na Figura 10.9 (LU et al., 2020; WANG et al., 2021).

Apesar de a humanização de um candidato a anticorpo terapêutico diminuir o reconhecimento como moléculas estranhas pelo sistema imune, anticorpos

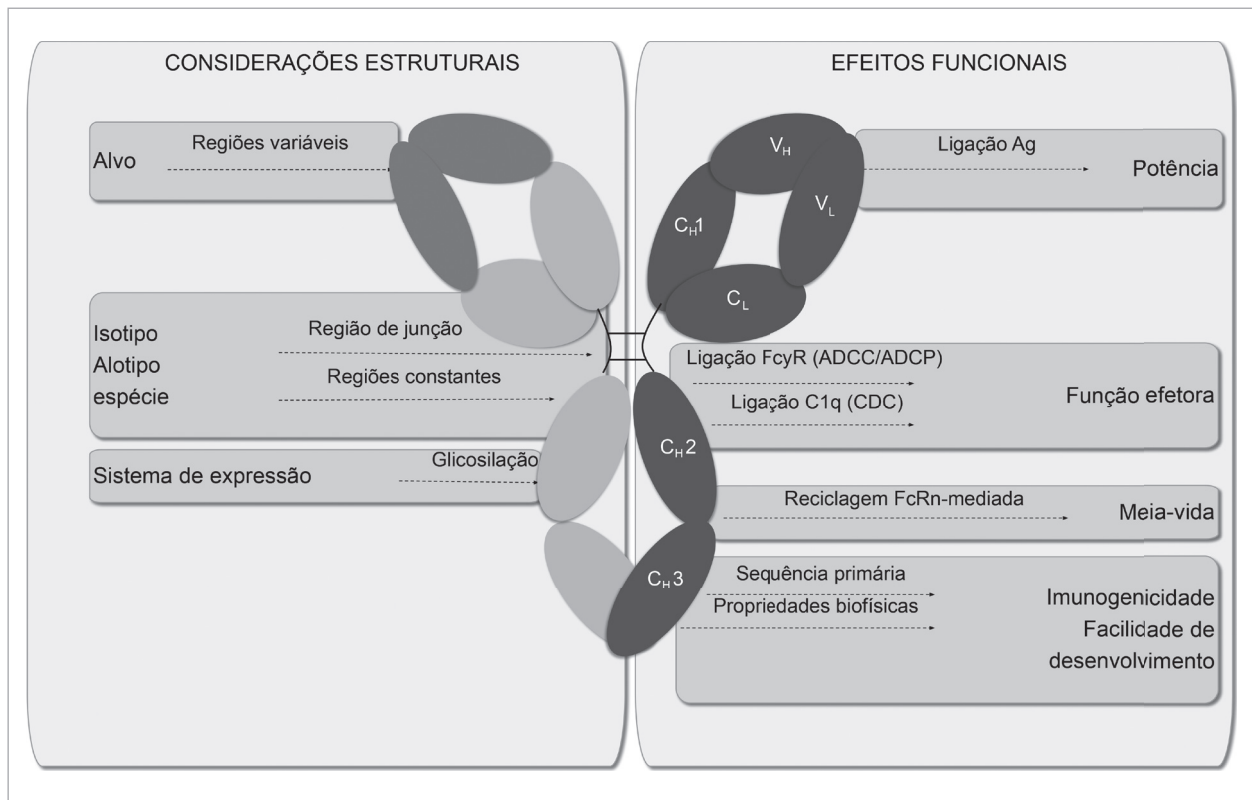


FIGURA 10.8 Esta figura mostra como características estruturais do anticorpo podem afetar suas funções biológicas e clínicas.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Goulet e Atkins (2020) e Silva-Pilipich, Smerdou e Vanrell (2021).

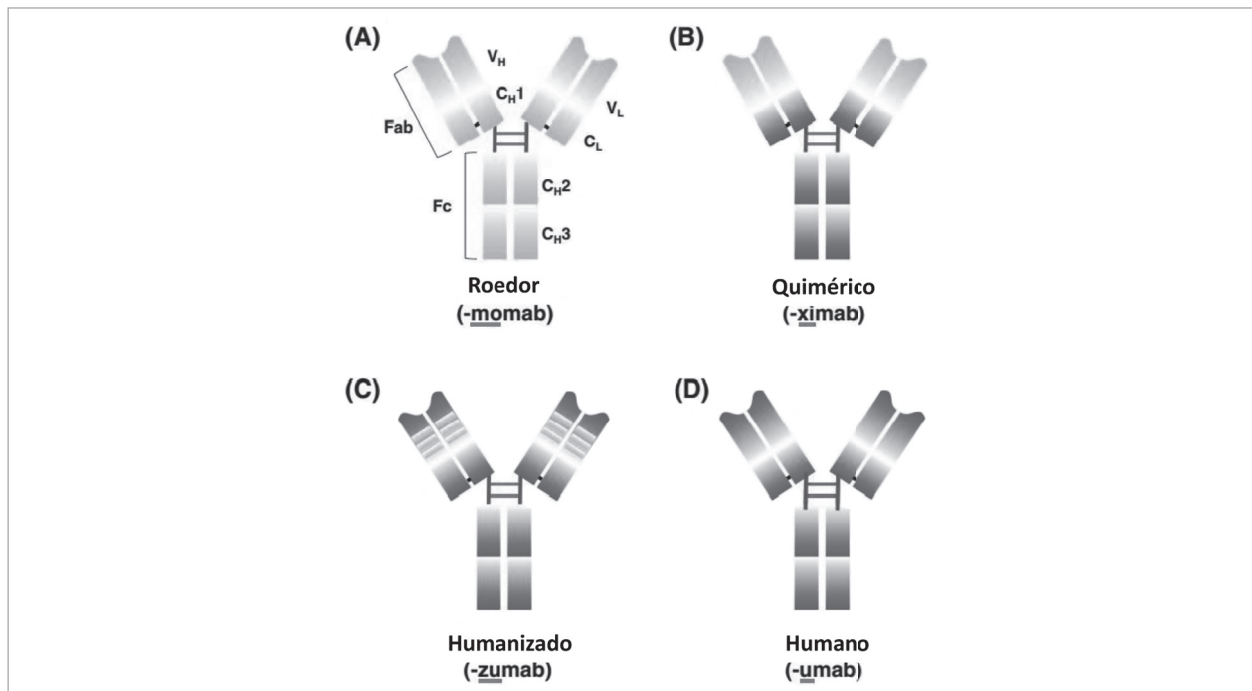


FIGURA 10.9 Esquema de humanização de anticorpos a partir de anticorpos murinos (cinza claro) até anticorpos completamente humanos (cinza escuro) e os sufixos associados com cada um.

Fonte: traduzida de Lu et al. (2020).

completamente humanos ainda podem ser imunogênicos. Neste caso, pode ser aplicada a redução da imunogenicidade, conhecida em inglês por *deimmunization*, que consiste em avaliar quais epítomos ainda podem ser antigênicos e removê-los, desde que não afetem a afinidade pelo alvo terapêutico. Outra estratégia é, ao invés de remover epítomos imunogênicos, induzir a tolerância pela introdução de epítomos para Treg (linfócitos T regulatórios) na estrutura do anticorpo. Para estas duas estratégias utilizam-se, principalmente, ferramentas de bioinformática (JONES et al., 2009; LU et al., 2020).

A etapa seguinte de otimização por engenharia de anticorpos é melhorar a eficácia terapêutica. O primeiro objetivo é melhorar a ligação do anticorpo com seu antígeno alvo e envolve diversas ferramentas utilizadas de rotina para a maturação de afinidade e aumento da especificidade, como mutagênese aleatória, mutagênese direcionada, embaralhamento de cadeia e outras abordagens *in silico* (WANG et al., 2021).

Além de melhorar a ligação ao antígeno, que é determinada pela região variável de anticorpo, também é possível aumentar a eficácia biológica por meio da engenharia de Fc. Os anticorpos podem recrutar respostas imunes efetoras como a resposta celular mediada por citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC), resposta de lise por complemento dependente de anticorpos (CDC) e fagocitose dependente de anticorpos (ADCP). Estas respostas mediadas por Fc podem ser cruciais para a eficácia terapêutica no câncer, enquanto em outras doenças, como doenças autoimunes, é importante bloquear ADCC, ADCP e CDC. Estas respostas podem ser aumentadas ou diminuídas por engenharia de anticorpos através da manipulação da afinidade para diferentes receptores do sistema imune pela modificação da sequência de aminoácidos ou alterações no padrão de glicosilação (WANG et al., 2021).

A eficácia e especificidade na clínica de anticorpos monoclonais terapêuticos precisa de novas melhorias, por isso a engenharia de anticorpos tem evoluído para a criação de novos formatos, como fragmentos de anticorpos, anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos e anticorpos conjugados a drogas (ADC) e outros imunoconjugados. Os domínios de anticorpos podem ser encaixados de diversas formas, como se fossem peças de lego, gerando centenas de formatos modulares derivados de anticorpos (LOU; CAO, 2022; SHIM, 2020), sendo que alguns dos principais estão representados na Figura 10.10. Formatos mais inovadores são mais aplicados a câncer (cerca da metade das moléculas em desenvolvimento) do que outras doenças (variou de 0 a 10% entre 2017 e 2022), como observado na Figura 10.11 (KAPLON et al., 2023).

Os fragmentos de anticorpos oferecem uma série de vantagens, como, por exemplo, maior penetração em tecidos permitindo capacidade de ligação a antígenos inacessíveis para os anticorpos completos, a redução de efeitos adversos mediados por Fc, a economia no processo produtivo e redução da imunogenicidade. No entanto, até o momento, poucos produtos em novos formatos foram aprovados para uso clínico. A maior limitação dos fragmentos é a redução da meia-vida plasmática para a faixa de minutos ou horas, enquanto imunoglobulinas completas podem durar semanas circulando no plasma. Por serem proteínas menores, têm uma depuração mais rápida nos rins (muitas vezes abaixo do limite de filtração renal de ~40KDa). Além disso, o Fc é importante para a meia-vida plasmática por interagir com o receptor neonato de Fc (FcRn) nas células endoteliais e no fígado, levando à reciclagem do anticorpo. Dependendo do efeito terapêutico desejado, a rápida depuração pode ser vantajosa ou desvantajosa. Se for desvantajosa, esta questão também pode ser resolvida por estratégias de engenharia de anticorpos como fusionar a Fc, proteínas como albumina, peguilação e outras soluções (LOU; CAO, 2022; SHIM, 2020).

Entre as centenas de formatos de anticorpos descritos, os mais proeminentes são os anticorpos biespecíficos e ADC, com diversos produtos aprovados para uso clínico e dezenas em fase clínica, como observado na Figura 10.11. Os anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos são compostos a partir de dois ou mais fragmentos variáveis de anticorpos, permitindo a ligação a múltiplos antígenos. Desta forma, podem criar funcionalidades por meio de diferentes mecanismos de ação, pois a ligação a diferentes alvos pode levar a uma sinergia ou emergência de efeitos terapêuticos, como, por exemplo, aumento da avidéz, aumento da ADCC por recrutar diretamente células efetoras e diminuição da resistência ao tratamento. Existem centenas de formatos descritos para anticorpos biespecíficos que podem ser agrupados em duas principais categorias, baseados em fragmentos e baseados em Fc representados na Figura 10.9 (LOU; CAO, 2022; SCHMID; NERI, 2019; SHIM, 2020).

Outra classe de anticorpo com potencial terapêutico e em crescimento são os ADC (Figura 10.12). Existem 11 destes produtos aprovados pelo FDA, a maioria a partir de 2017. A criação de ADC representa um resgate de compostos quimioterápicos, que não poderiam ser administrados sistemicamente devido a sua extrema potência e toxicidade. A estrutura molecular de um ADC é constituída por componentes que desempenham papéis fundamentais e diferenciados em sua aplicação, contribuindo com fatores como alta potência, baixa imunogenicidade, baixa citotoxicidade para células saudáveis e alta especificidade contra células alvo da

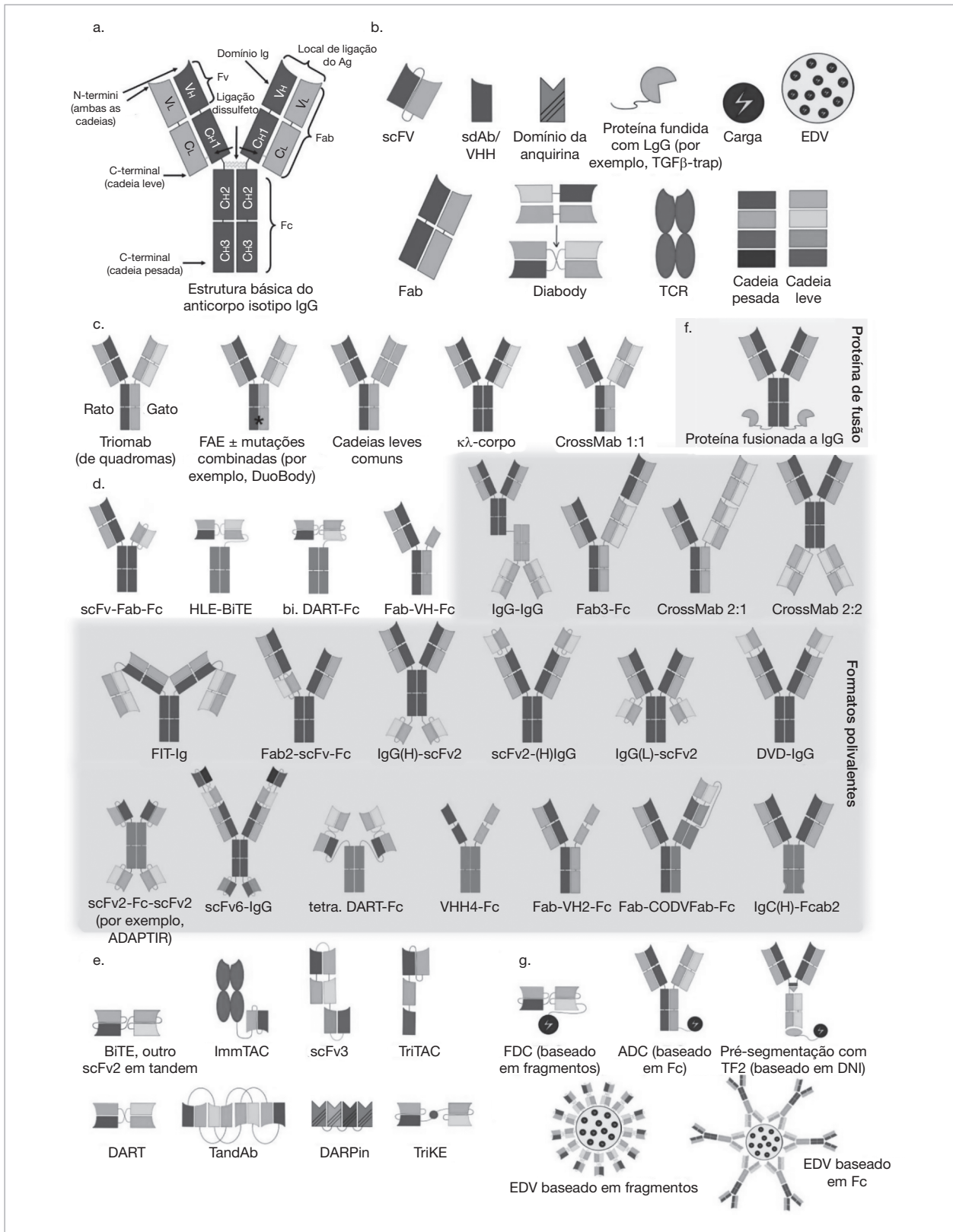


FIGURA 10.10 Alguns dos principais formatos de anticorpos. Os domínios de anticorpos podem ser rearranjados formando fragmentos (A), anticorpos biespecíficos (B). Além disso, os anticorpos podem ser conjugados a drogas, toxinas e outras proteínas, formando os imunocombinados.

Fonte: traduzida de Elshiaty, Schindler e Christopoulos (2021).

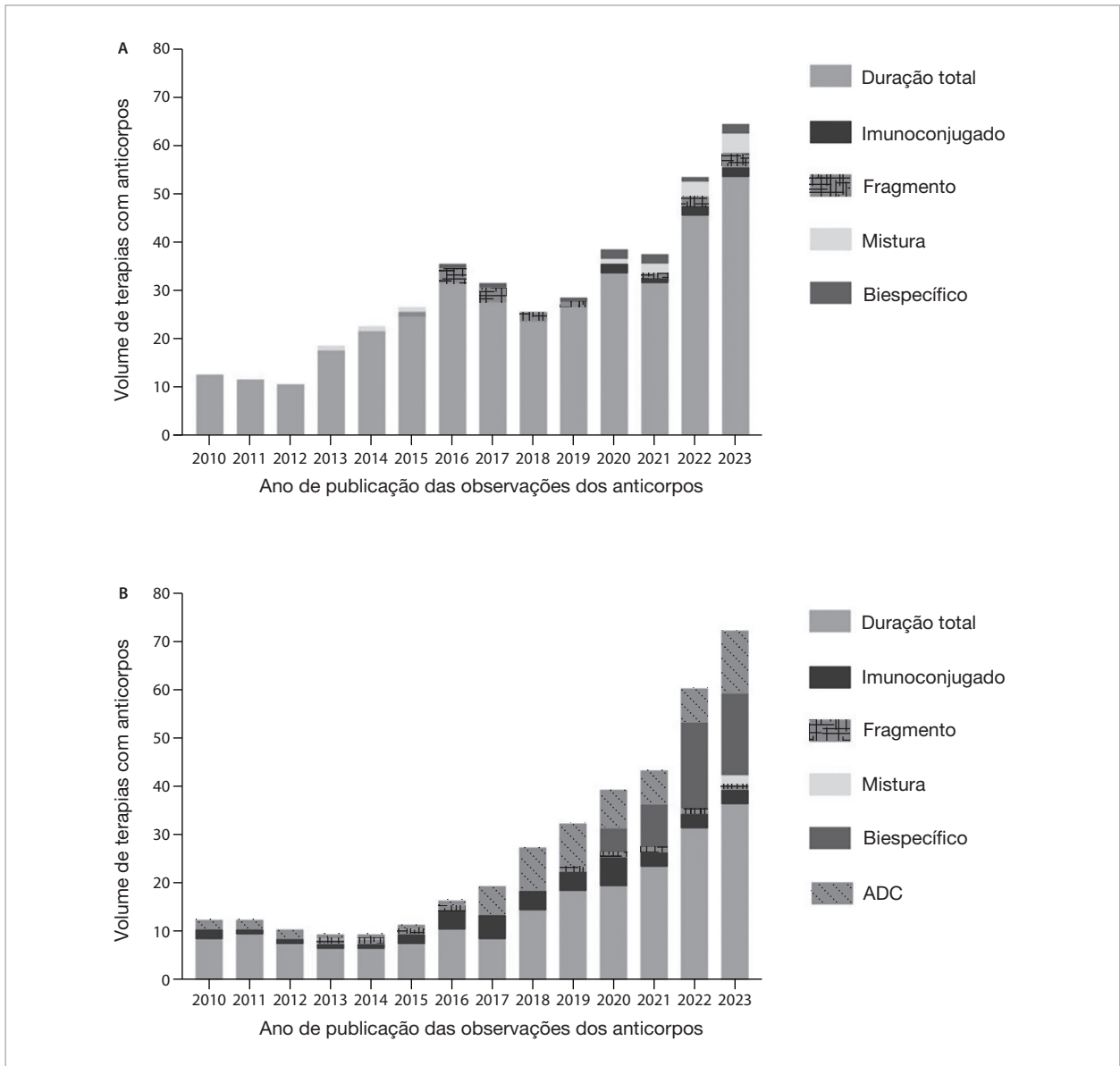


FIGURA 10.11 Formatos e número de anticorpos em estudos clínicos avançados para (a) diversas doenças (excluindo Covid-19 e câncer) e (b) câncer.

Fonte: Kaplon et al. (2023).

terapia. Após ser introduzido na circulação, o reconhecimento de um antígeno específico leva à formação de um complexo antígeno e anticorpo na superfície da célula. Este complexo é internalizado e o *linker* que liga o composto químico ao anticorpo é clivado no endossoma e/ou lisossoma, liberando a droga dentro da célula, conforme observado na Figura 10.13 (FU et al., 2022; SHIM, 2020; TONG et al., 2021).

A engenharia de anticorpos pode ser aplicada para melhorar a farmacocinética, o que pode levar a redução da dose, diminuição do intervalo entre as doses, formulação subcutânea e redução dos custos de produção. Neste

sentido, pode ser modificada a depuração (*clearance*) inespecífica dos anticorpos, modificando-se propriedades físico-químicas como PI. A depuração também pode ser reduzida por meio de mudanças na sequência de aminoácidos para aumentar a afinidade para receptor FcRn, presente nas hemácias, aumentando a meia-vida plasmática de anticorpos (WANG et al., 2021).

As características farmacêuticas também podem ser otimizadas, como termoestabilidade, solubilidade e heterogeneidade. O principal objetivo do desenvolvimento de processo é o estabelecimento de condições de manufatura que gerem consistência entre diferentes

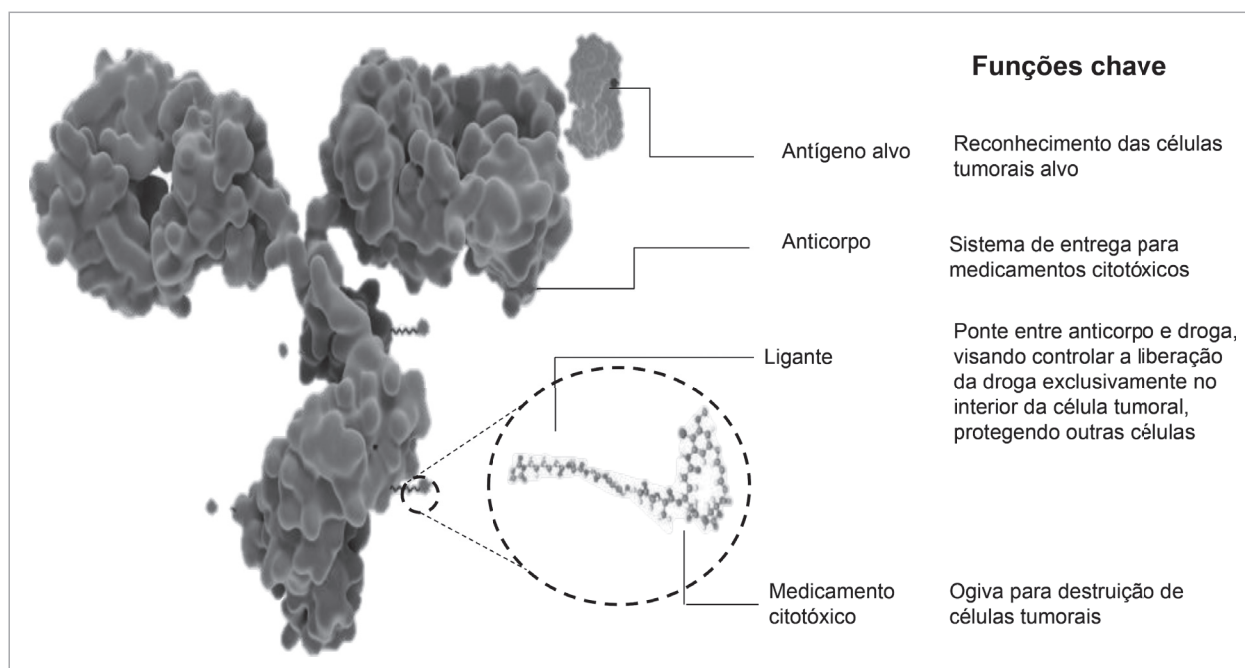


FIGURA 10.12 Estrutura básica de um anticorpo conjugado a drogas (ADC).

Fonte: Fu et al. (2022).

lotes. Considerando que os atributos de qualidade são afetados por mudanças mínimas no processo de manufatura, todas as etapas do desenvolvimento pré-clínico são críticas para a qualidade do produto e segurança do paciente, principalmente se as alterações da droga forem relacionadas a estabilidade, atividade ou eficácia (CARRARA et al., 2021; WANG et al., 2021).

10.4.2 Desenvolvimento de processo produtivo de anticorpos terapêuticos

Uma vez que a sequência do anticorpo candidato clínico seja obtida se inicia o desenvolvimento do processo produtivo da molécula. Neste sentido, diminuir variantes de mAb, impurezas no processo e entregar consistência de lote a lote são cruciais para o desenvolvimento de processo. Além disso, muito esforço foi dedicado para diminuir o tempo e custo de processo por anticorpo (CARRARA et al., 2021; GOULET; ATKINS, 2020; LU et al., 2020; WANG; SINGH, 2014).

O desenvolvimento de anticorpos é semelhante ao desenvolvimento de outros biofármacos, descrito no Capítulo 8. Neste capítulo são tratadas questões específicas de desenvolvimento de mAb. Como todos os mAb têm estrutura muito semelhante, é possível desenvolver uma plataforma de processo, incluindo um sistema de expressão (linhagens e vetores para transfecção), esquema pré-definido de amplificação celular, condições de biorreatores, sistemas de purificação de alta performance

e métodos analíticos bem validados. A produção por plataforma é compatível com a maior parte dos mAb, mas não é a ideal para nenhum produto (CARRARA et al., 2021; WANG et al., 2021).

O desenvolvimento de processo começa com a transfecção com um vetor de expressão adequado numa linhagem celular hospedeira. Uma das etapas mais importantes é a escolha da linhagem celular que expresse o gene de interesse de forma estável, com boa propagação das células e produção de altos títulos de mAb funcionais. Normalmente, uma linhagem celular modificada geneticamente para expressar o mAb de interesse será considerada adequada se mantiver a estabilidade por 70 a 100 gerações e tiver alta produtividade específica (CARRARA et al., 2021; WANG; SINGH, 2014).

A maioria dos mAb são produzidos em células de mamífero por causa da sua capacidade de expressar, fazer o enovelamento correto, modificações pós-traducionais e secretar proteínas de formas análogas às proteínas humanas, diminuindo as chances da indesejada imunogenicidade. As linhagens humanas, como HEK293 (células embrionárias humanas de rim), e linhagens derivadas são comumente utilizadas para expressões transientes na fase de descoberta. No entanto, são pouco utilizadas para a produção de anticorpos para entrega a pacientes por apresentar uma expressão menos estável. A maioria dos anticorpos terapêuticos é produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês *chinese hamster ovary cells*) devido ao grande rendimento, caracterização

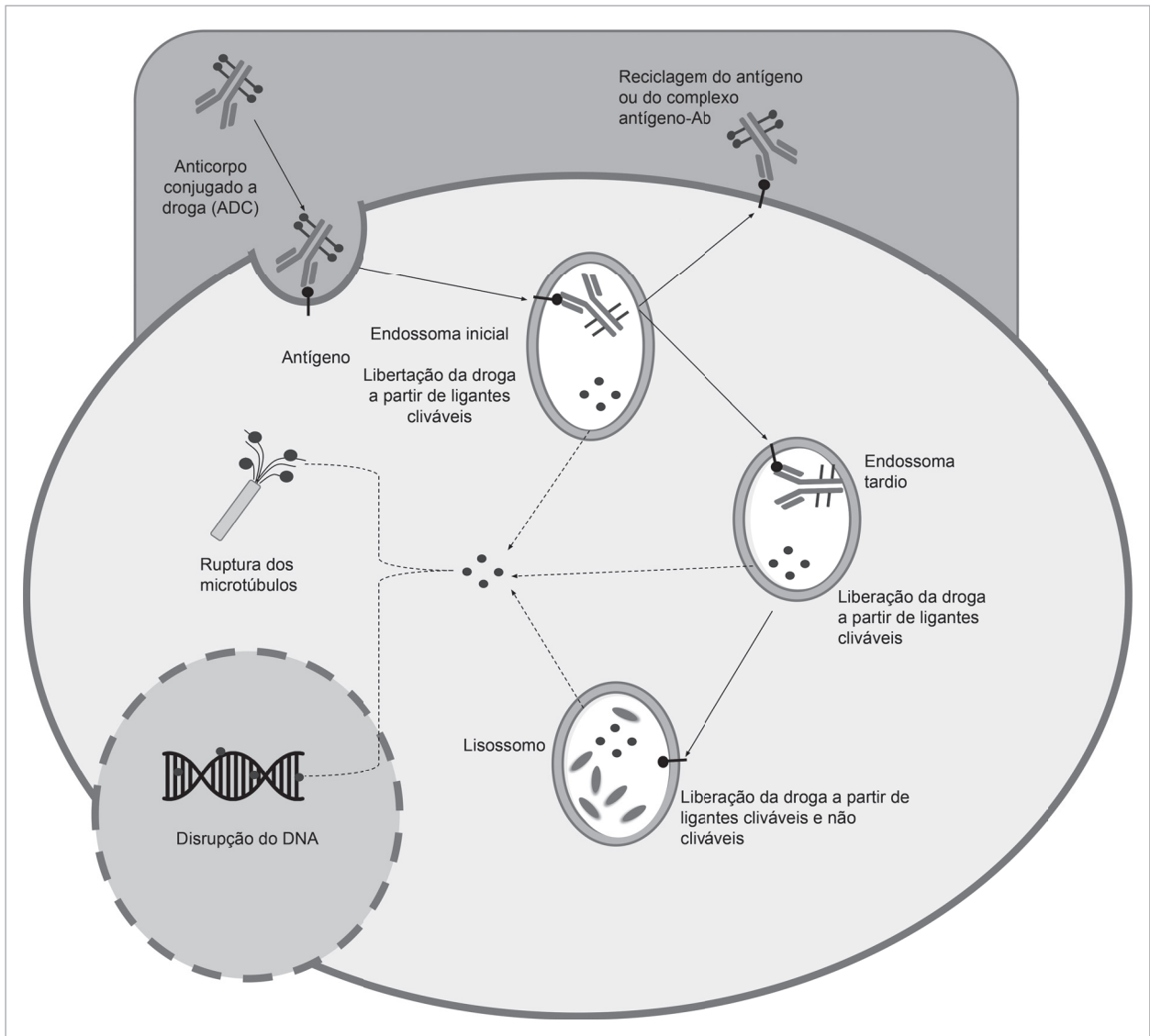


FIGURA 10.13 Mecanismo de ação de um anticorpo conjugado a drogas (ADC).

Fonte: Traduzida de Fu et al. (2022).

e estabilidade da transfecção. Células CHO que foram modificadas por engenharia genética podem ser capazes de secretar até 100 pg/célula/dia de mAb. Nesta etapa normalmente são testadas diversas condições de cultivo para aumentar a produtividade (CARRARA et al., 2021; GOULET; ATKINS, 2020; LU et al., 2020).

Depois que um clone secretor é selecionado, é iniciada a produção do banco de células mestre (MCB, do inglês *master cell bank*), que deve ser produzido em boas práticas de fabricação (BPF). A partir do MCB são produzidos os bancos de célula de trabalho (WCB, do inglês *working cell bank*) que serão usados para o processo de escalonamento, produção para ensaios de toxicidade e lotes para ensaios clínicos. Além disso, a partir do MCB, a qualquer momento que seja necessário pode ser

gerado um novo WCB, para produzir o mAb em todo o seu ciclo do produto, incluindo os lotes comercializados. Portanto, esta etapa representa o primeiro componente do processo comercial (WANG; SINGH, 2014).

Como os anticorpos monoclonais têm características estruturais semelhantes, o processo de purificação varia pouco. A maioria, se não todos, incorporam cromatografia de afinidade baseada em proteína A, como MabSelect, como primeira etapa de purificação. A proteína A fica imobilizada na fase sólida da cromatografia e se liga a Fc de anticorpos, enquanto outras impurezas relacionadas ao processo, como proteínas da célula hospedeira e ácido nucleico, não ficam retidas na coluna. Num processo típico, após a cromatografia de afinidade os mAb são eluídos com cerca de 90% de pureza. Geralmente, é feita

uma etapa de polimento com cromatografia de troca iônica e, em alguns casos, são necessárias mais etapas de cromatografia (WANG; SINGH, 2014).

Comparada com moléculas pequenas, a complexidade da estrutura dos anticorpos causa desafios na formulação e entrega. Os atributos de qualidade da formulação incluem solubilidade, estabilidade, viscosidade e agregação (CARRARA et al., 2021). De modo geral, as concentrações de anticorpos utilizados na clínica são muito altas (acima de 100 mg/mL) para entregar quantidade suficiente de produto por meio de injeções de baixo volume. Como a agregação de proteínas pode ocorrer em concentrações altas e pode alterar as propriedades biológicas de anticorpos, para evitar agregação são trabalhadas formulações específicas, além de aplicar engenharia de proteínas.

Os agregados podem favorecer o reconhecimento pelo sistema imune do paciente, ocasionando um dos principais efeitos adversos dos anticorpos, a imunogenicidade, além de poder diminuir o tempo de meia-vida do produto, reduzindo a eficácia. A imunogenicidade depende não apenas de fatores extrínsecos como dose, frequência, rota de administração, formulação e características do paciente, mas também de propriedades físico-químicas do anticorpo. Como a imunogenicidade é específica, embora haja métodos de predição *in vitro*, normalmente é avaliada em primatas não humanos, por ter alta semelhança com humanos, e/ou ensaios clínicos (GOULET; ATKINS, 2020).

Com relação à rota de administração, o ideal seria a via oral; no entanto, existe a necessidade de melhorar a tecnologia de mAb para que esta via chegue na prática clínica. Isso ocorre, pois em moléculas complexas, como mAb, existe uma baixa biodisponibilidade (1-2% da dose) se for administrado oralmente, devido à limitação de penetração no epitélio intestinal e suscetibilidade à degradação enzimática no lúmen do intestino. Assim sendo, as rotas mais comuns de administração são: intravenosa (IV), intramuscular (IM) ou subcutânea (SC) e a injeção, principal forma de entrega (CARRARA et al., 2021). A seguir serão discutidas as principais aplicações clínicas dos mAb e como os anticorpos modificaram o complexo industrial da saúde.

10.5 ANTICORPOS MONOCLONAIS TERAPÊUTICOS: USO E RECOMENDAÇÕES NA PRÁTICA CLÍNICA

10.5.1 Aplicação na prática clínica em doenças inflamatórias imunomediadas e de interesse na reumatologia

Anticorpos e outros agentes direcionados a células imunes específicas (p. ex., células B e T) ou mediadores

secretados, como citocinas pró-inflamatórias (p. ex., fator de necrose tumoral-TNF- α , interleucinas IL-1, IL-6, IL-17, IL-12 e IL-23), foram desenvolvidos e trazidos para a prática clínica. Estão presentes no tratamento de doenças crônicas, como o câncer, hepatites, osteoporose e doenças inflamatórias imunomediadas (DIIM), incluindo a artrite reumatoide (AR), artrite psoriásica (APso), espondilite anquilosante (EAs), lúpus eritematoso sistêmico (LES), granulomatose com poliangíte (GPA) e poliangiite microscópica (PAM), artrite idiopática juvenil (AIJ), doença inflamatória intestinal (DII), psoríase (Pso), esclerose múltipla (EM), dermatite atópica, hidradenite supurativa, uveíte imunomediada, asma, dentre outras. Sendo, mais recentemente, aprovados com algumas indicações distintas, para a Covid-19 (BURMESTER et al., 2013; FURIE et al., 2011; MCINNES; GRAVALLESE, 2021).

Dos agentes imunobiológicos aprovados para uma série de doenças inflamatórias imunomediadas, com ênfase na área da reumatologia, pode-se enumerar: diversos anticorpos monoclonais (mAb) anti-TNF- α (infleximabe, adalimumabe e golimumabe), mAb peguilado (certolizumabe pegol), mAb receptor anti-IL-6 (tocilizumabe), mAb anti-IL-17A (secuquinumabe), mAb anti-IL-12/IL-23 (ustequinumabe), mAb anti-CD20 (rituximabe), mAb-anti BlyS (fator ativador de linfócitos B; ou seja, belimumabe), além de proteína de fusão IgG Fc do receptor de TNF solúvel (etanercepte) e proteína de fusão moduladora de células T (abatacepte) (Quadro 10.1). Essas terapias modernas melhoram a qualidade de vida dos pacientes e retardam o ciclo natural da doença (BURMESTER et al., 2017; LU et al., 2020; MCINNES; GRAVALLESE, 2021).

Em se tratando de DIIM, em especial na reumatologia, por motivos cronológicos, a maior experiência adquirida refere-se aos imunobiológicos que antagonizam o TNF (anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes). Apesar da segurança relativa dos agentes biológicos (anti-TNF e não anti-TNF) bem estabelecida a curto prazo, nos estudos pivotais de cada um desses produtos, e por registros, no médio e longo prazo, deve se manter atenção na seleção e acompanhamento dos pacientes com indicação desses medicamentos. O rastreamento de infecções que possam ser reativadas pelo uso de imunobiológicos (anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes), como a tuberculose, hepatite B e, menos frequentemente, hepatite C, bem como a atualização vacinal de rotina, de acordo com os fatores de risco e faixa etária, são recomendados. Outras infecções como herpes-zóster, vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecções endêmicas no Brasil (hanseníase, doença de Chagas) devem receber especial cuidado. As infecções graves podem ocorrer, mas têm diminuído distintamente nos estudos mais recentes e na observação

QUADRO 10.1 Biofármacos em doenças inflamatórias imunomediadas e de interesse na reumatologia: ação, indicação e via de administração

Biofármaco	Ação	Indicação	ia
Etanercepte	Proteína de fusão solúvel do receptor p75 Fc do TNF humano. Não é anticorpo monoclonal	AR, EA, APso, AIJ poliarticular, Pso	C
Abatacepte	Proteína de fusão recombinante solúvel (domínio extracelular do antígeno CTLA-4). Modulador seletivo da coestimulação de célula T, por meio de interferência com a via de sinalização do CD28. Não é anticorpo monoclonal.	AR, AIJ	C/IV
Infliximabe	Anticorpo monoclonal quimérico camundongo-humano, anti-TNF	AR, EA, APso, PSo em placas, Crohn, RCU	V
Golimumabe	Anticorpo monoclonal humano IgG1κ anti-TNF	AR, EA, APso, AIJ poliarticular	C
Adalimumabe	Anticorpo monoclonal humano recombinante, anti-TNF-α	AR, EA, EpA axial não radiográfica, APso, AIJ poliarticular e artrite relacionada à entesite, Pso em placas, Crohn, RCU, Uveíte, hidranenite supurativa	SC
Certolizumabe pegol	Anticorpo monoclonal TNF-α peguilado. A peguilação é um processo de modificação de moléculas biológicas através de conjugação química covalente com 2 moléculas de polietilenoglicol (polímero imunogênico e hidrofóbico)	AR, EA, EpA axial não radiográfica, APso, Pso em placas	SC
Belimumabe	Anticorpo monoclonal IgG1 recombinante humano anti-BLyS (estimuladores de linfócito B). Reduz a sobrevivência das células B e inibe a diferenciação das células B em plasmócitos produtores de imunoglobulina.	LES ativo	IV
Rituximabe	Anticorpo monoclonal quimérico camundongo-humano, anti-CD20, proteína expressa na superfície de linfócitos B maduros, mas ausentes nos imaturos saudáveis.	AR, PAM, GPA, linfoma não Hodgkin, leucemia linfóide crônica	IV
Ustequinumabe	Anticorpo monoclonal IgG1kappa humano. Liga-se com especificidade à subunidade compartilhada proteica p40 das citocinas humanas IL-12 e IL-23, inibindo sua bioatividade e impedindo que a p40 se ligue ao receptor proteico IL-12Rbeta1 expresso na superfície das células do sistema imunológico. Assim, interrompe as vias das citocinas relacionadas a Th1 e Th17.	APso, Pso em placas, Crohn, RCU	SC
Secuquinumabe	Anticorpo monoclonal IgG1 humano que se liga de maneira seletiva à citocina pró-inflamatória IL-17A, neutralizando-a e inibindo a interação com seu receptor; reduzindo assim as ações por ela mediadas	EA, EpA axial não radiográfica, APso, PSo em placas	SC
Ixequizumabe	Anticorpo monoclonal humanizado IgG4 com atividade neutralizante contra IL 17-A	PSo	SC
Tocilizumabe	Anticorpo monoclonal humanizado antirreceptor de IL-6 humana	AR, AIJ poliarticular e sistêmica, arterite temporal, SLC grave induzida por células CAR-T	SC/IV
Vedolizumabe	Anticorpo monoclonal humanizado IgG1. É um antagonista seletivo da integrina no intestino	Crohn, RCU	IV
Guselcumabe	Anticorpo monoclonal humano IgG1 que bloqueia a via da citocina IL-23	PSo, APso	SCm
Risanquizumabe	Anticorpo monoclonal humanizado IgG1 com alta afinidade seletiva para se ligar à subunidade p19 da citocina IL-23, bloqueando sua ligação ao seu receptor.	PSo, APso	SC

Obs.: APso: artrite psoriásica; AR: artrite reumatoide; AIJ: artrite idiopática juvenil; EA: espondilite anquilosante; EpA: espondiloartrite; GPA: granulomatose com poliangiíte; IL: interleucina; IV: intravenoso; PAM: poliangiíte microscópica; PSo: psoríase; RCU: retocolite ulcerativa; SC: subcutâneo; SLC: síndrome de liberação de citocinas; TNF: fator de necrose tumoral.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

adquirida no acompanhamento dos pacientes, hoje, cerca de duas décadas após o início de sua comercialização. O uso de imunobiológicos anti-TNF (anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes) por pacientes com insuficiência cardíaca classe III ou IV (New York Heart Association), neoplasia (atual ou anterior até 5 anos) e doença desmielinizante é contraindicado. Assim, as diretrizes de recomendações de tratamento ajudam a determinar quais pacientes são candidatos à terapia biológica (COMBE et al., 2017; MOTA et al., 2018; RESENDE et al., 2020; SEPRIANO et al., 2020).

Com o uso, em sequência, por um mesmo paciente, de diferentes biofármacos (anticorpos monoclonais ou não) e, ainda, com a entrada no mercado de biossimilares, surgem novos desafios. Assim, análises de farmacovigilância tornam-se mais importantes na avaliação a longo prazo desses pacientes (ECKER; JONES; LEVINE, 2015).

A significativa e incontestável mudança produzida no tratamento das doenças com os biofármacos disponíveis no mercado impulsionou o interesse da pesquisa na identificação de novos agentes biológicos. Outros anticorpos monoclonais e novos agentes terapêuticos estão em desenvolvimento, como ligantes de CD-22 (epratuzumabe), e devem chegar à prática clínica em breve. Dessa forma, há um horizonte promissor para o manejo de pacientes com doenças crônicas e imunomediadas (DAVIS; REIMOLD, 2017; SAAD et al., 2019).

10.5.2 Aplicação na prática clínica em oncologia

O uso dos anticorpos monoclonais no tratamento do câncer foi proposto por Paul Ehrlich no século passado (WEINER; SURANA; WANG, 2010), mas somente com o desenvolvimento do híbrido, em 1975, a produção dos primeiros anticorpos monoclonais aconteceu (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Junto com avanços posteriores na tecnologia, foi possível o desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos aplicados na prática clínica.

Especialmente na última década, os anticorpos no tratamento de pacientes com câncer têm sido cada vez mais empregados. Muitos anticorpos são específicos contra antígenos expressos pelo próprio tumor, outros visam ao microambiente tumoral e ao sistema imune (WEINER; SURANA; WANG, 2010). Existem diversas opções de anticorpos monoclonais disponíveis no campo da oncologia, os principais exemplos são abordados neste capítulo.

Um dos pioneiros na oncologia foi o anticorpo anti-CD20. Em 1988, a proteína CD20, presente em linfócitos B maduros, foi identificada. O CD20 é abundantemente expresso em células B neoplásicas presentes no linfoma não Hodgkin, mas não é encontrado em

células B imaturas saudáveis. Portanto, um tratamento com anticorpo monoclonal com alvo no CD20 poderia eliminar as células neoplásicas, mas as células B imaturas permaneceriam para repor o suprimento de células saudáveis. Assim, o CD20 tornou-se o primeiro alvo para um anticorpo monoclonal e o rituximabe foi o primeiro desta classe a ser aprovado para o tratamento do câncer (ZAHAVI; WEINER, 2020).

Diversas terapias de anticorpos monoclonais com sucesso clínico em oncologia são baseadas em bloqueio da interação receptor ligante. Muitos dos alvos expressos no tumor são receptores de fator de crescimento que têm expressão aumentada durante a tumorigênese. Ao bloquear a ligação do ligante e/ou sinalização por meio desses receptores, os anticorpos monoclonais podem reduzir a proliferação das células neoplásicas, induzir apoptose e, até mesmo, ajudar a sensibilizar tumores a agentes quimioterápicos (ADAMS; WEINER, 2005).

Membros da família de EGFR, incluindo EGFR, HER2, HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4), são frequentemente superexpressos em tumores sólidos. O cetuximabe e o panitumumabe bloqueiam a ligação aos ligantes de EGFR, impedindo a dimerização do receptor, que é uma etapa fundamental para se iniciar a transdução do sinal pela via (LI et al., 2005; SUNADA et al., 1986). Ambos são usados para o tratamento do câncer colorretal metastático sem mutação no gene de KRAS em combinação com quimioterapia ou de maneira isolada, a depender da linha de tratamento (KIM, 2009; VAN CUTSEM et al., 2009). O cetuximabe também é indicado para o tratamento de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço em combinação com radioterapia para doença localmente avançada em pacientes, de acordo com critério médico. No entanto, não podem ser tratados com a associação de quimioterapia e radioterapia, ou em combinação com quimioterapia baseada em platina para doença recidivada e/ou metastática.

Ao contrário do EGFR, o HER2 não possui ligante conhecido. Os anticorpos direcionados a este receptor funcionam, principalmente, para inibir a homo e heterodimerização do receptor e a consequente internalização (CHEN; LAN; HUNG, 2003). O HER2 é amplificado e superexpresso em aproximadamente 30% dos tumores invasivos de mama e superexpresso, embora raramente amplificado, em alguns adenocarcinomas do pulmão, ovário, endométrio, próstata e tumores gástricos. O trastuzumabe é usado para o tratamento de câncer de mama invasivo HER2 positivo nos cenários neoadjuvante, adjuvante e avançado. O trastuzumabe também está aprovado em associação com quimioterapia para o tratamento de pacientes com adenocarcinoma inoperável, localmente avançado, recorrente ou metastático do estômago ou da junção gastroesofágica, HER2 positivo.

Outro anticorpo direcionado a HER2 é o pertuzumabe, que se liga em um local distinto do trastuzumabe e inibe a dimerização do receptor (SCHEUER et al., 2009). Pertuzumabe, em combinação com trastuzumabe e quimioterapia, está indicado no tratamento do câncer de mama nos cenários inicial e metastático.

Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), muitas vezes expressos por tumores sólidos, se ligam ao seu receptor no endotélio vascular dos vasos no microambiente tumoral para estimular a angiogênese. O bevacizumabe bloqueia a ligação do VEGF ao seu receptor, sendo aprovado para o tratamento de diversas neoplasias avançadas, por exemplo, o câncer de mama, colorretal, de pulmão, de não pequenas células, ovário, colo de útero em combinação com quimioterapia citotóxica (ELLIS; HICKLIN, 2008). O ramucirumabe tem ação contra o VEGFR2, estando aprovado para pacientes com câncer gástrico ou da junção esofagogástrica avançado com ou sem quimioterapia, a depender da linha de tratamento. Além disso, tem ação para o câncer colorretal metastático com progressão da doença, durante ou após quimioterapia anterior, contendo bevacizumabe e quimioterapia e para câncer de pulmão não pequenas células em associação com erlotinibe na primeira linha de pacientes com doença metastática e com mutações ativadoras de EGFR ou em associação com quimioterapia para doença localmente avançada ou metastática com progressão da doença após quimioterapia contendo platina. Ramucirumabe também está indicado em monoterapia no tratamento de pacientes com carcinoma hepatocelular avançado ou sem possibilidade de ressecção e que tenham sido previamente tratados com terapia alvo.

Além dos anticorpos monoclonais descritos anteriormente que têm ação direta nas células tumorais, diversas terapias com foco no sistema imunológico têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a eficácia da resposta imune antitumoral, muitas vezes conhecida como imunoterapia contra o câncer, que cresceu consideravelmente na última década. Anticorpos que se ligam a correceptores imunes têm potencial de reverter a imunossupressão mediada pelas neoplasias. O CTLA4, um receptor de linfócitos T, é um regulador negativo da ativação de células T. A via de PD-1/PD-L1 desempenha um papel significativo na regulação das respostas imunes. A estimulação do eixo PD-1/PD-L1 está correlacionada com a exaustão de células T, apoptose de células T e sua capacidade reduzida de proliferação (CRUZ; KAYSER, 2019).

Anticorpos anti-CTLA4 (ipilimumabe), anti-PD-1 (pembrolizumabe, nivolumabe, cemiplimabe, dostarlimabe), anti-PD-L1 (avelumabe, durvalumabe, atezolizumabe) isoladamente ou em combinações (com

quimioterapia, terapia alvo ou outra imunoterapia) mudaram a história do tratamento de várias neoplasias sólidas. Inicialmente eram aplicados apenas para doença metastática e, em algumas indicações mais recentes, nos cenários mais iniciais (adjuvante e neoadjuvante). Outros anticorpos contra outros correceptores imunes estão em desenvolvimento pré-clínico ou clínico.

Os anticorpos conjugados a drogas (ADC) e os anticorpos biespecíficos (BITE) representam a evolução no campo dos anticorpos monoclonais e alguns representantes de ambas as classes têm aprovação para o tratamento de alguns tipos de câncer (EINSELE et al., 2020; TARANTINO et al., 2022). Em suma, o Quadro 10.2 mostra os principais anticorpos monoclonais aprovados no Brasil.

QUADRO 10.2 Principais anticorpos monoclonais aprovados no Brasil para tratamento de doenças onco-hematológicas

Anticorpo	Alvo	Indicações
Rituximabe	CD20	Linfoma não Hodgkin, leucemia linfóide crônica
Trastuzumabe	HER2	Câncer de mama, estômago, endométrio
Pertuzumabe	HER2	Câncer de mama
Trastuzumabe entansina	HER2	Câncer de mama
Cetuximabe	EGFR	Câncer de cólon, reto, cabeça e pescoço
Panitumumabe	EGFR	Câncer de cólon, reto
Bevacizumabe	VEGF	Câncer de cólon, reto, pulmão, mama, SNC, colo de útero, ovário, rim
Ramucirumabe	VEGF	Câncer de cólon, reto, estômago, pulmão, fígado
Daratumumabe	CD38	Mieloma múltiplo
Ipilimumabe	CTLA4	Melanoma, câncer de pulmão, rim, fígado, mesotelioma, esôfago
Pembrolizumabe	PD1	Melanoma, câncer de pulmão, rim, urotelial, cabeça e pescoço, bexiga, estômago, esôfago, colo de útero, endométrio, linfomas, mama, tumores com instabilidade de microsatélites
Nivolumabe	PD1	Melanoma, câncer de pulmão, rim, urotelial, cabeça e pescoço, esôfago, estômago, linfomas, câncer de pele não melanoma, mesotelioma

(continua)

QUADRO 10.2 Principais anticorpos monoclonais aprovados no Brasil para tratamento de doenças onco-hematológicas (*continuação*)

Anticorpo	Alvo	Indicações
Cemiplimabe	PD1	Câncer de pele não melanoma, pulmão
Atezolizumabe	PDL1	Câncer de pulmão, mama, urotelial
Avelumabe	PDL1	Carcinoma de células de Merkel, câncer de rim e bexiga
Durvalumabe	PDL1	Câncer de pulmão, urotelial, vias biliares

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

10.6 O PAPEL DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS TERAPÊUTICOS PARA O COMPLEXO ECONÔMICO INDUSTRIAL DA SAÚDE (CEIS)

Passaram-se três décadas desde que o FDA aprovou o primeiro anticorpo monoclonal terapêutico em 1986, o muromonabe, um anti-CD3 murino. Desde então, os anticorpos terapêuticos passaram a ser a classe dominante em biofármacos, este mercado cresceu rapidamente e, em 2013, representava US\$ 75 bilhões. Atualmente, existem mais de 80 mAb disponíveis comercialmente e continua em franco crescimento, estimando-se que a venda destes produtos, em 2025, represente US\$ 300 bilhões, conforme Figura 10.14. Atualmente, eles são a classe terapêutica dominante de biofármacos. Esse sucesso ocorreu principalmente por conta de avanços tecnológicos nas duas últimas décadas (ECKER; JONES; LEVINE, 2015; KELLEY; RENSHAW; KAMARCK, 2021; KINCH; KRAFT; SCHWARTZ, 2023; LU et al., 2020).

Apesar dos avanços da indústria de anticorpos monoclonais, a garantia do acesso global para estes produtos requer reduzir o custo de manufatura e aumento da capacidade produtiva. A demanda de pico e os volumes de produção variam, consideravelmente por molécula e doença, de 10 kg/ano até mais de 3.000 kg/ano. Avanços tecnológicos como engenharia de anticorpos, medicina personalizada e aumento da produtividade reduziram os investimentos em escalas elevadas (biorreatores de 12 a 25.000 L.) para plantas com biorreatores em torno de 2.000 L, utilizando tecnologias de descartáveis (*single use*), utilizando as mesmas plataformas de *upstream* e *downstream*. Apesar destas novas tendências tecnológicas, terapias com mAb, ainda, não são amplamente utilizadas em países de baixa e média renda, principalmente pelo custo elevado (KELLEY; RENSHAW; KAMARCK, 2021).

O crescimento da biotecnologia farmacêutica no tratamento de doenças impactou significativamente o orçamento e a vulnerabilidade do SUS. Conforme discutido no Capítulo 1, existe um atraso tecnológico de desenvolvimento e produção de biofármacos, incluindo os anticorpos monoclonais terapêuticos. Assim sendo, o país é altamente dependente da importação de produtos biotecnológicos. Como a manufatura de produtos biológicos é complexa, onerosa e crítica para eficácia e segurança, estes produtos consomem cerca de 50% do orçamento do SUS. Uma série de políticas públicas foram implementadas para incorporar esta tecnologia ao país, como as parcerias para o desenvolvimento produtivo (PDP) (MEIRELLES et al., 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023; SCHEINBERG et al., 2018).

Entre as PDP vigentes, seis são de anticorpos monoclonais terapêuticos e uma de proteína de fusão de um receptor na região Fc de imunoglobulina (Quadro 10.3). Bio-Manguinhos/Fiocruz e Bionovis são as únicas indústrias nacionais que fornecem anticorpos monoclonais ao SUS via a política de PDP. Essa política começou a gerar frutos e hoje existem as primeiras plantas certificadas pela Anvisa para a produção de anticorpos monoclonais terapêuticos e diversas em construção; portanto, houve um fortalecimento do tecido produtivo. Hoje praticamente todos os registros de anticorpos monoclonais submetidos à Anvisa por organizações brasileiras são oriundos de PDP. Além disso, houve uma redução dos preços médios de anticorpos monoclonais pagos pelo SUS (Quadro 10.4). Outro benefício se refere à competência de controle de qualidade, na adequação às agências regulatórias, em ensaios clínicos, farmacovigilância, desenvolvimento de processos e qualificação de mão de obra (MEIRELLES et al., 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023; SCHEINBERG et al., 2018).

Apesar dos bons resultados, restam fragilidades nas conduções políticas, insegurança jurídica, dificuldades de governança e descontinuidade de decisões, representando pontos de atenção e necessidade de correção de rumos (MEIRELLES et al., 2020).

10.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento de diferentes tecnologias, numerosos anticorpos monoclonais terapêuticos foram produzidos e testados em estudos clínicos para tratar um volume crescente de doenças, revolucionando as mais diversas especialidades médicas. O alto custo agregado aos anticorpos monoclonais ainda é um fator limitante para seu uso em todas as suas indicações aprovadas, especialmente em países com menos recursos financeiros destinados ao setor da saúde. O Brasil é dependente de importação e tecnologia externa

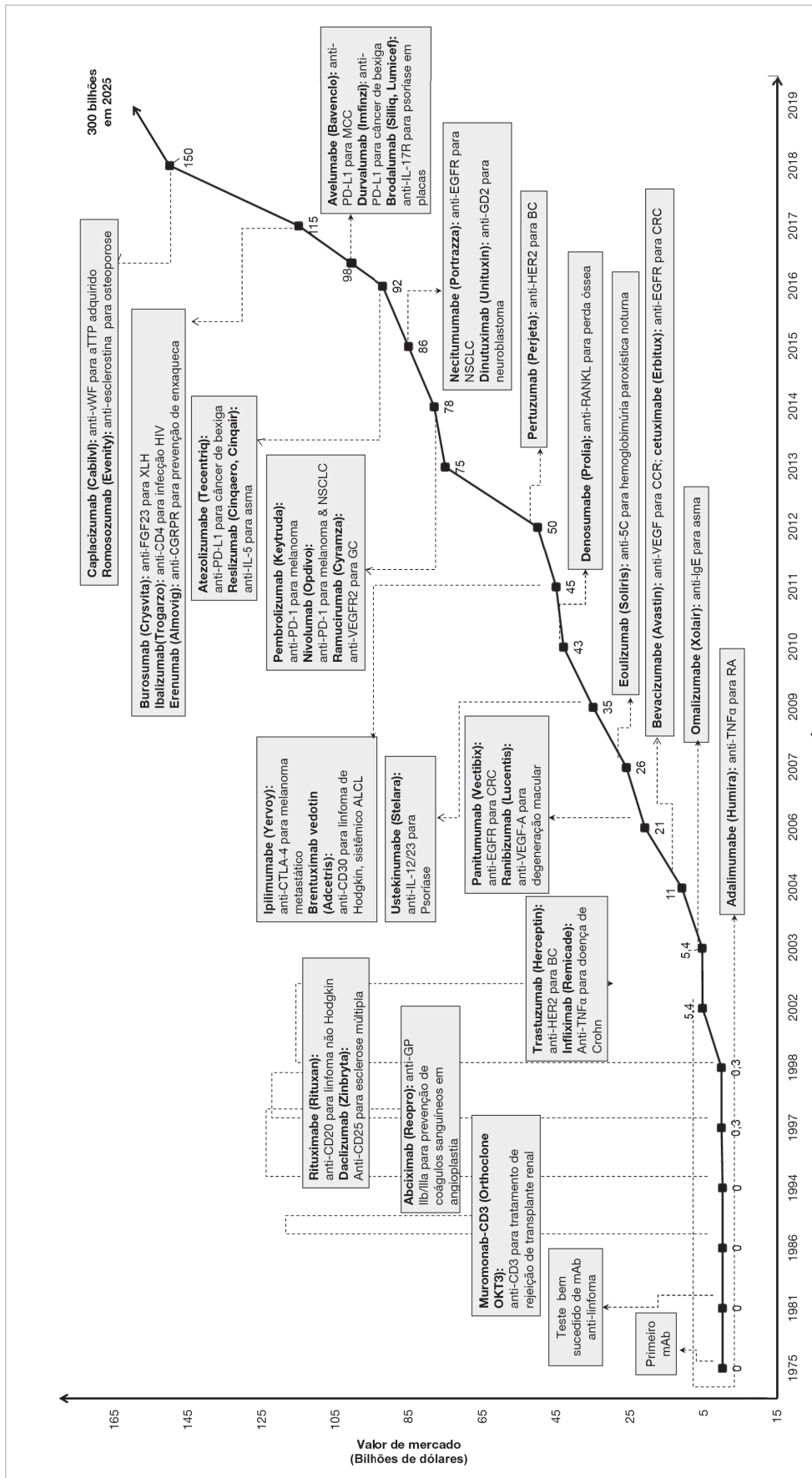


FIGURA 10.14 Crescimento do mercado de anticorpos monoclonais terapêuticos de 1975 a 2019.

Fonte: traduzida de Lu et al. (2020).

QUADRO 10.3 Parcerias para o desenvolvimento produtivo (PDP) vigentes de anticorpos monoclonais. Na fase II o projeto de PDP está aprovado pelo MS e na fase III se inicia o fornecimento do medicamento para o SUS

Produto	Instituição pública	Parceiro privado nacional	Parceiro privado internacional	Fase
Adalimumabe	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis	Fresenius	II
	Butantan	Sandoz do Brasil	Sandoz AG	II
Etanercept*	Butantan	Sandoz do Brasil	Sandoz AG	II
	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis	Samsung Bioepis	III
Golimumabe	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis	Janssen-Cilag	III
Infliximabe	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis	Janssen-Cilag	III
Rituximabe	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis	Sandoz AG	III
Trastuzumabe	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Bionovis	Samsung Bioepis	III

Obs.: *Etanercept não é um anticorpo monoclonal, mas sim uma proteína de fusão de um receptor para TNF e região Fc de imunoglobulina.

Fonte: adaptado de Ministério da Saúde (2022).

QUADRO 10.4 Variação dos valores unitários médios de aquisição de anticorpos monoclonais terapêuticos entre 2014 e 2019 (preços correntes e conversão pela taxa de câmbio média do mês de aquisição)

Medicamento	Apresentação	Principais indicações	Variação (US\$)	Variação (R\$)
Adalimumabe	40 mg/mL – sol. Injetável	Artrite reumatoide	-17%	-3%
Eculizumabe	10 mg/mL – sol. Injetável	Síndrome hemolíticourêmica	-40%	-35%
Etanercepte	25 mg – pó liófilo	Artrite reumatoide	-33%	-20%
	50 mg – sol. injetável		-34%	-22%
Trastuzumabe	440 mg – pó liófilo	Câncer de mama	-28%	2%
	150 mg – pó liófilo		-19%	-4%
Infliximabe	100 mg – pó liófilo	Doença de Crohn	-24%	-11%
Golimumabe	50 mg/mL – sol. injetável	Artrite reumatoide	-27%	-11%
Rituximabe	10 mg/mL – sol. injetável	Artrite reumatoide	-17%	-2%
Palivizumabe	50 mg – pó liófilo	Doença respiratória VSR	-28%	-14%
	100 mg/mL – sol. injetável		-16%	-6%

Fonte: Adaptado de Meirelles et al. (2020).

para acesso ao tratamento com anticorpos monoclonais terapêuticos e demais biofármacos. A continuidade e criação de novas políticas públicas que tragam maior estabilidade e segurança e incentivem o aumento da capacidade de produção e desenvolvimento desses biofármacos no país é de suma importância para a mudança deste cenário.

Há um expressivo potencial para o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais em muitas condições que ainda não são satisfatoriamente manejáveis com a terapia padrão disponível. Na próxima década haverá o crescimento de terapias efetivas para doenças que

ameaçam a vida, com os anticorpos conjugados a drogas e os anticorpos biespecíficos, além de novas opções com os inibidores de correceptores imunes.

À medida que a biotecnologia e a bioengenharia se desenvolvem e se expandem em capacidade científica, a combinação de pesquisa básica, estudos translacionais e ensaios clínicos possibilitará conceber, investigar e testar agentes, técnicas e caminhos terapêuticos adicionais. Em última análise, haverá maior concorrência no mercado de anticorpos monoclonais terapêuticos e demais biofármacos impactando positivamente a ampliação do acesso dos pacientes a essas terapias inovadoras.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; WEINER, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1147–1157, 7 set. 2005.
- ALFALEH, M. A. et al. Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 28 ago. 2020.
- ANAND, T. et al. Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. **Current Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1124–1134, 9 abr. 2021.
- ANDRABI, R. et al. Production and characterization of human anti-V3 monoclonal antibodies from the cells of HIV-1 infected Indian donors. **Virology journal**, v. 9, p. 196, set. 2012.
- ANDRABI, R. et al. Cross-neutralizing activity of human anti-V3 monoclonal antibodies derived from non-B clade HIV-1 infected individuals. **Virology**, v. 439, n. 2, p. 81–88, maio 2013.
- BURMESTER, G. R. et al. Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 4, p. 517–524, abr. 2013.
- BURMESTER, G. R. et al. Managing rheumatic and musculoskeletal diseases – past, present and future. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 7, p. 443–448, 15 jul. 2017.
- CARRARA, S. C. et al. From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 594, p. 120164, fev. 2021.
- CHEN, J.-S.; LAN, K.; HUNG, M.-C. Strategies to target HER2/neu overexpression for cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 3, p. 129–136, jun. 2003.
- COMBE, B. et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 6, p. 948–959, jun. 2017.
- CRUZ, E.; KAYSER, V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. **Biologics: Targets and Therapy**, v. Volume 13, p. 33–51, maio 2019.
- DAVIS, L. S.; REIMOLD, A. M. Research and therapeutics – traditional and emerging therapies in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 56, n. suppl_1, p. i100–i113, 1 abr. 2017.
- ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2 jan. 2015.
- EINSELE, H. et al. The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. **Cancer**, v. 126, n. 14, p. 3192–3201, 15 jul. 2020.
- ELLIS, L. M.; HICKLIN, D. J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 579–591, 3 ago. 2008.
- ELSHIATY, M.; SCHINDLER, H.; CHRISTOPOULOS, P. Principles and Current Clinical Landscape of Multispecific Antibodies against Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5632, 26 maio 2021.
- FANG, J. C.; BODEUS, M.; BURTONBOY, G. Study on rat-rat hybridoma technique and production of rat monoclonal antibodies against HIV and HBsAg. **Chinese journal of biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 73–81, 1991.
- FITZGERALD, V.; LEONARD, P. Single cell screening approaches for antibody discovery. **Methods**, v. 116, p. 34–42, mar. 2017.
- FLYNN, J. N.; HARKISS, G. D.; HOPKINS, J. Generation of a sheep x mouse heterohybridoma cell line (1C6.3a6T.1D7) and evaluation of its use in the production of ovine monoclonal antibodies. **Journal of immunological methods**, v. 121, n. 2, p. 237–246, jul. 1989.
- FU, Z. et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 93, 22 mar. 2022.
- FURIE, R. et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 12, p. 3918–3930, dez. 2011.
- GOULET, D. R.; ATKINS, W. M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 1, p. 74–103, jan. 2020.
- GREEN, L. L. et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. **Nature genetics**, v. 7, n. 1, p. 13–21, maio 1994.
- GRISWOLD, K. E.; BAILEY-KELLOGG, C. Design and engineering of deimmunized biotherapeutics. **Current opinion in structural biology**, v. 39, p. 79–88, ago. 2016.
- JONES, T. D. et al. Deimmunization of Monoclonal Antibodies. In: [s.l.: s.n.]. p. 405–423.
- KAPLON, H. et al. Antibodies to watch in 2023. **mAbs**, v. 15, n. 1, 31 dez. 2023.
- KEARNEY, J. F. et al. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 123, n. 4, p. 1548–1550, out. 1979.
- KELLEY, B. Developing therapeutic monoclonal antibodies at pandemic pace. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 540–545, 21 maio 2020.
- KELLEY, B.; RENSHAW, T.; KAMARCK, M. Process and operations strategies to enable global access to antibody therapies. **Bio-technology Progress**, v. 37, n. 3, 16 maio 2021.
- KIM, R. Cetuximab and panitumumab: are they interchangeable? **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 12, p. 1140–1141, dez. 2009.
- KINCH, M. S.; KRAFT, Z.; SCHWARTZ, T. Monoclonal antibodies: Trends in therapeutic success and commercial focus. **Drug Discovery Today**, v. 28, n. 1, p. 103415, jan. 2023.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, ago. 1975.
- KUO, M. C. et al. Rabbit-mouse hybridomas secreting intact rabbit immunoglobulin. **Molecular immunology**, v. 22, n. 4, p. 351–359, abr. 1985.
- LABRIJN, A. F. et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 8, p. 585–608, 7 ago. 2019.
- LI, S. et al. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 301–311, abr. 2005.
- LING, W.-L.; LUA, W.-H.; GAN, S. K.-E. Sagacity in antibody humanization for therapeutics, diagnostics and research purposes: considerations of antibody elements and their roles. **Antibody Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 71–79, 2020.

37. LONBERG, N. et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 856–859, 1994.
38. LONBERG, N. Human antibodies from transgenic animals. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1117–1125, 7 set. 2005.
39. LOU, H.; CAO, X. Antibody variable region engineering for improving cancer immunotherapy. **Cancer Communications**, v. 42, n. 9, p. 804–827, 13 set. 2022.
40. LU, R.-M. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1, 2 dez. 2020.
41. MCINNES, I. B.; GRAVALLESE, E. M. Immune-mediated inflammatory disease therapeutics: past, present and future. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 10, p. 680–686, 13 out. 2021.
42. MEHANNA, R. A. **Physical versus Immunological Purification of Mesenchymal Stem Cells**. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/mesenchymal-stem-cells-isolation-characterization-and-applications/physical-versus-immunological-purification-of-mesenchymal-stem-cells>. Acesso em: 25 jan. 2023.
43. MEIRELLES, B. B. et al. **Balanco da estratégia de desenvolvimento da biotecnologia farmacêutica no Brasil: 2009-2019**. Disponível em: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/19802>. Acesso em: 15 fev. 2023.
44. MENDEZ, M. J. et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 146–156, 1 fev. 1997.
45. MENENDEZ, A.; SCOTT, J. K. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 145–157, jan. 2005.
46. MIMMI, S. et al. Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 2, p. 87–91, 2019.
47. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Biocientíficos – Medicamentos, Vacinas e Hemoderivados**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/deciis/pdp/produtos-objeto-de-pdp/medicamentos-vacinas-e-hemoderivados/plataformas/medicamento-vacina-e-hemoderivados-parcerias-vigentes-plataformas-biotecnologico>. Acesso em: 15 fev. 2023.
48. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/deciis/pdp>. Acesso em: 15 fev. 2023.
49. MOTA, L. M. H. DA et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, v. 58, n. 1, p. 2, 24 dez. 2018.
50. NAGATA, S.; PASTAN, I. Removal of B cell epitopes as a practical approach for reducing the immunogenicity of foreign protein-based therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 11, p. 977–985, set. 2009.
51. NISHINAKA, S. et al. A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 217–222, jun. 1991.
52. PARRAY, H. A. et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. **International Immunopharmacology**, v. 85, p. 106639, ago. 2020.
53. PEDRIOLI, A.; OXENIUS, A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 12, p. 1143–1158, dez. 2021.
54. RAFTERY, L. J. et al. Retooling phage display with electrohydrodynamic nanomixing and nanopore sequencing. **Lab on a Chip**, v. 19, n. 24, p. 4083–4092, 2019.
55. RESENDE, G. G. et al. The Brazilian Society of Rheumatology guidelines for axial spondyloarthritis – 2019. **Advances in Rheumatology**, v. 60, n. 1, p. 19, 21 dez. 2020.
56. ROSALY, V. et al. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**, n. figura 1, p. 77–85, 2006.
57. SAAD, C. et al. Imunobiológicos. In: **Livro da Sociedade Brasileira de Reumatologia**. Barueri: Manoele, 2019. p. 725–733.
58. SCHEINBERG, M. A. et al. Partnership for productive development of biosimilar products: perspectives of access to biological products in the Brazilian market. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 3, 17 set. 2018.
59. SCHEUER, W. et al. Strongly Enhanced Antitumor Activity of Trastuzumab and Pertuzumab Combination Treatment on HER2-Positive Human Xenograft Tumor Models. **Cancer Research**, v. 69, n. 24, p. 9330–9336, 15 dez. 2009.
60. SCHMID, A. S.; NERI, D. Advances in antibody engineering for rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 197–207, 27 abr. 2019.
61. SEPRIANO, A. et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2019 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 79, n. 6, p. 760–770, jun. 2020.
62. SHARMA, C. et al. A repertoire of high-affinity monoclonal antibodies specific to *S. typhi*: as potential candidate for improved typhoid diagnostic. **Immunologic research**, v. 62, n. 3, p. 325–340, jul. 2015.
63. SHEN, W. et al. Blocking Agent Optimization for Nonspecific Binding on Phage Based Magnetoelastic Biosensors. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 159, n. 10, p. B818–B823, 1 jan. 2012.
64. SHIM, H. Bispecific Antibodies and Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 360, 26 fev. 2020.
65. SHULMAN, M.; WILDE, C. D.; KÖHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v. 276, n. 5685, p. 269–270, nov. 1978.
66. SILVA-PILIPICH, N.; SMERDOU, C.; VANRELL, L. A Small Virus to Deliver Small Antibodies: New Targeted Therapies Based on AAV Delivery of Nanobodies. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1956, 15 set. 2021.
67. SMITH, G. P.; SCOTT, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. In: [s.l.: s.n.]. p. 228–257.
68. SUNADA, H. et al. Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 11, p. 3825–3829, jun. 1986.
69. TARANTINO, P. et al. Antibody–drug conjugates: Smart chemotherapy delivery across tumor histologies. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 2, p. 165–182, 12 mar. 2022.
70. TONG, J. T. W. et al. An Insight into FDA Approved Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5847, 27 set. 2021.
71. TUCKER, E. M. et al. Specific Bovine Monoclonal Antibody Produced by a Re-Fused Mouse/Calf Hybridoma. **Hybridoma**, v. 3, n. 2, p. 171–176, jan. 1984.

72. VAN CUTSEM, E. et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 14, p. 1408–1417, 2 abr. 2009.
73. VAN DER HORST, H. J. et al. Fc-Engineered Antibodies with Enhanced Fc-Effector Function for the Treatment of B-Cell Malignancies. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 3041, 19 out. 2020.
74. VAN LENT, J. et al. Miniaturized single-cell technologies for monoclonal antibody discovery. **Lab on a Chip**, v. 21, n. 19, p. 3627–3654, 2021.
75. WANG, B. et al. Optimization of therapeutic antibodies. **Antibody Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 45–54, 1 jan. 2021.
76. WANG, W.; SINGH, M. J. **Biological drug products : development and strategies**. 2014
77. WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317–327, maio 2010.
78. ZAHAVI, D.; WEINER, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. **Antibodies**, v. 9, n. 3, p. 34, 20 jul. 2020.

Parte V

Biotecnologia e o processo produtivo, regulatório e de farmacovigilância

Desafios da produção em larga escala

Maria de Lourdes M. Leal

Daniel André Ribeiro

Miguel Angel de la O Herrera

Ricardo da Costa Lopes

Carla F. Wolanski de Almeida

Felipe Leal da Silva

Este capítulo descreve a produção em larga escala de produtos biotecnológicos destinados à saúde humana e seus principais desafios. Assim, passa pela produção de ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) de vacinas e biofármacos em diferentes plataformas, ressaltando os desafios de escalonamento nas etapas de *upstream* e *downstream*, termos em inglês para a montante e a jusante, respectivamente. Também são exploradas a produção de reativos para diagnóstico e as etapas de processamento final, buscando proporcionar uma visão global das etapas produtivas abrangendo todos os tipos de produtos biológicos disponíveis no mercado (vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico).

11.1 A PRODUÇÃO DE INGREDIENTE FARMACÊUTICO ATIVO DE VACINAS E BIOFÁRMACOS

O ingrediente farmacêutico ativo (IFA) consiste no componente principal da formulação de um medicamento, ou seja, é a substância que promove o efeito pretendido do medicamento. Um processo biotecnológico industrial para produção de IFA, seja para produzir biofármacos ou vacinas, comumente é organizado em duas etapas com características específicas, conforme a Figura 11.1. Primeiramente, têm-se os processos que compreendem a etapa *upstream*, que pode ser desdobrada em subprocessos. O primeiro é a preparação do inóculo (expansão celular), no qual uma concentração inicial de microrganismos ou células eucarióticas será introduzida no biorreator a partir de um banco de células de trabalho (derivado do banco de células mestre). Também faz parte do *upstream* a preparação do meio de cultura, que consiste em misturar os diferentes componentes com os nutrientes

necessários para o cultivo por meio de um sistema de mistura sólido/líquido.

Um sistema deve ser projetado para distribuir o meio aos diferentes biorreatores ao longo da produção. O inóculo é introduzido no primeiro biorreator e, uma vez que o volume de cultivo adequado é obtido, ocorre a transferência de um biorreator para outro, aumentando o volume da cultura. Dentro do reator de produção, os microrganismos ou células sintetizam o produto desejado.

Uma vez que a quantidade de produto desejada é gerada no biorreator, na etapa de *downstream*, a recuperação e purificação do produto é realizada. O *downstream* inclui técnicas de separação sólido-líquido e líquido-líquido de vários tipos, com o objetivo de purificar e concentrar o produto. Deve-se considerar que, juntamente com o produto, outros componentes são gerados no biorreator, como células, restos dos componentes do meio, subprodutos e secreções das células e outros produtos específicos que sejam introduzidos no processo (p. ex., antiespumante, ligantes desprendidos de colunas cromatográficas etc.). A estratégia de separação

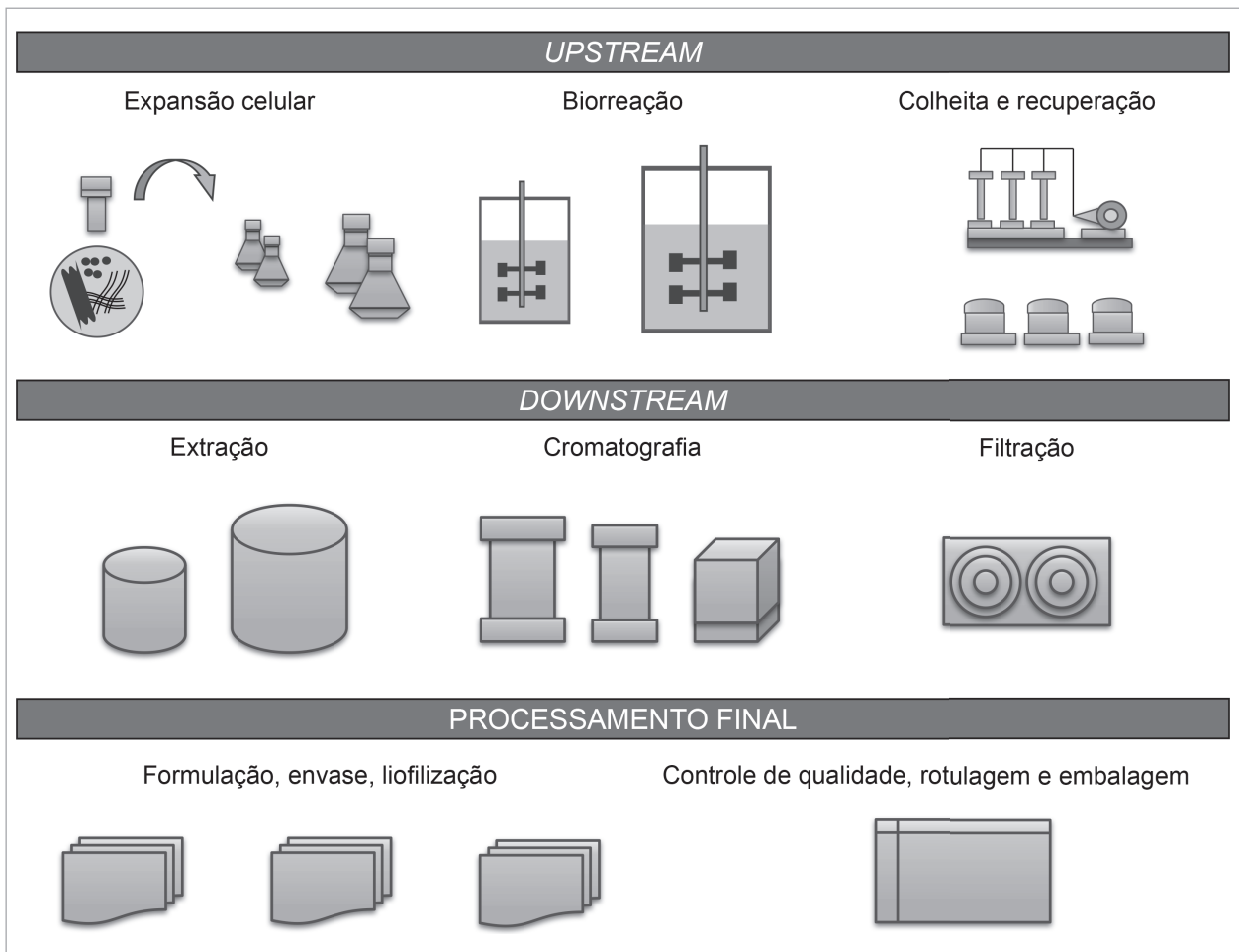


FIGURA 11.1 Exemplo de um processo industrial biotecnológico convencional.

é definida pelo local onde se encontra o produto a ser purificado (dentro ou fora da célula) ou se é a própria célula. Alguns exemplos de técnicas de separação utilizadas na indústria farmacêutica são apresentados no Quadro 11.1.

No caso específico de vacinas, existem 5 tipos principais: (i) vacinas vivas atenuadas; (ii) vacinas inativadas; (iii) vacinas de subunidade; (iv) vacinas de vetor viral; e (v) vacinas de ácido nucleico. Cada uma é projetada para preparar o sistema imunológico a combater certos tipos de patógenos que causam doenças graves. Quando as vacinas são desenvolvidas, existem premissas que precisam ser consideradas, como:

- Como o sistema imunológico responde à doença;
- Qual é o público-alvo que precisa ser vacinado para evitar a doença;
- A melhor tecnologia ou abordagem para criar, desenvolver e produzir a vacina.

Com base em alguns desses fatores, é decidido que tipo de vacina desenvolver. As operações unitárias para produção de vacinas são basicamente as mesmas utilizadas para produção de biofármacos, com exceção das vacinas virais atenuadas, que utilizam como etapa de *upstream* passagens do vírus por uma série de culturas de células ou embriões.

Portanto, este capítulo foi segregado em operações unitárias de *upstream*: produção de vacinas em ovos embrionários e produção em biorreatores; e *downstream*: ruptura celular e clarificação, cromatografia, ultrafiltração/diafiltração e filtração/inativação para redução de carga viral (no caso de processos para produção de biofármacos). Algumas indústrias consideram as etapas de ruptura celular e clarificação como etapas de *upstream*, uma vez que a equipe que atua nessas operações, normalmente, opera também nas etapas de biorreação e, por ainda haver contato com organismos vivos, no contexto deste livro, essas etapas serão consideradas como *downstream*.

QUADRO 11.1 Técnicas de separação na indústria farmacêutica

Técnica	Descrição
Filtração	A suspensão oriunda do biorreator passa através de um filtro de determinado tamanho de poro. Todos os materiais em suspensão ficam retidos no filtro (células, dedris celulares etc.).
Centrifugação	As células e os componentes sólidos são separados do meio de cultura por ação de um campo centrífugo.
Homogeneização	As células são lisadas e/ou rompidas para “liberar” o produto intracelular para posterior tratamento.
Ultrafiltração/ diafiltração	É utilizada principalmente para concentrar e condicionar o produto, troca de solução tampão, por exemplo.
Cromatografia	Técnica utilizada em biotecnologia para separação de proteínas e componentes solúveis, em geral, podendo ser por meio de diferentes princípios que exploram propriedades físico-químicas das moléculas: afinidade (p. ex., imunoafinidade, proteína A), troca iônica (catiônica ou aniônica), hidrofobicidade, exclusão por tamanho.

Estas operações serão descritas em mais detalhes por serem frequentes em processos de produção de IFA de vacinas e biofármacos. Portanto, em cada uma das operações, os principais pontos que podem afetar a performance do processo ao realizar o escalonamento serão destacados ao longo do capítulo.

11.2 DESAFIOS NA PRODUÇÃO DE INGREDIENTE FARMACÊUTICO ATIVO DE VACINAS E BIOFÁRMACOS

11.2.1 Operações de *upstream*

11.2.1.1 Produção de vacinas atenuadas em ovos embrionários

As vacinas virais vivas ou atenuadas podem ser produzidas de várias maneiras. Alguns dos métodos mais comuns envolvem a passagem do vírus causador da doença por uma série de culturas celulares ou embriões de animais (geralmente embriões de galinha). Nos embriões de galinha, o vírus cresce em diferentes embriões em série. A cada passagem, o vírus melhora sua replicação nas células do embrião, mas perde a capacidade de se replicar em células humanas. Os vírus que

serão utilizados em uma vacina podem ser cultivados (ou “passados”) em até 200 embriões ou culturas de células diferentes. Com o tempo, o vírus atenuado perderá a capacidade de se replicar corretamente (ou não) em células humanas, até que possa ser usado em uma vacina. Todos os métodos que envolvem a passagem de um vírus por um hospedeiro não humano produzem uma versão do vírus que, ainda, pode ser reconhecida pelo sistema imunológico humano, mas não pode se replicar adequadamente em um hospedeiro humano. Quando o vírus da vacina resultante é administrado a um ser humano, não será capaz de se replicar o suficiente para causar doenças, mas provocará uma resposta imune que pode proteger contra futuras infecções. Exemplos de vacinas produzidas com a tecnologia baseada em ovos são as vacinas contra os vírus da influenza. As vacinas de influenza podem ser inativadas ou atenuadas. Em relação a sua composição, podem ser trivalentes que protegem contra os vírus H1N1, H3N2 e influenza B ou tetravalente, que possui duas variantes de influenza B.

A vacina de influenza é uma vacina sazonal, sendo modificada anualmente, cuja formulação é baseada em um sistema de monitoramento da circulação do vírus Influenza. Assim sendo, os fabricantes possuem um desafio logístico e um cronograma crítico para produção.

A OMS informa, em fevereiro e setembro, quais são as cepas que deverão ser utilizadas na produção da vacina nos hemisférios norte e sul, respectivamente. A partir deste momento, os fabricantes têm um intervalo de 6 meses para fornecerem as vacinas.

A maioria das vacinas de influenza licenciadas são produzidas empregando a plataforma de ovos embrionados de galinha. Esta tecnologia foi desenvolvida em 1940, e os ovos de galinha são como minibioreatores operados paralelamente para replicação do vírus influenza (MILIÁN; KAMEN, 2015).

O processo se inicia com a inoculação do vírus H1N1 em embriões de galinha com 11 dias, e tem a duração de pelo menos 72h para que o vírus se multiplique. Após a incubação, realiza-se a colheita do líquido alantoico e segue-se para a etapa de purificação: centrifugação, concentração, fragmentação e inativação, totalizando 21 etapas. O material obtido é uma suspensão da vacina monovalente contendo somente uma cepa do vírus. Neste processo de produção com um ovo é possível produzir de duas a cinco doses de IFA; contudo, pode-se obter rendimentos mais elevados, dependendo do tipo de vírus (p. ex., mais de 200 doses por ovo). Posteriormente, são produzidos os lotes dos outros dois vírus e realiza-se a mistura das três suspensões para obtenção da vacina trivalente (BUTANTAN, 2021).

Embora essa tecnologia seja relativamente eficiente e com custo competitivo, possui limitações importan-

tes. O longo tempo de produção da vacina, desde o momento do fornecimento dos bancos semente dos vírus até a disponibilização da vacina, é entre 6 e 8 meses. Este período pode ser suficiente para que surjam novas variantes, acarretando incompatibilidade com a vacina. Além de mutações adaptativas do vírus semente, a replicação no tecido aviário também pode resultar em maior incompatibilidade com as cepas circulantes. Outro aspecto importante é o aumento de escala, considerando que o volume de doses está diretamente relacionado à quantidade de ovos. Os ovos são especiais (livres de patógenos específicos) e requerem uma cadeia de fornecimento cuidadosamente planejada e robusta. Assim sendo, o sistema de produção de ovos não pode ser ampliado rapidamente, por ser dependente de galinhas poedeiras, além de estar vulnerável ao risco de gripe aviária ou outros surtos de doenças aviárias que podem impactar o fornecimento de ovos embrionados de galinha (BECKER et al., 2021).

Com o intuito de superar as limitações do processo de produção a base de ovo, sistemas empregando cultivo de células de mamíferos ou de insetos vêm sendo utilizados na produção de vacinas comerciais para influenza. A produção de vacina viral em células cultivadas em biorreator possui expressivas vantagens, tais como: (i) maior flexibilidade; (ii) rapidez no processo de fabricação; (iii) ser escalonável; e (iv) não ser afetada pela escassez de ovos. Além disso, apresenta uma eficácia moderadamente maior para os idosos (CHEN et al., 2020). Um exemplo da comparação entre as duas tecnologias está descrito no trabalho de George et al. (2010), em que a vacina viva atenuada produzida em biorreator *single-use* de 30 L fornece 2,4 milhões de doses de vacina monovalente em uma única corrida de produção e para obtenção do mesmo volume de doses seriam necessários 4.000 a 8.000 ovos.

A seguir serão exploradas, em detalhes, as características em termo de escalonamento dos processos de fabricação baseado em células cultivadas em biorreatores.

11.2.1.2 Produção de biorreatores

Cabe distinguir a fermentação e a biorreação antes de discutir os desafios da operação em biorreatores. Na biotecnologia, a fermentação é o nome dado à produção industrial de biomassa, enzimas ou metabólitos, em geral, por meio do crescimento controlado de células, principalmente bacterianas, em biorreatores. Embora o termo “fermentação” seja usado, deve-se notar que, metabolicamente, as condições de cultivo são, na maioria dos casos, aeróbicas para obter o máximo desempenho de produção. A biorreação pode ser definida como um conjunto de práticas e procedimentos que permitem a manutenção de células dentro de um sistema inde-

pendente do tecido de origem da célula sob condições controladas. Normalmente, a biorreação abrange os cultivos de células animais, insetos, vegetais, dentre outros.

A regra básica para escalonamento de biorreatores para reduzir a probabilidade de queda na performance, é a manutenção dos parâmetros de escalabilidade, a saber: (i) a relação potência por volume (P/V) e tempo de mistura (T_m) que estão relacionados com a capacidade de agitação do sistema de biorreação; (ii) o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$); (iii) a velocidade tangencial da ponta da hélice do impelidor ($N \cdot D_i$, *tip speed*, onde N é a velocidade em rpm e D_i o diâmetro do impelidor); (iv) o regime de escoamento do fluido (número de Reynolds, Re) que, normalmente, é turbulento em biorreatores de tanque agitado; e (v) a manutenção das relações geométricas H/D (altura de trabalho pelo diâmetro do tanque) e D_p/D_t (diâmetro da pá pelo diâmetro do tanque), conforme pode ser visualizado na Figura 11.2 (MAHDINIA; CEKMECELIOGLU; DEMIRCI, 2019).

Contudo, além da variabilidade intrínseca de sistemas biológicos, não é possível manter todos os parâmetros de escalabilidade constantes entre as escalas. Por exemplo, se o *tip speed* for mantido constante, automaticamente, haverá alteração do P/V entre as escalas desproporcionalmente. Por isso a necessidade de realização de lotes experimentais para escalonamento de biorreatores e percepção de qual parâmetro de escalabilidade é mais apropriado para o sistema de cultivo. Os sistemas de distribuição de gases devem ser similares entre as escalas, ou seja, devem ser capazes de promover um tamanho padrão para as bolhas de gases, pois o tamanho das bolhas influencia na dissolução do gás no líquido e na integridade das células.

Por um lado, bolhas grandes têm menor relação área superficial/volume, resultando em uma menor taxa de dissolução do oxigênio e provocando o arrasto das células para o topo do biorreator, uma região onde as condições nutricionais são desfavoráveis para as células e, normalmente, há formação de espuma, acarretando morte celular. Por outro lado, bolhas muito pequenas, quando estouram, geram uma energia com potencial maior de provocar rompimento celular do que bolhas grandes. Portanto, a distribuição do tamanho das bolhas em um sistema de biorreação precisa ser otimizada e avaliada em cada novo sistema (AMER; FENG; RAMSEY, 2019; MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008; XU; CHEN, 2016). A Figura 11.2 mostra as relações geométricas entre biorreatores de diferentes escalas.

Em uma operação de biorreação o tipo de organismo (procarioto, eucarioto inferior e eucarioto superior) e a característica do produto (vacina ou biofármaco) influenciará no desempenho de um biorreator de diferentes

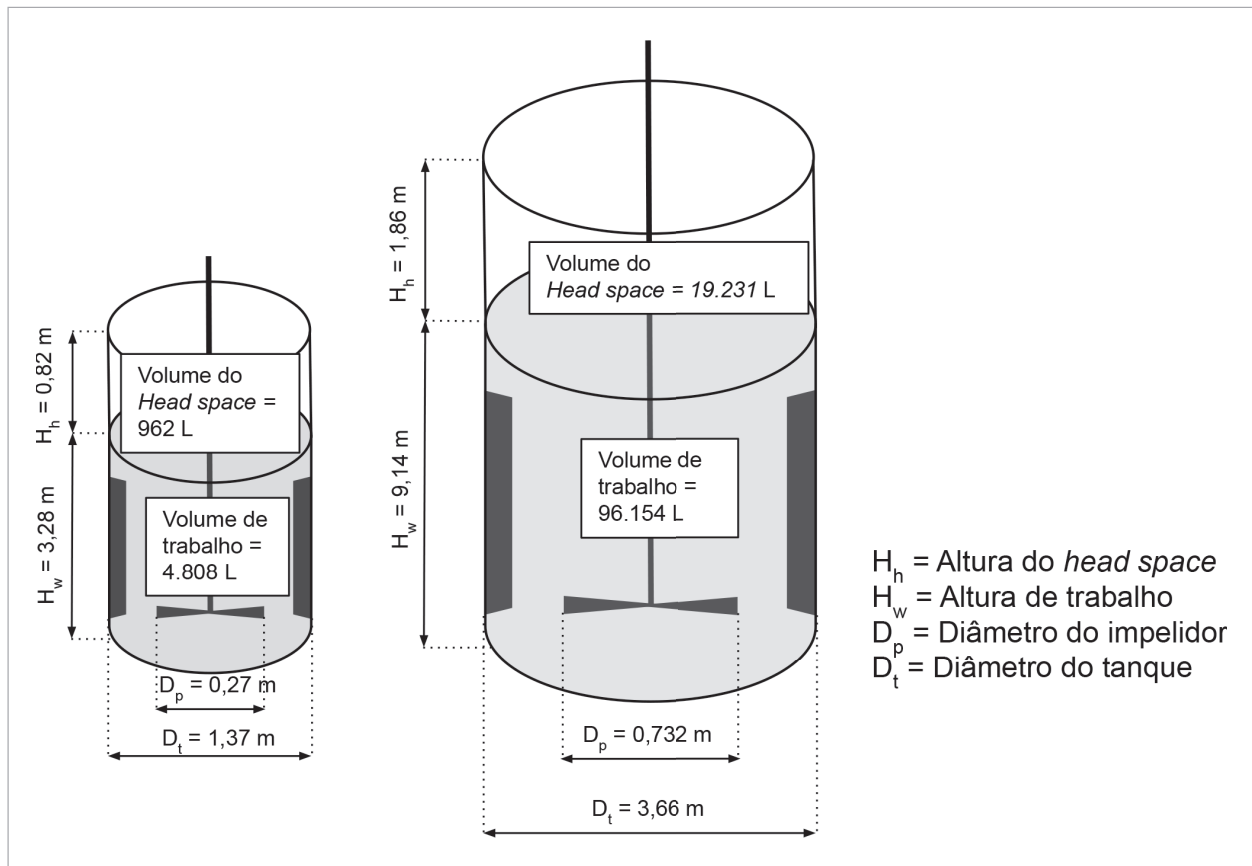


FIGURA 11.2 Relações geométricas entre biorreatores de diferentes escalas.

Fonte: adaptada de Mahdinia, Cekmecelioglu e Demirci (2019).

formas. Ao longo deste tópico, o desenvolvimento de processos de biorreação em larga escala será explorado com exemplos de produtos específicos e abordando diferentes organismos.

A vacina de pertussis celular utilizada para proteger contra coqueluche é um exemplo de vacina bacteriana inativada. Esta vacina é composta por uma suspensão da bactéria *Bordetella pertussis*, cocobacilo Gram-negativo, aeróbia estrita, morta por calor e/ou agentes químicos. É importante ressaltar que um elevado rendimento dos fatores de virulência por unidade de biomassa é sempre desejável, acarretando uma menor quantidade de lipopolissacarídeo por dose e, por consequência, menos eventos adversos. As vacinas são produzidas utilizando diferentes condições de cultivo e composições de meio de cultura que influenciam a taxa de crescimento, produção e degradação dos fatores de virulência, assim como a associação dos fatores de virulência nas células. No entanto, para alcançar elevados rendimentos no processo de produção de *B. pertussis*, em grande escala, além dos parâmetros clássicos de crescimento como temperatura e pH deve-se considerar a aeração, oxigênio dissolvido e

a velocidade do agitador, parâmetros essenciais durante o crescimento da bactéria em biorreator.

Geralmente, a produção industrial de *B. pertussis* tem início com passagem da bactéria em meio sólido (Bordet-Gengou) e posterior transferência para meio líquido, quimicamente definido, denominado de Stainer e Scholte (WHO, 1990). *B. pertussis* é uma bactéria aeróbia estrita e durante o cultivo em biorreator é possível alcançar uma aeração eficiente para seu crescimento e concomitante produção dos fatores de virulência. A aeração pode ser submersa (dispersão de ar na parte inferior do biorreator) ou superficial (na parte superior do biorreator – head space). Entretanto, o principal problema relacionado à aeração submersa é a tendência de *B. pertussis* flotar nas bolhas de ar e se acumular na superfície do biorreator, ocasionando a remoção da bactéria do contato com o meio de cultivo, resultando na interrupção do crescimento. Durante os estágios iniciais de crescimento, a demanda de oxigênio é baixa e adição de antiespumante contornaria este problema. Contudo, com o aumento da concentração de células demandando mais oxigênio o antiespumante

não é suficiente para controlar este fenômeno, além de ser uma substância que, em concentrações elevadas, causa inibição no crescimento da bactéria (SEKURA et al., 1994).

No trabalho desenvolvido por Shivanandappa et al. (2015) foi avaliada a aeração superficial com e sem formação de vórtex na produção em grande escala de *B. pertussis* (biorreator 500 L) empregando as mesmas condições de cultivo (300 L meio, 500 rpm, 16 L ar/min, controle de pH, 35,5°C em 48 h). Nos cultivos realizados sem formação de vórtex foram inseridas 4 chicanas diametralmente opostas no biorreator. O rendimento em biomassa obtido no cultivo com vórtex foi cerca de duas vezes maior comparativamente ao experimento na presença de chicanas e sem afetar as propriedades de virulência de *B. pertussis*. Na condição com vórtex ocorre um padrão de fluxo em forma de redemoinho na base do impelidor, melhorando o fornecimento de ar durante todo o cultivo. No cultivo com utilização de chicanas ocorre a formação de espuma que se acumula na superfície e influencia na formação de pequenas bolhas que circulam ao longo do líquido até a superfície, acarretando em esgotamento do oxigênio e aumento da pressão parcial de CO₂ podendo modificar o ciclo metabólico. O padrão do fluxo do meio com a presença das chicanas acarreta a redução da taxa de crescimento e eventual interrupção do crescimento de *B. pertussis* e redução da produção de biomassa final (Figura 11.3).

Outro exemplo de vacina produzida em biorreatores é o cultivo de microrganismo para produção de vacina bacteriana de subunidade (toxoides ou polissacarídeos). Os toxoides ou anatoxinas são toxinas bacterianas, secretadas pelo patógeno para o meio de cultivo, que após purificação, passam por tratamento físico ou químico, e

tornam-se inativas. Entretanto, este processo, denominado de destoxificação, mantém a imunogenicidade do antígeno necessária para que possa ser utilizado como vacina. Os exemplos clássicos desta aplicação são as vacinas contra tétano e difteria. Estas vacinas podem ser utilizadas, separadamente ou combinadas, com outras vacinas.

O tétano é uma doença causada pela bactéria *Clostridium tetani* (*C. tetani*), anaeróbica estrita e que forma esporos termoestáveis. O principal fator de virulência deste agente etiológico é a tetanoespasmina, neurotoxina responsável pelos sintomas do tétano.

As etapas de *upstream* e *downstream* para produção da anatoxina tetânica, até a liberação do resultado da destoxificação, requerem condições ambientais e de infraestrutura especiais. Como instalações segregadas, distante dos demais prédios da fábrica. Área de contenção biológica nível III, operação com pressão negativa em relação ao exterior e todo o ar que deixa essa área é incinerado.

O cultivo de *C. tetani* para produção comercial de anatoxina tetânica é realizado em biorreatores de grande capacidade em torno de 1.000 L. Originalmente, o meio de Mueller e Miller (M&M) utilizado para a produção da toxina continha na sua componente de origem animal, como caldo de infusão de cérebro e coração de boi. Por ser um meio complexo, ocorria uma grande variabilidade entre os lotes de produto. Para superar a variabilidade entre os lotes e evitar reações tóxicas e alérgicas, devido à presença de proteínas de origem animal, a OMS recomenda fortemente que os fabricantes de vacina cultivem o *C. tetani* em meio quimicamente definido de preferência. O meio de Latham é uma modificação do meio M&M sem componentes de origem

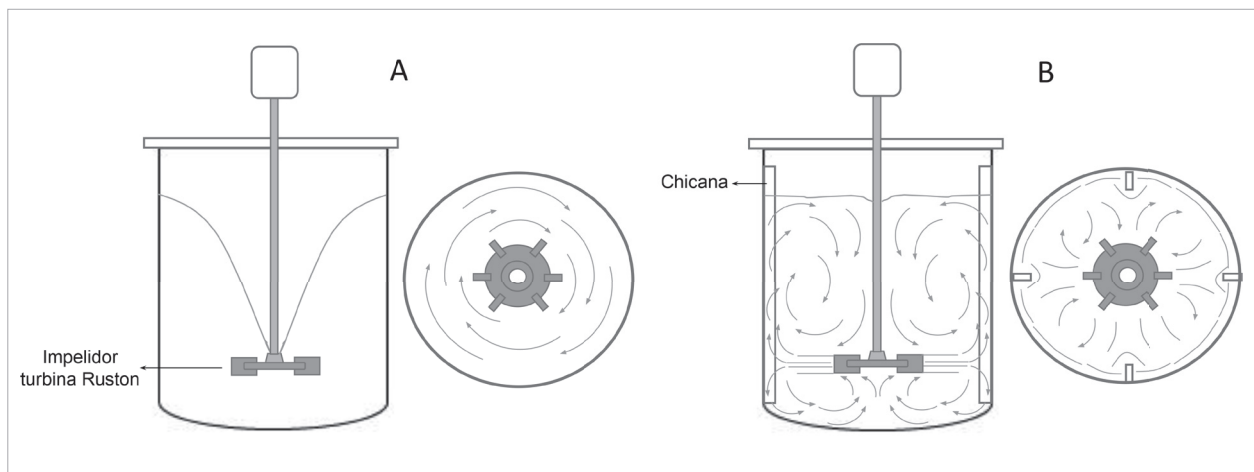


FIGURA 11.3 (A) Escoamento em redemoinho (formação vórtex); (B) Escoamento radial para impelidor tipo turbina Ruston em tanque com chicana.

Fonte: adaptada de Schmidell e Junior (2021).

animal amplamente empregado no cultivo de *C. tetani* (PLOTKIN; ORENSTEIN; OFFIT, 2013).

Alguns aspectos importantes devem ser considerados durante o cultivo de *C. tetani*. Por exemplo, a formação de gases provenientes do metabolismo microbiano que se acumulam no *head space* do biorreator e a homogeneização do cultivo.

Dentre os gases produzidos, o H_2S é tóxico para bactéria e afeta a produção da toxina tetânica. Portanto, a taxa de exaustão dos gases é uma variável de extrema relevância neste bioprocesso. Três estratégias podem ser utilizadas para mitigar esta questão: (i) o fornecimento contínuo de ar estéril para retirar os gases, que alcançam o espaço livre no biorreator acima do cultivo; (ii) a utilização de fornecimento periódico de N_2 por borbulhamento que além de expulsar os gases oriundos da fermentação mantém o ambiente em anaerobiose, ocasionando um aumento no rendimento da toxina quando comparado com o cultivo sem adição deste gás; e (iii) o borbulhamento de N_2 durante a fase de crescimento e, posterior, insuflamento superficial de ar. A terceira estratégia pode ser considerada a mais adequada porque após a *lise* da bactéria, além da liberação da toxina, também ocorre liberação de enzimas proteolíticas que decompõem parte da toxina e o oxigênio presente no ar é responsável pela inibição destas enzimas (LUCA et al., 1997; VAN HEMERT, 1974).

A homogeneização do cultivo deve ser realizada suavemente, sem que ocorra a incorporação de gases do metabolismo. O tipo de agitador empregado na produção da toxina tetânica é denominado de vibromixer ou vibromisturador, trata-se de um agitador eletromagnético, que gera uma vibração vertical transmitida para uma placa perfurada com furos cônicos sem que ocorra

rotação. O agitador move-se verticalmente a uma taxa de 50 vezes (50 Hz) ou 60 vezes (60 Hz) por segundo, e pode ser ajustada de acordo com o nível de produção de gases durante a fase exponencial. Essa vibração faz o bombeamento do líquido verticalmente, a direção depende se a parte estreita dos cones estiver apontada para cima ou para baixo (Figura 11.4).

A biossíntese da toxina está relacionada ao crescimento robusto da bactéria. A lise da bactéria e a liberação da toxina para o meio estão diretamente relacionados aos fatores, como: (i) agitação pelo vibromixer; (ii) suprimento ideal de ar; (iii) pH; e (iv) temperatura (Muniandi et al., 2013).

A produção das vacinas polissacarídicas e das conjugadas têm início com o cultivo das bactérias encapsuladas. A fermentação para obtenção de polissacarídeo capsular é realizada em biorreatores de aço inox.

As condições de cultivo, os parâmetros de processo e de escalonamento da etapa de *upstream* estão relacionados às características de cada patógeno, se aeróbio (*Hib*), microaeróbio (*meningococo*) ou anaeróbio facultativo (*pneumococo*). Estas bactérias são nutricionalmente exigentes, geralmente são cultivadas em meios semisintéticos, cuja composição seja capaz de contemplar o crescimento e a formação de polissacarídeo capsular, seguindo a recomendação da OMS de não utilização de componentes de origem animal na composição dos meios de cultivo devido à encefalite espongiiforme bovina. Um aspecto importante a ser considerado é o momento ideal para colheita do cultivo, que deve ser avaliado de acordo com o meio e os parâmetros de processo utilizados. É importante ressaltar que o tempo de fermentação em que se obtém um maior rendimento em biomassa não é, necessariamente, o mesmo para produção de polis-

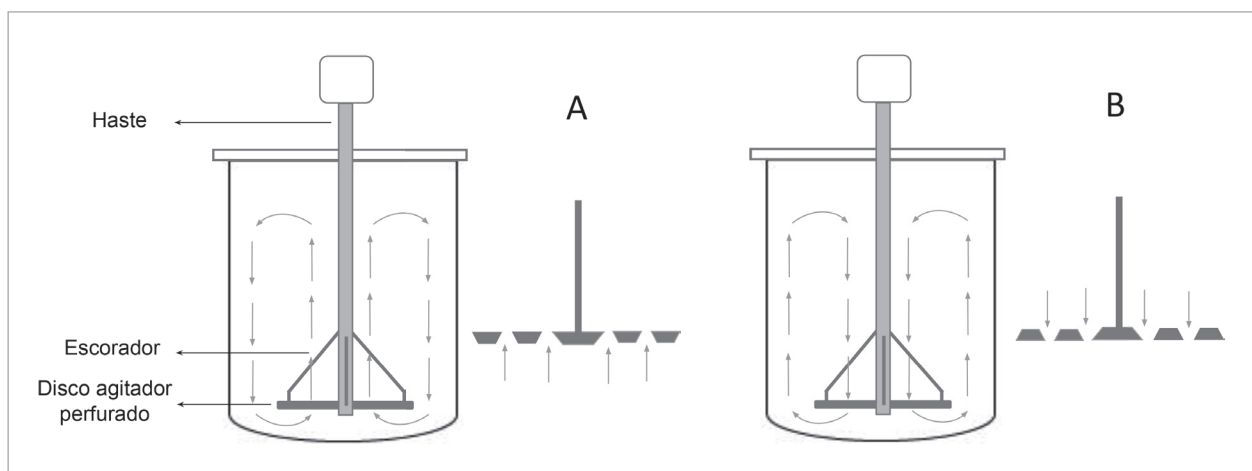


FIGURA 11.4 Diagrama esquemático do vibromisturador no interior do biorreator. A: Sentido do fluxo do meio para cima; B: sentido do fluxo do meio para baixo.

Fonte: adaptada de DRM (2023) e Muniandi et al. (2013).

sacarídeo com peso molecular elevado necessário para indução de resposta imunológica.

De maneira geral, os sistemas de biorreação rígidos, também conhecidos como aço inox, são comumente utilizados para produção industrial biotecnológica na plataforma bacteriana, porque os parâmetros de operação necessários para promover o metabolismo dos microrganismos podem ser mantidos facilmente. Os biorreatores descartáveis (*single use*) têm muitas vantagens para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, como: (i) rápida implementação do sistema; (ii) maior flexibilidade de tamanho; (iii) infraestrutura necessária reduzida; (iv) mínimo risco de contaminação cruzada; e (v) requisitos mínimos de manutenção. No entanto, a maioria das aplicações está restrita para cultura de células animais, poucos equipamentos estão disponíveis para fermentação bacteriana de alta densidade devido à dificuldade de manter parâmetros como transferência de oxigênio, calor e agitação. Ainda assim, vários fabricantes estão empenhados a vencer essas limitações desenvolvendo sistemas descartáveis para fermentação que possam ser utilizados em grandes volumes a nível industrial.

Os eucariotos superiores são naturalmente organismos mais complexos e geram desafios específicos no desenvolvimento de processos de produção em larga escala, em relação às etapas de cultivo celular e clarificação (operações de separação sólido-líquido, como centrifugação e filtração). Para estas etapas, um dos maiores desafios no aumento de escala é manter os níveis de expressão, características do produto (cultivo celular) e a integridade das células (cultivo celular e clarificação). Esta seção será dedicada às etapas de cultivo de células e a clarificação será abordada na parte de *downstream*.

Com relação às etapas de cultivo celular, o primeiro passo é a expansão do inóculo até que se alcance a quantidade de células necessária para inocular o biorreator de produção. As células eucarióticas, de maneira geral, possuem um crescimento mais lento e, consequentemente, atingem níveis de concentrações celulares menores do que os observados em cultivos de células procarióticas. Diferentemente de cultivos microbianos cuja concentração é expressa em massa seca de células por volume, nos cultivos de células animais utiliza-se a quantidade de células por volume. Isso implica passos adicionais de expansão celular até o inóculo do biorreator de produção.

Por exemplo, a concentração celular, normalmente, utilizada para inocular uma etapa de cultivo de células animais é de $0,2-0,5 \times 10^6$ cel/mL e o tempo médio de duplicação das células está em torno de 24 horas. Portanto, a quantidade de etapas na expansão do inóculo depende do nível de concentração alcançável (fase exponencial mais curta ou mais longa) e do volume do

biorreator de produção. Vale ressaltar que a inoculação de uma etapa de expansão ocorre quando as células estão na fase média-final da curva exponencial, antes de alcançar a fase estacionária. O início do processo de expansão celular é comum para todas as escalas (parte do descongelamento de um criotubo de 1-2 mL); e o ideal é manter um padrão com relação aos sistemas de frascos de cultivo (aderente ou em suspensão), tipos de biorreatores (tanque agitado, tipo *wave* ou onda, leito empacotado etc.). Mudanças no modo de operação, tipo de biorreator ou utilização de tipos diferentes de biorreatores ao longo das etapas de expansão podem ser realizadas. Para tanto, é necessário avaliar os parâmetros de crescimento em testes de escalonamento, pois a alteração do tipo de biorreator e modo de operação podem influenciar na dinâmica de crescimento das células (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

No caso de biorreatores de produção, a performance está atrelada não somente ao comportamento da célula em termos de crescimento e viabilidade, mas também ao nível de expressão e qualidade da proteína de interesse, no caso de ingrediente farmacêutico ativo de biofármacos (WURM, 2004). A qualidade da proteína está relacionada com a manutenção dos atributos críticos de qualidade (CQA, do termo em inglês, *Critical Quality Attributes*).

Um exemplo de atributo crítico de qualidade é o perfil/padrão de glicosilação de uma proteína recombinante, que pode ser afetado pela condição de cultivo das células, como disponibilidade de nutrientes, pH, osmolaridade, agitação (estresse hidrodinâmico) etc. (KONTORAVDI; JIMENEZ DEL VAL, 2018; ZHANG et al., 2016). Mudanças nas condições de cultivo podem afetar a performance do processo, principalmente por influência do aumento da tensão de cisalhamento a que porventura as células possam ser submetidas, do grau de homogeneização dos nutrientes do meio de cultivo e da disponibilidade de oxigênio (MAHDINIA; CEKMECELIOGLU; DEMIRCI, 2019; MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Considerando o cultivo de células animais, mesmo utilizando-se um meio de cultivo otimizado na fase de desenvolvimento e os mesmos parâmetros (pH, temperatura e nível de oxigenação) para uma determinada linhagem celular, alterações de escala, de tipo de biorreator (rígido vs. *single-use*) e modo de operação podem alterar as taxas de cisalhamento das células, influenciando na performance do cultivo. Maior taxa de rompimento celular pode modificar o perfil proteico do sobrenadante, interferindo na performance das etapas de purificação desenvolvidas para uma característica de sobrenadante e nível de produção específicos.

Com relação aos diferentes modos de operação de biorreatores para células animais em suspensão, existem

4 principais modos: batelada, batelada alimentada, contínuo e contínuo em perfusão (com reciclo celular), como pode ser visualizado na Figura 11.5.

O principal desafio para o aumento de escala está relacionado com a complexidade de operar um determinado sistema. A complexidade aumenta do modo em batelada para o modo contínuo em perfusão. A operação em modo contínuo precisa de um nível maior de automação e um monitoramento/controlado mais rigoroso por operarem por um longo período, além da necessidade de um dispositivo que opere com um grau alto de retenção celular, sem danificar as células, sem alterar o padrão de glicosilação (p. ex., células submetidas a estresse em termos de oxigenação e nutrição refletem efeitos na síntese proteica) e sem reter o produto de interesse. Outra questão importante com relação a processos contínuos é a necessidade de fornecimento de elevado volume de meio de cultura, uma vez que o biorreator é alimentado constantemente. Isso pode ser um fator limitante no aumento de escala desse tipo de processo (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Continuando na abordagem de células eucarióticas, a otimização e escalonamento de operações de expansão celular e produção de biológicos utilizando-se células vegetais seguem os mesmos princípios das premissas utilizadas para o cultivo de células animais. A expressão de proteínas em células vegetais é intracelular, distinguindo da expressão em células animais. Necessita de etapas de rompimento celular para liberação da proteína de interesse, semelhante às operações adotadas para microrganismos, porém são consideradas etapas de *downstream* e serão abordadas nos próximos tópicos.

As células vegetais, quando cultivadas em suspensão, exigem um nível de controle menor do que as células animais, pois são mais robustas no que tange às condições de processo (manutenção de parâmetros de processo). Adicionalmente, são sensíveis a tensões de cisalhamento, apesar da presença de parede celular em células vegetais, exigindo sistemas de agitação sem impelidores. A principal preocupação no escalonamento de biorreatores para cultivo de células vegetais está na transferência otimizada do oxigênio dissolvido para o meio. O primeiro e – até o momento da concepção deste livro – único biofármaco aprovado para uso humano produzido em células vegetais é a alfataliglicerase, cujo processo de biorreação é realizado em biorreatores *single-use* que possuem apenas um sistema proprietário de distribuição de gases na base do biorreator que tem a função de fornecer o oxigênio e ao mesmo tempo promover a mistura do meio contendo as células (biorreator tipo coluna de bolhas).

Os biorreatores foram projetados para permitir a remoção do excesso de ar e gases residuais. Não há necessidade de controle de temperatura e monitoramento on-line do pH durante o cultivo, e o escalonamento é vertical até 800 L e depois horizontal. Ou seja, até 800 L utilizam-se biorreatores com volumes diferentes e depois aumenta-se a quantidade de unidades de biorreatores de 800 L. A bolsa de cultivo pode ser utilizada por vários ciclos, pois, após a colheita, parte do volume de cultivo permanece no biorreator e serve como inóculo da próxima batelada, até um limite definido por procedimentos de validação de processo. Esse modo de operação também é conhecido como batelada rea-

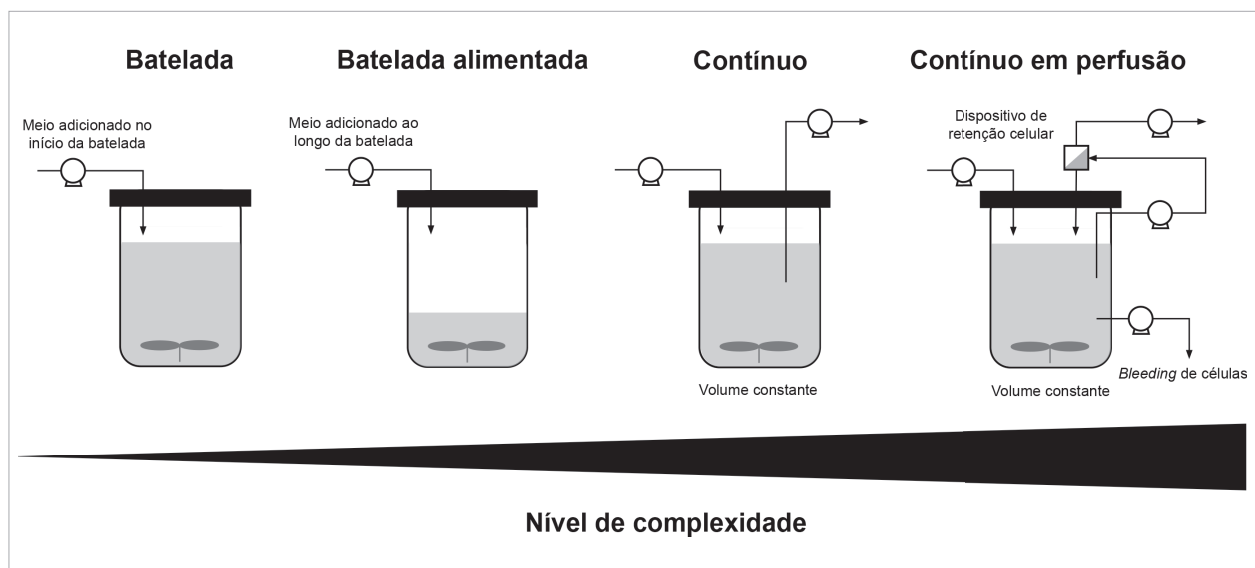


FIGURA 11.5 Modos de operação de biorreatores correlacionados com o nível de complexidade.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

limentada, sendo uma opção para escalonamento de processos em batelada onde existe uma limitação de área física (TEKOA et al., 2015).

Finalmente, após recuperação do produto gerado durante a biorreação, é necessário realizar operações de preparo para os lotes seguintes. Quando o sistema de biorreação utilizado é um sistema rígido ou comumente chamado de aço inox, o sistema tem que passar por uma série de procedimentos de higienização e esterilização. Essas ações são realizadas com o intuito de garantir as boas práticas de fabricação (BPF), além de manter as condições de assepsia que vão evitar potencial contaminação de lotes posteriores. No entanto, se o dispositivo utilizado para a biorreação é um sistema descartável (*single-use*), após a conclusão do processo de biorreação, a bolsa utilizada é retirada do suporte do equipamento e será descontaminada com o uso de uma autoclave. A bolsa é descartada respeitando a legislação ambiental e de boas práticas de fabricação.

11.2.2 Operações de *downstream*

As principais operações utilizadas nas etapas de *downstream* para produção de vacinas e biofármacos são: (i) homogeneização à alta pressão (para rompimento celular, produto intracelular); (ii) centrifugação; (iii) filtração em profundidade (para clarificação); (iv) a cromatografia; e (v) filtração tangencial (para purificação, condicionamento e concentração do produto). A microfiltração, com membrana de 0,22 µm, faz parte de praticamente todos os processos de *downstream* para produção de biofármacos e vacinas.

No caso específico de biofármacos produzidos por células animais, etapas de nanofiltração e inativação para redução de carga viral são largamente utilizadas nos processos produtivos devido a questões regulatórias. Além dessas operações específicas, as etapas cromatográficas também são utilizadas para redução de carga viral. Em processos mais antigos, apenas etapas cromatográficas eram validadas para redução de carga viral; após o estabelecimento do ICH Q5A – *viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin* (liberado para consulta pública em 1995) – etapas exclusivas para remoção de vírus foram adicionadas aos processos. A Figura 11.6 destaca as operações de redução de carga viral em processos de biofármacos (identificados de forma genérica) aprovados por agências regulatórias como *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA).

As etapas de *downstream* são, de maneira geral, menos susceptíveis a variações no escalonamento do processo por não conter organismos vivos, pois são

removidos nas etapas de clarificação, ou pelo fato de a viabilidade celular não ser preponderante para o sucesso da operação. Em relação às operações de *downstream*, os desafios estão atrelados à manutenção da estabilidade da molécula, harmonização entre rendimento e níveis de pureza. Em síntese, na manutenção da performance do processo nas diferentes escalas para suportar a robustez do processo.

Um exemplo de processo de purificação, a partir de organismo procarioto, é a toxina tetânica, produzida por bactéria e utilizada como vacina contra o tétano. Após a etapa de fermentação, a colheita da toxina é realizada por filtração, seguida das etapas de purificação e destoxificação com formaldeído e glicina ou lisina. A adição do aminoácido promove reações de *cross-linking* entre os grupamentos aminos, evitando a reversão da toxicidade. A anatoxina somente é liberada após aprovação no teste de toxicidade em animais.

Alguns fabricantes realizam a destoxificação da toxina bruta antes da purificação para aumentar a segurança do processo. A desvantagem desta metodologia são as reações químicas entre a toxina e substâncias presentes no meio, obtendo-se uma anatoxina com menor grau de pureza antigênica. A Figura 11.7 exemplifica duas possibilidades de purificação e destoxificação da toxina tetânica.

Outro exemplo de processo de *downstream*, a partir de organismo procarioto, é a produção de vacinas polissacarídicas. O método tradicional de purificação de *PSC* (polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* grupo C) é realizado por extrações fracionadas com etanol e fenol para remoção de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente. No caso das bactérias Gram-negativas como meningococo e Hib, é necessária uma etapa de ultracentrifugação para retirada de endotoxina (LPS). Na Figura 11.8 está apresentado um fluxograma do processo tradicional de purificação de *PSC* de *N. meningitidis*, desenvolvido por Gotschlich et al., (1969). Esta abordagem foi utilizada na produção de vacinas meningocócicas polissacarídicas grupos A e C em meados da década de 1970, no Brasil. A estratégia de purificação descrita possui uma longa duração e apresenta as seguintes etapas inconvenientes para produção em larga escala: o manuseio de grande quantidade de etanol que requer uma área à prova de explosão, a utilização de fenol, substância tóxica que constitui riscos à saúde e ao meio ambiente e, finalmente, a etapa de ultracentrifugação, que não é compatível para processar expressivos volumes, sendo necessária a utilização de muitos equipamentos e, portanto não sendo escalonável (PATO; DE PÁDUA R. BARBOSA; DA SILVA JUNIOR, 2006). No Quadro 11.2 pode-se observar algumas estratégias de purificação de polissacarídeos capsulares.

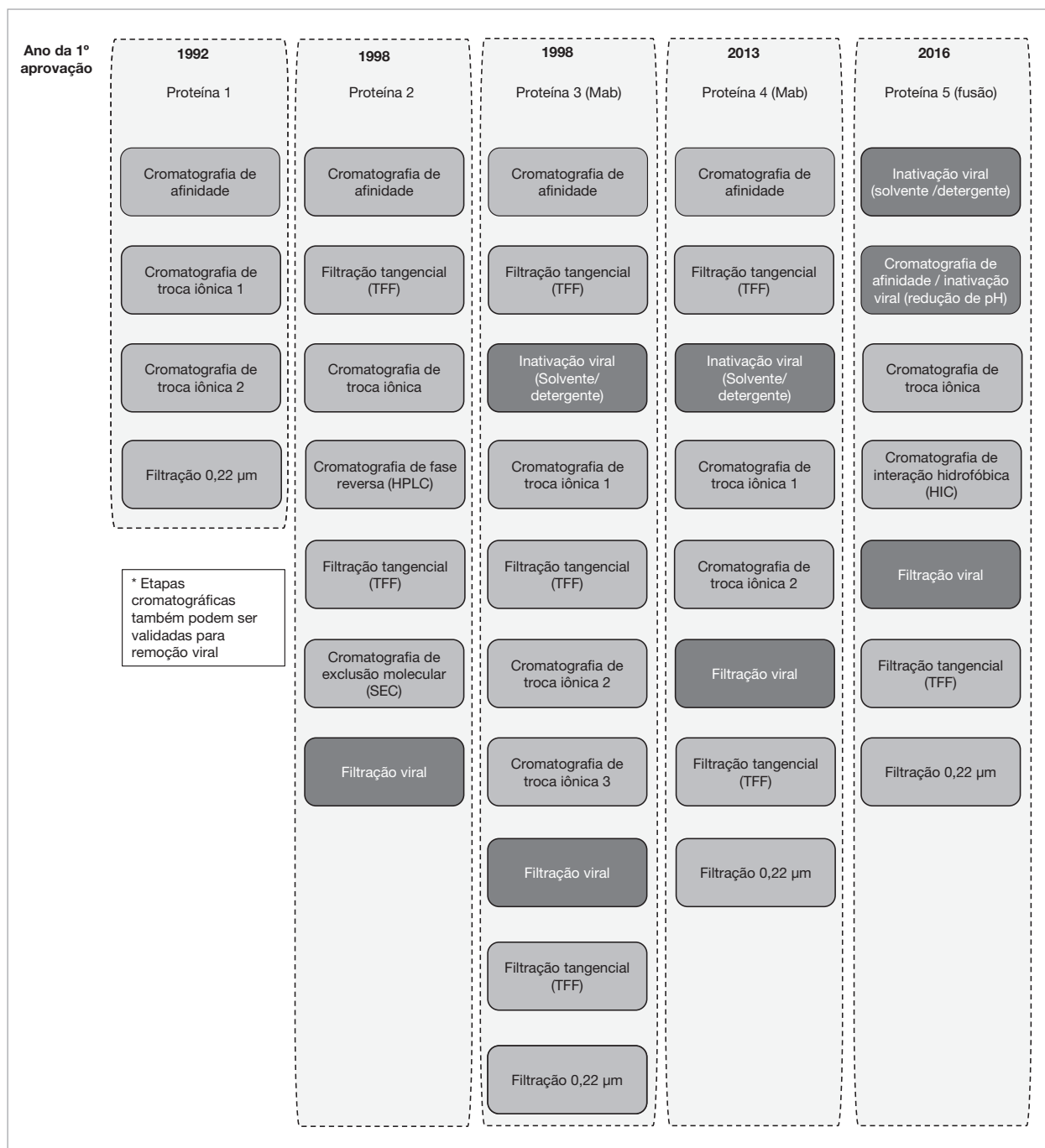


FIGURA 11.6 Exemplos de processos de purificação, após clarificação, de biofármacos aprovados por agências regulatórias como *Food and Drug Administration (FDA)* e *European Medicines Agency (EMA)*.
Fonte: elaborada pelos autores, com base em Gomperts, Lundblad e Adamson (1992).

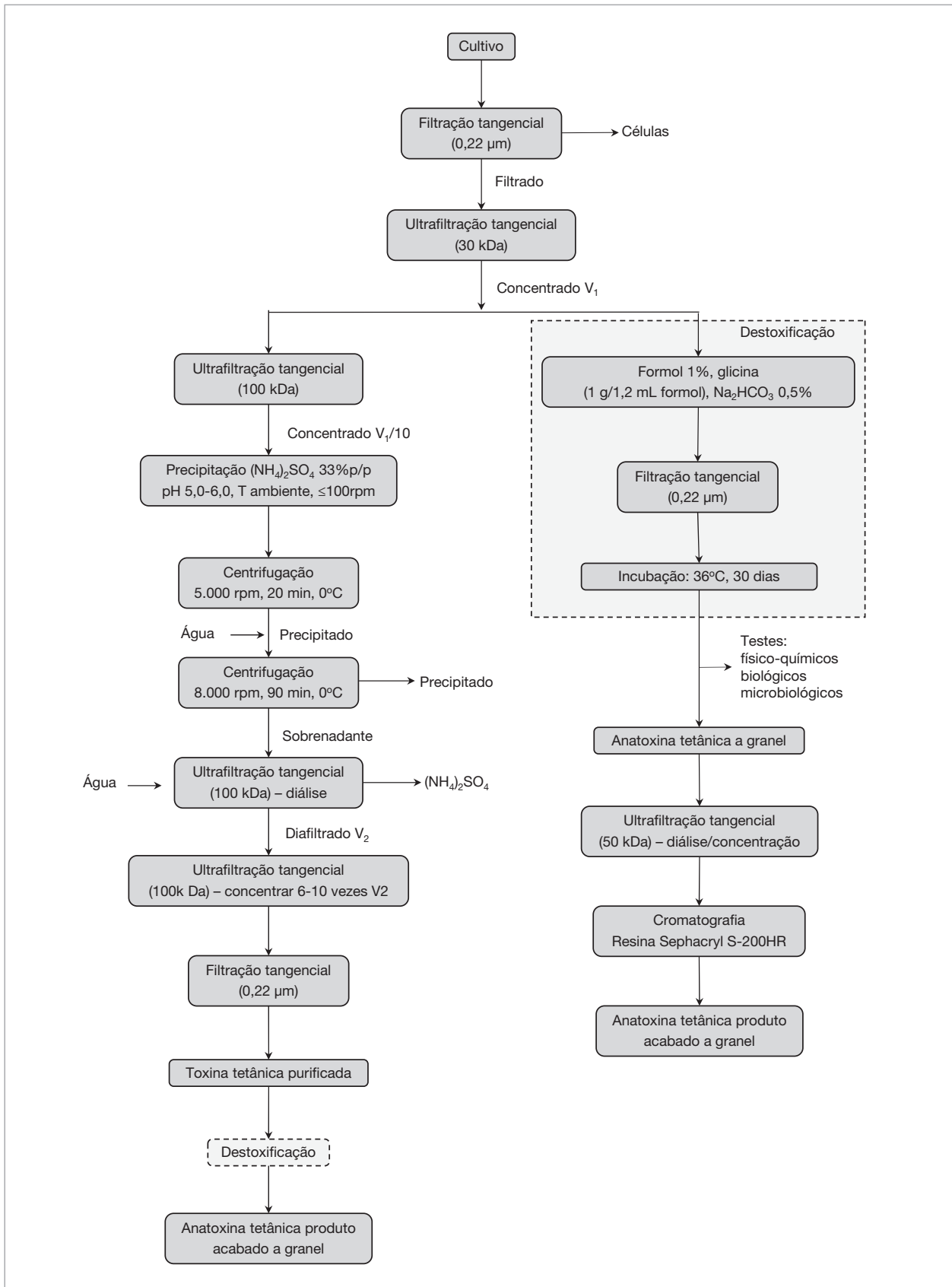


FIGURA 11.7 Fluxograma do processo de obtenção da anatoxina tetânica após etapa de fermentação. Fonte: adaptada de Prado (2008).

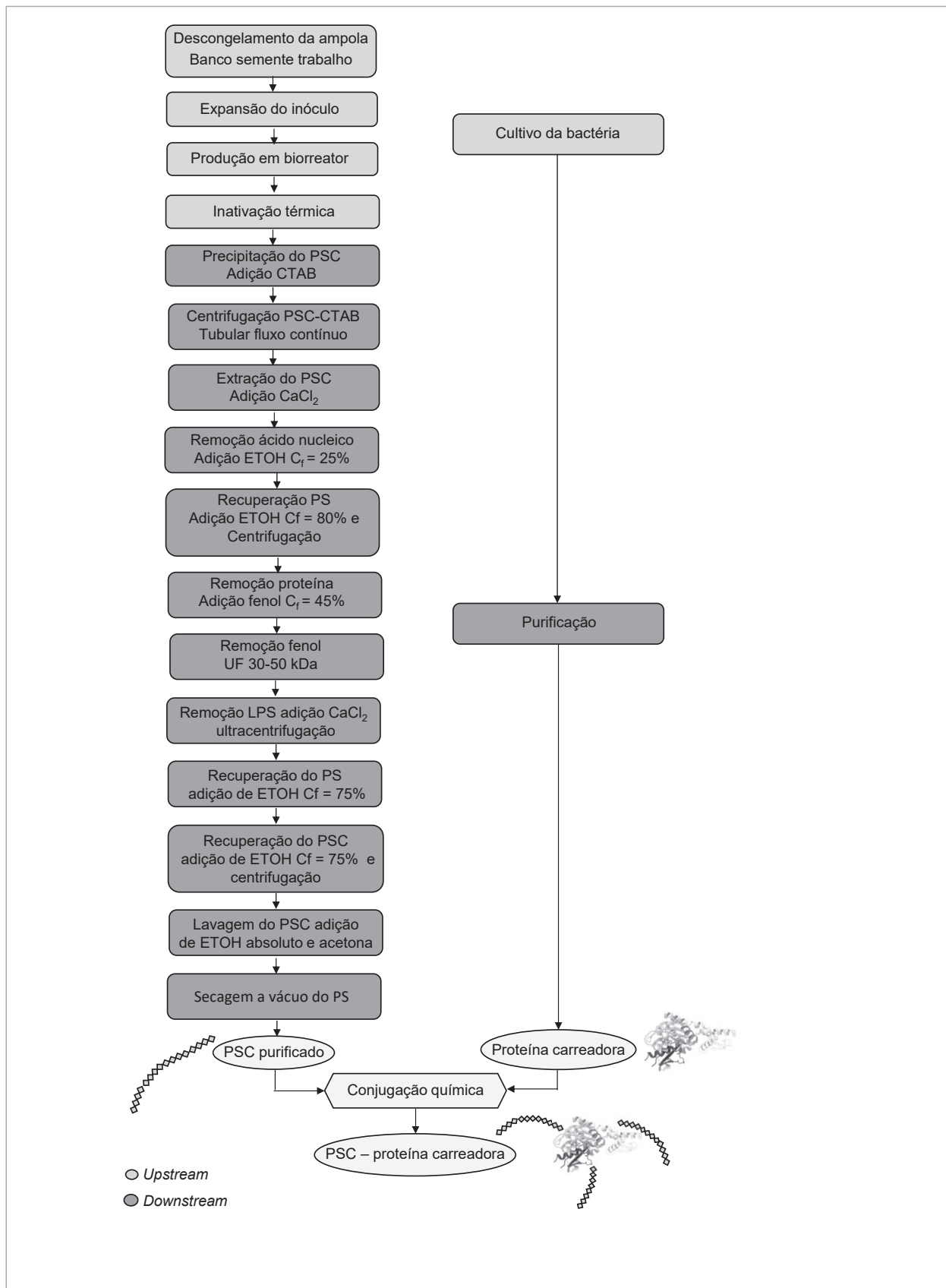


FIGURA 11.8 Representação esquemática da produção de obtenção de vacina polissacarídica conjugada. Fonte: elaborada pelos autores (2023).

QUADRO 11.2 Estratégias alternativas para purificação de polissacarídeos capsulares

Substituição	Objetivo	Metodologia alternativa	Referência
Etanol Cf = 25% Fenol Ultracentrifugação	Remoção de moléculas carregadas negativamente como DNA, endotoxinas e proteínas da célula da própria bactéria	Terra diatomácea como assistente de filtração empregando soluções de lavagem (retirada de contaminantes) e extratoras (coleta do PSC) baseadas na condutividade	Liveyns et al., 1989 (EP 0072513 B1)
		Filtros de carvão ativado carregados positivamente, previamente tratados com tampões adequados para não adsorver o PSC que na sua grande maioria são negativos	Constantino, 2011 (EP 2 277539 A2)
		Adição DOC, cromatografia com sequência de resinas trocadoras forte (Capto adhere) e fraca (Capto DEAE) de ânions e cromatografia de exclusão molecular	GE Healthcare, 29216880, 2016
		Adição de DOC seguido de ultrafiltração, cromatografia de troca aniônica (Source 15Q) e exclusão molecular (Sephacrose CL-4B)	Pato et al., 2006

DOC: desoxicolato de sódio; PSD: polissacarídeo capsular.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Os polissacarídeos produzidos devem atender às especificações preconizadas nos guias da OMS que contemplam uma série de testes analíticos quantitativos, caracterizações físico-químicas e biológicas. Estes biopolímeros são os ingredientes farmacêuticos ativos das vacinas polissacarídicas e insumos para as vacinas conjugadas.

Na etapa de conjugação utilizam-se PSC que passam por um tratamento de redução de tamanho utilizando métodos químicos (periodato de sódio) ou físicos (microfluidizador). É importante ressaltar que apesar de estar descrito em patente, o ultrassom não deve ser utilizado por não ser passível de escalonamento. Após a redução de tamanho, ocorre a introdução de grupamentos funcionais no PSC ou na proteína, que sejam adequados para reação de conjugação. Os métodos mais utilizados para produção de conjugados são: método da carbodiimida (EDAC), aminação redutiva e o método de CDAP (1-ciano-4-dimetilaminopiridina tetraflourobato). A produção do conjugado em grande escala ocorre em reator químico com controle de velocidade de agitação, pH e temperatura. Na etapa de purificação utiliza-se TFF (UF/DF), sigla em inglês para filtração de fluxo tangencial (ultrafiltração/diafiltração), para remoção de subprodutos da reação e polissacarídeos não conjugados. O escalonamento da TFF é linear com base na área da membrana e na carga de produto (BASTOS et al., 2015). Uma alternativa é a utilização de técnicas cromatográficas como exclusão molecular; entretanto, ocorre a diluição do produto exigindo uma etapa posterior para concentrar o produto.

A produção de vacina de RNAm é realizada em três etapas: produção DNA plasmidial (pDNA), produção

do RNAm e seu encapsulamento em nanopartículas lipídicas (LNP). Nos Quadro 11.3 e Quadro 11.4 pode-se observar o fluxo de cada uma dessas etapas e seus respectivos objetivos.

Alguns dos principais desafios na produção em larga escala de pDNA e RNAm estão relacionados com a recuperação de pDNA com elevados rendimentos. Não é uma tarefa simples essa recuperação devido ao seu tamanho, sensibilidade ao cisalhamento e semelhança com alguns contaminantes. Na etapa de clarificação, as técnicas utilizadas devem ser capazes de trabalhar com suspensões altamente viscosas. A etapa de concentração e diafiltração por filtração de fluxo tangencial (TFF) deve ser realizada em condições de baixo cisalhamento. Por exemplo, baixa TMP (pressão transmembrana) e um estudo detalhado sobre o tamanho ideal do poro e a interação do pDNA com a membrana. No polimento deve-se utilizar técnicas que sejam sensíveis para separar isoformas de plasmídeo.

Diversos aspectos precisam ser considerados para o escalonamento do processo de fabricação de RNAm e devem ser priorizados durante o desenvolvimento de processos (pequena escala). Neste sentido, deve-se substituir métodos que não sejam escalonáveis, mesmo que funcionem muito bem em pequena escala, e que também não são compatíveis para produção em BPF (Boas Práticas de Fabricação), como, por exemplo, extração por solventes e precipitação e o uso de solventes perigosos. Além disso, o RNAm pode ser degradado por Rnases, em segundos. Desta forma, todas as matérias-primas, soluções e equipamentos que entram em contato com o produto devem estar livres dessas enzimas. Adicionalmente, pode-se fazer uma seleção cuidadosa do sistema

QUADRO 11.3 Etapas do processo de produção de pDNA

Etapa	Objetivo
(i) Expansão celular e produção	Cultivo de células do hospedeiro, geralmente <i>E. coli</i> , para produzir milhões de cópias de pDNA
(ii) Colheita das células	Separação das células do meio de cultivo
(iii) Lise das células	Liberação do pDNA das células
(iv) Clarificação	Remoção de resíduos celulares e impurezas
(v) Concentração e diafiltração I (UF/DF)	Concentração de pDNA (UF), remoção de contaminantes (moléculas pequenas) e etapas de troca de tampão (DF)
(vi) Captura	Remoção da maioria dos contaminantes e impurezas ao mesmo tempo que concentra pDNA (isolamento pDNA sem restrição de tamanho)
(vii) Polimento	Separação de isoformas de pDNA, geralmente para isolar o pDNA superenrolado (SC) do DNA circular aberto e linear. O pDNA SC é a forma mais estável, eficiente e biologicamente ativa
(viii) Concentração e diafiltração II (UF/DF)	Concentração de pDNA (UF), remoção de contaminantes (moléculas pequenas) e etapas de troca de tampão (DF)
(ix) Filtração estéril	Prevenção à contaminação microbiana e garantir a segurança do paciente

Fonte: elaborado pelos autores com base em Sartorius (2023) e Vergauwen et al. (2022).

QUADRO 11.4 Etapas do processo de produção de RNAm e encapsulamento em LNPs

Etapa	Objetivo
(i) Linearização do pDNA	Evitar eventos de transcrição passiva (<i>readthrough</i>) que podem gerar formas indesejadas de RNAm, que produzem impurezas adicionais, as quais teriam que ser removidas
(ii e iii) Captura/polimento ou Concentração e diafiltração I (UF/DF) do pDNA	Remoção de impurezas
(iv e v) Transcrição <i>in vitro</i> e Capeamento	O pDNA linearizado serve de molde de DNA para a transcrição em RNAm. Garantir a estabilidade e tradução eficiente na célula
(vi) Concentração e diafiltração II (UF/DF)	Remoção de pequenos fragmentos de DNA das moléculas maiores de RNAm
(vii e viii) Captura/polimento	Remoção de impurezas
(ix) Concentração e diafiltração III (UF/DF)	Maximizar a pureza do produto e transferir o RNAm para o tampão adequado para formulação ou armazenamento
(x) Filtração estéril	Prevenção à contaminação microbiana e garantir a segurança do paciente
(xi) Congelamento	Armazenamento para posterior formulação
(xii) Encapsulação e formulação	RNAm é encapsulado em nanopartículas lipídicas (LNP: <i>lipo-nano particles</i>) para proteger da degradação e facilitar a entrada nas células do indivíduo
(xiii) Concentração e diafiltração IV (UF/DF)	Remoção de partículas e ajuste para pH neutro
(xiv) Filtração estéril	Prevenção à contaminação microbiana e garantir a segurança do paciente

Fonte: elaborado pelos autores com base em Sartorius (2023) e Vergauwen et al. (2022).

de liberação de RNAm para proteger da degradação, a ter uma liberação eficiente no citoplasma e que não seja tóxico. Também deve-se considerar se o produto final for um complexo de RNAm de tamanho elevado, devem ser avaliadas alternativas para a filtração estéril do produto. Por fim, pode-se realizar uma avaliação sobre

a estabilidade do produto, considerando o sistema de liberação utilizado, pois impacta diretamente a cadeia de frio e, conseqüentemente, o custo do produto.

A seguir as etapas de *downstream* serão discutidas separadamente, iniciando pela ruptura celular e clarificação.

11.2.2.1 Ruptura celular e clarificação

Os homogeneizadores de alta pressão têm sido usados como ferramentas de ruptura de células microbianas. Com exceção dos microrganismos filamentosos, o método é aplicado com sucesso em muitas variedades de bactérias, leveduras e micelas.

Conforme a Figura 11.9, o processo de homogeneização funciona forçando as células em suspensão através de um canal estreito ou orifício sob pressão. Uma alta pressão, que pode chegar até 1.500 bar, é aplicada a uma suspensão de células, forçando-as a passar por uma válvula, resultando em uma alta tensão de cisalhamento, rompendo as membranas. O rompimento ocorre pela combinação de forças de cisalhamento na região da válvula, cavitação (devido às regiões de baixa pressão geradas) e impacto com o anel, liberando dessa forma o produto de interesse. No entanto, o desenho de um processo de rompimento celular tem que ser calculado com cautela. Por um lado, a maior pressão permitiria o rompimento celular com maior eficiência. Por outro lado, altas pressões podem afetar os corpos de inclusão e, no pior caso, podem se dissolver no meio aquoso, resultando em perdas expressivas de produto.

Os parâmetros operacionais com efeito na eficiência dos homogeneizadores de alta pressão são:

- Pressão;
- Temperatura;
- Número de passagens;
- Design da válvula e anel de impacto;
- Fluxo.

Com relação às operações de clarificação, os processos com células animais, normalmente, implicam riscos mais elevados para a otimização desta etapa. Por consequência, em maiores desafios para o escalonamento devido à sensibilidade das células animais e ao fato de o produto de interesse, na maioria das vezes, ser secretado no meio. A principal premissa para manutenção da eficiência da operação no aumento de escala consiste no controle das taxas de cisalhamento, como no escalonamento de biorreatores. Por exemplo, o rompimento excessivo de células durante a operação de centrifugação pode causar maior liberação de contaminantes, como proteínas da célula hospedeira (HCP) e DNA comparativamente ao processo desenvolvido em escala laboratorial ou piloto. As condições de operação, como vazão, força g, tipo e frequência de descarga, precisam ser adequadas para escala industrial. Além disso, a formação de partículas submicrônicas devido ao rompimento excessivo de células impacta a performance da separação por cen-

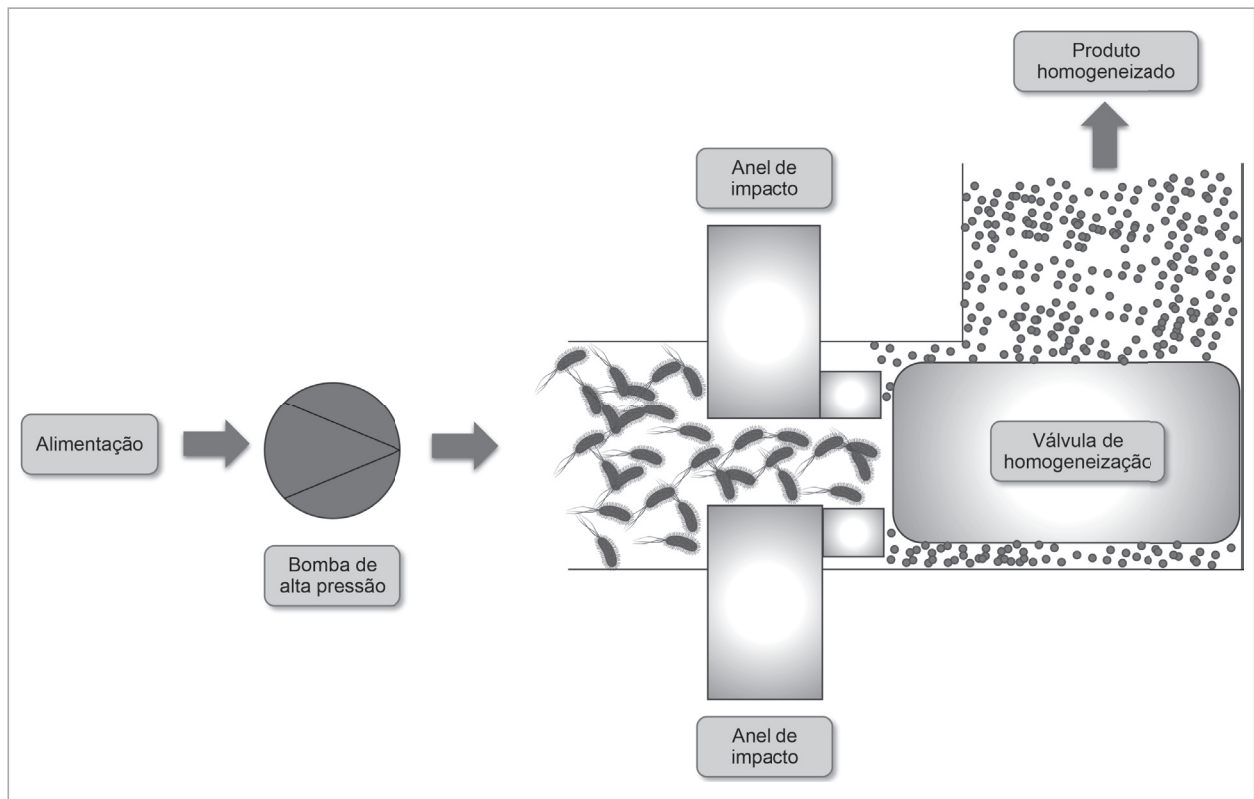


FIGURA 11.9 Funcionamento de um homogeneizador de alta pressão.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

trifugação, por alterar as características das partículas sólidas e, em etapas posteriores de filtração, por causar incrustações não previstas durante o desenvolvimento (HARRISON et al., 2003; ROUSH; LU, 2008; SHUKLA, ABHINAV A. KANDULA, 2008).

A avaliação da performance de processos de centrifugação é realizada basicamente por meio do monitoramento dos seguintes parâmetros: turbidez, níveis de HCP, DNA residual e *packed cell volume* (PCV), que consiste no volume de célula por volume de amostra e normalmente encontra-se na faixa de 0,02 a 0,06. A realização de lotes experimentais é indispensável, pois nem sempre o comportamento se mantém constante devido à variabilidade intrínseca de organismos biológicos. A manutenção dos parâmetros proporcionalmente é o meio mais seguro para obtenção de sucesso no escalonamento de operações de centrifugação (ROUSH; LU, 2008).

Em muitos casos, para processos com células animais utilizam-se apenas operações de filtração como etapa de clarificação. Normalmente, uma filtração em profundidade, seguida de uma filtração com membrana, usualmente com tamanho de poro médio de 0,22 μm é suficiente. O escalonamento de etapas de filtração segue uma proporção de volume ou massa de amostra por área de filtração estabelecido empiricamente em escala de laboratório e piloto. Portanto, é fundamental a manutenção das condições de cultivo entre diferentes escalas e diferentes lotes para que a qualidade da suspensão celular não seja um fator que contribua para a potencial redução de performance de etapas de filtração. É importante sempre trabalhar com uma margem de segurança de pelo menos 20% na determinação da área de filtração (ROUSH; LU, 2008).

11.2.2.2 Cromatografia

A cromatografia é a operação mais empregada para reduzir os níveis de contaminantes indesejados. Dependendo do grau de pureza requerido, mais etapas cromatográficas são necessárias. A dose do medicamento biológico exerce significativa influência na quantidade de operações de cromatografia. Por exemplo, a exigência de pureza para biofármacos é mais elevada do que para vacinas, devido à necessidade de administração de doses maiores e com maior regularidade dos biofármacos nos pacientes. Normalmente, são necessárias no mínimo 3 etapas cromatográficas para purificar um biofármaco (Figura 11.6), enquanto é comum encontrar processos de purificação de vacinas virais com 1 ou 2 etapas cromatográficas. O recomendado para biofármacos com relação a níveis de HCP (sigla em inglês para proteínas da célula hospedeira, *host cell protein*) é de 100 ppm (ou seja, 100 ng de HCP por 1 mg da proteína de interesse),

mas esse alvo pode sofrer variações dependendo da dose estabelecida para cada biofármaco e resultados de imunogenicidade decorrentes de testes pré-clínicos e clínicos. Essa quantidade maior de etapas cromatográficas pode ser considerada como um desafio para o escalonamento de processos de produção de biofármacos. Isto ocorre, pois a cromatografia é a operação unitária mais representativa em termos de custo para um processo produtivo biotecnológico (JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012; MA; KILBY, 2020).

Existem, basicamente, 4 tipos de cromatografia: (i) exclusão por tamanho (ou gel filtração); (ii) troca iônica (dividida em aniônica e catiônica); (iii) interação hidrofóbica; e (iv) afinidade. Como regra geral, para manutenção da performance de colunas cromatográficas e produtividade do processo (produto purificado por tempo) em diferentes escalas a velocidade linear do fluido e a altura da coluna devem permanecer constantes em todas as escalas a partir dos parâmetros definidos na escala piloto. Para que isso seja possível, basta aumentar o diâmetro da coluna, como ilustrado na Figura 11.10. Assim, se a qualidade do empacotamento for a mesma, a eficiência da coluna tende a se manter constante (BURGESS; DEUTSCHER, 2009).

O maior desafio no escalonamento de colunas é evitar o desperdício de resina e conseguir acomodar a faixa de título do produto sem perdas significativas de rendimento, pois para manter a altura constante e a velocidade linear o aumento de volume não será proporcional. Dependendo da escala, pode-se ter um volume de resina acima do necessário e, normalmente, as resinas cromatográficas são os materiais com maior custo no processo e avaliados individualmente. Simulações devem ser realizadas para determinar se o volume da coluna consegue acomodar a faixa de título (ou concentração do produto) no momento da aplicação do produto em cada coluna, pois em alguns casos, como na interação hidrofóbica, existe uma faixa (limite mínimo e máximo) de carregamento da coluna na qual a performance foi otimizada. Contudo, não é inviável realizar o escalonamento por volume. Pode-se manter constante o volume de coluna por tempo (p. ex., VC/h), ou seja, o volume de amostra e de soluções aplicadas na coluna por tempo é o mesmo nas diferentes escalas. Neste caso a velocidade linear e a altura serão modificadas para valores maiores, conforme representado na Figura 11.11. O objetivo é manter a produtividade, mas com o risco de comprometer a performance, uma vez que os parâmetros de eficiência da coluna (como altura dos pratos teóricos) serão alterados, pois são influenciados pela velocidade linear. O principal benefício do escalonamento por volume é a maior flexibilidade no ajuste do volume de resina proporcional à capacidade

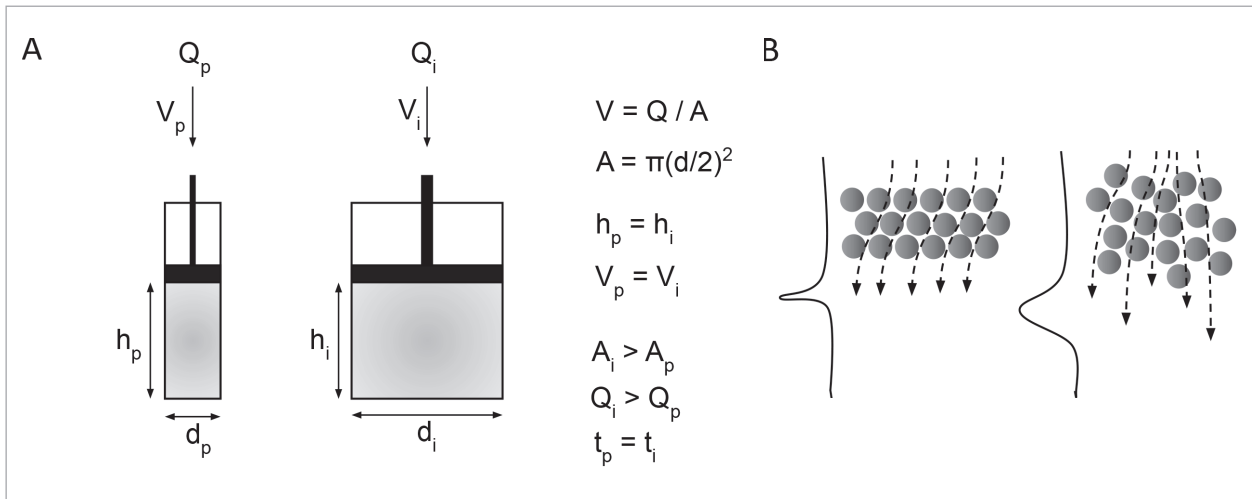


FIGURA 11.10 A: Racional tradicional para escalonamento de colunas cromatográficas, sendo: V = velocidade linear; h = altura da coluna; t = tempo de processo; d = diâmetro da coluna; Q = vazão; A = área da seção transversal da coluna; p = escala piloto; i = escala industrial. B: Representação do perfil cromatográfico considerando um empacotamento bem executado (esquerda) e mal executado (direita); as setas representam o fluxo da fase móvel.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

dinâmica da coluna definida na fase de desenvolvimento, evitando desperdício de resina e de soluções. Além de ser possível operar com colunas de dimensões menores (pode ser útil dependendo das disponibilidades de colunas e área de processo na planta). Contudo, esse tipo de escalonamento não é recomendado para separações muito restritas, ou seja, se houver um pico de contaminante muito próximo ao pico do produto de interesse (HANSEN, 2017).

11.2.2.3 Operações de filtração com membranas e inativação viral

A filtração tangencial é a operação frequentemente aplicada a processos de produção de biofármacos quando o objetivo é substituir a solução na qual a amostra (produto) está dissolvida (processo de diafiltração – DF) ou quando se deseja concentrar a amostra (processo de ultrafiltração – UF). A técnica consiste na utilização de membranas de ultrafiltração (UF) que possuem tamanho médio de poros entre 0,001–0,05 μm , porém são comumente classificadas quanto à massa molecular de corte (ou *cut-off*), em kDa. Por exemplo, uma membrana de UF com *cut-off* de 10 kDa significa que essa membrana é capaz de reter moléculas maiores que 10 kDa. Normalmente, para o processo define-se o *cut-off* como sendo 5x menor que a massa molecular da proteína ou vírus de interesse como margem de segurança. A Figura 11.12 apresenta os componentes principais de um sistema para filtração tangencial utilizado para ultrafiltração e diafiltração (UF/DF). A dinâmica consiste

no bombeamento da amostra através da membrana de forma que o fluxo seja tangencial, obtendo-se um fluxo de retorno (moléculas retidas pela membrana, como proteínas maiores que o *cut-off*) para o tanque contendo a amostra e um fluxo de permeado (moléculas que permeiam a membrana, sais e água por exemplo). Ao longo de várias passagens pela membrana o volume da amostra diminui e, conseqüentemente, a concentração da amostra retida pela membrana aumenta. Para a substituição da solução, basta adicionar a nova solução à amostra e recircular no sistema até que se obtenha a completa substituição da solução (monitorado pelas medidas de pH e condutividade). Normalmente, a adição entre 5 e 10 vezes do volume inicial da amostra (após a concentração) é suficiente para a troca completa da solução (MILLIPORE, 2003; ZYDNEY, 2021).

O escalonamento da operação de filtração tangencial tem como princípio básico a busca pela estabilidade hidráulica entre os sistemas de diferentes escalas, ou seja, a perda de pressão ao longo do sistema deve ser proporcional. Para conseguir essa estabilidade hidráulica e obter um escalonamento linear (aumentando-se a área de membrana proporcionalmente ao aumento do volume ou massa de amostra) algumas características relacionadas ao dispositivo contendo a membrana (módulos) e ao sistema como um todo devem ser observadas. Os dois tipos mais comuns de módulos de membranas utilizados em processos industriais são para: membranas de fibra oca e planas. Os módulos de membranas planas mais conhecidos são denominados de *cassette*. A principal

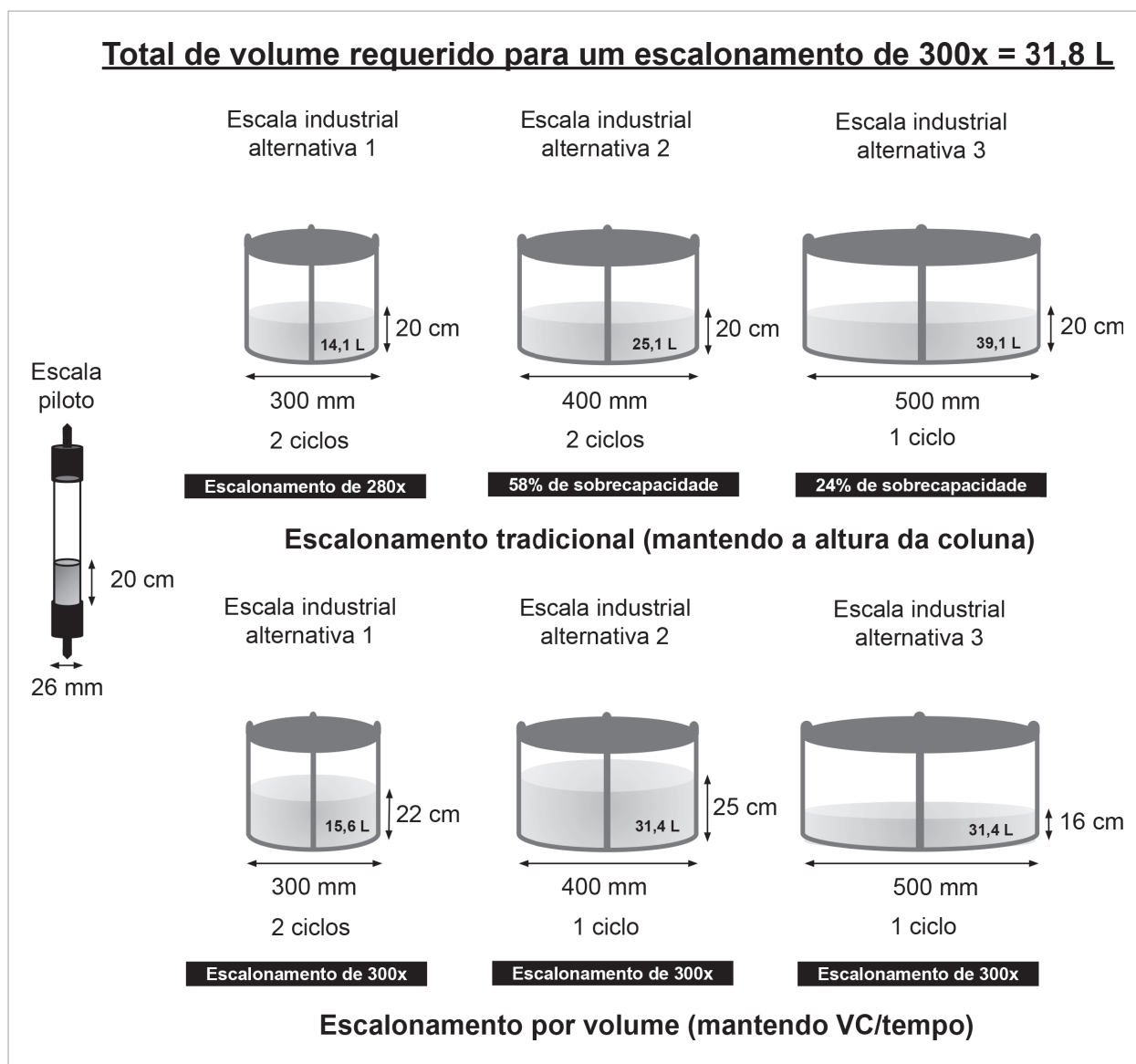


FIGURA 11.11 Método de escalonamento por volume, manutenção do VC/tempo, em comparação ao método tradicional.

Fonte: adaptada de Erickson (2018).

característica do módulo contendo a membrana para o escalonamento é a manutenção do comprimento dos canais por onde a amostra é alimentada. Portanto, a área de membrana varia aumentando-se a quantidade de canais em paralelo e a espessura do *cassette*. A Figura 11.13 mostra a estrutura externa e interna de um *cassette* para membrana plana e o comportamento teórico do fluido através dos canais do *cassette*. Outros pontos também são importantes no *design* de um *cassette*, como: (i) quantidade de portas de alimentação e do retido devem ser proporcionais ao aumento da largura da membrana; (ii) a forma de orientação em relação à alimentação e as dimensões das telas espaçadoras presentes nos canais

são constantes nas diferentes escalas; e (iii) todos os elementos susceptíveis à compressão (p. ex., materiais da membrana, das telas de espaçamento, das juntas e de encapsulamento do *cassette*) devem permanecer constantes (VAN REIS et al., 1997).

O maior desafio para o desenvolvimento de sistemas para TFF é a necessidade de projetar o sistema para reduzir o volume morto e garantir a manutenção do fluxo ao longo do tempo, por meio do correto dimensionamento da bomba de alimentação e da tubulação. O volume mínimo de operação do tanque de recirculação é um ponto que deve ser observado na configuração do sistema, pois depende do nível de concentração

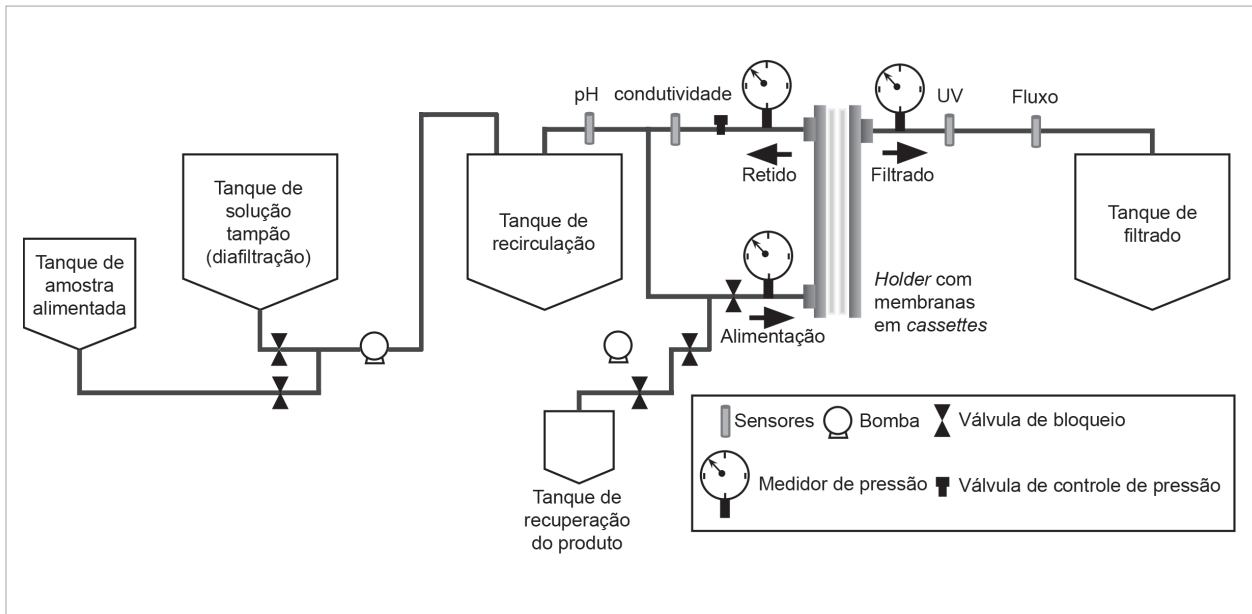


FIGURA 11.12 Principais componentes de um sistema para filtração tangencial automatizado.
 Fonte: elaborada pelos autores (2023).

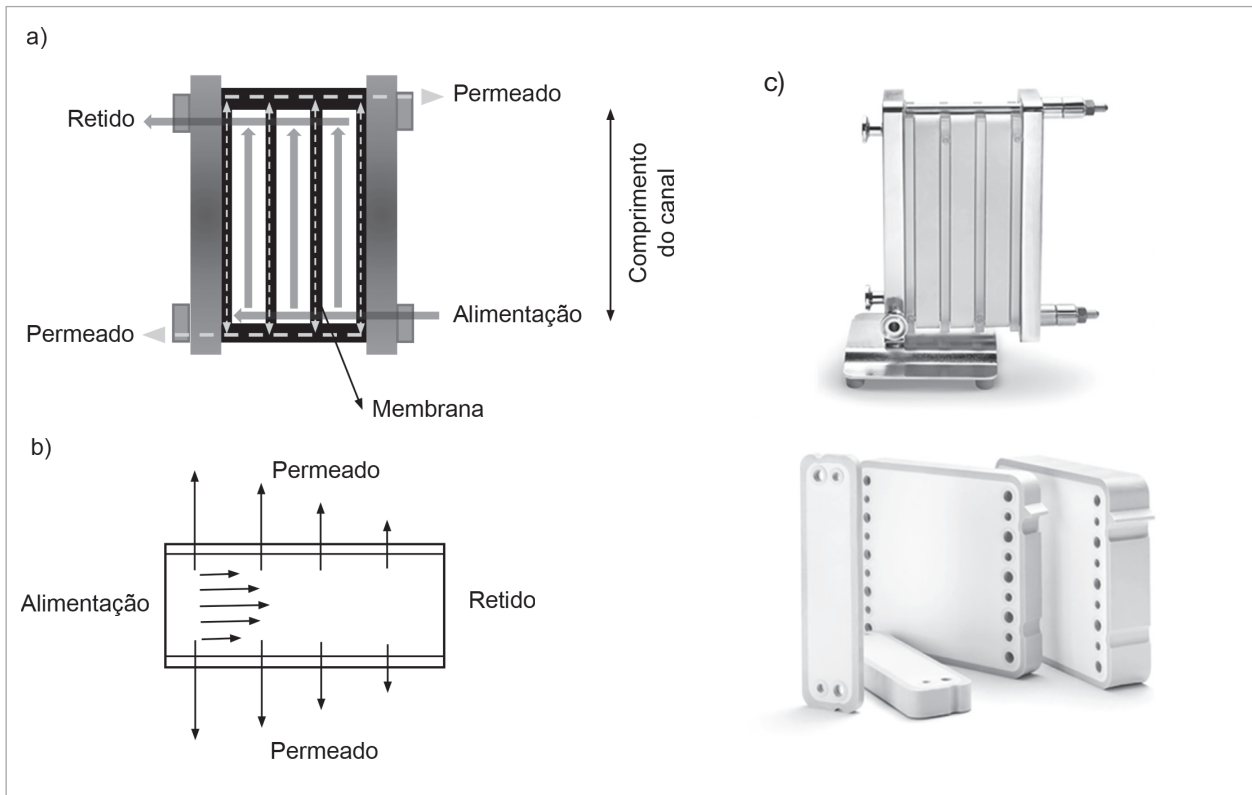


FIGURA 11.13 Estrutura de um módulo para membrana plana (*cassette*) e dinâmica do fluido através do módulo.

Fonte: elaborada pelos autores; imagens cedidas pela Merck (2023). A: Dinâmica do fluido através do *cassette*; B: comportamento do fluxo ao longo do canal; C: imagem de *cassettes* Pellicon® da empresa Merck-Millipore.

requerida para o produto. Para ilustrar, tanques de fundo cônico tendem a ter um volume mínimo de trabalho reduzido. Além disso, sistemas industriais de TFF devem ser de fácil limpeza por procedimentos de *cleaning in place* (CIP), fácil manutenção e totalmente drenáveis. Sistemas completamente automatizados de até 80 m² de área de membrana são relatados na literatura por fornecedores, mas existe a necessidade de customização, na qual o projeto deve ser desenvolvido pelo fornecedor da tecnologia e com acompanhamento da equipe técnica do cliente, seguindo as boas práticas de projeto: (i) preparação da especificação de requerimento do usuário; (ii) qualificação de projeto; e (iii) teste de fábrica e qualificações de instalação, operação e performance (MILLIPORE, 2003).

Operações específicas para redução de carga viral não podem ser negligenciadas no desenvolvimento de processos que utilizam células animais, principalmente. Para a produção de biofármacos a recomendação do ICH Q5 e das principais agências regulatórias do mundo é que durante o processo de *downstream* sejam implementadas pelo menos duas etapas para remoção ou inativação de vírus envelopado e uma etapa para vírus não envelopado. A Figura 11.6 destaca as operações exclusivas para redução de carga viral em alguns exemplos de processos industriais. As inativações químicas por pH ácido e com uso de solvente/detergente são as operações de inativação mais utilizadas para vírus envelopado em processos de produção de biofármacos, e o escalonamento consiste na utilização de sistemas que promovem a mesma capacidade de mistura, mantendo constante o parâmetro potência/volume (P/V). A recomendação para processos de inativação é que seja realizado em dois tanques para mitigar o risco de parte do sistema ainda conter material com vírus ativo e carrear para o produto, por meio de: (i) uso de linhas de transferência inadequadamente limpas; (ii) geração de respingos ou aerossóis que podem reentrar no processo; (iii) presença de líquidos em áreas mortas do tanque (p. ex., portas de amostragem, portas de instrumentos e bocais). Por exemplo, na inativação por pH ácido, o pH da solução é ajustado no primeiro tanque e transferido para o outro, onde permanece em incubação pelo tempo determinado nas condições de temperatura e pH necessárias para inativação viral até a neutralização da solução. Portanto, no planejamento de operações de inativação viral na escala produtiva deve ser sempre avaliada a necessidade de inclusão de mais um tanque no processo.

A filtração normal utilizando membrana de filtração viral, também conhecida como nanofiltração, apesar de utilizar membranas com 20 nm de tamanho médio de poro (pode ser considerada como uma membrana de ultrafiltração fechada), é utilizada em praticamente todos

os processos de produção de biofármacos desenvolvidos após a implementação do ICH Q5A (ver Figura 11.6). O principal motivo da inserção da nanofiltração em processos biológicos foi para aumentar a segurança em relação a uma possível contaminação por vírus não envelopado na produção de proteínas derivadas do plasma sanguíneo, esse tipo de membrana é capaz de remover a maioria dos vírus não envelopados. O escalonamento da nanofiltração é linear, segue o volume de amostra por área de membrana estabelecido empiricamente na etapa de desenvolvimento; e normalmente a força motriz para a filtração ocorrer é por diferencial de pressão (ar comprimido puro ou nitrogênio). Uma vez que os poros são muito fechados, normalmente o fluxo varia ao longo do processo, dificultando a otimização da alimentação por bombeamento.

Etapas cromatográficas, além de promoverem a purificação da proteína de interesse, também são validadas para remoção viral, desafiando-se o protocolo de purificação com a inserção de vírus conhecidos. A validação de processos de inativação ou remoção viral sempre é realizada em escala reduzida e fora da planta industrial (RUPPACH, 2020; SHOKRI DOODEJI; ZERAFAT, 2018; SOFER, 2003; WICKRAMASINGHE *et al.*, 2010).

11.3 PRODUÇÃO DE KIT DIAGNÓSTICO

A partir da declaração da pandemia pela OMS (Organização Mundial da Saúde), em 11 de março de 2020, uma das primeiras necessidades sanitárias urgentes, naquele momento, era a testagem. O desenvolvimento tecnológico da Fiocruz para *kits* de diagnóstico (Laboratório de Tecnologia de Diagnósticos) possui uma equipe dedicada ao desenvolvimento de *kits* moleculares e outra equipe que desenvolve *kits* de diagnóstico sorológicos ou testes rápidos. Para o diagnóstico da Covid-19 foi preconizada utilização do *kit* molecular. Este *kit* foi inteiramente desenvolvido em Bio-Manguinhos /Fiocruz a partir da sequência do vírus encaminhada via OMS.

Esta seção irá se basear no estudo de caso do desenvolvimento deste *kit* diagnóstico para a Covid-19, para demonstrar como um *kit* diagnóstico é desenvolvido e produzido em larga escala. A primeira proposta de *kit* para Covid-19 possuía a seguinte composição, de acordo com Protocolo Charitè.

- Mix PCR: composto pelas enzimas;
- Primer, sonda e nucleotídeos: sequência primer e sonda para os marcadores RP – gene constitutivo humano, identificado por RP; gene E e N;
- Controle positivo: sequência genética e sintética do vírus SARS-CoV-2;
- Controle negativo: água RNase free.

BOX 11.1**PROTOCOLO CHARITÈ:**

O teste padrão-ouro para diagnóstico da Covid-19, por diversas entidades, em virtude de sua alta sensibilidade e especificidade para a fase aguda, é aquele que se baseia na reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real, o RT-PCR. Diversos protocolos foram estabelecidos, O primeiro protocolo estabelecido e validado pela OMS – e um dos mais usados até o momento – foi o desenvolvido pelo Instituto de Virologia Charité, da Universidade de Berlim, Alemanha.



Neste desenho, as sondas distintas para alvos distintos possuíam o mesmo fluoróforo, ou seja, a detecção dos alvos distintos precisava ser realizada em dois poços da placa de reação; portanto, havia necessidade de utilizar 2 poços para cada paciente, aumentando assim a quantidade de insumos por teste. Posteriormente, evoluiu-se para uso de fluoróforos distintos por sonda, o que possibilitou uso de apenas 1 poço por reação; logo, o volume de insumos necessários para uma reação decresceu, possibilitando maior oferta de *kits*. Foi esta a primeira otimização deste processo produtivo. Apesar disto, da capacidade de produção variar em torno de 30.000 reações/semana, quando a demanda projetada até maio de 2020 seria de 500.000 reações/semana, 2 milhões de reações/mês. Assim, foi necessário escalar o processo produtivo a fim de atender à demanda. O processo de preparo do *kit* consiste em:

- Formulação dos mixes de enzimas e sondas primers, nucleotídeos, controle positivo e negativo – etapa realizada pela equipe do laboratório de tecnologia diagnóstica (desenvolvimento), em fase de transferência para equipe de produção;
- Identificação manual dos criotubos e envase do material nos criotubos;
- Fechamento dos criotubos com tampa de rosca;

- Realização da verificação de volume médio – controle em processo;
- Congelamento do material envasado;
- Embalagem final nos cartuchos e caixas de embarque de isopor, com gelo seco, para expedição ao almoxarifado.

Iniciou-se a proposta entendendo as restrições deste processo produtivo e estabelecendo tamanho de lote e então as necessidades para este escalonamento. As seguintes restrições foram consideradas:

- Manipulação do material em grau A – cabine de fluxo laminar para todas as operações;
- Conduta de trabalho em fluxo laminar, com movimentos lentos, não retirar as mãos de dentro do fluxo sem antes utilizar álcool 70%;
- Utilização de vestimenta hidrorrepelente, máscaras e luvas;
- Material usado deverá ser autoclavado previamente antes de descartá-lo ou lavá-lo;
- Utilização de banho de gelo durante a operação de envase;
- Envase do controle positivo deve ser separado do restante do processamento dos outros componentes do *kit*;
- Monitoramento do volume médio durante o envase;
- Operação de rotulagem de criotubos e envase manual;
- Tamanho de lote é definido pelo volume de mix de enzimas a ser envasado.

Dessa forma, conforme o volume de enzima e volume necessário para realização da reação, o tamanho do lote definido foi de 175 *kits*. A composição do *kit* é mostrada no Quadro 11.5 e no Quadro 11.6.

É possível atender 96 pacientes com cada *kit*, realizando 96 reações. Portanto, para 1 lote são produzidas 16.800 reações. A meta seriam 500.000 reações por semana; logo, seria necessário processar 30 lotes semanalmente. É importante frisar que, como o processo produtivo é manual, foi necessário estabelecer o volume de colaboradores e o tempo demandado para execução de cada lote. Para atingir a meta, foi avaliado o tempo para operação e as necessidades específicas para execução. O Quadro 11.7 evidencia os tempos obtidos após avaliação realizada pela Engenharia Industrial. Cada equipe de trabalho destinada à rotulagem de microtubos possuía 2 colaboradores em operação na cabine de segurança biológica, sendo 3 cabines disponíveis para esta atividade, contando com um operador para realizar apoio das atividades, tais como: (i) preenchimento de documentação; (ii) organização de materiais; e (iii) reposição de materiais e insumos. Ao total, 1.680 mi-

QUADRO 11.5 Composição do *kit* 1 × 96 reações para diagnóstico molecular da Covid-19

Componentes Apresentação: 1 × 96 reações	Total de tubos por lote	Quantidade de tubos por <i>kit</i>
E/RP	175	1
PCR	175	1
CP	175	1
CN	175	1
Total de tubos a processar = 700/lote		

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

QUADRO 11.6 Composição do *kit* 2 × 48 reações para diagnóstico molecular da Covid-19

Componentes Apresentação: 2 × 48 reações	Total de tubos por lote	Quantidade de tubos por <i>kit</i>
E/RP	175	1
Rox	175	1
PCR	175	2
CP	175	1
CN	175	1

Total de tubos a processar com CP e CN = 875 tubos/
lote; sem CP e CN = 525/lote

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

crotubos eram rotulados, por equipe, em um turno de 8 horas de trabalho. Contando com 3 equipes operacionais, totalizaram 5.040 microtubos por turno. Aplicou-se rodízio das equipes, para evitar lesões por movimentos repetitivos dos colaboradores. Para cumprir-se a meta semanal, de 26.250 criotubos, para tanto, finalizaram-se os envases aos sábados.

Vislumbrou-se a primeira melhoria ao terceirizar a produção dos controles positivo e negativo. Assim, foram reduzidos 2 criotubos de cada *kit*. A quantidade de criotubos a processar decresceu de 26.250 para 15.750.

Adequações foram necessárias para viabilizar 3 equipes destinadas aos envases. Uma das salas foi adequada com a inserção de mais uma cabine de segurança biológica destinada ao envase. Realizadas as adequações de infraestrutura, instalação de cabines de segurança biológica, iniciou-se a contratação dos colaboradores para composição das equipes. Não foi possível dispor de toda a equipe de produção de moleculares, pois os *kits* NAT (*nucleic acid testing*) distribuídos para hemorrede precisavam ser entregues. As equipes foram contratadas aos poucos, à medida que se aumentava o volume de

reações produzidas por semana. Enquanto uma equipe treinava as demais, incrementava-se o volume de lotes.

Em um período de 4 horas era possível alcançar 2.600 tubos envasados contando apenas com 1 equipe, de 3 pessoas. Estes profissionais revezam-se nas atividades de apoio, rotulagem, envase. Assim, esta mesma equipe é capaz de rotular no período da manhã e envasar no período da tarde. O arranjo produtivo pode ser melhorado, quando houve a contratação do IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná), parceiro de Bio-Manguinhos/Fiocruz para fornecer os controles negativo e positivo, este último, formulado, a partir da sequência genética sintética gene *block* para alvos RP e E. Desta forma, o volume de tubos a ser processado para cada lote foi reduzido em 50% do total, neste formato. Considerando-se 350 tubos ao invés de 700 iniciais, teríamos uma redução na quantidade de equipes e no espaço destinado ao processamento, conforme o Quadro 11.7 e o Quadro 11.8.

O processo adotado foi robusto, sendo implementado com sucesso ao longo das 8 semanas, conforme o Quadro 11.9. O legado para a área de reativos para testes moleculares foi o desenvolvimento de outros *kits* para outros agravos que fazem parte do portfólio de Bio-Manguinhos. A capacidade produtiva foi incrementada com ajustes na infraestrutura e desenho de perfis de colaboradores, modelos de capacitação e treinamento empregados. Podem ser usados como modelos. Processo

QUADRO 11.7 Composição das atividades e equipes por processo

Processo	Volume de tubos processado por equipe por 3 horas de trabalho	Tamanho de equipe
Rotulagem	13.824	2 pessoas e 1 apoio
Envase	1.080	3 pessoas em revezamento

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

QUADRO 11.8 Meta semanal de produção e composição de equipes

Meta	Lotes/ semana	Volume de criotubos a processar/ semana	Tamanho da equipe de rotulagem
30.000	2	1750	1
100.000	6	5.250	3
250.000	15	13.125	4
500.000	30	26.250	5

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

QUADRO 11.9 Composição final das equipes por número de reações e número de lotes produzidos

Número de reações	Volume de lotes	Volume de tubos	Quantidade de equipes/turno	Quantidade de colaboradores
16.800	1	350	1	3
84.000	5	1.750	2	6
168.000	10	3.500	3	9
252.000	15	5.250	4	12
504.000	30	10.500	5	15

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

de captação de perfis adequados ao trabalho e criação de banco de talentos para mobilizações rápidas em casos de necessidade.

Partiu-se de 30 mil reações por semana para 500 mil reações por semana em um período de 8 semanas, demonstrado na Figura 11.14. Esta ação foi possível com a sinergia entre os laboratórios de desenvolvimento e produção, para aumentar a disponibilidade de *kits* mantendo a qualidade e reprodutibilidade dos testes.

11.4 PROCESSAMENTO FINAL

O processamento final consiste em etapas de um amplo processo na produção de imunobiológicos, destacando-se a produção de vacinas, diluentes e recentemente biofármacos. São processos que se iniciam com o recebimento do insumo farmacêutico ativo (IFA), iniciando com a etapa de formulação e seguida pelo envasamento, que deve ser o mais automatizado possível. A automação

permite reduzir ao máximo o risco de contaminação, em sua maioria oriundo da intervenção humana. Os produtos com a apresentação sólida passam pela etapa de liofilização e os produtos líquidos vão diretamente para a etapa de selagem, também conhecida por recravação. Na sequência, o padrão de qualidade internacional requer a inspeção de 100% desses produtos, seja por inspeção manual, automática, semiautomática ou a combinação destas possibilidades.

A etapa seguinte, considerada menos crítica por não ser um processo asséptico, mas não menos importante, é a embalagem e rotulagem. Esta etapa configura-se por identificar o produto com rótulo, o número do lote, cartuchos e bulas (podendo ser utilizados em alguns casos mementos).

A respeito das tendências do processamento final, vale que tanto as novas tecnologias estão sendo adotadas quanto os requisitos de qualidade também crescem. Em termos gerais, as demandas do processamento final per-

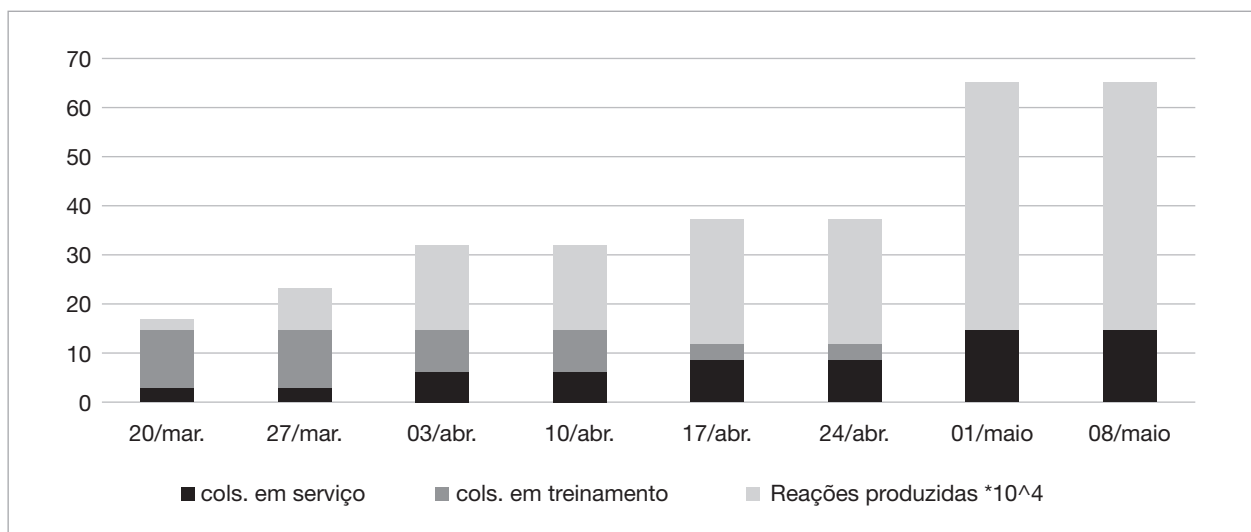


FIGURA 11.14 Evolução do escalonamento do processo de produção de *kits* moleculares SARS-CoV-2 E/ RP 96 reações.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

manecem as mesmas. Em síntese, manter equipamentos livres de contaminação na formulação e na etapa de embalagem primária, bem como preservar as condições bioquímicas que serão na maior parte voltadas para segurança e eficácia de cada imunobiológico.

11.4.1 Formulação em larga escala de vacinas e biofármacos

Quando são citados os desafios relacionados à produção em larga escala de vacinas e biofármacos, o primeiro tópico presente nas indústrias farmacêuticas é o tipo de tecnologia que deve ser implementada. Este ponto é importante, tendo em vista a vasta gama de tecnologias presentes nos fornecedores para a produção em larga escala e que atendam aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação.

Quando se trata de produção em larga escala em Bio-Manguinhos/Fiocruz, a produção da vacina contra a Covid-19 pode ser usada como referência. Isto devido à emergência sanitária que atingiu o Brasil e à necessidade de atendimento prioritário a todo o Sistema de Saúde Pública brasileiro.

Devido a esta necessidade de resposta na produção de vacinas em todo o mundo, muitos dos insumos necessários para a formulação de vacinas, como filtros esterilizantes e filtros para a redução de carga microbiana, estavam em escassez no mercado. Inclusive nos maiores polos de produção de vacinas. Diante da escassez de recursos foi necessária a utilização de todas as tecnologias disponíveis na produção farmacêutica, tanto a tecnologia de produção via sistemas *single-use* quanto a utilização de tanques de aço inoxidável. Nesse contexto, cabe decidir sobre qual tecnologia melhor se aplica à produção em larga escala de vacinas e biofármacos.

A tecnologia *single-use* é uma cultura recente no Brasil para produção de vacinas e biofármacos. Contudo, está em constante avanço devido à maior facilidade de manuseio e à maior proteção ao produto formulado/ envasado. O significado de *single-use* é: produtos, geralmente de plástico, que são “feitos para serem usados apenas uma vez” antes do descarte. São sistemas projetados conforme a necessidade de produção de cada vacina ou biofármaco e que atendem às demandas de manufatura de cada produto. As vantagens da tecnologia *single-use* estão no Quadro 11.10.

A utilização dessas tecnologias *single-use* em sistemas completamente fechados (Figura 11.15) cria oportunidade de redução na classificação de limpeza das áreas utilizadas na produção de vacinas e biofármacos. Além disso, possuem a capacidade de reduzir a periodicidade de limpeza das áreas limpas, mediante validação adequada do processo de limpeza destas.

QUADRO 11.10 Vantagens da tecnologia *single-use*

Vantagem	Descrição
Flexibilidade	As tecnologias <i>single-use</i> são mais “adequáveis” às necessidades específicas de cada produto na fabricação das vacinas e biofármacos.
Retirada da necessidade de tratamento dos tanques de aço inoxidável	A utilização dos tanques de aço inoxidável na produção de vacinas e biofármacos requer a limpeza de toda a superfície deste, visando à retirada de todo e qualquer resquício do produto formulado. Isto reduz a possibilidade de contaminação cruzada entre produtos diferentes ou, até mesmo, do mesmo produto de lotes diferentes no tanque. Após essa limpeza, é necessário assegurar a eficácia na retirada de todo e qualquer resquício do produto no tanque, o material precisa ser esterilizado, conforme os requisitos básicos de Boas Práticas de Fabricação de produtos farmacêuticos. Toda essa operação consome disponibilidade de produção, água purificada ou WFI (água para injetáveis) e energia para alimentar esse sistema.
Processo fechado, ou seja, produto sem nenhum contato com o ambiente	As áreas limpas, áreas com grau de limpeza para produção de vacinas e biofármacos, são classificadas conforme grau de limpeza. Exemplo: Áreas limpas grau A são áreas mais limpas dentro dessa escala, que podem ser definidas também como graus B, C, D e CNC (controlada/não classificada). Quanto maior a classificação de limpeza, maior atendimento dos requisitos de boas práticas de fabricação para manufatura de produtos estéreis ou de baixa carga microbiana em sistemas “abertos”. Para que a vacina ou biofármaco seja formulado em sistema “aberto” maior deve ser a criticidade de classificação de limpeza da área de produção. Contudo, para que as áreas atinjam todos os parâmetros necessários do maior grau de limpeza das áreas limpas, mais energia será utilizada para manter a qualidade, temperatura e umidade do ar dessas áreas de manufatura; provavelmente, nas indústrias farmacêuticas, este seja o maior consumo de energia nas instalações fabris de vacinas e biofármacos.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).



FIGURA 11.15 Sistema *single-use* de formulação de vacinas, composto com balança para controle de massa adicionada nas bolsas e sistema de agitação. Fonte: Nathalia Rodrigues – Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Apesar das vantagens dos sistemas *single-use*, há algumas limitações, justificando a utilização dos tradicionais tanques de aço inoxidável. No Quadro 11.11 estão as vantagens dos tanques inox.

A produção em larga escala de vacinas e biofármacos pode utilizar diferentes tecnologias, tanto sistemas *single-use* quanto os tanques de aço inoxidável (Figura 11.16). Não há uma regra geral para a produção de larga escala das vacinas e biofármacos. É necessário compreender a melhor tecnologia para cada caso e

QUADRO 11.11 Vantagens da utilização dos tanques de aço inoxidável

Vantagem	Descrição
Aumento na escala produtiva	Apesar dos avanços em tempo recorde das empresas responsáveis pela produção dos sistemas <i>single-use</i> , o volume máximo destes sistemas são, aproximadamente, entre 5.000 e 7.000 L. Os tanques de aço inoxidável apresentam a possibilidade de aumento de escala de produção entre 15.000 e 20.000 L, aproximadamente.

(continua)

QUADRO 11.11 Vantagens da utilização dos tanques de aço inoxidável (continuação)

Vantagem	Descrição
Alto <i>lead time</i> na entrega dos sistemas <i>single-use</i>	Durante a pandemia do Covid-19 aumentou o risco de escassez na cadeia de suprimentos dos sistemas <i>single-use</i> . Isso elevou o tempo de entrega dos materiais <i>single-use</i> , devido à falta de itens básicos na construção desse sistema, como filtros esterilizantes ou de redução de carga microbiana, tubos de silicone de alta pureza curado a platina, entre outros. Mesmo com o fim da pandemia e a normalização da cadeia de suprimentos de materiais que atendem ao mercado farmacêutico, outro ponto que sempre foi crítico para o aumento do <i>lead time</i> na entrega de sistemas <i>single-use</i> é a customização das bolsas para o atendimento de especificações de produção de cada vacina e biofármaco. Os materiais que compõem um mesmo sistema de formulação <i>single-use</i> , com a globalização e busca de melhores preços em cada peça constituinte das bolsas de uso único, se originam de diferentes países, e cada país possui uma demanda e um prazo de entrega diferente. Assim sendo, acarreta um aumento no prazo de entrega de materiais que compõem a produção de vacinas e biofármacos em sistemas <i>single-use</i> .
Pouca interação com o produto	O risco de interação com o produto é praticamente nulo com os tanques de aço inoxidável, isto porque o material utilizado para a construção dos tanques utilizados na fabricação de vacinas e biofármacos é o aço inox 316L, por exemplo. Sendo assim, há uma redução drástica no potencial de lixiviação e extração (extraíveis e lixiviáveis são substâncias oriundas de interações químicas entre os componentes do medicamento e do material de embalagem. Podem ter potencial tóxico, bem como provocar desequilíbrio químico e físico na forma farmacêutica em questão, podendo comprometer a segurança do medicamento).
Descarte das bolsas utilizadas nos sistemas <i>single-use</i>	As bolsas dos sistemas <i>single-use</i> utilizadas na formulação de vacinas e biofármacos devem ser descontaminadas em ciclos validados e, após descontaminação, estas devem ser descartadas, gerando um alto volume de material plástico para disposição final. Uma das opções de descarte desses sistemas <i>single-use</i> é a incineração. Essa forma de descarte, além de ser pouco acessível, é um processo extremamente caro para as indústrias farmacêuticas.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).



FIGURA 11.16 A: Tanque de aço inoxidável 316 L de 150 L utilizado no preparo de soluções. B: Tanque de aço inoxidável 316 L de 300 L utilizados na formulação da vacina Covid-19. C: Tanque de aço inoxidável 316 L de 150 L utilizados na formulação da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola.

Fonte: Bernado Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.

aplicá-la da melhor forma, cumprindo as Boas Práticas de Fabricação, para garantir a esterilidade ou a menor carga microbiana possível dos produtos farmacêuticos. Mesmo após o período pandêmico do Covid-19 e a normalização da entrega dos produtos envolvidos na fabricação dos sistemas *single-use*, se faz importante a aplicabilidade de diferentes formas de produção das vacinas e biofármacos. Isso permite mitigar o risco de dependência de um único fornecedor dessas tecnologias ou a redução da flexibilidade na manufatura desses produtos. Deve-se considerar que a tecnologia envolvida nas indústrias farmacêuticas é extremamente dinâmica e a cada dia surgem novas tecnologias que ajudam, facilitam e melhoram a produção de vacinas e biofármacos em larga escala. Por fim, é importante ressaltar que qualquer modificação nas operações da produção das vacinas e biofármacos deve ser avaliada e validada para que tais modificações não tragam efeitos adversos ao paciente e que sempre atendam às Boas Práticas de Fabricação.

11.4.2 Envase

Essa é uma das principais etapas do processamento final, este processo deve sempre ocorrer sob proteção de barreiras de ar, tais proteções são configuradas por um fluxo de ar laminar filtrado por filtros de alta eficiência (filtros HEPA). Ao longo dos anos, os equipamentos de proteção foram aperfeiçoados e observamos uma evolução importante de conceitos neste sentido. Existem equipamentos com design “aberto”, ou seja, apenas um módulo de fluxo laminar protegido por cortina transparente de vinil, tem-se os RABS (Sistemas de Barreira de Acesso Restrito) passivos e ativos. Por fim, uma tecnologia mais avançada e promissora dos isoladores, cujo conceito é a completa separação entre o produto e os operadores.

De acordo com a Instrução Normativa n. 35, de 21 de agosto de 2019, os envases devem ser realizados em áreas limpas e os equipamentos que fornecem ar limpo devem ser classificados de acordo com a versão vigente da norma ISO 14644-1, seguindo os métodos de ensaio da ISO 14644-3. As áreas limpas devem ser classificadas de acordo com as características exigidas do ambiente. Na fabricação de medicamentos estéreis quatro graus de limpeza podem ser distinguidos (grau A, grau B, grau C e grau D), sendo suas características descritas no Quadro 11.12.

QUADRO 11.12 Características dos níveis de classificação de limpeza para áreas de envase

Grau A	A zona para as operações de alto risco como, por exemplo, a zona de envase, onde estão os reservatórios de tampas, ampolas abertas e frascos-ampolas e onde são feitas conexões assépticas. Normalmente, essas condições são fornecidas por uma estação de trabalho com fluxo de ar unidirecional ou isolador. Os sistemas de fluxo de ar unidirecional devem fornecer uma velocidade de ar homogênea na faixa de 0,36 a 0,54 m/s (valor de referência) medida na posição de trabalho das estações de trabalho abertas com fluxo de ar unidirecional. A manutenção do padrão de fluxo de ar unidirecional deve ser demonstrada e validada. Um fluxo de ar unidirecional e com velocidades mais baixas pode ser usado em isoladores e caixas com luva.
Grau B	O ambiente circundante da área grau A, ou seja, a zona que circunda as preparações e o envase assépticos.
Graus C e D	Áreas limpas para a realização de etapas menos críticas da fabricação de medicamentos estéreis.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Os operadores devem usar vestimentas específicas, de acordo com a classificação da área limpa, passando por treinamentos (teóricos e práticos) e qualificações periódicas. É necessária a validação de processo observando e limitando a posição fixa de cada operador. Independentemente da linha de operação, seja ela conceito aberto (Figura 11.17) ou totalmente fechado (isolador), todo processo passa por monitoramento ambiental de partículas viáveis (amostragem ativa, passiva e amostragem de contato) e amostragem de partículas não viáveis.

Os materiais utilizados no processo são esterilizados e os materiais não passíveis de esterilização sofrem desinfecção. Há uma forte tendência tecnológica no sentido de substituição de tanques de armazenamento de produtos e outros materiais, por sistemas *single-use* que são baseados em polímeros resistentes e com baixo ou nenhum nível de material extraível e lixiviável. Cabe observar, nos projetos de envases, a importância dos conectores que devem ser adequados e seguros em função da classe onde se faz as conexões e confiáveis ao processo. A vasta gama de opções de conectores requer a validação juntamente com o restante do processo via simulação asséptica.

10.4.2.1 Linhas semifechadas

Os RABS estão se tornando populares no setor do processamento asséptico, pois oferecem uma proteção de produto eficiente ao proporcionarem um alto nível de separação entre operadores e o núcleo asséptico crítico. Esses sistemas utilizam uma combinação de

barreira física e fluxo de ar dinâmico, a proteção do produto aproxima-se à de um isolador, sendo o sistema de barreira escolhido para várias aplicações. Os RABS reduzem significativamente o risco que representa uma intervenção humana direta e são cada vez mais requisitados pela indústria farmacêutica. Existem dois tipos de RABS, são os chamados RABS ativos e os RABS passivos:

- **RABS passivos:** são capazes de proporcionar um nível de qualidade asséptica semelhante a um isolador, fornecendo proteção através de uma barreira aerodinâmica sobre uma zona de processo crítico, sendo o ar limpo obtido através do sistema de filtração da área GRAU A (Módulo de Fluxo laminar ou Forro filtrante) (Figura 11.18a).
- **RABS ativos:** são capazes de proporcionar um nível de qualidade asséptica semelhante a um isolador, fornecendo proteção através de uma barreira aerodinâmica sobre uma zona de processo crítico, sendo o ar limpo obtido por filtração através de filtros HEPAS (Módulo de fluxo laminar) (Figura 11.18b).

10.4.2.2 Linhas fechadas

O isolador é uma tecnologia usada para dupla proposta, proteger o produto da contaminação do ambiente e das pessoas e, também, proteger pessoas de produtos tóxicos durante sua produção. A utilização dessa tecnologia minimiza as intervenções humanas em áreas de processamento e pode resultar em uma redução



FIGURA 11.17 Linhas abertas.

Fonte: Bernardo Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.



FIGURA 11.18 Exemplos de RABS passivos e ativos. (A) RABS passivos. (B) RABS ativos.

Fonte: (a) Bernardo Portella – ASCOM; (b) Breno Nascimento Silva – Bio-Manguinhos/Fiocruz.

significativa no risco de contaminação microbiológica dos produtos preparados assepticamente a partir do ambiente. O ambiente circundante deve ser controlado e, para o processamento asséptico, deve haver uma classificação de, no mínimo, grau D. Os isoladores apenas podem ser utilizados após a validação (ANVISA, 2019). Na Figura 11.19 pode-se observar a vista frontal e a vista posterior do isolador, respectivamente.

11.4.2.3 Simulação asséptica

A simulação asséptica é uma etapa regulatória dos processos assépticos, é regulada estritamente pelos órgãos sanitários nacionais e internacionais. No Brasil a regulação ocorre pela Anvisa sob a IN 35 de 2019.

As operações de fabricação são segregadas em duas categorias: (i) aquelas em que o produto passa por esterilização terminal; e (ii) aquelas que são conduzidas assepticamente em alguma ou em todas as etapas. Desta forma,



FIGURA 11.19 A: Vista frontal da envasadora sob isolador. B: Vista posterior da envasadora sob isolador.

Fonte: Breno Nascimento Silva – Bio-Manguinhos/Fiocruz.

chama-se de processo asséptico a fabricação de produtos estéreis alternativos para produtos que não podem ser esterilizados em seu recipiente final, devido à instabilidade da formulação. Assim, deve manter a esterilidade de um produto preparado a partir de materiais estéreis.

O processamento asséptico deve ser validado e deve incluir um teste de simulação do processo usando um meio nutriente. Esse teste deve imitar o mais próximo possível o processo de fabricação asséptico de rotina, incluindo todas as etapas críticas e subsequentes do processo de fabricação. Ainda, devem ser levadas em consideração as intervenções conhecidas que ocorrem durante o processo, bem como situações de pior caso.

Os testes de simulação do processo asséptico devem ser realizados como validação inicial, com três testes de simulação consecutivos e satisfatórios por turno, repetidos em intervalos definidos e após qualquer modificação significativa no sistema de aquecimento, ventilação e ar-condicionado, nos equipamentos, no processo e no número de turnos. Os testes de simulação de processo asséptico devem ser repetidos duas vezes ao ano por turno e processo.

11.4.3 Liofilização

A liofilização é um método de preservação de produtos que são particularmente sensíveis ao calor, por meio de secagem sem aquecimento. Na liofilização, o produto é inicialmente congelado e, em seguida, submetido a uma programação de temperatura e vácuo. O solvente – em geral, água – é removido por sublimação (secagem primária) e depois por dessorção (secagem

secundária). A liofilização fornece uma alternativa de estabilidade, potencialmente mais robusta, pela redução da mobilidade molecular e pelo retardamento das reações de deterioração mediadas pela água. A água presente no produto resultante deve alcançar valores tais em que não sejam sustentados crescimentos biológicos e reações químicas. Esse processo é realizado nos liofilizadores que são equipamentos dotados de uma série de componentes, entre eles: câmara de liofilização, condensador, sistema de refrigeração (compressores), sistema de vácuo (bomba de vácuo), bomba de circulação e aquecedor.

O produto deve ficar exposto nas prateleiras da câmara do liofilizador, ficando a superfície da câmara em contato direto com a superfície das prateleiras de maneira a propiciar a troca térmica entre eles. Na etapa de congelamento, o fluido que circula no interior das prateleiras é refrigerado de forma que este possa remover energia do produto, levando este ao congelamento. Na etapa de secagem ele deve ser aquecido, cedendo energia ao produto, permitindo sua secagem. Durante a etapa de secagem o sistema de vácuo é responsável pela redução da pressão, e o vapor oriundo do processo da secagem fica retido nas serpentinas geladas do condensador.

A utilização do equipamento está relacionada a uma preparação rigorosa (que inclui limpeza, degelo do condensador, troca e esterilização de filtro, esterilização da câmara e condensador, testes adicionais de estanqueidade), para garantir a qualidade e confiabilidade do processo, agregando mais tempo a toda a cadeia produtiva, pois para todo o processo é preciso trabalhar com margens de segurança. O Quadro 11.13 descreve as 3 fases primordiais de um ciclo de liofilização.

QUADRO 11.13 Características das fases de um ciclo de liofilização

Congelamento	Tem como objetivo levar o grau de mobilidade da água na região intersticial próximo a zero para que na próxima fase se inicie congelado ou inferior a sua temperatura de colapso, temperatura esta em que a quantidade de água móvel na região intersticial é insignificante. No congelamento as moléculas da água interagem entre si, formando os cristais de gelo, sendo o soluto segregado em regiões limitadas pelos cristais de gelo chamadas de regiões intersticiais. Porém, uma pequena porção da água presente se liga fortemente ao soluto, permanecendo como um novo elemento nesta região. A temperatura de congelamento do produto deve ser estabelecida a partir da avaliação do ponto eutético da formulação.
Secagem primária	Consiste na sublimação dos cristais de gelo, à baixa temperatura e sob vácuo; quando para a transformação de água sólida em vapor é preciso dar energia ao sistema. O vapor é removido progressivamente, sendo formado um caminho entre os cristais de gelo e a superfície da formulação. A sublimação sempre ocorrerá da superfície para dentro da formulação, sempre com uma interface separando a camada já sublimada da camada ainda congelada. Uma fonte de calor deverá fornecer energia – calor latente – para esta interface. Uma vez que o vapor tenha sido formado, este é capturado e preso em uma armadilha de frio também chamada de condensador.
Secagem secundária	Após sublimação, a estrutura remanescente do produto ainda contém água fortemente ligada. Esta umidade residual presente na formulação deve ser removida a níveis que não propiciem o crescimento biológico ou que induzam a reações químicas. Sendo assim, nesta fase, a temperatura do produto é levada a valores positivos de modo que as moléculas de vapor d'água que permaneceram adsorvidas à estrutura remanescente da fase primária ganhem energia suficiente para deixar o produto.

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Um processo de liofilização otimizado pode ser obtido quando os parâmetros (pressão da câmara de secagem e temperatura das prateleiras), durante o ciclo, forem controlados visando minimizar a perda na qualidade do produto a ser liofilizado. Além de projetar um ciclo de liofilização que seque um produto, é preciso pensar no potencial de repetição do processo, seu escalonamento para produção e na capacidade do liofilizador industrial (com carga completa ou não) para atingir os parâmetros do ciclo desenhado.

Na Figura 11.20 estão ilustrados os três estágios do ciclo de liofilização e na Figura 11.21 o corredor de carregamento dos liofilizadores e parte interna da câmara do liofilizador, respectivamente.

11.4.4 Recravação, inspeção visual, rotulagem e embalagem

Após o processo de liofilização, necessariamente, devem ser realizados processos de fechamento dos fras-



FIGURA 11.21 Parte interna da câmara do liofilizador.
Fonte: Bernardo Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.

cos com selo recravável sob módulo de fluxo laminar com filtros HEPA, para então serem considerados de fato fechados. Na sequência, são realizadas as etapas de inspeção visual em 100% dos frascos (automática e/ou

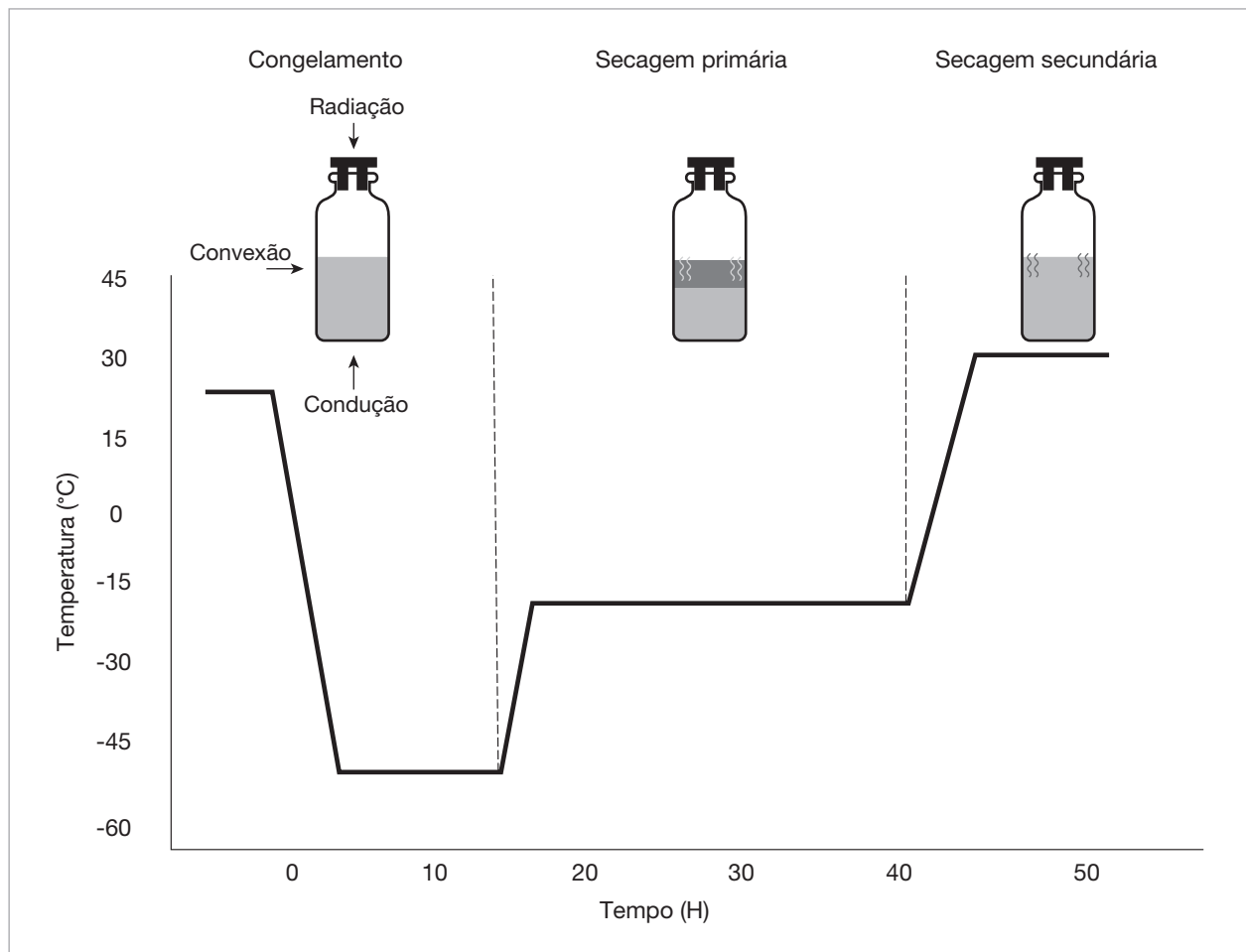


FIGURA 11.20 Estágios do ciclo de liofilização.

Fonte: Bio-Manguinhos, trabalho de desenvolvimento institucional.

manual), em seguida são realizadas as etapas de rotulagem e embalagem, em que são inseridas as informações do lote, fabricante, data de validade, entre outros dados.

11.4.4.1 Recravação

Após o processo de envase, necessariamente, é preciso garantir o fechamento dos frascos, este processo é chamado de recravação. A recravação é realizada por máquina automática e utilizam-se selos de alumínio tipo *flip-off* (com uma lâmina para ser levantada pelo usuário) ou *tear-off* (com uma cobertura de plástico para ser retirada imediatamente antes da utilização). Este processo é realizado, obrigatoriamente, sob fluxo laminar grau A, podendo variar em equipamentos fechados ou semifechados (RABS ou máquinas sob módulo de fluxo laminar para então ser considerado de fato fechado). Os produtos líquidos passam por essa etapa imediatamente após o envase e os produtos liofilizados após o encerramento do ciclo de liofilização.

11.4.4.2 Inspeção visual e teste de integridade

Os produtos envasados devem, por força de requerimentos de qualidade nacional e internacionais (em especial as farmacopeias europeia e norte-americana), ser submetidos a inspeção visual. Na inspeção visual, busca-se verificar defeitos cosméticos, particulados exógenos ao processo, verificação do volume declarado. As inspeções podem ser realizadas de maneira manual, semiautomática e automática. É recomendada a combinação destas para melhor eficiência e complementação de todos os parâmetros que envolvem a fase do processamento. O volume máximo de inspeções em cada lote é regulado pelos requisitos de qualidade.

Recentemente, foi adicionada a obrigatoriedade de algumas embalagens primárias (p. ex., ampolas e bisnagas) serem 100% submetidas ao teste de integridade, sendo uma tendência que o mesmo requisito seja estabelecido para frascos fechados por rolhas plásticas com recrave (selo de alumínio). Os testes de integridade podem ser realizados com a inspeção automática ou mesmo em um outro momento após a inspeção automática, muitas empresas farmacêuticas realizam imediatamente antes da etapa de embalagem. O teste de integridade pode ser realizado por alta voltagem para frascos e ampolas com produtos líquidos e por vácuo para bisnagas plásticas. Em alguns arranjos produtivos é possível encontrar testes de integridade por vácuo para frascos também. Para frascos com produtos liofilizados usa-se também, de forma mais recente, o sistema de High Gas Analyser (HGA), com o qual, por meio de um feixe de luz (*laser*), verifica o nível de oxigênio dentro do frasco, o que de maneira indireta pode detectar eventual perda de integridade.

a) Automática

Por um lado, a inspeção é realizada por máquinas com uso de câmeras ou sistemas de detecção por feixe de luz – sistema amplamente utilizado pela indústria farmacêutica combinado à inspeção visual manual dado ao alto grau de incerteza na detecção de defeitos. Por outro lado, compensa pela rapidez de processamento de frascos e ampolas (Figura 11.22) e pelo menor uso de mão de obra, ainda que seja uma especialidade bastante incomum e as indústrias precisam oferecer longos treinamentos.

b) Manual

A inspeção visual manual é a forma mais antiga e a mais amplamente utilizada pelas companhias farmacêuticas e confere um alto grau de acuracidade ao processo. Esse método também possui uma série de parâmetros regulados, como o tempo que deve ser conferido a cada unidade a ser inspecionada, o tempo de descanso dos inspetores, o nível de luminosidade no ato da inspeção e a distância do frasco a lâmpada, entre outros parâmetros (Figura 11.23).

c) Semiautomática

Esse modelo é bastante utilizado pelas companhias produtoras de imunobiológicos e é uma forma de acelerar a inspeção manual com a otimização do tempo de inspeção por unidade com um número menor de inspetores. Em geral, quase que a totalidade dos equipamentos utilizam lentes neste processo, o que não é recomendado pelas principais farmacopeias e fóruns que tratam do tema.

Em todos os processos de inspeção – sejam automáticos, semiautomáticos ou manuais –, em cada porção destes deve ser realizado um teste do nível de qualidade aceitável (NQA). Este teste contém níveis variados de criticidade estudados e determinados para cada produto de acordo com suas características e tamanhos da porção analisada (lote). Usa-se a tabela da NBR 5425 – 01/1985, do guia para inspeção por amostragem no controle e certificação de qualidade. Independentemente do nível de criticidade utilizado inicialmente para cada produto, as revisões subsequentes devem necessariamente aumentar a rigidez dos critérios de aceitação.

Nos processamentos de biológicos constitui-se como um dos principais controles o tempo de refrigeração, sendo muito utilizados os termos *time of refrigeration* (TOR), estes devem ser controlados em planilhas específicas e somados em cada etapa do processo. As etapas devem ter limites claros de tempo e estes são conferidos no desenvolvimento e nas validações de processos. Usa-se o termo em inglês *holding time* para cada um dos passos.



FIGURA 11.22 A: Máquina de inspeção visual utilizada para frascos. B: Máquina de inspeção visual com ampolas.

Fonte: Bernardo Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.



FIGURA 11.23 Inspeção visual manual.

Fonte: Bernardo Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.

11.4.4.3 Rotulagem e embalagem

Nestas etapas existem requisitos de segurança, aspectos de apresentação que devem seguir tanto normas nacionais quanto normas dos órgãos internacionais. Busca-se, cada vez mais, a automação dos processos de rotulagem e embalagem para evitar erros e fraudes. Normalmente, são processos em larga escala e mais recentemente normas foram instituídas para serialização de cada embalagem e rastreamento destas. Pode-se descrever como pontos necessários a este processo os seguintes passos (Figura 11.24): (i) recebimento: em frascos, bisnagas e ampolas envasados e revisados em

embalagens primárias, recebimento e armazenamento de materiais de embalagem; (ii) processo: rotulagem (rótulo em cada frasco, bisnaga ou ampola), codificação e checagem eletrônica dos dados variáveis (datas, lotes etc.); (iii) embalagem: codificação das caixas com os cartuchos contendo a embalagem primária, pesagem e checagem eletrônica dos dados variáveis, sejam eles em cartuchos de frascos, bisnagas ou ampolas; (iv) expedição de produtos acabados e dados nos sistemas organizacionais como ERP, planilhas etc.

A Figura 11.25 apresenta uma máquina de embalagem de frascos e seringas em cartucho de papel em várias perspectivas.

A Figura 11.26 apresenta a máquina de embalagem de frascos em blisters em várias perspectivas.

11.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vale destacar que, nos últimos anos, pesquisadores intensificaram o desenvolvimento de modos contínuos de operação para todas as operações unitárias de processos de *downstream*. Os dispositivos de retenção celular, baseados em filtração tangencial com membrana de microfiltração para biorreatores que operam em perfusão, vêm entregando alta performance, propiciando concentrações celulares de até $1,0 \times 10^8$ cél./mL com 90% de viabilidade. Além disso, os dispositivos de retenção celular disponíveis no mercado, como o fluxo tangencial alternante (ATF, do inglês *alternating tangential flow*), vêm demonstrando robustez ao longo do tempo.

Existem opções de sistemas contínuos para as principais operações de *downstream* utilizadas em processos de produção de biofármacos, algumas com mais tempo de desenvolvimento, como a cromatografia contínua, e outras com menos, como a operação de TFF. Tanto a cromatografia quanto o sistema TFF contínuos são baseados em sistemas de múltiplas colunas ou múltiplos módulos de membrana. Este último denominado de SPTFF (*single pass tangential flow filtration*), no qual o produto passa uma única vez por cada módulo para ser concentrado, ou seja, não há recirculação, o que

reduz a tensão de cisalhamento, o tempo de processo e o consumo de energia e materiais. A SPTFF também pode ser operada para troca de tampão, realizando-se algumas adaptações no sistema, porém tem-se observado que a eficiência de diafiltração ainda é inferior ao sistema tradicional. Na operação de inativação viral também se torna viável a utilização no modo contínuo através da tecnologia gene regulador de condutância transmembrana da fibrose Cística (CFIR, do inglês *coiled flow inversion reactor*), que consiste resumidamente na utilização de misturadores em linha e reator em espiral.

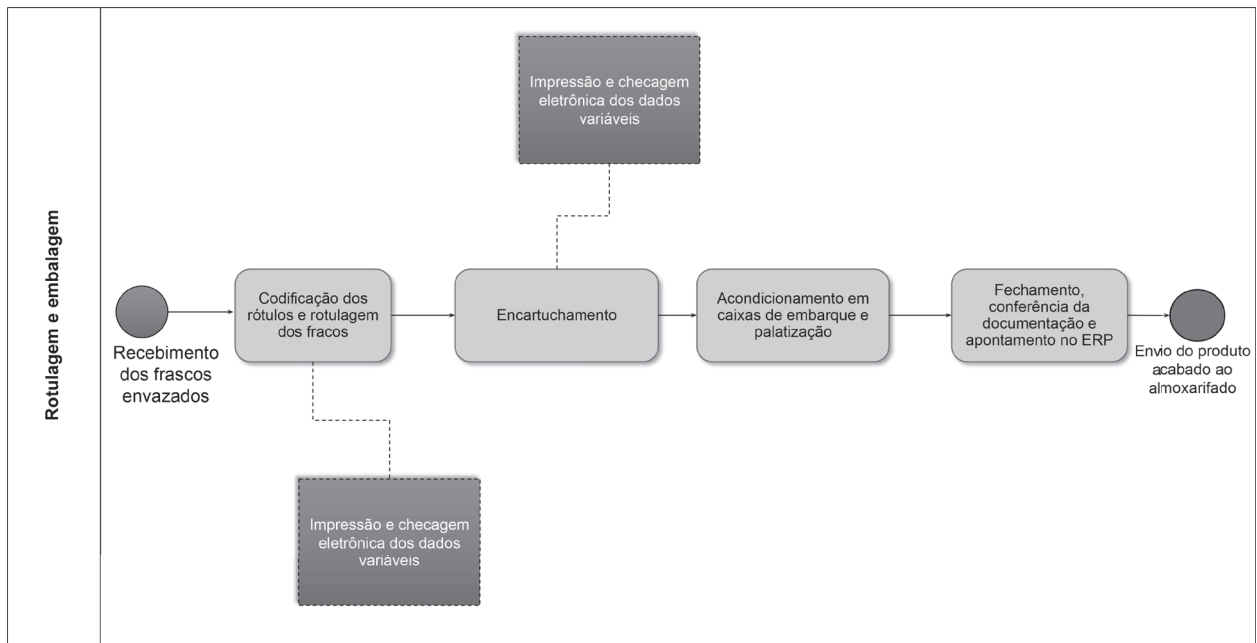


FIGURA 11.24 Fluxograma de rotulagem e embalagem de produtos biológicos.

Fonte: DEPMI / Bio-Manguinhos.



FIGURA 11.25 Máquina de embalagem de frascos e seringas em cartuchos de papel em diferentes perspectivas.

Fonte: Bernardo Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.



FIGURA 11.26 Máquina de embalagem de frascos em blisters em diferentes perspectivas.

Fonte: Bernardo Portella – ASCOM Bio-Manguinhos/Fiocruz.

O grande desafio para obtenção de processos 100% contínuos é a integração entre as etapas e a coleta de dados on-line do sistema para possibilitar um controle, monitoramento e otimização de forma precisa do processo, para obter processos cada vez mais robustos e eficientes. Provavelmente processos contínuos ou semicontínuos serão uma tendência para as novas instalações para produção de IFA de biofármacos e vacinas, pois existe um ganho significativo em produtividade atrelada a uma redução de área produtiva (MADSEN et al., 2022; RATHORE et al., 2022).

As etapas de produção de IFA e de processamento final são reguladas por normas rígidas de controle e validação de processos. Para os equipamentos são requeridos qualificação de instalação, operação e desempenho, assim como as áreas limpas nas quais estão instalados. Cada etapa possui um estudo intensivo de desempenho e controle de indicadores, as melhores práticas devem orientar e guiar todas as fases de implantação, operação e até mesmo o descomissionamento das instalações quando for o caso. Assim, a indústria farmacêutica e biotecnológica aporta esforços no aperfeiçoamento contínuo dos processos de produção de IFA e no processamento final com o intuito de agregar segurança e eficácia aos processos produtivos.

REFERÊNCIAS

1. AMER, M.; FENG, Y.; RAMSEY, J. D. Using CFD simulations and statistical analysis to correlate oxygen mass transfer coefficient to both geometrical parameters and operating conditions in a stirred-tank bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 3, p. e2785, 2019.
2. ANTARES VISION GROUP. **Semi-Automatic Inspection Machines**. Disponível em: <https://www.antaresvisiongroup.com/lifescience/products/semi-automatic-inspection-machines/>. Acesso em: 14 abr. 2023.
3. ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. Disponível em: https://fitoterapiabrasil.com.br/sites/default/files/documentos-oficiais/farmacopeia_brasleira_6a_ed-com_errata.pdf. Acesso em: 23 jan. 2023.
4. BASTOS, R. C. et al. Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4281-4287, ago. 2015.
5. BECKER, T. et al. Influenza Vaccines: Successes and Continuing Challenges. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. Supplement_4, p. S405-S419, 30 set. 2021.
6. BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzymology**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2009.
7. BUTANTAN. **Como é feita a vacina da influenza do Butantan? Produção envolve IFA próprio e meses de formulação**. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/como-e-feita-a-vacina-da-influenza-do-butantan-producao-envolve-ifa-proprio-e-meses-de-formulacao>. Acesso em: 3 abr. 2023.
8. CHEN, J.-R. et al. Better influenza vaccines: an industry perspective. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 33, 14 dez. 2020.
9. DRM. **The Fundamix**. Disponível em: <https://drm-filters.com/portfolio-item/fundamix-vibromixer>. Acesso em: 23 jan. 2023.
10. ERICKSON, K. **Chromatography scale-up: don't get tied down by bed height**. Disponível em: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/chromatography-scale-up-using-column-volume-instead-of-bed-height-10001#>. Acesso em: 23 jan. 2023.
11. GEORGE, M. et al. Production of cell culture (MDCK) derived live attenuated influenza vaccine (LAIV) in a fully disposable platform process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 6, p. 906-917, 8 abr. 2010.
12. GOMPERS, E.; LUNDBLAD, R.; ADAMSON, R. The Manufacturing Process of Recombinant Factor VIII, Recombinate. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 247-251, out. 1992.
13. HANSEN, E. B. Chromatography Scale-up on a Volume Basis. In: **Preparative Chromatography for Separation of Proteins**. 1. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2017.
14. HARRISON, R. et al. **Bioseparations Science and Engineering**. New York: Oxford University Press, 2003.

15. JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B. Vaccine process technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1443–1460, jun. 2012.
16. KONTORAVDI, K.; JIMENEZ DEL VAL, I. Computational tools for predicting and controlling the glycosylation of biopharmaceuticals. **Elsevier**, v. 22, p. 89–97, 2018.
17. LUCA, M. M. et al. Nitrogen-gas bubbling during the cultivation of *Clostridium tetani* produces a higher yield of tetanus toxin for the preparation of its toxoid. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 2, p. 161–163, 1997.
18. MA, J.; KILBY, G. W. Sensitive, Rapid, Robust, and Reproducible Workflow for Host Cell Protein Profiling in Biopharmaceutical Process Development. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 8, p. 3396–3404, 7 ago. 2020.
19. MADSEN, E. et al. Single pass tangential flow filtration: Critical operational variables, fouling, and main current applications. **Separation and Purification Technology**, v. 291, p. 120949, jun. 2022.
20. MAHDINIA, E.; CEKMECELIOGLU, D.; DEMIRCI, A. Bioreactor Scale-Up. In: **Fermentation Technology**. 1. ed. Zurique: Springer Cham, 2019. p. 213–233.
21. MILIÁN, E.; KAMEN, A. A. Current and Emerging Cell Culture Manufacturing Technologies for Influenza Vaccines. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
22. MILLIPORE. **Protein Concentration and Diafiltration by Tangential Flow Filtration**. Disponível em: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/MILLIPORE_TFF.pdf. Acesso em: 23 jan. 2023.
23. MORAES, A.; AUGUSTO, E.; CASTILHO, L. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008.
24. MUNIANDI, C. et al. **Standardization of process for increased production of pure and potent tetanus toxin**. **Journal of Microbiology and Infectious Diseases** Sağlık Araştırmaları Derneği, , 2013.
25. PATO, T. P.; DE PÁDUA R. BARBOSA, A.; DA SILVA JUNIOR, J. G. Purification of capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup C by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 832, n. 2, p. 262–267, 2006.
26. PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. ; OFFIT, P. A. **Vaccines**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.
27. PRADO, S. **Aplicabilidade do Antígeno Tetânico Conjugado com Derivados do Monometoxi-Polietilenoglicol Sally Müller Affonso Prado**. [s.l.] USP/Instituto Butantan/IPT, 2008.
28. RATHORE, A. S. et al. Enablers of continuous processing of biotherapeutic products. **Trends in biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 804–815, jul. 2022.
29. ROUSH, D. J.; LU, Y. Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 3, p. 488–495, 2008.
30. RUPPACH, H. Viral safety for biotherapeutics and biosimilar. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 37, p. 23–29, 2020.
31. SARTORIUS. **pDNA Production**.
32. SCHMIDELL, W.; JUNIOR, A. C. B. Agitação e aeração em biorreatores. In: EDGARD BLÜCHER LTDA (Ed.). **Coleção Biotecnologia Industrial – 2. ed. Engenharia bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2021. p. 241–306.
33. SEKURA, R. et al. **Production of Bordetella Pertussis Toxin with a Low Concentration of Iron**. United States Patents, 1994. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/24/2b/6b/f9436d59f6c660/US5338670.pdf>
34. SHIVANANDAPPA, K. et al. Assessment of *Bordetella pertussis* Strain 509 Cell Mass Yield in Baffle and Vortex Mode of Agitation during Large Scale Industrial Fermentor Cultivation. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 06, n. 01, p. 1–6, 2015.
35. SHOKRI DOODEJI, M.; ZERAFAT, M. A Review on the Applications of Nanofiltration in Virus Removal and Pharmaceutical Industries. **Glob Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 5, p. 125–127, 2018.
36. SHUKLA, ABHINAV A. KANDULA, J. R. **Harvest and Recovery of Monoclonal Antibodies from Large-Scale Mammalian Cell Culture**. Disponível em: <https://www.biopharminternational.com/view/harvest-and-recovery-monoclonal-antibodies-large-scale-mammalian-cell-culture>. Acesso em: 23 jan. 2023.
37. SOFER, G. Virus inactivation in the 1990s – And into the 21st century: Part 4, culture media, biotechnology products, and vaccines. **BioPharm International**, n. January, 2003.
38. TEKOAH, Y. et al. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the Protalix experience. **Plant biotechnology journal**, v. 13, n. 8, p. 1199–1208, out. 2015.
39. TELSTAR. **Sistemas de barreira para acesso restrito (RABS)**. Disponível em: <https://www.telstar.com/pt-br/equipamento-para-producao-farmaceutica/sistemas-de-barreira-e-fluxo-laminar/sistemas-de-barreira-para-acesso-restrito-rabs/>. Acesso em: 11 abr. 2023.
40. VAN HEMERT, P. Vaccine production as a unit process. **Progress in industrial microbiology**, v. 13, p. 151–271, 1974.
41. VAN REIS, R. et al. Linear scale ultrafiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 5, p. 737–746, 5 set. 1997.
42. VERGAUWEN, L. et al. **Estratégias de fabricação de vacinas e produtos terapêuticos de mRNA**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/pharmaceutical-and-biopharmaceutical-manufacturing/vaccine-manufacturing/manufacturing-strategies-for-mrna-vaccines>. Acesso em: 23 jan. 2023.
43. WHO. **Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines**. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/requirements-for-diphtheria-tetanus-pertussis-and-combined-vaccinesd5900f3c-b63e-4f7e-b7df-fcef6a149b39.pdf?sfvrsn=6da899bc_1&download=true. Acesso em: 20 jan. 2023.
44. WICKRAMASINGHE, S. R. et al. Understanding virus filtration membrane performance. **Fuel and Energy Abstracts**, 2010.
45. WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, nov. 2004.
46. XU, S.; CHEN, H. High-density mammalian cell cultures in stirred-tank bioreactor without external pH control. **Journal of biotechnology**, v. 231, p. 149–159, ago. 2016.
47. ZHANG, P. et al. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. **Drug discovery today**, v. 21, n. 5, p. 740–765, maio 2016.
48. ZYDNEY, A. L. New developments in membranes for bioprocessing – A review. **Journal of Membrane Science**, v. 620, p. 118804, fev. 2021.

O papel da qualidade e regulação

Rosane Cuber Guimarães

Sheila Barros Matsuoka

Bianca Waruar Paulo Lobo

Gustavo Mendes Lima Santos

Este capítulo apresenta a importância de conceitos e práticas da Qualidade e da Regulação Sanitária no desenvolvimento e comercialização de produtos biotecnológicos. O capítulo se inicia pela apresentação dos conceitos de qualidade em relação aos produtos biotecnológicos e às Boas Práticas de Fabricação (BPF), Clínicas (BPC) e Laboratoriais (BPL). Em seguida, avança pela caracterização do papel da qualidade na produção de vacinas, testes para diagnósticos e biofármacos. Posteriormente, aborda os aspectos históricos sobre regulação em biotecnologia e biossimilares no mundo e no Brasil.

12.1 CONCEITOS DE QUALIDADE

Qualidade é um conceito subjetivo, é o modo de ser, é a propriedade de qualificar os mais diversos serviços, objetos e indivíduos. Segundo a *International Standardization Organization* (ISO), qualidade é a adequação e conformidade aos requisitos que a própria norma e os clientes estabelecem. Em outras palavras, a qualidade é o nível de perfeição de um processo, serviço ou produto entregue pela sua empresa.

Por ser um conceito amplo e subjetivo, a qualidade precisa ser traduzida em um sistema que tenha objetivos e métricas que possam ser implementados e medidos para avaliar o grau de perfeição de um processo, serviço ou produto produzido e entregue à sociedade. Segundo o Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), a implementação de um sistema da qualidade na produção de produtos biotecnológicos tem três objetivos principais (EMA, 2015): (i) estabelecer, implementar e manter um sistema que permita a entrega de produtos

com os atributos de qualidade adequados para atender às necessidades de pacientes, profissionais de saúde, autoridades regulatórias (incluindo a conformidade com registros regulatórios aprovados) e outros clientes internos e externos; (ii) desenvolver e usar sistemas eficazes de monitoramento e controle para o desempenho do processo e qualidade do produto, garantindo assim a continuidade da adequação e capacidade dos processos; e (iii) identificar e implementar melhorias apropriadas na qualidade do produto, melhorias no processo, redução da variabilidade, inovações e aprimoramentos do sistema de qualidade farmacêutica, aumentando assim a capacidade de atender às necessidades de qualidade de maneira consistente.

Um Sistema da Qualidade Farmacêutica deve ser aplicado durante todo o ciclo de vida de um produto biotecnológico, conforme ilustrado na Figura 12.1.

Na primeira etapa, Desenvolvimento Farmacêutico, o objetivo é projetar um produto e seu processo de fabricação para fornecer consistentemente o desempenho pretendido e atender às necessidades de pacientes e profissionais de saúde, autoridades reguladoras e exigências dos clientes internos. As abordagens para o

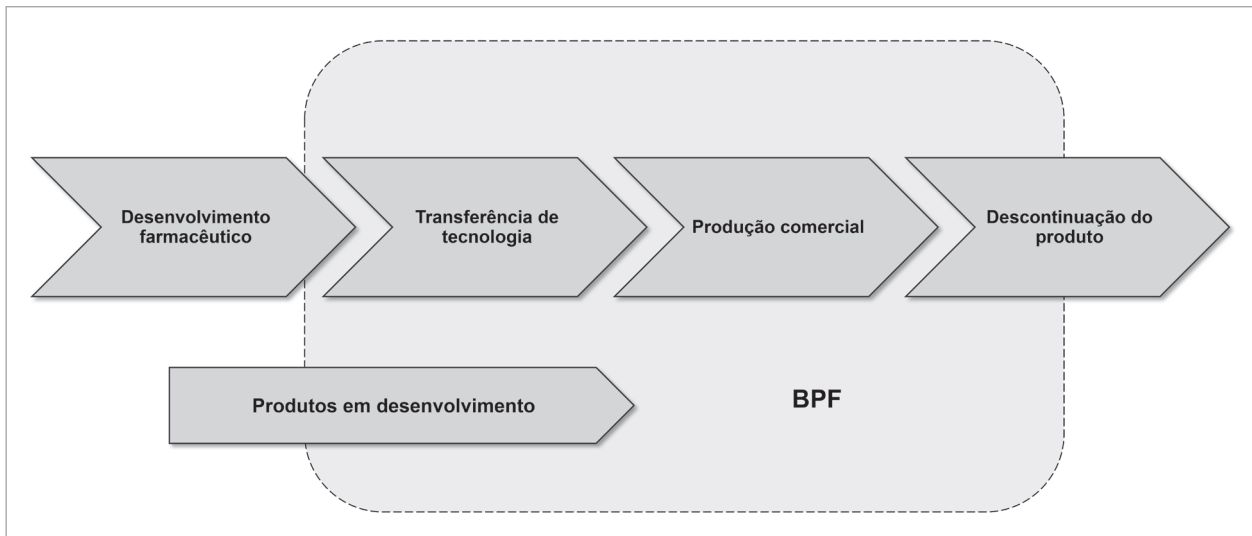


FIGURA 12.1 Sistema da Qualidade Farmacêutica.
BPF: Boas Práticas de Fabricação. Fonte: adaptada de EMA (2015).

desenvolvimento farmacêutico estão descritas no guia Q8 do ICH (ver Box 12.1). Os resultados de estudos de desenvolvimento exploratório, não clínico e clínico, fazem parte do Desenvolvimento Farmacêutico.

BOX 12.1

GUIA Q8 DO ICH



Na segunda etapa, Transferência de Tecnologia, o objetivo é transferir o conhecimento de produtos e processos do desenvolvimento para a fabricação comercial, com vistas a alcançar a realização do produto. Esse conhecimento forma a base do processo de fabricação, estratégia de controle, abordagem de validação de processo e a melhoria contínua.

Na terceira etapa, Produção Comercial, o objetivo é alcançar a realização do produto, estabelecer e manter um estado de controle e facilitar a melhoria contínua. O Sistema de Qualidade Farmacêutica deve garantir que a qualidade desejada do produto seja alcançada

rotineiramente, o desempenho adequado do processo, o conjunto de controles seja apropriado, as oportunidades de melhoria sejam identificadas e avaliadas e o corpo de conhecimento seja continuamente expandido.

Na quarta etapa, Descontinuação do Produto, o objetivo é gerenciar efetivamente o estágio final do ciclo de vida útil do produto. Para a descontinuação do produto, uma abordagem pré-definida deve ser usada para gerenciar atividades como retenção de documentação e amostras e a avaliação contínua do produto (p. ex., tratamento de reclamações e estabilidade), bem como os relatórios em conformidade com as exigências regulatórias.

12.2 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO, CLÍNICAS E LABORATORIAIS

As “Boas Práticas” podem ser definidas de várias maneiras. No entanto, um ponto em comum à maioria das definições implica em estratégias, abordagens e/ou atividades que se mostraram eficazes, eficientes, sustentáveis e/ou transferíveis, por meio de pesquisa e avaliação, e que conduzem de maneira confiável a um resultado desejado (EWI, 2021). A Figura 12.2 demonstra como se aplicam as Boas Práticas (BPx) específicas em cada etapa do ciclo de vida de um produto biológico. Cada uma das BPx citadas serão abordadas de maneira mais elucidativa no decorrer deste capítulo.

A segurança dos produtos biológicos é um assunto de extrema importância e preocupação para toda a população. As vacinas, por exemplo, constituem uma severa preocupação para a saúde pública, visto que ocupam uma posição única no mercado (KESSELHEIM, 2011).

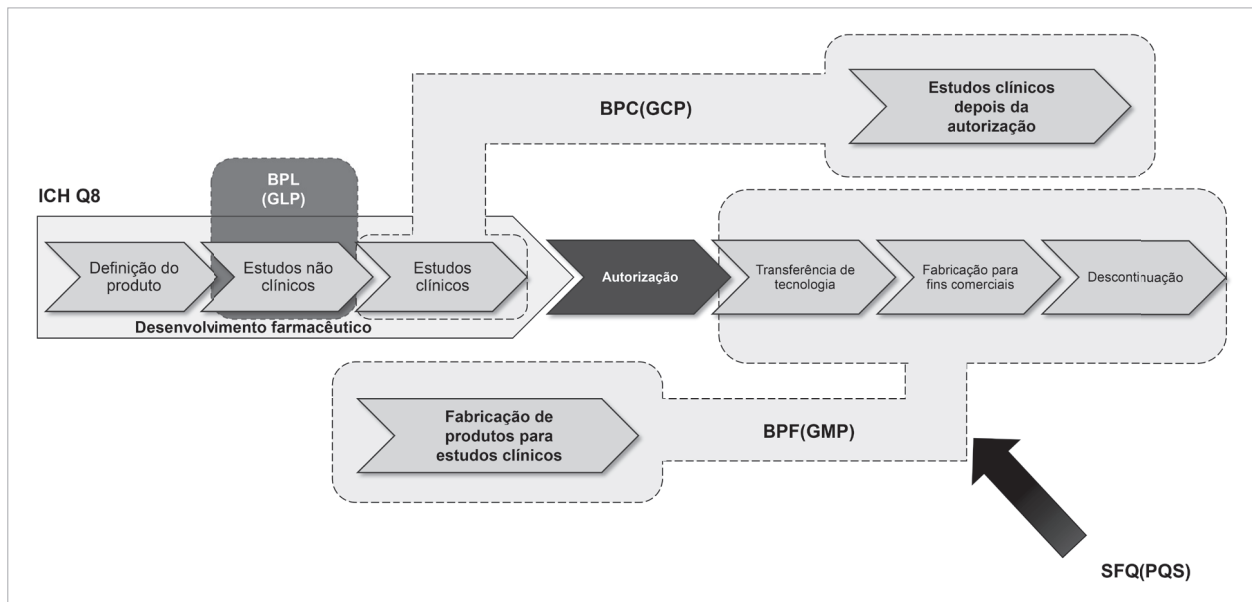


FIGURA 12.2 Relação das Boas Práticas e etapas do ciclo de vida do produto.

BPC: Boas Práticas Clínicas; Fabricação; BPF: Boas Práticas de Fabricação; BPL: Boas Práticas Laboratoriais (BPL); GCP: *Good Clinical Practice*; GLP: *Good Laboratory Practice*; GMP: *Good Manufacturing Practice*; PQS: *Pharmaceutical Quality System*. SFQ: sistema de qualidade farmacêutica.

Fonte: adaptada de EMA (2015).

Quando outros bens de consumo são defeituosos, seus fabricantes, geralmente, são estritamente responsáveis pelos danos resultantes. No entanto, nos produtos da área médica, como medicamentos (vacinas, biofármacos etc.), as mesmas substâncias que os tornam eficazes podem levar ao surgimento de reações adversas. Isso é sempre uma grande preocupação. Desta forma, é responsabilidade dos fabricantes destes produtos informar adequadamente os consumidores sobre os seus riscos. Este princípio ajuda a garantir que os produtos permaneçam no mercado, visto que são de contribuição vital para a saúde pública (KESSELHEIM, 2011).

Para garantir que a população seja atendida com os medicamentos seguros, eficazes e com qualidade para todos, uma série de legislações têm sido publicadas, as quais visam garantir o fornecimento de medicamentos. A promulgação dessas leis começou no início do século XX (ano 1901), quando pacientes com difteria eram tratados com uma antitoxina derivada de soro sanguíneo de cavalos. Após a morte de 13 crianças com tétano devido a uma antitoxina contaminada, o congresso norte-americano aprovou a Lei de Controle Biológico de 1902, tendo sido a primeira regulamentação americana para a produção de vacinas e antitoxinas, reconhecendo a necessidade de salvaguardas regulatórias. Essa lei forneceu ao governo norte-americano o primeiro controle sobre os processos usados para fabricar produtos biológicos e, também, a responsabilidade de garantir a sua segurança para a população (BREN, 2006).

Os produtos biológicos incluem produtos médicos feitos a partir de fontes vivas, como seres humanos, animais, plantas e microrganismos (BREN, 2006). Pode-se também definir um produto biológico como um medicamento produzido por um sistema biológico, em oposição aos processos produtivos que utilizam reações estritamente químicas. Os produtos biológicos podem ser do tipo tradicional, como vacinas vivas; ou produzidos biotecnologicamente, como anticorpos monoclonais e vacinas de subunidades, que também podem ser referidos como medicamentos biológicos (WHO, 2022).

Os incidentes de 1901 levaram à discussão sobre a prevenção de uma recorrência, sendo uma opção a regulamentação governamental dos fabricantes de produtos biológicos. Algumas publicações médicas, também, pediam inspeção governamental e licenciamento dos fabricantes de produtos biológicos (COLEMAN, 2016). Em julho de 1902 o presidente norte-americano Theodore Roosevelt assinou a lei de 1902, que agora é chamada de Lei de Controle Biológico (*Biologics Control Act*). Em termos gerais, a lei proibia a venda ou troca de qualquer produto biológico no comércio interestadual ou estrangeiro, ou no distrito de Columbia, a menos que o produto tivesse sido produzido em estabelecimento licenciado anualmente pela autoridade do sistema de saúde pública. Além disso, a lei proibia afirmações falsas e exigia o número da licença governamental e uma data de validade no rótulo do produto. A lei de 1902 foi administrada pela autoridade de saúde pública americana,

sistema de saúde pública, até 1972, quando a responsabilidade foi transferida para a agência norte-americana de regulação de alimentos e medicamentos, Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – traduzido do inglês *Food Drug Administration*) (COLEMAN, 2016).

O controle do governo sobre os medicamentos cresceu substancialmente nos últimos 100 anos, saindo de nenhum para um controle extenso. Os produtos farmacêuticos estão entre os mais regulados, não apenas nos Estados Unidos, como no mundo (HOOPER, 2022).

Dentre os diversos controles regulados por legislações de saúde, um dos principais é o conceito Boas Práticas de Fabricação (BPF ou GMP, do inglês, *Good Manufacture Practice*). Esse conceito não é novo e teve o seu surgimento motivado por diversos incidentes.

As BPF se referem a um conjunto de regulamentos e normas aplicados às indústrias farmacêuticas, com o objetivo de garantir a qualidade, eficácia e segurança de medicamentos e produtos. É uma questão de construir a qualidade ao invés de testar a qualidade. Os requerimentos de BPF têm a principal meta de garantir a qualidade e proteção do paciente. Isso significa que devem ser fabricados produtos com qualidade, pureza, potência e segurança adequadas. Os fabricantes devem ter as suas atividades registradas em órgãos regulamentadores, garantindo que os medicamentos e produtos têm sua produção baseada num protocolo padronizado e aprovado (ARAYNE; SULTANA; ZAMAN, 2008).

Pode-se dizer que o conceito de BPF se iniciou na década de 1940, nos Estados Unidos, após um incidente envolvendo a empresa farmacêutica Winthrop, de Nova York. Essa empresa distribuiu ao mercado comprimidos de sulfatiazol contaminados com Fenobarbital, levando centenas de pessoas à morte e outras tantas a apresentarem reações adversas (SHIELDS, 1999). Este incidente levou o FDA a revisar os requisitos de fabricação e controle de qualidade de toda a indústria farmacêutica, desenvolvendo uma abordagem que se denominaria, posteriormente, de BPF (ARAYNE; SULTANA; ZAMAN, 2008; SHIELDS, 1999).

O termo BPF apareceu oficialmente pela primeira vez em 1962, numa emenda à Lei de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos dos Estados Unidos (ARAYNE; SULTANA; ZAMAN, 2008; GPO, 1962). O documento inicial da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre BPF foi elaborado em 1967, por um grupo de consultores, a pedido da vigésima Assembleia Mundial da Saúde. O primeiro Guia da OMS com diretrizes para BPF foi publicado em seguida, em 1969 (ARAYNE; SULTANA; ZAMAN, 2008; WHO, 1969).

No Brasil, a primeira lei que exigiu o cumprimento de normas de vigilância sanitária para medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos e licenciamento das

indústrias pelos órgãos sanitários das unidades federativas data de 1976 – Lei n. 6360/76 (BRASIL, 1976). Não obstante, a história da regulamentação na indústria farmacêutica também apresenta alguns episódios, envolvendo a produção e qualidade de medicamentos, como o caso do contraceptivo oral Microvlar® e do medicamento Celobar®, um contraste usado em exames radiológicos que levou ao óbito 20 pacientes em Goiânia (DEUS; SÁ, 2013).

Em 1988, com a promulgação da Constituição Federal (CF), o Estado brasileiro passa a ter o dever de garantir à população o acesso aos serviços de saúde. Logo em seguida, em 1990, nascia o Sistema Único de Saúde (SUS), instituído pela Lei n. 8.080/1990, que determina os princípios da universalidade, integralidade e equidade/igualdade, além da formulação de uma política de medicamentos efetiva, como responsabilidades indelegáveis do Estado (BRASIL, 1990; DEUS; SÁ, 2013).

12.2.1 Boas Práticas de Fabricação

No Brasil, as BPF de medicamentos são hoje determinadas pela Resolução RDC n. 658, de 30 de março de 2022. Esta RDC define as BPF como a parte do gerenciamento da qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, de acordo com os padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro sanitário, autorização para uso em ensaio clínico ou especificações do produto (BRASIL, 2022a).

No Brasil, somente medicamentos e produtos biológicos registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e fabricados ou importados por estabelecimentos devidamente autorizados pelos governos federais ou estaduais podem ser comercializados ou distribuídos (BRASIL, 1976; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Além disso, para solicitar o registro as empresas produtoras de medicamentos ou produtos biológicos devem cumprir as BPF determinadas pelas legislações nacionais e apresentarem o Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF), emitido pela Anvisa. O CBPF é concedido pela Anvisa, de acordo com os procedimentos operacionais padrão desta agência (BRASIL, 2022a).

Para cumprir as exigências de um CBPF, as empresas produtoras de vacinas no Brasil devem atender, no mínimo, aos requisitos dispostos nas regulamentações apresentadas no Quadro 12.1.

12.2.2 Boas Práticas Clínicas

Um ensaio clínico é um estudo sistemático de medicamentos e/ou especialidades medicinais em voluntários humanos que seguem estritamente as diretrizes do

QUADRO 12.1 Normas sanitárias para Boas Práticas de Fabricação

Regulamentação	Disposição
Resolução RDC Nº 658, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.
Instrução normativa (IN) n. 35, de 21 de agosto de 2019	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a medicamentos estéreis.
Instrução normativa (IN) n. 127, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Insumos e Medicamentos Biológicos.
Instrução normativa (IN) n. 131, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de amostragem de matérias-primas e materiais de embalagens utilizados na fabricação de medicamentos.
Instrução normativa (IN) n. 134, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares aos sistemas computadorizados utilizados na fabricação de medicamentos.
Instrução normativa (IN) n. 136, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Experimentais.
Instrução normativa (IN) n. 138, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação.
Instrução normativa (IN) n. 139, de 30 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às amostras de referência e de retenção.
Resolução (RDC) n. 654, DE 24 de março de 2022	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos.

Fonte: elaborado pelos autores.

método científico. Seu objetivo é descobrir ou confirmar os efeitos e/ou identificar as reações adversas ao produto investigado e/ou estudar a farmacocinética dos ingredientes ativos, de forma a determinar sua eficácia e segurança. Os ensaios clínicos são necessários para descobrir novas respostas terapêuticas às doenças (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2005, p. 5).

De acordo com o Guia internacional ICH6 (R2) as Boas Práticas Clínicas (BPC) são um padrão internacional de ética e qualidade científica para desenhar,

conduzir, registrar e reportar ensaios que envolvam a participação de seres humanos (ICH, 2016). O cumprimento desse padrão oferece uma garantia pública de que os direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes do ensaio estão protegidos, consistente com os princípios que têm sua origem na Declaração de Helsinque e que os dados do ensaio clínico têm credibilidade (EMA, 2016).

Os ensaios clínicos devem ser conduzidos apenas se os benefícios antecipados para o indivíduo sujeito da pesquisa e para a sociedade ultrapassarem claramente os riscos envolvidos. Embora o benefício dos resultados do ensaio clínico para a ciência e a sociedade sejam importantes e devam ser considerados, as preocupações mais importantes são as relativas aos direitos, segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa. Um ensaio clínico deve ser conduzido em consonância com o protocolo que recebeu aprovação/opinião favorável anteriormente por parte da comissão de revisão institucional (CRI)/comitê independente de ética (CEI).

A aprovação de ensaios clínicos depende de informações não clínicas adequadas e, quando aplicável, de informações clínicas dos produtos em investigação. Os ensaios clínicos devem seguir protocolos previamente elaborados e aprovados para serem conduzidos. Deve-se obter também o consentimento livre e esclarecido de cada sujeito antes da participação nos ensaios clínicos.

Médicos qualificados (ou, se apropriado, dentistas qualificados) devem ser responsáveis pelo atendimento médico dos sujeitos da pesquisa, bem como por qualquer decisão médica tomada em seu nome. Esses profissionais devem ser qualificados adequadamente por meio de educação, treinamento e experiência para desempenhar suas tarefas relativas ao ensaio clínico e aos sujeitos da pesquisa.

O registro, o manuseio e o armazenamento de todas as informações do ensaio clínico devem ser apropriados para permitir o relato, a interpretação e a verificação precisos do ensaio. O arquivamento dos registros que poderiam identificar os sujeitos deve ser protegido, respeitando a privacidade e as regras de sigilo, em consonância com a(s) exigência(s) regulatória(s) aplicável(is).

Os produtos em investigação devem ser manufaturados, manejados e armazenados de acordo com as BPF aplicáveis e devem ser usados em consonância com o protocolo aprovado. Devem ser implementados sistemas com procedimentos que assegurem a qualidade de cada aspecto do ensaio clínico.

12.2.3 Boas Práticas de Laboratório

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) são um sistema de qualidade que abrange o processo organizacional e as condições nas quais estudos não clínicos de segurança

à saúde humana e ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados. As BPL constituem-se em testes, geralmente, exigidos por órgãos regulamentadores para fins de avaliação e o registro de produtos, conforme escopo definido na NIT-Dicla-055 (INMETRO, 2013). Isso significa que para se fazer qualquer ensaio em laboratório de desenvolvimento de um medicamento (desenvolvimento farmacêutico), estas normas de BPL devem ser seguidas, garantindo que, posteriormente, será possível atender às BPF.

No Brasil as BPL têm o objetivo de estabelecer as diretrizes para elaborar o escopo de instalações de teste em conformidade aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), da qual o Brasil é signatário.

Os testes regulamentados pelas BPL são: (i) testes físico-químicos; (ii) estudos toxicológicos; (iii) estudos de mutagenicidade; (iv) estudos ecotoxicológicos com organismos aquáticos e terrestres; (v) estudos sobre comportamento em água, solo e ar e bioacumulação; (vi) estudos de resíduos; (vii) estudos de efeitos em mesocosmos e ecossistemas naturais; (viii) química analítica e clínica (associada a estudos não clínicos); (ix) estudos com Organismos Geneticamente Modificados; (x) estudos de eficácia; (xi) estudos de equivalência farmacêutica; e (xii) estudos de citotoxicidade.

Conforme estabelecido na norma NIT-Dicla-055, os testes relacionados em cada área de especialidade dos estudos são definidos em legislações estabelecidas por órgãos regulamentadores das áreas de meio ambiente, saúde, agricultura e outros (IBAMA, ANVISA, MAPA, entre outros). Servem de base para avaliação de risco e registros de substâncias no país. Ressalta-se que os órgãos regulamentadores, ao estabelecerem exigências dos testes, baseiam-se, entre outros, em Guias de Metodologias da OCDE (INMETRO, 2013).

12.3 O PAPEL DA QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE VACINAS E BIOFÁRMACOS

Produtos biológicos caracterizam-se por serem obtidos a partir de microrganismos e/ou de processos biotecnológicos. No Brasil, sua distribuição e comercialização está condicionada a avaliação e concessão do registro pela Anvisa, com balizamento do tema pela RDC 55/2010. Essa Resolução da Diretoria Colegiada subdivide produtos biológicos em 6 categorias, nas quais inserem-se as vacinas, os anticorpos monoclonais e os biomedicamentos obtidos por procedimentos biotecnológicos.

Vacinas são medicamentos imunobiológicos que contêm uma ou mais substâncias antigênicas capazes de induzir imunidade específica ativa, para proteger, reduzir a severidade ou combater doenças causadas por patógenos, atuando como medida preventiva, com uso de doses limitadas. Anticorpos monoclonais e biomedicamentos, por sua vez, destacam-se por suas indicações terapêuticas, incluindo tratamento de câncer e doenças autoimunes.

A RDC 55/2010 traz ainda os requisitos mínimos para concessão e renovação de registro desse tipo de produto. Nesse caso, os atributos de qualidade, segurança e eficácia – pilares obrigatórios e interdependentes – devem ser demonstrados para fins de obtenção do registro, mas também acompanhar o produto por todo o seu ciclo de vida, desde o desenvolvimento até a comercialização, incluídos estudos não clínicos e clínicos, fabricação e controle de qualidade.

Para subsidiar suas análises, a Anvisa dispõe de competência para realizar inspeções com a finalidade de identificar o cumprimento de uma ampla gama de requisitos mínimos e verificar a observância às Boas Práticas de Fabricação pelos produtores. Documento de relevância, o CBPF é expedido pela Anvisa caso constatado o cumprimento do preconizado nas normas de BPF, que dispõem sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, e nas Instruções Normativas correlacionadas. O CBPF possui validade de dois anos sendo concedido por linha de produção, com indicação do nome da linha, das formas farmacêuticas e dos nomes dos princípios biológicos ativos para os quais o estabelecimento encontra-se em conformidade.

Ao término, em sendo concedido o registro, sua publicidade ocorre mediante publicação no Diário Oficial da União (DOU), a partir da qual inicia-se a contagem da validade de dez anos. Vale recordar que a obtenção do registro não dispensa a obrigatoriedade de manutenção dos atributos fundamentais do produto: qualidade, segurança e eficácia. Nesse ponto, o monitoramento ocorre em atuação ampla, no âmbito do sistema de farmacovigilância e com a participação dos demais entes do sistema de vigilância sanitária. Assim, para além da obtenção de certificados, a observância aos conceitos de BPF é fundamental em todo o processo de produção de produtos biológicos, desde a realização de controles de qualidade da substância ativa e do produto acabado, passando por estudos de estabilidade, até a produção dos lotes a serem utilizados em estudos clínicos.

Um dos pontos de destaque refere-se ao comparilhamento de áreas. No caso das vacinas, as preparações contendo microrganismos vivos não podem ser produzidas ou envasadas em áreas utilizadas para a

produção de outros medicamentos, exceto no caso de vacinas contendo microrganismos inativados, preparadas pelas técnicas de DNA recombinante ou de extratos bacterianos. Nessa hipótese, podem ser envasadas, após sua inativação, nas mesmas instalações de produção de outros medicamentos, desde que os procedimentos de inativação e limpeza sejam validados e as medidas adequadas de descontaminação após o envase e esterilização sejam observadas (BRASIL, 2022a).

Em razão das especificidades envolvidas, as etapas de desenvolvimento de um produto biológico, após compreendida a doença, podem ser divididas conforme a Figura 12.3.

De essencial importância na etapa inicial, a obtenção do princípio biológico ativo passa pela seleção das cepas/células/plasmídeos/vetores a serem utilizados em sua produção. Por essa razão, informações relacionadas a esses materiais tornam-se imprescindíveis para avaliação da Anvisa, com identificação de sua origem, processos de obtenção ou construção, processos biotecnológicos empregados e certificados de análise, de acordo com o tipo de medicamento.

Na produção de lotes experimentais, iniciam-se o estabelecimento das especificações e dos testes de controle de qualidade aplicáveis aos insumos e ao produto final. É nessa fase também que ocorrem a caracterização do produto, a definição do processo de fabricação, o estabelecimento dos controles em processo, o conhecimento das etapas críticas do processo de produção e da estabilidade do produto por meio de estudos (ICH, 1999).

Na sequência, previamente à realização de estudos clínicos envolvendo humanos, é necessária a realização de estudos em animais (estudos não clínicos). Dessa etapa são demandadas informações relativas à justificativa de escolha dos animais, dados e caracterização dos efeitos de reatogenicidade, toxicidade, segurança e

imunogenicidade observados durante os experimentos. O controle de qualidade executado no medicamento em desenvolvimento e detalhes dos estudos clínicos pretendidos, com avaliação de possíveis benefícios e riscos envolvidos, são algumas das informações requeridas pela Anvisa.

A realização de estudos clínicos envolvendo produtos biológicos é ainda condicionada à anuência da Anvisa em relação ao Dossiê de Desenvolvimento Clínico do Medicamento (DDCM) a ser apresentado pelo desenvolvedor. De acordo com a RDC nº 09/2015, o DDCM é o conjunto de documentos com a finalidade de avaliar as etapas inerentes ao desenvolvimento de um medicamento experimental, contendo informações suficientes para subsidiar a indicação clínica proposta, população alvo e desenhos dos ensaios clínicos pretendidos, isto é, deve explicitar as Fases Clínicas planejadas, demonstrando todo o fundamento de desenvolvimento do produto, inclusive com informações sobre ensaios clínicos realizados fora do Brasil (BRASIL, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

De modo consagrado, o desenvolvimento clínico de um produto biológico tem suas fases segregadas em Fases I a III, representando essa numeração um progressivo avanço da complexidade e extensão de seu conteúdo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O estudo de fase I tem como objetivo principal estimar a segurança e a tolerabilidade do medicamento a partir de uma avaliação farmacodinâmica. O estudo de fase II busca a exploração da eficácia terapêutica com base em avaliação da atividade imunológica, posologia proposta e diferentes concentrações. Por último, há o estudo de Fase III, com a finalidade de confirmar o benefício terapêutico do uso do medicamento experimental.

Para que as fases clínicas ocorram de maneira segura e a avaliação de eficácia não seja comprometida, um dos

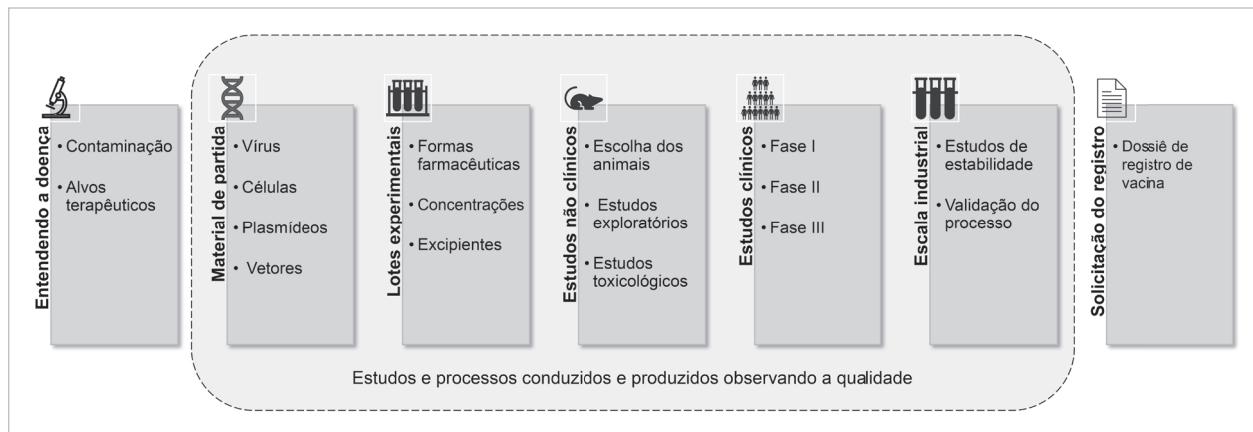


FIGURA 12.3 Etapas de desenvolvimento de um produto biológico.

Fonte: elaborada pelos autores (2023).

requisitos de qualidade é o estabelecimento do controle de qualidade, composto por ensaios analíticos. Esses, por sua vez, devem ter suas especificações determinadas pelo fabricante ou estabelecidas com base nos requerimentos internacionais, farmacopeias, referências bibliográficas ou monografias, contemplando desde o material de partida, passando pela substância ativa até a obtenção do produto acabado. Os resultados decorrentes devem demonstrar, em limites numéricos, intervalos ou outros critérios, a qualidade do produto (ICH, 1999).

Descrições detalhadas sobre a substância ativa e o medicamento experimental devem ser fornecidas para assegurar a manutenção dos parâmetros de segurança, eficácia e qualidade. Identidade, pureza, teor e esterilidade são exemplos de Atributos de Qualidade e possuem relevância para manutenção da potência em vacinas, ou da atividade, no caso de anticorpos monoclonais e biomedicamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005, 2013). Para a produção de lotes industriais, testes de controle de qualidade devem ser adequados para garantir a consistência da produção e a avaliação da estabilidade. Esses podem incluir ensaios de aparência, distribuição de tamanho de partícula, presença de agregados, pH e umidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005, 2013). Essa elevada exigência regulatória em relação à qualidade dos produtos biológicos se justifica.

Integradas à rotina de saúde dos brasileiros – e à de muitos outros países –, as vacinas disponibilizadas por meio do calendário vacinal contemplam desde bebês a idosos. Além da distribuição gratuita, esse produto é também acessível em clínicas privadas. Com a destinação a públicos de diferentes faixas etárias e para tratamento das mais variadas doenças, estima-se o uso anual de mais de 1 bilhão de doses em todo o mundo. Tamanha amplitude demonstra a importância da comprovação de qualidade das vacinas, com atendimento às especificações dos compêndios farmacopeicos, às regulamentações sanitárias e aos *Technical Reports* da OMS, tornando-se imprescindível o atendimento aos requisitos para que estejam entre os produtos mais rigorosamente projetados, monitorados e compatíveis ao uso humano (PLOTKIN et al., 2018).

O coronavírus SARS-CoV-2, causador da doença infecciosa Covid-19, impulsionou ainda mais a relevância desse medicamento. Segundo o site da PAHO/OMS, o volume de doses da vacina contra Covid-19, somente nos continentes americanos, está em torno de 2.022.999.781 até outubro de 2022. No Brasil, estima-se que 485.255.043 de doses da vacina contra Covid-19 foram administradas (OPAS, 2022).

O uso de anticorpos monoclonais e de biomedicamentos, por sua vez, vem apresentando vantagens significativas na melhoria da qualidade de vida dos

doentes, atuando no restabelecimento de funções afetadas e na prevenção de danos relacionados a doenças. Como exemplo, a artrite reumatoide, doença autoimune, acomete frequentemente articulações e, ocasionalmente, órgãos como coração, pulmões e olhos por meio de inflação crônica, podendo diminuir a expectativa de vida entre 5 e 10 anos.

Como se observa, são medicamentos destinados a pacientes com quadro clínico por vezes delicado. São razões como essas que justificam elevado rigor na exigência da comprovação e manutenção de inquestionável e suficiente qualidade das vacinas, biomedicamentos e anticorpos monoclonais, sob risco de ineficácia do produto e, até mesmo, agravamento do quadro clínico do usuário.

12.4 O PAPEL DA QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE TESTES PARA DIAGNÓSTICOS

Produtos para diagnóstico *in vitro* (IVD), uma vez que analisam amostras derivadas do corpo humano, exclusiva ou principalmente para prover informações com propósitos de diagnóstico, monitoramento, triagem ou para determinar a compatibilidade com potenciais receptores de sangue, tecidos e órgãos, são regulamentados pela Anvisa.

Nesse caso, a concessão do registro à empresa devidamente regularizada junto aos órgãos sanitários – Anvisa e Vigilância Sanitária Local – ocorre com o atendimento aos requisitos da RDC 36/2015, expedida pela Anvisa, independentemente de tratar-se, ou não, do fabricante do IVD. De acordo com a RDC citada, o prazo de validade do registro é de 10 anos.

Os fabricantes do IVD que se enquadrem nas classes III e IV necessitam obter CBPF. Cabe citar que a classe III engloba os IVD destinados ao diagnóstico de doença de notificação compulsória, agente sexualmente transmissível, triagem pré-natal, teste genético humano, entre outros. Os IVD classe IV se destinam ao diagnóstico, monitoramento ou detectam a presença de agente transmissível pelo sangue ou órgãos, que cause risco de morte ou doença, geralmente incurável, a fim de avaliar a sua aptidão para transfusão ou transplante, podendo-se citar como exemplo o “Kit NAT Plus HIV/HBV/HCV/Malária Bio-Manguinhos” para diagnóstico do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HBC) e do *Plasmodium* ssp. (malária).

A fim de manter a qualidade dos IVD, o fabricante deve adotar um sistema de qualidade que garanta a produção de produtos seguros, eficazes e adequados ao uso pretendido. Para tanto, deve estabelecer e manter

instruções e procedimentos eficazes do sistema de qualidade. O fabricante do IVD, por exemplo, deve estabelecer e manter uma estrutura organizacional adequada, representada por meio de organograma, com pessoal suficiente para assegurar que os produtos sejam fabricados de acordo com BPF, de maneira que seja possível realizar a verificação do processo por pessoal treinado.

A qualidade do produto deve garantir que o IVD atenda à indicação ou à pretensão de uso. Para o registro devem ser apresentados estudos de desempenho de funcionamento, estudo de estabilidade e atendimento a proposta clínica do produto, de maneira a comprovar a sua funcionalidade.

A descrição do processo de produção deve conter as fases ou etapas da fabricação até a obtenção do produto acabado, incluindo etapas de controle em processo e teste de controle de qualidade. Todos os insumos devem ser provenientes de fornecedores qualificados, produzidos com a qualidade requerida e acompanhados de seus respectivos laudos de liberação.

Durante o processo de produção e montagem do IVD, devem ser observadas as premissas dadas pela RDC 665/2022, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação, bem como a necessidade de realização da validação do processo produtivo antes de disponibilização para comercialização.

A qualidade de um IVD é de extrema importância. Por vezes, o resultado concedido erroneamente pode ocasionar danos ao usuário que podem trazer prejuízo psicológico. Portanto, a constante observância da qualidade pelos fabricantes de IVD é ponto a ser sempre alcançado.

12.5 REGULAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCASSIMILARES NO MUNDO E NO BRASIL

Regulação é o conjunto de regras definidas pelos diferentes países para que produtos biotecnológicos possam ser disponibilizados para a população. Essas regras incluem requisitos para comprovação de qualidade, segurança e eficácia, que devem ser demonstrados por meio de estudos conduzidos pelos desenvolvedores. Os tipos de estudos, duração e critérios de aceitação são definidos pelos instrumentos regulatórios; e caberá a agências reguladoras ou instituições semelhantes a avaliação e aprovação desses estudos.

No Brasil, a fundamentação legal para a regulação de produto biotecnológico é definida pela Lei n. 6360, de 23 de setembro de 1976, que no seu artigo 12 diz que *“nenhum dos produtos de que trata essa lei, inclusive os importados, poderá ser industrializado, exposto à venda ou entregue ao consumo antes de registrado no Ministério da Saúde”* (BRASIL, 1976).

A agência reguladora brasileira, a Anvisa, foi criada em 1999 pela Lei n. 9782, de 26 de janeiro de 1999 (BRASIL, 1999). Dentre suas diversas atribuições definidas pela referida lei, foi estabelecida a concessão do registro de produto biotecnológico segundo as normas de sua área de atuação. A concessão do registro no país, portanto, compõe uma de suas atividades em sua missão institucional de proteger e promover a saúde da população.

12.5.1 O que é considerado durante uma avaliação de registro de produto biotecnológico?

Os requisitos técnicos aplicados pela Anvisa para o registro de produtos biotecnológicos estão cada vez mais alinhados às boas práticas regulatórias internacionais (BRASIL, 2022b). Desde que iniciou o processo de convergência regulatória, por meio de aceitação em fóruns internacionais de harmonização de requisitos. A Anvisa tem aprimorado seu arcabouço normativo com o objetivo de garantir que critérios científicos internacionalmente discutidos não sejam divergentes dos aplicados no Brasil e, também, evitar esforços desnecessários de proceder com análises realizadas por agências consideradas de referência.

Os aspectos técnicos para a aprovação de um produto biotecnológico por uma agência reguladora são compostos por uma série de requisitos que podem ser agrupados didaticamente em quatro grandes grupos.

O primeiro é a biotecnologia. É preciso fazer uma avaliação criteriosa sobre o desenvolvimento e a produção do produto biotecnológico. A formulação e o método de fabricação do produto biotecnológico precisam assegurar que o produto cumpre com critérios de qualidade, tais como pureza, teor e quantidade de princípio ativo liberada. Todos os ensaios que são realizados para liberação do lote precisam ser analisados quanto à sua validação de maneira a garantir que aspectos que possam interferir na qualidade do produto sejam devidamente controlados lote a lote (ICH, 1999). Uma avaliação importante da tecnologia farmacêutica diz respeito à estabilidade do produto biotecnológico, em estudos em que se avalia a preservação da qualidade ao longo do tempo, mantendo o produto em condições climáticas específicas. O estudo de estabilidade é fundamental para a definição tanto das condições de armazenamento (temperatura) quanto do prazo de validade, que indica por quanto tempo o produto biotecnológico poderá ser utilizado (ICH, 1995). Dentre os principais aspectos a serem avaliados estão: formulação e fornecedores de materiais de partida, processo de produção e embalagem, plano para escalonamento industrial, métodos de controle de qualidade e de processo, especificações e referências utilizadas e estudos de estabilidade.

O segundo é a eficácia/segurança do produto biotecnológico. Os estudos que são conduzidos ao longo do desenvolvimento do produto, que inclui estudos em modelos animais, modelos laboratoriais e em humanos nas diferentes fases de uma pesquisa clínica, são avaliados pelas agências reguladoras quanto à sua rastreabilidade e confiabilidade. Os resultados desses estudos são validados pelos especialistas da agência e têm por objetivo mostrar o perfil de segurança do produto biotecnológico, ou seja, quais são as reações adversas que estão relacionadas ao uso do produto na dosagem, na posologia, na via de administração e na forma farmacêutica definida. Também são avaliados os resultados de eficácia, ou seja, em qual grau o produto biotecnológico consegue melhorar o quadro da doença a que se propõe tratar.

As agências reguladoras atuam como revisores, confrontando os dados gerados e as alegações de uso pretendidas pela empresa. Para garantir a confiabilidade dos resultados, os especialistas das agências reguladoras verificam se os estudos foram conduzidos quanto às BPC, que segundo o guia E6 do ICH é um padrão internacional de qualidade ética e científica para projetar, conduzir, registrar e relatar ensaios que envolvam a participação de seres humanos (ICH, 2016). Ao final da avaliação dos estudos de eficácia e segurança é possível deliberar sobre a bula do produto biotecnológico. A bula deve trazer informações claras sobre todos os estudos que foram considerados para a aprovação de um produto biotecnológico; e deve trazer informações claras, em linguagem acessível, tanto para o profissional prescritor quanto para o paciente, sobre as condições de uso, posologia, riscos e conduta em caso de superdosagem. A rotulagem do produto biotecnológico também deve trazer informações consideradas fundamentais, como as condições de armazenamento, as substâncias presentes e as características do produto.

O terceiro grupo é a farmacovigilância. Como parte da documentação a ser submetida para agências para fins de registro de produtos biotecnológicos, as empresas que pretendem ser detentoras de registro devem apresentar planos de farmacovigilância e plano de minimização de risco específicos para o país. Esses planos representam o compromisso que as empresas fazem com o monitoramento a longo prazo do desempenho do produto na população. A farmacovigilância é a ciência que busca identificar, avaliar, compreender e prevenir os efeitos adversos ou quaisquer problemas relacionados ao uso do produto biotecnológico (ICH, 2004) e no plano de farmacovigilância são propostas estratégias da empresa detentora do futuro registro para coletar notificações de eventos adversos decorrentes do uso do produto pela população. As notificações de eventos adversos devem

ser reportadas periodicamente às agências de maneira a permitir a avaliação contínua do balanço benefício/risco.

O plano de minimização de risco busca reduzir ou mitigar riscos que possam ocorrer pelo uso do produto biotecnológico. Para exemplificar, temos o caso de produtos biotecnológicos que têm o potencial de causar efeito no desenvolvimento fetal. Nesse caso, a empresa deve apresentar no plano proposto à agência a estratégia para minimizar o risco de pessoas grávidas usarem esse produto, que podem envolver, além da inclusão em bula, campanhas educacionais específicas para os prescritores e população em geral. Tanto o plano de farmacovigilância quanto de minimização de risco são avaliados por especialistas das agências, que precisam estar de acordo com as normativas regulatórias do país para que o produto possa ser registrado.

O último grupo de requisitos está relacionado às Boas Práticas de Fabricação. As Boas Práticas de Fabricação estão relacionadas com essa expectativa regulatória de que o local que fabricará os lotes industriais do produto biotecnológico cumpra com requisitos técnico-operacionais de maneira a assegurar qualidade e consistência na produção dos lotes. As agências reguladoras verificam se a planta fabril possui sistema de qualidade implementado que possa identificar rapidamente quaisquer desvios de produção e mitigar danos que esses desvios possam causar. Além disso, qualificação de equipamentos, treinamento de pessoal e estratégias para recolhimento de lotes com defeitos são requisitos avaliados para a concessão de um certificado que assegura que, se o produto for fabricado naquele local, sob aquelas condições definidas, os requisitos de qualidade serão cumpridos (ICH, 2000).

No Brasil, o registro de produtos biotecnológicos pode ser solicitado pelo desenvolvedor do produto ou alguma empresa habilitada para essa solicitação, por meio de dossiês específicos, que devem conter documentos que contemplam esses quatro grupos de informações técnicas (BRASIL, 2010).

Os produtos biotecnológicos podem ser divididos em duas categorias: produtos novos ou produtos não novos, também chamados como biossimilares. Produtos novos devem ser registrados pela via individual, o que significa que devem apresentar em seu dossiê todos os dados acima descritos e, por se tratar de produtos que contêm insumos farmacêuticos novos, devem apresentar um Relatório de Experimentação Terapêutica, o relatório completo de todos os estudos não clínicos, como também os protocolos e relatórios completos dos estudos clínicos, fases I, II e III, que incluem todas as fases de pesquisa clínica.

Biossimilares podem ser registrados pela via individual ou pela via da comparabilidade, o que significa que esses produtos são desenvolvidos tendo como referência

um produto biológico aprovado pela agência. Além dos dados descritos e do relatório de experimentação terapêutica, devem apresentar relatório conclusivo com demonstração da comparabilidade, contendo informações suficientes para prever se as diferenças detectadas nos atributos de qualidade resultam em impactos adversos na segurança e eficácia do produto biológico. Produtos biossimilares não são considerados intercambiáveis aos medicamentos de referência, sendo necessários estudos específicos de intercambiabilidade para que essa alegação possa constar em bula. Após análise, a equipe de especialistas da Anvisa pode apresentar para o solicitante do registro esclarecimentos ou deficiências encontradas nos documentos, que devem ser respondidas antes da decisão final. Somente após a publicação em Diário Oficial da União (DOU) é que o registro é oficialmente concedido.

12.5.2 Por que um produto que é registrado em outro país não pode ser automaticamente autorizado no Brasil?

Nem sempre um produto que foi registrado em um país diferente é o mesmo ou cumpre os mesmos requisitos do produto que será disponibilizado no Brasil. Tendo em consideração os quatro grupos de requisitos regulatórios discutidos, é possível identificar particularidades técnicas brasileiras que justificam avaliações prévias pela Anvisa para autorização do uso no Brasil.

Em relação à tecnologia farmacêutica, um dos principais aspectos que precisam ser verificados é quanto aos estudos de estabilidade. Países diferentes possuem zonas climáticas distintas e, no Brasil, os produtos biotecnológicos precisam ser estudados na chamada zona climática 4 (ANVISA, 2019), que é diferente das zonas climáticas estabelecidas para países como Estados Unidos ou outros da Europa. O risco de não haver esse estudo é o produto ser armazenado em condições distintas da preconizada pelo fabricante e ter seu prazo de validade reduzido, podendo resultar em perda de teor (diminuição da eficácia) ou formação de impurezas com potencial tóxico (diminuição da segurança).

Em relação à eficácia/segurança, a avaliação pela Anvisa é fundamental para verificar se os resultados dos estudos que subsidiaram a aprovação do produto biotecnológico em outros países podem ser extrapolados para a população brasileira. Questões relativas à epidemiologia da doença em cada país, população-alvo que utilizará o produto biotecnológico ou características genéticas dos pacientes estudados podem impactar a forma como o produto biotecnológico pode ser utilizado em diferentes países. Assegurar que o produto biotecnológico, da forma como o uso foi aprovado por outra agência reguladora, será seguro e eficaz para os brasileiros é uma ação primordial da Anvisa.

Ainda nesse grupo, a bula e a rotulagem do produto biotecnológico em português é requisito técnico estabelecido pela normativa brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). É fundamental garantir que a linguagem traduzida mantenha sua clareza e evite o uso incorreto e, para tanto, é necessária uma avaliação de especialistas da Anvisa.

Quanto aos planos de farmacovigilância e minimização de risco, a avaliação da Anvisa é primordial tendo em consideração que os planos são propostos para cada país, considerando suas particularidades e limitações. Ações de farmacovigilância e minimização de risco dependem de fatores como o engajamento de profissionais de saúde e da população, para se definir o quanto de recursos e esforços serão empenhados em cada (BRASIL, 2020). O risco de se aplicar um plano delineado para outro país é sua não aplicabilidade, que resulta em ausência crítica de informações valiosas sobre o desempenho do produto biotecnológico no Brasil e consequente risco à população.

Por fim, as BPF só poderiam deixar de ser analisadas pela Anvisa se houve a clareza de que o local e as condições de fabricação do produto aprovado em outro país são exatamente as mesmas do produto que virá para o Brasil. Não são incomuns situações em que empresas possuem locais distintos de fabricação de produtos biotecnológicos destinados a diferentes países e, como discutido acima, locais ou condições de fabricação distintas podem impactar a performance do produto; e tanto as condições técnica-operacionais quanto os estudos de comparabilidade que devem ser realizados entre produtos fabricados em locais diferentes devem ser avaliados para assegurar que as características do produto serão mantidas (ANVISA, 2011).

12.5.3 Quais são os prazos e quais são as estratégias de priorização para análise de um registro de produto biotecnológico pela Anvisa?

É definido pela Lei n. 13411 de 28 de dezembro de 2016 que os prazos para análise de pedidos de registro de produtos biotecnológicos classificados na categoria ordinária são de 365 dias; e quando um produto biotecnológico é classificado na categoria prioritária esse tempo é de 120 dias (BRASIL, 2016).

A Resolução RDC n. 204, de 27 de setembro de 2017, dispõe sobre o enquadramento na categoria prioritária, de petições de registro, pós-registro e anuência prévia em pesquisa clínica de produtos biotecnológicos (BRASIL, 2017a). Essa resolução define que produtos biotecnológicos prioritizados serão aqueles que se enquadram nas seguintes categorias:

- Produto biotecnológico utilizado para doença negligenciada, emergente ou reemergente, emergências em saúde pública ou condições sérias debilitantes, nas situações em que não houver alternativa terapêutica disponível ou quando apresentar uma melhora significativa da segurança, eficácia ou adesão ao tratamento.
- Produto biotecnológico novo, nova fórmula farmacêutica, nova indicação terapêutica ou nova concentração destinados à população pediátrica.
- Vacinas ou soros hiperimunes a serem incorporados no Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde.
- Produto biotecnológico inovador ou novo, contendo insumo farmacêutico ativo fabricado no país.
- Produto biotecnológico integrante da lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) que seja objeto de Parceria de Desenvolvimento Produtivo (PDP), mediante a submissão inicial completa de todos os documentos e estudos previstos na regulamentação vigente.

Está vigente também a Resolução RDC n. 205, de 28 de dezembro de 2017 (BRASIL, 2017b). Essa resolução estabelece procedimentos especiais para registro de produtos biotecnológicos novos para doenças raras. A resolução define que doença rara é aquela que afeta até sessenta e cinco pessoas em cada cem mil indivíduos, conforme definido pela Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, com base em dados oficiais nacionais ou, quando inexistentes, em dados publicados em documentação técnico-científica.

Para que um pedido de registro de produto biotecnológico para doença rara possa seguir os procedimentos definidos nesta resolução é necessário cumprir dois critérios:

- Seja utilizado em condição séria debilitante; e
- Proponha-se a alterar de maneira clinicamente significativa a evolução ou possibilite a remissão da doença.

Além da priorização, a RDC n. 205/2017 define prazos de avaliação menores que os dispostos na lei. A avaliação da solicitação de registro do produto biotecnológico pela Anvisa ocorrerá em até sessenta dias após a submissão, com emissão de notificação de exigência ou parecer conclusivo. Da mesma forma, as empresas que submetem os pedidos desses registros têm prazos menores para cumprir exigências, que passam de, no máximo, 120 dias após o conhecimento para 30 dias.

12.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo deste capítulo restou claro que a qualidade é transversal e perpassa por todas as etapas de um produto farmacêutico. Nem sempre foi desta forma, na história existem relatos de eventos em que a falha de qualidade levou à morte de centenas de pessoas.

Esses graves incidentes moveram a regulação, fizeram que Agências Regulatórias fossem criadas, de maneira que a concepção de um produto é centrada no paciente e os aspectos de qualidade devem ser pensados desde a fase inicial. Isso ocorre para garantir a segurança e eficácia ou para que esses produtos sejam mantidos no mercado, garantindo o acesso aos pacientes.

Os riscos de uma aprovação automática do uso de um produto biotecnológico na população brasileira, sem uma avaliação prévia da Anvisa, não são apenas jurídicos ou normativos, mas riscos técnicos com potencial impacto na qualidade, segurança e eficácia do produto e na saúde dos pacientes. O caminho de convergência regulatória que vem sendo adotado pela Anvisa contribui para que os requisitos aplicados no país estejam alinhados às melhores práticas regulatórias internacionais, além de permitir a colaboração entre agências de maneira a reduzir esforços desnecessários de análise.

A Anvisa tem implementado normas de transparência; por meio de acesso ao seu portal (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>), é possível identificar uma série de informações que são relevantes para a avaliação do cenário regulatório. Em suas páginas é possível identificar a lista de produtos biotecnológicos que estão registrados pela agência, assim como todos os ensaios clínicos que são autorizados para condução no Brasil. Também estão disponíveis Pareceres Públicos de Avaliação de Produto Biotecnológico, que trazem o racional técnico-científico utilizado para a tomada de decisão da agência, quer seja aprovação ou reprovação. As bulas de produtos biotecnológicos registrados também estão disponíveis na página da Anvisa, assim como a Agenda Regulatória, que traz os temas considerados prioritários pela agência para revisão, atualização ou publicação de novos tópicos regulatórios. Todas as normativas da Anvisa estão sujeitas a consultas públicas, cuja participação social é estimulada.

Se não é claro para a população por que a Anvisa é necessária e sua forma de atuação, uma série de questionamentos e críticas surgem. Por isso, a transparência e a participação social são fundamentais para garantir uma atuação regulatória eficiente, sempre visando a produtos e medicamentos de qualidade, seguros e eficazes para a população.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA. **Guia para Realização do Exercício de Comparabilidade para Registro de Produtos Biológicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/guia-para-realizacao-do-exercicio-de-comparabilidade-para-registro-de-produtos-biologicos.pdf>. Acesso em: 31 maio. 2023.
2. ANVISA. **Medicamentos – guia n. 28, versão 1, de 11 de novembro de 2019**. Disponível em: [https://pesquisa.anvisa.gov.br/upload/surveys/15455/files/Guia de Estudos de Estabilidade\(1\).PDF](https://pesquisa.anvisa.gov.br/upload/surveys/15455/files/Guia de Estudos de Estabilidade(1).PDF). Acesso em: 31 maio. 2023.
3. ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; ZAMAN, M. K. Historical incidents leading to the evolution of good manufacturing practice. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 13, n. 8, p. 431–432, 6 ago. 2008.
4. BRASIL. **Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6360.htm. Acesso em: 24 jan. 2023.
5. BRASIL. **Lei n. 8.080, de 19 de setembro de 1990**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm. Acesso em: 24 jan. 2023.
6. BRASIL. **Lei n. 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1999/lei-9782-26-janeiro-1999-344896-publicacaooriginal-1-pl.html>. Acesso em: 24 jan. 2023.
7. BRASIL. **Lei n. 13.411, de 28 de dezembro de 2016**. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/l13411.htm. Acesso em: 31 maio. 2023.
8. BRASIL. **Resolução RDC n. 658, DE 30 de março de 2022**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-658-de-30-de-marco-de-2022-389846242>. Acesso em: 24 jan. 2023a.
9. BRASIL, M. DA S. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 55, de 16 de dezembro de 2010**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_55_2010_COMP.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.
10. BRASIL, M. DA S. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 9, de 20 de fevereiro de 2015**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3503972/RDC_09_2015_COMP.pdf.
11. BRASIL, M. DA S. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 204, de 27 de dezembro de 2017**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_204_2017_.pdf/b2d4ae64-2d91-44e9-ad67-b883c752c094.
12. BRASIL, M. DA S. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 205, de 28 de dezembro de 2017**. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0205_28_12_2017.pdf.
13. BRASIL, M. DA S. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 406, de 22 de julho de 2020**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/4858873/RDC_406_2020_.pdf/c62cdedd-e779-4021-858d-852edbd90178.
14. BRASIL, M. DA S. **Convergência Regulatória**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acesoainformacao/institucional/relacoes-internacionais/convergencia-regulatoria>. Acesso em: 24 jan. 2023b.
15. BREN, L. The road to the biotech revolution: highlights of 100 years of biologics regulation. **FDA consumer**, v. 40, n. 1, p. 50–57, 2006.
16. COLEMAN, T. S. **Food and Drug Law Journal**. Volume 71 ed. Washington: Food and Drug Law Institute (FDLI), 2016.
17. DEUS, F. J. T. DE; SÁ, P. F. G. DE. **Evolução da Normatização de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e seu impacto na qualidade de medicamentos comercializados no Brasil**. Disponível em: <https://www.yumpu.com/pt/document/view/19974371/evolucao-da-normatizacao-de-boas-praticas-de-fabricacao-bpf->. Acesso em: 25 fev. 2023.
18. EMA. **ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system**. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human_en.pdf. Acesso em: 31 maio. 2023.
19. EMA. **ICH E6 (R2) Good clinical practice**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-e6-r2-good-clinical-practice-scientific-guideline>. Acesso em: 24 jan. 2023.
20. EWI. **What are “good practices”?** Disponível em: https://ec.europa.eu/migrant-integration/page/what-are-good-practices_en. Acesso em: 24 jan. 2023.
21. GPO. PUBLIC LAW 87-781-.OCT. 10,1962. p. 1–17, 1962.
22. HOOPER, C. L. **Pharmaceuticals: Economics and Regulation**. Disponível em: <https://www.econlib.org/library/Enc/PharmaceuticalsEconomicsandRegulation.html>. Acesso em: 23 out. 2022.
23. ICH. Quality Of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C. **EMA**, p. 1–20, 1995.
24. ICH. Specifications: Test Procedures And Acceptance Criteria For Biotechnological/Biological Products Q6B. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, p. 1–20, 1999.
25. ICH. Good Manufacturing Practice Guide For Active Pharmaceutical Ingredients Q7. **ICH**, p. 1–49, 2000.
26. ICH. Pharmacovigilance Planning E2E. **ICH**, p. 1–20, 2004.
27. ICH. Integrated Addendum To ICH E6(R1): Guideline for Good Clinical Practice E6(R2). p. 1–66, 2016.
28. INMETRO. **Elaboração do Escopo BPL e da Relação Detalhada dos Estudos Conduzidos pela Instalação de Teste**. p. 1–10, 2013.
29. KESSELHEIM, A. Safety, supply, and suits--litigation and the vaccine industry. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 16, p. 1485–1487, abr. 2011.
30. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução Da Diretoria Colegiada – RDC n. 47, de 8 de Setembro de 2009**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_47_2009_COMP.pdf/cd434aae-fca0-448e-bd40-1b8e85e5570b.
31. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 55, de 16 de dezembro de 2010**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_55_2010_COMP.pdf/41ebae78-5742-4060-9bec-6ccece9ce262.
32. OPAS. **Folha informativa sobre Covid-19**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19#:~:text=Outros sintomas menos comuns e,%2C diarreia%2C calafrios ou tonturas..> Acesso em: 20 dez. 2022.
33. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Boas Práticas Clínicas : Documento das Américas. IV Conferência Pan-Americana para harmonização da regulamentação farmacêutica**, p. 88, 2005.
34. PLOTKIN, S. A. et al. **Plotkin's Vaccines**. 7. ed. Elsevier: Elsevier, 2018.

35. SHIELDS, C. **Swann**. 1. ed. Rio de Janeiro: Record, 1999.
36. WHO. **WHO Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations**. 1. ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1969.
37. WHO. WHO Technical Report Series, No. 1039. p. 1–178, 2022.
38. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No 927**. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/annex-1nonclinical.p31-63.pdf?sfvrsn=e87c28d8_3&download=true. Acesso em: 20 jan. 2023.
39. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Biological Standardization**. Geneva: WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2013.
40. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Clinical evaluation of Vaccines: regulatory expectations**. , 2016.

Farmacovigilância

Paulo Roberto Takey

Patrícia Mouta Nunes de Oliveira

Helaine Carneiro Capucho

Renata Saraiva Pedro

Apesar dos avanços tecnológicos constantes das Indústrias Farmacêuticas e das normatizações sanitárias rigorosas das Agências Regulatórias, ainda não há medicamentos registrados, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, totalmente eficazes ou seguros, disponíveis para toda a diversidade humana. A Farmacovigilância desempenha, portanto, um papel importante no pós-registro: a avaliação contínua do benefício-risco dos medicamentos de uso humano diante de suspeita de reações adversas a medicamentos; inefetividade terapêutica; interações medicamentosas; superdose de medicamentos; abuso de medicamentos; erros de medicação; uso *off label* do medicamento; exposição a medicamento durante gravidez/lactação; eventos adversos por desvio de qualidade; e outras situações que possam vir a ser objeto da farmacovigilância. Este capítulo se inicia com a definição e os principais conceitos da Farmacovigilância, logo após apresenta os seus aspectos históricos no Brasil e no mundo, bem como a sua importância para a segurança dos produtos de origem biotecnológica, e finaliza com suas atividades de detecção, avaliação, compreensão, prevenção e comunicação.

13.1 FARMACOVIGILÂNCIA: CONCEITOS E DEFINIÇÕES

A expectativa de vida tem sido ampliada de acordo com os avanços tecnológicos e muito se deve aos medicamentos desenvolvidos ao longo do tempo. Entretanto, toda tecnologia em saúde tem riscos que, quando superados pelos benefícios, são gerenciados para evitar a sua ocorrência. O desenvolvimento de medicamentos é sistematizado em diferentes etapas para que todos os possíveis riscos sejam mapeados, bem como seus benefícios. Embora todas essas etapas favoreçam o gerenciamento de riscos, sabe-se que envolve uma quantidade limitada de

participantes nos estudos clínicos, por períodos curtos e em condições controladas, quando comparado com o uso do produto após sua comercialização.

Diante disso, faz-se necessária a realização de uma vigilância intensiva da segurança dos medicamentos, após serem liberados para uso na população. Tal necessidade originou a Farmacovigilância, que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é “a ciência e atividades relativas à detecção, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou quaisquer problemas relacionados ao uso de medicamentos” (WHO, 2005). O conceito, que está vigente há mais de duas décadas, amplia o escopo de atuação da farmacovigilância para

além das reações adversas. Passa a englobar os eventos adversos a medicamentos, queixas técnicas, suspeitas de falta de efeito terapêutico, suspeitas de reações adversas a medicamentos, uso *off label* de medicamentos, erros de medicação e quase falhas, intoxicações, uso abusivo de medicamentos e interações medicamentosas, cujos conceitos podem ser verificados a seguir (ANVISA, 2020a):

- Eventos adversos são quaisquer ocorrências médicas indesejáveis relacionadas ao uso de medicamentos, sem que necessariamente exista relação causal com o tratamento, podendo ser qualquer sinal desfavorável e não intencional, sintoma ou doença temporalmente associados ao uso. São suspeitas de problemas durante o tratamento com um medicamento, como reações adversas, ausência ou redução do efeito, erros de medicação, desfechos negativos relacionados a interações medicamentosas clinicamente relevantes.
- Queixa técnica é qualquer suspeita de alteração ou irregularidade de um produto/empresa relacionada a aspectos técnicos ou legais. Refere-se a suspeitas de alterações em produtos ou irregularidades de empresas, como produtos sem registro, falsificados, alterações na consistência do produto, problemas na rotulagem, presença de corpo estranho, alterações nas características físico-químicas do medicamento, dentre outras.
- A inefetividade terapêutica é a ausência ou a redução da resposta terapêutica esperada de um medicamento. A redução do efeito pode estar associada a uma ampla gama de fatores, como variabilidades individuais e genéticas, interações medicamentosas não observadas, técnica de administração do medicamento. Devem ser avaliadas, ainda, as condições de transporte e armazenamento do medicamento.
- A reação adversa a medicamento é o efeito nocivo e não intencional e que ocorre nas doses normalmente utilizadas para profilaxia, diagnóstico, terapia da doença ou para modificação de funções fisiológicas. Para melhor compreensão das reações adversas e prevenção de eventos futuros, é indispensável que as suspeitas de reação adversa sejam notificadas, para permitir a realização das investigações adequadas. Os resultados das investigações são diversos, e podem levar a modificações terapêuticas no tratamento do paciente, como suspensão, substituição ou ajuste de dose até a alteração da bula do medicamento ou retirada de comercialização.
- Intoxicações por medicamentos são a resposta nociva decorrente do uso, intencional, ou não, de um medicamento em doses superiores àquelas usualmente empregadas para profilaxia, diagnóstico, tratamento ou para modificação de funções fisiológicas.
- *Uso off label* é o uso em situações divergentes do descrito na bula do medicamento autorizada pela Agência Sanitária Nacional. Pode incluir diferenças na indicação, faixa etária/peso, dose, frequência, apresentação ou via de administração.
- Erro de medicação é qualquer evento evitável que pode causar ou levar a um uso inapropriado de medicamentos ou causar dano a um paciente, enquanto a medicação está sob o controle dos profissionais de saúde, pacientes ou consumidores, envolvendo o uso não intencional, com finalidade terapêutica, podendo ou não ter prescrição. O erro de medicação em potencial, que não chegou a alcançar o paciente, também é conhecido como quase falha. qualquer evento evitável que possa causar ou levar a uso inapropriado de medicamentos, ou causar dano a um paciente, enquanto a medicação está sob o controle dos profissionais de saúde, pacientes ou consumidores, envolvendo o uso não intencional, com finalidade terapêutica, podendo ou não ter prescrição.
- Interação medicamentosa é a resposta farmacológica, toxicológica, clínica ou laboratorial causada pela combinação do medicamento com outros medicamentos. A interação medicamentosa pode resultar em aumento ou diminuição da efetividade terapêutica ou ainda no aparecimento de novos eventos adversos relacionados.

13.2 ASPECTOS HISTÓRICOS SOBRE A FARMACOVIGILÂNCIA NO BRASIL E NO MUNDO

A farmacovigilância permite ampliar o conhecimento e disseminar rapidamente informações sobre a segurança no uso de medicamentos, com o objetivo de prevenir a ocorrência de eventos adversos graves (CARON et al., 2016). Além da análise individual das suspeitas de eventos adversos graves, a farmacovigilância compreende também a avaliação periódica de relatórios de avaliação benefício-risco que contemplam todos os relatos de eventos adversos. Por fim, os dados obtidos pelos serviços de farmacovigilância de cada país são encaminhados à OMS, o que permite análise dos dados agregados para a detecção de sinais de segurança pelo Programa Internacional de Monitorização de Medicamentos coordenado por *the Uppsala Monitoring Centre* (UMC), centro colaborador da OMS para a farmacovigilância.

O Brasil passou a colaborar oficialmente como 62º país membro oficial do Programa Internacional em 2001, quando foi instituído o Centro Nacional de Monitorização de Medicamentos (CNMM), com escritório-sede na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Desde então, a Anvisa participa de fóruns internacionais junto

à OMS e autoridades regulatórias para compreender os eventos adversos relacionados a medicamentos. Neles os participantes compartilham experiências sobre usos de vacinas e demais medicamentos, incluindo discussão de casos de eventos adversos para complementar a análise dos eventos adversos. A Agência, ainda, verifica rotineiramente a emissão de alertas acerca da segurança emitidos por autoridades regulatórias estrangeiras e pelo UMC (ANVISA, 2021).

No entanto, para que haja efetiva colaboração brasileira nesta importante rede internacional, esforços vêm sendo empreendidos com êxito para o fortalecimento e o desenvolvimento de redes locais de farmacovigilância no Brasil, tais como a rede de Hospitais Sentinela da Anvisa e a Rede Nacional de Alerta e Resposta às Emergências em Saúde Pública do Ministério da Saúde, composta por Centros de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde (CIEVS). A farmacovigilância vem se desenvolvendo com papel importante em serviços de saúde e empresas farmacêuticas brasileiras, especialmente com a harmonização das bases legais da farmacovigilância no Brasil com as internacionais.

As redes locais, regionais e a rede mundial de farmacovigilância atuam não somente para a captação de eventos adversos por meio de notificações de suspeitas de eventos adversos. Atuam também para qualificar o processo investigativo e avaliativo, que tem como objetivo primário a prevenção de novas ocorrências a partir da melhor compreensão do perfil de segurança dos medicamentos (SALOMON; BARBOSA, 2020).

A compreensão adequada dos eventos adversos e a detecção precoce de sinais de segurança permite às agências reguladoras de cada país elaborarem estratégias de gestão de riscos, gestão de contingências, ajustes de atividades de vigilância e identificação de grupos vulneráveis ou em risco (ANVISA, 2020a). A ferramenta de detecção de sinais adotada pela OMS que as nações signatárias utilizam, incluindo o Brasil, é o *VigiLyze*, que permite a detecção e gerenciamento de sinais a partir de dados nacionais, regionais ou globais, como ponto de partida para a sua detecção quantitativa (ANVISA, 2021). A análise do *VigiLyze* permite à Anvisa avaliar os dados brasileiros e compará-los aos internacionais, além de incluir informações sobre questões de segurança emergentes e possibilitar contínua e sistemática análise dos planos de gerenciamento de riscos apresentados no processo de registro ou autorização de uso emergencial de medicamentos.

Para alcançar os mais elevados níveis de monitoramento de sinais de segurança sobre os medicamentos, é primordial a interação entre os diversos atores estratégicos da farmacovigilância – agência reguladora, detentores de registro e autorização de uso emergencial,

serviços de saúde e a sociedade. A cooperação entre esses atores em prol da população brasileira é imprescindível para que sejam prestadas respostas rápidas à sociedade e para o bom funcionamento do sistema de farmacovigilância no Brasil. A farmacovigilância alcançou avanços importantes, em especial durante a pandemia de Covid-19, na qual a farmacovigilância tornou-se uma ciência conhecida pela população. Contudo, não é uma área prioritária para investimentos, tanto nos serviços públicos quanto nos privados, o que tem limitado a sua atuação, especialmente quanto à disponibilidade de recursos tecnológicos e humanos. Assim, estratégias devem ser adotadas para priorizar o monitoramento de grupos de medicamentos de maior risco, como os de origem biotecnológica.

13.3 A IMPORTÂNCIA DA FARMACOVIGILÂNCIA PARA SEGURANÇA DOS PRODUTOS DE ORIGEM BIOTECNOLÓGICA

Ao contrário dos medicamentos sintetizados quimicamente, que geralmente podem ser facilmente caracterizados e reproduzidos por diferentes fabricantes, as substâncias ativas biológicas são moléculas complexas produzidas geralmente usando processos de fabricação complexos com muitas etapas de *upstream* ou de *downstream* que moldam o perfil geral de segurança, qualidade e eficácia. O processo de fabricação (incluindo a escolha da linha celular, ou matéria-prima, processo de fermentação e purificação, formulação final) é tão determinante da qualidade do produto quanto a substância ativa, e pequenas alterações em qualquer etapa da fabricação podem afetar a qualidade do produto, e, posteriormente, sua segurança e eficácia. Os avanços na biotecnologia e nas ciências analíticas permitirão uma maior caracterização e controle dos produtos biológicos, mas é essa complexidade fundamental que cria os desafios específicos para os produtos biológicos na farmacovigilância (HMA, 2016).

A farmacovigilância é a pedra angular no monitoramento dos perfis de segurança dos medicamentos, uma vez que estão em uso clínico (GIEZEN; MANTTEL-TEEUWISSE; LEUFKENS, 2009). As informações coletadas pelas práticas rotineiras de farmacovigilância permitem que a comunicação de riscos e medidas de minimização ocorram em tempo hábil quando novos sinais de segurança são identificados para uma determinada indicação ou produto, e essas informações também podem levar a ações corretivas se mudanças em um perfil de segurança forem observadas durante o ciclo de vida do produto (CASADEVALL et al., 2013; GIEZEN; MANTTEL-TEEUWISSE; LEUFKENS, 2009). Na era dos

biológicos de múltiplas fontes, a farmacovigilância de rotina torna-se particularmente importante para garantir o uso seguro e eficaz desses produtos, pois eventos raros, como reações imunomediadas em alguns casos, podem ser detectados somente após a comercialização dos produtos (AKERS, 2014; GIEZEN; MANTEL-TEEUWISSE; LEUFKENS, 2009) Além disso, os biológicos são mais suscetíveis a diferenças físico-químicas (isto é, estruturais e funcionais) devido a diferenças na fabricação, seu ambiente ou condições de manuseio em relação a drogas de moléculas pequenas (CASADEVALL et al., 2013).

13.4 O PAPEL DA FARMACOVIGILÂNCIA NA DETECÇÃO, NOTIFICAÇÃO, INVESTIGAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EVENTOS ADVERSOS

Os eventos adversos (EA) devem ser identificados, avaliados e monitorados e comunicados pela Farmacovigilância. São definidos como qualquer ocorrência médica indesejável em paciente no qual haja sido administrado medicamento, sem que necessariamente exista relação causal com o tratamento, podendo ser qualquer sinal desfavorável e não intencional, sintoma ou doença temporariamente associada ao uso do medicamento (BRASIL, 2020). Sendo assim, são escopo da Farmacovigilância as informações de segurança relativas à suspeita de reações adversas a medicamentos; inefetividade terapêutica, total ou parcial; interações medicamentosas; superdose de medicamentos; abuso de medicamentos; erros de medicação; uso *off label* do medicamento; exposição a medicamento durante gravidez/lactação; e eventos adversos por desvio de qualidade (BRASIL, 2020).

Excepcionalmente na Farmacovigilância de vacinas, utiliza-se a terminologia “evento supostamente atribuível à vacinação ou imunização” (ESAVI), que é definido como qualquer evento de saúde (sinal, sintoma, achado laboratorial anormal ou doença) desfavorável e indesejado que ocorre após a vacinação ou imunização, e que não tem necessariamente uma relação causal com o processo de vacinação ou com a vacina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; OPAS, 2022). Assim, destaca-se a incerteza quanto à relação causal entre o evento adverso e a vacina no momento da notificação; e diferencia-se vacinação (processo de administração da vacina) de imunização (processo de geração de resposta do sistema imunitário), importante para avaliar o efeito causal de cada um.

Os eventos adversos de interesse especial (EAIE) são aqueles que representam uma preocupação médica e científica, necessitando de notificação, análise e monitorização prioritárias. São eventos pré-especificados clinicamente significativos que podem ser causados por um medicamento e podem requerer investigação

adicional, com o objetivo de melhor caracterizá-los e compreendê-los. Podem ser graves, ou não, e incluir eventos que possam ser potenciais precursores ou pródromos para condições médicas mais graves em indivíduos suscetíveis (CIOMS, 2022b; OPAS, 2022).

Os EA podem ser classificados quanto à frequência de ocorrência, à gravidade e à intensidade. As categorias dos EA quanto à frequência de ocorrência entre os expostos ao medicamento são muito comuns, comuns ou frequentes, incomuns ou infrequentes, raros ou muito raros, conforme o Quadro 13.1.

QUADRO 13.1 Classificação dos eventos adversos quanto à frequência de ocorrência

Categoria	Frequência (razão)	Frequência (%)
Muito comum	$\geq 1/10$	≥ 10
Comum (frequente)	$\geq 1/100$ e $< 1/10$	≥ 1 e < 10
Incomum (infrequente)	$\geq 1/1.000$ e $< 1/100$	$> 0,1$ e < 1
Raro	$\geq 1/10.000$ e $< 1/1.000$	$\geq 0,01$ e $< 0,1$
Muito raro	$< 1/10.000$	$< 0,01$

Fonte: elaborado com base em CIOMS (1999) e OPAS (2022).

Evento adverso grave (EAG) é qualquer ocorrência médica indesejável, em qualquer dose, que resulte em morte, risco de morte, situações que requeiram hospitalização ou prolongamento de hospitalização existente, incapacidade significativa ou persistente, anomalia congênita e evento clinicamente significativo (BRASIL, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Para um ESAVI, considera-se também como critério de gravidade a condição de ser suspeito de provocar aborto (OPAS, 2022). Os eventos adversos não graves (EANG) são quaisquer outros eventos que não estejam incluídos nos critérios de gravidade apresentados. Eles não representam risco potencial para a saúde do paciente ou vacinado, mas também devem ser cuidadosamente monitorados, pois podem sinalizar um problema potencialmente maior em relação ao medicamento, à vacina ou à imunização; e no caso das vacinas, podem ter um impacto sobre a aceitabilidade da imunização, em geral.

Diferentemente da gravidade, a classificação de intensidade de um EA tem relação com o grau de comprometimento nas atividades diárias do paciente e não com seu desfecho. Um EA pode ser leve, moderado ou intenso (CIOMS, 2022a; DIVISION OF AIDS, 2017; FDA, 2007), independentemente de ser, ou não, grave. Por exemplo, uma dor de cabeça que necessitou de analgesia potente, mas não resultou em internação é um EA intenso e não grave. A

gravidade de um EA (e não a intensidade) norteia o cumprimento regulatório em relação à notificação de um EA (CIOMS, 2022b).

Deve-se diferenciar evento adverso de reação adversa (BRASIL, 2020), uma vez que essa última se caracteriza pela suspeita de relação causal entre o medicamento e a resposta prejudicial ou indesejável (BRASIL, 2020). Assim, os EA são classificados quanto à relação causal com o medicamento de acordo com o Quadro 13.2.

Para as vacinas, os tipos de ESAVI de acordo com sua causa estão descritos no Quadro 13.3.

QUADRO 13.2 Classificação dos eventos adversos quanto à relação causal com o medicamento

Categoria de causalidade	Critérios
Definida	Evento ou alteração (anormal) em exame laboratorial com relação temporal plausível em relação à administração da intervenção; Não pode ser explicado por doença ou outra intervenção, medicamento; Resposta à interrupção ou retirada plausível (farmacologicamente, patologicamente); Evento definido farmacologicamente ou fenomenologicamente (p. ex., uma desordem objetiva e específica ou um fenômeno farmacologicamente reconhecido); Reexposição satisfatória, se necessária.
Provável	Evento ou alteração (anormal) em exame laboratorial com relação temporal razoável em relação à administração da intervenção; Improvável que seja atribuído a uma doença ou outra intervenção, medicamento; Resposta à interrupção ou retirada clinicamente razoável; Reexposição não exigida.
Possível	Evento ou alteração (anormal) em exame laboratorial com relação temporal razoável em relação à administração da intervenção; Pode também ser explicado por doença ou outras intervenções, medicamentos; Informação sobre a retirada ou interrupção do tratamento pode estar faltando ou obscura.

(continua)

QUADRO 13.2 Classificação dos eventos adversos quanto à relação causal com o medicamento (continuação)

Categoria de causalidade	Critérios
Improvável	Evento ou alteração (anormal) em exame laboratorial que em relação ao momento de administração da intervenção faz uma relação improvável (mas não impossível); Doença ou outros tratamentos subsidiam explicações plausíveis.
Condicional/não classificada	Evento ou alteração (anormal) em exame laboratorial; Mais dados são necessários para uma avaliação apropriada; ou Dados adicionais sob investigação.
Inacessível/inclassificável	A narrativa do relato sugere uma reação adversa; Não pode ser classificada porque a informação é insuficiente ou contraditória; Os dados não podem ser suplementados ou verificados.

Fonte: WHO (2013).

QUADRO 13.3 Classificação de um ESAVI quanto a sua causa

Tipo de ESAVI	Definição
Evento relacionado à vacina ou a qualquer um de seus componentes	ESAVI causado por uma ou mais propriedades inerentes ao produto biológico, seja o princípio ativo ou qualquer outro componente da vacina (p. ex., adjuvantes, conservantes ou estabilizantes)
Evento relacionado com um desvio de qualidade do produto	ESAVI ocasionado por desvio das especificações de qualidade das vacinas, inclusive dos dispositivos utilizados para sua aplicação, em decorrência dos processos de fabricação, armazenamento ou distribuição
Evento relacionado a erro programático	ESAVI causado por um desvio dos procedimentos padronizados recomendados em qualquer estágio do ciclo da vacina, desde a distribuição pelo fabricante até o uso, incluindo o descarte de resíduos
Evento por estresse ocorrido imediatamente antes, durante ou após o processo de vacinação	ESAVI causado por ansiedade relacionada ao processo de vacinação e fatores socioculturais relacionados

(continua)

QUADRO 13.3 Classificação de um ESAVI quanto a sua causa (*continuação*)

Tipo de ESAVI	Definição
Evento coincidente	ESAVI que NÃO é causado pela vacina, erro programático ou reação de estresse relacionada à vacinação, guardando relação meramente temporal com a aplicação da vacina
Evento inclassificável (ou não classificável)	Definição operacional utilizada quando, por falta de informações, o evento não pode ser classificado em nenhuma outra categoria

Fonte: OPAS (2022).

A vigilância de um EA é composta pela sua detecção; notificação; registro em sistema de informação; investigação (análise dos exames clínicos, exames laboratoriais, outros medicamentos em uso, doenças pré-existentes, busca ativa de novos dados etc.); análise das informações e avaliação de causalidade; e *feedback* ou retroalimentação do caso com medidas corretivas (Figura 13.1).

13.4.1 Detecção dos eventos adversos

A vigilância passiva é o tipo mais frequente de vigilância pós-mercado realizada em relação aos EA na qual um profissional de saúde ou consumidor relata

BOX 13.1

Saiba mais:

ESAVI não grave: É todo ESAVI que não ofereça perigo à vida do indivíduo vacinado (ou do embrião, feto ou recém-nascido caso o indivíduo vacinado tenha sido uma gestante), que desapareça sem tratamento ou apenas com tratamento sintomático, que não necessite de hospitalização e que não cause deficiência ou outros transtornos a longo prazo.

Reação adversa: qualquer resposta prejudicial ou indesejável, não intencional, a um medicamento, que ocorre nas doses usualmente empregadas no ser humano para profilaxia, diagnóstico, terapia da doença ou para a modificação de funções fisiológicas (BRASIL, 2020).



FIGURA 13.1 Componentes da vigilância de eventos adversos a medicamentos.

Fonte: OPAS (2022).

espontaneamente a ocorrência de EA após o uso de um medicamento para a autoridade regulatória, uma empresa farmacêutica ou uma instituição de saúde (SALOMON, 2020). O principal objetivo da vigilância passiva é detectar previamente eventos desconhecidos ou quaisquer alterações no perfil de notificação de EA conhecidos (OLIVEIRA et al., 2020).

A subnotificação é a principal limitação da vigilância passiva e ocorre tanto em países de alta quanto de baixa renda (SALOMON; BARBOSA, 2019). A sensibilização dos profissionais de saúde envolvidos no processo de detecção, assim como dos consumidores/pacientes e responsáveis pelas crianças vacinadas ou em uso de algum medicamento, é importante para o monitoramento adequado dos eventos adversos.

A vigilância ativa é um método que busca determinar EA por meio de um processo contínuo e pré-organizado. Consiste na aplicação de estratégias de busca sistemática de eventos específicos na comunidade ou em estabelecimentos de saúde. Envolve a detecção proativa e a rápida análise de informações que ocorrem em milhões de indivíduos registrados em grandes sistemas de dados de saúde para verificar os sinais de segurança identificados por meio da vigilância passiva ou para detectar sinais de segurança adicionais que podem não ter sido relatados como eventos adversos aos sistemas de vigilância passiva (FDA, 2021; SALOMON; BARBOSA, 2020). Os EA também podem ser detectados de forma ativa, por exemplo, em pesquisas na literatura e estudos clínicos de pós-comercialização (estudos de Fase IV).

13.4.2 Notificação e registro dos eventos adversos

A Portaria n. 1.660, de 22 de julho de 2009, instituiu o Sistema de Notificação e Investigação em Vigilância Sanitária (Vigipós), no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, como parte integrante do SUS. No seu artigo 1º, a Portaria institui o monitoramento, a análise e a investigação dos eventos adversos e queixas técnicas relacionadas aos serviços e aos produtos sob vigilância sanitária na fase de pós-comercialização/pós-uso. Em seu artigo 8º (BRASIL, 2009), estabelece que os órgãos de vigilância epidemiológica e sanitária, nas três esferas de gestão do SUS, desenvolverão ações conjuntas que visem à promoção e à proteção da saúde da população quando houver ocorrência de eventos de relevância epidemiológica relacionados com os produtos sob vigilância sanitária (BRASIL, 2009).

Os detentores de registro de medicamentos devem seguir os requisitos de farmacovigilância descritos no art. 34 da Resolução – RDC nº 406/2020 (BRASIL, 2020). Entre tais obrigações, os detentores devem co-

municar à ANVISA quaisquer informações relevantes relacionadas à segurança, que configurem situações de urgência quanto à utilização de seus produtos afetando a segurança do paciente, que sejam detectadas por eles, no prazo previsto. Neste rol de informações, incluem-se as notificações de eventos adversos graves, vinculados aos produtos registrados.

No Brasil, os eventos adversos envolvendo medicamentos biológicos (exceto vacinas) devem ser notificados por profissionais de saúde, usuários e indústria farmacêutica no sistema da Anvisa, o *VigiMed*. Para as vacinas, os profissionais de saúde utilizam o Sistema e-SUS Notifica, gerenciado pelo Programa Nacional de Imunizações. Os usuários e a indústria farmacêutica, por sua vez, utilizam o *VigiMed*.

O *VigiMed* é o sistema disponibilizado pela Anvisa para o monitoramento de eventos adversos relacionados a medicamentos e vacinas, substituindo o *Notivisa* nessas situações (ANVISA, 2020b). *VigiMed* é o nome dado no Brasil ao sistema *VigiFlow*, que é fornecido aos centros nacionais de farmacovigilância dos países membros do Programa de Monitoramento Internacional de Medicamentos pelo *Uppsala Monitoring Centre* (UMC), centro colaborador da OMS que operacionaliza o programa. O sistema foi lançado no Brasil em janeiro de 2019 e algumas das funcionalidades estão em fase de desenvolvimento; portanto, novas versões ainda serão lançadas, com incrementos e melhorias.

Ele está disponível para os profissionais de saúde, para os serviços de saúde (rede sentinela, hospitais, ambulatórios e clínicas de vacinação) e para os detentores de registro de medicamentos. As vigilâncias sanitárias estaduais também têm acesso ao sistema para dar suporte ao monitoramento dos dados locais. Os patrocinadores que conduzem os ensaios clínicos no Brasil com quaisquer medicamentos e produtos biológicos também começaram a ser cadastrados no *VigiMed*.

- **Profissionais de saúde:** profissional de saúde sem vínculo institucional, ou seja, de um estabelecimento sem cadastro no *VigiMed*.
- **Serviços de saúde:** notifique aqui quando estiver vinculado a um serviço de saúde. Para cadastro e atualizações, o gestor deve enviar um e-mail para vigimed@anvisa.gov.br com as seguintes informações: nome da Instituição e CNES, lista de usuários, e-mail dos usuários e seus respectivos cargos. Clínicas de Vacinação devem responder ao formulário do Edital de Chamamento nº 2/2021.
- **Vigilâncias Sanitárias:** acessam para monitoramento das notificações provenientes dos estabelecimentos do seu Estado.

- **Empresas:** seguindo a regulamentação da farmacovigilância, RDC 406/2020.
- **Patrocinadores de ensaios clínicos:** devem notificar aqui eventos adversos graves em ensaios clínicos com medicamentos ou produtos biológicos.

No VigiMed devem ser notificados os eventos adversos (EA) relacionados a medicamentos e os eventos subsequentemente atribuíveis a vacinas ou vacinação (ESAVI), ou seja, qualquer ocorrência médica indesejável na qual haja sido administrado medicamento ou vacina, mesmo sem certeza de que a intercorrência seja causada pelo tratamento. Exemplos incluem suspeitas de reações adversas, ausência ou redução do efeito, erros de medicação, interações entre medicamentos diferentes e uso com finalidade diferente do indicado na bula (*off-label*).

Permanecem sendo notificadas no Notivisa as queixas técnicas, ou seja, as suspeitas de alterações em produtos ou irregularidades de empresas, tais como alterações na consistência do produto/rótulo, presença de corpo estranho, defeitos no lacre/tampa, denúncias de produtos sem registro e falsificados. No entanto, as queixas técnicas, quando associadas a um evento adverso, devem ser notificadas no VigiMed.

Notificações de eventos adversos relacionados às vacinas contra o vírus SARS-CoV-2 (Covid-19), conforme Protocolo de Vigilância Epidemiológica e Sanitária de Eventos Adversos Pós-Vacinação: profissionais de saúde e serviços de saúde, devem utilizar preferencialmente o e-SUS Notifica. Os detentores de registro de medicamentos ou de autorização temporária de uso emergencial devem utilizar o VigiMed.

A notificação deve ser realizada sempre que houver a suspeita de uma reação adversa ou outra questão de segurança. Logo, muitas vezes não estão disponíveis informações completas sobre a situação em um primeiro momento. Mesmo assim, o relato deve ser realizado com as informações disponíveis, não sendo necessário preencher todos os campos do sistema para completar a entrada de dados. Há uma quantidade mínima de informações que a notificação deve conter para ser válida (Quadro 13.4). Contudo, uma notificação mais completa levará a uma melhor análise dos dados.

A OMS possui um banco de dados global de eventos adversos a medicamentos, o VigiBase, que é desenvolvido e mantido pelo *Uppsala Monitoring Centre* (UMC). Ele permite a análise de suspeitas de danos sofridos por pacientes em todo o mundo e como podem ser prevenidos.

O VigiBase detém mais de 30 milhões de notificações anônimas de suspeitas de efeitos adversos de medicamentos sofridos por pacientes (desde janeiro de 2022). É um banco de dados de farmacovigilância no qual as informações são registradas estruturada e hierarquica-

QUADRO 13.4 Campos de preenchimento obrigatório para uma notificação de EA

Informação da notificação

- Data inicial de recebimento
- Tipo de notificação
- Última data de recebimento (se inserir a última data de recebimento, a data deve estar completa)
- Qualificação do notificador

Paciente

- Iniciais do paciente ou
- Sexo ou
- Data de nascimento ou
- Idade no início da reação ou
- Grupo de idade ou
- Se a notificação é Parent/Child*

§ Idade gestacional no início da reação (se feto) ou

§ Idade gestacional na exposição (se feto) (no Medicamento)

*Esta opção deve ser usada nos casos de notificações relacionadas ao uso de medicamento pelo pai/mãe, cujo resultado foi a ocorrência de um evento adverso apenas no filho/feto (lactentes, por exemplo). A notificação nesses casos é referida como sendo "Parent-Child Report". Se não houve reação/evento afetando a criança/feto, este tipo de relato não se aplica. Para os casos que descrevem morte fetal ou aborto espontâneo precoce, somente uma notificação dos pais é aplicável. Se tanto o pai/mãe quanto a criança/feto sofrerem eventos adversos, duas notificações devem ser fornecidas, mas ambas devem ser relacionadas.

Medicamento: indicar pelo menos um medicamento suspeito ou dois medicamentos em interação:

- Nome do medicamento (WHODrug) ou
- Nome do medicamento relatado pelo notificador inicial

Reação

- Reação/evento conforme relatado pelo notificador inicial ou
- Reação/evento (MedDRA)

Fonte: VigiMed (2020).

mente para permitir a recuperação e análise dos dados de maneira fácil e flexível. Seu objetivo é fornecer a evidência a partir da qual os riscos potenciais à segurança de medicamentos (sinais) possam ser detectados e comunicados.

O VigiBase trabalha com a padronização das classificações médicas e de medicamentos, incluindo terminologias como WHO-ART, MedDRA, WHO ICD e o dicionário de medicamentos, WHODrug. Essas classificações permitem a entrada, recuperação e análise de dados estruturados em diferentes níveis de precisão

e agregação, que são vitais para permitir uma análise de dados eficaz e precisa (UMC, 2023).

O objetivo do Programa de Monitoramento Internacional de Medicamentos da OMS é garantir que qualquer indicação de problemas de segurança relacionados a medicamentos anteriormente desconhecidos seja identificada e que as informações sejam compartilhadas, para que ações para proteger os pacientes possam ser tomadas quando necessário.

Os países recebem notificações espontâneas de suspeitas de eventos adversos nacionalmente a partir de seus sistemas de farmacovigilância. No caso do Brasil, o sistema VigiMed. Estes relatos serão revisados e analisados localmente e podem levar a ações regulatórias. Os países membros do Programa Internacional de monitoramento de medicamentos se comprometem a compartilhar esses relatórios no VigiBase, onde os dados pós-comercialização da maioria dos países do mundo são coletados em um só lugar. A coleta de informações em um banco de dados global facilita a detecção de sinais de segurança de medicamentos – que podem não ser aparentes nos dados de um único país – e aumenta a probabilidade de detectar reações adversas raras a medicamentos a partir de dados internacionais. Embora os dados do VigiBase sejam mais heterogêneos do que os dados dos bancos de dados nacionais de farmacovigilância, devido, por exemplo, a diferentes práticas médicas e requisitos regulatórios, ele oferece oportunidades para fazer comparações de países e identificar e analisar diferenças entre países ou regiões.

O sistema VigiBase depende dos centros nacionais de farmacovigilância para a celeridade, integridade e qualidade dos relatórios. Os centros nacionais usam regularmente os dados do VigiBase, a partir do sistema via VigiLyze, para detecção de sinais de segurança.

Desde 1978 o UMC é responsável pelo desenvolvimento e manutenção do VigiBase. Mais de 120 países colaboram fornecendo ao banco de dados uma ampla cobertura da população global, embora haja uma representação desproporcional de alguns países dentro do total de relatórios. Alguns países apresentam taxas de notificação mais altas por milhão de população comparativamente a outros.

O Programa Internacional de Monitoramento de medicamentos da OMS foi criado, em 1968, para garantir que as evidências sobre danos aos pacientes fossem coletadas do maior número possível de fontes. Isso permite que cada país seja alertado sobre padrões de danos emergentes em todo o mundo, mas que podem não ser evidentes apenas a partir de seus dados locais, devido ao volume de dados. Os membros do programa trabalham nacionalmente e colaboram internacionalmente para monitorar e identificar danos causados pelos

medicamentos, reduzir os riscos aos pacientes e estabelecer padrões e sistemas mundiais de farmacovigilância.

O VigiLyze é uma ferramenta de detecção e gerenciamento de sinais que usa insights sobre o uso mais seguro de medicamentos de membros do Programa Internacional de Monitoramento de Medicamentos da OMS como ponto de partida para a detecção quantitativa eficiente de sinais. Apoia processos nacionais de gestão de sinais, incluindo avaliações qualitativas.

13.4.3 Avaliação dos eventos adversos

A investigação de um caso de evento adverso, isto é, de uma suspeita de reação adversa a um medicamento biológico ou vacina se inicia com a notificação, seja pelo médico assistente, enfermeiro, farmacêutico, usuário do produto ou seu cuidador, ou pela indústria farmacêutica que detém o registro do produto. No caso das vacinas, todo ESAVI grave ou óbito ocorrido até 30 dias após a vacinação é um agravo de notificação compulsória ao sistema de vigilância e deve ser notificado em até 24 horas (BRASIL, 2022).

Prioritariamente, devem ser investigados os eventos adversos graves, os desconhecidos (ou seja, aqueles não descritos em bula), os agregados de casos de eventos semelhantes e os eventos adversos de interesse especial para o medicamento em questão (essa listagem é definida pelo produtor com base nos dados de desenvolvimento clínico e farmacovigilância) (OLIVEIRA et al., 2020). Entretanto, a depender da situação, outros eventos podem demandar investigação.

A investigação de um evento adverso consiste no processo de coleta de informações sobre o evento, inclusive as circunstâncias envolvidas, para identificar as possíveis causas e tomar as medidas cabíveis, ou seja, o objetivo principal é determinar se o medicamento ou a vacina foi, ou não, responsável pela ocorrência do evento (WHO, 2020a). Os objetivos secundários da investigação de um evento adverso são confirmar diagnóstico e desfecho; avaliar o processo operacional do programa de imunizações que possa ter causado o erro de imunização (se aplicável); pesquisar outros casos similares (cluster); comparar o risco de ocorrência de determinado evento adverso em expostos e não expostos.

As etapas de um processo de investigação completa de um evento adverso, segundo a OMS são: definir o problema; elaborar um plano de coleta de dados e uma organização estruturada da investigação a ser realizada; consolidar os dados clínicos, resultados laboratoriais e informações sobre a vacina ou medicamento, dispositivo de aplicação e diluente (quando aplicável), inclusive as condições de armazenamento de tais produtos; estabelecer uma linha de tempo e identificar os fatos relacionados

ao evento; identificar os fatores relacionados à prestação do serviço de infusão ou vacinação (se aplicável); agrupar todos os fatores relacionados e contribuintes para o evento; e redigir o relatório de investigação do evento e preencher o formulário correspondente.

Devem ser coletados e registrados no formulário de investigação os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, além de informações sobre o produto administrado. Pode ser necessária a coleta de amostras clínicas para uma melhor elucidação do caso e, se não executada no tempo correto, pode comprometer ou inviabilizar a conclusão da investigação (OLIVEIRA et al., 2020).

Durante a investigação e coleta de dados, deve-se estabelecer a ordem cronológica dos eventos notificados e relacionados que ajudará a relacionar os eventos clínicos com as outras situações e facilitará a formulação de hipóteses. Todos os elementos da investigação compõem um dossiê para análise pelo comitê de farmacovigilância. Deve-se assegurar que a investigação seja conduzida objetiva e imparcialmente durante o processo de coleta e análise das informações. O pessoal envolvido em todo o processo não deve ter conflitos de interesses e a qualidade das evidências coletadas deve ser sempre avaliada para uma análise completa e imparcial do caso.

13.4.4 Compreensão dos eventos adversos

As expectativas regulatórias regionais e globais em relação à importância da farmacovigilância para a segurança dos medicamentos levaram a uma evolução gradual das normas, com a introdução de padrões de auditoria e procedimentos operacionais associados, com participação de órgãos colaborativos internacionais como o CIOMS e o Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), incluindo o desenvolvimento de novos conceitos, termos e definições de acompanhamento de eventos adversos (BENINGER, 2020).

A viabilidade regulatória de um produto biológico depende de uma relação benefício-risco aceitável, que, por sua vez, depende do que foi aprendido sobre os benefícios clínicos do produto desde o desenvolvimento clínico pré-registro e do que foi aprendido sobre o perfil de segurança do produto pela avaliação completa do banco de dados de segurança, por meio de atividades de gerenciamento de relatos de eventos adversos e gerenciamento de sinais de segurança.

Quando um novo medicamento é aprovado, a importância do gerenciamento dos sinais de segurança aumenta significativamente, porque a população de pacientes que passa a ser exposta ao novo produto aumenta gradual-

mente, passando de relativamente homogênea (na fase de desenvolvimento clínico) para grupos de pacientes que muitas vezes não foram estudados durante os ensaios clínicos prévios à aprovação.

Esses grupos não estudados previamente podem incluir pacientes com comorbidades e doenças complexas, que não são inseridos em ensaios clínicos devido aos critérios de inclusão e exclusão dos protocolos de pesquisa, populações especiais (p. ex., crianças e adolescentes, pacientes idosos e mulheres grávidas). Adicionalmente, pacientes em uso de vários medicamentos concomitantes, alguns dos quais têm o potencial de causar interações medicamentosas que não foram avaliadas antes da aprovação.

O gerenciamento de sinais de segurança é parte integrante da farmacovigilância, sendo fundamental para prover as informações necessárias para a manutenção dos perfis de segurança dos produtos biológicos de uma empresa, apoiar balanços benefício-risco favoráveis e garantir o uso seguro pelos profissionais de saúde e seus pacientes.

13.4.5 Comunicação dos eventos adversos

A desinformação é altamente sofisticada e deliberadamente projetada para atacar a população mais vulnerável. Assim como as táticas de educação em saúde, mobilização social e comunicação que ajudaram a erradicar a varíola há mais de 40 anos evoluíram, as táticas usadas por fornecedores de desinformação também. A desinformação é cada vez mais sofisticada e difícil de rastrear, e pode colocar em risco a confiança do público nas autoridades de saúde e serviços (WHO, 2021). Essa atividade pode ser usada como uma ferramenta para encorajar a polarização, estigmatizar grupos de pessoas e encorajar “tratamentos” e comportamentos prejudiciais à saúde.

A desinformação e a desconfiança podem ser uma mistura particularmente tóxica que leva as pessoas a rejeitarem intervenções de saúde, como vacinas (p. ex., no caso da Covid-19 e da poliomielite), desrespeitar as orientações dos especialistas em saúde (p. ex., na Covid-19) ou experimentar terapias não comprovadas e perigosas.

A comunicação de risco trata da troca de informações, conselhos e opiniões em tempo real entre especialistas e pessoas que enfrentam uma ameaça (perigo) a sua sobrevivência, saúde ou bem-estar econômico ou social (WHO, 2020b). Seu objetivo final é que todos em risco sejam capazes de tomar decisões informadas para mitigar os efeitos da ameaça (perigo), como um surto de doença, e tomar medidas de proteção e prevenção.

A comunicação de risco usa muitas técnicas de comunicação, desde mídia e comunicações de mídia social

até comunicações de massa e envolvimento das partes interessadas e da comunidade. Requer a compreensão das percepções, preocupações e crenças das partes interessadas, bem como de seus conhecimentos e práticas. A comunicação de risco eficaz também deve identificar desde o início e, posteriormente, gerenciar rumores, desinformação e outros desafios de comunicação.

A comunicação de risco ocorre em todas as etapas do processo de gerenciamento de risco de farmacovigilância, abrangendo a troca de informações e conselhos sobre segurança de medicamentos entre especialistas ou autoridades reguladoras e usuários de medicamentos. O objetivo é permitir que decisões terapêuticas informadas sejam feitas por profissionais de saúde e pelo público (BAHRI et al., 2015).

Embora a comunicação seja um processo fundamental da vida, comunicar os riscos dos medicamentos é muitas vezes complicado (BHASALE et al., 2021). Poucos países têm estratégias de comunicação eficazes e comprovadas. Os esforços de uma década da OMS para melhorar a comunicação de risco continuam, com as diretrizes mais recentes sobre o gerenciamento de uma infodemia (WHO, 2021). A OMS enfatiza a necessidade de entender o conhecimento, percepções, crenças e práticas de todas as partes interessadas enquanto adapta a orientação para abranger os últimos avanços nos métodos de comunicação. A linguagem precisa ser acessível ao público-alvo e trazer a informação de segurança clara e assertivamente, evitando gerar medo e apreensão nas pessoas.

13.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das exigências regulatórias e da opinião pública sobre biofármacos e vacinas, é essencial quebrar paradigmas e investir em abordagens inovadoras de farmacovigilância. A proatividade na detecção de problemas relacionados a medicamentos, seguida de uma resposta rápida, certamente pode interromper rumores e aumentar a confiança da indústria farmacêutica pública e dos programas governamentais de saúde que se consolidaram ao longo de décadas.

A farmacovigilância dos produtos de origem biotecnológica representa uma oportunidade, mas também um desafio para melhorar os seus processos. O trabalho em conjunto de diferentes atores envolvidos na farmacovigilância deve permitir a detecção de melhoria do sistema, simplificação de processos e aumento da adesão dos participantes. Adicionalmente, deve melhorar a qualidade dos dados, ser flexível para incorporar mudanças e fortalecer a detecção e a classificação dos casos. Além disso, precisa ser estável ao longo do tempo e promover sua utilidade e efetividade ao responder a cada um dos

seus objetivos. A fim de superar os desafios enfrentados pelo Brasil para realizar a farmacovigilância, mudanças nos processos de detecção e avaliação dos eventos adversos vêm sendo realizadas, como a interoperabilidade entre os sistemas utilizados para a detecção de eventos adversos com a base de dados mundial de farmacovigilância, o VigiBase.

Essas mudanças possibilitam maior celeridade para o processo de detecção de sinais de segurança dos produtos. A detecção de sinais carece de análise quanto a sua credibilidade científica e clínica e quanto à sua relevância regulatória. Tal avaliação tornou-se mais robusta no Brasil após a implementação da farmacovigilância das vacinas contra a Covid-19. Embora haja espaço para melhorias, o processo se fortaleceu, e o diálogo com a agência regulatória se destaca como ponto forte do processo. A interação entre os diversos atores estratégicos da farmacovigilância (p. ex., Agência Nacional de Vigilância Sanitária, detentores de registro e Programa Nacional de Imunizações) favoreceu a agilidade na tomada de decisão e troca de conhecimentos sobre as vacinas. Não há dúvidas de que a cooperação entre esses atores em prol da população brasileira seja estratégica para o funcionamento adequado do sistema de farmacovigilância no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. AKERS, C. **Safety First – Sizing Up Biologics Side Effects**. Disponível em: <https://themedicinemaker.com/manufacture/safety-first-sizing-up-biologics-side-effects>. Acesso em: 23 jan. 2023.
2. ANVISA. **Guia sobre os requisitos mínimos para submissão de solicitação de autorização temporária de uso emergencial, em caráter experimental, de vacinas Covid-19**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/guia-sobre-os-requisitos-minimos-para-submissao-de-solicitacao-de-autorizacao-temporaria-de-uso-emergencial-em-carater-experimental-de-vacinas-covid>. Acesso em: 23 jan. 2023a.
3. ANVISA. **Notificações de medicamentos e vacinas – profissionais de saúde**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/notificacoes/medicamentos-e-vacinas/profissionais/profissionais>. Acesso em: 25 jan. 2023b.
4. ANVISA. **Plano de Monitoramento de Eventos Adversos de Medicamentos e Vacinas Pós-Vacinas Pós-Autorização Autorização de Uso Emergencial: de Uso Emergencial: Diretrizes e**. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/farmacovigilancia/plano-de-monitoramento-de-eapv-_diretrizes-e-estrategias-de-farmacovigilancia-para-o-enfrentamento-da-covid-19.pdf. Acesso em: 23 jan. 2023.
5. BAHRI, P. et al. The ISO-P CommSIG for Improving Medicinal Product Risk Communication: A New Special Interest Group of

- the International Society of Pharmacovigilance. **Drug Safety**, v. 38, n. 7, p. 621–627, 2 jul. 2015.
6. BENINGER, P. Signal Management in Pharmacovigilance: A Review of Activities and Case Studies. **Clinical Therapeutics**, v. 42, n. 6, p. 1110–1129, jun. 2020.
 7. BHASALE, A. L. et al. Postmarket Safety Communication for Protection of Public Health: A Comparison of Regulatory Policy in Australia, Canada, the European Union, and the United States. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 109, n. 6, p. 1424–1442, jun. 2021.
 8. BRASIL. **Portaria n. 1.660, de 22 de julho de 2009**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt1660_22_07_2009.html. Acesso em: 24 jan. 2023.
 9. BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 406, de 22 de julho de 2020**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-406-de-22-de-julho-de-2020-269155491>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 10. BRASIL. **Portaria GM/MS n. 420, de 2 de março de 2022**.
 11. CARON, J. et al. The history of pharmacovigilance. **Therapies**, v. 71, n. 2, p. 129–134, abr. 2016.
 12. CASADEVALL, N. et al. Pharmacovigilance and biosimilars: considerations, needs and challenges. **Expert opinion on biological therapy**, v. 13, n. 7, p. 1039–1047, jul. 2013.
 13. CIOMS. **Guidelines for Preparing Core Clinical-Safety Information on Drugs Second Edition – Report of CIOMS Working Groups III and V**. Disponível em: <https://cioms.ch/publications/product/guidelines-preparing-core-clinical-safety-information-drugs-second-edition-report-cioms-working-groups-iii-v/>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 14. CIOMS. **CIOMS Cumulative Glossary, with a focus on pharmacovigilance**. Geneva, Switzerland: [s.n.]. Disponível em: <https://cioms.ch/publications/product/cioms-cumulative-pharmacovigilance-glossary/>.
 15. CIOMS. **Glossary of ICH terms and definitions**. Disponível em: <https://cioms.ch/publications/product/glossary-of-ich-terms-and-definitions/>. Acesso em: 23 jan. 2023b.
 16. DIVISION OF AIDS. **Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events**. Disponível em: <https://rsc.niaid.nih.gov/sites/default/files/daidsgradingcorrectedv21.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 17. FDA. **Guidance for Industry: Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials**. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/73679/download>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 18. FDA. **COVID-19 Vaccine Safety Surveillance**. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/covid-19-vaccine-safety-surveillance>. Acesso em: 24 jan. 2023.
 19. GIEZEN, T. J.; MANTEL-TEEUWISSE, A. K.; LEUFKENS, H. G. M. Pharmacovigilance of biopharmaceuticals: challenges remain. **Drug safety**, v. 32, n. 10, p. 811–817, 2009.
 20. GRAHAM, B. B. S. Rapid COVID-19 vaccine development Availability Includes the Avoidance of Safety Pitfalls. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 945–946, 2020.
 21. HMA. **Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP): Product- or Population-Specific Considerations II: Biological medicinal products**. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-pharmacovigilance-practices-gvp-product-population-specific-considerations-ii_en-0.pdf. Acesso em: 23 jan. 2023.
 22. KUMAR, A. et al. Status Report on COVID-19 Vaccines Development. **Current Infectious Disease Reports**, v. 23, n. 6, 2021.
 23. LURIE, N. et al. Developing covid-19 vaccines at pandemic speed. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 21, p. 1969–1973, 2020.
 24. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação**. 4. ed. Brasília: [s.n.].
 25. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota técnica n. 255/2022-CGPNI/DEIDT/SVS/MS**. Disponível em: <https://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/nt-255-2022-cgpni-deidt-svs-ms.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2022.
 26. OLIVEIRA, P. M. N. DE et al. O panorama da vigilância de eventos adversos pós-vacinação ao fim da década de 2010: importância, ferramentas e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. suppl 2, 2020.
 27. OPAS. **Manual de vigilância de eventos supostamente atribuíveis à vacinação ou imunização na Região das Américas**. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55946>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 28. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Boas práticas de farmacovigilância para as Américas Boas práticas de farmacovigilância para as Américas**. [s.l.: s.n.].
 29. SALOMON, F. **Boletim Farmacovigilância 13**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/monitoramento/farmacovigilancia/boletins-de-farmacovigilancia/boletim-de-farmacovigilancia-no-13.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2023.
 30. SALOMON, F.; BARBOSA, J. **Boletim de Farmacovigilância 7**.
 31. SALOMON, F.; BARBOSA, J. **Boletim Farmacovigilância 10**. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33868/2894786/Boletim+de+Farmacovigilância+nº+10/edccfdd4-0645-418a-92d5-b328df8639e9?version=1.2>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 32. UMC. **The WHO Programme for International Drug Monitoring**. Disponível em: <https://who-umc.org/about-the-who-programme-for-international-drug-monitoring/>. Acesso em: 25 jan. 2023.
 33. VIGIMED. **Sistema de notificação de eventos adversos no uso de medicamentos no uso de medicamentos Perguntas e Respostas Perguntas e Respostas**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/notificacoes/VigiMed/arquivos/VigiMed-perguntas-e-respostas.pdf/view>. Acesso em: 25 jan. 2023.
 34. WHO. **A importância da farmacovigilância**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/importancia.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2023.
 35. WHO. **The use of the WHO-UMC system for standardised case causality assessment**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-causality-assessment>. Acesso em: 24 jan. 2023.
 36. WHO. **Covid-19 Vaccines: Safety Surveillance Manual**. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/covid-19-vaccines-safety-surveillance-manual/covid19vaccines_manual_surveillance_systems.pdf. Acesso em: 7 fev. 2023a.
 37. WHO. **Emergencies: Risk communication**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/emergencies-risk-communication>. Acesso em: 25 jan. 2023b.
 38. WHO. **WHO public health research agenda for managing infodemics**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019508>. Acesso em: 25 jan. 2023.

Biossimilares

Valderilio Feijó Azevedo

Hugo Garcia Tonioli Defendi

Iralice Medeiros de Souza

Anna Erika Vieira de Araújo

Flávia Caixeta Albuquerque

Este capítulo apresenta os principais aspectos do desenvolvimento de medicamentos biossimilares, que são produtos biológicos altamente similares aos medicamentos biológicos de referência, em termos de qualidade, segurança e eficácia. O desenvolvimento de biossimilares requer uma série de estudos comparativos, que podem ser organizados em quatro categorias: estudos analíticos, estudos não clínicos, estudos clínicos e estudos confirmatórios. Os estudos analíticos comparam as características físico-químicas, biológicas e imunológicas do biossimilar e do produto de referência. Os estudos não clínicos incluem testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a toxicidade, a farmacocinética e a farmacodinâmica do biossimilar. Os estudos clínicos envolvem ensaios clínicos em humanos para comparar a segurança, a imunogenicidade e a eficácia do biossimilar e do produto de referência em uma ou mais indicações terapêuticas. Os estudos confirmatórios são realizados quando há alguma incerteza residual sobre a similaridade entre o biossimilar e o produto de referência após os estudos anteriores. O capítulo também aborda a questão da intercambialidade de biossimilares, que se refere à possibilidade de substituir o produto de referência pelo biossimilar ou vice-versa sem comprometer a segurança ou a eficácia. Por fim, o capítulo discute os desafios e as oportunidades dos biossimilares em doenças raras, que são condições que afetam um número limitado de pessoas e que geralmente requerem tratamentos biológicos específicos e caros.

14.1 ESTUDOS DE COMPARABILIDADE DE BIOSSIMILARES

Um medicamento biossimilar é um produto biológico produzido para ser semelhante a um medicamento inovador comercializado. Os biossimilares podem apenas ser registrados e comercializados após o término do período de exclusividade patentária do biológico de referência. Para serem registrados pela via da comparabilidade, os

biossimilares precisam possuir semelhanças ao produto referência nos aspectos de qualidade, segurança e eficácia. Por se conhecer informações do produto inovador, algumas etapas podem ser reduzidas no desenvolvimento do biossimilar. Por este motivo, estes produtos têm potencial de aumentar a concorrência, reduzir custos de produção e, assim, ampliar o acesso de pacientes às terapias (PRIVATO; MARTINEZ; SCHMIDT, 2020).

Todos os produtos biológicos, incluindo produtos inovadores e biossimilares, perpassam por uma avaliação rigorosa, de modo a garantir a eficácia, segurança e qualidade do produto a ser prescrito para o paciente. O fabricante de um produto biossimilar é responsável por gerar uma série de dados comparando o produto biossimilar proposto com o produto de referência aprovado pela agência reguladora nacional, para demonstrar a biossimilaridade (PIMENTA; MONTEIRO, 2019).

A via de aprovação dos biossimilares é complexa, pois depende do desenho de um estudo cientificamente válido, uma vez que são esperadas diferenças sutis por se tratar de produtos biológicos cuja estrutura é altamente dependente do processo de produção, conforme discutido nos capítulos 8 e 9.

Para a avaliação da biossimilaridade são utilizadas muitas técnicas analíticas que, muitas vezes, não são capazes de estimar o impacto clínico de pequenas diferenças entre os produtos. Desta forma, torna-se necessária a realização de estudos de comparabilidade clínica para garantir que possíveis diferenças, não detectadas nos ensaios analíticos, não possuam relevância clínica em termos de segurança e eficácia do medicamento (WEBSTER; GEORGE; WOOLLETT, 2021).

A Agência Europeia de Medicamentos (EMA – traduzido do inglês *European Medicines Agency*) emitiu uma série de diretrizes gerais que detalham os requisitos para aprovação de biossimilares no mercado. Além disso, diretrizes específicas de classe de produto foram emitidas para o desenvolvimento de biossimilares à base de eritropoetina recombinante, somatotropina, fatores estimuladores de colônias de granulócitos humanos (p. ex., filgrastim), insulina humana, interferon α recombinante e das heparinas de baixo peso molecular. Geralmente, o processo de aprovação varia de acordo com os produtos, pois diferenças significativas existem entre eles, e permitem que os produtos sejam avaliados caso a caso (CHMP, 2014).

A agência americana (FDA), por meio da Lei de Competição e Inovação de Preços de Biológicos (BPCI Act), de 2009, criou um caminho abreviado para o licenciamento de produtos biológicos que são comprovadamente biossimilares ou intercambiáveis com um produto biológico aprovado pela FDA (FDA, 2018). Esse caminho foi estabelecido como uma forma de fornecer mais opções de tratamento, aumentar o acesso a medicamentos que salvam vidas e potencialmente reduzir os custos de saúde por meio da competição.

O caminho de licenciamento abreviado não significa que um padrão de aprovação inferior seja aplicado a produtos biossimilares ou intercambiáveis. Na realidade, o pacote de dados necessário para a aprovação de um produto biossimilar ou intercambiável é extenso. Se um

fabricante de biossimilares pode demonstrar que seu produto é biossimilar ao medicamento referência, então é cientificamente justificado confiar nos conhecimentos existentes sobre a segurança e eficácia do produto de referência para apoiar a aprovação do biossimilar. Isso permite um programa de desenvolvimento de medicamentos potencialmente mais curto e menos caro para um biossimilar.

No Brasil, em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N. 55/2010 e instituiu um novo marco regulatório que segue vigente até o presente momento. Este representa um avanço em termos de regulamentação e colocou o Brasil alinhado às práticas regulatórias internacionais. A RDC 55/2010 categoriza dois grupos de produtos e estabelece os requisitos mínimos para seus registros, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia desses medicamentos (Figura 14.1). Em 2011, foi publicado o guia do exercício da comparabilidade para medicamentos biológicos, que orienta o registro de produtos biológicos pela via da comparabilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Aos fabricantes de medicamentos biossimilares é requerida a demonstração por meio de estudos abrangentes de comparabilidade com o medicamento biológico de referência. Isso para corroborar que o medicamento biossimilar desenvolvido é muito semelhante ao medicamento de referência, não obstante a variabilidade natural inerente a todos os medicamentos biológicos. É importante, também, garantir que não existem diferenças clinicamente significativas entre o biossimilar e o medicamento de referência em termos de segurança, qualidade e eficácia (STÁVALE; LEAL; FREIRE, 2020). A qualidade, segurança e eficácia de um produto biossimilar devem ser aprovadas pelo órgão regulador nacional antes que sua aprovação e comercialização possa ser obtida, o que requer um exercício de comparabilidade apropriado.

A comparação de qualidade entre o biossimilar e o produto inovador é crucial, pois os atributos de qualidade de uma proteína estão diretamente associados à sua segurança e eficácia. Sabe-se que a fabricação biofarmacêutica é um processo de várias etapas, envolvendo a clonagem da sequência genética apropriada em um vetor de expressão cuidadosamente selecionado, seleção de um sistema de expressão celular, expansão, purificação e o processamento final (detalhado nos capítulos 8 e 9). Quando se toma como base o processo de fabricação específico utilizado, observa-se uma variabilidade entre os biológicos produzidos, até mesmo quando se considera o mesmo fabricante e local de fabricação. Desta forma, o desafio permanece em avaliar e quantificar essas diferenças, a fim de garantir que o produto biossimilar é tão seguro e eficaz quanto o inovador. Quando se

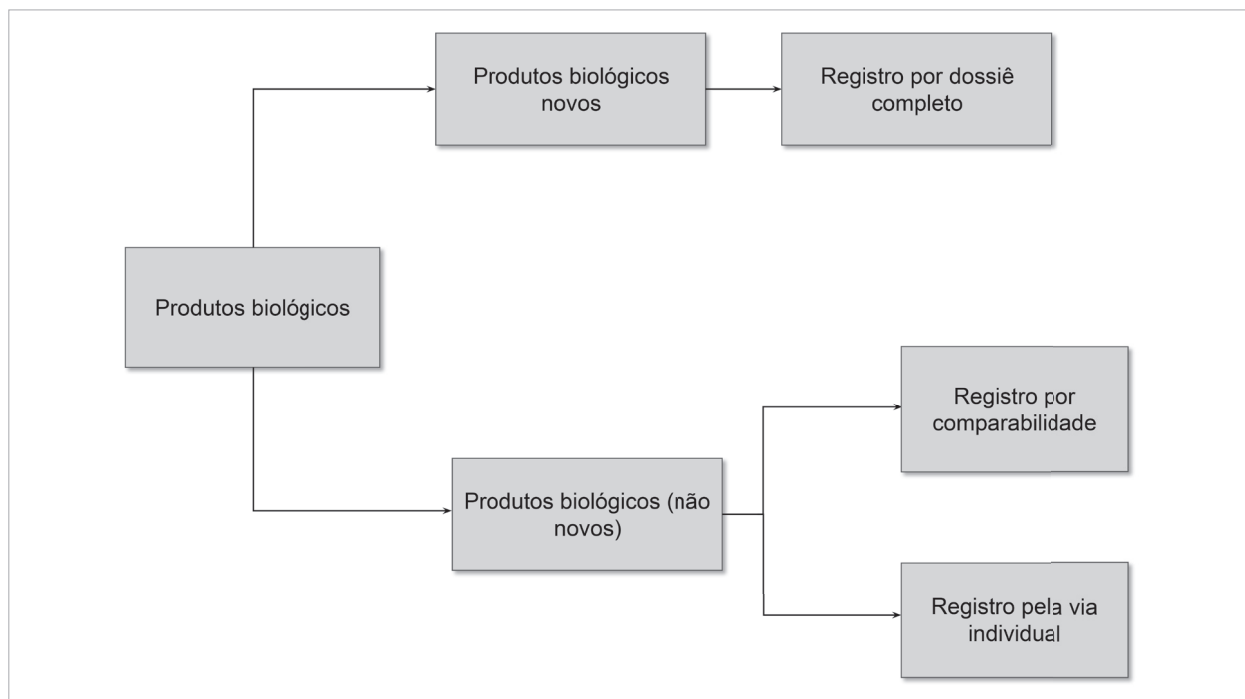


FIGURA 14.1 Vias regulatórias para produtos biológicos, segundo a RDC 55/2010.

Fonte: Gomes et al. (2016).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

considera a variabilidade do processo do fabricante do produto biossimilar, espera-se que o material de origem possa também afetar a qualidade do produto. Assim, o produto é afetado tanto pelas diferenças na célula hospedeira quanto pelos passos subsequentes. Além disso, as moléculas de proteína podem ser degradadas durante as etapas de processamento, e impurezas criadas nestas etapas podem contribuir para a diminuição da potência e/ou aumento da imunogenicidade (ANVISA, 2011).

Neste contexto, torna-se importante a caracterização dos produtos de referência e biossimilares, além da determinação de atributos críticos de qualidade cujo conhecimento de seus impactos vão auxiliar na determinação da faixa de aceitação das diferenças encontradas. Os dados comparativos são gerados e avaliados gradualmente, começando com o detalhamento analítico estrutural e funcional, seguido pela avaliação dos atributos de qualidade do produto, e, por fim, os estudos não clínicos e clínicos. A comparação entre os produtos passa por estudos em animais, quando necessário, e por estudos clínicos comparativos. Neste caso, é documentado um perfil completo de dados não clínicos e clínicos para o produto de referência. O fabricante precisa demonstrar que o produto biossimilar desenvolvido é altamente semelhante e não tem diferenças clinicamente significativas em relação ao produto de referência. Isso reduz o custo do medicamento para os pacientes, uma vez que

os fabricantes de biossimilares precisam realizar ensaios clínicos reduzidos, levando potencialmente a um acesso mais rápido a esses produtos.

A via de desenvolvimento por comparabilidade é a via regulatória utilizada por um produto biológico para a obtenção de registro, em que foi usado o exercício de comparabilidade. A via da comparabilidade enquadra aqueles produtos cujo princípio ativo possui registro no país e que apresenta similaridade com outro produto de referência, o que permite que a comprovação de eficácia, segurança e qualidade seja realizada por meio de estudos de comparabilidade. O exercício de comparabilidade está intimamente relacionado com a apresentação do conhecimento sobre as propriedades bioquímicas, físico-químicas, biológicas do produto a ser registrado em relação ao seu comparador.

Os princípios relacionados à comparabilidade advêm, inicialmente, de alterações no processo de fabricação de um determinado medicamento biológico. Contudo, quando aplicados aos medicamentos biossimilares, são requeridos mais dados e uma comprovação em termos de qualidade, eficácia e segurança entre o produto desenvolvido e o produto biológico comparador. A comprovação da biossimilaridade, neste caso, inclui estudos clínicos, dado que são utilizados processos de fabricação completamente independentes; assim, são esperadas diferenças entre o medicamento biossimilar

e o medicamento de referência. O potencial impacto destas diferenças na segurança e na eficácia não pode ser previsto unicamente a partir de uma avaliação analítica.

Os medicamentos biossimilares são sistematicamente desenvolvidos para serem altamente similares ao medicamento de referência nos parâmetros de qualidade, segurança e eficácia. Diferentemente do que ocorre no desenvolvimento de medicamentos inovadores, quando as etapas clínicas são de maiores exigências e investimentos para os fabricantes, o desenvolvimento de medicamentos biossimilares inicia-se com a definição das características estruturais e dos atributos de qualidade em relação ao perfil do medicamento biossimilar alvo e a sua comparabilidade com o medicamento de referência (Figura 14.2). A comparabilidade é estabelecida de acordo com a estrutura molecular.

Nesse sentido, a funcionalidade deve ser demonstrada mediante uma caracterização analítica detalhada, com estudos relevantes de ligação ao receptor e bioensaios, estes últimos realizados com o medicamento biossimilar e o medicamento de referência por meio de uma avaliação estatística comparativa rigorosa. A comparabilidade não clínica e clínica fornece a confiança de que quaisquer diferenças observadas ao nível da qualidade não afetam a segurança e a eficácia do medicamento biossimilar, quando comparadas com o medicamento de referência. Como consequência, o exercício de comparabilidade baseia-se numa robusta comparação integral entre o medicamento biossimilar e o medicamento de referência em termos da qualidade, segurança e eficácia. Cada pedido de autorização de introdução no mercado de um medicamento biossimilar é avaliado individual e independentemente.

O foco para o fabricante do medicamento inovador é demonstrar claramente a segurança e eficácia da terapêutica em ensaios clínicos, tendo objetivo diferente do caminho para o fabricante do biossimilar. O fabricante do medicamento inovador deve apresentar um pacote analítico que especifique a composição e a fórmula do medicamento. Estudos pré-clínicos são utilizados como prova de princípio, quando devem ser realizados ensaios para identificar potenciais toxicidades e demonstrar efeitos terapêuticos em um modelo animal. O principal trabalho e a maior parte dos custos para um fabricante de medicamentos inovadores estão no desenho, na execução e na avaliação dos ensaios clínicos. Esta investigação varia desde estudos de farmacologia clínica de Fase I, para demonstrar claramente a farmacocinética do fármaco, até um extenso estudo de eficácia e segurança de fases II e III, para demonstrar benefício terapêutico inequívoco sem excesso de toxicidade.

Em contrapartida, para o biossimilar, o benefício terapêutico foi identificado no desenvolvimento do

medicamento inovador. Desta forma, o maior esforço de um fabricante de medicamentos biossimilares está relacionado à construção de um pacote analítico robusto que confirme que o produto seja altamente semelhante ao inovador em termos de características físico-químicas e estruturais, incluindo impurezas e agregados. A funcionalidade do biossimilar *in vitro* também deve corresponder à do produto inovador em uma gama de ensaios. Os estudos clínicos são responsáveis por avaliar a segurança, e pela comparabilidade entre a eficácia e imunogenicidade do produto biossimilar e do inovador (ISAACS et al., 2017) (Figura 14.2).

14.1.1 Estudos analíticos de desenvolvimento por comparabilidade

Os ensaios analíticos estruturais sempre foram a base dos estudos de comparabilidade. Nas primeiras publicações sobre desenvolvimento por comparabilidade, os testes analíticos foram, em grande parte, limitados a demonstrações que produtos fabricados após uma mudança de processo atendiam a especificações de pré-alteração. No entanto, como os tipos de mudanças que os fabricantes desejavam validar por meio da comparabilidade ampliaram seu alcance e, particularmente, com o advento dos biossimilares, os dados analíticos necessários tornaram-se mais extensos, incluindo, por exemplo, análises de modificações pós-traducionais (PTM) de vários lotes de produtos.

A fim de acessar a comparabilidade estrutural de medicamentos biossimilares é utilizado o estado-da-arte de equipamentos e técnicas analíticas. A aplicação de metodologias analíticas ortogonais utiliza diferentes princípios físico-químicos ou biológicos para avaliar uma determinada característica de um dado medicamento. Esta avaliação pode promover uma fundamentação mais robusta para comprovação de biossimilaridade. A ortogonalidade dos métodos utilizados, principalmente, para caracterização analítica verifica e corrobora as conclusões extraídas de outras técnicas e é capaz de fornecer um pacote robusto de dados estruturais em que fabricantes e autoridades regulatórias podem se basear. As ferramentas ortogonais são importantes para demonstrar e corroborar a comparação entre os medicamentos, principalmente quando se trabalha com técnicas analíticas quantitativas, que muitas vezes impedem o mapeamento completo do parâmetro estudado. Um exemplo clássico da utilização de técnicas ortogonais está na determinação de variantes de tamanho, em que as técnicas analíticas ortogonais foram amplamente empregadas para cobrir a amplitude da faixa de tamanho e para quantificar independentemente agregados de tamanho dentro da mesma faixa (EASTON, 2020).

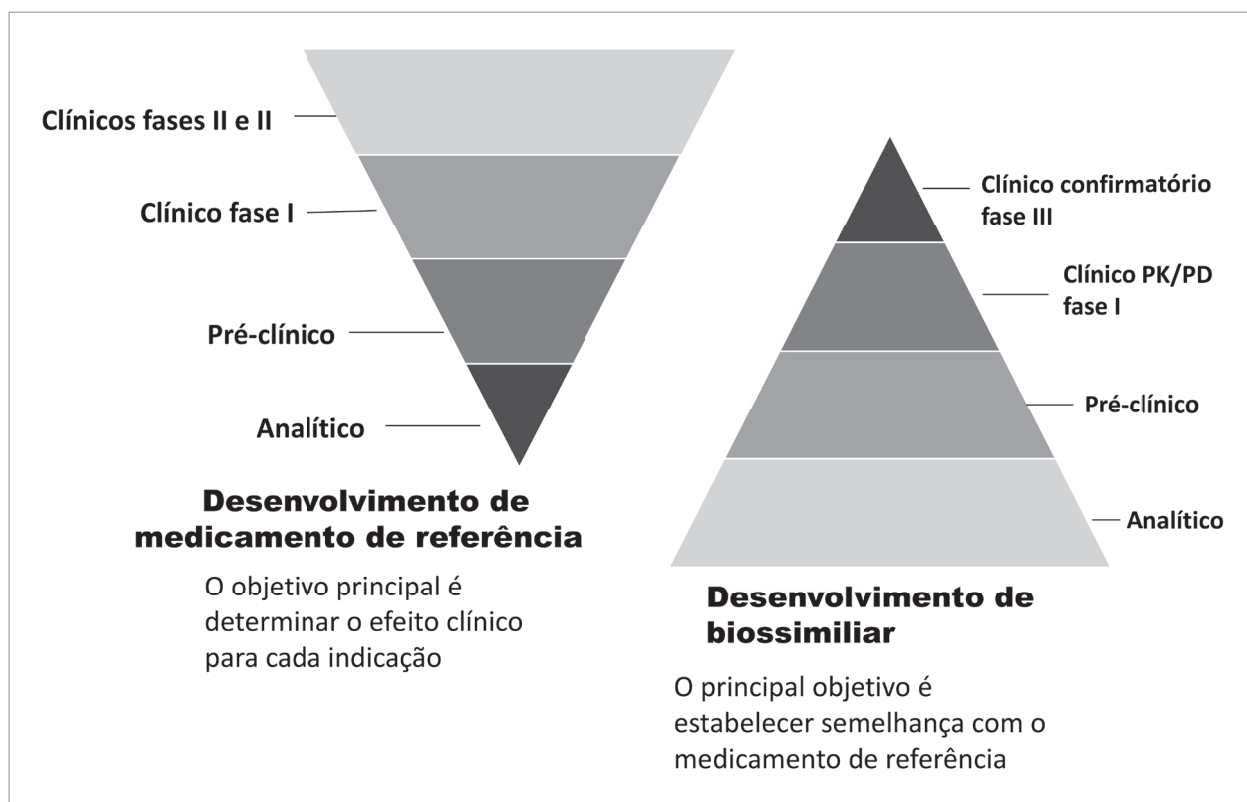


FIGURA 14.2 Representação esquemática das fases de desenvolvimento de medicamentos inovadores e biossimilares, tomando como base o esforço de cada etapa.

Fonte: adaptada de BioEngage (2022).

Diferentes técnicas analíticas são empregadas para acessar a comparabilidade entre os produtos inovador e biossimilar. A escolha das técnicas analíticas deve ser guiada pela natureza da molécula e pelas diretrizes regulatórias julgadas relevantes. O uso de técnicas analíticas robustas nos estágios iniciais do desenvolvimento dos biossimilares se evidencia como uma estratégia de mitigação de riscos. Ao verificar a comparabilidade físico-química e biológica do candidato biossimilar com o produto de referência antes do início dos custosos ensaios clínicos de comparabilidade, o risco de falha é mitigado e a probabilidade de sucesso na submissão às agências regulatórias é aumentada (FDA, 2019).

A caracterização estrutural das moléculas inclui, principalmente, a metodologia de cromatografia líquida à acoplada espectrometria de massas, que é dita como multiatributo, por possibilitar o acesso às diferentes características das moléculas, como: (i) mapemamento peptídico; (ii) pontes dissulfeto; (iii) resíduos de cisteína livres; e (iv) N-glicosilação. A caracterização físico-química, assim como a pureza da molécula alvo, são acessadas utilizando técnicas espectroscópicas, cromatográficas e de eletroforese. Outras técnicas analíticas podem auxiliar a caracterização estrutural da

molécula de interesse, como: (i) ressonância plasmônica e calorimetria isotérmica, para avaliar a ligação entre a molécula e seu alvo; (ii) ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho, para acessar o perfil molecular do produto; e (iii) calorimetria diferencial, para determinação da estabilidade das moléculas estudadas.

14.1.2 Estudos não clínicos de desenvolvimento por comparabilidade

Ensaio não clínicos são comumente utilizados como ferramentas importantes para antecipar informações clínicas de eficácia e segurança de um novo medicamento. Normalmente, tais ensaios incluem estudos *in vitro* ou *in vivo*, que avaliam a efetividade na ligação ao alvo e a presença de quaisquer efeitos deletérios nas células ou órgãos.

De maneira geral, os ensaios não clínicos permitem a avaliação de parâmetros de farmacodinâmica (PD), farmacocinética (PK) e toxicidade, como uma forma de base aos estudos clínicos. Nos ensaios de PD, o objetivo é entender como determinada molécula atua no organismo e pode ocasionar efeitos colaterais de acordo com suas

propriedades físico-químicas e mecanismo de ação. Para os ensaios de PK, são avaliados os parâmetros de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Os ensaios de toxicologia definem o nível de toxicidade por meio da administração de diferentes doses (únicas ou repetidas) de maneira a estabelecer uma janela de confiança para o medicamento a ser desenvolvido. Também fornecem dados de toxicidade direcionada a determinados órgãos (p. ex., presença de hepatotoxicidade), de genotoxicidade (possibilidade de induzir mutações no DNA ou danos cromossômicos), carcinogenicidade e teratogenicidade (mutações no feto) ou problemas de fertilidade. Modelos computacionais cada vez mais têm sido desenvolvidos e utilizados para auxiliar na previsão desses parâmetros, levando em consideração a estrutura da molécula, via de administração e mecanismo de ação (RUSYN; DASTON, 2010).

Apesar de os modelos animais estarem presentes no desenvolvimento de diversos biossimilares, verifica-se uma tendência de diminuição de sua aplicação, sobretudo no atendimento ao princípio dos 3 R's (redução, refinamento e substituição, do inglês *replacement*), bastante difundido na condução de ensaios *in vivo*. Desse modo, diversas agências regulatórias permitem uma limitação na apresentação de dados obtidos por ensaios *in vivo*.

Na falta de um modelo *in vitro* adequado, modelos animais podem ser utilizados, a depender especialmente do modo de ação do biofármaco. Os estudos de toxicidade, normalmente realizados no desenvolvimento de novas moléculas, podem ser requeridos apenas em alguns casos para o desenvolvimento de biossimilares. Isso ocorre particularmente quando há alterações no processo de obtenção (p. ex., uso de novas linhagens celulares) ou formulação (como na adição de novos excipientes) do biossimilar em comparação ao medicamento originador (EMA, 2022a).

O principal argumento na limitação de estudos em animais para biossimilares, especialmente os de toxicidade, é que os dados demonstram que modelos animais são pouco representativos em prever a resposta imune em humanos. Dessa forma, os ensaios analíticos podem ser suficientes para fornecer dados robustos sobre esses parâmetros (KURKI et al., 2022).

O mesmo raciocínio se aplica à avaliação de imunogenicidade, um importante fenômeno a ser avaliado dentro dos estudos clínicos. Como os biofármacos são normalmente compostos por proteínas, há sempre a possibilidade de indução da formação de anticorpos antidroga (ADA – *anti-drug antibodies*). Essa resposta ADA tende a provocar modificações importantes em parâmetros de farmacocinética, farmacodinâmica, além de afetar a eficácia e segurança do medicamento biológico.

As normas do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (ICH, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) S6 comentam que os estudos em animais são, geralmente, limitados em sua habilidade para prever a incidência de respostas imunes humanas a um produto terapêutico derivado de proteínas, além da intensa variabilidade esperada para este tipo de modelo. Entretanto, alguns aspectos da resposta imune podem ser avaliados em modelos animais hiperimunes, como, por exemplo, a formação e depósitos de complexos imunes (EMA, 2022b).

No caso dos biossimilares, tal informação foi medida durante o desenvolvimento do produto inovador, e quanto maior o grau de comparabilidade entre as moléculas, especialmente quanto à estrutura proteica, maior é a chance de as interações serem as mesmas; apesar de outros aspectos, como mecanismo de ação, variantes moleculares (agregados) e modificações pós-traducionais (p. ex., glicosilação), também induzirem a formação de anticorpos via resposta imune. Ainda, alguns modelos animais têm sido desenvolvidos de maneira a facilitar a avaliação de ADA. Entretanto, um desafio e uma complicação comum a esses modelos é o polimorfismo do MHC de classe II, intrinsecamente ligado à formação da resposta imune, com uma variabilidade de mais de 7.300 alelos conhecidos e expressos de maneira diferente na população humana (DUCRET et al., 2022).

Dentre os modelos relatados, o mais comum é a criação de camundongos transgênicos produtores de anticorpos humanos, como, por exemplo, via expressão de diversas porções do repertório genético V humano, envolvidos diretamente no mecanismo de recombinação somática V(D)J relacionados à formação de anticorpos em células B (CHEN; MURAWSKY, 2018). Ou mais recente, o desenvolvimento de linhagens de *minipigs* Göttingen humanizados com um minirepertório de genes humanos para a cadeia leve kappa e as cadeias pesadas $\gamma 1$ e $\gamma 4$ das imunoglobulinas (FLISIKOWSKA et al., 2022).

Mesmo diante das limitações, tais modelos podem facilitar a avaliação de segurança e eficácia de proteínas terapêuticas e seus biossimilares. Desta forma, ensaios computacionais *in silico* e celulares *in vitro* são ferramentas importantes e aliadas à avaliação não clínica desses parâmetros.

14.1.3 Estudos clínicos de desenvolvimento por comparabilidade

Os requerimentos de estudos clínicos para o desenvolvimento de biossimilares diferem de acordo com as

agências reguladoras. No geral, são requeridas similaridades de farmacocinética e estudos clínicos comparativos, conduzidos em pacientes saudáveis. Os estudos clínicos comparativos visam atingir a eficácia e a segurança em, pelo menos, uma indicação relevante. Estudos de dose resposta não são normalmente solicitados devido à dosagem do produto referência ter sido estabelecida (CHMP, 2014; FDA, 2016).

O objetivo principal de um estudo clínico para desenvolvimento de um biossimilar é confirmar que quaisquer diferenças entre o produto biossimilar e o referência não são clinicamente significativas. A abrangência dos estudos clínicos para um potencial biossimilar depende do grau de incerteza observado nos ensaios analíticos.

Os estudos clínicos comparativos de fase I entre biossimilares e o medicamento referência avaliam a estrutura molecular, conformação e glicosilação das proteínas, fatores estes que podem afetar a eficácia do mecanismo de ação, PK e PD, como também a segurança relativa às reações de imunogenicidade e estabilidade estrutural.

Estudos comparativos de PK são um requisito básico para o desenvolvimento de um biossimilar. Na presença de parâmetros de avaliação adequados para a PD e de um mecanismo de ação claro, um estudo PK/PD pode ser um trabalho clínico suficiente para a aprovação de um biossimilar para comercialização.

14.1.4 Estudos confirmatórios de desenvolvimento por comparabilidade

A equivalência clínica entre o potencial biossimilar e o produto referência, assim como a respectiva avaliação de eficácia, são realizadas utilizando-se a população de estudo suficientemente sensível para detectar potenciais diferenças relacionadas ao produto e, ao mesmo tempo, minimizar a influência de fatores relacionados com a doença. Na fase III, o medicamento biossimilar pode ser avaliado por meio de desenhos estatísticos como de superioridade, equivalência e de não inferioridade em relação ao controle (Figura 14.3).

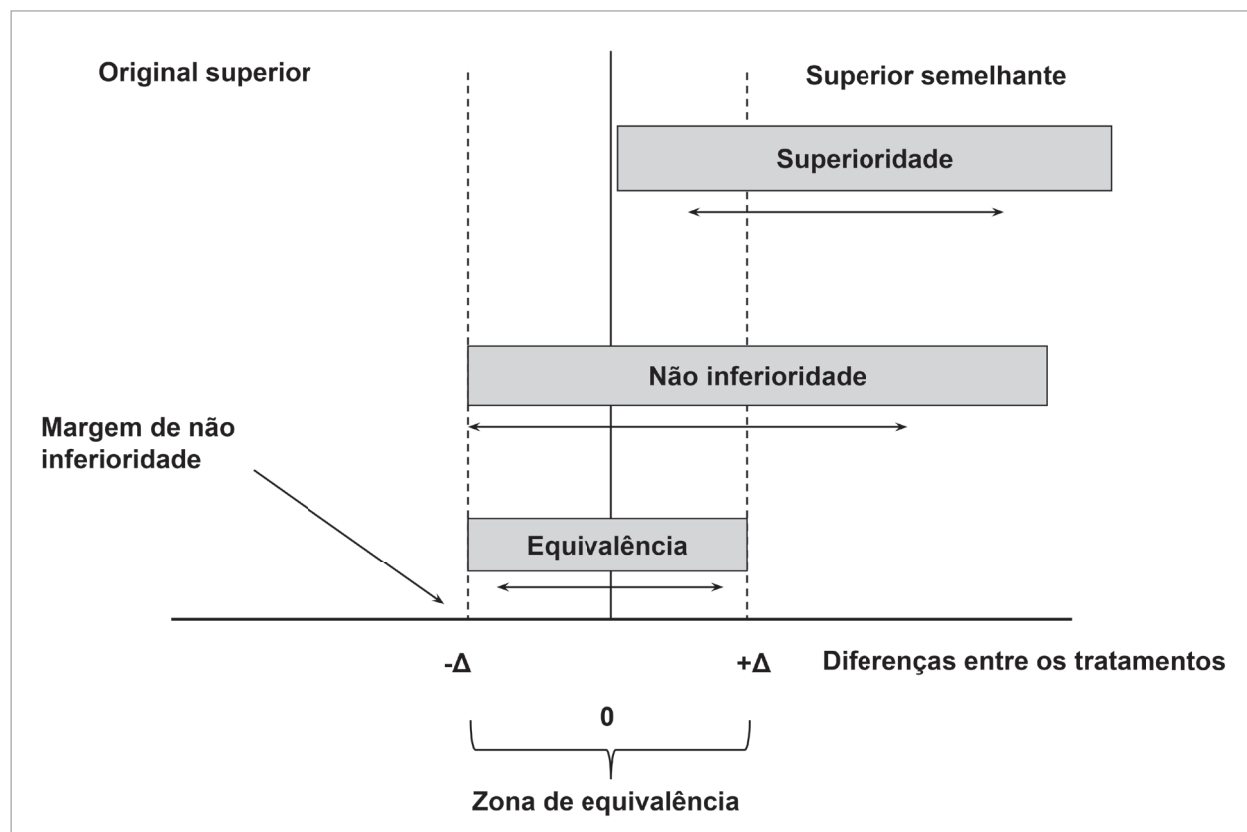


FIGURA 14.3 Exemplo de diagrama que delimita e classifica as diferenças encontradas entre o medicamento biossimilar e o inovador. Os intervalos colocados à direita da linha central e que não a incluem são superiores, e os colocados à esquerda são inversamente inferiores. Intervalos de confiança colocados totalmente dentro dos limites das margens $[-\Delta; +\Delta]$ são considerados equivalentes.

Fonte: traduzida de Yoshida (2010).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Geralmente, é realizado o estudo do tipo não inferioridade para comparação do biossimilar com o medicamento referência. Esse estudo visa determinar se o similar é, pelo menos, tão eficaz quanto o original, atendendo a um limite pré-estabelecido, ou seja, dentro de uma variação aceitável (BSR, 2017).

Recentemente, alguns especialistas argumentaram que, de uma perspectiva científica, econômica e ética, estudos comparativos de eficácia clínica podem ser desnecessários no desenvolvimento da maioria dos biossimilares (FRAPAISE, 2018; WEBSTER; WONG; WOOLLETT, 2019; WEBSTER; WOOLLETT, 2018). Deve-se notar que as diretrizes regulatórias não exigem estudos comparativos de eficácia clínica em todas as circunstâncias. A orientação do FDA afirma que será necessário um estudo clínico comparativo “se houver incerteza residual sobre se existem clinicamente diferenças significativas entre o produto biossimilar proposto e o produto de referência com base em estruturas e caracterização funcional, ensaios em animais, dados de PK e PD em humanos e avaliação de imunogenicidade clínica” (FDA, 2015).

Fatores que afetam o tipo e a extensão dos dados clínicos necessários incluem a complexidade do produto de referência, a magnitude das diferenças observadas na estrutura comparativa e avaliação funcional, o grau em que o mecanismo de ação do medicamento é compreendido e a disponibilidade de um *endpoint* de PD que se correlaciona com a eficácia.

Na União Europeia, os requisitos regulatórios no que diz respeito aos dados clínicos têm evoluído desde que um biossimilar foi introduzido pela primeira vez. Embora estudos comparativos de PK/DP continuem essenciais, se propõe a dispensa da necessidade de estudos comparativos para algumas categorias de produtos, juntamente com segurança/imunogenicidade comparativa. Entretanto, para biológicos complexos e multifuncionais, os ensaios clínicos comparativos de eficácia e segurança em pacientes ainda são vistos como um componente necessário do desenvolvimento de um biossimilar (CHMP, 2014).

14.1.5 Ensaios clínicos

Uma das mais importantes etapas na demonstração da biossimilaridade clínica de um produto em comparação ao seu produto de referência é a demonstração da biossimilaridade clínica. Sem essa etapa, ou mesmo sua fraca demonstração, compromete-se de maneira indelével a robustez do processo da totalidade de evidências para um biossimilar. Assim, o desenvolvimento clínico de um biossimilar requer uma comparação rigorosa frente a frente com o produto de referência, e a produção de

dados científicos confiáveis em termos clínicos leva a uma maior aceitabilidade e confiança de médicos que prescrevem essa classe de produtos farmacêuticos-biológicos. O principal objetivo nesse processo é demonstrar que qualquer diferença de eficácia ou segurança entre o produto de referência e o biossimilar seja inferior a uma margem pré-especificada de equivalência clínica (DRANITSARIS et al., 2013; FEIJÓ AZEVEDO, 2013).

A escolha de um desenho de ensaio clínico depende de vários fatores, e o desenho específico selecionado para um determinado ensaio deve ser explicitamente justificado no protocolo clínico (FEIJÓ AZEVEDO, 2013). A seleção dos objetivos primários em termos de eficácia e segurança é um processo de várias etapas que inclui o desenho estatístico do estudo principal, bem como o cálculo do tamanho da amostra adequado para garantir o poder estatístico. O processo requer uma compreensão clara das margens pré-especificadas de comparabilidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (FDA, 2015), a margem selecionada deve representar a maior diferença de eficácia/segurança que importa para a prática clínica. Por definição, qualquer diferença no resultado contido dentro deste intervalo não terá relevância clínica. Geralmente, as margens de comparabilidade para um determinado parâmetro resultam de raciocínio clínico, não sendo frequentemente bem estabelecidas ou universalmente aceitas. Vide Figura 14.4.

Outrossim, a escolha do tamanho da amostra deve ser bem justificada pelos patrocinadores do estudo, sendo uma combinação da opinião de especialistas e análises previamente publicadas. Em geral, os ensaios de Fase II não são necessários para biossimilares, uma vez que a dose ideal do produto de referência foi previamente bem estabelecida. Os desenhos comparativos de ensaios clínicos (fases I e III) para biossimilares são semelhantes aos de qualquer biológico no que diz respeito à população de pacientes mais sensíveis, tamanho da amostra, desfechos e duração do estudo. Os ensaios devem ser randomizados, duplos-cegos e adequadamente alimentados (FDA, 2015).

Uma vez que o objetivo de um ensaio clínico comparativo é demonstrar que o biossimilar proposto é equivalente ao produto de referência, os ensaios de superioridade não são adequados. Em vez disso, os ensaios de não superioridade, incluindo os de equivalência e os desenhos de não inferioridade, são os mais adequados (FEIJÓ AZEVEDO, 2013). Embora ensaios de não inferioridade possam ser usados, um desenho de estudo de equivalência é o preferido quando se trata de demonstração de que um biossimilar seja de fato equivalente ao produto de referência.

O objetivo em um ensaio de equivalência é rejeitar a hipótese nula de não equivalência e aceitar a alternativa

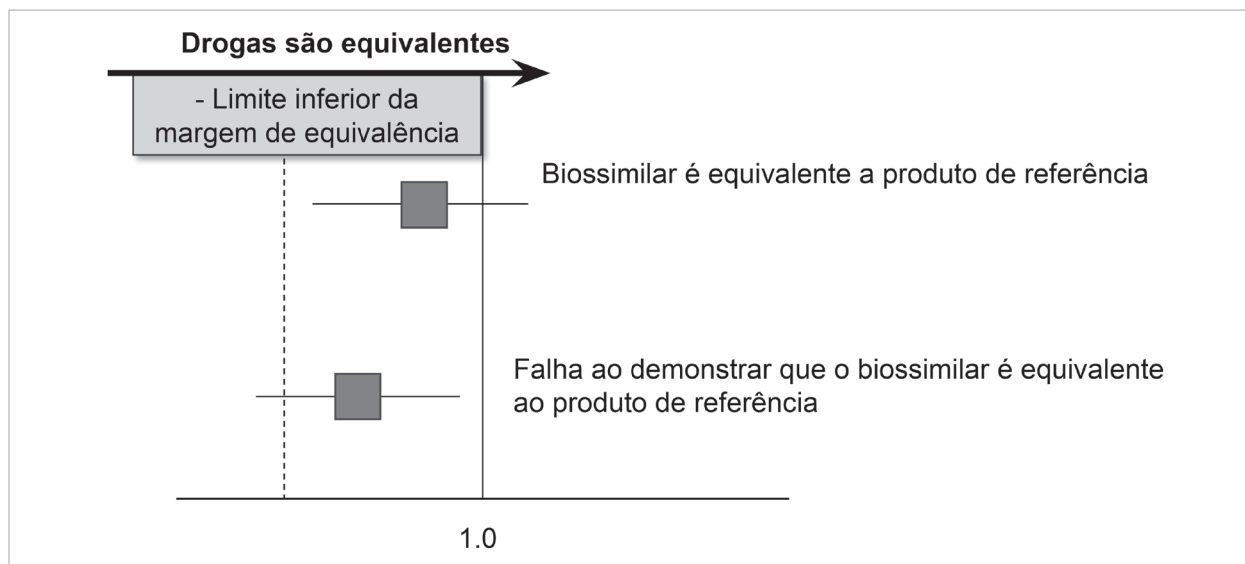


FIGURA 14.4 Ensaio de equivalência.

*Desenho do ensaio de equivalência. Em um ensaio de equivalência, se o limite inferior do IC de 95% da diferença entre os dois produtos (biossimilar vs. produto de referência) não cruzar o limite nulo (margem de equivalência), então o produto biossimilar e o produto de referência são equivalentes. Se o limite inferior do IC 95% cruzar o limite nulo, a equivalência entre os dois produtos não pode ser concluída. IC = intervalo de confiança.

Fonte: traduzida de Dranitsaris et al. (2013).

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

de que os produtos biossimilares e de referência são equivalentes. O ensaio deve determinar se o biossimilar não é pior nem melhor do que o produto de referência. Esta realização é obtida usando um teste de dois lados que requer limites de margem superiores e inferiores, as margens equivalentes pré-especificadas são selecionadas para detectar diferenças clinicamente significativas na eficácia entre o biossimilar e o produto de referência no intervalo de confiança de 95% (ver Figura 14.4) (DRANITSARIS et al., 2013). Há casos em que uma concessão unilateral de não inferioridade pode ser adequada, embora apenas se tal se justifique (p. ex., se o produto de referência tiver uma ampla margem de segurança). Digno de nota, um teste unilateral não demonstra equivalência, apenas demonstra que o biossimilar não é inferior ao produto de referência.

O tamanho do estudo, sua duração e os diferentes desfechos são outras considerações importantes no desenho de um ensaio clínico comparativo. O tamanho da amostra é o fator mais importante do poder de um estudo e pode ser afetado pelas margens de equivalência e pelos efeitos do tratamento. Quando as margens de equivalência são estreitas, o tamanho mínimo amostral tende a aumentar. Ao contrário, quanto maiores forem as margens equivalentes, o volume de pacientes a incluir no ensaio tende a diminuir. A enfermidade para a qual o biossimilar está sendo estudado influenciará na duração do estudo. Em doenças reumáticas imunomediadas, por

exemplo, como a maioria delas é crônica, o ensaio clínico comparativo deve ter duração suficiente para que tanto os efeitos clínicos benéficos quanto os potenciais efeitos adversos possam ser observados e bem documentados. Normalmente, a seleção dos parâmetros de avaliação baseia-se nos parâmetros de avaliação utilizados nos ensaios clínicos do produto de referência (FDA, 2015; FEIJÓ AZEVEDO, 2013).

Em relação aos desfechos clínicos que serão escolhidos para a comparação entre as amostras, é importante que sejam simultaneamente relevantes para o estado da doença em questão e suficientemente sensíveis para detectar diferenças clinicamente relevantes na eficácia e na segurança. Os parâmetros de avaliação devem ser, em geral, um ou mais dos utilizados durante os ensaios clínicos pivotais conhecidos do produto de referência. De qualquer forma, novos desfechos da prática clínica podem ser testados, se têm maior relevância para a rotina diária para a prescrição dos médicos ou relevância para a qualidade de vida dos pacientes.

Para muitas doenças inflamatórias, estes parâmetros são coerentes com o quadro das medidas de resultados em reumatologia (OMERACT, 2023). Podem ser escolhidos dois tipos de parâmetros de eficácia: (i) desfechos finais clínicos, que afetam diretamente o paciente; e (ii) desfechos substitutos, que refletem uma situação que está associada a um desfecho real, mas que ainda não afeta o doente (ALTEN; CRONSTEIN, 2015). Na especialidade

de reumatologia existem diversos marcadores substitutos clínicos que são atualmente aceitos, enquanto muitos marcadores biológicos são confundidos por fatores que não estão relacionados com a doença autoimune.

14.1.6 Intercambialidade de biossimilares

Vários cenários do mundo real, de natureza médica e não médica, podem levar à comutação cruzada entre biossimilares do mesmo produto de referência. A princípio, deve-se reconhecer que a troca médica ocorre quando um medicamento é substituído por outro, a critério do médico.

O objetivo de uma mudança médica é sempre melhorar o benefício do tratamento do paciente. Este não é o caso de um interruptor cruzado médico envolvendo biossimilares (AZEVEDO et al., 2017). Em casos específicos, a comutação cruzada pode ser clinicamente necessária para resolver problemas de intolerância, como, por exemplo, evitar um excipiente irritante (biossimilares de adalimumabe sem citrato versus biossimilares contendo citrato) ou um dispositivo de entrega pré-preenchido para um biossimilar ao qual um paciente exibe hipersensibilidade (uma cobertura de agulha contendo um derivado de látex versus um escudo de agulha sem látex) (HOULTON, 2019; MYSLER et al., 2021).

Pelo contrário, a mudança não médica ocorre quando um paciente clinicamente estável, cuja terapia é eficaz e bem tolerada, é trocado por outra alternativa terapêutica (AZEVEDO et al., 2019). Essa troca ou comutação cruzada não está relacionada à melhoria da eficácia, segurança e/ou conveniência, mas à sua transferência com a finalidade de reduzir custos ou garantir que o paciente tenha acesso contínuo ao mesmo tipo de medicamento. A troca cruzada não médica, em geral, é regida por um terceiro (pagador). Na prática, o farmacêutico hospitalar dispensa o produto que está disponível (MYSLER et al., 2021). Despesas diretas, incentivos promovidos pelo pagador, copagamento, descontos ou taxas hospitalares de reembolso fixo para o dia de internação, apesar da medicação utilizada, também podem influenciar a decisão de mudar para outra versão biossimilar ou, alternativamente, reverter para o produto de referência quando os incentivos econômicos desaparecem.

A intercambialidade é uma característica entre dois ou mais produtos que indica que a troca desses produtos, para a frente e para trás, não representa risco adicional em termos de eficácia ou segurança para os pacientes quando comparados aos produtos isoladamente (MOOTS et al., 2017). Ainda, não está totalmente claro se a permutabilidade dos produtos biológicos pode ter impacto na segurança e eficácia da imunogenicidade. A FDA, por exemplo, publicou recentemente um rascunho

exigindo dados clínicos que apoiem a intercambialidade (MOOTS et al., 2017). Este rascunho inclui evidências de, pelo menos, um estudo prospectivo clinicamente controlado com um período suficiente de tratamento com troca cruzada, seguido por um período randomizado de dois braços (alternância versus não comutação). O braço de comutação deve ter um mínimo de três trocas com cada um passando para o produto alternativo.

Pelo contrário, as orientações europeias não contêm recomendações sobre a intercambialidade, o que deixa as decisões relativas ao acesso às autoridades reguladoras nacionais europeias. Nos EUA, e em muitos países europeus, existe mais de um biossimilar aprovado do mesmo produto de referência, e a avaliação da equivalência de eficácia e segurança e os dados de comutação foram obtidos a partir de estudos de comparação.

Apesar das evidências crescentes, dados adicionais ainda são necessários para investigar se a intercambialidade é um processo viável. Alguns consensos sobre o uso de biossimilares foram publicados para alguns grupos de pacientes (AZEVEDO et al., 2015; BSR, 2017; TORRES et al., 2017).

Essas recomendações ou consensos reconhecem os biossimilares como uma oportunidade para aumentar o acesso às terapias caras e aceitariam receber tratamento biossimilar uma vez prescrito, respeitando uma decisão compartilhada entre o médico e o paciente. As sociedades médicas, em geral, concordam que a decisão da troca de produto deve ser baseada em uma decisão compartilhada entre paciente e médico (AZEVEDO et al., 2015).

14.1.7 Biossimilares em doenças raras

As doenças raras representam um desafio para a medicina moderna. Os medicamentos órfãos utilizados no tratamento de doenças raras estão, frequentemente, associados a elevados custos de tratamento. Para muitos sistemas de saúde, os custos para tratar pacientes com doenças raras não são acessíveis. O desenvolvimento de biossimilares para doenças raras possui diversos desafios: (i) o alto custo para obtenção do produto de referência para fins de fabricação; (ii) quantidade pequena de lotes a serem produzidos; (iii) dificuldades para obtenção de pacientes selecionados para estudos de fase I e III; e (iv) população heterogênea dentro da mesma condição clínica.

14.1.8 Aspectos da qualidade

Como mencionado anteriormente, o processo de desenvolvimento de um biossimilar tem como principal objetivo a obtenção de moléculas altamente semelhantes ao seu respectivo biológico de referência. Este é um cami-

inho abreviado, quando comparado com medicamentos inovadores. Isso porque os aspectos de segurança e eficácia foram comprovados pelo biológico de referência; e, portanto, o desafio passa a ser alcançar critérios de qualidade bem estabelecidos, por meio de uma extensa caracterização analítica, funcional e clínica entre o biológico de referência e seu candidato a biossimilar (ANVISA, 2011; BRASIL, 2010; CHMP, 2014; FDA, 2019). O exercício da comparabilidade, com foco na caracterização molecular e funcional entre o candidato a biossimilar e o biológico de referência, provê a base racional para prever que o perfil de segurança e eficácia do biológico de referência se aplica ao biossimilar (WHO, 2022).

Neste sentido, a qualidade assume um aspecto essencial – durante o exercício da comparabilidade, pois estabelece os atributos de qualidade que deverão ser considerados durante o exercício de comparabilidade entre o candidato a biossimilar e o produto referência para demonstrar similaridade em termos de qualidade, segurança e eficácia. Estes atributos de qualidade devem ser acessados por meio de uma ampla caracterização de múltiplos lotes do produto referência, a fim de obter uma compreensão do perfil geral de qualidade, bem como a faixa de variabilidade dos lotes do produto biológico de referência que se encontram no mercado (WHO, 2022). É importante destacar que apenas um produto referência licenciado pela agência regulatória com base em um dossiê de registro completo e comercializado por um período de tempo adequado com qualidade, segurança e eficácia comprovadas pode servir como produto biológico de referência (WHO, 2022).

A agência regulatória nacional deve estar de acordo com a utilização do referido produto como biológico de referência, e este produto também deve ser adquirido considerando o seu local de fabricação, tanto do produto acabado quanto do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA). Tais parâmetros são relevantes, dado que produtos biológicos *per se* possuem micro-heterogeneidades intrínsecas decorrentes do processo produtivo biológico. Portanto, a inclusão de diferentes locais de fabricação pode impactar o perfil de qualidade a ser alcançado durante o desenvolvimento do produto biossimilar.

Portanto, observa-se que a escolha do produto biológico de referência é um ponto crítico no desenvolvimento de um biossimilar, pois este deverá ser o mesmo, ao longo de todo o exercício da comparabilidade. Tradicionalmente, as agências regulatórias nacionais exigem o uso de um medicamento de referência registrado no país para o licenciamento de um medicamento genérico. No caso de biossimilares, essa prática nem sempre é viável ou necessária, e várias jurisdições regulatórias permitiram o uso de um biológico de referência não local como comparador para permitir o desenvolvimento e o

acesso mais rápido às terapias biológicas. O uso de um biológico de referência proveniente de outra jurisdição com padrões científicos e regulatórios semelhantes é, portanto, possível. As informações necessárias para apoiar a aceitabilidade deste comparador, proveniente de outra jurisdição, serão determinadas, caso a caso, pela agência regulatória nacional (WHO, 2022).

Os avanços nas tecnologias analíticas, principalmente nas metodologias físico-químicas de caracterização molecular, têm proporcionado a obtenção de dados cada vez mais sensíveis e robustos, com alto poder preditivo de funcionalidade e impacto clínico de candidatos biossimilares, a partir de dados estruturais e físico-químicos. Esta evolução científica tem possibilitado a redução de ensaios em animais, como também de estudos clínicos (FDA, 2019).

Considerando o valor dos dados analíticos no exercício da comparabilidade, o uso de padrões de referência internacionais é bastante encorajado. Esses materiais destinam-se ao desenvolvimento de metodologias para qualificar e validar ensaios para o uso pretendido, para monitorar a potência de produtos individuais/diversos, para calibrar bioensaios (diretamente ou para calibrar padrões nacionais ou farmacopeicos) e para apoiar o desempenho do ensaio ao longo da vida – ciclo de um produto.

A OMS fornece padrões internacionais (IS) e reagentes que servem como fontes de referência de atividade biológica definida e expressa em Unidades Internacionais (UI) ou Unidades (U). Estes padrões e reagentes de referência estão disponíveis para uma ampla gama de substâncias, incluindo hormônios, como a eritropoietina e o hormônio foliculo-estimulante; citocinas, por exemplo, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), bem como proteínas modificadas/de ação prolongada, (G-CSF peguillado, darbepoetina e etanercept) e anticorpos monoclonais (mAbs) (WHO, 2022).

É importante ressaltar que os dados relacionados à *Chemistry, Manufacturing and Control (CMC)* se referem aos parâmetros de aceitação de características físico-químicas às metodologias para medição destes parâmetros, estratégias de controle de qualidade e controle em processo, dados de produção dos lotes e todos os dados relacionados a Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Sistema da Qualidade Farmacêutica, os quais devem ser completos. Por mais que alguns ensaios e estudos possam ser abreviados por justificativas técnicas, os dados de qualidade que comporão o dossiê para registro devem ser completos (ANVISA, 2011; BRASIL, 2010; WHO, 2022).

Além das regulamentações nacionais que devem ser seguidas pelos desenvolvedores de biossimilares, outros documentos importantes que norteiam este processo

são os produzidos pelo ICH. Este organismo tem como principal objetivo harmonizar normas e diretrizes no âmbito dos produtos farmacêuticos para uso humano, com o propósito de garantir que os medicamentos desenvolvidos em qualquer lugar do mundo atendam a altos padrões de eficácia, segurança e qualidade (ICH, 2022). Um dos seus papéis é a publicação e contínua revisão de guias, por meio de um processo de construção coletiva entre os principais atores do segmento farmacêutico e organismos regulatórios. Estes guias se desdobram em quatro principais áreas do conhecimento: (i) qualidade; (ii) eficácia; (iii) segurança; e (iv) multidisciplinaridade.

No que diz respeito aos aspectos de qualidade, são 14 grupos de documentos publicados pelo ICH, os quais incluem marcos cruciais, como a realização de estudos de estabilidade, definição de limites relevantes para testes de impurezas e uma abordagem mais flexível à qualidade farmacêutica com base no gerenciamento de risco de Boas Práticas de Fabricação. Alguns destes documentos podem ser considerados importantes para o desenvolvimento de produtos biológicos, e, mesmo não sendo específicos para biossimilares, vale destacar os guias Q5E e Q8, que trazem bases técnico-científicas que têm ajudado na evolução das normativas nacionais específicas para o tema.

O Q5E, que tem como título *Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process*, é uma referência fundamental para avaliação de mudanças em processos produtivos de produtos biológicos. Embora o escopo deste documento seja limitado a uma avaliação da comparabilidade de um produto biológico, antes e depois de uma mudança no processo de fabricação realizada pelo mesmo fabricante, certos princípios científicos abordados são aplicáveis a uma avaliação de biossimilaridade entre um candidato a biossimilar e seu biológico de referência (EMA, 2005). No entanto, demonstrar a biossimilaridade, considerando que os desenvolvedores e produtores são diferentes, é mais complexo e, provavelmente, exigirá dados mais extensos e abrangentes do que a avaliação da comparabilidade de um produto antes e depois de uma mudança no processo de fabricação feita pelo próprio produtor.

Por um lado, um fabricante que modifica seu próprio processo de fabricação possui amplo conhecimento e informações sobre o produto e o processo existente, incluindo controles estabelecidos e parâmetros de aceitação. Por outro lado, o fabricante de um candidato a biossimilar não terá conhecimento direto do processo de fabricação do produto de referência e terá seu próprio processo de fabricação. Exemplos tradicionais destas diferenças são linhagem celular recombinante, matérias-primas, equipamentos, processos, controles

de processo e critérios de aceitação. Portanto, dados analíticos comparativos abrangentes são necessários para construir a base para um programa de desenvolvimento de um produto biossimilar (FDA, 2019).

Outros guias do ICH de especial interesse para o desenvolvimento de biossimilares são os guias Q8, Q9 e Q10. Este conjunto de diretrizes enfatiza uma abordagem baseada em risco e ciência para produtos farmacêuticos em um sistema de qualidade adequadamente implementado. Como consequência, foram elaboradas as diretrizes de Desenvolvimento Farmacêutico (Q8), Gestão de Riscos de Qualidade (Q9) e Sistema de Qualidade Farmacêutica (Q10), e dada a inter-relação dos temas, é recomendado que as indústrias desenvolvedoras e produtoras de medicamentos implementem estas diretrizes de maneira conjunta.

O Q8 é um documento que trata do desenvolvimento farmacêutico e os princípios basilares da qualidade que devem ser seguidos desde o início do processo de desenvolvimento de um produto. Este guia traz o conceito de *Quality by Design* (QbD), que é definido como uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de medicamentos, a qual inclui a incorporação de conhecimentos e experiências prévias, o uso de ferramentas estatísticas para planejar e otimizar experimentos, gerenciamento de risco da qualidade durante o desenvolvimento e ciclo de vida do medicamento e gerenciamento dos conhecimentos adquiridos internos e externos à empresa (ICH, 2009).

O QbD tem sido muito utilizado pelas Indústrias Farmacêuticas, pois proporciona um maior entendimento do produto e processo de manufatura do medicamento, gerando uma base científica robusta, que permite maior assertividade na aprovação regulatória destes produtos e flexibilidade nos pós-registros pelas agências regulatórias. Trabalhar com os conceitos de QbD possibilita um melhor gerenciamento e mitigação de riscos e, potencialmente, maior economia para as empresas envolvidas neste segmento, ao antecipar potenciais problemas de produção e possibilitar alterações no processo, dentro do *design space*, sem necessitar de aprovações pós-registro. Segundo o ICH Q8 (R2), *design space* é a combinação multidimensional e interação de variáveis de entrada e parâmetros de processo que proporcionam a manutenção dos requisitos de qualidade do medicamento, previamente aprovados pela agência regulatória (ICH, 2009).

Considerando que os biossimilares seguem um racional de desenvolvimento baseado na engenharia reversa, ou seja, a partir da sequência genética do biológico de referência, o perfil alvo de qualidade dos biossimilares será estritamente definido pelas características do respectivo biológico de referência, sendo este a principal

fonte de conhecimento prévio. Neste sentido, o uso da abordagem de QbD para desenvolver biossimilares revela-se como uma importante ferramenta estratégica para o sucesso destes projetos, tanto do ponto de vista tecnológico, de gestão de risco e regulatório.

Esta estratégia ajuda a enfrentar alguns desafios exclusivos desses produtos, como um perfil de qualidade estritamente definido e a falta de conhecimento do seu processo de manufatura, dado que, geralmente, são segredos industriais, mantidos pelas empresas que desenvolveram o biológico de referência. O QbD é uma abordagem eficiente, mas desafiadora para o desenvolvimento de biossimilar devido à complexa relação entre processo, qualidade e eficácia (Figura 14.5).

As primeiras etapas na abordagem QbD são definir o perfil do produto referência e identificar os atributos críticos de qualidade (ACQ). Os resultados dessa caracterização, lote a lote, são empregados para definir os intervalos de variabilidade de cada um dos ACQ em relação ao produto referência (inovador). Portanto, uma primeira seleção, classificação e interação de atributos de qualidade (AQ) podem ser estabelecidas antes do desenvolvimento do produto. Dadas as relações entre os tipos de AQ e seu potencial impacto nos desfechos clínicos,

é importante prestar igual atenção a todos os atributos estruturais e funcionais relevantes antes de concluir a biossimilaridade no nível de qualidade (KWON et al., 2017; VANDEKERCKHOVE et al., 2018).

Para estabelecer uma faixa que representa a variabilidade esperada do originador biológico, conforme apontado anteriormente, vários lotes do produto referência são adquiridos e testados. Assim, quanto mais lotes forem analisados durante o exercício de desenvolvimento, mais confiança o desenvolvedor do biossimilar terá na definição dos limites de similaridade para cada atributo.

Como um exemplo desta prática, durante o desenvolvimento do biossimilar do etanercepte SB4 (registrado com nome Brenzys®), a empresa Samsung Bioepis Co desenvolveu 61 métodos analíticos de última geração e testou 30 lotes de referência comercializados pela UE e mais de 30 lotes de referência comercializados pelos EUA durante o processo de desenvolvimento do biossimilar (CHO et al., 2016).

Da mesma forma, durante o desenvolvimento do biossimilar infliximabe SB2, também realizado pela Samsung Bioepis, os possíveis atributos de qualidade para este medicamento foram comparados com mais de 80 lotes de produto referência comercializados pela UE

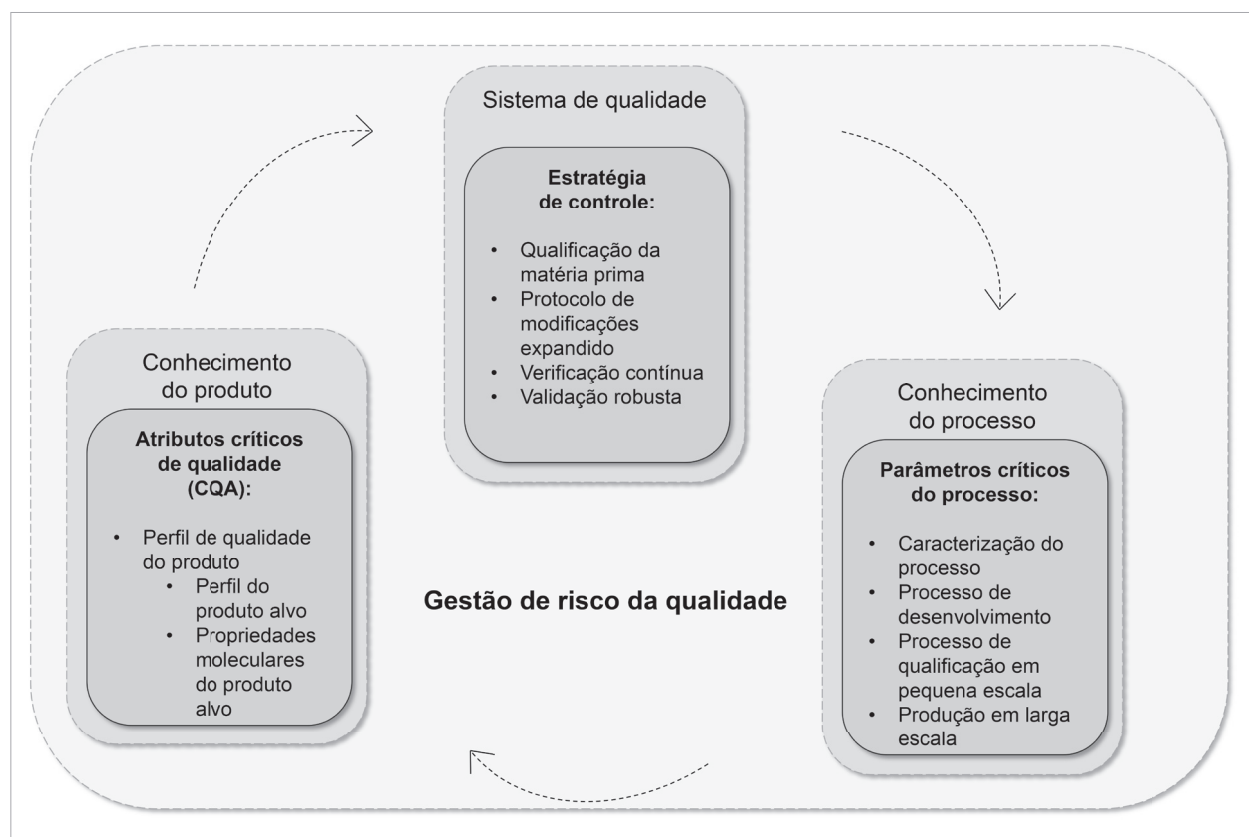


FIGURA 14.5 Ilustração de abordagem *Quality by Design* (QbD) de um produto biofarmacêutico.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Eon-duval, Broly e Gleixner (2012).

e pelos EUA, utilizando mais de 60 análises estruturais, físico-químicas e biológicas (HONG et al., 2017).

Mudanças nos ACQ podem ocorrer em diferentes estágios do processo produtivo, exigindo uma compreensão profunda da molécula e do seu processo produtivo em cada estágio (EMA, 2015). O padrão de glicosilação de moléculas biossimilares está ligado à linhagem celular utilizada ou à sua imunogenicidade, que pode estar associada, por exemplo, ao processo de purificação e a condições de armazenamento (HAJBA et al., 2018).

Várias modificações pós-traducionais, como glicosilação, podem ter um impacto direto nas propriedades

clínicas de proteínas terapêuticas, potencialmente influenciando sua atividade (potência), farmacocinética (PK), farmacodinâmica (PD) ou imunogenicidade (HAJBA et al., 2018). No Quadro 14.1 estão listadas algumas das propriedades físicas, químicas e biológicas consideradas ACQ que podem impactar o desempenho de um produto biológico, nos parâmetros de segurança e de eficácia (SCHIESTL et al., 2011; SCHIESTL; ZABRANSKY; SÖRGEL, 2017; THORPE et al., 2019; TU et al., 2019; VULTO; JAQUEZ, 2017; XU et al., 2019).

É evidente que a glicosilação é uma das principais características importantes para definição da biossimi-

QUADRO 14.1 Propriedades físicas, químicas e biológicas que podem ser consideradas atributos críticos de qualidade (ACQ) do produto*

Atributos	Propriedades da molécula biológica	Relevância clínica*	Nível de criticidade*	
Físico-químicos	Estrutura da proteína	Sequências de resíduos de aminoácidos (estrutura primária)	Imunogenicidade, eficácia e segurança	Muito alto
		Alterações de estruturas secundária, terciária e quaternária.	Eficácia e imunogenicidade	Alto
		Presença de pontes dissulfetos	Imunogenicidade, eficácia e segurança	Muito alto
	Heterogeneidade de tamanho	Heterogeneidade de carga (formas ácidas/básicas)	Imunogenicidade	Alta
		Monômero, variantes de baixa e alta massa molecular produzindo agregados		
	Heterogeneidade de carga e modificações nos aminoácidos	Glicosilação, deaminação, oxidação	Eficácia, potência e imunogenicidade	Muito alta
Modificações pós-traducionais	Glicosilação, Desaminação, Manosilação e sialilação (adição de ácido siálico), γ -carboxilação e β -hidroxilação	Imunogenicidade	Muito alta	
Funcional (caracterização biológica)	Atividade efetora	Ligação à molécula alvo Ligação à FcRn Ligação à Fc γ R	Eficácia e segurança	Muito alta
	Atividade biológica	CDC ADCC Apoptose	Eficácia e segurança	Muito alta
Impurezas	Relacionada ao processo produtivo	Material genético e proteínas da célula hospedeira, matérias-primas, desaminação, agregados, partículas suspensas	Imunogenicidade	Alta

*A relevância clínica e o nível de criticidade são determinados de acordo com a molécula a ser desenvolvida e seu mecanismo de ação.
Fonte: elaborado pelos autores.

laridade; portanto, como atributo crítico de qualidade deve ser definida caso a caso. Por exemplo, o grau de fucosilação e manosilação pode ter um impacto significativo na função efetora de um anticorpo monoclonal. A ligação ao receptor FcRIIIa e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) desempenha um papel fundamental no desencadeamento da morte celular de células ligadas pelo anticorpo terapêutico por células NK.

Do mesmo modo, a extensão da manose na porção-N terminal ou de ácido siálico pode alterar a meia-vida de um anticorpo na circulação, alterando os perfis farmacocinéticos do produto; ou, ainda, a presença de um epítipo de α -galactose ou de ácido siálico N-glicolilneuramínico pode provocar uma resposta imunogênica.

Portanto, a base de conhecimento do produto biossimilar e do processo deve incluir uma compreensão da variabilidade das matérias-primas, a relação entre os parâmetros do processo e os atributos de qualidades críticos (CQA), além da associação entre CQA e as características clínicas do biossimilar.

14.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresentou os principais conceitos relacionados aos biossimilares e a totalidade de evidências que é necessária ao fabricante apresentar a uma agência reguladora, de maneira geral, para que seu produto farmacêutico possa ser definido como biossimilar. Em última análise, o texto indica que todo o exercício de biossimilaridade leva à definição de que biossimilares são versões altamente semelhantes inicialmente produzidas a partir de engenharia reversa de medicamentos biológicos inovadores existentes e de seus ingredientes ativos (produtos de origem ou de referência). Os biossimilares precisam cumprir com todos os critérios de qualidade nos seus atributos em relação aos produtos de referência, além de demonstrar por meio de diversas técnicas e estudos sua similaridade bioquímica, biofísica e clínica com tais produtos. Deve-se enfatizar a importância deste capítulo devido ao fato de que os biossimilares têm emergido nas duas últimas décadas como opções de tratamento menos dispendiosas em comparação com produtos de referência para os quais as patentes de exclusividade de mercado atingiram o final do prazo.

REFERÊNCIAS

1. ALTEN, R.; CRONSTEIN, B. N. Clinical trial development for biosimilars. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. S2–S8, jun. 2015.
2. ANVISA. **Guia para Realização do Exercício de Comparabilidade para Registro de Produtos Biológicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/guia-para-realizacao-do-exercicio-de-comparabilidade-para-registro-de-produtos-biologicos.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2022.
3. AZEVEDO, V. et al. Biosimilars: considerations for clinical practice. **Considerations in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 13–18, nov. 2017.
4. AZEVEDO, V. F. et al. Recommendations on the use of biosimilars by the Brazilian Society of Rheumatology, Brazilian Society of Dermatology, Brazilian Federation of Gastroenterology and Brazilian Study Group on Inflammatory Bowel Disease – Focus on clinical evaluation of monoclon. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 9, p. 769–773, set. 2015.
5. AZEVEDO, V. F. et al. Practical Guidance on Biosimilars, With a Focus on Latin America. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 91–100, mar. 2019.
6. BRASIL, M. DA S. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 55, DE 16 de dezembro de 2010**. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_55_2010_COMP.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.
7. BSR. **Position statement: Biosimilar medicines**. London: [s.n.]. Disponível em: [https://www.rheumatology.org.uk/Portals/0/Documents/Policy/Position statements/Biosimilars.pdf?ver=2019-02-27-170506-670](https://www.rheumatology.org.uk/Portals/0/Documents/Policy/Position%20statements/Biosimilars.pdf?ver=2019-02-27-170506-670).
8. CHEN, W. C.; MURAWSKY, C. M. Strategies for Generating Diverse Antibody Repertoires Using Transgenic Animals Expressing Human Antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 7 mar. 2018.
9. CHMP. **Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)**. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-0.pdf. Acesso em: 7 fev. 2022.
10. CHO, I. H. et al. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. **mAbs**, v. 8, n. 6, p. 1136–1155, 17 ago. 2016.
11. DRANITSARIS, G. et al. Clinical trial design in biosimilar drug development. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 2, p. 479–487, 17 abr. 2014.
12. DUCRET, A. et al. Assay format diversity in pre-clinical immunogenicity risk assessment: Toward a possible harmonization of antigenicity assays. **mAbs**, v. 14, n. 1, 31 dez. 2022.
13. EASTON, R. L. **Building Orthogonality into Biosimilar Testing**. Disponível em: <https://bioprocessintl.com/sponsored-content/building-orthogonality-into-biosimilarity-testing/>. Acesso em: 30 set. 2022.
14. EMA. **ICH Q5E Biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process: comparability of biotechnological/biological products – Scientific guideline**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5e-biotechnological-biological-products-subject-changes-their-manufacturing-process>. Acesso em: 21 nov. 2022.
15. EMA. **Non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues – Scientific guideline**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing-recombinant-human>. Acesso em: 15 jan. 2023.
16. EMA. **Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues – Scientific guideline**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-as-active-substance-non-clinical-and-clinical-issues>.

- nal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-acti-
ve-substance-non. Acesso em: 13 out. 2022a.
17. EMA. **ICH S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals – Scientific guideline.** Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-pre-clinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals-scientific-guideline>. Acesso em: 13 out. 2022b.
 18. EON-DUVAL, A.; BROLY, H.; GLEIXNER, R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: An assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 3, p. 608–622, maio 2012.
 19. FDA. **Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product.** Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/scientific-considerations-demonstrating-biosimilarity-reference-product>. Acesso em: 7 fev. 2023.
 20. FDA. **Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product.** Silver Spring. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/88622/download>.
 21. FDA. **Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act).** Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/laws-enforced-fda/federal-food-drug-and-cosmetic-act-fdc-act>. Acesso em: 20 set. 2022.
 22. FDA. **Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations Guidance for Industry.** Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-therapeutic-protein-biosimilars-comparative-analytical-assessment-and-other-quality>. Acesso em: 7 fev. 2023.
 23. FEIJÓ AZEVEDO, V. Biossimilares necessitam de dados clínicos comparativos cientificamente confiáveis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 1, p. 129–131, jan. 2014.
 24. FLISIKOWSKA, T. et al. A humanized minipig model for the toxicological testing of therapeutic recombinant antibodies. **Nature Biomedical Engineering**, v. 6, n. 11, p. 1248–1256, 22 set. 2022.
 25. FRAPAISE, F.-X. The End of Phase 3 Clinical Trials in Biosimilars Development? **BioDrugs**, v. 32, n. 4, p. 319–324, 26 ago. 2018.
 26. GOMES, E. B. P. et al. Desenvolvimento de Biossimilares no Brasil. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 5, n. 1, p. 31, 28 jun. 2016.
 27. GRIFFITH, N. et al. Formulary Selection Criteria for Biosimilars: Considerations for US Health-System Pharmacists. **Hospital Pharmacy**, v. 49, n. 9, p. 813–825, 1 out. 2014.
 28. HAJBA, L. et al. On the glycosylation aspects of biosimilarity. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 616–625, mar. 2018.
 29. HONG, J. et al. Physicochemical and biological characterization of SB2, a biosimilar of Remicade® (infliximab). **mAbs**, v. 9, n. 2, p. 365–383, 17 fev. 2017.
 30. HOULTON, S. Benefits and drawbacks of moving to biosimilar medicines. **Prescriber**, v. 30, n. 7, p. 13–15, 22 jul. 2019.
 31. ICH. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. **ICH**, 2009.
 32. ICH. **ICH Official Website.** Disponível em: <https://www.ich.org/>. Acesso em: 21 nov. 2022.
 33. ISAACS, J. et al. The biosimilar approval process: how different is it? **Considerations in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 3–6, nov. 2017.
 34. KURKI, P. et al. Regulatory Evaluation of Biosimilars: Refinement of Principles Based on the Scientific Evidence and Clinical Experience. **BioDrugs**, v. 36, n. 3, p. 359–371, 21 maio 2022.
 35. KWON, O. et al. Considerations of critical quality attributes in the analytical comparability assessment of biosimilar products. **Biologicals**, v. 48, p. 101–108, jul. 2017.
 36. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução Da Diretoria Colegiada – RDC n. 55, de 16 de dezembro de 2010.** Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_55_2010_COMP.pdf/41ebae78-5742-4060-9bec-6ccece9ce262.
 37. MOOTS, R. et al. Switching Between Reference Biologics and Biosimilars for the Treatment of Rheumatology, Gastroenterology, and Dermatology Inflammatory Conditions: Considerations for the Clinician. **Current Rheumatology Reports**, v. 19, n. 6, p. 37, 16 jun. 2017.
 38. MYSLER, E. et al. Biosimilar-to-Biosimilar Switching: What is the Rationale and Current Experience? **Drugs**, v. 81, n. 16, p. 1859–1879, 27 nov. 2021.
 39. OMERACT. **Omeract.** Disponível em: <https://omeract.org/>. Acesso em: 7 fev. 2023.
 40. PIMENTA, M. V.; MONTEIRO, G. The production of biopharmaceuticals in Brazil: current issues. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019.
 41. PRIVATO, M. B.; MARTINEZ, L. L.; SCHMIDT, C. Biofármacos no Brasil: uma revisão do processo de regulamentação / Biopharmaceuticals in Brazil: a review of the regulatory process. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 65, n. 1, p. 1, 14 maio 2020.
 42. RUSYN, I.; DASTON, G. P. Computational Toxicology: Realizing the Promise of the Toxicity Testing in the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1047–1050, ago. 2010.
 43. SANDOZ BRASIL. **Desenvolvimento de biossimilares.** Disponível em: <https://www.sandoz.com.br/desenvolvimento-de-biossimilares>. Acesso em: 11 abr. 2023.
 44. SCHIESTL, M. et al. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 310–312, 8 abr. 2011.
 45. SCHIESTL, M.; ZABRANSKY, M.; SÖRGEL, F. Ten years of biosimilars in Europe: development and evolution of the regulatory pathways. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 11, p. 1509–1515, maio 2017.
 46. STÁVALE, M. C. DE M.; LEAL, M. DA L. F.; FREIRE, M. DA S. A evolução regulatória e os desafios na perspectiva dos laboratórios públicos produtores de vacinas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. suppl 2, 2020.
 47. THORPE, R. et al. Quality assessment and its impact on clinical performance of a biosimilar erythropoietin: A simulated case study. **Biologicals**, v. 62, p. 8–15, nov. 2019.
 48. TORRES, P. et al. Consenso brasileiro multi-institucional de pacientes sobre medicamentos biossimilares. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 39–43, abr. 2017.
 49. TU, C.-L. et al. Analysis of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters in EU- Versus US-Licensed Reference Biological Products: Are In Vivo Bridging Studies Justified for Biosimilar Development? **BioDrugs**, v. 33, n. 4, p. 437–446, 20 ago. 2019.
 50. VANDEKERCKHOVE, K. et al. Rational Selection, Criticality Assessment, and Tiering of Quality Attributes and Test Methods

- for Analytical Similarity Evaluation of Biosimilars. **The AAPS Journal**, v. 20, n. 4, p. 68, 10 jul. 2018.
51. VULTO, A. G.; JAQUEZ, O. A. The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production? **Rheumatology**, v. 56, n. suppl_4, p. iv14–iv29, 1 ago. 2017.
52. WEBSTER, C. J.; GEORGE, K. L.; WOOLLETT, G. R. Comparability of Biologics: Global Principles, Evidentiary Consistency and Unrealized Reliance. **BioDrugs**, v. 35, n. 4, p. 379–387, 18 jul. 2021.
53. WEBSTER, C. J.; WONG, A. C.; WOOLLETT, G. R. An Efficient Development Paradigm for Biosimilars. **BioDrugs**, v. 33, n. 6, p. 603–611, 6 dez. 2019.
54. WEBSTER, C. J.; WOOLLETT, G. R. Comment on “The End of Phase 3 Clinical Trials in Biosimilars Development?” **BioDrugs**, v. 32, n. 5, p. 519–521, 16 out. 2018.
55. WHO. **Guidelines on evaluation of biosimilars**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/guidelines-on-evaluation-of-biosimilars>. Acesso em: 7 fev. 2023.
56. XU, Y. et al. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. **mAbs**, v. 11, n. 2, p. 239–264, 17 fev. 2019.
57. YOSHIDA, W. B. Studies on biosimilar medications. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 9, n. 3, p. 141–144, 2010.

Parte VI

**Biotecnologia e terapias
avançadas**

Terapia gênica e celular

Martín Bonamino

Mariana Torres Mazzi

As terapias avançadas são modalidades terapêuticas com potencial curativo para muitas doenças. Neste capítulo, é feita a definição dessas modalidades terapêuticas, com foco principalmente nas terapias celulares e gênicas sob uma óptica histórica. Assim, são abordados os principais impactos clínicos documentados para essas modalidades terapêuticas e os desafios para a implementação delas. Além disso, é discutida a relação da área com a biotecnologia, além das contribuições da terapia gênica e celular para o Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS).

15.1 TERAPIA GÊNICA E CELULAR: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO

As doenças raras são aquelas que afetam um reduzido volume de pessoas em comparação com a população em geral, e muitas delas são crônicas, progressivas e potencialmente fatais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que existam mais de 5.000 doenças raras afetando cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo (ORPHA, 2022; WHO, 2023). No entanto, a falta de conhecimento e recursos para diagnóstico e tratamento torna difícil obter dados precisos sobre a prevalência dessas doenças em diferentes regiões do mundo (EMA, 2023).

No Brasil, a situação não é diferente. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), existem cerca de 13 milhões de pessoas com doenças raras no país, o que corresponde a cerca de 6% da população (BRASIL, 2014). Estima-se que cerca de 80% dessas doenças têm origem genética, mas também há doenças raras causadas por fatores infecciosos, virais ou degenerativos. A maioria dos indivíduos portadores de doenças raras com fenótipos não dramáticos poderá viver anos ou até décadas até

que sua doença seja identificada. Muitas dessas pessoas jamais receberão tratamento.

A maior parte das doenças raras não tem cura, e muitas vezes o tratamento é limitado a drogas paliativas e serviços de reabilitação, que visam aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente. Apenas uma pequena parte dos casos recebe medicamentos capazes de interferir na progressão da doença e impactar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Isso se deve, em parte, à falta de investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para doenças raras, bem como aos altos custos envolvidos nesse processo. Além disso, muitas vezes os pacientes com doenças raras têm dificuldades para acessar tratamentos por conta da falta de informações e recursos disponíveis na rede pública de saúde. Há alguns anos, abordagens com produtos de terapias avançadas têm modificado esse cenário para algumas das doenças raras, representando uma quebra de paradigma e provando amplos benefícios para pacientes acometidos por algumas dessas doenças. No entanto, pela pequena quantidade de pacientes portadores de algumas dessas condições, o cenário mais provável é que boa parte dessas doenças raras não seja

atendida por novas terapias no médio prazo, uma vez que o custo de desenvolvimento da terapia dificilmente será coberto pelos ganhos de empresas de biotecnologia/farmacêuticas, o que desestimula o trabalho com essas terapias por parte desse setor industrial. Em última análise, esse cenário privará boa parte dos pacientes de acessar novas terapias.

É importante continuar investindo em pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos para doenças raras, bem como garantir o acesso a esses tratamentos a todos os pacientes que precisam deles.

Outras doenças que vêm se beneficiando das terapias avançadas são as crônico-degenerativas. Embora possam ter componentes genéticos em sua fisiopatologia, são também amplamente impactadas pelo estilo de vida e representam as doenças mais prevalentes. Nesse cenário, tem-se um desafio diferente: como desenvolver, disponibilizar e viabilizar essas novas terapias a pacientes com doenças altamente prevalentes, como doenças metabólicas, neurológicas, oncológicas e cardiovasculares.

As terapias gênicas e celulares surgem como alternativas para o tratamento das causas das doenças raras, em vez de tratar apenas seus sintomas. A terapia gênica é uma técnica que consiste na introdução de material genético, como um gene ou um fragmento de DNA, em células ou tecidos de um paciente com o objetivo de corrigir ou substituir genes defeituosos que causam determinada doença (PATIENT EDUCATION, 2022). Essa estratégia pode envolver a correção ou a suplementação de genes com suas versões saudáveis. Outra modalidade de terapia gênica envolve a adição de novos genes (mesmo que não naturais) ou, ainda, com base nas novas ferramentas de edição genética, a correção de versões defeituosas de genes ou mesmo a anulação (ou nocaute) de cópias de genes determinados (FDA, 2023). Essas terapias encontraram muita resistência (seja por barreiras tecnológicas ou mesmo por questões éticas) para a aplicação delas, mas, nos últimos anos, diversos casos de sucesso tornaram a terapia gênica uma realidade terapêutica inquestionável (HIGH; RONCAROLO, 2019; NALDINI, 2015).

A terapia celular é uma abordagem em que células viáveis são injetadas, enxertadas ou implantadas em um paciente com o objetivo de exercer um efeito terapêutico (TROUNSON; MCDONALD, 2015). As células utilizadas em terapias celulares são comumente células-tronco, com capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos celulares (MEDICINEPLUS, 2021). Essas células podem ser autólogas, quando originárias do próprio paciente; alogênicas, quando provenientes de um doador compatível; ou mesmo células artificiais, criadas em laboratório. Além disso, as células-tronco podem ser totipotentes, quando têm a capacidade de

originar células embrionárias e pré-embriônicas; pluripotentes, quando têm a capacidade de gerar vários tipos de células do corpo humano; ou multipotentes, quando têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares em um mesmo tecido. Um desafio particular para a utilização de células-tronco na terapia é o controle de seu processo de diferenciação, seja em processos de produção de células parcial e/ou totalmente diferenciadas, seja em processos de produção *in vitro*, mas também – e sobretudo – para a diferenciação *in vivo*. O rigoroso controle desses processos é crítico para a determinação da segurança dessas terapias, uma vez que células com processos incompletos de diferenciação podem levar a tecidos disfuncionais ou mesmo ao desenvolvimento de tumores, como teratomas.

Essas células podem, ainda, ser manipuladas geneticamente para que sejam mais eficazes no tratamento de doenças raras, por exemplo, para aumentar sua aceitação imunológica ou para expressar fatores que possam promover a regeneração de tecidos danificados. Além disso, as células podem ser cultivadas sobre matrizes de diferentes naturezas e estruturas, incluindo as matrizes tridimensionais, em estratégias de engenharia tecidual, ou injetadas isoladamente, dependendo da estratégia terapêutica adotada.

Em resumo, as terapias gênicas e celulares representam uma nova e promissora abordagem no tratamento de doenças raras (AUSTIN et al., 2018) e também em doenças crônico-degenerativas, permitindo o tratamento das causas, e não apenas dos sintomas. Com o avanço da tecnologia, é possível que essas terapias sejam cada vez mais utilizadas para tratar pacientes com diferentes doenças e oferecer uma maior qualidade de vida a essas pessoas.

No que se refere às terapias celulares, as células utilizadas são geralmente células-tronco, que têm a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em vários tipos celulares, mas há também a utilização de células maduras, como no caso das terapias com linfócitos. A terapia celular, mais especificamente usando células-tronco hematopoiéticas, tem sido estudada e adotada em transplantes de medula óssea há mais de seis décadas. A nível mundial, diversas pesquisas foram elaboradas para avaliar a eficácia e a segurança da terapia celular em várias doenças, dentre as quais doenças imunes, cardíacas, neurodegenerativas e metabólicas. No Brasil, em particular, os estudos sobre terapia celular se desenvolveram fundamentalmente com células derivadas da medula óssea para o tratamento de doenças imunes, pulmonares, hepáticas, cardíacas e no sistema nervoso. A maioria dessas iniciativas, no entanto, não resultou em tratamentos consolidados reconhecidos e com aplicação sistemática, e ainda está em estágios experimentais.

A terapia gênica tem sido estudada desde a década de 1970 (HOH, 2023), mas apenas recentemente a tecnologia se tornou avançada o suficiente para ser aplicada em pacientes em escala capaz de fornecer respostas clínicas contundentes (WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013). Um dos principais resultados positivos é o tratamento de imunodeficiências, no qual a adição de cópias normais de genes que impactam o desenvolvimento do sistema imunológico vem beneficiando pacientes portadores de deficiências nos genes que codificam a adenosina deaminase (ADA) ou a cadeia gama comum de receptores de citocinas. Ainda no grupo de doenças genéticas hereditárias, doenças como fibrose cística e a distrofia muscular de Duchenne contam com grande potencial de aplicação da terapia genética para a correção do gene defeituoso. Além disso, a terapia genética também tem sido utilizada no tratamento de certos tipos de câncer, seja pelo uso de vírus oncolíticos carreando (ou não) genes que possam estimular o sistema imune ou, ainda, pela inserção de genes artificiais que estimulem o sistema imune a reconhecer os tumores, como é o caso dos receptores quiméricos de antígenos (CAR, do inglês *chimeric antigen receptor*).

Além dos tratamentos sistêmicos no organismo, a terapia gênica tem um amplo campo de aplicação na correção gênica de tecidos específicos, como é o caso das doenças oculares. Um exemplo dessa aplicação é a amaurose congênita de Leber, na qual a inserção de um gene funcional pode restaurar a visão em pacientes previamente comprometidos. Esses avanços clínicos têm mostrado o potencial da terapia genética como uma abordagem inovadora e promissora para o tratamento de uma ampla gama de doenças genéticas e adquiridas, oferecendo esperança e melhoria na qualidade de vida a muitos pacientes afetados por condições médicas debilitantes. Tanto a terapia celular quanto a terapia gênica estão em fase de pesquisa clínica para uma variedade de doenças raras e comuns em todo o mundo. No Brasil, pesquisas estão em andamento para avaliar a eficácia e a segurança dessas terapias em doenças como diabetes, doenças cardíacas e neurológicas. O Brasil apresenta um marco regulatório maduro para a avaliação e eventual aprovação de terapias gênicas, o que levou ao registro no país de terapias gênicas para o tratamento de atrofia muscular espinhal (AME) e amaurose congênita de Leber, além de terapias CAR-T envolvendo a modificação genética de linfócitos para o tratamento de leucemias, linfomas e mieloma múltiplo.

Em resumo, a terapia celular e a terapia gênica são inovadoras e com grande potencial para tratar as causas subjacentes das doenças, no caso das genéticas, e para o tratamento de câncer, eliminando as células tumorais. Embora ainda haja desafios a serem enfrentados,

a pesquisa nessas áreas está avançando rapidamente em todo o mundo, incluindo no Brasil. A seguir, serão descritas algumas das modalidades de terapia gênica em desenvolvimento e em aplicação clínica.

15.2 TIPOS DE TERAPIA GÊNICA

15.2.1 Terapia gênica germinativa

A terapia gênica germinativa é uma técnica de engenharia genética que visa à correção de mutações genéticas hereditárias pela introdução de um gene saudável, da edição genética diretamente no gameta (óvulo ou espermatozoide) ou no embrião recém-fertilizado (zigoto). Dessa forma, todas as células do organismo desenvolvido a partir desse zigoto, incluindo as germinativas, terão a correção genética e poderão transmiti-la para as gerações futuras.

O mecanismo de funcionamento da terapia gênica germinativa consiste na introdução do gene (ou da edição genética) terapêutico(a) na célula germinativa por meio de um vetor viral ou de técnicas de edição gênica, utilizando, por exemplo, o sistema CRISPR-Cas9 (ADLI, 2018). Após a inserção do gene, a célula germinativa é fertilizada naturalmente ou por fertilização *in vitro*, e o embrião resultante é transferido ao útero da mãe para o desenvolvimento fetal. Um exemplo potencial seria o uso da técnica para prevenir a transmissão da distrofia muscular de Duchenne, uma doença genética rara e grave que afeta principalmente meninos; ela mostrou efeitos positivos em experimentos com camundongos (LONG et al., 2014).

A terapia gênica germinativa ainda é, no entanto, uma técnica experimental e controversa, em razão de preocupações éticas e de segurança (DOUDNA, 2020). Em 2019, um grupo de especialistas internacionais em genética recomendou a proibição global do emprego da técnica em humanos, por conta do risco de efeitos colaterais não intencionais e da possibilidade de uso indevido para fins não terapêuticos, como a criação de bebês “sob medida” ou mesmo de abordagens de melhoramento genético em humanos. Esse entendimento é consensual entre as principais sociedades de genética de diversos países. Por um lado, há um forte debate sobre a maturidade tecnológica das técnicas de edição genética para que se determine se elas podem ser aplicadas em tecidos germinativos. Por outro lado, há um debate ético sobre em que situações esse tipo de aplicação seria aceitável. Apesar disso, a terapia gênica germinativa tem sido apontada como uma promessa para a prevenção e o tratamento de doenças genéticas hereditárias no futuro. Nesse sentido, pesquisas continuam sendo desenvolvidas para aprimorar a técnica e

garantir sua segurança visando a possíveis aplicações clínicas futuras, especialmente por meio de seu uso em modelos animais.

15.2.2 Terapia gênica somática

A terapia gênica somática é uma abordagem de engenharia genética que tem como objetivo tratar doenças genéticas e outras condições médicas por meio da modificação dos genes em células somáticas do corpo, ou seja, células que não são células germinativas e, portanto, não transmitem essa nova característica genética para as gerações futuras. Diferentemente da terapia gênica germinativa, a terapia gênica somática não modifica os genes das células germinativas e, portanto, não é hereditária, desde que sua aplicação evite, na medida do possível, a modificação genética de gametas (NALDINI, 2015).

O mecanismo de funcionamento da terapia gênica somática envolve a introdução do gene terapêutico em células específicas do corpo, geralmente por meio de vetores virais modificados, como retrovírus, adenovírus ou lentivírus. Esses vetores são projetados para transportar o gene terapêutico às células do paciente e substituir, adicionar uma cópia não mutada ou mesmo corrigir o gene defeituoso ou ausente, restaurando, assim, a função celular normal. Os diferentes vetores terapêuticos disponíveis diferem em termos de capacidade de carga de material genético, seu tropismo para diferentes células e tecidos, sua capacidade de entrega do transgene para a célula e mesmo sua capacidade de integração (ou não) desse transgene ao genoma da célula. Uma descrição mais detalhada das propriedades dos diferentes vetores pode ser encontrada no Quadro 15.1.

Após a introdução do gene terapêutico, as células são capazes de produzir a proteína funcional ausente e/ou corrigir o defeito genético, o que pode resultar na melhora ou na cura da doença-alvo. Vale ressaltar que a cura muitas vezes pode ser alcançada pela correção de apenas uma parcela das células, seja porque a proteína normal produzida atinge níveis suficientes para um efeito terapêutico – como no caso das terapias gênicas para hemofilia (NATHWANI et al., 2014) –, ou porque as células corrigidas apresentam vantagem seletiva quando comparadas à população de células não corrigidas. Em outros casos, se faz necessária a modificação genética de uma fração considerável do compartimento celular alvo para se obter os benefícios terapêuticos.

Atingir o nível de modificação genética com efeito terapêutico dependerá amplamente da fisiopatologia da doença, do compartimento celular que deve ser manipulado, do protocolo de manipulação (se as células podem ser manipuladas *ex vivo* – caso dos precursores hematopoiéticos – ou *in vivo*, como no caso de neurônios,

fibras musculares, hepatócitos etc.). Além disso, como consequência desses requisitos, dependerá do tipo de vetor a ser usado (vetores virais vs. não virais, integrativos vs. não integrativos, com capacidade de carrear cargas genéticas grandes ou pequenas, entre outros). A Figura 15.1 ilustra o mecanismo de funcionamento da terapia gênica somática.

Um exemplo de aplicação da terapia gênica somática é o tratamento da imunodeficiência combinada grave (SCID, na sigla em inglês), também conhecida como “síndrome do menino da bolha”, em que o gene defeituoso responsável pela função imunológica é corrigido em células somáticas do paciente que compõem o compartimento de células precursoras hematopoiéticas (CAVAZZANA-CALVO et al., 2012). Outro exemplo é o tratamento de doenças genéticas do sangue, como a anemia falciforme e a talassemia, também por meio da introdução de genes corretos nas células hematopoiéticas do paciente. Ao contrário da terapia para SCID, em que células carreando o gene defeituoso receberão uma cópia normal do gene-alvo, algumas globinopatias demandam que o gene defeituoso seja silenciado, uma vez que ele tem um efeito deletério dominante. Nesse sentido, estratégias de RNA antissenso ou mesmo a edição genética de elementos reguladores dos genes em questão podem ser aplicadas (KOHN, 2019).

A terapia gênica somática tem mostrado resultados promissores em ensaios clínicos e está em constante evolução, com o desenvolvimento de novas tecnologias de edição gênica, como CRISPR-Cas9, e a identificação de novas doenças passíveis de tratamento. No entanto, ainda existem desafios técnicos, éticos, regulatórios e de economia da saúde a serem superados antes que a terapia gênica somática possa se tornar uma opção de tratamento amplamente disponível para a população em geral.

15.2.3 Terapia com célula CAR-T

A terapia de células T com receptor antigênico quimérico (CAR-T, do inglês *chimeric antigen receptor T-cell therapy*) é uma abordagem de terapia celular que utiliza células T geneticamente modificadas para o tratamento de determinados tipos de câncer. Nessa terapia, células T são coletadas do paciente e modificadas geneticamente para expressar um receptor artificialmente construído, que tem como objetivo criar células T que reconhecem antígenos na superfície das células tumorais (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2022).

O mecanismo de funcionamento da terapia com célula CAR-T consiste na coleta de células T dos pacientes e envio dessas células a um laboratório no qual são geneticamente modificadas para expressar a proteína

QUADRO 15.1 Vetores virais comumente usados em terapia genética e seu grupo de risco/nível de biossegurança recomendado

Vetor viral	Material genético	Capacidade de carga	Grupos de risco (segundo o NIH)	Nível de biossegurança recomendado pelo CDC (<i>in vitro</i>)	Nível de biossegurança recomendado pelo CDC (<i>in vitro</i>)	Recomenda-se a prática em um ambiente clínico	Tropismo	Principais limitações	Principais vantagens	Desinfecção
Vírus adeno associado (todos os sorotipos)	ssDNA	< 5 Kb	1	BSL-1	ABSL-1	Precauções universais/ padrão ou práticas BSL-2	Ampla gama de hospedeiros: infeccioso para muitos tipos de células, inclusive neurônios	Pequena capacidade de embalagem	Não imunogênico; não patogênico	O desinfetante recomendado é o hipoclorito de sódio a 0,5% preparado na hora. O álcool não é um desinfetante eficaz contra o AAV.
Adenovírus (todos os sorotipos)	dsDNA	8 kb (incompetente para replicação)	2	BSL-2	ABSL-2	Precauções universais/ padrão ou práticas BSL-2	Ampla gama de hospedeiros, infeccioso para muitos tipos de células	Podem iniciar uma resposta inflamatória forte	Transdução eficiente na maioria dos tecidos	O desinfetante recomendado é o hipoclorito de sódio a 0,5% preparado na hora. O álcool não é um desinfetante eficaz contra o adenovírus.
Retrovírus	RNA	8 kb	2	BSL-2	ABSL-2	Precauções universais/ padrão ou práticas BSL-2	Ampla gama de hospedeiros	Transduz apenas células em divisão; a integração pode induzir oncogenes em algumas aplicações	Transferência persistente de genes em células em divisão	O desinfetante recomendado é o hipoclorito de sódio a 0,5% preparado na hora
Lentivírus	RNA	8 kb	3 (para HIV)	BSL-2	ABSL-2	Precauções universais/ padrão ou práticas BSL-2	Ecotrópico, antotrópico	Podem transduzir tanto células em divisão quanto células que não se dividem; a integração pode induzir oncogenes em algumas aplicações	Transferência persistente de genes em células em divisão	O desinfetante recomendado é o hipoclorito de sódio a 0,5% preparado na hora
Vetor baseado em herpesvírus (vírus herpes simplex-1)	dsDNA	40 kb (incompetente para replicação) 150 kb (amplicon)	2	BSL-2	ABSL-2	Precauções universais/ padrão ou práticas BSL-2	Ampla gama de hospedeiros	Podem iniciar uma forte resposta inflamatória; expressão gênica transitória em células que não sejam neurônios	Grande capacidade de empacotamento; forte tropismo por neurônios	O desinfetante recomendado é o hipoclorito de sódio a 0,5% preparado na hora

Observações:

- A classificação de risco difere entre os países; somente a classificação dos EUA é apresentada aqui, sem levar em conta o transgene. RG1: agentes que não estão associados a doenças em humanos adultos saudáveis. RG2: agentes associados a doenças humanas que raramente são graves e para as quais há intervenções preventivas ou terapêuticas disponíveis. RG3: agentes associados a doenças humanas graves ou letais para as quais intervenções preventivas ou terapêuticas podem estar disponíveis (alto risco individual, mas baixo risco comunitário). RG4: agentes associados a doenças humanas graves ou letais para as quais geralmente não há intervenções preventivas ou terapêuticas disponíveis (alto risco individual e alto risco comunitário). AAV, vírus adeno-associado; CDC, Centros de Controle e Prevenção de Doenças; ds, fita dupla; kb, kilobases; NIH, Institutos Nacionais de Saúde; RG, grupo de risco; ss, fita simples.
 - BSL-1: refere-se ao nível de contenção baseado no grupo de risco do vírus parental. No entanto, a maioria dos procedimentos que envolvem o manuseio e a manipulação dos vetores virais é feita em laboratórios BSL-2 para proteger as culturas de células e os estoques virais contra contaminação.
 - ABSL-2: os animais após 7 dias podem ser alojados em laboratórios ABSL-1.
 - ABSL-2: animais após 48 horas podem ser alojados em laboratórios ABSL-1.
- Fonte: traduzido de Ghosh et al. (2020).

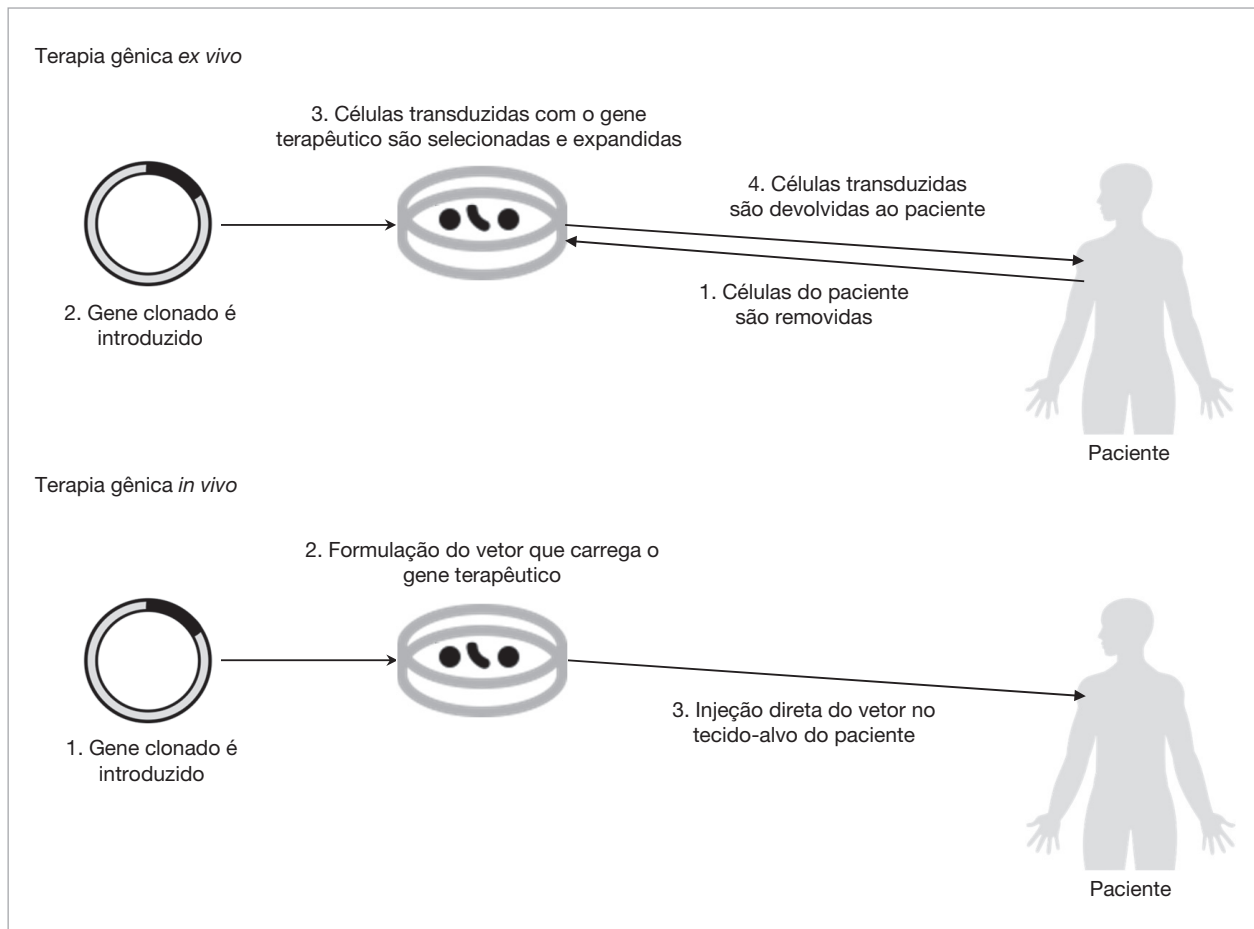


FIGURA 15.1 Mecanismos de terapia gênica somática.

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Rosenberg e Rosenberg (2012); Menck e Armando (2007); canva.com.

do CAR. O CAR é projetado para se ligar a um antígeno (em geral proteico, mas existem CAR glicolipídicos e mesmo lipídicos) de superfície específica encontrada em células tumorais, permitindo que as células T reconheçam e ataquem as células do tumor (ABDO; ARAGÃO; BONAMINO, 2021). Uma vez que as células T foram modificadas geneticamente, elas são cultivadas em grandes quantidades em laboratório e depois reintroduzidas no paciente por meio de uma infusão intravenosa. Quando as células T modificadas com o CAR entram em contato com células que expressam o antígeno-alvo, elas se ligam a essas células e promovem a morte delas, conforme mostrado na Figura 15.2.

A terapia com célula CAR-T foi desenvolvida em meados dos anos 1990, sendo aprovada para o tratamento de certos tipos de leucemia e linfoma. Os exemplos de drogas que usam essa tecnologia incluem o Kymriah e o Yescarta. Esses medicamentos têm atingido taxas de remissão impressionantes, com uma fração considerável dos pacientes mantendo as respostas clínicas e hematológicas mesmo após longos períodos (NEELAPU et

al., 2023). Uma fração significativa dos pacientes, no entanto, é refratária ao tratamento ou apresenta mecanismos de resistência tardia que levam à recidiva da doença (SHAH; FRY, 2019). A refratariedade de alguns pacientes e a recidiva apresentada por uma fração dos indivíduos tratados evidenciam que há um amplo espaço para melhorias no desenho dessas terapias. Esse desenho/redesenho da molécula do CAR, das formas e da duração do cultivo celular, bem como das características finais da célula obtida, pode levar a benefícios adicionais aos pacientes, a um ritmo acelerado de desenvolvimento de novas abordagens baseadas em moléculas de CAR (CHICAYBAM et al., 2020).

Perspectivas futuras sobre a terapia com célula CAR-T incluem a melhoria das técnicas de produção de células T modificadas e a investigação de novos antígenos de superfície a fim de expandir a aplicação dessa terapia para outros tipos de câncer (CHICAYBAM et al., 2020). Estudos estão em andamento com o intuito de explorar o uso de terapia com célula CAR-T para tratar outros tipos de neoplasias, incluindo tumores sólidos, além de

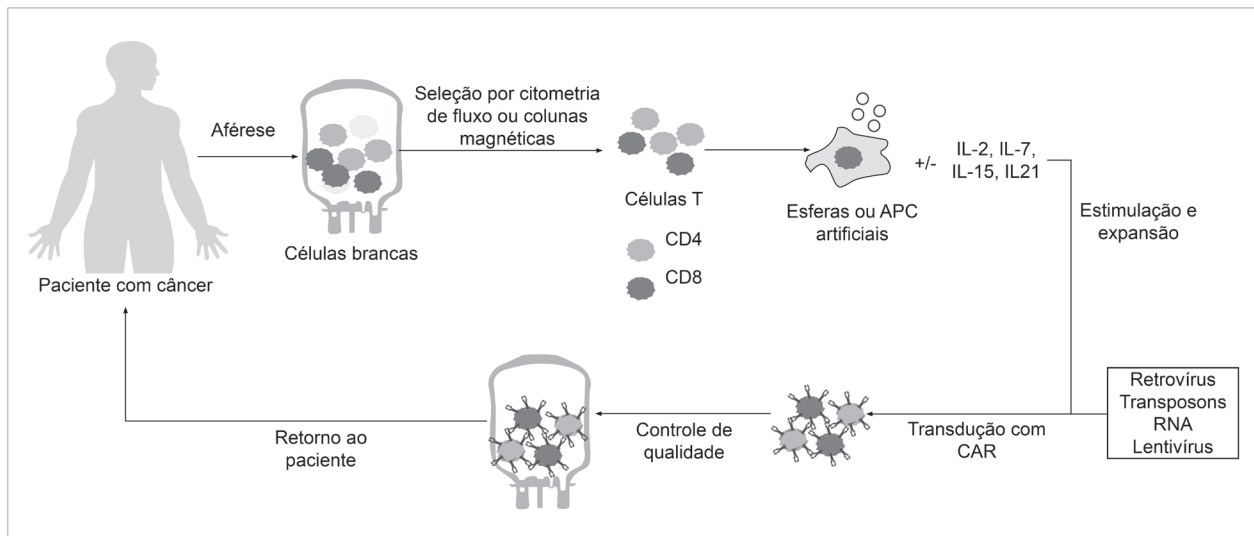


FIGURA 15.2 Células CAR-T e seu processo de preparo.

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Barrett et al. (2014), utilizando elementos de canva.com

doenças autoimunes, nas quais células CAR-T alvejando o antígeno CD19 mostraram resultados promissores na eliminação dos linfócitos B autorreativos em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico (MACKENSEN et al., 2022; MAZZI et al., 2021). Além disso, pesquisas estão em andamento a fim de desenvolver terapias combinadas que usem células CAR-T com outras terapias imunológicas, como inibidores de *checkpoint* imunológico, para aumentar ainda mais a eficácia do tratamento.

15.2.3.1 Terapia com célula TCR

Outra vertente envolvendo a modificação genética de linfócitos T abrange a terapia com células modificadas com receptores de célula T (TCR) transgênicos (RESTIFO; DUDLEY; ROSENBERG, 2012). Nessa abordagem, os linfócitos T são modificados para expressarem um novo receptor de célula T, que proverá a essa célula uma nova especificidade contra, por exemplo, proteínas expressas pelo tumor (TSIMBERIDOU et al., 2021). Por conta de o mecanismo de reconhecimento do antígeno por parte do TCR envolver a ligação ao complexo do peptídeo com o MHC, esse sistema permite detectar proteínas de expressão aberrante ou mesmo proteínas mutadas presentes em diversos compartimentos celulares, ao contrário das células CAR-T que, em geral, reconhecem somente antígenos presentes na membrana da célula. Essa abordagem exige que sejam identificados TCR (cadeias alfa e beta) que reconheçam o peptídeo-alvo complexado com um alelo específico de HLA. Desse modo, coleções de TCR que reconhecem peptídeos derivados de diferentes antígenos cuja apresentação é restrita por HLA específicos têm sido compiladas, embasando e

expandido de modo consistente os alvos que podem ser abordados com essa estratégia de imunoterapia.

A geração de linfócitos T expressando TCR transgênicos (Figura 15.3) é semelhante ao processo da geração de células CAR-T, e começa com a coleta de linfócitos T do paciente, com posterior modificação genética dessas células para que integrem o transgene codificando o TCR no genoma e passem a expressar TCR específicos ao antígeno do tumor. À transdução com vetores retrovirais, segue-se cultivo celular, de modo a atingir o número de células necessário para a atividade terapêutica. Essas células T modificadas são, em seguida, infundidas no paciente, no qual, ao encontrarem e reconhecerem as células tumorais, promovem sua eliminação.

A terapia com células expressando TCR transgênicos tem sido utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, como melanoma (Morgan et al., 2006), pâncreas (LEIDNER et al., 2022), tumores epiteliais associados ao HPV (NAGARSHETH et al., 2021), dentre outros, com resultados encorajadores em ensaios clínicos (LI et al., 2019). Por exemplo, um estudo clínico com pacientes com melanoma metastático tratados com células T modificadas com TCR específico para antígeno do melanoma mostrou uma taxa de resposta completa de 19%, e 11 dos 20 pacientes tratados permaneceram livres de progressão da doença por mais de um ano após a terapia (ROSENBERG; DUDLEY, 2009).

Ainda assim, há desafios a serem enfrentados, como o desenvolvimento de TCR que reconheçam com segurança alvos específicos de tumores, uma vez que o reconhecimento de antígenos-alvo do TCR em tecidos saudáveis pode levar a eventos de toxicidade limitante (MORGAN et al., 2013). Medidas adicionais para a

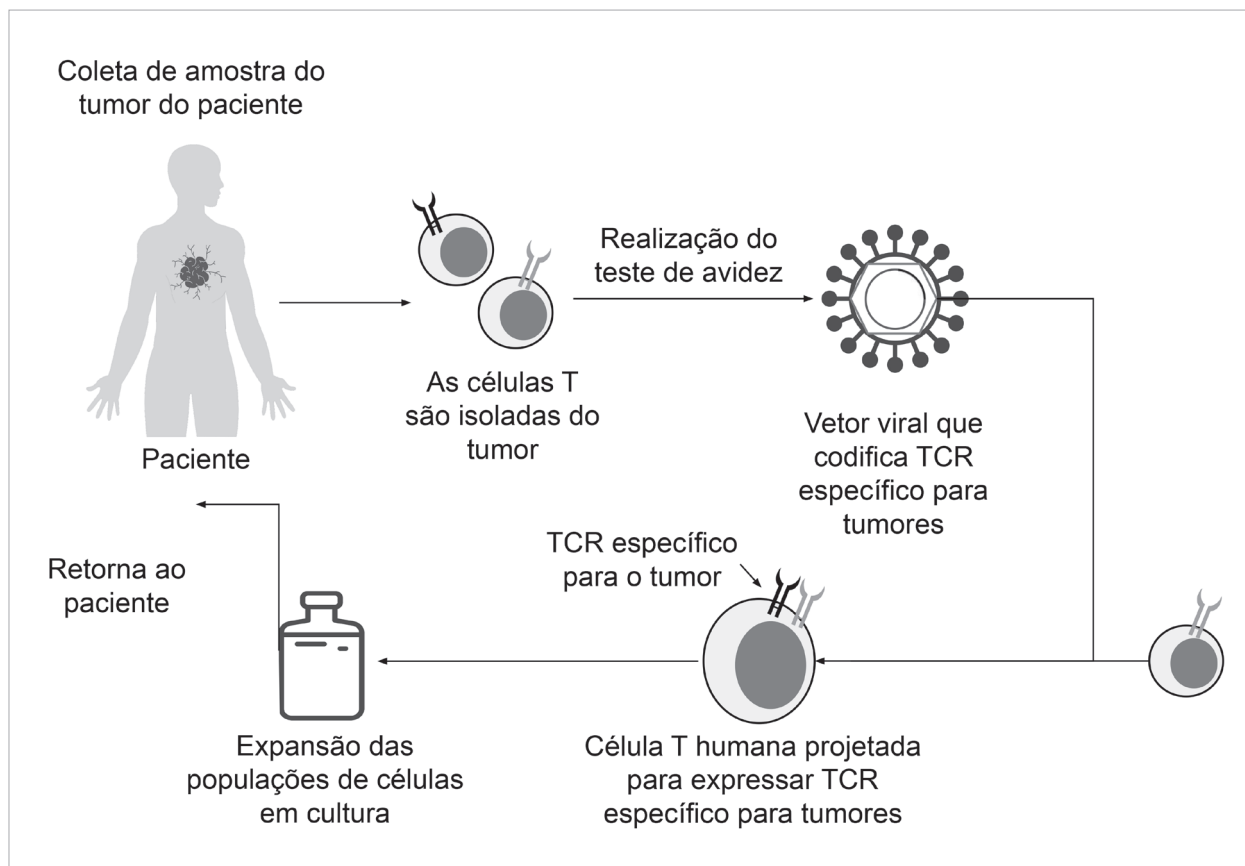


FIGURA 15.3 Mecanismo de utilização de receptores de células T (TCR) transgênicos para o reconhecimento de tumores.

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Restifo, Dudley e Rosenberg (2012), utilizando elementos do canva.com

geração de células terapêuticas mais seguras envolvem a identificação de antígenos tumorais mais eficazes e a prevenção de toxicidade, o que pode incluir eventualmente a adição de um gene suicida nos linfócitos T transgênicos de modo a eliminar a célula T modificada em caso de toxicidade (CHICAYBAM et al., 2020). A terapia com células T expressando TCR transgênicos tem um grande potencial como opção terapêutica para pacientes com câncer nos quais antígenos de expressão exclusiva estejam identificados, com a caracterização dos epítomos reconhecidos e a identificação dos respectivos TCR capazes de reconhecer esses complexos de peptídeo+MHC.

15.3 TERAPIAS IMUNOLÓGICAS NÃO MODIFICADAS GENETICAMENTE

A imunoterapia é uma modalidade terapêutica na qual a manipulação do sistema imunológico é aproveitada para o tratamento de doenças, em especial de câncer e infecções. Essa manipulação pode ser feita por meio de citocinas, vacinas, vírus oncolíticos, anticorpos

monoclonais ou mesmo do uso direto das células imunológicas, com ou sem modificações genéticas. Nas últimas décadas, a imunoterapia contra o câncer revolucionou o tratamento da doença, mudando de maneira radical o prognóstico de pacientes antes terminais. Nessa seção são discutidas as principais formas de imunoterapia celular não geneticamente modificadas. O protótipo de imunoterapia é o transplante de medula óssea, que continua sendo a principal forma de tratamento para neoplasias hematológicas de alto risco e síndromes de falência medular. Outras modalidades de terapia – grande parte ainda em estudos clínicos – são as células *natural killer* (NK) e linfócitos infiltrantes tumorais (TIL), que também serão abordadas.

15.3.1 Transplante de medula óssea

O transplante de medula teve início na década de 1950 em Seattle, nos EUA. O trabalho pioneiro de E. D. Thomas posteriormente rendeu-lhe o Prêmio Nobel. Cerca de 20 mil procedimentos foram realizados em 2020 nos EUA para o tratamento de patologias hematológicas,

mas também para algumas neoplasias sólidas e erros inatos do metabolismo (CASTRO Jr.; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001).

A medula óssea localiza-se dentro dos ossos e é o maior órgão de síntese *de novo* de células do organismo.

Em qualquer momento, cerca de 90% das células do corpo têm origem na medula óssea. Dentro dela residem as células-tronco hematopoiéticas, capazes de autorrenovação e diferenciação em todos os tipos de células do sangue (Figura 15.4). Cercadas por um microambiente

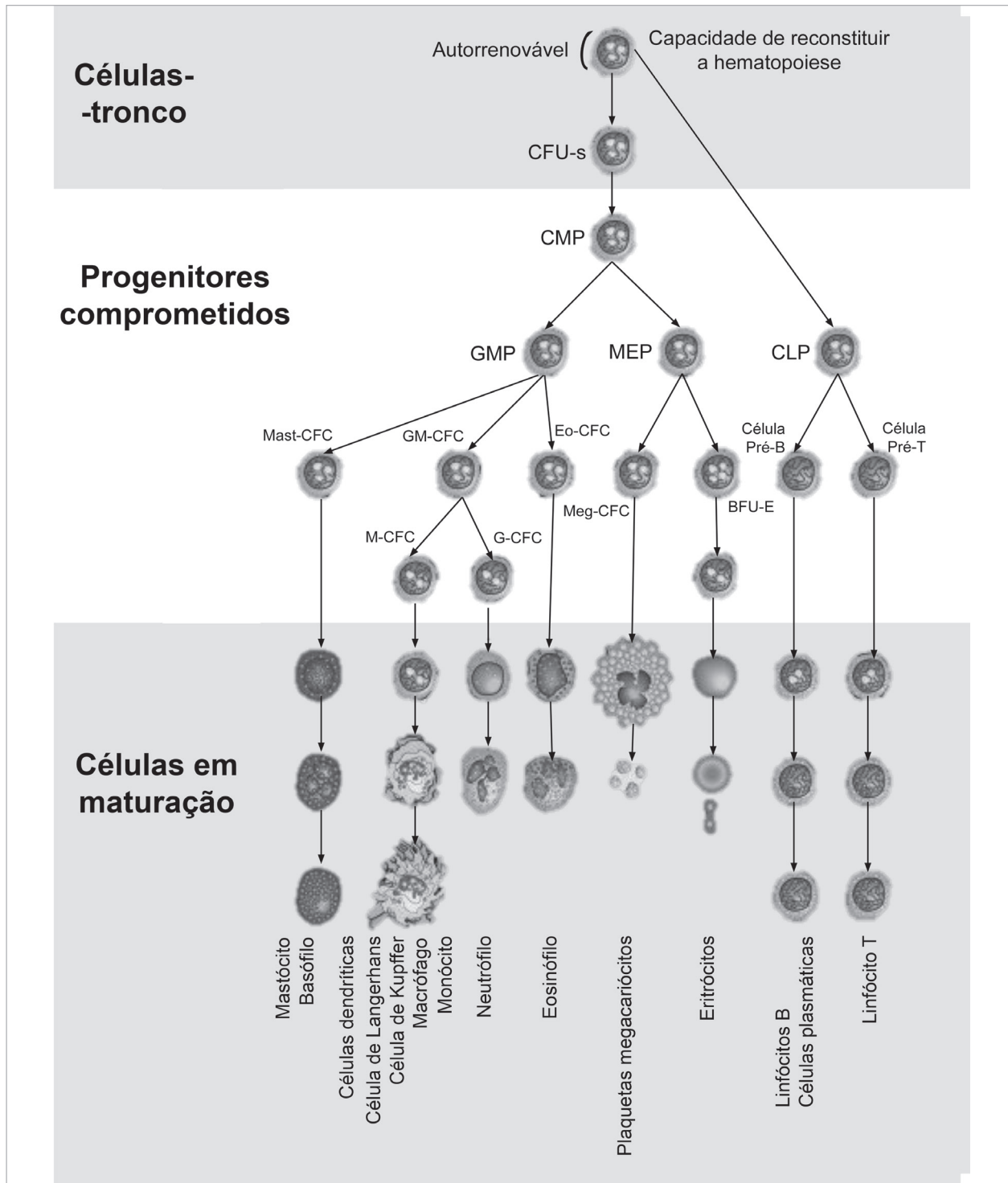


FIGURA 15.4 Processo de diferenciação das células hematopoiéticas.

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Metcalf (2007).

especializado, que dá suporte e controla finamente o *turnover* celular, as células-tronco hematopoiéticas são a base do transplante de medula. Quando transferidas de um doador para o paciente, são capazes de regenerar a função medular e produzir as células sanguíneas, bem como reconstituir o sistema imunológico (CALVI; LINK, 2015; NOMBELA-ARRIETA; MANZ, 2017).

Existem duas modalidades de transplante de medula: autólogo e alogênico. No transplante autólogo, as células-tronco do paciente são recolhidas antes da realização de quimioterapia de altas doses e posteriormente reinfundidas. Esse processo é necessário porque a medula óssea é um órgão mais sensível à maioria dos quimioterápicos e, portanto, o fator limitante da toxicidade. A preservação das células-tronco viabiliza o tratamento do tumor com drogas em altas doses, o que permite curar ou prolongar a sobrevida do paciente (BLUME; THOMAS, 2015).

O transplante alogênico é um processo mais complexo no qual um doador saudável irá fornecer células-tronco para um paciente. Normalmente, o paciente tem uma doença benigna que impede a produção adequada de células do sangue – as síndromes de falência medular, ou doenças malignas, nas quais é necessário um efeito imunológico para a cura da neoplasia. Em casos selecionados, doenças hereditárias do metabolismo, especificamente de armazenamento lisossômico, também podem se beneficiar do transplante alogênico. Nesse contexto, a correção do defeito metabólico é possível pela transferência de enzimas lisossomais entre as células. Essa transferência pode ser realizada diretamente entre células adjacentes ou pela endocitose da enzima secretada pelas células do enxerto (ROSENTHAL, 2015).

O transplante alogênico baseia-se em dois pilares: condicionamento e imunoterapia. O condicionamento é o processo preparatório antes da infusão das células-tronco. Com base em quimioterapia associada, ou não, à radioterapia, o esquema de condicionamento tem como objetivos: i) destruir a medula (mieloablação) e o sistema imunológico (linfodepleção) do doador, permitindo, assim, a enxertia, e ii) reduzir a carga tumoral no caso de doenças malignas. Os regimes de condicionamento clássicos são bastante agressivos e tóxicos, e, portanto, apenas pacientes em bom estado geral, jovens e com funções orgânicas preservadas eram candidatos ao procedimento. Com o envelhecimento da população e a necessidade de expandir as indicações, foram desenvolvidos regimes de intensidade reduzida, que não levam à completa mieloablação, mas geram imunossupressão

potente que permite a enxertia (BENSINGER, 2015; SANDMAIER; STORB, 2015).

O efeito imunoterápico do transplante de medula óssea é o grande diferencial entre os regimes autólogo e alogênico, e baseia-se na capacidade do sistema imunológico do doador de reconhecer e eliminar células tumorais remanescentes após o regime de condicionamento. O efeito imunológico do enxerto contra o tumor permite a cura de neoplasias resistentes ao tratamento quimioterápico, porém sua presença ou eficácia não são garantidas (WARREN, 2015). Saiba mais sobre os tipos de transplantes de precursores hematopoiéticos e suas indicações nos Estados Unidos no Box 15.1.

BOX 15.1

Saiba mais sobre os tipos de transplante de precursores hematopoiéticos e suas indicações nos Estados Unidos em 2020.



O transplante de medula é um procedimento complexo, hoje largamente utilizado para o tratamento de patologias de outra forma incuráveis, em especial leucemias agudas. Mesmo com o grande avanço nos últimos 65 anos, ainda há muitos desafios a serem superados, pois a mortalidade relacionada ao procedimento segue elevada. A redução da toxicidade dos regimes de condicionamento, o desenvolvimento de estratégias que permitam reduzir a incidência de DECH sem prejudicar o efeito do enxerto contra o tumor, bem como abordagens para acelerar a reconstituição imune após o procedimento são necessidades urgentes. O surgimento de novas terapias imunológicas, em especial o sucesso recente das terapias CAR-T para neoplasias B CD19+, pode levar a uma revisão das indicações de transplante futuramente. No entanto, as demais neoplasias hematológicas têm se mostrado bastante desafiadoras para imunoterapia, e o transplante segue como única modalidade com potencial curativo a esses pacientes.

15.3.1.1 As bases imunológicas do TMO alogênico

15.3.1.1.1 A compatibilidade entre doador e receptor é determinada pelo sistema HLA

O efeito imunoterápico do TMO é mediado pelos linfócitos T. Os linfócitos T têm origem na medula óssea e sua maturação ocorre no timo. São células da imunidade celular ou adaptativa e possuem receptores altamente específicos denominados TCR (*T-cell receptor*). O TCR clássico é um heterodímero composto de uma cadeia alfa e uma cadeia beta ligadas por pontes dissulfídicas. Cada cadeia é composta por uma região constante e uma região variável, que reconhece o antígeno. No processo de maturação linfocitária, a região variável sofre rearranjo somático e dá origem a um TCR único. Uma vez que o TCR é expresso na membrana celular, as células T passam por um processo de seleção no timo, no qual os clones autorreativos são deletados. Os clones selecionados permanecem nos tecidos linfoides, e, uma vez que haja reconhecimento antigênico, poderão ser ativados e dar início à resposta imune adaptativa (MARTIN; SHLOMCHIK, 2015; PETERSDORF, 2015).

Os TCR clássicos reconhecem antígenos derivados de proteínas (peptídeos) ligados ao antígeno leucocitário humano (HLA). O HLA classe I é expresso em todas

as células nucleadas e reconhecido pelos linfócitos T CD8+, enquanto o HLA de classe II é expresso nas células apresentadoras de antígeno e reconhecido pelos linfócitos T CD4+. O HLA de classe I é formado por uma cadeia de betaglobulina associada a uma cadeia pesada alfa. A cadeia pesada alfa tem o domínio de ligação ao peptídeo e é codificada pelos genes nos *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-C. HLA de classe II são formados por duas cadeias polipeptídicas alfa e beta, e codificadas pelos genes HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (Figura 15.5) (MARTIN; SHLOMCHIK, 2015; PETERSDORF, 2015).

O sistema HLA é codificado no cromossomo 6, altamente polimórfico, herdado em haplótipo com baixas taxas de recombinação e expresso em codominância (Figura 15.5). O HLA determina a compatibilidade tecidual na realização de transplantes de órgãos e tecidos. O avanço dos métodos de sequenciamento gênico que permitiram a definição do HLA em alta resolução levaram a uma melhora substancial do prognóstico após transplante de medula. Os linfócitos T são capazes de reconhecer tecidos HLA incompatíveis e rejeitá-los, além de mediar a destruição de tecidos saudáveis em receptores de medula – doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (FERRARA; ANTIN, 2015; MARTIN; SHLOMCHIK, 2015; PETERSDORF, 2015).

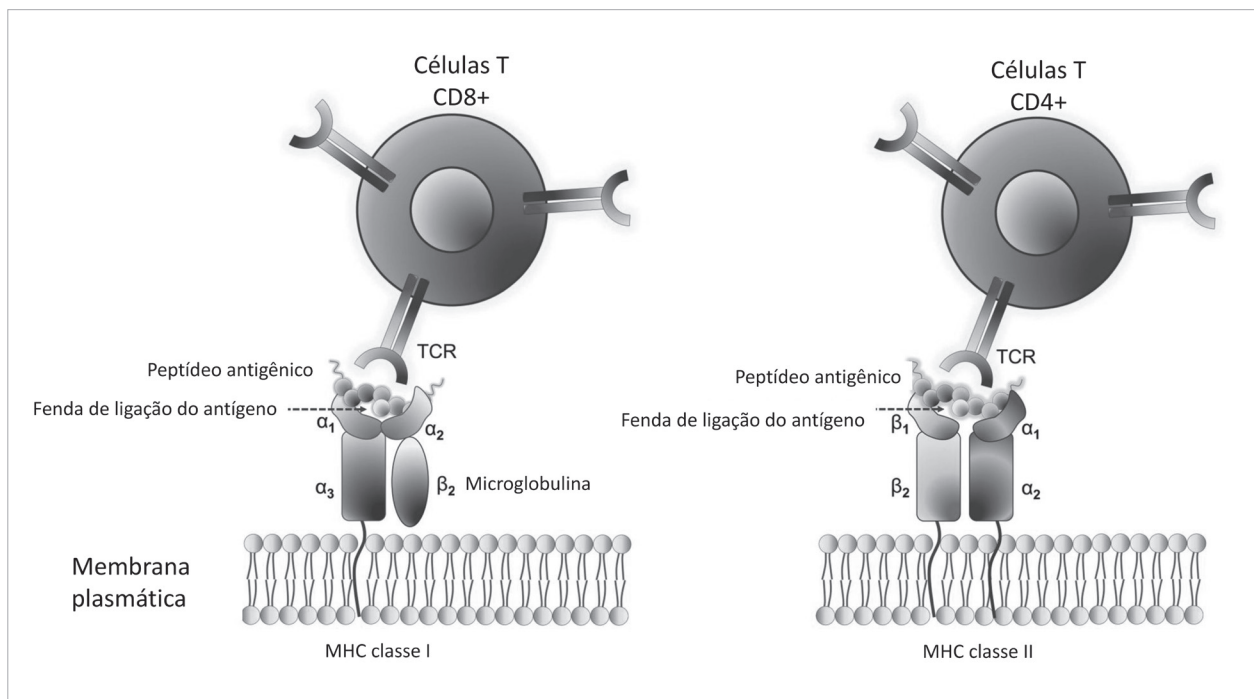


FIGURA 15.5 Visão esquemática das interações dos TCR com os complexos de peptídeos com os MHCs de classe I ou II.

Fonte: traduzida de Tsimberidou (2021).

15.3.1.1.2 O efeito do enxerto contra o tumor é mediado por determinantes antigênicos menores

Os determinantes antigênicos maiores são dados pela compatibilidade HLA. Cerca de 1-10% dos linfócitos T no sangue periférico a qualquer tempo são capazes de reconhecer células HLA-incompatíveis. No caso de tecidos HLA compatíveis, o efeito do enxerto contra o tumor é mediado pelo reconhecimento de peptídeos: i) derivados de proteínas anormais, como neoantígenos tumorais; ii) derivados de proteínas normais, porém polimórficas; iii) gerados por polimorfismos no proteossoma constitucional; e iv) derivados do cromossomo Y quando há disparidade de gênero. Esses peptídeos são determinantes antigênicos menores, pois em geral não impedem a realização do transplante, uma vez que a reação dos linfócitos T é de menor intensidade e passível de controle com imunossupressão. Esses mecanismos estão também envolvidos no desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro. Clinicamente não é possível medir o efeito do enxerto contra o tumor: sua presença é acessada de maneira indireta pela presença de DECH ou pelo controle tumoral quando a imunossupressão é retirada em casos de recaída após o transplante. Tampouco é possível prever o grau de controle imunológico do enxerto sobre o tumor antes da realização do procedimento (WARREN, 2015).

15.3.1.2 Princípios clínicos do TMO alogênico

15.3.1.2.1 Escolha do doador

Quando há indicação de transplante alogênico, a primeira medida é determinar a disponibilidade de um doador HLA compatível. Existem três tipos de doadores: i) doador aparentado; ii) doador não aparentado; e iii) doador haploidêntico (CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015).

O doador aparentado é um irmão HLA compatível de mesmo pai e mesma mãe. Uma vez que o HLA é herdado em haplótipo, cada irmão tem 25% de chances de ser totalmente compatível, 50% de chances de ser haploidêntico e 25% de chances de ser HLA incompatível. No caso de doadores aparentados, a compatibilidade mínima avaliada são os alelos de classe I HLA-A e -B e de classe II HLA-DRB1 – é o chamado doador 6/6 (CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015; DEHN et al., 2019; HOWARD et al., 2015).

Os doadores não aparentados são provenientes de um banco de medula, como o Redome (Brasil) ou o NMDP (EUA). Grande parte dos bancos internacionais são integrados, o que permite a busca de doadores no mundo inteiro. No caso de doadores não aparentados, a compatibilidade mínima deve ser de 7/8, levando-se em consideração os alelos classe I HLA-A, -B e -C, bem como HLA-DRB1 na classe II. No entanto, a tendência

mundial é fazer a tipagem dos 12 alelos de classe I e II, uma vez que *mismatch* no HLA-DPB1 foi associado a aumento da incidência de DECH (CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015; DEHN et al., 2019; HOWARD et al., 2015).

Os doadores haploidênticos são familiares do paciente que compartilham um haplótipo. Podem ser pais, irmãos ou primos, por exemplo. Nesse caso, a compatibilidade HLA é de 50%. e deve ser avaliada em 4 loci: HLA-A, -B, -C e -DRB1. Esse grau elevado de incompatibilidade determina o uso de protocolos de condicionamentos específicos para prevenir a rejeição e evitar DECH grave (CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015).

Um doador aparentado saudável quase sempre é a primeira escolha, tanto por questões logísticas quanto pela incidência esperada de complicações menor. A segunda opção seria um doador não aparentado HLA compatível, se disponível no banco. O transplante haploidêntico, em geral, é reservado para pacientes que não dispõem de doadores HLA compatíveis (CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015; DEHN et al., 2019; HOWARD et al., 2015).

15.3.1.2.2 Fonte das células-tronco

As células-tronco hematopoiéticas podem ser obtidas a partir de três fontes (BALLEN; GLUCKMAN; BROXMEYER, 2013; CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015):

- Medula óssea, retirada por meio de múltiplas aspirações das cristas ilíacas do doador. O procedimento é realizado em centro cirúrgico, sob anestesia geral, e oferece baixo risco de complicações.
- Aférese de sangue periférico mobilizado após o uso de G-CSF. O doador recebe a medicação por 4 dias, e no quinto dia é realizada aférese. Em geral, é necessária a colocação de um cateter venoso profundo para a realização do procedimento, que dura de 2 a 4 horas e tem baixo risco de complicações.
- Cordão umbilical proveniente de um banco de células. Não há risco para o doador, mas é uma modalidade cujo uso vem decrescendo pelas dificuldades técnicas como a baixa dose de células, longo período de enxertia e reconstituição imunológica.

Em geral, a medula óssea é preferência para adultos nos quais a DECH não é desejável, como é o caso de doenças benignas, e para crianças. A maior dificuldade nessa modalidade em adultos é a discrepância comum de peso entre doador e receptor, uma vez que a dose de medula a ser aspirada é calculada de acordo com o peso do receptor (o volume máximo coletado é de 20 mL/kg).

As células-tronco mobilizadas são mais utilizadas em adultos e, embora aumentem o risco de DECH quando comparadas à medula óssea, podem também reduzir o risco de recaída de doenças malignas. Nesse produto, a carga de linfócitos é mais elevada que aquela observada na medula (CARRERAS et al., 2019; CONFER; MILLER; CHELL, 2015).

15.3.1.2.3 Condicionamento e imunossupressão

Existem múltiplos regimes de condicionamento testados em ensaios clínicos para patologias específicas (e que não estão no escopo deste capítulo). Sua escolha depende da doença de base e do estado do paciente. Por exemplo, regimes clássicos de leucemia linfóide aguda (LLA) preveem o uso de quimioterapia associada à radioterapia corporal total em doses elevadas, enquanto os regimes de condicionamento de leucemia mieloide aguda (LMA) utilizam predominantemente quimioterapia em altas doses. Os regimes de condicionamento clássicos são bastante tóxicos, porém melhoram o controle da doença de base. No entanto, pacientes mais velhos ou frágeis, que não toleram regimes de alta intensidade, se beneficiaram do surgimento de regimes de intensidade reduzida, com base em fludarabina (BENSINGER, 2015; CARRERAS et al., 2019; SANDMAIER; STORB, 2015).

A lógica do regime de condicionamento é a mioablação e imunossupressão do receptor de modo a permitir a enxertia das células-tronco do doador. Os pacientes recebem quimioterapia, associada ou não à radioterapia, de maneira fracionada, que dura em geral de 5 a 7 dias. Após o término do condicionamento, o paciente recebe a infusão da medula ou o produto da aférese (BENSINGER, 2015; CARRERAS et al., 2019; SANDMAIER; STORB, 2015).

Além do regime de condicionamento, é necessário uso de imunossupressores para reduzir o risco de DECH. A imunossupressão, em geral, é feita com inibidores da calcineurina por um período de 3 meses a 1 ano após o transplante, dependendo da doença de base do paciente. Ao contrário do transplante de órgãos sólidos, no qual a imunossupressão é contínua por toda a vida, na ausência de DECH a imunossupressão pode ser retirada completamente após um período variável, em que há desenvolvimento de tolerância imunológica (CARRERAS et al., 2019; FERRARA; ANTIN, 2015).

15.3.1.2.4 Enxertia

A “pega da medula” ocorre quando a contagem de neutrófilos é superior a 500/mm³ por três dias consecutivos e em geral se dá entre o 14º (sangue periférico) e o 21º dia (medula óssea) após a infusão das células-tronco (CARRERAS et al., 2019; MARTIN, 2015). Esse processo reflete o aporte de células hematopoiéticas maduras

provenientes da nova medula. Após esse aporte inicial de neutrófilos, as demais subpopulações de leucócitos maduros derivados da medula do doador começam a ser detectadas na circulação do paciente.

15.3.1.2.5 Complicações do transplante

As principais complicações do transplante são relacionadas aos efeitos do regime de condicionamento e às complicações imunológicas. As principais causas de morte no período precoce, antes de 100 dias, são disfunção orgânica secundária à quimio e à radioterapia, infecções, recaída da doença de base e DECH. No período tardio, após o 100º dia, as infecções, recaída da doença de base e DECH são as principais causas de morte (CARRERAS et al., 2019; LOEB; YEUNG; SHULMAN, 2015).

15.3.2 Células NK

As células NK são linfócitos da imunidade inata, derivados dos precursores hematopoiéticos da medula óssea. Sua maturação ocorre na medula óssea e nos órgãos linfóides, sem a necessidade do timo. Não expressam TCR nem CD3, e podem ser identificadas pelo marcador de superfície CD56. Foram descritas há mais de quarenta anos por sua capacidade de eliminar células infectadas por vírus e células tumorais rapidamente e sem a necessidade de sensibilização prévia. As células NK são capazes de identificar perfis de expressão de ligantes associados à transformação oncogênica, levando à sua ativação e à destruição da célula transformada (ABEL et al., 2018; LIU et al., 2021; ROSSI et al., 2022). Dada a sua alta capacidade citotóxica associada à reatividade limitada contra tecidos saudáveis, as células NK apresentam grande potencial de uso no tratamento como drogas “vivas”. Foram desenvolvidos métodos de expansão *ex vivo* de células NK de várias fontes, inclusive de sangue periférico, sangue de cordão umbilical e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Essas plataformas permitem uso clínico direto das células NK, e podem também servir de base para a geração de produtos geneticamente modificados (ROSSI et al., 2022; YOON; KIM; CHOI, 2015).

A ativação das células NK é controlada por uma série de receptores ativadores, coestimulatórios e inibitórios (Figura 15.6). O estímulo resultante desses sinais determina se a célula adjacente será alvo de citotoxicidade, bem como o perfil de citocinas secretado (ABEL et al., 2018; LIU et al., 2021).

A família de receptores mais bem descrita de células NK é a dos receptores KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*), que tem função inibitória e interage com HLA de classe I, protegendo as células normais do ataque inde-

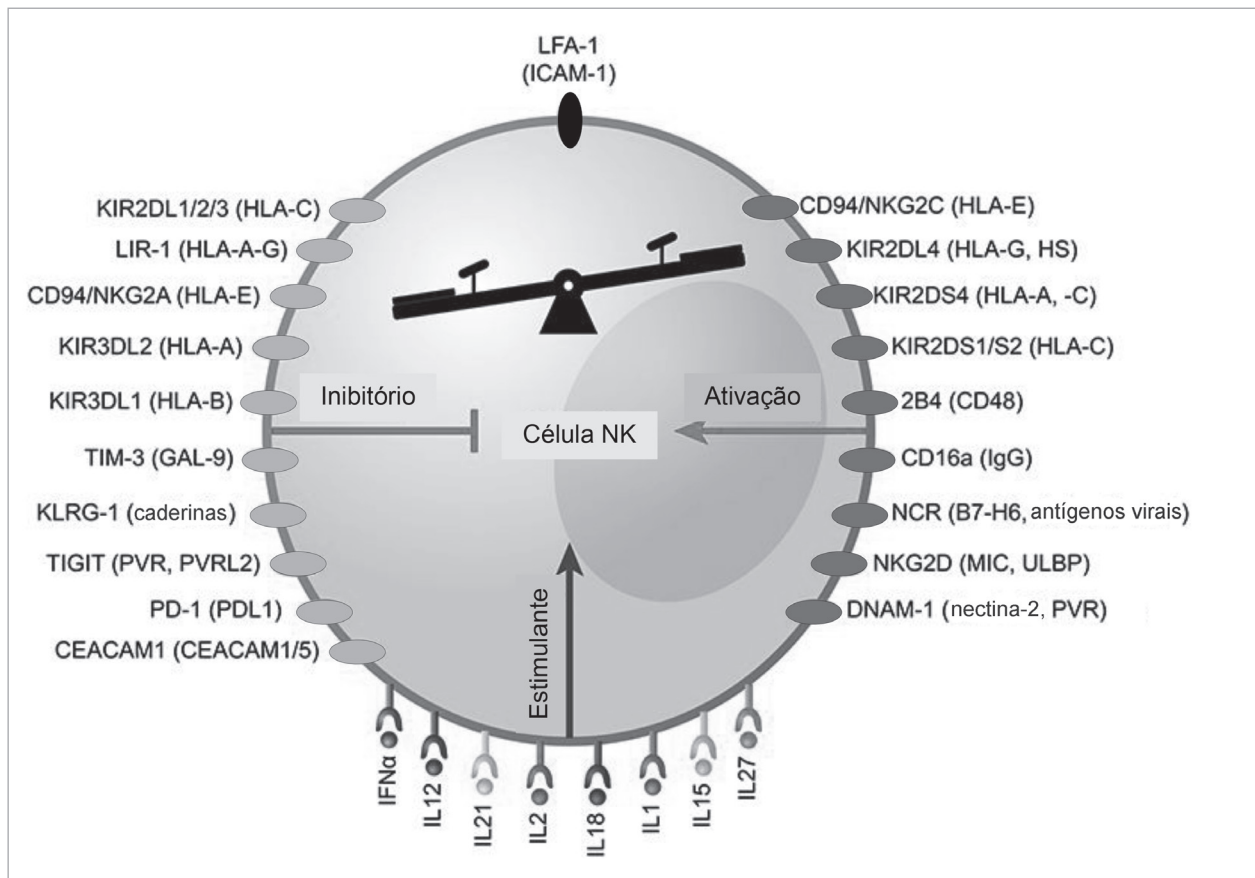


FIGURA 15.6 O processo de ativação das células NK é complexo e resulta do somatório de estímulos inibitórios e estimulatórios. Receptores de células NK, sua função e ligantes. Ilustração esquemática mostrando como a atividade e a citotoxicidade das células NK são controladas por sinais dos receptores da superfície celular. As citocinas e os receptores de citocinas correspondentes na célula NK são mostrados na parte inferior da célula NK. Sinais inibitórios desencadeados por receptores (cinza claro) após o envolvimento de seus ligantes (entre parênteses) são mostrados no lado esquerdo da célula NK. Os sinais de ativação desencadeados pelos receptores (cinza escuro) após o envolvimento de seus ligantes (entre parênteses) são mostrados no lado direito. A ligação de LFA-1 (preto) nas células NK ao ICAM-1 nas células alvo direciona a liberação de grânulos em direção à célula alvo, o que é necessário para a lise eficiente das células alvo. Fonte: Carlsten M e Järås M (2019).

sejado. As células tumorais, no entanto, frequentemente expressam níveis baixos ou ausentes de HLA de classe I, levando à ativação da célula NK e à destruição tumoral. Além disso, as células neoplásicas podem superexpressar ligantes estimulatórios, tanto em sua membrana quanto secretados no microambiente tumoral. Ligantes do receptor NKG2D são preferencialmente expressos em células malignas ou sob estresse celular, como MICA (MHC class I polypeptide related-sequence A), MICB e ULBPs (UL16-binding proteins). Diversos tipos de tumor podem secretar PDGF-DD (*platelet derived growth factor DD*), que estimula a secreção de IFN- γ e TNF α através dos receptores NKp-44 (SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Além da estimulação direta, as células NK podem ser ativadas por meio do receptor CD16, que reconhece a fração Fc das imunoglobulinas. O reconhecimento de células opsonizadas gera ativação dos linfócitos NK e resulta na lise celular, um processo denominado citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC, traduzido do inglês *antibody-dependent cell cytotoxicity*) (SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

A ativação direta das células NK *naive* por ligantes estimulatórios (exceto CD16) é insuficiente para induzir citotoxicidade ou secreção de citocinas, sendo necessária pré-estimulação com citocinas. As principais citocinas envolvidas na ativação de células NK são IL-2 e IL-15. Em especial, a IL-15 ligada à membrana de células ad-

jacentes apresenta bioatividade superior a IL-15 solúvel. Células NK geneticamente modificadas para expressar IL-15 ligada à membrana apresentam sobrevida prolongada quando comparadas àquelas que expressam sua forma solúvel (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

IL-21 associada a IL-15 e FLT-3 (*FMS-related tyrosine kinase3 ligand*) induzem a proliferação e a diferenciação de células NK a partir de precursores hematopoiéticos CD34+ na medula óssea, e podem ser utilizadas clinicamente para a imunoterapia contra o câncer. Além disso, IL-12 e IL-18 podem estimular células NK e são indutoras potentes da secreção de IFN- γ . Essa combinação de citocinas é utilizada clinicamente para aumentar o potencial citotóxico de células NK infundidas (SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Os linfócitos NK exercem sua função citotóxica pela liberação de grânulos contendo perforina, que abre poros na membrana da célula-alvo e gera lise osmótica, e granzimas, que ativam caspases e apoptose celular. A morte celular também pode ser induzida via FasL e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Além da lise direta, as células NK secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, recrutando células inflamatórias e influenciando sua atividade no microambiente tumoral (PRAGER; WATZL, 2019; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

15.3.2.1 Uso clínico das células NK

As células NK podem ser isoladas do sangue periférico, do sangue de cordão umbilical e do sangue placentário. A maioria dos ensaios clínicos foi realizada com produtos de sangue periférico derivados de leucoaférese. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são depletadas de células T por meio de seleção negativa com anti-CD3. Os linfócitos B também podem ser removidos com o uso de partículas anti-CD19 e a fração enriquecida através da seleção positiva de CD56. Como a maioria das células NK na periferia está em estado inativado, a estimulação com citocinas é importante para aumentar a capacidade citotóxica e a persistência dessas células *in vivo*. Exposição a IL-12, IL-15 e IL-18 por 12-16 h é comumente usada antes da infusão do paciente (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Como as células NK constituem 5-15% dos linfócitos no sangue periférico, pode haver dificuldade em atingir valores suficientes a fim de ser mantida uma proporção favorável de células efetoras para células tumorais. O uso de citocinas é insuficiente para a expansão celular sustentada, por isso a coestimulação com linhagens celulares é fundamental para a proliferação *ex vivo*. Muitos protocolos utilizam a linhagem K562, derivada

de leucemia mieloide crônica, que não expressa HLA de classe I e é geneticamente modificada para expressar IL-15 de membrana e/ou 4-1BB, potentes estimuladores de células NK. Essa plataforma pode levar à proliferação de células NK superior a 350 vezes após 10 dias de cultura. Antes da cocultura, as células K562 são irradiadas com doses letais (120Gy) para impedir a propagação delas no produto infundido ao paciente (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Os pacientes podem receber células NK de fonte autóloga ou alogênica. Por um lado, a expressão de HLA de classe I no tumor tende a inibir a função de células NK autólogas, e os resultados de ensaios clínicos têm corroborado a baixa eficácia dessa terapia. Por outro lado, os linfócitos NK haploidênticos com *mismatch* de KIR têm maior potencial de reconhecimento tumoral e eliminação de doença residual. Essa estratégia vem sendo utilizada com frequência nos ensaios clínicos para o tratamento de LMA e tumores sólidos, em especial neuroblastoma (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Uma estratégia comum antes da infusão de células NK é o uso de linfodepleção, geralmente realizada com quimioterápicos (fludarabina e ciclofosfamida – Flu/Cy). A linfodepleção tem algumas funções: i) pode auxiliar na redução da carga tumoral, bem como ii) modificar o microambiente tumoral eliminando linfócitos T regulatórios e células mieloides supressoras, além de iii) gerar um milieu de citocinas favorável à expansão celular. No caso de células NK alogênicas fora do contexto de transplante de medula, a linfodepleção também pode atrasar a rejeição das células infundidas, que ocorre geralmente de 2 a 3 semanas após a infusão (SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020), conforme mostrado na Figura 15.7. Para sustentar a persistência e a expansão das células infundidas, os pacientes frequentemente recebem administração subcutânea de IL-2 em doses de 1×10^6 IU/m² a 1×10^7 IU por 2 semanas (SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

15.3.2.2 Resultados clínicos

Os resultados clínicos observados com o uso de células NK não modificadas geneticamente têm sido modestos. As maiores taxas de sucesso foram vistas na LMA, em que estudos mostram taxas de resposta em um terço a metade dos pacientes, algumas delas sustentadas a longo prazo, porém distantes do potencial curativo relatado para linfócitos CAR-T na LLA. Além da heterogeneidade dos estudos e dos tipos de produto infundidos, a fase da doença também influencia os resultados, e pacientes com cargas tumorais mais baixas demonstraram maiores chance de resposta (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

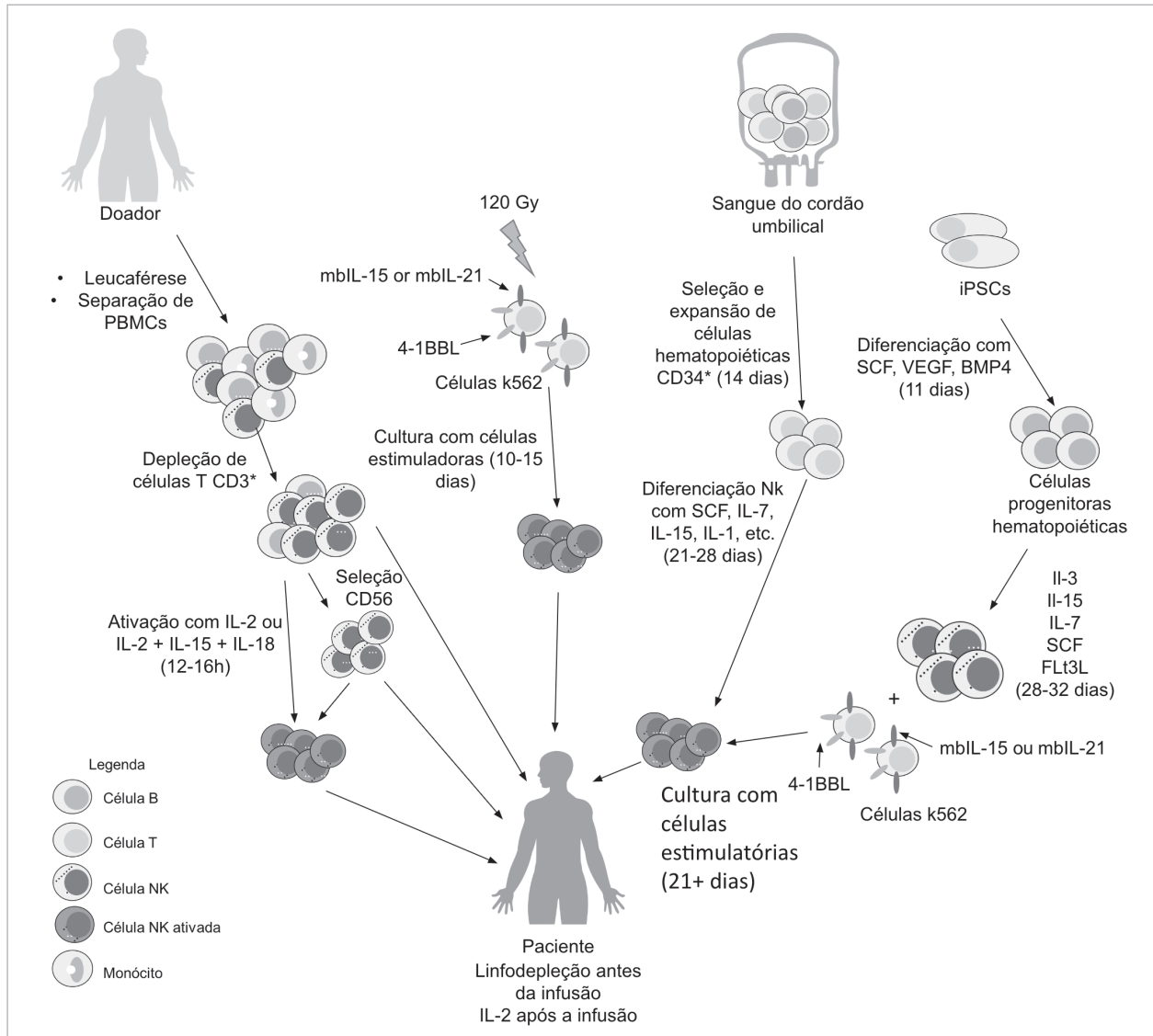


FIGURA 15.7 Células NK podem ser geradas a partir de diversas fontes para terapia. As células podem ser purificadas para uso direto de sangue periférico ou expandidas *in vitro* a partir de sangue periférico ou de cordão umbilical para posterior infusão. Vertentes mais recentes têm testado a diferenciação das células NK a partir de iPSC.

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Shimasaki, Jain e Campana (2020); canva.com.

No neuroblastoma, a infusão de células NK após o uso de anticorpo monoclonal contra GD2 para potencializar o efeito de ADCC obteve respostas em 40% dos pacientes. Outros tumores tratados com infusões de células NK, como mieloma múltiplo, tumores de ovário, rim e mama, não mostraram resultados apreciáveis (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

15.3.2.3 O futuro da terapia com células NK

A terapia com células NK não modificadas geneticamente precisa ser otimizada para superar as barreiras à sua ampla aplicação. A primeira delas é o desenho

clínico adequado, uma vez que a dose terapêutica deve atingir uma razão célula efetora/célula-alvo que permita a eliminação tumoral. Além disso, a rejeição de células alogênicas limita a sobrevivência dessas células *in vivo*. A adoção de regimes de linfodepleção mais intensos poderia prolongar a persistência dessas células, porém ao custo de toxicidade aumentada e limitação de uso em pacientes mais frágeis (SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Outras estratégias visam à ativação de células NK *in vivo*. Por exemplo, o uso de engajadores biespecíficos de células assassinas (BiKE, traduzido do inglês *bispecific*

killer engagers), anticorpos biespecíficos que se ligam ao CD16 e a um antígeno de membrana tumoral. Um anticorpo que antagoniza o KIR (KIRD2L1/2/3) foi testado em fase I na LMA e em mieloma múltiplo com boa segurança, porém sem respostas objetivas (LIU et al., 2021; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

A alta capacidade citotóxica aliada à ausência de DECH, no entanto, tornam as células NK excelentes ferramentas para a imunoterapia, em especial para a produção de células CAR-NK. A tendência observada nos estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em andamento é o uso cada vez maior de células NK em plataformas que envolvem modificação genética para otimizar sua função e sua persistência, bem como sua capacidade de infiltração tumoral (ROSSI et al., 2022).

15.3.3 Terapias com TIL

O evento inicial no surgimento do câncer é uma mutação no DNA. Essa mutação gera instabilidade genômica, levando ao acúmulo de mutações secundárias e alterações cromossômicas estruturais que impulsionam a progressão tumoral (ZHANG; ZHANG, 2020). A presença de mutações pode também gerar neoantígenos tumorais, que são novos epítopos reconhecidos pelo sistema imune e capazes de ativar a resposta imune adaptativa (LANG et al., 2022; PAIJENS et al., 2021).

Durante o desenvolvimento da neoplasia, o sistema imune inato e o adaptativo infiltram o microambiente tumoral (TME) e contribuem para a modulação da progressão do tumor. As células do sistema imune inato são capazes de suprimir o crescimento tumoral através de lise direta ou da ativação do sistema adaptativo. Linfócitos B e T infiltram o TME, e, embora a função dos linfócitos B seja pouco entendida, sabe-se que os linfócitos T, em especial os linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTL), são capazes de respostas imunes potentes contra tumores, lisando as células neoplásicas pela liberação de granzimas e perforina. Porém, as células tumorais possuem mecanismos de escape à imunovigilância, como defeitos nas vias de apresentação de antígenos, aumento da expressão de moléculas imunossupressoras e o recrutamento de células imunossupressoras para o TME (ZHANG; ZHANG, 2020).

Dessa maneira, os linfócitos T têm sua função inibida e ocorre progressão tumoral. A imunoterapia com inibidores de *checkpoint* como CTLA-4 e PDL-1/PD1, que antagonizam o efeito imunossupressor do microambiente tumoral sobre os linfócitos T, foi revolucionária no tratamento de diversos tumores sólidos, em especial daqueles com alta carga mutacional como melanoma. Taxas de resposta elevadas em pacientes com opções antes limitadas de tratamento corroboraram o potencial

da imunoterapia no controle e possível cura de neoplasias (ALEXANDROV et al., 2013; STRICKLER; HANKS; KHASRAW, 2021).

Os primeiros protocolos de tratamento de melanoma com linfócitos T que infiltram os tumores, ou TIL, foram desenvolvidos na década de 1990 pelo dr. Rosenberg em Bethesda. O conhecimento sobre imunologia do câncer ainda não era bem estabelecido, porém os primeiros resultados de estudos clínicos foram encorajadores (ROSENBERG; SPIESS; LAFRENIERE, 1986). O uso de TIL baseia-se em princípio semelhante ao dos inibidores de *checkpoint*, que consiste na superação do efeito supressor do microambiente tumoral pela infusão de números elevados de células T tumor-específicas associadas a suporte com citocinas estimulatórias (ROSENBERG et al., 1994).

Os TIL constituem uma população heterogênea. Estudos em tumores de cólon e pulmão demonstraram a existência de uma população pequena específica para neoantígenos tumorais (CD39+) e uma grande população de linfócitos *bystander* (CD39-). Além da população específica pequena, o marcador CD39+ está associado à exaustão linfocitária por estimulação antigênica crônica via TCR. Para utilização clínica, os TIL precisam ser isolados e expandidos *ex vivo*, e posteriormente infundidos no paciente, em geral após linfodepleção (GRANHØJ et al., 2022). O processo de obtenção e expansão de linfócitos infiltrantes de tumores é mostrado na Figura 15.8.

15.3.3.1 Produção de TIL

Em primeiro lugar, o material tumoral é cirurgicamente extraído. A amostra pode ser processada de duas maneiras: digestão enzimática até uma solução que permita isolamento de células únicas, ou dissecada em múltiplos fragmentos menores. Esse material então é cultivado em meio adequado na presença de IL-2. Após 2-3 semanas, são isolados linfócitos minimamente cultivados chamados YTIL (*young* TIL ou TIL jovens). Os YTIL podem ser expandidos em um protocolo de expansão rápida (REP), que utiliza IL-2 em altas doses, anti-CD3 e PBMC irradiados. O anti-CD3 induz proliferação através de estimulação inespecífica do TCR. Após 14 dias de cultura, cerca de 2×10^{11} linfócitos podem ser isolados para infusão no paciente. Como a expansão é inespecífica, linhagens celulares de tumores autólogos, ou outros alvos com expressão antigênica similar à dos tumores, podem ser utilizadas para a seleção de clones de TIL que demonstrem especificidade tumoral. Porém, esse processo é laborioso, longo e nem sempre eficaz. Os YTIL apresentam tempo de cultura menor e maior especificidade tumoral que protocolos de seleção estrita, e são geralmente as células utilizadas nos ensaios clínicos (GRANHØJ et al., 2022).

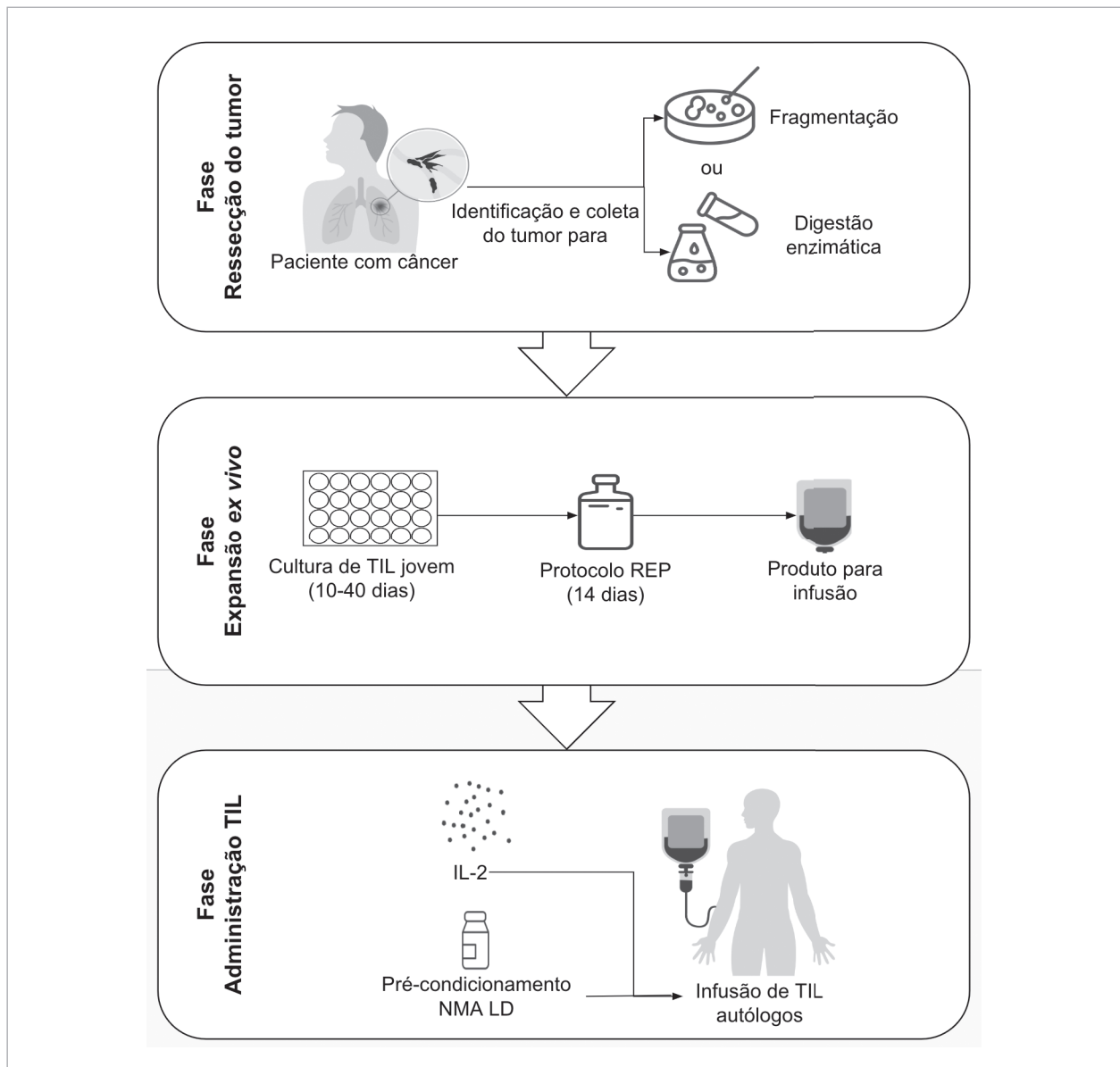


FIGURA 15.8 Processo de obtenção e expansão de linfócitos infiltrantes de tumores.

Fonte: elaborada pelos autores a partir de Granhøj et al. (2022). Ilustrações do canva.com.

Após o preparo das células, os pacientes recebem linfodepleção com fludarabina e ciclofosfamida. Embora os mecanismos celulares não estejam completamente elucidados, a linfodepleção é importante na modulação do microambiente tumoral, depletando as células imunossupressoras, e para a redução da demanda por citocinas de outras células imunes, aumentando a concentração disponível para os TIL. Após a infusão, os protocolos em geral preveem a administração de IL-2 subcutânea em altas doses para sustentar a expansão e aumentar a citotoxicidade das células infundidas (GRANHØJ et al., 2022).

15.3.3.2 Eficácia TIL

15.3.3.2.1 Melanoma metastático e outros tumores

Os três primeiros estudos com TIL em melanoma metastático, iniciados antes do surgimento de inibidores de *checkpoint*, mostraram taxas de resposta variando entre 49% e 72%. Interessante notar que 22% desses pacientes atingiram remissão completa duradoura após 3 anos de acompanhamento. Estudos subsequentes confirmaram taxas de resposta de 40% a 50% com 10% a 20% de respostas completas.

Com o surgimento dos inibidores de *checkpoint*, que se tornaram o tratamento padrão para melanoma

metastático, além da terapia-alvo com inibidores de BRAF/MEK, o uso de TIL ficou restrito em grande parte a protocolos de pesquisa para pacientes em terceira ou quarta linha de tratamento (GRANHØJ et al., 2022). A complexidade em sua produção é apontada como fator limitante à expansão do uso. No entanto, está em fase final de licenciamento pelo FDA o lifileucel, um produto de TIL autólogos para melanoma metastático recaído ou refratários a inibidores de *checkpoint* e terapia-alvo. O estudo pivotal mostrou taxas de resposta de 36% a 41% e controle de doença em 80% dessa população (Sarnaik et al., 2021). Um estudo randomizado fase 3 comparou TIL com ipilimumab em uma população majoritariamente refratária a inibidores de PD1/PDL-1 (86%), e demonstrou maior tempo livre de progressão (7,2 × 3,1 meses) e sobrevida global aumentada (25,8 meses × 18,9 meses) no grupo que recebeu a terapia com TIL. A toxicidade apresentada no grupo dos TIL foi associada a quimioterapia e IL-2 em altas doses. Esses resultados confirmam o potencial dessa abordagem terapêutica para populações com opções restritas (ROHAAN et al., 2022).

Embora seja possível gerar TIL para tumores não melanoma, as taxas de resposta observadas são significativamente menores e não sustentadas quando comparadas àquelas vistas no tratamento do melanoma. Os estudos clínicos atuais têm focado na otimização do processo de produção dos TIL e em sua combinação com inibidores de *checkpoint* para potencialização do efeito (BRAUN; WU, 2022; GRANHØJ et al., 2022).

15.3.3.2.2 Desafios no uso de TIL

Embora os resultados clínicos dos TIL no tratamento do melanoma sejam encorajadores, a maioria dos pacientes é primariamente resistente ao tratamento ou adquire resistência ao longo do tempo. Para a expansão do uso clínico em outros tipos de tumores, bem como a melhora das taxas de resposta no melanoma, diversos fatores associados à baixa eficácia terapêutica precisam ser endereçados, entre eles:

- Ausência de reconhecimento tumoral pelos TIL por conta da baixa frequência de linfócitos tumor-específicos no produto infundido ou ausência de apresentação antigênica eficaz.
- Perda de antígenos-alvo.
- Presença de células imunossupressoras no microambiente tumoral.
- Disfunção e exaustão das células T infundidas.
- Migração limitada para o sítio tumoral.
- Heterogeneidade tumoral (os produtos são gerados a partir de uma ou poucas lesões tumorais, e, portanto, não são necessariamente representativas de todos os clones neoplásicos do paciente).

Além disso, a toxicidade do esquema de linfodepleção e da administração de IL-2 são as principais complicações observadas após infusões de TIL. A linfodepleção é realizada com quimioterapia em doses elevadas, que causam mielossupressão e citopenias graves (anemia, neutropenia e plaquetopenia), aumentam o risco de infecções e demandam hospitalização por 2 a 3 semanas na maioria dos casos. A IL-2 em altas doses pode causar síndrome de extravasamento capilar, insuficiência renal e edema pulmonar, que necessitam de manejo em unidade de cuidado intensivo. Esquemas alternativos com IL-2 em doses moderadas ou baixas vêm sendo testados e demonstraram redução da toxicidade sem perda da eficácia terapêutica (BRAUN; WU, 2022; GRANHØJ et al., 2022; ROHAAN et al., 2022; SARNAIK et al., 2021).

15.4 BIOTECNOLOGIA APLICADA À TERAPIA GÊNICA E CELULAR

As revoluções tecnológicas decorrentes do advento da elucidação da estrutura do DNA, o sequenciamento de ácidos nucleicos, as ferramentas de DNA recombinante e, mais recentemente, de edição genética proporcionaram um aumento de conhecimento, exponencial nos últimos anos. Desde a definição original dos ácidos nucleicos como carreadores da informação genética até a velocidade assombrosa em que a descrição do sistema CRISPR/Cas9 e sua aplicação biotecnológica levaram à aplicação clínica das terapias de edição genética, vivemos um período que pode ser definido como uma nova revolução na genética. Essa nova revolução está calcada em nossa capacidade de sequenciar vastas quantidades de genomas dos mais variados organismos, na geração de ferramentas moleculares para diagnóstico rápido e preciso e, também, em nossa capacidade sem precedentes de editar genomas dos mais variados seres vivos, incluindo humanos.

As ferramentas de edição genética, inicialmente as Zinc Finger Nucleases, depois os TALENs e, por último, CRISPR, permitiram a prova de conceito de que edições genéticas em organismos complexos podem ser obtidas de maneira rápida, eficiente e segura. Os primeiros protocolos de aplicação clínica de CRISPR em humanos para o tratamento de doenças (FRANGOUL et al., 2021; GILLMORE et al., 2021) evidenciam o potencial revolucionário dessa terapia, embora seja ainda necessário acompanhar a evolução dos primeiros pacientes tratados com essas tecnologias para que aspectos de segurança sejam verificados. É possível antever, inclusive, que alguns dos protocolos de terapia gênica envolvendo vetores virais que se destinam à entrega nas células alvo de uma cópia não mutada do gene-alvo (seja com ADA, cadeia gama comum com vetores lentivirais ou

mesmo o RPE65 através de vetores adeno-associados) serão substituídos por estratégias de edição genética. O campo de estudo de entrega gênica também vem passando por fortes inovações, em que cada vez mais protocolos utilizando sistemas não virais de entrega gênica ou mesmo a proteína Cas9 complexada ao RNA guia e modificada para se tornar capaz de penetrar na célula e realizar a edição genética são adotados como agentes terapêuticos (FOSS et al., 2023).

Essas inovações têm potencial para o desenvolvimento de novos protocolos de terapia gênica que prescindam do uso de vetores virais. Embora muito eficientes e, em geral, seguros, os vetores virais demandam estruturas altamente especializadas para produção, apresentam alto custo para a geração em grau GMP e sua produção representa um gargalo à maior disponibilidade de terapias gênicas. Desse modo, estratégias sem uso de vetores virais podem acelerar o desenvolvimento dessas terapias e ajudar a torná-las mais acessíveis.

O forte e acelerado desenvolvimento de ferramentas como o sistema CRISPR tem impacto em diversas áreas da biotecnologia, seja no uso de dispositivos diagnósticos isotérmicos e *point of care* até a terapia para diversas doenças, além de influenciar de modo profundo processos industriais de base biotecnológica. Não há mais dúvidas de que a biologia sintética fez grandes progressos recentemente em diversas áreas, como em processos industriais através da elaboração de vias de biossíntese (Galanie et al., 2015), em mecanismos de estudos de sistemas e abordagens terapêuticas através de estratégias de optogenética (FOLCHER et al., 2014), na terapêutica contra o câncer (CHICAYBAM et al., 2020) e no desenvolvimento de sistemas ortogonais de controle de expressão gênica (WEINBERG et al., 2017). Cada um desses campos trará grandes impactos na biotecnologia aplicada à saúde, e é um grande desafio adotar essas novas soluções disruptivas criteriosamente e democraticamente.

15.5 APLICAÇÕES CLÍNICAS DE TERAPIA GÊNICA E CELULAR

A terapia celular e, há menos tempo, a terapia gênica pavimentaram o caminho de uma revolução terapêutica em curso. As últimas décadas viram avanços marcantes no tratamento de doenças incuráveis até que se aprendesse a aplicar o potencial de células-tronco no contexto hematológico e, mais recentemente, de vetores virais que carregam genes saudáveis para pacientes com doenças derivadas de mutações germinativas. Restam poucas dúvidas de que as recentes ferramentas de edição genética darão novo impulso a esse campo nos próximos anos.

O Brasil vem acompanhando esses avanços e possui um ecossistema maduro de utilização clínica dessas

novas tecnologias, além de grupos de pesquisa com tradição no desenvolvimento de terapias celulares em maior extensão e gênicas de modo mais incipiente. Um aspecto importante que torna o Brasil particularmente atraente é a presença de um arcabouço regulatório maduro, seja nas instâncias da Anvisa, da CTNBio ou mesmo dos comitês de ética em pesquisa animal ou com seres humanos. Com esse arcabouço, o tamanho do mercado potencial e a capacidade instalada, o país se torna atrativo para a aplicação clínica e mesmo o envolvimento em fases clínicas de desenvolvimento de terapias celulares e gênicas por empresas farmacêuticas e de biotecnologia.

Há um processo muito dinâmico de aprovação de novas terapias gênicas no país. Em maio de 2023, o Brasil contava com terapias aprovadas para o tratamento de diversas doenças hematológicas, como leucemias linfoblásticas agudas de precursores B, linfomas CD19+ e mielomas múltiplos, distrofias hereditárias retinianas e atrofia muscular espinhal (Box 15.2). Há um ritmo acelerado de aprovações, e uma sugestão é a realização de uma consulta da lista atualizada de produtos registrados na página da Anvisa.

BOX 15.2

A lista atualizada de registros de produtos de terapias avançadas no Brasil pode ser consultada no QR code a seguir:



Temos um cenário em que muitas terapias estão em desenvolvimento, seja para as mais diversas doenças monogênicas (especialmente as hemoglobinopatias e algumas doenças de coagulação), seja para a perspectiva de uma expressiva quantidade de terapias fundamentadas em edição genética através do sistema CRISPR/Cas9. Esse cenário é extremamente estimulante e desafiador se, por um lado, há novas opções terapêuticas e, do outro lado, existe o desafio de como prover acesso a essas terapias de altíssimo custo. Esse cenário pode levar a situações não previstas, como o desinteresse de grandes indústrias farmacêuticas de comercializar os tratamentos

eficazes, alegando dificuldade de ter retorno financeiro pelo pequeno número de pacientes, ainda que recebam milhões de dólares por paciente tratado (DUNN, 2022).

15.6 O PAPEL DA TERAPIA GÊNICA E CELULAR PARA O COMPLEXO ECONÔMICO INDUSTRIAL DA SAÚDE (CEIS)

As terapias gênicas e celulares representam um ecossistema extremamente dinâmico e de alto valor agregado. Países que produzem e comercializam terapias dessas modalidades encontram uma importante fonte de receita e desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. Esses setores têm muitas oportunidades de interações com o setor de base química, indústrias biotecnológicas, setores de prestação de serviço, complexos hospitalares e de cuidados, além do setor de diagnóstico e tratamento.

Há um vasto campo para o desenvolvimento dessas novas terapias, seja por meio de atividades disruptivas, seja pela melhoria incremental que envolva processos mais simples, eficientes e com custos reduzidos para a produção e/ou implementação dessas terapias. Essas dimensões podem ser relacionadas a novos equipamentos utilizados nos procedimentos de geração ou mesmo transferência de vetores de entrega gênica (segmento de engenharia biomédica), utilização de drogas e compostos químicos que potencializem e/ou otimizem o processo de geração da terapia ou ainda seus efeitos terapêuticos, questões de logística, seja no transporte, no armazenamento ou nas manipulações desses produtos medicinais de terapias avançadas. Por último, certamente há desenvolvimentos conjuntos com abordagens de diagnóstico de precisão, seja no rastreamento genético de populações como no diagnóstico preciso que acompanhe uma indicação de uso dessas terapias, que em geral apresentam custos elevados.

15.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível perceber, em perspectiva, que as terapias avançadas, envolvendo as terapias celulares e gênicas, transitaram de promessas conceituais para realidades terapêuticas nas últimas seis décadas. Em particular, os últimos dez anos representaram um marco para a terapia gênica, que rompeu a barreira conceitual e se consolidou como um campo terapêutico de ponta, com potencial curativo e uma vasta possibilidade de desdobramentos e benefícios aos pacientes.

Essas terapias representam um desafio conceitual e prático para a implementação em sistemas de saúde, seja em aspectos que envolvem seus altos custos, os modelos de reembolso, os requerimentos técnicos e logísticos,

além da capacitação das equipes de saúde e estruturas hospitalares para a sua aplicação. Não obstante, o campo vem evoluindo em velocidade acelerada e, com o advento das novas estratégias e técnicas de edição genética, é possível esperar uma expansão ainda mais acelerada nos próximos anos.

O Brasil vem se preparando para enfrentar esse grande desafio, e uma discussão madura sobre as melhores formas de incorporar, desenvolver e disponibilizar essas novas terapias se faz necessária. Isso é importante para que a população atendida pelo sistema de saúde de nosso país possa se beneficiar dessa revolução terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. ABDO, L.; ARAGÃO, E. A.; BONAMINO, M. Structural determinants of chimeric antigen receptor design. **Critical Reviews in Immunology**, v. 41, n. 1, p. 89-104, 2021.
2. ABEL, A. M. et al. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 13 ago. 2018.
3. ADLI, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1.911, 15 maio 2018.
4. ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7.463, p. 415-421, 22 ago. 2013.
5. AULETTA, J. et al. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR US summary slides. **CIBMTR**. Disponível em: <https://cibmtr.org/CIBMTR/Resources/Summary-Slides-Reports>. Acesso em: 14 dez. 2023.
6. AUSTIN, C. P. et al. Future of rare diseases research 2017-2027: An IRDiRC perspective. **Clinical and Translational Science**, v. 11, n. 1, p. 21-27, jan. 2018.
7. BALLEEN, K. K.; GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. E. Umbilical cord blood transplantation: The first 25 years and beyond. **Blood**, v. 122, n. 4, p. 491-498, 25 jul. 2013.
8. BARRETT, D. M. et al. Chimeric Antigen receptor therapy for cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 65, n. 1, p. 333-347, 14 jan. 2015.
9. BENSINGER, W. I. High-dose preparatory regimens. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation**. Nova Jersey: Wiley, 2015. p. 223-234.
10. BLUME, K. G.; THOMAS, E. D. A history of allogeneic and autologous hematopoietic cell transplantation. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation**. [s.l.]: Wiley, 2015. p. 1-11.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças raras: informação para uma atenção integral à saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
12. BRAUN, D. A.; WU, C. J. Tumor-infiltrating t cells: A portrait. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 10, p. 992-994, 10 mar. 2022.
13. CALVI, L. M.; LINK, D. C. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. **Blood**, v. 126, n. 22, p. 2.443-2.451, 26 nov. 2015.
14. CARLSTEN M.; JÄRÅS, M. Natural killer cells in myeloid malignancies: immune surveillance, nk cell dysfunction, and pharmacological opportunities to bolster the endogenous NK cells. **Frontiers**, v. 10, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02357.

15. CARRERAS, E. et al. **The EBMT handbook: Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies.** Cham: Springer International Publishing, 2019.
16. CASTRO JR., C. G. de; GREGIANIN, L. J.; BRUNETTO, A. L. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 5, out. 2001.
17. CAVAZZANA-CALVO, M. et al. Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 580-584, out. 2012.
18. CHICAYBAM, L. et al. Overhauling CAR-T cells to improve efficacy, safety and cost. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2.360, 21 ago. 2020.
19. CONFER, D. L.; MILLER, J. P.; CHELL, J. W. Bone marrow and peripheral blood cell donors and donor registries. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.** Nova Jersey: Wiley, 2015. p. 423-432.
20. DEHN, J. et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: Guidelines from the NMDP/CIBMTR. **Blood**, v. 134, n. 12, p. 924-934, 19 set. 2019.
21. DOUDNA, J. A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. **Nature**, v. 578, n. 7.794, p. 229-236, 13 fev. 2020.
22. DUNN, A. Kids with "bubble boy" disease are dying — even though drug companies have found a cure. **Business Insider.** 26 jul. 2022. Disponível em: <https://www.businessinsider.com/bubble-boy-disease-cure-but-drug-companies-wont-provide-it-2022-7> . Acesso em: 14 dez 2023.
23. EMA. Orphan designation: Overview. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/orphan-designation-overview> . Acesso em: 14 dez. 2023.
24. FDA. Cellular & Gene Therapy Products. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products#:~:text=Human gene therapy seeks to,living cells for therapeutic use> . Acesso em: 14 dez. 2023.
25. FERRARA, J. L. M.; ANTIN, J. H. The pathophysiology of graft-versus-host disease. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.** Wiley, 2015. p. 146-155.
26. FOLCHER, M. et al. Mind-controlled transgene expression by a wireless-powered optogenetic designer cell implant. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5.392, 11 nov. 2015.
27. FOSS, D. V. et al. Peptide-mediated delivery of CRISPR enzymes for the efficient editing of primary human lymphocytes. **Nature Biomedical Engineering**, v. 7, n. 5, p. 647-660, 25 abr. 2023.
28. FRANGOUL, H. et al. CRISPR-Cas9 Gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, p. 252-260, 21 jan. 2021.
29. GALANIE, S. et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. **Science**, v. 349, n. 6.252, p. 1.095-1.100, 4 set. 2015.
30. GHOSH, S. et al. Viral vector systems for gene therapy: A comprehensive literature review of progress and biosafety challenges. **Applied Biosafety**, v. 25, n. 1, p. 7-18, 1º mar. 2020.
31. GILLMORE, J. D. et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 6, p. 493-502, 5 ago. 2021.
32. GRANHØJ, J. S. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy: Recent advances, challenges, and future directions. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 22, n. 5, p. 627-641, 4 maio 2022.
33. HIGH, K. A.; RONCAROLO, M. G. Gene therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 5, p. 455-464, 1º ago. 2019.
34. HOH, Y. K. The first three decades of gene therapy. **The American Biology Teacher**, v. 85, n. 1, p. 17-22, 1º jan. 2023.
35. HOWARD, C. A. et al. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: Consensus opinion of the blood and marrow transplant clinical trials network (BMT CTN). **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 1, p. 4-7, jan. 2015.
36. KOHN, D. B. Gene therapy for blood diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 60, p. 39-45, dez. 2019.
37. LANG, F. et al. Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 4, p. 261-282, 1º abr. 2022.
38. LEIDNER, R. et al. Neoantigen T-cell receptor gene therapy in pancreatic cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 22, p. 2.112-2.119, 2 jun. 2022.
39. LI, D. et al. Genetically engineered T-cells for cancer immunotherapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 1, p. 35, 20 set. 2019.
40. LIU, S. et al. NK cell-based cancer immunotherapy: From basic biology to clinical development. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 7, 6 dez. 2021.
41. LOEB, K. R.; YEUNG, C. C.; SHULMAN, H. M. Pathology of hematopoietic cell transplantation. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.** Wiley, 2015. p. 292-332.
42. LONG, C. et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. **Science**, v. 345, n. 6.201, p. 1.184-1.188, 5 set. 2015.
43. MACKENSEN, A. et al. Anti-CD19 CAR-T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. **Nature Medicine**, v. 28, n. 10, p. 2.124-2.132, 15 out. 2022.
44. MARTIN, P. J. Documentation of engraftment and characterization of chimerism after hematopoietic cell transplantation. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.** Wiley, 2015. p. 272-282.
45. MARTIN, P. J.; SHLOMCHIK, W. D. Overview of hematopoietic cell transplantation immunology. In: **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.** Wiley, 2015. p. 96-115.
46. MAZZI, M. T. et al. CAR-T cells leave the comfort zone: current and future applications beyond cancer. **Immunotherapy Advances**, v. 1, n. 1, 1º jan. 2021.
47. MEDLINEPLUS. What are stem cells? Disponível em: <https://medlineplus.gov/stemcells.html> . Acesso em: 14 dez. 2023.
48. MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**, n. 75, 2007. p. 50-61. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13620> . Acesso em: 14 dez. 2023.
49. METCALF, D. Concise review: Hematopoietic stem cells and tissue stem cells: Current concepts and unanswered questions. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2.390-2.395, 1º out. 2007.
50. MORGAN, R. A. et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. **Science**, v. 314, n. 5.796, p. 126-129, 6 out. 2006.
51. MORGAN, R. A. et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. **Journal of Immunotherapy**, v. 36, n. 2, p. 133-151, fev. 2013.
52. NAGARSHETH, N. B. et al. TCR-engineered T-cells targeting E7 for patients with metastatic HPV-associated epithelial cancers. **Nature Medicine**, v. 27, n. 3, p. 419-425, 8 mar. 2021.
53. NALDINI, L. Gene therapy returns to centre stage. **Nature**, v. 526, n. 7.573, p. 351-360, 14 out. 2015.

54. NATHWANI, A. C. et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 21, p. 1.994-2.004, 20 nov. 2015.
55. NATIONAL CANCER INSTITUTE. CAR-T cells: engineering patients' immune cells to treat their cancers. [s.d.]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>. Acesso em: 14 dez. 2023.
56. NEELAPU, S. S. et al. 5-year follow-up supports curative potential of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1). **Blood**, 23 fev. 2023.
57. NOMBELA-ARRIETA, C.; MANZ, M. G. Quantification and three-dimensional microanatomical organization of the bone marrow. **Blood Advances**, v. 1, n. 6, p. 407-416, 14 fev. 2017.
58. ORPHA. **Prevalence and incidence of rare diseases**: Bibliographic data. nov. 2023. Disponível em: https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf. Acesso em: 14 dez. 2023.
59. PAIJENS, S. T. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 4, p. 842-859, 2 abr. 2021.
60. PATIENT EDUCATION. Gene Therapy Basics. [s.d.]. Disponível em: <https://patienteducation.asgct.org/gene-therapy-101/gene-therapy-basics>. Acesso em: 14 dez. 2023.
61. PETERSDORF, E. W. Histocompatibility. *In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Nova Jersey: Wiley, 2015. p. 112-127.
62. PRAGER, I.; WATZL, C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 105, n. 6, p. 1.319-1.329, 27 maio 2019.
63. RESTIFO, N. P.; DUDLEY, M. E.; ROSENBERG, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 4, p. 269-281, 22 abr. 2012.
64. ROHAAN, M. W. et al. Tumor-Infiltrating lymphocyte therapy or ipilimumab in advanced melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 23, p. 2.113-2.125, 8 dez. 2022.
65. ROSENBERG, L. E.; ROSENBERG, D. D. Detection and treatment of genetic disorders. *In: Human Genes and Genomes*. [s.l.]: Elsevier, 2012. p. 289-315.
66. ROSENBERG, S. A. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 15, p. 1.159-1.166, 3 ago. 1994.
67. ROSENBERG, S. A.; DUDLEY, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 2, p. 233-240, abr. 2009.
68. ROSENBERG, S. A.; SPIESS, P.; LAFRENIERE, R. A New approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. **Science**, v. 233, n. 4.770, p. 1.318-1.321, 19 set. 1986.
69. ROSENTHAL, J. Hematopoietic cell transplantation for storage diseases. *In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Wiley, 2015. p. 885-912.
70. ROSSI, F. et al. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2 jun. 2022.
71. SANDMAIER, B. M.; STORB, R. Reduced intensity allogeneic transplantation regimens. *In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Wiley, 2015. p. 232-246.
72. SARNAIK, A. A. et al. Lifileucel, a tumor-infiltrating lymphocyte therapy, in metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 24, p. 2.656-2.666, 20 ago. 2021.
73. SHAH, N. N.; FRY, T. J. Mechanisms of resistance to CAR-T cell therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 5 mar. 2019.
74. SHIMASAKI, N.; JAIN, A.; CAMPANA, D. NK cells for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 3, p. 200-218, 6 mar. 2020.
75. STRICKLER, J. H.; HANKS, B. A.; KHASRAW, M. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response: Is more always better? **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 5, p. 1.236-1.241, 1º mar. 2021.
76. TROUNSON, A.; MCDONALD, C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 11-22, jul. 2015.
77. TSIMBERIDOU, A.-M. et al. T-cell receptor-based therapy: An innovative therapeutic approach for solid tumors. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 102, 30 dez. 2021.
78. WARREN, E. H. Biology of the human graft versus tumor response and how to exploit it. *In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Wiley, 2015. p. 166-181.
79. WEINBERG, B. H. et al. Large-scale design of robust genetic circuits with multiple inputs and outputs for mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 453-462, 27 maio 2017.
80. WHO. Rare diseases. Disponível em: <https://www.who.int/standards/classifications/frequently-asked-questions/rare-diseases>. Acesso em: 14 dez. 2023.
81. WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, n. 2, p. 162-169, ago. 2013.
82. YOON, S. R.; KIM, T.-D.; CHOI, I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 2, p. e141-e141, 13 fev. 2015.
83. ZHANG, Y.; ZHANG, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: Understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 8, p. 807-821, 1º ago. 2020.

Outras terapias baseadas em ácidos nucleicos

Sotiris Missailidis

Ana Paula Dinis Ano Bom

Charles Marques Lourenço

Patrícia Cristina da Costa Neves

Este capítulo apresenta uma visão ampla sobre as terapias baseadas em ácidos nucleicos. Ele se inicia com a caracterização das principais aplicações das terapias de RNA às doenças genéticas. Na sequência, aborda as principais vacinas terapêuticas baseadas em RNA mensageiro e os sistemas de entrega. Além disso, são abordadas as terapias baseadas em aptâmeros. Por fim, são apontados os impactos, atuais e futuros, dessas terapias no Complexo Econômico-Industrial da Saúde (CEIS). São apresentadas diferentes abordagens para terapias e vacinas baseadas em ácidos nucleicos, com ênfase em terapias e vacinas carreadoras de RNA mensageiro (MRNA) ou RNA de silenciamento (siRNA) e aptâmeros e suas aplicações, principalmente, nas doenças genéticas. A terapia gênica baseada em RNA requer que o RNA terapêutico funcione dentro das células-alvo sem provocar respostas imunes indesejadas, enquanto vacinas baseadas em RNA precisam do arsenal imunológico para serem eficazes. Neste capítulo, são também avaliados os desafios para o desenvolvimento de produtos baseados em ácidos nucleicos e como superá-los. Os ácidos nucleicos podem ser transportados para as células com sistemas de entrega de drogas não virais, que contornam as limitações dos vetores de entrega viral, bem como podem ser conjugados a moléculas para aumentar a estabilidade e a eficiência. Terapias baseadas em ácidos nucleicos estão em crescente amplitude e apresentam relevância na medicina clínica; são consideradas terapias inovadoras e estão na fronteira do conhecimento.

16.1 APLICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

As primeiras evidências de que um RNA exógeno, manipulado por pesquisadores, poderia ser utilizado como uma molécula carreadora de informações desejadas para células eucarióticas surgiram no final da década

de 1980, em algumas publicações da empresa Vical Incorporate (MALONE; FELGNER; VERMA, 1989). Eles demonstraram que o RNA mensageiro incorporado em lipossomos era capaz de transfectar diferentes tipos celulares e expressar a proteína de interesse. Estava aberto o caminho para estudos ao longo de mais de 30 anos de desenvolvimento tecnológico que culminaram com a criação das vacinas contra a Covid-19, que revolucio-

naram tanto a área de vacinas preventivas quanto áreas terapêuticas que usam o RNA mensageiro.

O RNA mensageiro pode ser utilizado de diversas maneiras no campo de prevenção e tratamento de doenças. A primeira é uma forma de repor proteínas faltantes ou expressas aberrantemente no organismo humano. O emprego do RNA mensageiro oferece uma oportunidade única para que o próprio corpo expresse qualquer tipo de proteína (Figura 16.1) (BERRAONDO et al., 2019).

Essa estratégia terapêutica conta com uma vantagem sobre o uso de proteínas terapêuticas expressas em organismos heterólogos, pois pode preservar a localização natural da proteína em diferentes organelas, impulsionadas por seus sinais de localização, além de favorecerem

modificações pós-traducionais naturais. O mecanismo de ação dessas terapias se baseia na introdução do mRNA produzido enzimaticamente *in vitro* (IVT, do inglês *in vitro transcription*), entregue por uma nanopartícula lipídica (NPL) – do inglês *lipid nanoparticle* (LNP) – em uma população celular específica no paciente, em geral aquela do tecido afetado pela doença. O mRNA liberado no citoplasma é então traduzido na proteína terapêutica (Figura 16.1).

O mRNA é, portanto, uma unidade de informação intermediária que conecta o genoma e o proteoma, e sua atividade é transitória por definição. Essa expressão transitória é a principal diferença para a terapia gênica, uma abordagem que pode introduzir uma modificação

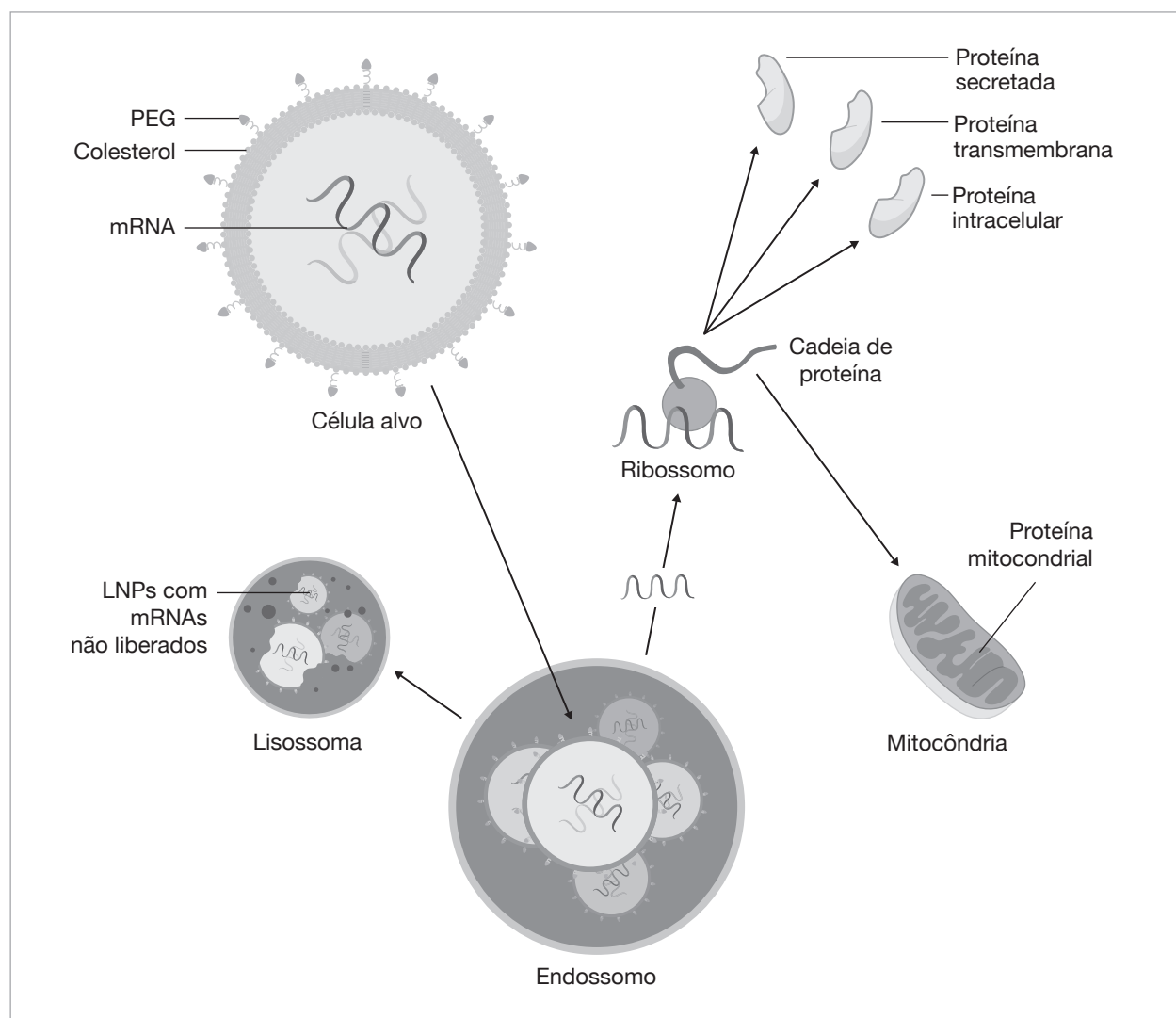


FIGURA 16.1 As nanopartículas lipídicas entregam o mRNA terapêutico aos hepatócitos, as células-alvo. Os mRNA liberados dos endossomos são traduzidos e os produtos proteicos eventualmente alcançam suas localizações intracelulares ou extracelulares.

LNP: nanopartículas lipídicas; PEG: polietilenoglicol.

Fonte: traduzida de Berraondo et al. (2019).

estável no genoma do hospedeiro. No caso de terapias baseadas em mRNA, um modo de ação do mRNA é transferir informações do genoma ao ribossomo para tradução e não alterar as informações genéticas do hospedeiro.

Por um lado, a natureza transitória dessa tecnologia é uma vantagem porque evita a genotoxicidade inerente à terapia gênica, além de ser mais fácil realizar uma titulação individualizada da dose de RNA e de interromper, rapidamente, o tratamento no caso de eventos adversos. Por outro lado, existem também algumas desvantagens potenciais. No caso do uso do mRNA, a administração repetida é necessária para o tratamento de doenças crônicas.

Além disso, até o momento, o fígado é o alvo terapêutico principal após administração sistêmica do mRNA encapsulado em nanopartículas lipídicas (NPL), restringindo o espectro das doenças tratáveis e a via de administração para alvos hepáticos (ou seja, infusão intravenosa [IV]). Pesquisas adicionais estão em andamento para melhorar a estabilidade e a tradução do mRNA, aprimorar a entrega de NPL aos tecidos extra-hepáticos e permitir vias alternativas de administração (injeções subcutâneas).

Levando-se em consideração as vantagens promissoras na utilização do RNA para a reposição de proteínas, diversas pesquisas surgiram para a adoção dele – principalmente para o tratamento de condições

raras monogênicas, em que os problemas genéticos se baseiam em defeitos de produção de determinada proteína codificada por um único gene (MARTINI; GUEY, 2019). Recentemente, três trabalhos avaliaram essa abordagem de administração de mRNA sistêmico para três distúrbios monogênicos diferentes em modelos animais. O mecanismo de ação da terapia, conforme já descrito, era restaurar a enzima/proteína com uma proteína funcional codificada pelo RNA sintético, modificado e entregue em órgãos-alvo utilizando NPL específicas. O sucesso da prova de conceito da terapia com mRNA foi demonstrado para acidemia metilmalônica (MMA), porfiria intermitente aguda (AIP) e doença de Fabry (AN et al., 2017; JIANG et al., 2018; ZHU et al., 2019). Dado o sucesso obtido nessas abordagens, diversas empresas vêm investindo em um *pipeline* de desenvolvimento de terapias de reposição baseadas em RNA, conforme mostrado na Tabela 16.1.

Além das terapias de reposição de proteínas, alguns trabalhos do início da década de 1990 começaram a esclarecer que o RNA mensageiro poderia ser direcionado e utilizado para a entrega de informações antigênicas às células apresentadoras de antígenos. Essas células são as responsáveis por processar os antígenos quando um organismo multicelular é invadido. Esses primeiros trabalhos demonstraram que o RNA mensageiro entregue por lipossomos era capaz de expressar proteínas de interesse do vírus Influenza e um antígeno carcinoem-

TABELA 16.1 Lista de estudos baseados em MRNA em estágios pré-clínicos e clínicos para doenças raras monogênicas

Empresas	Doenças raras	Alvos	Rotas de administração	Estágio de desenvolvimento
Arcturus	Hemofilia B	Fator IX (secretada)	IV	Pré-clínico
Arcturus	Deficiência de ornitina transcarbamilase	OCT (intracelular)	IV	Pré-clínico
Genevant	Deficiência de ornitina transcarbamilase	OCT (intracelular)	IV	Pré-clínico
Moderna	Acidemia metilmalônica	MUT (intracelular)	IV	Fase 1/2
Moderna	Acidemia propiônica	PCCA e PCCB (intracelular)	IV	Pré-clínico
Moderna	Doença de armazenamento de glicogênio tipo 1 ^a	G6PC (intracelular)	IV	Pré-clínico
Moderna	Fenilcetonúria	PAH (intracelular)	IV	Pré-clínico
Moderna	Doença de Fabry	α -Gal A (secretada)	IV	Pré-clínico
Translate Bio	Deficiência de ornitina transcarbamilase	OCT (intracelular)	IV	IND
Translate Bio	Fibrose cística	CFTR (transmembrana)	Inalação	Fase 1/2
Ultragenix/Arcturus	Doença de armazenamento de glicogênio tipo 3	GDE (intracelular)	IV	Pré-clínico

Fonte: Martini e Guey (2019).

brionico em células apresentadoras de antígenos e, como resultado, mostraram a indução de respostas celulares e humorais contra esses antígenos, fornecendo as primeiras evidências para a utilização do RNA mensageiro em vacinas preventivas e terapêuticas (CONRY et al., 1995; MARTINON et al., 1993).

O conceito de vacina preventiva envolve duas propriedades clássicas do sistema imunológico dos mamíferos: especificidade e memória. O sistema imunológico, quando entra em contato pela primeira vez com um antígeno, desencadeia uma resposta especializada para eliminar esse organismo invasor. Ao fim dessa resposta, que é chamada de resposta primária, algumas células que participaram do processo restam como células de memória, “armazenando” a informação de como combater aquele antígeno no caso de um segundo encontro, no qual essas células irão expandir rapidamente e combater o antígeno de maneira eficaz. Sendo assim, as vacinas preventivas têm o papel de prevenir uma infecção (imunidade esterilizante) ou evitar o agravamento da doença.

As vacinas ditas terapêuticas se aproveitam do conceito de que são mecanismos que induzem o corpo a responder por si mesmo a uma injúria, portanto, são mecanismos de imunidade ativa. Nesse caso, a vacina não é empregada para prevenir uma doença, mas para estimular o organismo a responder com mecanismos

imunológicos contra uma enfermidade instalada, sendo caracterizada, por fim, como um tratamento. Um excelente exemplo dessa diferenciação é a utilização da vacina contra o papilomavírus humano (HPV), ilustrado na Figura 16.2.

Na Figura 16.2, é possível observar (no quadro à esquerda) que as vacinas preventivas contra o HPV se baseiam, principalmente, na imunidade humoral. Por um lado, as vacinas preventivas em uso no momento são partículas semelhantes ao vírus do HPV (VLP) que codificam as proteínas do capsídeo viral L1 e/ou L2, potentes indutoras de anticorpos neutralizantes, que bloqueiam a infecção primária por HPV, induzindo imunidade esterilizante e prevenindo a infecção pelo HPV. Por outro lado, a vacinação terapêutica contra o HPV concentra-se mais na imunidade mediada por células.

A imunidade mediada por células envolve a interação entre células apresentadoras de antígenos, particularmente células dendríticas e células T. As células dendríticas induzem clones específicos de células T CD4+ e T CD8+ efetoras, que, ao fim do processo de eliminação do vírus, se tornarão células de memória. Essas células T efetoras realizam a mediação de efeitos terapêuticos com células T CD8+ efetoras, também conhecidas como linfócitos T citotóxicos (CTL), mediando a morte específica de células infectadas pelo vírus, e com células T CD4+ efetoras,

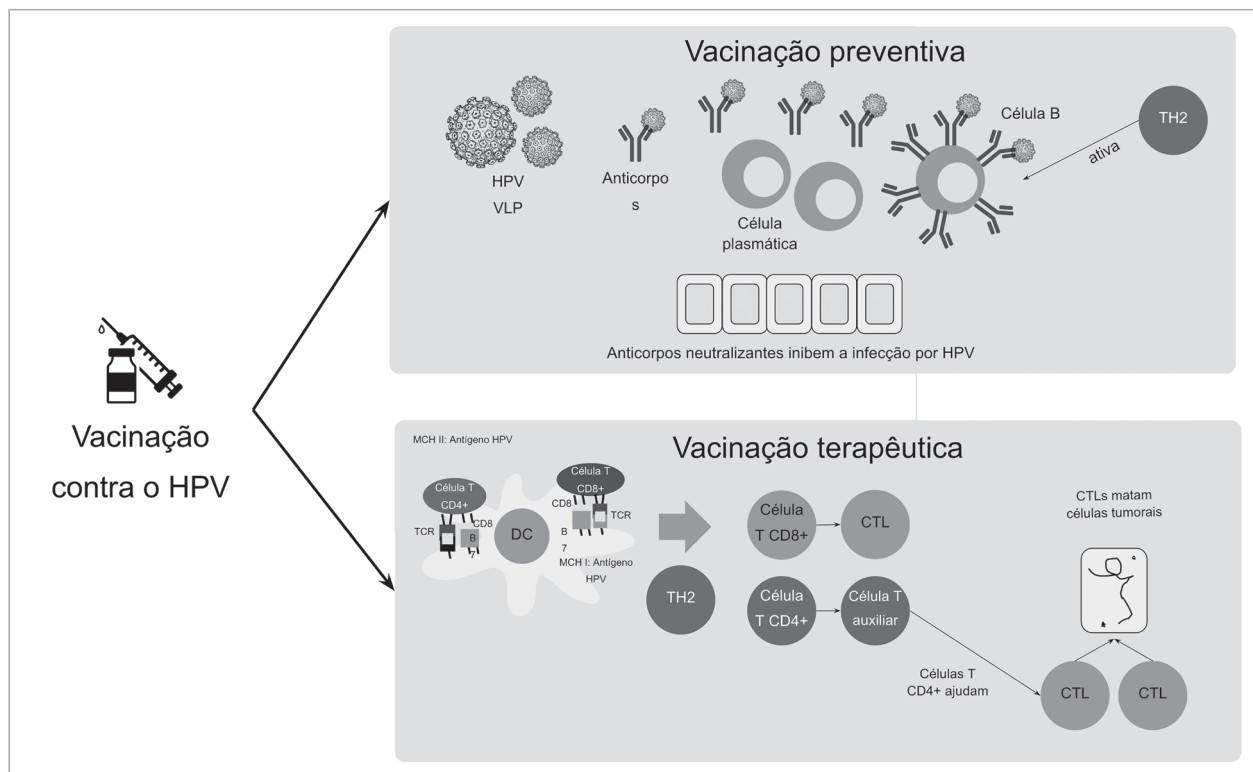


FIGURA 16.2 Vacinas preventivas e terapêuticas contra o papilomavírus humano (HPV).

Fonte: elaborada pelos autores com base em Lin et al. (2010); canva.com.

se diferenciando em células T auxiliares para aumentar a resposta imune CTL ou ativar células B para produzir anticorpos, conforme é possível observar no quadro à direita. Todos esses mecanismos levam à eliminação do HPV do organismo, sendo então essa vacina uma forma de tratamento da doença (CONRY et al., 1995). Levando-se em consideração o exemplo citado, fica

muito claro o potencial uso do RNA mensageiro como forma de vacina terapêutica (Figura 16.3).

A primeira vantagem na utilização do RNA é que, recorrendo a sistemas de entrega, ele é entregue diretamente no citoplasma das células apresentadoras de antígeno (1) no qual, ao ser traduzido na proteína de interesse, faz que ela acesse direta e rapidamente as vias

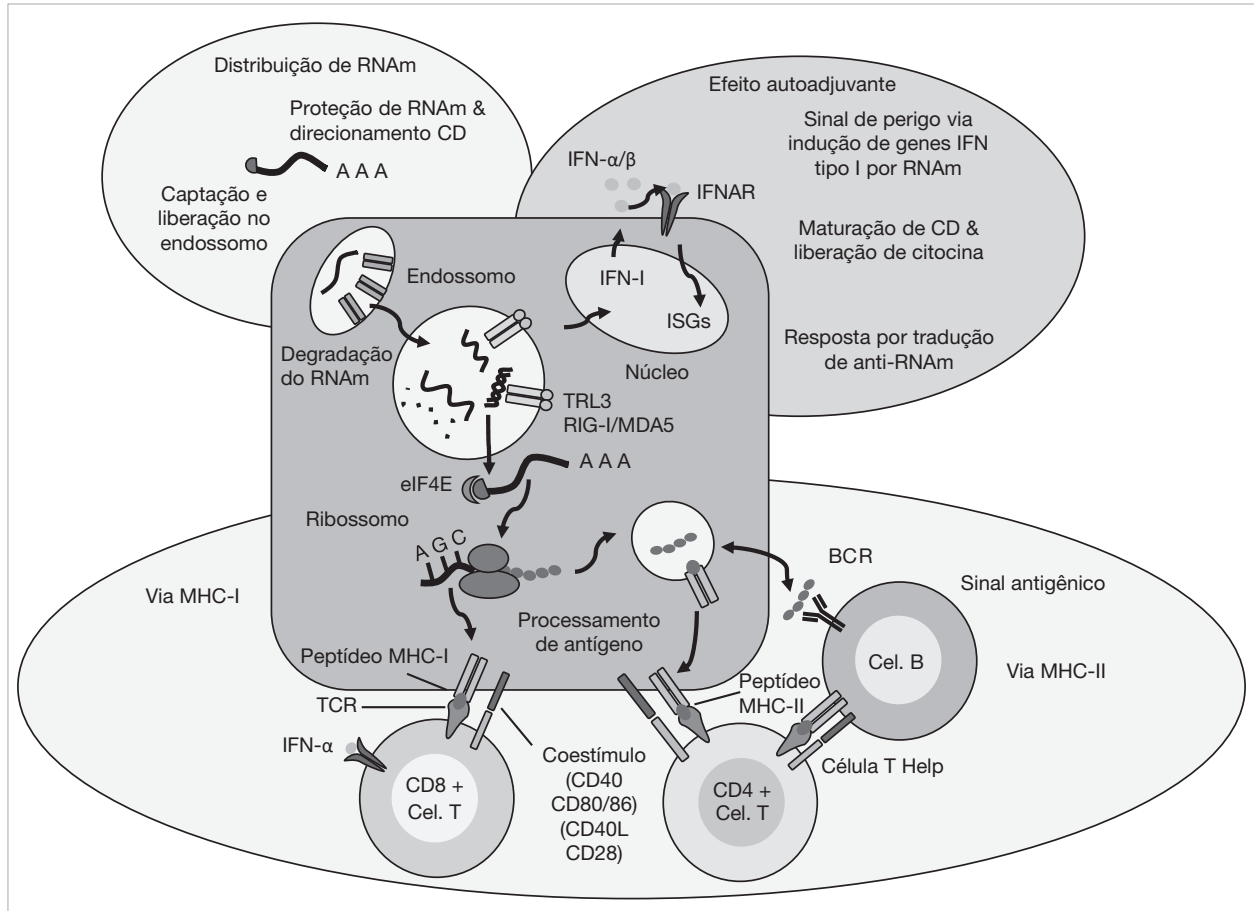


FIGURA 16.3 Modo de ação do mRNA para induzir respostas imunes adaptativas. 1: Entrega de mRNA: o mRNA que codifica o antígeno deve resistir à degradação por RNase e preferencialmente atingir APC (DC). Moléculas de mRNA são captadas por endocitose mediada por receptor e encaminhadas através do compartimento endolisossomal. Apenas uma fração do mRNA escapa dos endossomos, associa-se às proteínas eIF4E e liga-se aos ribossomos, enquanto a maior quantidade de moléculas de mRNA é degradada. 2: Efeito adjuvante: mRNA é reconhecido por vários PRRs, incluindo TLRs endossomais, e sensores de RNA citosólico induzem vias de sinalização que regulam a produção de IFNs tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias. Os IFN tipo I atuam como uma faca de dois gumes: iniciam a transcrição de centenas de genes estimulados por interferon (ISG) envolvidos no processo de maturação de DC e diretamente atuam como um terceiro sinal de citocina para a ativação de células T, mas também promovem enzimas antivirais que aumentam a degradação do mRNA e inibem o processo de tradução do mRNA. 3: Apresentação de antígeno: a expressão de proteínas antigênicas pela maquinaria de tradução do hospedeiro permite o processamento do antígeno e a apresentação de peptídeos antigênicos via intracelular por MHC-I para CTL, ou permite a produção *in situ* de proteínas de antígenos secretadas que podem ser apresentadas através da via MHC-II para células T auxiliares e células B.

Fonte: elaborada com base em Verbeke et al. (2019).

de processamento de antígenos, tanto para as moléculas de MHC de classe I quanto para as moléculas de MHC de classe II (3). A presença no citosol de algumas moléculas de mRNA pode garantir uma extensa apresentação de antígenos aos linfócitos T citotóxicos (CD8+), enquanto as proteínas, no caso de vacinas de subunidade, dependem de vias de apresentação cruzada menos eficientes. Curiosamente, também a via do MHC de classe II pode ser direcionada usando mRNA como fonte de antígeno: isso após a secreção e a reciclagem das proteínas expressas pelo mRNA ou via transporte direto de antígenos do citosol para os lisossomos, por exemplo, promovido pela incorporação de uma sequência de direcionamento lisossomal no construto de mRNA (VAN NUFFEL et al., 2012).

Além disso, é como se esse RNA exógeno mimetizasse uma infecção viral; assim, também é capaz de induzir diversos mecanismos imunológicos importantes para a resposta terapêutica desejada (2), por exemplo, respostas de interferon tipo I através das vias de reconhecimento de ácidos nucleicos pelos receptores TLR-3, 7 e 8, além de RIG-1 e MDA-5. Os IFN tipo I atuam como uma faca de dois gumes: iniciam a transcrição de centenas de genes estimulados por interferon (ISG) envolvidos no processo de maturação de DC e atuam diretamente como um terceiro sinal de citocina para a ativação de células T, exercendo um efeito adjuvante importante à indução das respostas desejadas, mas ao mesmo tempo promovem a transcrição de enzimas antivirais que aumentam a degradação do mRNA e inibem o processo dela de tradução.

O uso do RNA mensageiro na forma de terapia antecedeu sua utilização como vacina preventiva. Isso ocorreu, principalmente, pelas limitações no uso do RNA no início do desenvolvimento da plataforma. O RNA é uma molécula instável, e, portanto, era muito difícil naquela época produzir o RNA de maneira enzimática (IVT, do inglês *in vitro transcription*) em larga escala para ser utilizado em vacinações de massa. Dessa forma, o desenvolvimento da plataforma RNA conforme é conhecida hoje ocorreu, principalmente, pela elaboração de vacinas terapêuticas para o tratamento de tumores, o que tornava a escala necessária à produção muito menor, uma vez que as vacinas terapêuticas para o tratamento de tumores têm aplicação limitada a um pequeno número de pacientes.

Para o tratamento de tumores, o mRNA tem a vantagem de oferecer muita versatilidade no tipo e na variedade de determinantes antigênicos que ele codifica. O mRNA pode codificar proteínas completas, e assim foram desenvolvidas diversas vacinas utilizando antígenos associados aos tumores, chamados de TAA. Os TAA incluem três tipos de antígenos: os antígenos

cancer-testis (CT), cuja expressão é geralmente restrita a células germinativas imunoprivilegiadas (por exemplo, NY-ESO-1, MAGE-A1 e MAGE-A3); os antígenos de diferenciação que geralmente não são expressos em tecido maduro (por exemplo, tirosinase, gp100, MART-1, antígeno específico da próstata [PSA], e fosfatase ácida prostática [PAP]); e, por fim, os antígenos superexpressos (por exemplo, hTERT, MUC-1, HER2 e MSLN) (FAGH-FURI et al., 2021). Essas proteínas tumorais são comuns entre diversos tipos de neoplasias, e sua utilização nas vacinas terapêuticas evita restrições relativas ao haplótipo MHC de um paciente que limitariam as respostas imunológicas à vacina.

Alternativamente, construções em tandem podem ser projetadas para conectar múltiplos epítomos antigênicos, ou seja, pequenos pedaços de proteínas unidos por conectores, dentro de uma única fita de mRNA. Adotando essa estratégia, a empresa BioNTech AG, que hoje conhecemos como a desenvolvedora da vacina Covid-19 comercializada pela Pfizer Comirnaty®, criou vacinas personalizadas contra o câncer baseadas em mRNA. A metodologia para a obtenção dessas vacinas está descrita na Figura 16.4.

A primeira etapa desse tratamento é obter um fragmento do tumor do paciente, a partir do qual serão extraídas as sequências completas de exoma e transcriptoma do tumor. O objetivo é identificar mutações tumorais individuais. Essas mutações são então analisadas para a predição de epítomos imunogênicos por bioinformática. A partir de um conjunto de mutações imunogênicas, desenha-se a sequência do mRNA sob demanda para codificar esses neoepítomos daquele paciente (GUO; LEI; TANG, 2018; SAHIN; TÜRECI, 2018). Um primeiro teste em humanos demonstrou a viabilidade clínica e a segurança dessa abordagem para cânceres de melanoma avançados: todos os pacientes vacinados desenvolveram respostas de células T CD4+ e CD8+ contra os antígenos selecionados, com alguns pacientes apresentando respostas antitumorais objetivas (SAHIN et al., 2017).

Tendo em vista o sucesso dessas abordagens em estudos pré-clínicos e os primeiros resultados promissores obtidos em humanos, diversas empresas vêm investindo em *pipelines* de desenvolvimento dessas vacinas, que têm avançado com sucesso nas fases clínicas, conforme pode ser visto na Tabela 16.2

16.2 SISTEMAS DE ENTREGA

Para obter o efeito desejado utilizando as vacinas e terapias mencionadas, na maioria das vezes, é necessário associar a droga (i.e., mRNA) a sistemas de entrega viáveis, eficientes e inteligentes (DDS – *drug delivery*

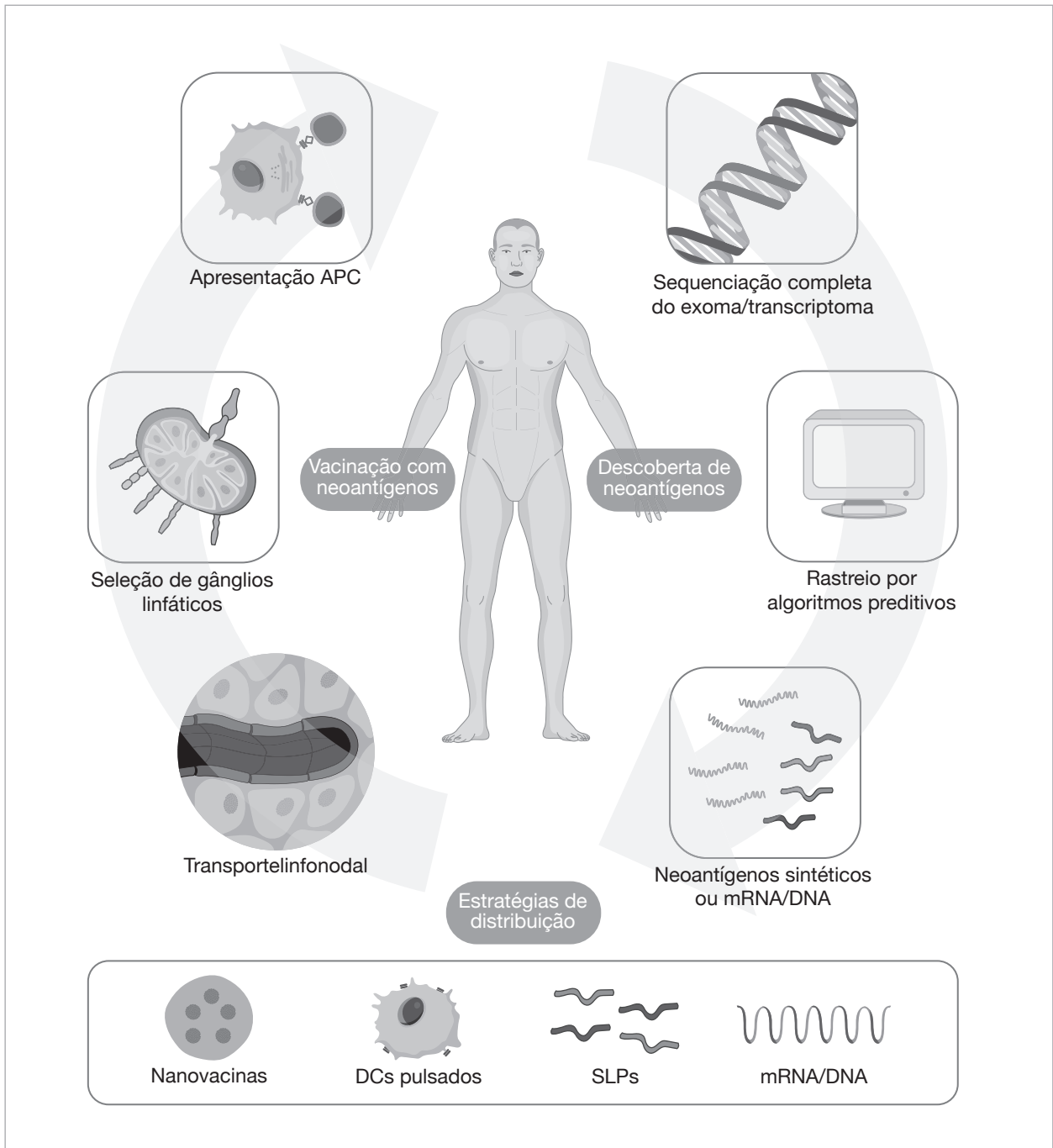


FIGURA 16.4 Ilustração esquemática do processo de descoberta de neoantígenos, fabricação e formulação de vacinas e vacinação em pacientes. O primeiro passo para o desenvolvimento de uma vacina neoantígena contra o câncer envolve a identificação de antígenos específicos de tumores mutados por sequenciamento completo do exoma/transcriptoma e predição de epítopos MHC imunogênicos. Em seguida, as vacinas de neoantígenos (por exemplo, SLP e mRNA) são fabricadas e formuladas para a entrega eficiente a órgãos linfoides secundários (por exemplo, linfonodo), nos quais as vacinas de neoantígenos são capturadas por APCs e apresentadas às células imunes efetoras, incluindo células T CD8+ ou CD4+. Várias estratégias de entrega foram desenvolvidas para ser obtida uma vacina contra o câncer baseada em neoantígenos eficaz e segura.

SLP: peptídeo longo sintético; DC: célula dendrítica; APC: célula apresentadora de antígeno; MHC: complexo principal de histocompatibilidade.

Fonte: traduzida de Guo, Lei e Tang (2018).

TABELA 16.2 Ensaios clínicos de vacinas baseadas em RNA

Druga	Fase	Paciente	Desfecho	ClinicalTrials.gov Identificador
Vacinas baseadas em <i>naked</i> RNA				
mRNA codificador para melanoma TAAs somado aGM-CSF como adjuvante	I/II	MEL maligno	Um aumento na resposta imune humoral antitumoral em alguns pacientes	NCT00204516
<i>Naked</i> mRNA codificador para melanoma TAAs	I	MEL avançado	NR	NCT01684241
<i>Naked</i> mRNA somado a GM-CSF como adjuvante	I/II	Estágio IV RCC	Coorte A (14 pacientes); 6 SD e um PR, 35,7% sobreviveram 4 anos	
TriMix somado a cinco TAAs mRNA	I	MEL	NR	NCT03394937
Plataforma baseada em protamina				
mRNA somado a GM-CSF	I/II	MEL	Células T reguladoras reduzidas um CR	NCT00204607
RNActive® cinco NSCSL TAAs mRNA 400-1600 µg	I/IIa	Estágio IIIB/IV NSCLC	PFS mediana; 0,5 meses (95% CI 1,8-6,3) SO; 10,8 meses (8,1-16,7) As taxas de sobrevida em dois e três anos foram de 26,7% e 20,7%, respectivamente	NCT00923312
RNActive® seis NSCLC-TAAs mRNA somado a radiação local	Ib	NSCLC avançado	SD: 57,7% para lesões-alvo	NCT01915524
RNActive® quatro PC-TAAs mRNA	I/IIa	PC avançado resistente à castração	No subgrupo de 36 pacientes metastáticos; OS média foi de 31,4 meses	NCT00831467
RNActive® seis PC-TAAs mRNA	I/IIb	PC avançado resistente à castração	A SG mediana foi de 35,5 meses [95% CI 28,0-NE] no braço CV9104 vs. 33,7 meses [95% CI 28,7-NE] no braço placebo (taxa de risco [HR] 1,1, 95% CI 0,70-1,76) Sem diferenças significativas nos endpoints rPFS e tempo para progressão dos sintomas	NCT02140138
mRNA-lipoplex nanovacina				
LPX-fomulada com quatro TAAs RNA	I	MEL	NR	NCT02410733
LPX-fomulada com neo-AG RNA, <i>naked</i> mRNA	I	MEL	NR	NCT02035956
LPX-fomulada com neo-AG RNA LPX-fomulada com TAA RNA & neo-Ag RNA	I	TNBC	NR	NCT2316457
NPL-fomulada com mRNA isolado ou em combinação com pembrolizumabe	I	NSCLC, pancreático; colorretal neoplasmas	NR	NCT03948763

MEL: melanoma; PC: câncer de próstata; RCC: câncer de células renais; NSCLC: câncer de pulmão de células não pequenas; PR: resposta parcial; CR: resposta completa; OS, sobrevida global; PFS, sobrevida livre de progressão; ORR, taxa de resposta objetiva; TNBC: câncer de mama triplo negativo; NR: não atingido; TAA: antígeno associado ao tumor; neo-AG: neoantígeno personalizado; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; LPX: lipoplex; NPL: nanopartículas lipídicas.

Fonte: Faghfuri et al. (2021).

system). Entretanto, o desenvolvimento de DDS é um dos maiores desafios na indústria farmacêutica, pois deve-se levar em consideração as propriedades da droga que será carregada para que se possa promover inovações no processo produtivo (LIU et al., 2016).

Os sistemas de entrega mais utilizados para a terapia de ácido nucleico são baseados em nanotecnologia, que é um campo científico multidisciplinar, que investiga novas propriedades que se manifestam em escala nanométrica para a manipulação e a construção de novas estruturas. Essa tecnologia abre oportunidades para a ciência, ao permitir a criação de materiais inéditos e inviáveis de serem produzidos sem ela (ABDI, 2023; ALENCAR et al., 2017). Na medicina, a nanotecnologia tem sido investigada como uma forma de melhorar as propriedades dos medicamentos, como sua solubilidade ou sua estabilidade. Além disso, oferece novas abordagens terapêuticas por meio do desenvolvimento de medicamentos capazes de proporcionar formas de direcionar e entregar os fármacos ao organismo com maior precisão, segurança e eficácia, bem como o estabelecimento de estratégias promissoras para o diagnóstico, prognóstico e regeneração de células e tecido (SCHAFFAZICK et al., 2003; THORLEY; TETLEY, 2013). A utilização de sistemas de entrega de drogas encapsuladas em nanopartículas biocompatíveis tem sido considerada uma solução eficaz para o tratamento de diversas doenças, principalmente doenças crônicas e neoplasias (VENTOLA, 2012).

Em relação ao desenvolvimento de vacinas, já se sabe que cada vez mais são exigidos sistemas inovadores que permitam ultrapassar as diversas limitações que as abordagens atuais apresentam. Por exemplo, quando se trata de vacinas de subunidades, à medida que são aprimorados os quesitos de segurança, é melhorada a especificidade e reduzida a toxicidade celular, é sabido que grande parte de sua capacidade imunogênica fica prejudicada (DELANY; RAPPUOLI; DE GREGORIO, 2014). Para suplantarmos essa limitação, é necessário o desenvolvimento de nanopartículas para o encapsulamento de antígenos (proteínas, DNA, RNA e polissacarídeos) com capacidade adjuvante a fim de reduzir a quantidade de antígenos e o número de doses necessários. Uma das abordagens possíveis para driblar a diminuição da imunogenicidade é mimetizar a estrutura do agente infeccioso em uma estrutura tridimensional que mantenha a densidade do antígeno e sua distribuição superficial a mais próxima possível do original (BACHMANN; JENNINGS, 2010).

Sendo assim, as nanopartículas têm emergido como uma ferramenta de primeira linha para o desenvolvimento de vacinas preventivas e terapêuticas, uma vez que podem entregar os antígenos efetivamente ou mimetizar os padrões de densidade e disposição antigênica

do organismo agressor, proporcionando o cenário ideal para a apresentação do antígeno e a manifestação da resposta protetora (LÓPEZ-SAGASETA et al., 2016; YANG et al., 2016). Outra aplicação muito interessante para a nanotecnologia é a identificação de estruturas para o encapsulamento que permitam explorar outras vias de administração, por exemplo, oral e nasal.

Os avanços na nanotecnologia têm levado ao desenvolvimento de novos nanomateriais cujas propriedades físico-químicas diferem de seus homólogos maiores. Essa diferenciação ocorre por sua maior relação superfície/volume, tornando-os excelentes candidatos para aplicações biomédicas (BOULAIZ et al., 2011).

Os sistemas nanocarreadores não virais, as nanopartículas (NP), são dispersões sólidas ou líquidas, com tamanho inferior a 1 μm , e podem consistir de diferentes materiais biodegradáveis, como polímeros naturais ou sintéticos (poliméricas), lipídios ou fosfolipídios (lipossomas ou nanopartículas lipídicas) e metais (BHATIA, 2016; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Idealmente, as nanopartículas devem ser estáveis na circulação para proteger e entregar sua carga terapêutica (medicamento) no tecido destinatário; ter boa penetração e retenção no tecido-alvo de modo que a liberação do medicamento ocorra dentro da janela terapêutica; e, em última análise, ser organicamente excretadas para evitar toxicidade de acumulação ao longo prazo (TILLI et al., 2016).

As propriedades especiais das nanopartículas derivam de suas elevadas proporções entre área superficial e volume, resultando em uma alta reatividade e estabilidade à degradação. Os nanocarreadores podem ser usados (i) como transportadores de fármacos e biológicos para a entrega dessas moléculas diretamente nas células-alvo, (ii) para proteger essas moléculas de serem degradadas no hospedeiro humano ou animal antes que elas atinjam seus alvos, (iii) para melhorar a absorção dessas moléculas, (iv) para permitir o melhor controle da farmacocinética dos fármacos e biológicos internalizados, e (v) para impedir a interação dos fármacos e biológicos com as células saudáveis, evitando, assim, efeitos colaterais negativos (DAVIS et al., 2010).

A tecnologia dos nanocarreadores tem avançado bastante, sendo possível superar a falta de especificidade de alvos que limitava a utilização sistêmica das nanopartículas por meio da geração de nanopartículas funcionalizadas (YAO et al., 2016). A funcionalização da superfície das nanopartículas ocorre através da fixação de um ligante que tenha interação com receptores específicos de determinado tecido para otimizar a administração do alvo, transportando-o até o sítio de ligação de maneira seletiva (GUARAGNA et al., 2012), tornando os medicamentos mais tóxicos e eficientes

contra o alvo específico com menor risco de danos colaterais a outros tecidos do corpo. No caso do câncer, os fármacos poderiam ser direcionados aos tumores, evitando os efeitos colaterais sistêmicos das terapias tradicionais (DALMORO et al., 2012; KARA; CALIN; OZPOLAT, 2022).

Dentro do universo das nanopartículas voltadas para RNA como terapêutico ou vacinas, se destacam os lipossomas ou NPL. Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas; as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas, inseridas ou adsorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos, são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (LI et al., 2022b; NEW, 1990).

As NPL têm sido amplamente utilizadas como sistemas de entrega para vacinas de mRNA, e estas promovem a complexação dos lipídios carregados positivamente com os ácidos nucleicos. Assim sendo, estabilizam e aumentam sua resistência à degradação por nuclease, permitindo que as vacinas sejam entregues às células-alvo desejadas. NPL, normalmente, consistem em quatro componentes: lipídios ionizáveis, fosfolipídios, colesterol e lipídios PEGuilados, entre os quais o lipídio ionizável desempenha um papel importante na proteção de RNA e facilita seu transporte citosólico (TENCHOV et al., 2021).

Outro componente importante usado como revestimento da superfície das nanopartículas lipídicas ou lipossomas são os polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os PEG (HALD ALBERTSEN et al., 2022; TORCHILIN, 2005). A camada hidrofílica superficial desses polímeros aumenta o tempo de circulação das nanopartículas, prevenindo o reconhecimento e a consequente associação com as opsoninas no plasma – desse modo, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente as células de Kupffer no fígado (NEEDHAM; MCINTOSH; LASIC, 1992).

Por sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, lipossomas ou NPL se tornaram potentes carreadores para vários tipos de terapias. Assim, possibilitam o aumento de sua eficácia e reduzem os efeitos tóxicos dos fármacos. Diversos trabalhos de desenvolvimento de formulações com objetivo terapêutico para várias doenças relatam a eficácia e a segurança dos tratamentos realizados com formulações lipídicas, constatando uma grande vantagem em relação aos tratamentos convencionais. Atualmente, são comercia-

lizadas formulações contendo lipossomas ou NPL para o tratamento do câncer, infecções sistêmicas por fungos e vacinas para Covid-19 (BATISTA; CARVALHO; MARGALHÃES, 2007; FDA, 2023; GUEVARA; PERSANO; PERSANO, 2020; LI et al., 2021).

Essas nanopartículas são consideradas a melhor abordagem para as moléculas de RNA, por conta de: (i) quantidade de informações sobre desenvolvimento da metodologia disponíveis na literatura; (ii) maior facilidade de aquisição de insumos; (iii) favorecimento da ligação e entrada do lipossoma e NPL na membrana celular; e (iv) as propriedades de ligação dos lipídeos catiônicos ou ionizáveis ao RNA (TENCHOV et al., 2021).

16.3 TERAPIAS BASEADAS EM RNAi

Os últimos anos testemunharam um crescimento expressivo na terapêutica de RNA. A descoberta dos RNA interferentes pequenos – ou pequenos RNA de interferência (siRNA) – como fármacos é considerada um dos mais importantes avanços no desenvolvimento farmacêutico, em parte porque essa molécula pode ser usada para diferentes alvos, ou seja, em qualquer área terapêutica. Sem dúvidas, a versatilidade é a principal vantagem dessa tecnologia, principalmente porque permite seu uso em alvos de doenças para as quais não há medicamentos disponíveis, e porque pode ser adotada para doenças de difícil tratamento, como: câncer, doenças metabólicas, autoimunes e raras (DE BRITO E CUNHA et al., 2022).

O RNA de interferência (RNAi) foi visto pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* em 1998 por Fire e colegas (FIRE et al., 1998). O mecanismo de silenciamento por RNA de interferência é natural de silenciamento de expressão de genes pós-transcrição. É um processo celular evolutivamente conservado que é desencadeado por RNA de dupla fita (dsRNA) e resulta em silenciamento da expressão de genes-alvo (mRNA) contendo uma sequência complementar e inibindo a produção de proteínas (BOCHICCHIO et al., 2015; NEUMEIER; MEISTER, 2021).

Em 2001, Elbashir et al. (2001) demonstraram que os RNA exógenos de 21 nucleotídeos em linhagens celulares de mamíferos podiam silenciar a expressão gênica, indicando a existência de um mecanismo semelhante em células de mamíferos RNAi. Sendo assim, o RNAi emergiu como uma nova ferramenta e permitiu aos pesquisadores que investigassem a função dos genes por meio da introdução de dsRNA curtos exogenamente nas células para silenciar alvos específicos. Após a descoberta, foi verificado que os RNAi tinham um potencial terapêutico enorme, principalmente para o tratamento de tumores em razão da habilidade

de silenciamento da expressão gênica pela degradação de mRNA complementar, bloqueando a tradução do mRNA (SLEDZ; WILLIAMS, 2005). Existem dois tipos de pequenas moléculas de RNA usadas na terapêutica: RNA de silenciamento ou RNA interferente pequeno (siRNA) e microRNA (miRNA).

Os miRNA são pequenos RNA não codificantes que existem endogenamente ao longo do genoma, no qual as regiões de complementaridade conduzem à formação de um *hairpin* de RNA imperfeito. Ao ser processado pela maquinaria de RNAi, o resultado é um duplex de RNA de 19-25 nucleotídeos que inclui regiões de incompatibilidade. Os miRNA de ocorrência endógena muitas vezes ligam a região 3' não traduzida (3' UTR) de mRNA e previnem sua tradução em proteína. Como apenas alguns nucleotídeos do miRNA são complementares ao mRNA-alvo para suprimir sua tradução, os miRNA podem ter muitos alvos na célula – diferentemente dos siRNA, que requerem complementaridade de sequência quase completa para induzir a clivagem do RNA-alvo.

O mecanismo da repressão de genes por miRNA depende do grau de complementaridade a um alvo de RNA; complementaridade incompleta resulta na supressão de tradução, enquanto a complementaridade completa resulta na clivagem do mRNA alvo (GERMAIN; CHUNG; SARMIERE, 2023; JONAS; IZAURRALDE, 2015; YEKTA; SHIH; BARTEL, 2004). Os siRNA são moléculas dupla fita que possuem cerca de 21 a 23 nucleotídeos de comprimento, com aproximadamente 7-8 nm de comprimento e 2 a 3 nm de diâmetro. As moléculas de siRNA são pequenas em tamanho (moléculas peso ~13 kDa), hidrofílicas e carregadas negativamente. Os RNA de interferência terapêuticos têm grande semelhança com os miRNA; eles possuem a função de degradar um mRNA específico para impedir que ele seja traduzido em proteína (CAILLAUD; EL MADANI; MASSAAD-MASSADE, 2020; CHEN ET AL., 2018; TOMARI; ZAMORE, 2005).

O mecanismo de interferência de RNA inicia no núcleo com RNA polimerase que transcreve uma sequência de DNA pequena, que gera um microRNA primário. Após clivagem, eles são exportados para o citoplasma. No citoplasma, os pré-miRNA ou dsRNA ou shRNA (*short hairpin RNA*), que são precursores de RNA, são reconhecidos por DICER e clivados, permitindo a maturação para a forma final miRNA ou siRNA. Tanto miRNA quanto siRNA recrutam a proteína argonauta (Ago) e os componentes do complexo de indutores de silenciamento de RNA (RISC), que tornam miRNA e siRNA fita simples. O RISC ativado usa a fita guia do siRNA como molde para reconhecer e degradar a sequência de mRNA. Dessa forma, siRNA podem ser sintetizados e entregues na célula através de sistemas

de entrega utilizando o mecanismo natural de RNAi; essa abordagem é chamada de via exógena. As moléculas devem ser liberadas no interior das células-alvo e incorporadas dentro da maquinaria do RNAi, ou seja, entregues na célula para que RISC possa reconhecer e degradar sequências de mRNA-alvos. Essa estratégia tem sido realizada com sucesso para o silenciamento de vários genes-alvo (DE BRITO E CUNHA et al., 2022; NOVINA; SHARP, 2004) (Figura 16.5).

O potencial terapêutico desse método é amplo. Existem terapias baseadas em RNAi em desenvolvimento com diferentes sistemas de entrega e abrangendo uma ampla gama de diferentes patologias, incluindo doenças metabólicas, hematologia, doenças infecciosas, oncologia, doenças oculares, entre outras (FRIEDRICH; AIGNER, 2022; MORRISSEY et al., 2005; OKUMURA; PITHA; HARTY, 2008; SHEN; SUN; FERRARI, 2012). Entretanto, as moléculas de siRNA são muito grandes, hidrofílicas e negativamente carregadas. Em condições normais, a membrana celular representa uma barreira impermeável e polar para macromoléculas. A dificuldade da difusão do siRNA pela membrana também ocorre pela desprotonação dos grupos fosfato do RNA em pH fisiológico. Além disso, a meia-vida de ácidos nucleicos na corrente sanguínea é pequena por conta da degradação por endo ou exonucleases e pela rápida remoção desses pelos rins (DINIS ANO BOM et al., 2019).

Uma estratégia para solucionar essa dificuldade é o desenvolvimento de um vetor para entrega ou inclusão de uma modificação química a fim de auxiliar a captação pelas células-alvo. Quando administradas sistematicamente, as moléculas de siRNA encontram muitas barreiras adicionais para alcançar o sítio de ação, e os sistemas de entrega devem ser projetados para: (i) providenciar estabilidade contra nucleases do soro (evitar a degradação enzimática de siRNAs pelo soro); (ii) proporcionar evasão do sistema imune; (iii) evitar interações não específicas com proteínas do soro (sequestro de proteínas plasmáticas) e células normais; (iv) oferecer prevenção de excreção renal; (v) fornecer saída dos vasos sanguíneos para alcançar tecidos-alvo; (vi) ajudar a entrada na célula (diminuir a impermeabilidade de membranas biológicas para siRNA); e; (vii) orientar a incorporação na maquinaria do RNAi (ALEXIS et al., 2008; KANASTY et al., 2012; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

As modificações químicas do RNA que são propostas por alguns autores e empresas como estratégia para otimizar a eficiência do siRNA e inibir possíveis efeitos colaterais são alterações no esqueleto fosfato, riboses ou bases (HU et al., 2020). Foi sugerido que a modificação do esqueleto de fosfato de siRNA o torna mais potente e confere uma meia-vida mais longa ao

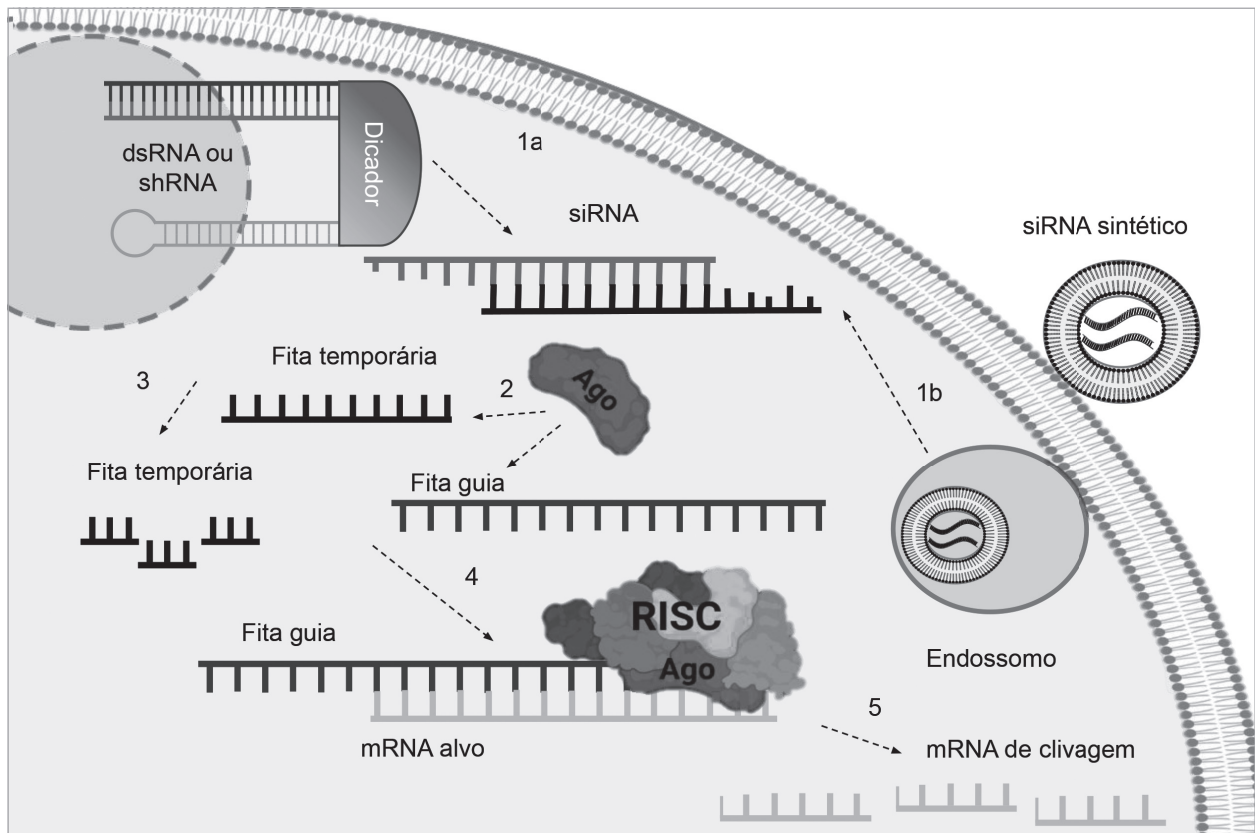


FIGURA 16.5 Mecanismo de silenciamento de genes através de siRNA em células eucarióticas por diferentes vias. Mecanismo de silenciamento de genes através de siRNA em células eucarióticas por diferentes vias: Através da via endógena, os precursores longos, ou seja, dsRNA ou shRNA, são clivados pela enzima DICER em siRNA maduro (1a). Pela via exógena, o siRNA sintético entrará em uma vesícula através do endossomo e será liberado no citoplasma (1b). A separação das fitas é feita pela proteína AGO (2), na qual a “passenger strand” será clivada, (3) e a fita guia será selecionada pelo complexo RISC a fim de seguir como modelo para alinhamento com o mRNA (4). Em seguida, ocorre a clivagem, silenciando assim o gene-alvo (5).

Fonte: traduzida de Brito e Cunha et al. (2022).

duplex. A modificação da ribose aumenta a meia-vida no soro, reduzindo a ativação imunológica, e oferece maior resistência às nucleases. Da mesma forma, a modificação da base também aumenta a resistência às nucleases séricas (SAJID et al., 2020). Outra estratégia tem sido o uso de polissacarídeos, como a quitosana. No entanto, a maioria dos estudos realizados utilizam variados tipos de carreadores para siRNA (GULINO, 2012; GUO; HUANG, 2012; MIYATA; NISHIYAMA; KATAOKA, 2012; WANG et al., 2014), dentre os mais estudados estão os lipossomas e NPLs.

Esforços expressivos têm sido feitos para trazer siRNA terapêuticos ao mercado. Após duas décadas da descoberta do mecanismo de RNAi, os primeiros medicamentos de siRNA receberam aprovação para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA, Agência Regulatória dos EUA) e pela European Medicines

Agency (EMA, Agência Europeia de Medicamentos). O primeiro siRNA terapêutico que foi aprovado pelo FDA para uso como um biofarmacêutico foi a patisirana (Onpattro™). O medicamento da empresa Alnylam Pharmaceuticals foi aprovado, em 2018, para o tratamento de amiloidose por transtirretina (ATTR). Esse medicamento é composto por um siRNA que afeta a degradação da transtirretina mutante e do tipo selvagem, efetivamente reduzindo a neuropatia e interrompendo a progressão da doença em pacientes ATTRh (ADAMS et al., 2018). Patisirana é entregue ao fígado por encapsulamento em nanopartículas lipídicas. Seguindo o sucesso de patisirana, muitas terapias adicionais de siRNA foram posteriormente aprovadas ou estão em estágios avançados de desenvolvimento.

Em 2019, o segundo medicamento, siRNA Givlaari® (givosirana), desenvolvido pela Alnylam Pharmaceuticals

foi aprovado pelo FDA. Givosirana é um medicamento baseado em siRNA direcionado para o ácido aminolevulínico sintase 1 (ALAS1) ao tratamento de adultos com porfiria hepática aguda (AHP) e, em 2020, ele foi aprovado pela EMA também para adultos e adolescentes com idade igual ou superior a 12 anos. A AHP é definida pela superexpressão do ALAS1 hepático, que resulta no acúmulo dos intermediários heme, ácido d-aminolevulínico (d-ALA) e porfobilinogênio (PBG), levando a danos no sistema nervoso e ataques de porfiria aguda. Givosirana é baseada em uma conjugação de siRNA com N-acetilgalactosamina (GalNAc), resultando em um direcionamento para hepatócitos. Esse conjugado siRNA-ligante liga-se especificamente aos receptores da asialoglicoproteína nos hepatócitos e fornece entrega direcionada e endocitose. Dessa forma, ocorre a redução do mRNA ALAS1 hepático induzido para os níveis normais (Figura 16.1). Isso conduz à redução dos níveis circulantes de metabólitos intermediários neurotóxicos, tanto o ALA quanto o PBG, os principais fatores que provocam ataques e outras manifestações das porfirias agudas hereditárias (DE PAULA BRANDÃO; TITZE-DE-ALMEIDA; TITZE-DE-ALMEIDA, 2020; KARA; CALIN; OZPOLAT, 2022, 2022; SCOTT, 2020; SYED, 2021).

Em 2020, a FDA aprovou Oxlumio® (lumasirana), desenvolvido pela Alnylam Pharmaceuticals, como o primeiro tratamento para hiperoxalúria primário tipo 1 (PH1). PH1 é o tipo mais frequente e grave de hiperoxalúria primária. No distúrbio PH1, a falta da enzima hepática alaninoglicoxilato aminotransferase (AGT) impede o metabolismo de glicoxilato em glicina, levando à produção excessiva de oxalato tóxico. Pacientes que sofrem de PH1 podem ter insuficiência renal e eventualmente danos em múltiplos órgãos. Lumasirana é um siRNA terapêutico que suprime o hidroxíácido gene da oxidase 1 (HAO1) que codifica a glicolato oxidase. Com atividade reduzida da enzima glicolato oxidase, o substrato que catalisa a produção de oxalato tóxico também diminui (GARRELFs et al., 2021; KARA; CALIN; OZPOLAT, 2022).

Inclisirana (Leqvio®; Novartis) é outro conjugado GalNAc-siRNA desenvolvido ao tratamento de homocigotos para hipercolesterolemia familiar e elevados níveis de lipoproteínas de baixa densidade carreadoras de colesterol (LDL-C). O tratamento da hipercolesterolemia é uma indicação muito prevalente; seu impacto pode exceder outros terapêuticos de siRNA, especialmente considerando a crescente necessidade de novas opções de tratamento para essa doença, além das estatinas. O medicamento tem como alvo PCSK9 (pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9), uma enzima-chave na via metabólica do LDL-C. Na Europa, Leqvio®

recebeu aprovação no final de 2020 e o FDA o aprovou em 2021 (FRIEDRICH; AIGNER, 2022; WARDEN; DUELL, 2021).

Vutrisirana, desenvolvido pela Alnylam Pharmaceuticals, recebeu a aprovação da FDA em junho de 2022. É um medicamento baseado em siRNA que tem como alvo TTR para tratar a mesma doença que a patisirana. No entanto, a droga é baseada em uma modificação química, sendo a terceira geração de plataforma de entrega da Alnylam Pharmaceuticals (CHAKRABORTY et al., 2017; FRIEDRICH; AIGNER, 2022; KEAM, 2022).

Dois áreas são consideradas como promissoras para o uso de terapias baseadas em siRNA: doenças neurológicas e câncer. Em relação aos distúrbios neurológicos, a princípio os sistemas de entrega estão sendo direcionados para o fígado, mas recentemente podemos observar abordagens de siRNA para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso (SNC), incluindo doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (DP) e ataxias espinocerebelares (AFONSO-REIS; AFONSO; NÓBREGA, 2021; BROWN et al., 2022; HIRUNAGI et al., 2021; LI et al., 2020; XIA et al., 2004).

Recentemente, uma empresa também está buscando estratégias híbridas que se baseiam nas três formas principais de terapia de RNA. Apic Bio em Cambridge, Massachusetts, adota uma abordagem que chama de silenciar e substituir, que usa um componente de RNAi para silenciar um gene prejudicial e um componente de mRNA que codifica uma versão normal da proteína mutada correspondente. Ambos são entregues por um único vetor viral. A empresa está fazendo um trabalho pré-clínico em drogas híbridas voltadas para a deficiência de $\alpha 1$ -antitripsina, uma doença pulmonar e hepática hereditária e esclerose lateral amiotrófica hereditária, uma condição neurológica degenerativa (APICBIO, 2023; DEWEERDT, 2019).

16.4 TERAPIAS BASEADAS EM APTÂMEROS

Nos últimos 25 anos, aptâmeros e a tecnologia SELEX (evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial) receberam grande atenção por seu potencial terapêutico e diagnóstico. Aptâmeros são moléculas de ácido nucleico de fita simples consistindo em DNA ou RNA de cerca de 20 a 80 bases, com pesos moleculares de 6 a 30 kDa, que adotam várias conformações tridimensionais e que se ligam a moléculas orgânicas ou não orgânicas, de átomos simples, a uma ampla variedade de proteínas, bem como a alvos mais complexos, como células inteiras, vírus ou bactérias. Os aptâmeros são caracterizados por alta especificidade para moléculas-alvo e alta afinidade de ligação, inerente à forma como são selecionados.

A técnica SELEX foi inventada independentemente em 1990 por duas equipes, Ellington e Szostak e Tuerk e Gold, e permaneceu dominante desde a descoberta dos aptâmeros, embora tenha sido submetida a muitas variações em seus protocolos originais (ELLINGTON; SZOSTAK, 1990; TUERK; GOLD, 1990), continua sendo o padrão-ouro para o desenvolvimento de aptâmeros específicos. O processo inclui várias rodadas de amplificação e enriquecimento que permitem a evolução de aptâmeros com alta afinidade, específicos para determinado alvo, a partir de um conjunto de oligonucleotídeos aleatórios. Normalmente, seleções negativas (contraseleções) são adicionadas à metodologia e permitem a eliminação de sequências inespecíficas que também se ligam a alvos semelhantes ou relacionados.

Semelhante ao reconhecimento conformacional que medeia o reconhecimento anticorpo-antígeno e a formação de complexos, os aptâmeros se ligam a seus alvos cognatos com alta especificidade e afinidade por meio de vários tipos de interação, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e ligações entre as bases complementares. Assim, os aptâmeros também são referidos como “anticorpos químicos” e são usados funcionalmente como antagonistas, agonistas ou ligantes-alvo e aplicados em uma variedade de ensaios bioanalíticos e biomédicos, bem como em aplicações terapêuticas (GOPINATH, 2007; MAIRAL et al., 2008).

Os aptâmeros são excelentes alternativas aos anticorpos monoclonais, que possuem altos custos de produção e importantes limitações como instabilidade em variações de temperatura ou baixa secreção pelo clone obtido. Portanto, torna-se evidente que a afinidade e a especificidade dessas moléculas as posicionam como uma tecnologia importante, não apenas para fins diagnósticos e terapêuticos, mas também para aplicações bioanalíticas (MAIRAL et al., 2008; MODH et al., 2016; PINTO et al., 2009; ZICHEL et al., 2012). Além disso, os aptâmeros são moléculas sintéticas e possuem tamanho reduzido e características de ácidos nucleicos, como estabilidade térmica, e são obtidos por síntese química, que elimina variação entre lotes, melhorando sua aplicabilidade e sua adequação para industrialização. Além disso, as modificações químicas podem ser facilmente implementadas em larga escala.

Os aptâmeros também têm aplicabilidade clínica potencialmente superior a anticorpos em vários aspectos: (i) são praticamente não imunogênicos e não tóxicos *in vivo*; (ii) por conta de seu tamanho menor, possuem penetração tecidual superior, aumentando seu índice terapêutico; (iii) podem ser desenvolvidos contra uma gama aparentemente ilimitada de alvos. Assim, existem vários estudos mostrando que essas

moléculas foram desenvolvidas contra pequenos íons inorgânicos, drogas, peptídeos, proteínas e células ou tecidos complexos, demonstrando o amplo escopo de aplicações dos aptâmeros (SONG; LEE; BAN, 2012).

Aptâmeros sofrem naturalmente digestão por nucleases. A fim de resolver esse problema, diferentes modificações são, com frequência, empregadas para estabilizar os aptâmeros, incluindo a criação de *Spiegelmers* ou uso de modificações químicas na estrutura dos oligonucleotídeos ou na posição 2' das pirimidinas. Alternativas incluem o uso de bibliotecas de DNA modificadas com fosforotioato ou modificação da posição 2 de nucleotídeos de pirimidina com grupos amino/flúor, ou uso de timidinas invertidas no 3' e 5'. Os *Spiegelmers* são uma rota alternativa para a produção de aptâmeros resistentes a nucleases, porque são oligonucleotídeos sintéticos de RNA ou DNA de imagem espelhada baseados na forma enantiomérica, não natural, dos açúcares ribose e desoxirribose. Eles podem se ligar especificamente a um alvo, mas não são reconhecidos por ribonucleases, apresentando, assim, alta estabilidade biológica.

Os aptâmeros fizeram grandes progressos nos últimos 25 anos, tanto em terapia quanto em diagnóstico, seja laboratorial ou diagnóstico por imagem, isolados ou acoplados a uma variedade de agentes. Como pequenas moléculas oligonucleotídicas – RNA ou DNA – específicas para qualquer tipo de alvo de interesse, com alta afinidade e seletividade, estáveis à temperatura ambiente, flexíveis e adaptáveis a diversas situações e modificações químicas, os aptâmeros são agentes de entrega ideais, conferindo especificidade e seletividade para sua molécula correspondente. Além disso, dependendo da escolha do alvo dos aptâmeros, eles podem entrar nas células especificamente por meio de endocitose mediada por células, resolvendo problemas potenciais de outros oligonucleotídeos terapêuticos, como siRNA, shRNA e miRNA.

Semelhante aos anticorpos conjugados a drogas (ADC) descritos no Capítulo 10, os aptâmeros podem ser acoplados a um agente quimioterápico, conferindo especificidade para a célula cancerígena que expressa determinado marcador tumoral e proíbe a entrada do quimioterápico em todo e qualquer tipo de célula, aumentando, assim, sua eficácia e reduzindo seus efeitos colaterais. Também podem ser acoplados a um agente de imagem, como um radiofármaco, orientando-o especificamente para o tipo de tecido desejado, reduzindo a dose de radiação necessária e aumentando a eficiência e a definição da imagem e, finalmente, oferecendo uma rápida eliminação do sistema.

Outra aplicação relevante de aptâmeros são em uso com nanopartículas, pois têm a capacidade de guiar a nanopartícula e são um excelente agente de funcional-

zação para vários tipos de nanopartículas. Seu tamanho, sendo consideravelmente menor que o de um anticorpo, não aumenta o tamanho da nanopartícula de modo considerável, enquanto sua eficiência de acoplamento e variedade de modificações químicas o tornam um agente de entrega ideal.

Assim, de acordo com análises de mercado, os aptâmeros representam um nicho emergente, em aplicações específicas no setor médico-científico. Os aptâmeros estão prontos para crescer rapidamente em várias áreas de aplicação, incluindo terapia e diagnóstico. Com a aprovação do Macugen® (pegaptanibe) pela FDA em 2004, e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em 2012 no Brasil, esse mercado recebeu um novo impulso. Há uma lista de 53 aptâmeros promissores no *pipeline* de ensaios clínicos no momento, tanto para diagnóstico quanto para terapia, o que demonstra que essas moléculas estão prontas para ver um rápido crescimento nos próximos 10 ou 15 anos.

Em câncer, além da cirurgia, as principais modalidades terapêuticas continuam sendo a quimioterapia, a radioterapia e a bioterapia. Os aptâmeros, como uma nova modalidade que está chegando ao mercado, entraram com sucesso em todas as três modalidades mencionadas. Os aptâmeros contribuíram obviamente na bioterapia, com vários aptâmeros em ensaios clínicos no momento e outros em estágios de desenvolvimento. Aptâmeros como o AS1411 contra nucleolina, por exemplo, chegaram à fase II de ensaios clínicos para diferentes indicações de câncer, como inibidores diretos de uma proteína associada a essa doença. No entanto, na maioria dos casos, os aptâmeros selecionados encontraram sua melhor aplicação como agentes de entrega de outras modalidades terapêuticas, sendo assim capazes de melhorar os tratamentos atuais de radioterapia, bioterapia ou quimioterapia, aliviando efeitos colaterais, melhorando a especificidade e reduzindo a dose, o que torna, assim, esses tratamentos mais eficientes.

Os aptâmeros podem ser acoplados com outras moléculas, por exemplo, com uma molécula de siRNA. O aptâmero de RNA pode ser simplesmente estendido para incorporar a parte da molécula de siRNA, como na Figura 16.6. Além disso, pode ser utilizada uma sequência de ligante (*linker*) para conectar o aptâmero ao siRNA (Figura 16.6). Finalmente, estruturas mais complexas têm sido exploradas, como no uso de estreptavidina com aptâmeros biotinilados. Isso oferece a vantagem de uma molécula tetramérica que pode conter dois aptâmeros e duas moléculas de siRNA diferentes ou idênticas, proporcionando, assim, o benefício de atingir dois alvos ao mesmo tempo (Figura 16.7) (CHU et al., 2006).

O uso de duas moléculas de siRNA diferentes, por sua vez, foi empregado com sucesso por Subramanian et al. (2015) em abordagens de tratamento de câncer de mama. Uma abordagem adicional para ligar aptâmeros com entrega de siRNA é com o uso de nanopartículas. Nesse caso, o siRNA pode ser protegido dentro da nanopartícula, enquanto o aptâmero pode atuar como um agente de funcionalização que conduz e liga especificamente a nanopartícula à célula cancerígena (NAMGUNG; KIM, 2012) (Figura 16.8).

As abordagens que exploram o uso terapêutico de drogas baseadas em siRNA e miRNA acopladas a aptâmeros foram amplamente abordadas nos últimos quinze anos, usando várias metodologias e contra vários alvos de interesse (tanto de aptâmeros quanto de RNA). Assim, Afonin et al. (2014) desenhou nanopartículas multifuncionais de siRNA para HIV-1 (AFONIN et al., 2014). A fim de mostrar a viabilidade da entrega de siRNA usando nanoanéis, Li et al. (2009) desenvolveram uma construção de nanoanéis funcionalizada com aptâmeros de RNA específicos para o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR) (LI et al., 2009). Zhao et al. (2011) desenvolveram uma nanopartícula para tratar o linfoma anaplásico de grandes células (ALCL) e aptâmeros CD30 (ZHAO et al., 2011). Powell

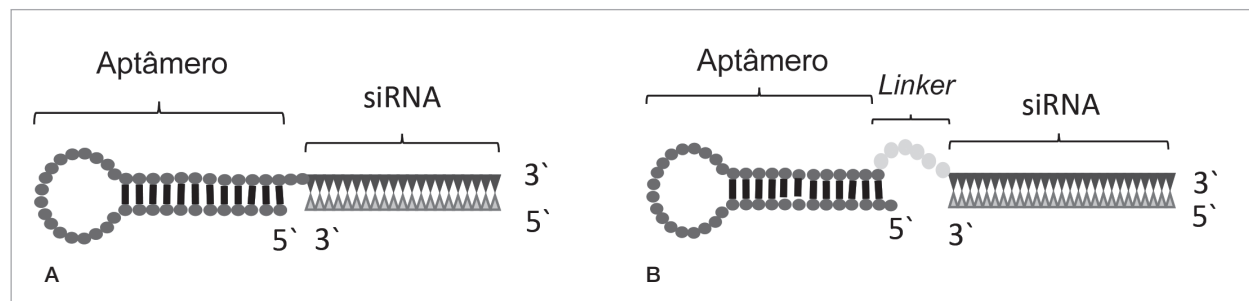


FIGURA 16.6 Esquema de duas abordagens diferentes de acoplamento aptâmero siRNA. A: A fita *sense* do aptâmero e do siRNA são cotransscritas e, em seguida, o *antisense* do siRNA complementar é anelado. B: Aptâmero e siRNA são conectados por um *linker*.

Fonte: adaptada de Almeida et al. (2017).

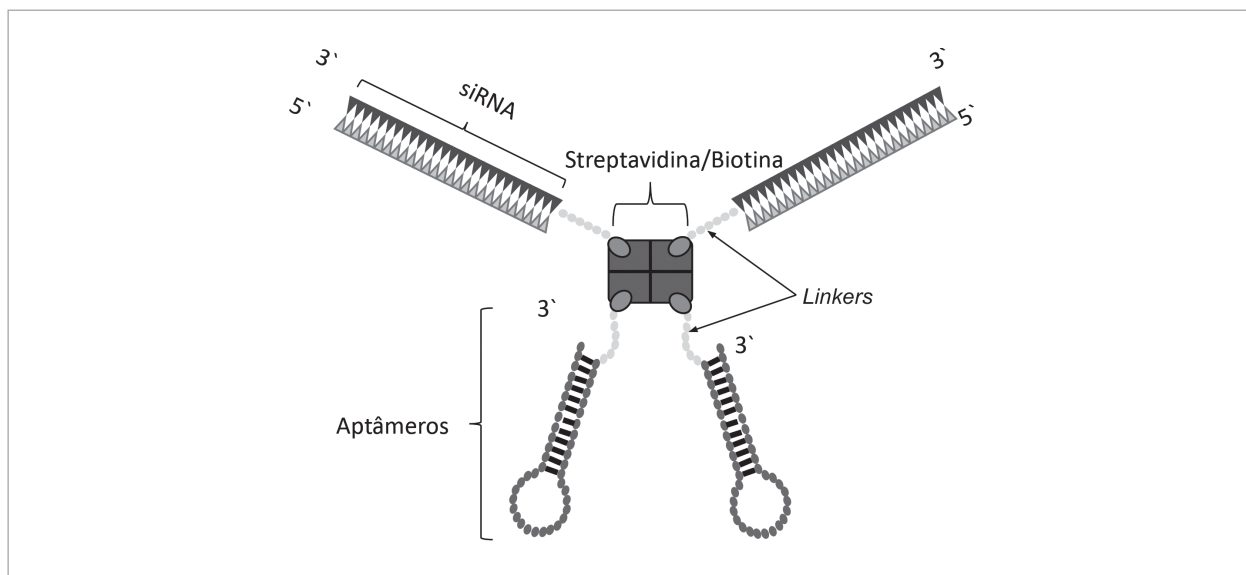


FIGURA 16.7 Esquema da molécula tetramérica contendo dois aptâmeros e duas moléculas de siRNA. Fonte: adaptada de De Almeida et al. (2017).

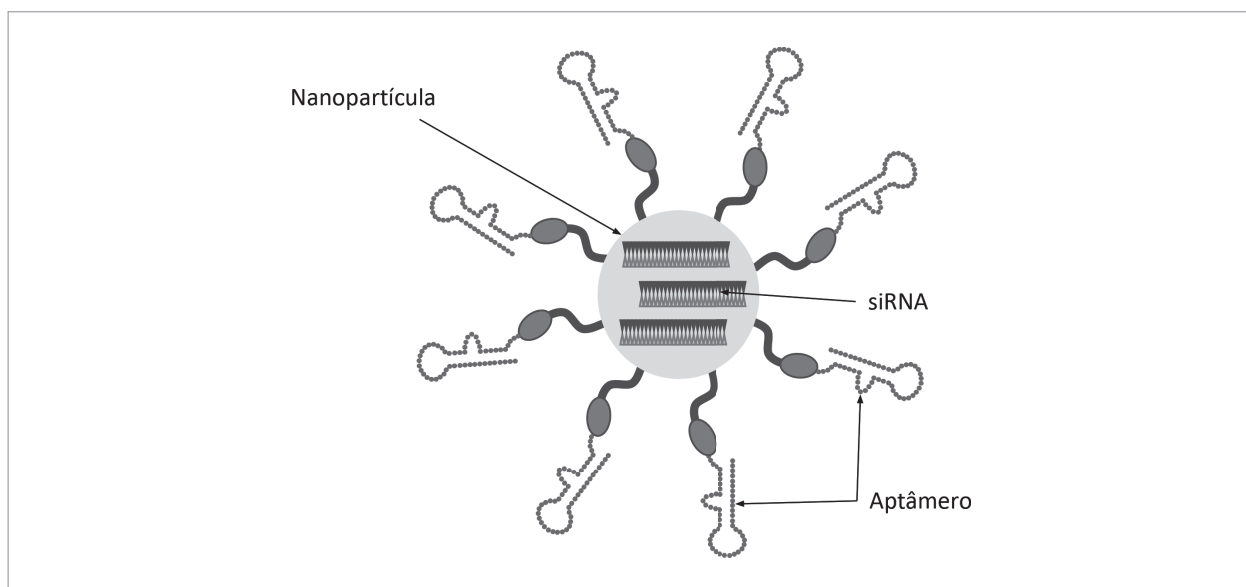


FIGURA 16.8 Esquema de siRNA encapsulado em nanopartículas decoradas com aptâmeros. Fonte: adaptada de De Almeida et al. (2017).

et al. (2017) testaram a possibilidade de conjugar um aptâmero a nanopartículas contendo siRNA P-gp, que pode se ligar aos receptores do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) em células de câncer de mama (POWELL et al., 2017). Para superar a resistência a múltiplas drogas (MDR), um nanovetor (conjugado com aptâmero específico de MD) foi usado para coentrega de siRNA e doxorrubicina (DOX), resultando em uma potente atividade antitumoral (YAN et al., 2016).

Partículas lipídicas de ácido nucleico estáveis (SNALP) também foram usadas para distribuir siRNA através de aptâmeros. Nesse estudo, acoplaram o aptâmero do receptor de transferrina em SNALP carreadoras de siRNA (WILNER et al., 2012). Outro sistema de entrega aptâmero-lipossoma-siRNA foi desenvolvido por Alshaer et al. (ALSHAER et al., 2018).

Para atingir as células de câncer de próstata, Kim et al. (2010) usaram shRNAs contra o gene *BCL-xL*

e o aptâmero PSMA conjugado a uma construção de polietilenoimina (PEI)-PEG. A fim de amplificar a resposta terapêutica e usar diferentes drogas em sinergia, os autores também incluíram DOX ou miRNA em nanopartículas funcionalizadas por aptâmeros (GAO et al., 2011; KIM et al., 2010). Gao et al. (2011) usaram uma plataforma multifuncional de nanopartículas do tipo envelope constituída por dois polímeros que incorporam siRNA e aptâmeros (XU et al., 2017). Lv et al. (2018) usou dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) funcionalizados com aptâmeros de EGFR a fim de coentregar shRNA para survivina e erlotinibe (LV et al., 2018).

Outra estratégia é o uso de siRNA-aptâmero quimera para compor a nanopartícula. O conjugado siRNA-aptâmero quimera surgiu como uma abordagem promissora para a entrega eficiente de siRNA a tipos de células específicos, por conta de sua baixa imunogenicidade, sua facilidade de síntese química e modificação, e a excelente especificidade de direcionamento do aptâmero (DASSIE et al., 2009). No entanto, em alguns casos, foi relatado escape endossômico. Para evitar esse problema, tem-se utilizado as quimeras de siRNA-aptâmeros em nanocarreadores. Bagalkot e Gao (2011) desenvolveram uma nova tecnologia para ligar quimeras de siRNA-aptâmeros a nanopartículas transportadoras (BAGALKOT; GAO, 2011).

Em estudo recente, para avaliar a viabilidade celular e a expressão de genes em células de câncer de mama metastático, Jafari et al. (2019) desenharam nanopartículas de quitosana para coentrega de Docetaxel e siRNA do receptor 1 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R), com o aptâmero MUC1 como direcionador. Os aptâmeros MUC1 têm sido usados para direcionar a administração de medicamentos a vários tipos de câncer, incluindo células de câncer de mama (JAFARI et al., 2019). Outro estudo no campo do câncer mostra uma eficiência do lipossoma conjugado com aptâmero EGFR carregado com siRNA da proteína 1 de ligação à sequência rica em AT especial (SATB1) (DONG et al., 2018).

Uma nova plataforma de entrega direcionada para o silenciamento de genes mediado em células cancerígenas foi descrita por Ayatollahi et al. (2017), que é o ácido 10-bromodecanoico (10C); 10C-PEG foi carregado com plasmídeo shRNA para *knockdown* específico da proteína BCL-xL e foi conjugado com o aptâmero AS1411 para o direcionamento à nucleolina em células cancerígenas (AYATOLLAHI et al., 2017). Uma morte sinérgica de células cancerígenas foi alcançada usando um aptâmero AS1411 de nucleolina-nanotubos de carbono (CNT) como transportadores biológicos contendo shRNA específico de BCL-xL e DOX (TAGHAVI et al., 2017).

Recentemente, foram demonstrados novos tipos de entrega de siRNA por aptâmeros. Xu et al. (2019) usaram o RNA de junção de três vias (3WJ) para acoplar aptâmeros de moléculas de adesão de células epiteliais (EpCAM) com o objetivo de entregar siRNA delta-5-dessaturase (D5D) (XU et al., 2019). Li et al. (2017) desenvolveram dímeros de pRNA combinados com siRNA e aptâmero, e demonstraram que o pRNA, que é um componente de um bacteriófago phi29, pode ser útil para a entrega eficiente de siRNA. O pRNA-siRNA-aptâmero foi encapsulado em folato e nanopartículas de quitosana funcionalizadas com PEG. Nesse estudo, o aptâmero usado foi FB4 para um domínio de transferina e o siRNA foi c-myc (LI et al., 2017). Wu et al. (2018) demonstraram que nanobolhas catiônicas funcionalizadas com aptâmeros de PSMA são capazes de transportar e entregar siRNA FoxM1 para células de câncer de próstata e tumores xenográficos (WU et al., 2018). Um estudo recente desenvolveu uma nanoestrutura de DNA programável que é considerada um sistema potencial para a administração de medicamentos ao câncer de pulmão de células não pequenas. Essa nanoestrutura conjugada com aptâmeros MUC-1 para entregar o siRNA Rab26 apresentou uma grande eficiência de entrega celular e atividade antitumoral (LIU et al., 2019).

Como é possível concluir a partir do que foi discutido nesta sessão, muitas das construções de aptâmeros utilizam também entrega de quimioterápicos, separadamente ou com as terapias de RNA. O uso de aptâmeros como agentes de entrega de quimioterapia foi uma das primeiras aplicações identificadas da tecnologia de aptâmeros. A quimioterapia padrão, como a que atinge células de proliferação rápida com base na ligação ao DNA ou inibição de proteínas de ligação ao DNA, como topoisomerasas, ainda tem sido adotada atualmente para o tratamento de vários tipos de câncer. No entanto, é um tratamento que apresenta efeitos colaterais graves que muitas vezes limitam a adesão ao protocolo de tratamento, limitando, assim, sua eficácia. Um agente quimioterápico que entrasse especificamente apenas na célula cancerígena, eliminando assim quaisquer efeitos colaterais associados, permaneceu um aspecto desejado desde que Paul Ehrlich descreveu o conceito de “bala mágica”. Na tentativa de atender a essa demanda, os aptâmeros têm sido acoplados a agentes quimioterápicos desde os primórdios de sua existência, com exemplo do aptâmero à elastase de neutrófilos acoplado a um inibidor de elastase (CHARLTON; SENNELLO; SMITH, 1997).

A partir daí vários estudos foram realizados, utilizando aptâmeros acoplados com drogas como metotrexato e doxorrubicina. Seguindo o exemplo do inibidor de elastase de neutrófilos, várias tentativas de administração de quimioterapia usando aptâmeros foram focadas

em acoplar o agente quimioterápico covalentemente ao aptâmero, usando uma das várias modificações químicas com grupos funcionais disponíveis, como grupos amino e tiol ou azida (BOYACIOGLU et al., 2013; HUANG et al., 2009). Por fim, em trabalho mais recente, Porciani et al. (2015) geraram uma construção bifuncional do aptâmero ligado a DOX, mas também carregando um oligonucleotídeo chamariz contra NFκB em uma abordagem de tratamento de câncer pancreático (PORCIANI et al., 2015).

Por um lado, o acoplamento covalente de aptâmeros aos reagentes quimioterápicos oferece a vantagem de que a droga é separada do aptâmero e não deve interferir em sua estrutura e sua associação a seu ligante (Figura

16.9). Além disso, explorando os vários ligantes, sua flexibilidade, sua sensibilidade ao pH e até seu comprimento, pode-se customizar quimeras que liberariam o ingrediente ativo no alvo, explorando os recursos específicos de internalização. Por outro lado, envolve procedimentos de acoplamento e purificação química que podem eventualmente impor algumas dificuldades técnicas. No entanto, vários autores exploraram as características particulares de intercalação de DNA de moléculas como DOX para vinculá-lo diretamente à parte de dupla fita do aptâmero e entregar diretamente o complexo (Figura 16.9).

Os potenciais problemas associados a essa abordagem têm sido o fato de que várias moléculas intercaladas em

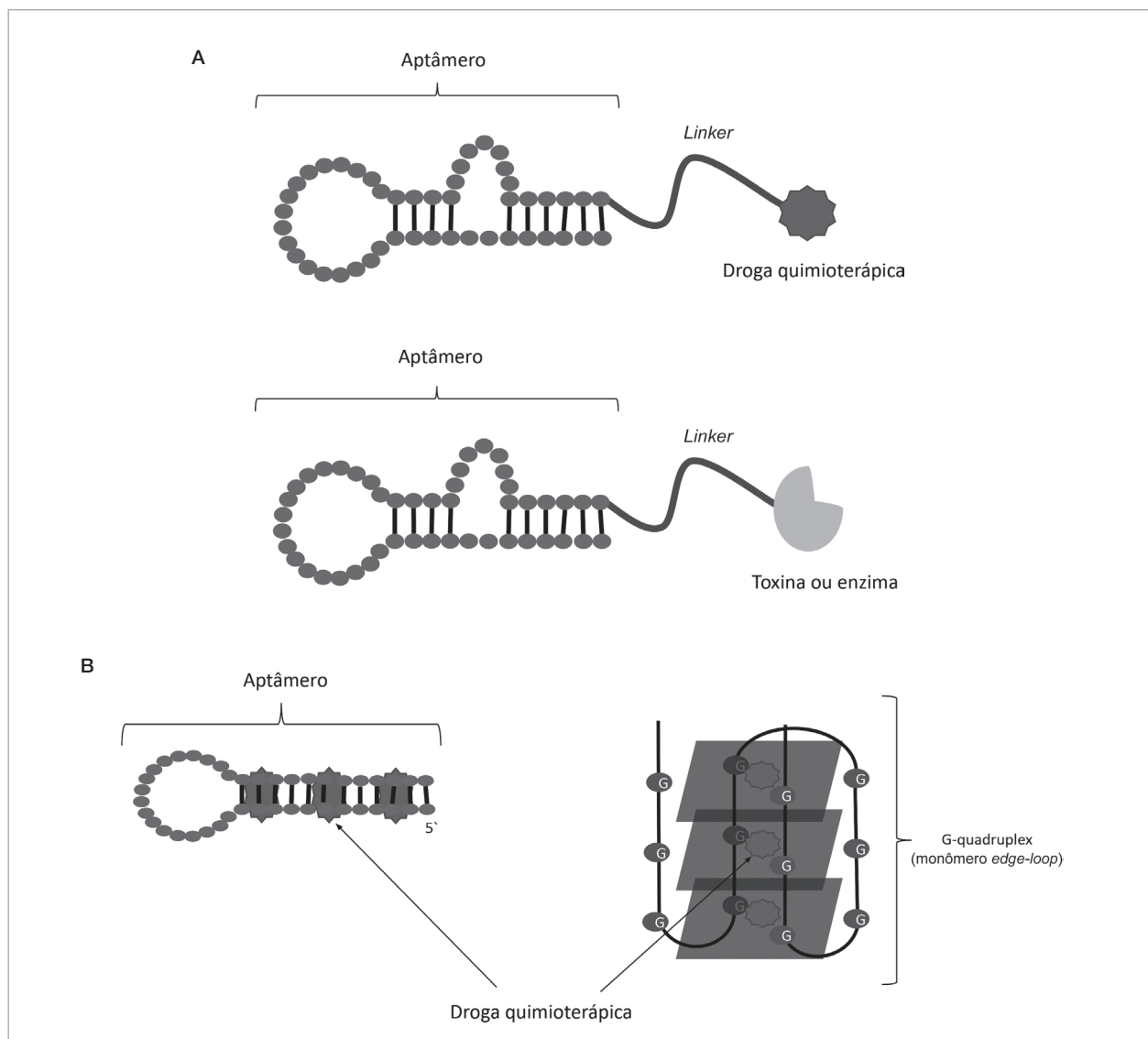


FIGURA 16.9 Esquema de (a) conjugação covalente e (b) aptâmero não covalente-agente quimioterápico. Adaptado de Bagalkot et al. (2006).

Fonte: adaptada de De Almeida et al. (2017).

um aptâmero podem causar distorção de sua estrutura e abolir ou diminuir seu reconhecimento de alvo, tornando-o ineficaz. Além disso, é importante garantir que o intercalador ligado seja liberado do aptâmero dentro da célula e esteja livre para exercer sua função. Mas não há reações químicas de acoplamento envolvidas, e uma simples mistura da droga com o aptâmero seria suficiente para ter uma droga química alvo-específica, com alto potencial.

Uma vez estabelecido que a intercalação não abole a ligação do aptâmero e o fármaco é facilmente liberado em pH endossomal/lisossomal baixo, esse modelo foi amplamente explorado por Bagalkot et al. (2006), Subramanian et al. (2012), Taghdisi et al. (2010), Hu et al. (2012) e Liu et al. (2012). Além disso, ao incorporar uma cauda rica em G-C de dupla fita, mais moléculas de doxorubicina podem ser carregadas no aptâmero, aumentando ainda mais a toxicidade do construto. Isso foi explorado em um aptâmero específico da linha celular de hepatocarcinoma humano por Meng et al. (2012) no tratamento de câncer de fígado (MENG et al., 2012). O câncer de fígado também foi o alvo do aptâmero antinucleolina AS1411 carregado com DOX (TRINH et al., 2015).

Todas essas abordagens de doxorubicina mostraram níveis de toxicidade semelhantes aos da doxorubicina

livre, mas com toxicidade geral ou cardiotoxicidade reduzida, pela eliminação de interações não específicas de DOX por conta da entrega específica, dirigida pelos aptâmeros. Outras abordagens bem-sucedidas incluem a entrega de toxinas, como gelonina (CHU et al., 2006), ou terapias fotodinâmicas (FERREIRA et al., 2009), que também demonstraram especificidade celular e toxicidade aumentada.

Por fim, uma metodologia adicional tem sido utilizada para a entrega de quimioterapia às células cancerígenas, com o uso de nanotecnologia. Dois exemplos são a entrega de docetaxel em nanopartículas formuladas com copolímero poli(ácido d,l-láctico-co-glicólico)-beta-poli(etilenoglicol) (PLGA-b-PEG) biocompatível e biodegradável com superfície funcionalizada com o anti-PSMA aptâmero, mostrando eficácia notável, toxicidade celular aumentada e toxicidade não específica reduzida (FAROKHZAD et al., 2006). Esse modelo explora o potencial de encapsulamento de um grande número de quimioterápicos em uma nanopartícula, que é então decorada por aptâmero para entrega específica (Figura 16.10). Um modelo diferente foi adotado por Luo, Shiao e Huang (2011), que usaram nanopartículas de ouro para acoplar aptâmeros modificados com tiol à sua superfície e carregá-los com DOX, resultando em cerca de 25 aptâmeros carregados por nanopartícula,

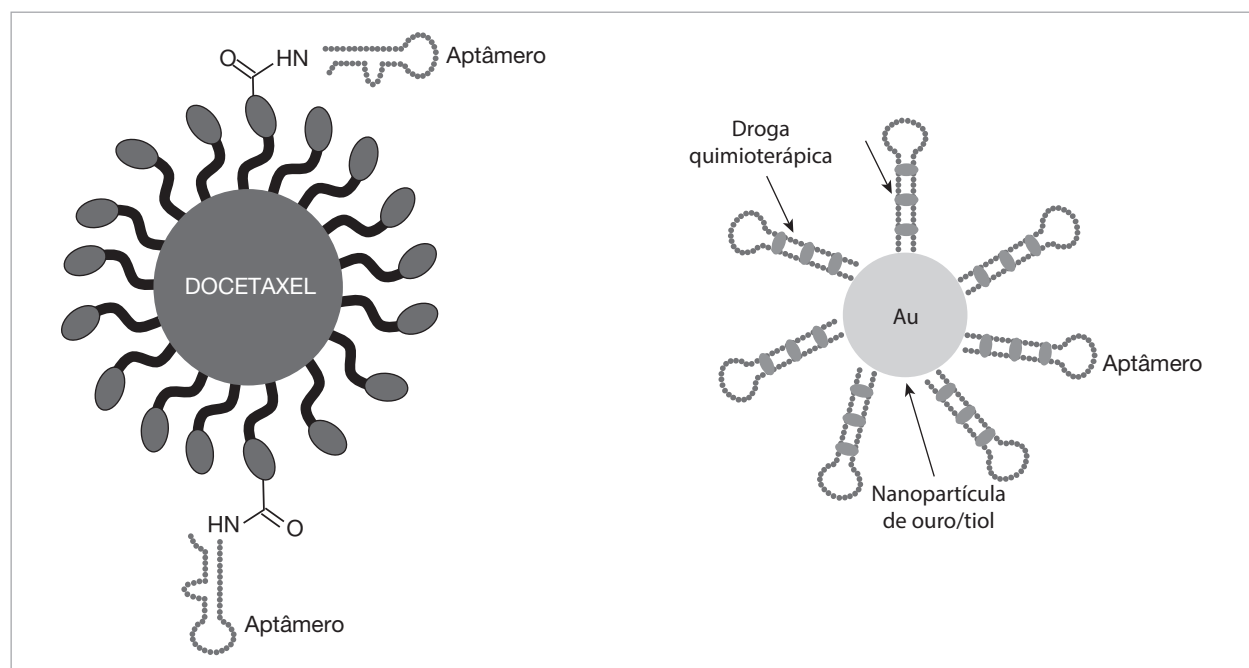


FIGURA 16.10 Entrega de quimioterápicos específicos para câncer usando aptâmeros. Esquema de (a) encapsulamento de um grande número de quimioterápicos (por exemplo Docetaxel) em uma nanopartícula decorada com aptâmeros para entrega específica, (b) nanopartículas de ouro conjugadas com aptâmeros carregados com quimioterápicos (intercalados).

Fonte: adaptada de De Almeida et al. (2017).

carregando cerca de 300 moléculas de DOX e demonstrando absorção celular e morte celular específica (LUO; SHIAO; HUANG, 2011) (Figura 16.10).

Aptâmeros têm também várias aplicações no campo de teranóstica, no qual podem ser utilizados tanto para o diagnóstico (baseado na identificação da presença de um marcador da doença) quanto para o tratamento (baseado na ligação e no bloqueio desse mesmo marcador). Kim et al. (2017) desenvolveram um sistema lipossomal teranóstico para transportar *Quantum Dots* (QD) de diagnóstico e siRNA terapêutico que foram acoplados a moléculas de aptâmero contra EGFR (KIM et al., 2017). Esse mesmo aptâmero anti-EGFR foi usado recentemente como um sistema de entrega teranóstico. Os autores recorreram a dois siRNA para fornecer um tratamento anticâncer sinérgico, usando siRNA BCL-2, que interfere na proliferação de células tumorais, e siRNA PKC- α para inibição da migração de células tumorais. Além disso, esses veículos foram capazes de entregar simultaneamente sinais de fluorescência fornecidos por QD em órgãos internos e tumores. Esse estudo mostra um direcionamento eficiente de siRNA terapêuticos anticâncer, bem como QD fluorescentes para tecidos tumorais, permitindo a aplicação no tratamento e imagens de fluorescência de cânceres (KIM et al., 2019).

Outra abordagem teranóstica utiliza radionuclídeos. O desafio de fornecer radionuclídeos aos locais do tumor para produzir imagens de diagnóstico ou abordagens terapêuticas aprimoradas envolve vários aspectos farmacocinéticos. Em primeiro lugar, os métodos de entrega devem favorecer a captação preferencial de radionuclídeos por células tumorais em vez de outros tecidos. O conceito de razão radioativa tumor-para-órgão não alvo é um dos parâmetros que determina o sucesso da abordagem de entrega. Razões mais altas geram um alto contraste entre tecido tumoral e não tumoral. Idealmente, após algumas horas de injeção de radionuclídeos acoplados a qualquer *driver* de tumor, a radioatividade deve ser concentrada preferencialmente nas células/sítios tumorais. Outro aspecto é que, uma vez no local do tumor, o tempo de retenção dos radionuclídeos deve ser otimizado para permitir a realização adequada do procedimento diagnóstico ou terapêutico desejado.

Os aptâmeros podem ser aplicados a fim de guiar diferentes sondas para tecidos ou células-alvo em muitas técnicas de imagem. Essas técnicas podem ser as imagens de fluorescência e bioluminescência, ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia por emissão de fóton único (SPECT), tomografia computadorizada (CT) e ultrassom (US) (DOUGHERTY; CAI; HONG, 2015; SUN; TAN; ZU, 2016).

Hicke et al. (2006) publicaram o primeiro esforço ao uso de aptâmeros radiomarcados *in vivo* para imagens de alvos tumorais, usando um aptâmero radiomarcado com ^{99m}Tc direcionado à tenascina-C (HICKE et al., 2006). Um ano depois, o grupo de Missailidis desenvolveu uma série de radiofármacos mono e multiméricos usando aptâmeros anti-MUC1 como um direcionador para os locais de xenografia do tumor MCF7 (PIEVE; PERKINS; MISSAILIDIS, 2009). Uma limitação revelada nesse trabalho foi a eliminação da maior parte da radioatividade do animal de teste por 3 h p.i. Assim, em um estudo sequencial, o mesmo grupo teve como objetivo melhorar a meia-vida circulante dos aptâmeros radiomarcados. Da Pieve et al. (2012) conjugaram o aptâmero com poli(etileno glicol) (PEG) e demonstraram que a PEGilação foi capaz de retardar a eliminação dos aptâmeros no sangue e no corpo, e que os complexos tetraméricos foram os mais eficientes dos complexos monoméricos (DA PIEVE et al., 2012).

Da Rocha Gomes et al. (2012) usaram um aptâmero contra a metaloproteinase 9 da matriz humana (hMMP-9). Eles sintetizaram um aptâmero truncado, apresentando ligação alta pra hMMP-9, mas sem propriedades de ligação contra hMMP-7 e hMMP-2. O aptâmero foi funcionalizado com MAG3 sem perda de especificidade e então radiomarcado com ^{99m}Tc para estudos de imagem. O conjugado de aptâmero radiomarcado foi testado contra um painel de tipos de tumor do sistema nervoso central humano que expressam MMP-9 (DA ROCHA GOMES et al., 2012). Outra iniciativa para desenvolver um radiofármaco baseado em aptâmeros foi descrita usando um aptâmero modificado contra HER-2 conjugado com hina como quelante, tricina como coligante e ^{99m}Tc como radiotraçador (VARMIRA et al., 2013, 2014).

No mesmo ano, foram publicados vários estudos com o uso de aptâmeros como radiofármacos. Em uma abordagem semelhante às publicadas anteriormente, Luo et al. (2017) usaram o aptâmero de nucleolina AS1411 como agente de entrega para radioterapia à base de cobre-64 e agente de diagnóstico por imagem (LUO et al., 2017). Nesse mesmo ano, dois estudos adicionais foram publicados, com uma abordagem diferente que visava eliminar a questão do quelante na entrega de radiofármacos mediada por aptâmeros. Assim, tanto Wu et al. (2014) quanto Correa et al. (2014) publicaram estudos baseados na marcação direta de aptâmeros com o metal, dispensando o uso de um quelante apropriado. Para isso, Wu et al. (2014) usaram um aptâmero de EGFR marcado com ^{188}Re (WU et al., 2014), enquanto Correa et al. (2014) selecionaram aptâmeros para CEA, que eles marcaram com ^{99m}Tc (CORREA et al., 2014).

No ano seguinte, Jacobson et al. (2015a, 2015b) publicaram dois artigos usando diferentes abordagens para radiofármacos direcionados baseados em aptâmeros (JACOBSON et al., 2015a, 2015b). No primeiro caso, usaram aptâmeros para proteína tirosina quinase-7 a fim de direcionar para carcinomas de cólon, marcados com ^{18}F , em uma abordagem de imagem PET (JACOBSON et al., 2015a, 2015b), enquanto no outro estudo adotaram tenascin-C como um marcador para o aptâmero e obtiveram imagens de PET e SPECT usando marcação de ^{18}F e ^{64}Cu , respectivamente (JACOBSON et al., 2015a, 2015b). Com o aumento da presença de equipamentos de imagem PET em hospitais e a meia-vida menor do ^{18}F , de quase duas horas (109 minutos) em comparação com as 6 h para $^{99\text{m}}\text{Tc}$, 12 h para ^{64}Cu e 17 h para Rênio-188, isso pode ser uma alternativa de imagem interessante. No entanto, a meia-vida curta desses radionuclídeos torna mais difícil concluir o acoplamento químico e a marcação dentro do tempo apropriado, considerando a meia-vida do radionuclídeo.

Usando um radionuclídeo de metal diferente, Kryza et al. (2016) selecionaram aptâmeros contra a metaloproteínase-9 da matriz humana (MMP-9), usando aptâmeros de RNA quimicamente modificados, resistentes à degradação por nuclease. Eles combinaram os aptâmeros com três quelantes diferentes, estabeleceram as propriedades de ligação do complexo aptâmero-quelante com MMP-9 em linhas celulares e usaram imagens de fluorescência em camundongos portadores de melanoma. Os autores marcaram os complexos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{111}In , usando MAG ou DOTA como quelantes, demonstrando também alta relação tumor-músculo e estabilidade do complexo.

Santos et al. (2016) publicaram um estudo dos aptâmeros MUC1, previamente desenvolvidos pelo grupo Missailidis, em uma formulação de nanopartículas para imagens de câncer de mama. O objetivo foi melhorar a depuração biológica e as propriedades farmacocinéticas dos aptâmeros, usando nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico), incorporando com sucesso os aptâmeros MUC1 na superfície da nanopartícula (nanopartícula carregada). Isso resultou em uma nanopartícula decorada com aptâmero que foi, posteriormente, marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para imagens de SPECT (SANTOS et al., 2016). Nesse contexto, gliomas e glioblastomas também foram alvos de aptâmeros específicos com radiação (LI et al., 2022a; ZHAO et al., 2019, 2021).

Em termos de imagem, mais uma metodologia foi explorada: trata-se da ressonância magnética, metodologia que tem a vantagem de não necessitar de radiação para obter sua imagem. Assim, Wang et al. (2008) foram os primeiros a descrever um complexo de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético com aptâmero (SPION) para aplicações de imagem de ressonância

magnética e potencial tratamento. Eles conjugaram o aptâmero A10 contra PMSA com SPION e analisaram sua capacidade em imagens de ressonância magnética de câncer de próstata (WANG et al., 2008). Ainda usando SPION, cerca de três anos depois, Yu et al. (2011) descreveram um SPION acoplado ao mesmo aptâmero PMSA, mas também carregado com doxorrubicina, permitindo assim imagens de ressonância magnética e quimioterapia direcionada ao mesmo tempo (Yu et al., 2011).

Dois estudos mais recentes, também, foram publicados com foco em imagens de ressonância magnética. You et al. (2014) descreveram o acoplamento de um aptâmero de VEGF acoplado a outro tipo de nanopartículas de óxido de ferro, nanopartículas ultrapequenas de óxido de ferro paramagnético (USPIO), para imagens específicas de câncer hepático em modelos animais (YOU et al., 2014). Finalmente, em 2015, Zhang et al. (2015) utilizaram um lipossoma termossensível, carregado com Gd-DTPA como agente de contraste e acoplado ao aptâmero de nucleolina AS1411. Esse complexo apresentou maior relaxividade, sem efeitos citotóxicos, maior especificidade e biocompatibilidade, tornando-se assim um agente de ressonância magnética interessante para imagem tumoral e diagnóstico precoce (ZHANG et al., 2015).

16.5 APLICAÇÕES DE TERAPIAS BASEADAS EM ÁCIDOS NUCLEICOS ÀS DOENÇAS GENÉTICAS

16.5.1 Atrofia muscular espinhal (AME)

A atrofia muscular espinhal (AME) é uma doença dos neurônios motores, de ampla variabilidade clínica e causada na maioria dos casos por uma mutação em homozigose no gene *SMN1* (SILVINATO; BERNARDO, 2018). É transmitida de maneira autossômica recessiva e é a doença neuromuscular mais comum na infância. Existem, ao menos, quatro fenótipos clínicos distintos que são conhecidos com base na idade de início das alterações clínicas e no grau de envolvimento motor (FARAVELLI et al., 2015). Na AME tipo I, espera-se o óbito antes dos 2 anos de idade em mais de 80% dos casos, geralmente por insuficiência respiratória, exceto nas crianças que possuem suporte ventilatório. Os primeiros sintomas são observados antes dos 6 meses de vida (SILVINATO; BERNARDO, 2018).

Na AME tipo II, os pacientes conseguem sentar-se sem auxílio, porém ficam impossibilitados de deambular, com surgimento dos primeiros sinais entre 6 e 18 meses (SHABABI; LORSON; RUDNIK-SCHÖNEBORN, 2014). No tipo III, o paciente consegue andar sozinho, apesar de alguma dificuldade, e na maioria dos casos

atinge uma expectativa de vida normal. Por último, no tipo IV, o quadro inicia-se na fase adulta de modo mais brando (JUNTAS MORALES et al., 2017).

O primeiro tratamento específico para essa enfermidade foi o Nusinersen (Spinraza®), um oligonucleotídeo anti-sense (ASO), que promove a produção de proteína a partir do pseudogene *SMN2* (GOVONI et al., 2018). Trata-se também do primeiro tratamento para a AME aprovado pela FDA e pela EMA, sendo posteriormente aprovado pela Anvisa. De acordo com os estudos realizados, foi possível comparar crianças afetadas por AME que receberam tratamento com essa medicação e aquelas que não receberam, observando-se que os pacientes em uso dos oligonucleotídeos mostraram um aumento na transcrição de *SMN2* e da proteína SMN em neurônios motores da medula espinhal, além de melhora clínica e estabilização da doença neurológica, sem progressão das perdas motoras (GOVONI et al., 2018).

16.5.2 Polineuropatia amiloidótica familiar

A amiloidose é uma doença infiltrativa, localizada ou sistêmica, tratando-se de uma causa reconhecida de cardiomiopatia restritiva, insuficiência cardíaca (IC) e polineuropatia. Existem mais de vinte tipos de proteína amiloide, com maior destaque para duas: de cadeia leve (AL) e a relacionada à transtirretina (TTR) (PLANTE-

-BORDENEUVE, 2014). Entre as diferentes formas de amiloidoses sistêmicas, destacam-se as amiloidoses hereditárias, ligadas a proteínas precursoras que sofreram mutação, como a transtirretina (TTR) (GERTZ, 2017).

A TTR é uma proteína predominantemente sintetizada no fígado (98%) e que tem a função de ser carreadora da tiroxina e do retinol (HAMILTON; BENSON, 2001). Quando a TTR sofre desestabilização de sua estrutura tetramérica, seja por mutação, no caso das formas hereditárias, há a consequente dissociação em monômeros, culminando na deposição tecidual sob a forma de agregados de filamentos amiloides, caracterizando, dessa forma, as amiloidoses ligadas à TTR, também chamadas de amiloidoses hereditárias associadas à transtirretina (hATTR) (HAMILTON; BENSON, 2001) (Figura 16.12). A TTRm (transtirretina mutante) é causada por uma mutação autossômica dominante no gene *TTR*, e o início do aparecimento dos sintomas ocorre usualmente na idade adulta, cursando com neuropatia progressiva, atrofia distal de mãos e pés com perda posterior da deambulação em fases mais avançadas da doença, cardiomiopatia, além de disautonomia (CRUZ et al., 2017).

Aprovado tanto pelo FDA quanto pelo EMA e pela Anvisa, o medicamento conhecido como inotersen (Tegsedi®) foi aceito como a primeira terapia de silenciamento de RNA por meio de oligonucleotídeos para

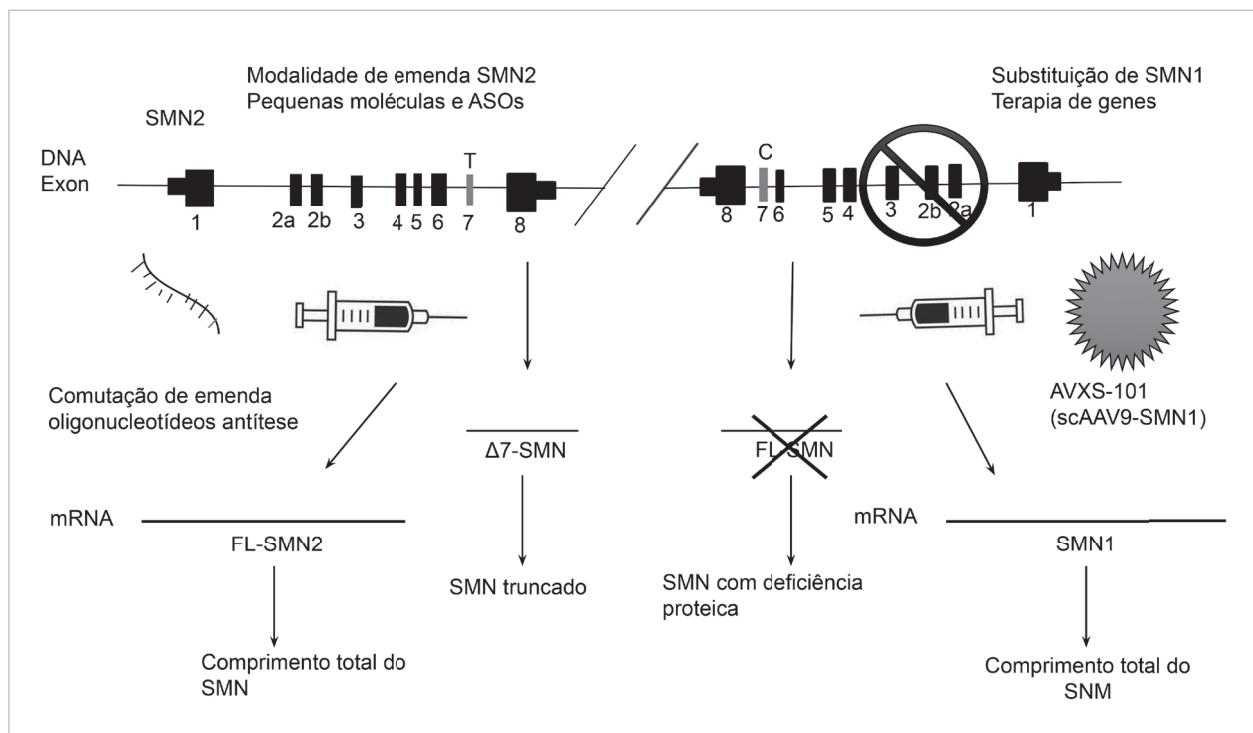


FIGURA 16.11 Ação dos oligonucleotídeos na amiotrofia espinhal progressiva.

Fonte: traduzida de Sanlioglu (2023).

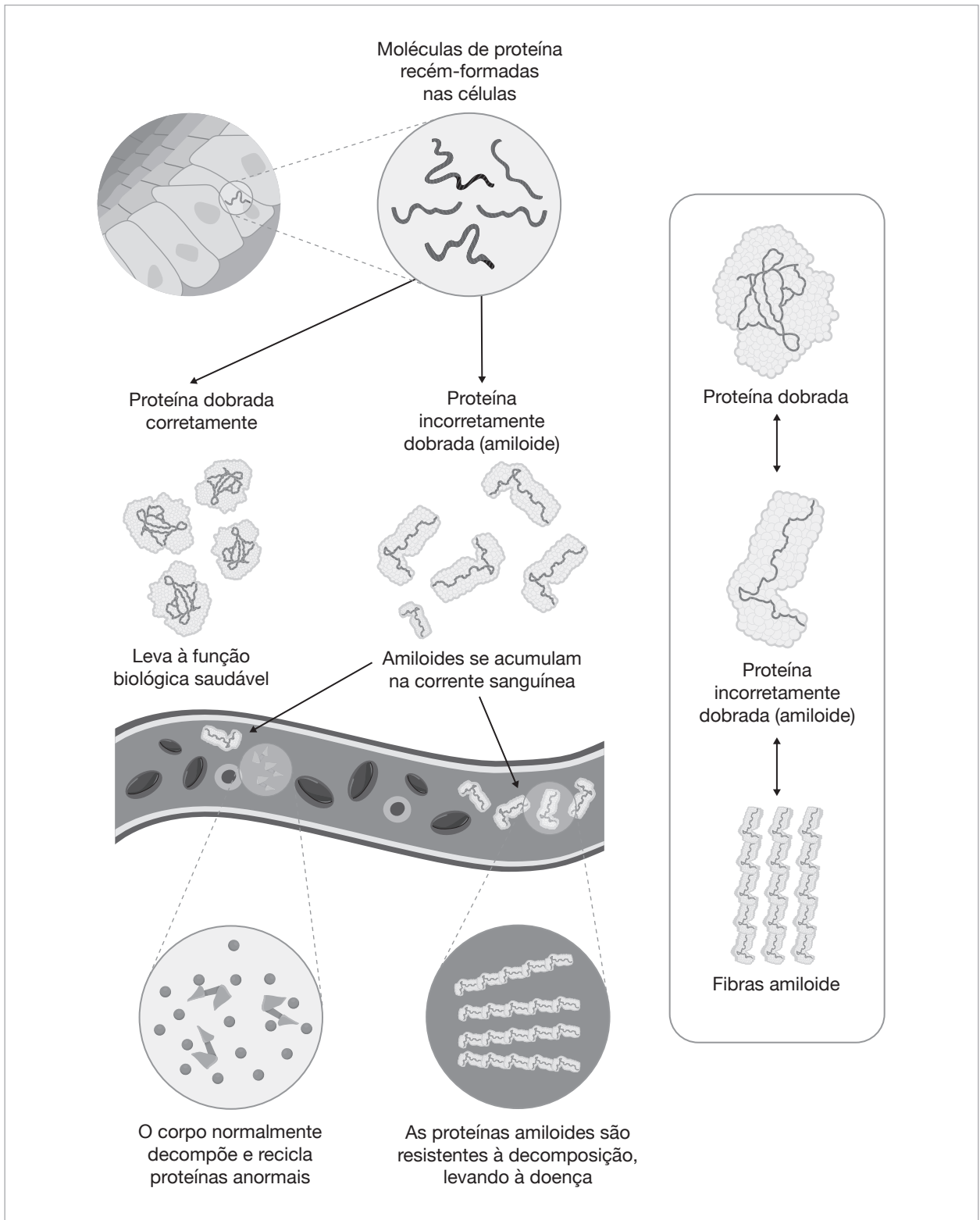


FIGURA 16.12 Formação das fibrilas amiloides.

Fonte: adaptada de Amyloidosis Support Groups (2013).

o tratamento da amiloidose hereditária causada por mutações no gene *TTR* (OBICI; MUSSINELLI, 2021). Inotersen é um inibidor oligonucleotídico *antisense* fosforotioato (ASO) 2'-O-(2'-metoxietila) (2'-MOE) da transtirretina (TTR) molecular-alvo. A ligação seletiva de inotersen ao mRNA TTR causa degradação tanto do mRNA TTR mutante quanto do tipo selvagem, resultando em reduções significativas nos níveis de proteína TTR mutada e do tipo selvagem (Figura 16.13) (BENSON et al., 2018; GALES, 2019).

16.5.3 Porfirias agudas hepáticas

As porfirias agudas hepáticas constituem um grupo de doenças de herança predominantemente autossômica dominante, decorrente de um distúrbio na via biossintética do heme, levando ao aumento de dois metabólitos neurotóxicos, o ácido aminolevulínico (ALA) e o porfobilinogênio (PBG) (Kauppinen, 2005). As manifestações clínicas mais frequentes das porfirias agudas são: dor abdominal, alteração da cor da urina, mudança no ritmo intestinal, déficit motor ou sensitivo-motor, vômitos, alteração do nível de consciência ou confusão mental, crises convulsivas, quadros disautonômicos cardiovasculares e distúrbios psiquiátricos (SOLINAS; VAJDA, 2008).

Um subgrupo de pacientes com porfirias agudas pode desenvolver crises recorrentes que paulatinamente tornam-se refratárias ao tratamento com hemina e para o qual não havia alternativas a não ser o transplante de fígado em casos em que a recorrência das crises levava a risco de morte do paciente e a uma péssima qualidade de vida com dor crônica e hospitalizações frequentes (SCHMITT et al., 2018). Para esse grupo de pacientes, houve o desenvolvimento e a recente aprovação de terapia com RNAi, medicamento conhecido como givosiran (DE PAULA BRANDÃO; TITZE-DE-ALMEIDA; TITZE-DE-ALMEIDA, 2020).

16.6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DAS TECNOLOGIAS BASEADAS EM ÁCIDOS NUCLEICOS

Com a elevada demanda de vacinas e terapias de RNA vislumbrada durante a pandemia de Covid-19, o custo de produção de RNA caiu significativamente e o volume de empresas especializadas nesses produtos cresceu exponencialmente. Durante esse período, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, da fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) vem desenvolvendo uma plataforma de produção de RNA para sua vacina de RNA contra a Covid-19 e outros agravos. Nesse contexto, muito se tem discutido sobre o desenvolvimento e

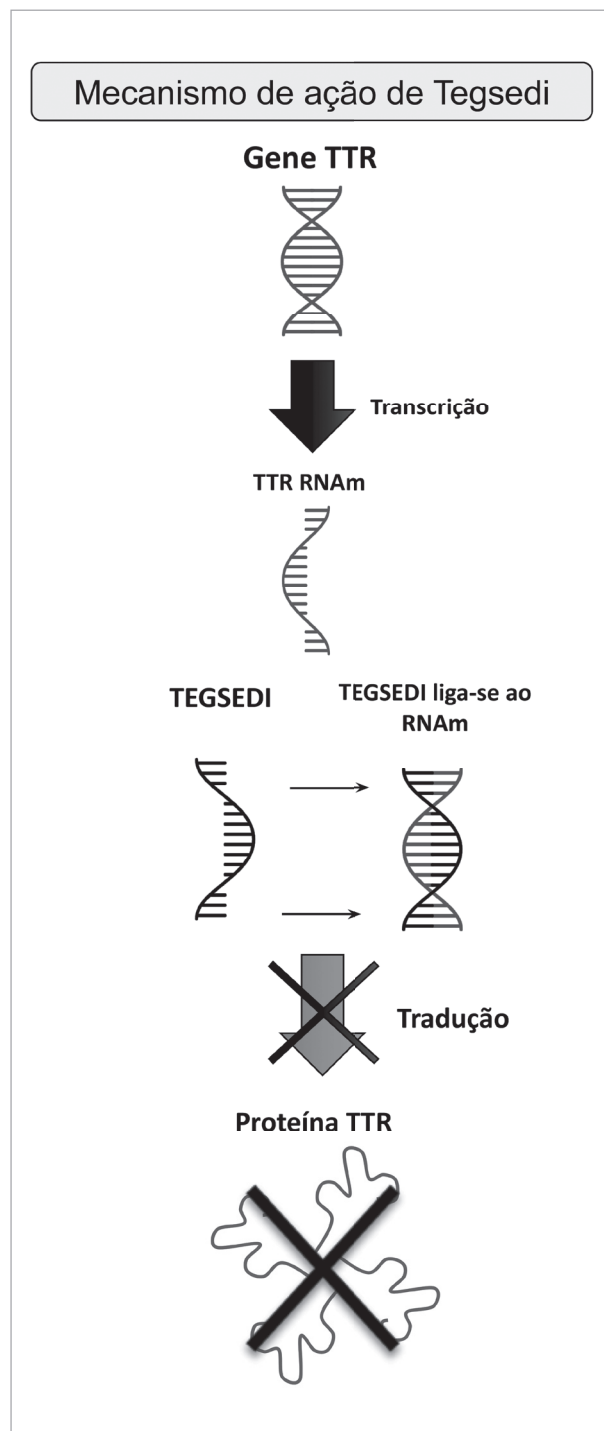


FIGURA 16.13 Mecanismo de ação do inotersen (Tegsedí®).

Fonte: elaborada com base em Tegsedí (2023).

a entrada no mercado de produtos vacinais ou terapias gênicas avançadas, baseadas em ácidos nucleicos.

Entre essas, os aptâmeros continuam sendo uma tecnologia muito promissora para fins de tratamento como um agente biológico ou para a entrega específica

de agentes não específicos, que enfrentam uma série de problemas de desenvolvimento, os quais ainda não lhes permitiram fazer uma transição bem-sucedida do laboratório para o mercado. Esses problemas incluem suas propriedades farmacocinéticas, que muitas vezes são afetadas pelo agente ao qual são acoplados para entrega, sua suscetibilidade a nucleases, que muitas vezes ditam uma série de modificações necessárias para a função, sua rápida filtração renal e rápida distribuição do compartimento de plasma aos tecidos. No entanto, eles mostraram resultados pré-clínicos muito promissores e, como agentes de entrega, demonstraram a capacidade de direcionar sua carga, seja outro terapêutico baseado em ácidos nucleicos, um radiofármaco, um quimioterápico ou uma nanopartícula, especificamente para o local-alvo. São flexíveis e fáceis de adaptar, com várias modificações químicas disponíveis para acoplamento e soluções aos problemas mencionados, como proteção contra nucleases ou acoplamento a PEG ou nanopartículas para alteração de tamanho e propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Essa característica permite aplicações que antes não eram possíveis e promete maiores avanços no futuro próximo, com a expansão do mercado de aptâmeros e redução de seus custos de produção, impulsionados pela maior demanda, além da promessa de novos agentes teranósticos e terapias direcionadas avançadas. Até hoje, somente um aptâmero foi registrado pela Anvisa, o pegaptanibe/Macugen®, para o tratamento de degeneração macular.

Tecnologias baseadas em RNA como o siRNA definitivamente abrem novos horizontes para o desenvolvimento de medicamentos. Por alguns anos, os pesquisadores tiveram que superar os obstáculos e uma fase de estagnação da pesquisa utilizando siRNA. Muito se avançou em relação à entrega e à tecnologia de siRNA e existem medicamentos aprovados para uso humano e empresas e laboratórios especializados nessa tecnologia. Além disso, mais de uma dúzia de terapias de RNA está sendo testada em ensaios clínicos. Como perspectiva, os tipos de RNAi são uma grande promessa para o tratamento de distúrbios resultantes de mutações genéticas autossômicas dominantes. Dada a sensibilidade do siRNA à complementaridade de sequência, é possível projetar siRNA que clivam e degradam seletivamente apenas o alelo mutante e deixam o alelo funcional do gene alvo intacto (HOHJOH, 2013). Outra abordagem relacionada ao silenciamento é a possibilidade da abertura de um caminho para a criação de drogas “programáveis” que podem desativar especificamente os genes durante um período desejado (DE BRITO E CUNHA et al., 2022). Vários produtos de RNA são registrados junto à Anvisa no Brasil, como indicado, como o Spinraza®, Inotecen®, Inclisiran® entre outros.

Para todas as abordagens de terapias e vacinas baseadas em ácidos nucleicos, uma perspectiva frequentemente apontada na literatura é o atendimento às necessidades da medicina personalizada. Para essa questão, se faz necessário o desenvolvimento de nanotransportadores mais sofisticados, multifuncionais e personalizados, melhorando significativamente a entrega e a resposta a terapias de medicina de precisão (SMITH et al., 2022). Outro grande desafio para as abordagens terapêuticas e vacinais está relacionado à entrega das cadeias terapêuticas de RNA nas células certas. O progresso dessas tecnologias dependerá de um contínuo compromisso das empresas farmacêuticas e pesquisadores para impulsionar essa inovação (PAYNE, 2019) a fim de que o estado-da-arte em ácidos nucleicos possa mudar nossas vidas no futuro.

As vacinas e terapias baseadas em ácidos nucleicos, como o RNA mensageiro (mRNA), o RNA autorreplicativo (saRNA), os curtos RNA como o siRNA e miRNA, e os aptâmeros de RNA e DNA, têm o potencial de oferecer impactos significativos no Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS). As vacinas baseadas em ácidos nucleicos, como as de mRNA, têm sido fundamentais na resposta à pandemia de Covid-19. Até o momento, a vacina da Pfizer tem empenhado um papel no combate da pandemia de Covid-19 no Brasil.

Bio-Manguinhos/Fiocruz está desenvolvendo a própria vacina de RNA e tem sido selecionado para participar no Hub de RNA da Organização Mundial da Saúde (OMS), montando a própria infraestrutura de produção de vacinas e outros produtos de RNA. Por sua vez, a HDT e a Senai Cimatec estão conduzindo estudos clínicos de sua vacina de sarna. Empresas farmacêuticas e biotecnológicas e instituições públicas têm investido em pesquisa e desenvolvimento para criar vacinas eficazes contra o vírus SARS-CoV-2, além de um *pipeline* de outros produtos importantes à saúde pública do País. Esse desenvolvimento acelerado e a produção em larga escala dessas vacinas têm impulsionado a indústria farmacêutica, pública e privada, e o setor de biotecnologia. Além disso, esses avanços têm criado inovação tecnológica no país.

As vacinas e terapias baseadas em ácidos nucleicos representam uma inovação significativa no campo da medicina. A tecnologia de mRNA, em particular, tem mostrado promessas para o desenvolvimento de vacinas contra uma ampla variedade de doenças infecciosas, bem como para o tratamento de doenças como o câncer e doenças genéticas. Essa inovação impulsiona o avanço científico e tecnológico no setor da saúde. Com a atualização do parque industrial, e a declaração da Anvisa para a produção de terapias gênicas e avançadas pela Fiocruz e pelo Butantan, outros produtos, seja de de-

envolvimento interno ou resultado de transferência de tecnologia, irão surgir nos próximos anos, diminuindo a dependência do país em compras por judicialização. Outro fator crítico resultado do avanço dessas terapias é a atração de investimentos significativos de empresas farmacêuticas, fundos de investimento e governos. Além disso, parcerias entre empresas, instituições acadêmicas e governamentais têm sido formadas para acelerar o desenvolvimento e a produção dessas terapias. Esses investimentos e parcerias impulsionam o crescimento do setor e criam oportunidades de emprego e investimento. Finalmente, as vacinas e terapias baseadas em ácidos nucleicos podem ter impactos positivos na saúde global, permitindo o acesso a tratamentos eficazes e inovadores em diferentes regiões do mundo. É por isso que essa tecnologia foi selecionada pela OMS e pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) como um movimento de parceria do sul global, no qual o Brasil tem um papel fundamental, e que pode garantir equidade e acesso a vacinas e terapias baseadas em ácidos nucleicos entre países e grupos socioeconômicos.

REFERÊNCIAS

1. ABDI. **ABDI**. [s.d.]. Disponível em: <www.abdi.com.br>. Acesso em: 14 dez. 2023.
2. ADAMS, D. et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 1, p. 11-21, 5 jul. 2018.
3. AFONIN, K. A. et al. Multifunctional RNA nanoparticles. **Nano Letters**, v. 14, n. 10, p. 5.662-5.671, 8 out. 2014.
4. AFONSO-REIS, R.; AFONSO, I. T.; NÓBREGA, C. Current status of gene therapy research in polyglutamine spinocerebellar ataxias. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4.249, 19 abr. 2021.
5. ALENCAR, M. S. de M. et al. Análise da produção científica brasileira sobre nanotecnologia e saúde. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde**, v. 11, n. 1, 3 abr. 2017.
6. ALEXIS, F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 1º ago. 2008.
7. ALSHAER, W. et al. Aptamer-guided siRNA-loaded nanomedicines for systemic gene silencing in CD-44 expressing murine triple-negative breast cancer model. **Journal of Controlled Release**, v. 271, p. 98-106, fev. 2018.
8. AMYLOIDOSIS SUPPORT GROUPS. **Conscientização sobre amiloidose**. [s.d.]. Disponível em: <https://www.amyloidosisupport.org/AmyloidAware_Portuguese.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2023.
9. AN, D. et al. Systemic messenger RNA Therapy as a treatment for methylmalonic acidemia. **Cell Reports**, v. 21, n. 12, p. 3.548-3.558, dez. 2017.
10. APICBIO. **ApicBio**. [s.d.]. Disponível em: <https://apic-bio.com/>. Acesso em: 14 dez. 2023.
11. AYATOLLAHI, S. et al. Aptamer-targeted delivery of Bcl-xL shRNA using alkyl modified PAMAM dendrimers into lung cancer cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 92, p. 210-217, nov. 2017.
12. BACHMANN, M. F.; JENNINGS, G. T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 11, p. 787-796, 15 nov. 2010.
13. BAGALKOT, V. et al. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 48, p. 8.149-8.152, 11 dez. 2006.
14. BAGALKOT, V.; GAO, X. siRNA-aptamer chimeras on nanoparticles: preserving targeting functionality for effective gene silencing. **ACS Nano**, v. 5, n. 10, p. 8.131-8.139, 25 out. 2011.
15. BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, jun. 2007.
16. BENSON, M. D. et al. Inotersen Treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 1, p. 22-31, 5 jul. 2018.
17. BERRAONDO, P. et al. Messenger RNA therapy for rare genetic metabolic diseases. **Gut**, v. 68, n. 7, p. 1.323-1.330, jul. 2019.
18. BHATIA, S. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In: **Natural Polymer Drug Delivery Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 33-93.
19. BOCHICCHIO, S. et al. Liposomes as siRNA delivery vectors. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 9, p. 882-892, 10 mar. 2015.
20. BOULAIZ, H. et al. Nanomedicine: Application areas and development prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3.303-3.321, 19 maio 2011.
21. BOYACIOGLU, O. et al. Dimeric DNA aptamer complexes for high-capacity-targeted drug delivery using ph-sensitive covalent linkages. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 2, p. e107, 2013.
22. BRANDÃO, P. R. de P.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S.; TITZE-DE-ALMEIDA, R. Leading RNA interference therapeutics part 2: Silencing delta-aminolevulinic acid synthase 1, with a focus on givosiran. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 24, n. 1, p. 61-68, 2 fev. 2020.
23. BROWN, K. M. et al. Expanding RNAi therapeutics to extrahepatic tissues with lipophilic conjugates. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 1.500-1.508, 2 out. 2022.
24. CAILLAUD, M.; EL MADANI, M.; MASSAAD-MASSADE, L. Small interfering RNA from the lab discovery to patients' recovery. **Journal of Controlled Release**, v. 321, p. 616-628, maio 2020.
25. CHAKRABORTY, C. et al. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from bench to clinic as next generation medicine. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 8, p. 132-143, set. 2017.
26. CHARLTON, J.; SENNELLO, J.; SMITH, D. *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. **Chemistry & Biology**, v. 4, n. 11, p. 809-816, nov. 1997.
27. CHEN, X. et al. RNA interference-based therapy and its delivery systems. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 1, p. 107-124, 14 mar. 2018.
28. CHU, T. C. et al. Aptamer: Toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 12, p. 5.989-5.992, 15 jun. 2006.
29. CONRY, R. M. et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. **Cancer research**, v. 55, n. 7, p. 1.397-1.400, abr. 1995.
30. CORREA, C. R. et al. Aptamers directly radiolabeled with technetium-99m as a potential agent capable of identifying carcinoma

- bryonic antigen (CEA) in tumor cells T84. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 8, p. 1.998-2.001, abr. 2014.
31. CRUZ, M. W. et al. Epidemiological and clinical characteristics of persons with transthyretin hereditary amyloid polyneuropathy: A global synthesis of 532 cases. **Amyloid**, v. 24, n. sup1, p. 109-110, 16 mar. 2017.
 32. CUNHA, D. de B. et al. Biotechnological evolution of siRNA Molecules: from bench tool to the refined drug. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 575, 5 maio 2022.
 33. DA PIEVE, C. et al. PEGylation and biodistribution of an anti-MUC1 aptamer in MCF-7 tumor-bearing mice. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1.377-1.381, 18 jul. 2012.
 34. DA ROCHA GOMES, S. et al. 99m Tc-MAG3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloproteinase-9. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 2.192-2.200, 21 nov. 2012.
 35. DALMORO, A. et al. Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 3, p. 471-477, abr. 2012.
 36. DASSIE, J. P. et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 839-846, 23 set. 2009.
 37. DAVIS, M. E. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, n. 7.291, p. 1.067-1.070, 21 abr. 2010.
 38. DE ALMEIDA, C. E. B. et al. Aptamer delivery of siRNA, radiopharmaceutics and chemotherapy agents in cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 525, n. 2, p. 334-342, jun. 2017.
 39. DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; GREGORIO, E. Vaccines for the 21st century. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 708-720, jun. 2014.
 40. DEWEERDT, S. RNA therapies explained. **Nature**, v. 574, n. 7.778, p. S2-S3, 17 out. 2019.
 41. DINIS ANO BOM, A. P. et al. Aptamers as delivery agents of siRNA and chimeric formulations for the treatment of cancer. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, p. 684, 16 dez. 2019.
 42. DONG, J. et al. EGFR aptamer-conjugated liposome-polycation-DNA complex for targeted delivery of SATB1 small interfering RNA to choriocarcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 849-859, nov. 2018.
 43. DOUGHERTY, C.; CAI, W.; HONG, H. Applications of aptamers in targeted imaging: state of the art. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 1.138-1.152, 17 abr. 2015.
 44. ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, v. 346, n. 6.287, p. 818-822, ago. 1990.
 45. FAGHFURI, E. et al. Recent developments of RNA-based vaccines in cancer immunotherapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 21, n. 2, p. 201-218, 1º fev. 2021.
 46. FARAVELLI, I. et al. Spinal muscular atrophy - recent therapeutic advances for an old challenge. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 6, p. 351-359, 19 jun. 2015.
 47. FAROKHZAD, O. C. et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 16, p. 6.315-6.320, 18 abr. 2006.
 48. FDA. Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-Covid-19/pfizer-biontech-Covid-19-vaccines#additional>>. Acesso em: 14 dez. 2023.
 49. FERREIRA, C. S. M. et al. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. 866-876, fev. 2009.
 50. FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6.669, p. 806-811, fev. 1998.
 51. FRIEDRICH, M.; AIGNER, A. Therapeutic siRNA: State-of-the-art and future perspectives. **BioDrugs**, v. 36, n. 5, p. 549-571, 23 set. 2022.
 52. GALES, L. Tegsedi (Inotersen): An antisense oligonucleotide approved for the treatment of adult patients with hereditary transthyretin amyloidosis. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 78, 21 maio 2019.
 53. GAO, S. et al. Second-generation aptamer-conjugated PSMA-targeted delivery system for prostate cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1.747, ago. 2011.
 54. GARRELFIS, S. F. et al. Lumasiran, an RNAi therapeutic for primary hyperoxaluria type 1. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 13, p. 1.216-1.226, 1º abr. 2021.
 55. GERMAIN, N. D.; CHUNG, W. K.; SARMIERE, P. D. RNA interference (RNAi)-based therapeutics for treatment of rare neurologic diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 91, p. 101-148, jun. 2023.
 56. GERTZ, M. A. Hereditary ATTR amyloidosis: Burden of illness and diagnostic challenges. **The American journal of managed care**, v. 23, n. 7 Suppl, p. S107-S112, jun. 2017.
 57. GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. Givosiran- Running RNA interference to fight porphyria attacks. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 24, p. 2.366-2.367, 11 jun. 2020.
 58. GOPINATH, S. C. B. Methods developed for SELEX. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 1, p. 171-182, 28 jan. 2007.
 59. GOVONI, A. et al. Time is motor neuron: Therapeutic window and its correlation with pathogenetic mechanisms in spinal muscular atrophy. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6.307-6.318, 2 ago. 2018.
 60. GUARAGNA, A. et al. Synthesis and evaluation of folate-based chlorambucil delivery systems for tumor-targeted chemotherapy. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 84-96, 18 jan. 2012.
 61. GUEVARA, M. L.; PERSANO, F.; PERSANO, S. Advances in lipid nanoparticles for mRNA-based cancer immunotherapy. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 23 out. 2020.
 62. GULINO, A. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3637, jul. 2012.
 63. GUO, X.; HUANG, L. Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 7, p. 971-979, 17 jul. 2012.
 64. GUO, Y.; LEI, K.; TANG, L. Neoantigen vaccine delivery for personalized anticancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2 jul. 2018.
 65. GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug target insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.
 66. HALD ALBERTSEN, C. et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 188, p. 114-416, set. 2022.

67. HAMILTON, J. A.; BENSON, M. D. Transthyretin: A review from a structural perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 10, p. 1.491-1.521, set. 2001.
68. HICKE, B. J. et al. Tumor targeting by an aptamer. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 47, n. 4, p. 668-678, abr. 2006.
69. HIRUNAGI, T. et al. Selective suppression of polyglutamine-expanded protein by lipid nanoparticle-delivered siRNA targeting CAG expansions in the mouse CNS. **Molecular Therapy – Nucleic Acids**, v. 24, p. 1-10, jun. 2021.
70. HOHJOH, H. Disease-causing allele-specific silencing by RNA interference. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 4, p. 522-535, 11 abr. 2013.
71. HU, B. et al. Therapeutic siRNA: State of the art. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 101, 19 jun. 2020.
72. HU, Y. et al. Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells *in vitro*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31970, 22 fev. 2012.
73. HUANG, Y.-F. et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. **ChemBioChem**, v. 10, n. 5, p. 862-868, 23 mar. 2009.
74. JACOBSON, O. et al. PET imaging of tenascin-C with a radio-labeled single-stranded DNA aptamer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 4, p. 616-621, abr. 2015a.
75. JACOBSON, O. et al. 18 F-labeled single-stranded DNA aptamer for pet imaging of protein tyrosine kinase-7 expression. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 11, p. 1.780-1.785, nov. 2015b.
76. JAFARI, R. et al. Anti-mucin1 aptamer-conjugated chitosan nanoparticles for targeted co-delivery of docetaxel and IGF-1R siRNA to SKBR3 metastatic breast cancer cells. **Iranian Biomedical Journal**, v. 23, n. 1, p. 21-33, jan. 2019.
77. JIANG, L. et al. Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria. **Nature Medicine**, v. 24, n. 12, p. 1.899-1.909, 8 dez. 2018.
78. JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 7, p. 421-433, 16 jul. 2015.
79. JUNTAS MORALES, R. et al. Adult-onset spinal muscular atrophy: An update. **Revue Neurologique**, v. 173, n. 5, p. 308-319, maio 2017.
80. KANASTY, R. L. et al. Action and reaction: The biological response to siRNA and its delivery vehicles. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 3, p. 513-524, mar. 2012.
81. KARA, G.; CALIN, G. A.; OZPOLAT, B. RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 182, p. 114.113, mar. 2022.
82. KAUPPINEN, R. Porphyrias. **The Lancet**, v. 365, n. 9.455, p. 241-252, jan. 2005.
83. KEAM, S. J. Vutrisiran: First approval. **Drugs**, v. 82, n. 13, p. 1.419-1.425, 23 set. 2022.
84. KIM, E. et al. Prostate cancer cell death produced by the co-delivery of Bcl-xL shRNA and doxorubicin using an aptamer-conjugated polyplex. **Biomaterials**, v. 31, n. 16, p. 4.592-4.599, jun. 2010.
85. KIM, M. W. et al. Cancer-targeted nucleic acid delivery and quantum dot imaging using EGF receptor aptamer-conjugated lipid nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9.474, 25 ago. 2017.
86. KIM, M. W. et al. Anti-EGF receptor aptamer-guided co-delivery of anti-cancer siRNAs and quantum dots for theranostics of triple-negative breast cancer. **Theranostics**, v. 9, n. 3, p. 837-852, 2019.
87. KRYZA, D. et al. *Ex vivo* and *in vivo* imaging and biodistribution of aptamers targeting the human matrix metalloprotease-9 in melanomas. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149387, 22 fev. 2016.
88. LI, D. et al. Progress in the molecular pathogenesis and nucleic acid therapeutics for Parkinson's disease in the precision medicine era. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 6, p. 2.650-2.681, 6 nov. 2020.
89. LI, D. et al. GMT8 aptamer conjugated PEGylated Ag@Au core-shell nanoparticles as a novel radiosensitizer for targeted radiotherapy of glioma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112-330, mar. 2022a.
90. LI, L. et al. Dual tumor-targeting nanocarrier system for siRNA delivery based on pRNA and modified chitosan. **Molecular Therapy – Nucleic Acids**, v. 8, p. 169-183, set. 2017.
91. LI, M. et al. The nano delivery systems and applications of mRNA. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 227, p. 113-910, jan. 2022b.
92. LI, N. et al. Technical and biological issues relevant to cell typing with aptamers. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2.438-2.448, 1º maio 2009.
93. LI, Y. et al. A comprehensive review of the global efforts on Covid-19 vaccine development. **ACS Central Science**, v. 7, n. 4, p. 512-533, 28 abr. 2021.
94. LIN, K. et al. Therapeutic HPV DNA vaccines. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1-3, p. 86-112, 12 jul. 2010.
95. LIU, D. et al. The smart drug delivery system and its clinical potential. **Theranostics**, v. 6, n. 9, p. 1.306-1.323, 2016.
96. LIU, Q. et al. Targeted delivery of Rab26 siRNA with precisely tailored DNA prism for lung cancer therapy. **ChemBioChem**, v. 20, n. 9, p. 1.139-1.144, 2 maio 2019.
97. LIU, Z. et al. Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells *in vitro*. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 148, 20 dez. 2012.
98. LÓPEZ-SAGASETA, J. et al. Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 58-68, 2016.
99. LUO, Y.-L.; SHIAO, Y.-S.; HUANG, Y.-F. Release of photoactivatable drugs from plasmonic nanoparticles for targeted cancer therapy. **ACS Nano**, v. 5, n. 10, p. 7.796-7.804, 25 out. 2011.
100. LUO, Z. et al. Precise glioblastoma targeting by AS1411 aptamer-functionalized poly (l-y-glutamylglutamine)-paclitaxel nanoconjugates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 783-796, mar. 2017.
101. LV, T. et al. Chloroquine in combination with aptamer-modified nanocomplexes for tumor vessel normalization and efficient erlotinib/Survivin shRNA co-delivery to overcome drug resistance in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. **Acta Biomaterialia**, v. 76, p. 257-274, ago. 2018.
102. MAIRAL, T. et al. Aptamers: Molecular tools for analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 4, p. 989-1007, 21 fev. 2008.
103. MALONE, R. W.; FELGNER, P. L.; VERMA, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6.077-6.081, ago. 1989.
104. MARTINI, P. G. V.; GUEY, L. T. A new era for rare genetic diseases: Messenger RNA therapy. **Human Gene Therapy**, v. 30, n. 10, p. 1.180-1.189, 1º out. 2019.
105. MARTINON, F. et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome-entrapped mRNA. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1.719-1.722, jul. 1993.

106. MENG, L. et al. Targeted delivery of chemotherapy agents using a liver cancer-specific aptamer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e33434, 25 abr. 2012.
107. MIYATA, K.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: Chemical challenges in the creation of artificial viruses. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2.562-2.574, 2012.
108. MODH, H. B. et al. Specific detection of tetanus toxoid using an aptamer-based matrix. **Journal of Biotechnology**, v. 238, p. 15-21, nov. 2016.
109. MORRISSEY, D. V. et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1.002-1.007, 24 ago. 2005.
110. NAMGUNG, R.; KIM, W. J. A Highly entangled polymeric nanoconstruct assembled by siRNA and its reduction-triggered siRNA release for gene silencing. **Small**, v. 8, n. 20, p. 3.209-3.219, 22 out. 2012.
111. NEEDHAM, D.; MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1.108, n. 1, p. 40-48, jul. 1992.
112. NEUMEIER, J.; MEISTER, G. siRNA specificity: RNAi mechanisms and strategies to reduce off-target effects. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 28 jan. 2021.
113. NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. Nova York: Oxford University Press, 1990.
114. NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. The RNAi revolution. **Nature**, v. 430, n. 6.996, p. 161-164, 8 jul. 2004.
115. OBICI, L.; MUSSINELLI, R. Current and emerging therapies for hereditary transthyretin amyloidosis: Strides towards a brighter future. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 4, p. 2.286-2.302, 30 out. 2021.
116. OKUMURA, A.; PITHA, P. M.; HARTY, R. N. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3.974-3.979, 11 mar. 2008.
117. PAYNE, D. RNA therapies. **Nature**, v. 574, n. 7.778, p. S1-S1, 17 out. 2019.
118. PIEVE, C. da; PERKINS, A. C.; MISSAILIDIS, S. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with ^{99m}Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 36, n. 6, p. 703-710, ago. 2009.
119. PINTO, A. et al. Real-time apta-PCR for 20 000-fold improvement in detection limit. **Molecular BioSystems**, v. 5, n. 5, p. 548, 2009.
120. PLANTE-BORDENEUVE, V. Update in the diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. **Journal of Neurology**, v. 261, n. 6, p. 1.227-1.233, 3 jun. 2014.
121. PORCIANI, D. et al. Aptamer-mediated codelivery of doxorubicin and NF-κB decoy enhances chemosensitivity of pancreatic tumor cells. **Molecular Therapy – Nucleic Acids**, v. 4, p. e235, 2015.
122. POWELL, D. et al. Aptamer-functionalized hybrid nanoparticle for the treatment of breast cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 108-118, maio 2017.
123. SAHIN, U. et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. **Nature**, v. 547, n. 7.662, p. 222-226, 13 jul. 2017.
124. SAHIN, U.; TÜRECI, Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. **Science**, v. 359, n. 6.382, p. 1.355-1.360, 23 mar. 2018.
125. SAJJID, M. I. et al. Overcoming barriers for siRNA therapeutics: From bench to bedside. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 294, 7 out. 2020.
126. SANLIOGLU, S. **Gene Therapy for Human Genetic Diseases**. Disponível em: <<http://genetherapy.akdeniz.edu.tr/assets/files/Gene-Therapy2022.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2023.
127. SANTOS DO CARMO, F. et al. Anti-MUC1 nano-aptamers for triple-negative breast cancer imaging by single-photon emission computed tomography in induced animals: Initial considerations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 53-60, dez. 2016.
128. SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: Nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 3, p. 501-505, nov. 2003.
129. SCHMITT, C. et al. Recurrent attacks of acute hepatic porphyria: Major role of the chronic inflammatory response in the liver. **Journal of Internal Medicine**, v. 284, n. 1, p. 78-91, jul. 2018.
130. SCOTT, L. J. Givosiran: First approval. **Drugs**, v. 80, n. 3, p. 335-339, 8 fev. 2020.
131. SHABABI, M.; LORSON, C. L.; RUDNIK-SCHÖNEBORN, S. S. Spinal muscular atrophy: A motor neuron disorder or a multi-organ disease? **Journal of Anatomy**, v. 224, n. 1, p. 15-28, jan. 2014.
132. SHEN, H.; SUN, T.; FERRARI, M. Nanovector delivery of siRNA for cancer therapy. **Cancer Gene Therapy**, v. 19, n. 6, p. 367-373, 4 jun. 2012.
133. SHEN, X.; COREY, D. R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 4, p. 1.584-1.600, 28 fev. 2018.
134. SILVINATO, A.; BERNARDO, W. M. Spinal muscular atrophy 5Q – Treatment with nusinersen. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 6, p. 484-491, jun. 2018.
135. SLEDZ, C. A.; WILLIAMS, B. R. G. RNA interference in biology and disease. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 787-794, 1º ago. 2005.
136. SMITH, E. S. et al. Clinical applications of short non-coding RNA-based therapies in the era of precision medicine. **Cancers**, v. 14, n. 6, p. 1.588, 21 mar. 2022.
137. SOLINAS, C.; VAJDA, F. J. E. Neurological complications of porphyria. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 263-268, mar. 2008.
138. SONG, K.-M.; LEE, S.; BAN, C. Aptamers and their biological applications. **Sensors**, v. 12, n. 1, p. 612-631, 9 jan. 2012.
139. SUBRAMANIAN, N. et al. Target-specific delivery of doxorubicin to retinoblastoma using epithelial cell adhesion molecule aptamer. **Molecular vision**, v. 18, p. 2.783-2.795, 2012.
140. SUBRAMANIAN, N. et al. Targeting cancer cells using LNA-modified aptamer-siRNA chimeras. **Nucleic Acid Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 317-322, dez. 2015.
141. SUN, H.; TAN, W.; ZU, Y. Aptamers: Versatile molecular recognition probes for cancer detection. **The Analyst**, v. 141, n. 2, p. 403-415, 2016.
142. SYED, Y. Y. Givosiran: A review in acute hepatic porphyria. **Drugs**, v. 81, n. 7, p. 841-848, 19 maio 2021.
143. TAGHAVI, S. et al. Polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes tagged with AS1411 aptamer for combination gene and drug delivery into human gastric cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1-2, p. 301-312, jan. 2017.

144. TAGHDISI, S. M. et al. Targeted delivery of daunorubicin to T-cell acute lymphoblastic leukemia by aptamer. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 4, p. 277-281, 27 maio 2010.
145. TEGSEDI. Patients treated with TEGSEDI® (inotersen) saw significant benefit in neuropathy and QoL vs placebo. [s.d.]. Disponível em: <<https://tegsedihcp.com/about-tegsedi/>>. Acesso em: 14 dez. 2023.
146. TENCHOV, R. et al. Lipid nanoparticles – From liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. **ACS Nano**, v. 15, n. 11, p. 16.982-17.015, 23 nov. 2021.
147. THORLEY, A. J.; TETLEY, T. D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, n. 2, p. 176-185, nov. 2013.
148. TILLI, T. M. et al. Validation of a network-based strategy for the optimization of combinatorial target selection in breast cancer therapy: siRNA knockdown of network targets in MDA-MB-231 cells as an in vitro model for inhibition of tumor development. **Oncotarget**, v. 7, n. 39, p. 63.189-63.203, 27 set. 2016.
149. TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: Machines for RNAi. **Genes & Development**, v. 19, n. 5, p. 517-529, 1º mar. 2005.
150. TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, fev. 2005.
151. TRINH, T. LE et al. A synthetic aptamer-drug adduct for targeted liver cancer therapy. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0136673, 2 nov. 2015.
152. TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, v. 249, n. 4.968, p. 505-510, 3 ago. 1990.
153. VAN NUFFEL, A. M. et al. Dendritic cells loaded with mRNA encoding full-length tumor antigens prime CD4+ and CD8+ T cells in melanoma patients. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 5, p. 1.063-1.074, maio 2012.
154. VARMIRA, K. et al. A HER2-targeted RNA aptamer molecule labeled with 99mTc for single-photon imaging in malignant tumors. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 40, n. 8, p. 980-986, nov. 2013.
155. VARMIRA, K. et al. An improved radiolabelled RNA aptamer molecule for HER2 imaging in cancers. **Journal of Drug Targeting**, v. 22, n. 2, p. 116-122, 7 fev. 2014.
156. VENTOLA, C. L. The nanomedicine revolution, part 1: emerging concepts. **P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 37, n. 9, p. 512-525, set. 2012.
157. VERBEKE, R. et al. Three decades of messenger RNA vaccine development. **Nano Today**, v. 28, p. 100-766, out. 2019.
158. WANG, A. Z. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy. **ChemMedChem**, v. 3, n. 9, p. 1.311-1.315, 15 set. 2008.
159. WANG, Z. et al. Rigid nanoparticle-based delivery of anti-cancer siRNA: Challenges and opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 831-843, jul. 2014.
160. WARDEN, B. A.; DUELL, P. B. Inclisiran: A novel agent for lowering apolipoprotein B-containing lipoproteins. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. e157-e174, ago. 2021.
161. WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 129-138, fev. 2009.
162. WILNER, S. E. et al. An RNA Alternative to human transferrin: A new tool for targeting human cells. **Molecular Therapy – Nucleic Acids**, v. 1, p. e21, 2012.
163. WU, M. et al. Ultrasound-mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of A10-3.2 aptamer targeted and siRNA-loaded cationic nanobubbles for therapy of prostate cancer. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 226-240, 1 jan. 2018.
164. WU, X. et al. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma *in vivo*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90752, 6 mar. 2014.
165. XIA, H. et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 816-820, 4 ago. 2004.
166. XU, X. et al. Multifunctional envelope-type siRNA delivery nanoparticle platform for prostate cancer therapy. **ACS Nano**, v. 11, n. 3, p. 2.618-2.627, 28 mar. 2017.
167. XU, Y. et al. Specific delivery of delta-5-desaturase siRNA via RNA nanoparticles supplemented with dihomogamma-linolenic acid for colon cancer suppression. **Redox Biology**, v. 21, p. 101.085, fev. 2019.
168. YAN, W. et al. Overcoming drug resistance in colon cancer by aptamer-mediated targeted co-delivery of drug and siRNA using grapefruit-derived nanovectors. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 79-91, 2018.
169. YANG, L. et al. Design of nanomaterial based systems for novel vaccine development. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 5, p. 785-802, 2016.
170. YAO, V. J. et al. Ligand-targeted theranostic nanomedicines against cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 267-286, out. 2016.
171. YEKTA, S.; SHIH, I.; BARTEL, D. P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. **Science**, v. 304, n. 5.670, p. 594-596, 23 abr. 2004.
172. YOU, X.-G. et al. Molecular magnetic resonance probe targeting VEGF165: Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 9, n. 5, p. 349-354, set. 2014.
173. YU, M. K. et al. Image-guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Small**, v. 7, n. 15, p. 2.241-2.249, 8 ago. 2011.
174. ZHANG, K. et al. Aptamer-modified temperature-sensitive liposomal contrast agent for magnetic resonance imaging. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 2.618-2.623, 14 set. 2015.
175. ZHAO, J. et al. Enhancement of radiosensitization by silver nanoparticles functionalized with polyethylene glycol and aptamer As1411 for glioma irradiation therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9.483-9.496, dez. 2019.
176. ZHAO, J. et al. Increasing the accumulation of aptamer AS1411 and verapamil conjugated silver nanoparticles in tumor cells to enhance the radiosensitivity of glioma. **Nanotechnology**, v. 32, n. 14, p. 145.102, 2 abr. 2021.
177. ZHAO, N. et al. A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 2, 31 dez. 2011.
178. ZHU, X. et al. Systemic mRNA therapy for the treatment of fabry disease: Preclinical studies in wild-type mice, fabry mouse model, and wild-type non-human primates. **The American Journal of Human Genetics**, v. 104, n. 4, p. 625-637, abr. 2019.
179. ZICHEL, R. et al. Aptamers as a sensitive tool to detect subtle modifications in therapeutic proteins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31948, 27 fev. 2012.

Parte VII

O futuro da biotecnologia na saúde

O futuro da biotecnologia na saúde

Beatriz de Castro Fialho

Ana Carolina Ramos Guimarães

Stephen Doral Stefani

Ana Paula Dinis Ano Bom

Martín Bonamino

Patrícia Cristina da Costa Neves

“[...] technology [...] discloses man’s mode of dealing with Nature, and the process of production by which he sustains his life, and thereby also lays bare the mode of formation of his social relations, and of the mental conceptions that flow from them.”

(MARX, 1867, p. 406)

Ao mesmo tempo que é necessário compreender a evolução histórica das tecnologias, é importante entender os impactos dessas tecnologias na sociedade. Isso porque, ao alterarem os meios materiais de vida, as tecnologias também afetam as relações sociais.

As tecnologias e suas inovações não devem ser compreendidas como detentoras de um fim em si, ou ainda como a principal força motriz do desenvolvimento socioeconômico. Devem ser vistas como uma das inúmeras formas de lidar com o mundo e como elementos de diferenciação entre atores econômicos, com uma infinidade de impactos sobre o tecido social e a dinâmica de competição (HARVEY, 2003). É a partir dessa compreensão que este capítulo abordará o histórico evolutivo e o futuro da biotecnologia.

Essa perspectiva de passado, presente e futuro, em qualquer campo do conhecimento, é complexa por natureza. Uma forma de começar é abordando a questão da incerteza. Desde a década de 1960, a percepção sobre o nível de incerteza mundial vem sendo monitorada e, ao longo das diversas crises econômicas, dos conflitos armados, dos surtos, das epidemias e das pandemias, observa-se picos de incerteza (WORLD UNCERTAINTY INDEX, 2023). Lidar com a incerteza é um processo complexo para os seres humanos, que, diante de um mundo altamente volátil, dinâmico e incerto, buscam minimamente tentar antecipar o futuro (AKALIN, 2006; VAN LIESHOUT et al., 2018, 2021).

Uma vez que a incerteza não pode ser calculada nem mitigada, como no caso de riscos (SIMON, 1955), há

um grande interesse em estudos de prospecção. Não obstante as diversas definições ao termo “prospecção”, é possível afirmar que esse é um processo que envolve o estabelecimento de heurísticas para refletir e propor cenários de futuro com o intuito de definir estratégias de atuação diante das tendências e expectativas (DINGLI; HARPER, 2002; EHLS et al., 2022; HARPER; GEORGHIU, 2005; MILES, 2010; POPPER, 2009; ROHRBECK; BATTISTELLA; HUIZINGH, 2015).

17.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A atividade industrial teve seu início marcado pelo surgimento das primeiras máquinas ainda no século XVII, principalmente a partir do desenvolvimento da tecnologia para a geração de energia a vapor. É frequente observar certa sobreposição – e em alguma medida também contraposição – de conceitos sobre a demarcação entre os diferentes ciclos de mudança nos paradigmas associados à evolução da indústria. Desde os economistas clássicos, a ciência econômica vem discutindo os processos de contração e expansão da economia e como eles se relacionam com os processos de crescimento e de desenvolvimento econômico (ROSTOW; KENNEDY, 1990). Um dos pontos em comum é a ênfase no movimento de longo prazo, como aqueles eventos que representaram ou representarão o surgimento de uma “nova onda longa” que altera a dinâmica econômica. Sem adentrar no debate sobre as diferenças entre autores e suas raízes teóricas,

tampouco nas implicações conceituais nos diferentes campos de conhecimento, das políticas públicas ou da vida cotidiana, costuma-se demarcar a evolução da indústria, ou das revoluções industriais, a partir da visão de longo prazo. A Primeira Revolução Industrial começou no final do século XVII e seguiu até meados do século XIX; a Segunda Revolução ocorreu do final do século XIX ao segundo quarto do século XX; e a Terceira Revolução Industrial, do terceiro quarto do século XX ao início do século XXI (Figura 17.1).

Segundo Liao et al. (2017), o termo “Quarta Revolução Industrial” teria sido utilizado pela primeira vez em um trabalho de Rostow e Kennedy (1990). Mas somente a partir da primeira década do século XXI é que o termo se tornou amplamente difundido (CASTAGNOLI et al., 2022; COMMISSION et al., 2021; CULOT et al., 2020; DEMIR; DÖVEN; SEZEN, 2019; DUGGAL et al., 2022; KLINGENBERG; BORGES; ANTUNES, 2022; LEMSTRA; DE MESQUITA, 2023; LIAO et al., 2017). Dentre as características principais da Quarta Revolução Industrial, estão:

- **Conectividade:** caracterizada pelo desenvolvimento de tecnologias que permitem conectar o mundo material com o mundo informacional, e que dispositivos *blockchain* e sistemas se comuniquem entre si. Exemplos: realidade virtual, realidade aumentada, a Internet das Coisas (IoT), tecnologias semânticas, redes 5G e sensores sem fio.
- **Grandes volumes de dados:** a busca pela redução da incerteza e a geração cada vez mais veloz de informação e conhecimento impulsionaram o desenvolvimento de tecnologias voltadas à coleta, à análise e à utilização de grandes quantidades de dados. Exemplos: análise de *big data*, inteligência artificial (IA) e aprendizado de máquina (*machine learning*), modelagem preditiva, entre outros.
- **Poder computacional:** em função da convergência entre tecnologias de alta conectividade e massas cada vez maiores de dados, têm sido buscadas e desenvolvidas novas tecnologias que permitam processar e analisar grandes quantidades de dados em tempo real. Exemplos: computação em nuvem (*cloud computing*), computação de borda (*edge computing*) e computação quântica (*quantum computing*).
- **Automação e sistemas ciberfísicos:** outra característica é o crescente aumento do uso da robótica e da manufatura aditiva em diferentes setores, permitindo a integração de tecnologias digitais e máquinas e equipamentos utilizados em diferentes processos. Exemplos: fábricas inteligentes, impressão 3D, robôs autônomos, integração entre sensores e dispositivos baseados em IoT, entre outros.

Essas novas tecnologias baseiam-se, sobretudo, na elevada capacidade de modularização, descentralização, interoperabilidade, agilidade e personalização. Para tanto, cada vez mais se caminha para ecossistemas de informação agnósticos que possibilitam acompanhar mudanças cada vez mais velozes (AAEN; NIELSEN; CARUGATI, 2022; CONSTANTIOU; KALLINIKOS, 2015; GHOBAKHLOO, 2018).

A partir de reflexões sobre a interação dessas novas tecnologias com o ser humano, foi proposto mais recentemente o termo “indústria 5.0” ou, até mesmo, “indústria 6.0”. A principal ideia, subjacente ao conceito de indústria 5.0, está relacionada à interação e à coexistência com o ser humano, e, nesse sentido, as tecnologias deveriam ser desenvolvidas a partir dessa perspectiva, como é o caso dos robôs colaborativos (COMMISSION et al., 2021; DEMIR; DÖVEN; SEZEN, 2019; RAJA SANTHI; MUTHUSWAMY, 2023). No caso da indústria 6.0, trata-se mais de um exercício de prospecção sobre o caminho que está apontando ao futuro, como impressão multidimensional, robótica assistiva domiciliar, uso cumulativo de mais de uma fonte de energia sustentável, entre outras (DUGGAL et al., 2022). Muito provavelmente, os conceitos de indústria 5.0 e indústria 6.0 estão mais associados com a percepção sobre o impacto das aplicações no modo de vida do que com a visão de longo prazo sobre os ciclos de desenvolvimento e crescimento econômico. De maneira simplificada, a Figura 17.1 apresenta as diferentes revoluções industriais ao longo do tempo.

No caso da Indústria 4.0, um estudo recente realizado por McKinsey Chui, Roberts e Yee (2022) analisou a magnitude do impacto de 14 tendências tecnológicas a partir de um *ranking* de inovação, com base em dados de patente e publicações; e um ranking de interesse, com base na frequência com que tais tecnologias aparecem em mecanismos de busca e na mídia. A maioria dos segmentos, de alguma forma, está associada a 14 tendências: (i) conectividade avançada; (ii) IA aplicada; (iii) computação em nuvem e de borda; (iv) tecnologias imersivas; (v) aprendizado de máquina em escala industrial; (vi) desenvolvimento de *software* de próxima geração; (vii) tecnologias quânticas; (viii) arquiteturas confiáveis e identidade digital; (ix) web 3; (x) bioengenharia; (xi) energias limpas; (xii) tecnologias de mobilidade; (xiii) tecnologia espacial; e (xiv) consumo sustentável (Figura 17.2).

Nem todas as tecnologias apresentam a mesma relevância para todos os segmentos, e algumas delas não estão no mesmo estágio de maturidade. Dessas 14 tendências, as que vêm recebendo maiores investimentos são: (i) IA aplicada; (ii) conectividade avançada; (iii) aprendizado de máquina em escala industrial; (iv) tec-



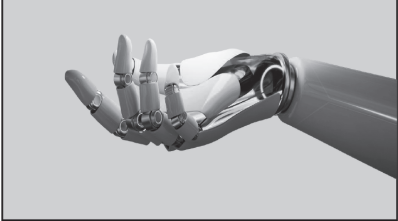


<p>A Primeira Revolução Industrial (final do séc. XVII a meados do séc. XIX)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Mecanização • Carvão e energia a vapor • Ferrovias 		<ul style="list-style-type: none"> • Computadores e microeletrônica • Automação industrial • Energias híbridas (fósseis, renováveis e nuclear) 		<p>A Quinta Revolução Industrial (a partir da segunda década do séc. XXI)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Biônica • Impressão • Energias renováveis
<p>A Segunda Revolução Industrial (final séc. XIX ao 2º quarto século XX)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Motor a combustão • Linhas de montagem • Produção em massa • Fontes de energia 		<ul style="list-style-type: none"> • Internet das coisas • Digitalização • Realidade aumentada • <i>Big data</i> 	<p>A Segunda Revolução Industrial (final séc. XIX ao 2º quarto século XX)</p>	<p>A Quarta Revolução Industrial (primeiras duas décadas do séc. XXI)</p>	

FIGURA 17.1 Da Primeira à Quinta Revolução Industrial.

Fonte: elaborada pelos autores, com base em Castagnoli et al. (2022), Commission et al. (2021), Culot et al. (2020), Demir, Dönen e Sezen (2019), Duggal et al. (2022), Klingenberg, Borges e Antunes (2022), Liao et al. (2017) e Raja Santhi e Muthuswamy (2023). A imagem utiliza elementos do DALL-E da OpenAI.

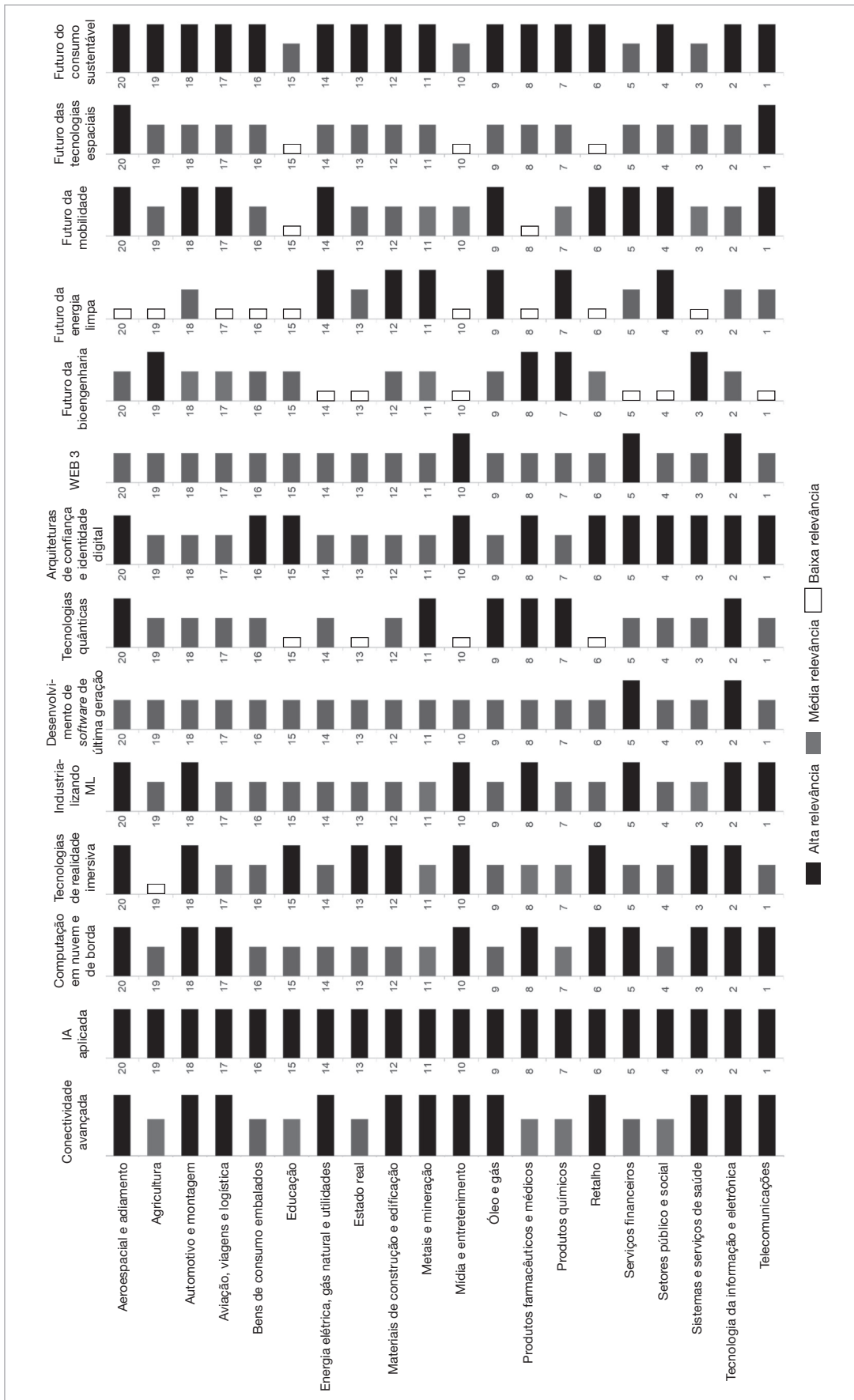


FIGURA 17.2 Principais tendências tecnológicas. Fonte: elaborada a partir de Chui, Roberts e Yee (2022).

nologias de mobilidade; e (v) energias limpas. A Figura 17.3 expõe de maneira gráfica esse cenário.

Em relação às barreiras para a adoção dos novos paradigmas introduzidos com a Quarta Revolução Industrial, elas vão variar de organização para organização, de país para país e de região para região. Cugno, Castagnoli e Büchi (2021) e Raj et al. (2020) observaram que as principais barreiras são:

I. Estratégicas:

- Ausência de interesse de determinadas organizações em adotar essas novas tecnologias pela falta de clareza dos ganhos diante da missão principal do negócio;
- Necessidade de interconexão com a cadeia de valor, principalmente a cadeia logística;
- Ausência de redes de parcerias entre as organizações para a adoção das novas tecnologias;
- Ausência de estratégia de transformação digital.

II. Organizacionais:

- Descompasso entre as características da Indústria 4.0 e os processos organizacionais;
- Resistência da organização a mudanças vs. necessidade de prontidão para a transformação;

- Gestão da mudança ineficaz e baixa efetividade.

III. Recursos:

- Necessidade de profissionais especializados em determinadas tecnologias e, ao mesmo tempo, capazes de uma visão generalista e de colaboração em equipes multidisciplinares;
- Falta de recursos para investimentos em novas tecnologias;
- Infraestrutura insuficiente para suportar tecnologias altamente conectivas;
- Falta de competência nas novas tecnologias digitais.

IV. Conhecimento:

- Ausência de consenso e baixa apreensão do que consiste na Indústria 4.0, suas aplicações e a interdependência entre as diferentes tecnologias sob a óptica da convergência;
- Falta de cultura digital interna às organizações e treinamento.

V. Regulatório:

- Ausência de padrões claros nas diversas áreas de conhecimento e tecnologias;

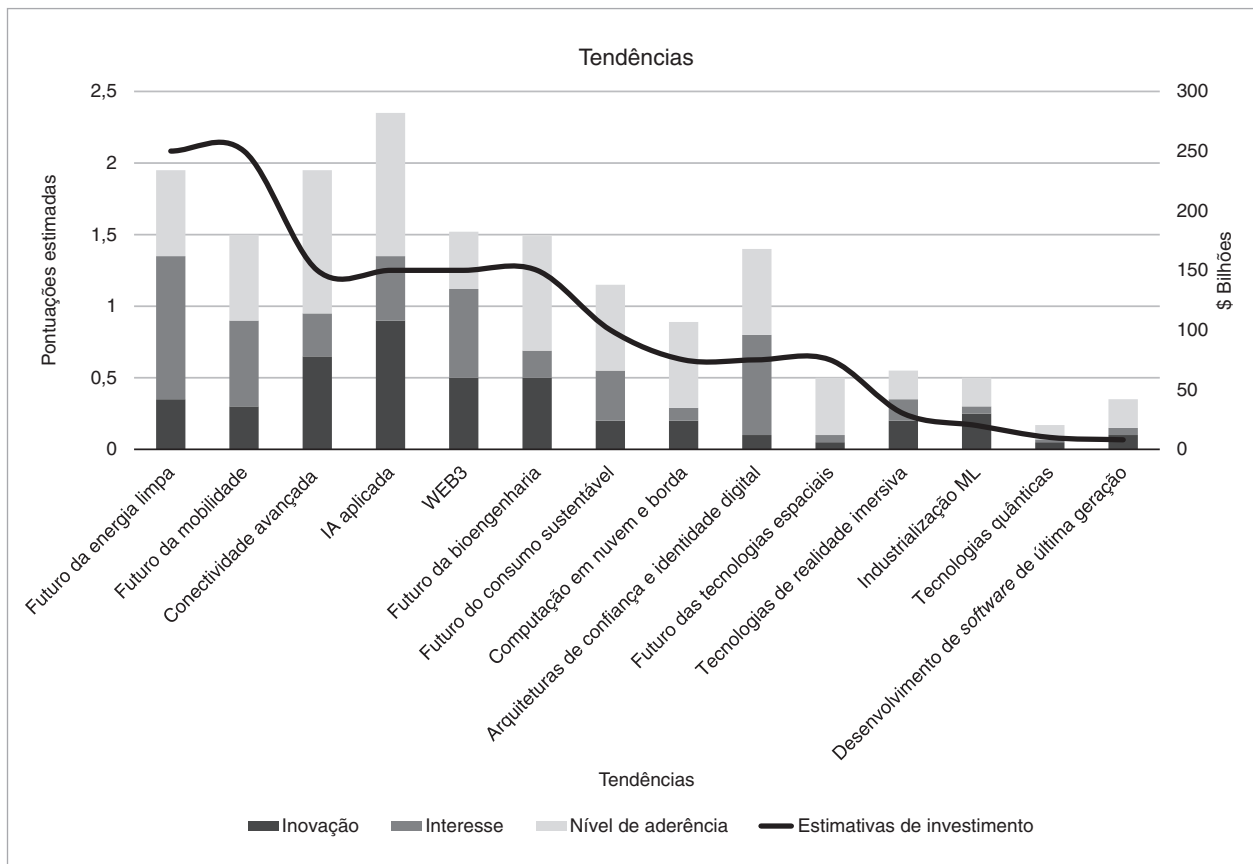


FIGURA 17.3 Tendências tecnológicas: inovação, interesse, investimento e adoção (2021).

Fonte: elaborada a partir de Chui, Roberts e Yee (2022).

- Incertezas quanto ao marco legal sobre a propriedade intelectual, proteção a dados e ética informacional.

Porém, as revoluções industriais não têm sido observadas em todos os países ao mesmo tempo, nem com a mesma magnitude e proeminência. Dentre os fatores que influenciam a geração, a introdução e a difusão de novas tecnologias, estão: (i) a divisão internacional de trabalho caracterizada pela concentração desses processos nos países mais avançados; (ii) a forma de inserção desses países na economia mundial; (iii) a vulnerabilidade externa dos países menos desenvolvidos; (iv) barreiras ao acesso à tecnologia; (v) infraestrutura; e (vii) as consequências socioeconômicas do desenvolvimento tardio (ARCHIBUGI; MICHIE, 1995; CHANDRA et al., 2009; CIRERA; COMIN; CRUZ, 2022; EUGSTER et al., 2018; FILHA et al., 2014; KELLER, 2004; UNITED NATIONS, 2018; VILAÇA JUNIOR, 2017; WORLD BANK, 2018).

Se, por um lado, o Brasil tem apresentado um volume cada vez maior de publicações científicas sobre a Indústria 4.0 (IVALE; SILVA; NÄÄS, 2021), por outro lado, a adoção dessas tecnologias vem ocorrendo lentamente. A maioria das iniciativas em andamento está associada à modernização dos sistemas de informação e automação, digitalização de processos, e tecnologias com intensiva conectividade, imersão e IA (CNI, 2016, 2018; FIESP, 2019; KPMG, 2023).

Alguns estudos recentes sobre as barreiras para a adoção e a difusão das tecnologias com base no paradigma da Indústria 4.0 no Brasil (CONTADOR et al., 2020; FRANK; DALENOGARE; AYALA, 2019; SATYRO et al., 2019; TORTORELLA et al., 2020; TORTORELLA; FETTERMANN, 2018) destacaram as seguintes:

I. Estratégicas:

- Impacto das flutuações no mercado sobre as decisões de investimento;
- Falta de clareza sobre os benefícios na adoção das novas tecnologias.

II. Organizacionais:

- Resistência organizacional, principalmente nos níveis de média gerência;
- Estrutura e cultura da organização.

III. Recursos:

- Necessidade de altos investimentos para a transição tecnológica;
- Infraestrutura de segurança;
- Falta de profissionais qualificados.

IV. Conhecimento:

- Compreensão sobre essas novas tecnologias ainda bastante inicial em muitas organizações.

V. Regulatório:

- Falta de padronização.

Embora as limitações observadas nesses estudos sobre o Brasil sejam semelhantes ao que é observado em nível mundial, a adoção dessas tecnologias em países em desenvolvimento acontece mais lentamente e com menores efeitos de transbordamento. Ao mesmo tempo, observa-se um impacto mais profundo no mundo do trabalho e na competitividade dos setores econômicos nos países em desenvolvimento. Grande parte desse problema está atrelada às vulnerabilidades da economia brasileira e à desindustrialização que o país vem sofrendo de maneira mais contundente desde o final do século XX (FILHA et al., 2014; NASSIF; MORCEIRO, 2023; ROCHA, 2021; SUZIGAN; GARCIA; ASSIS FEITOSA, 2021). Se, por um lado, por força da dinâmica industrial mundial, há uma pressão no sentido da modernização e da adoção de novas tecnologias, por outro lado, há um grande debate em torno das implicações dessas tecnologias no contexto brasileiro, por exemplo, as relacionadas aos desafios no mundo do trabalho em razão dos altos níveis de desemprego observados e da reduzida qualificação da população economicamente ativa (ROCHA, 2021).

Esse contexto é ainda mais desafiador quando se observa a defasagem no grau de sofisticação tecnológica e na adoção de novas tecnologias, inclusive as tecnologias digitais, por países em desenvolvimento (CIRERA; COMIN; CRUZ, 2022; RAMÍREZ-DJUMENA, 2016; UNCTAD, 2019, 2021; UNITED NATIONS, 2018). Essa defasagem torna mais complexa a adoção e a difusão das tecnologias do paradigma da Indústria 4.0, principalmente porque esses países precisam superar vários desafios, como altos índices de pobreza, fome, falta de saneamento básico, evasão escolar etc.

Por último, é preciso também considerar que as tecnologias da Indústria 4.0 vão requerer capacidades de armazenamento e processamento de dados cada vez maiores (OPENAI, 2018). Essa trajetória, de aumento crescente, pode ter um forte impacto no clima, uma vez que há cada vez mais recursos necessários, e muitos deles têm fontes não renováveis. Inclusive, um grupo de pesquisadores (LACOSTE et al., 2019) desenvolveu uma calculadora para avaliar a pegada de carbono associada à adoção de aprendizagem de máquina (SCHMIDT et al., 2023). Tais tendências implicam a necessidade de se investir em energias limpas para a redução do impacto ambiental dessas tecnologias (DHAR, 2020; SCHWARTZ et al., 2020).

Diversos trabalhos têm analisado as mudanças tecnológicas no setor biofarmacêutico ao longo da evolução da indústria mundial em países em desenvolvimento (ARORA et al., 1998; FIALHO, 2005; LIEBENAU, 1987; MALERBA; ORSENIGO, 2015; SRINIVAS, 2004). Recentemente, com o surgimento do conceito “Indústria 4.0”,

também vem sendo feito um esforço para analisar essas trajetórias com um paralelo traçado com as revoluções industriais (p. ex., ARDEN et al., 2021; HUNTER, 2020; KARATAS et al., 2022; LI; CARAYON, 2021; LOBO BORBA; WORANOVICZ CARVALHO, 2023; PAUL et al., 2021B; REINHARDT; OLIVEIRA; RING, 2020; SISODIA; JINDAL, 2021). A Figura 17.4 apresenta, de maneira esquemática, a evolução das tecnologias nessas duas áreas em paralelo com a evolução industrial de uma forma mais global.

Em suma, inúmeras aplicações na área da saúde vêm sendo impulsionadas, em especial desde a década de 1990, por novas abordagens computacionais como a química combinatorial, a bioinformática e a biologia computacional. Mais recentemente, o desenvolvimento de grandes modelos com base em linguagem de processamento natural tem apontado para um futuro ainda mais revolucionário. A Figura 17.5 exhibe a tendência das tecnologias digitais emergentes na área da saúde, considerando o progresso observado e as expectativas quanto à adoção e à difusão.

17.2 TECNOLOGIAS DIGITAIS NA ÁREA DA SAÚDE E A BIOINFORMÁTICA

As análises assistidas por computador utilizando programas especializados passaram a fazer parte da

rotina de modernos laboratórios de pesquisa, desde a análise de sequências de DNA, RNA ou proteínas até uma análise conjunta de dados biológicos de um sistema complexo e sua interação com o ambiente. É notável que o surgimento e a modernização das tecnologias de sequenciamento, especialmente as de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*), mudaram fundamentalmente os métodos de pesquisa em diversas áreas.

Tais tecnologias basearam-se no desenvolvimento de duas áreas do conhecimento: a bioinformática e a biologia computacional, abrangidas no novo paradigma da Quarta Revolução Industrial. A bioinformática é um campo interdisciplinar que surgiu com o propósito de analisar, interpretar e processar os dados biológicos gerados, atuando em parceria com áreas como biologia, química, física, ciência da computação, estatística, matemática e engenharias. Para tanto, são aplicados métodos computacionais e analíticos a problemas biológicos, referindo-se basicamente a análises envolvendo busca e uso de padrões e estruturas inerentes em dados biológicos e ao desenvolvimento de novos métodos para acesso e consultas a bancos de dados. O termo “biologia computacional” é com mais frequência usado para referir à simulação física e matemática de processos biológicos. Com o surgimento e o avanço de métodos de alto rendimento para obter e armazenar diferentes tipos de dados biológicos, a linha de divisão entre essas

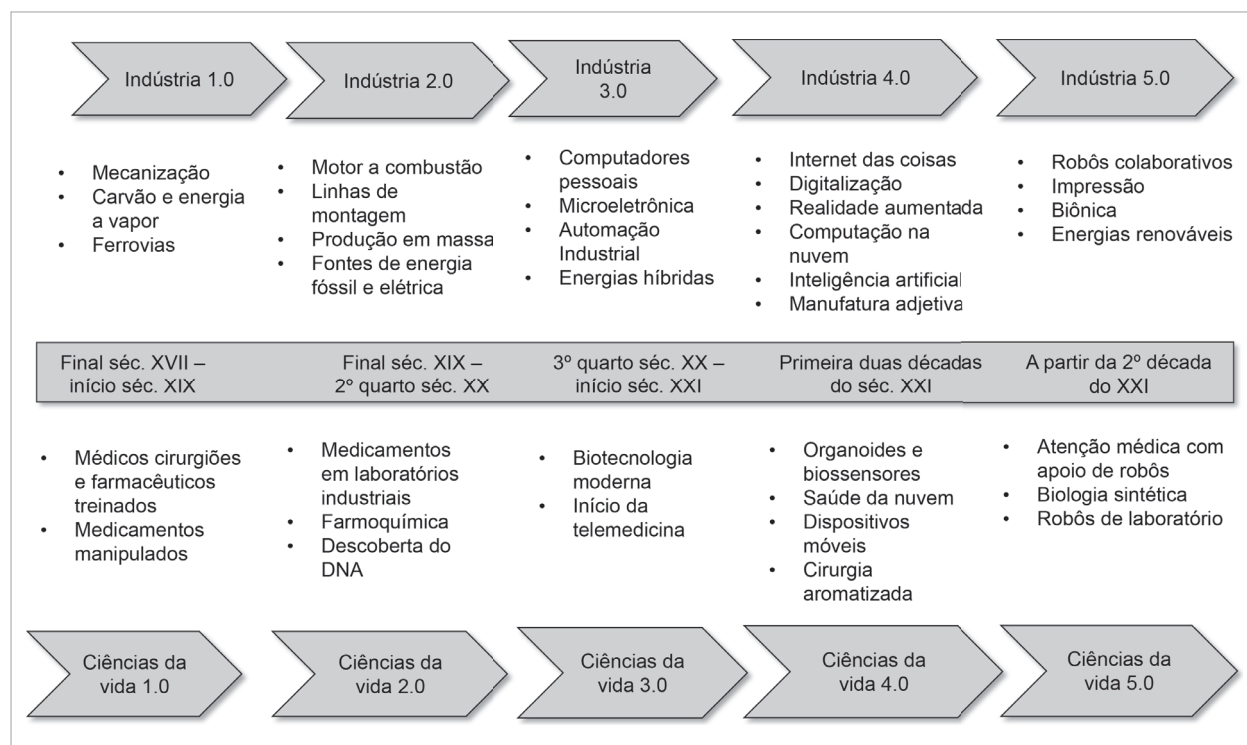


FIGURA 17.4 Evolução industrial e os paradigmas tecnológicos na área da saúde.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Arden et al. (2021), Karatas et al. (2022) e Sisodia e Jindal (2021).

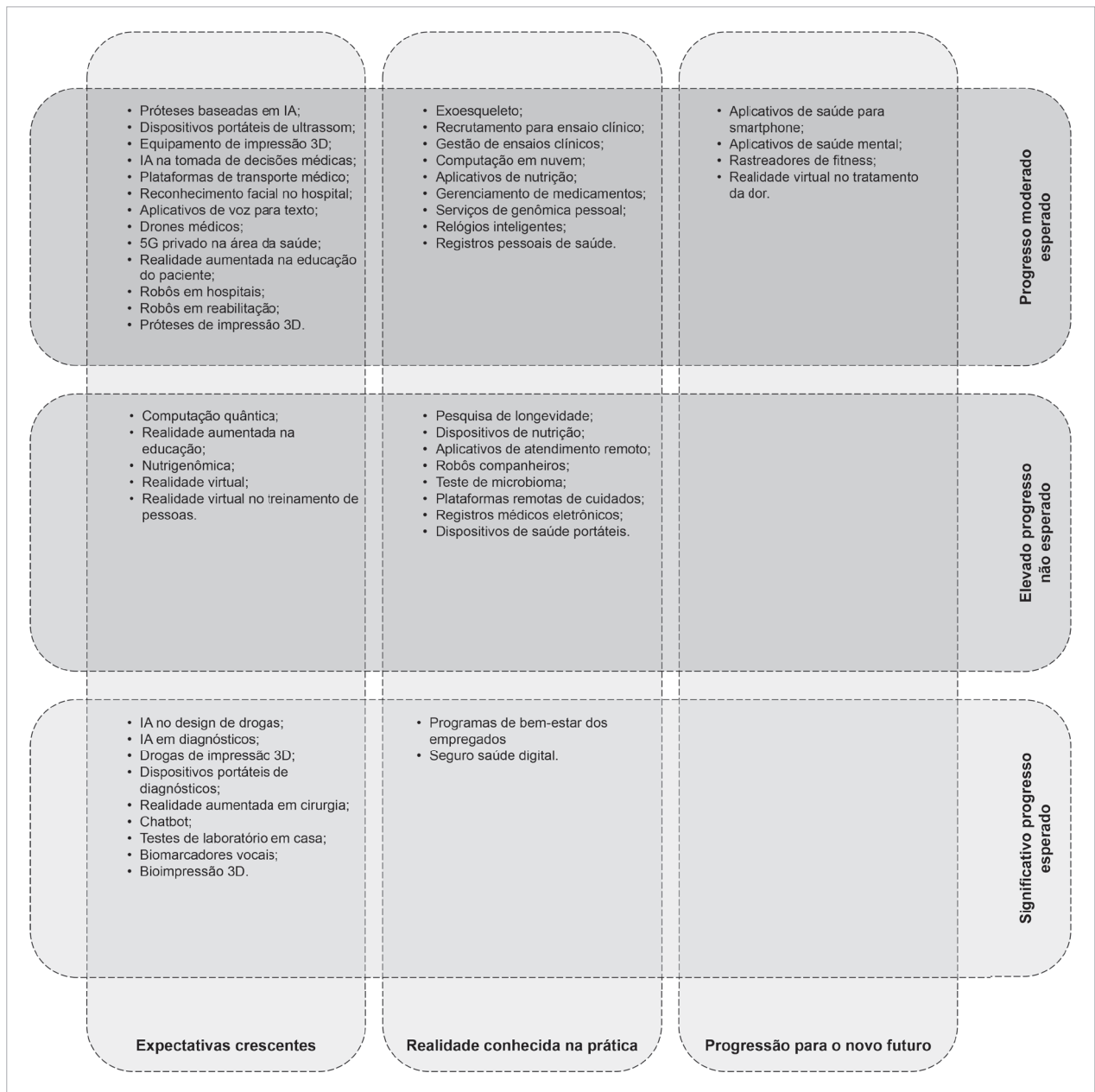


FIGURA 17.5 Principais 50 tendências de tecnologias digitais na área da saúde (2021).

Fonte: elaborada pelos autores a partir de The Medical Futurist (2023).

duas subdisciplinas tornou-se tênue. Nos últimos anos, o quantitativo de dados biológicos publicamente disponível cresceu de modo exponencial. Com a crescente digitalização, o uso da tecnologia da informação não só facilita a aquisição de diferentes tipos de informações e dados, mas também permite a geração, a integração e a síntese de conhecimentos mais abrangentes. Coletivamente, esses dados formam vastos conjuntos conhecidos como *big data*.

Nesse contexto, muitos acreditam que a bioinformática moderna é relativamente recente. Entretanto, o início

dela ocorreu quando ainda não existiam computadores de mesa e a molécula de DNA ainda não podia ser sequenciada (GAUTHIER et al., 2019). O computador moderno digital foi inventado na década de 1940, enquanto a descoberta da existência de uma molécula que armazena o material genético de uma célula apenas foi realizada por Frederick Griffith em 1928, e o papel do DNA como uma molécula codificadora de informação genética foi validado somente em 1952, por Hershey e Chase. Apesar do conhecimento de seu papel principal, pouco se sabia sobre o arranjo da molécula de DNA.

A estrutura de dupla-hélice do DNA foi resolvida por Watson, Crick e Franklin apenas em 1953. Entretanto, apesar dessa descoberta, os primeiros métodos de sequenciamento de DNA levaram mais 25 anos para serem desenvolvidos. Do ponto de vista computacional, apesar da existência do computador digital, foi somente com a revolução da informática, que levou ao aumento da capacidade de armazenamento e do poder de processamento, que as análises necessárias para a obtenção de uma informação biológica relevante puderam ser concretizadas. A evolução da biologia molecular e da informática, paralelamente, permitiu o surgimento de uma área, a bioinformática, capaz de processar uma expressiva quantidade de dados com o intuito de ajudar a entender aspectos importantes de células, organismos, sistemas e do ecossistema como um todo. A utilização do nome bioinformática para definir a nova área em surgimento foi feita em 1970 pelos biólogos Paulien Hogeweg e Ben Hesper. Apesar de não existir uma data precisa, muitos pesquisadores consideram que a bioinformática passou a ser globalmente reconhecida como uma área importante em 1995, com a publicação do primeiro genoma de um organismo de vida livre (*Haemophilus influenzae*).

A bioinformática para a análise de sequências de DNA levou mais tempo que a análise de proteínas, uma vez que a natureza química dessas moléculas era mais bem compreendida. No final da década de 1950, era possível a determinação de estruturas de proteínas por meio de cristalografia, assim como o arranjo da cadeia de aminoácidos de uma proteína, a insulina, havia sido publicado. Com o desenvolvimento e a automação de métodos que possibilitam a obtenção de sequências de proteínas, como o de degradação de Edman, tornou-se mais acessível o sequenciamento de outras proteínas. Em cerca de 10 anos, mais de 15 famílias diferentes de proteínas foram sequenciadas. Apesar da possibilidade de obter sequências de proteínas, o método de sequenciamento de Edman conta com uma dificuldade para obter sequências de proteínas grandes, rendendo um máximo teórico de 50 a 60 aminoácidos sequenciados em uma única reação. Para proteínas maiores, é necessária uma clivagem em fragmentos menores, sequenciados individualmente. O grande desafio para sequenciar proteínas grandes era recuperar a sequência final de proteínas a partir da montagem de centenas de pequenas sequências de peptídeos. No início dos anos 1960 foi desenvolvido um programa de bioinformática, um dos primeiros da história, capaz de montar as sequências de proteínas.

Se é possível dar crédito a uma pessoa pelo nascimento da bioinformática, essa pessoa é a cientista americana Margaret Dayhoff (1925-1983). Pioneira na área, ela foi responsável pela aplicação de métodos

computacionais para dados biológicos. A importância de sua contribuição a fez ser considerada “a mãe e o pai da bioinformática”. Com o físico Robert S. Ledley, ela desenvolveu de 1958 a 1962 o Comproteín, um programa de computador projetado para determinar a estrutura primária da proteína usando dados de sequenciamento de peptídeos de Edman. Esse programa é um dos primeiros vestígios de *software* desenvolvido para a nova montagem de sequências. A codificação dos aminoácidos utilizada pelo programa era representada por abreviações de três letras, posteriormente substituídas por códigos de aminoácidos de uma letra, também desenvolvidos por Dayhoff e ainda em uso atualmente, reduzindo o tamanho dos arquivos a serem processados e analisados. O primeiro uso desse novo sistema de codificação foi no *Atlas of Protein Sequence and Structure*, o primeiro banco de dados de sequências biológicas, contendo 65 sequências de proteínas, que levou à criação do *Protein Information Resource* (PIR).

A publicação da sequência completa do genoma da bactéria *Haemophilus influenzae* revolucionou o estudo de microrganismos, facilitando as pesquisas por meio da disponibilização de listas completas de genes, seus contextos genéticos e suas funções preditas. Esse marco permitiu não somente a obtenção, pela primeira vez, do genoma completo de um organismo de vida livre, mas também induziu o sequenciamento de outros genomas. A estratégia utilizada se baseia no sequenciamento de pequenos fragmentos cromossômicos gerados aleatoriamente e clonados em um vetor de plasmídeo de alto volume de cópias. Algoritmos foram especificamente desenvolvidos para montar grandes sequências contíguas a partir das sequências dos fragmentos de DNA obtidas dos clones. A publicação do genoma humano é considerada um marco evolucionário na era genômica.

O Projeto Genoma Humano foi iniciado em 1991 pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA. Em 1998, a Celera Genomics (empresa privada de biotecnologia) também entrou na disputa para sequenciar e montar o primeiro genoma humano utilizando diferentes estratégias. Nessa época, vários programas computacionais foram desenvolvidos para montar as leituras de sequenciamento do genoma inteiro. Outro aspecto favorável para o avanço da era da genômica foi a globalização da rede de informação, surgida no início dos anos 1990, o que permitiu a disponibilização dos dados gerados. Essa rede é essencial para a comunidade científica, especialmente para o compartilhamento de dados e ferramentas. Após 10 anos de esforço internacional para desvendar a sequência do genoma humano, um rascunho inicial foi anunciado nos anos 2000 (INT. HUMAN GENOME SEQ. CONSORTIUM, 2001), com o anúncio oficial de conclusão em 2003 por meio da publicação

em duas renomadas revistas científicas, a *Nature* e a *Science*. Esse marco abriu novas questões que puderam ser estudadas, como: (i) identificação abrangente dos componentes estruturais e funcionais codificados no genoma; (ii) elucidação da organização de genes, proteínas e vias metabólicas, e sua contribuição para fenótipos celulares e de organismos; (iii) compreensão detalhada da variação hereditária no genoma humano; (iv) entendimento da variação evolutiva entre espécies; (v) identificação das contribuições genéticas à doença e resposta a medicamentos; (vi) identificação de variantes genéticas relacionadas à boa saúde e à resistência a doenças; (vii) desenvolvimento de abordagens baseadas no genoma para prever suscetibilidade a doenças e resposta a fármacos; (viii) detecção precoce de doenças e taxonomia molecular de estados de doenças; (ix) adoção de uma nova compreensão de genes e caminhos para desenvolver novas abordagens terapêuticas; e (x) investigação de informações de risco genético na definição de estratégia de tratamento e previsão de resultados. Desde então, a grande quantidade de dados gerados criou uma crescente demanda para o desenvolvimento de algoritmos e ferramentas computacionais, capazes de extrair o conhecimento a partir da informação contida nos dados, expandindo a área não somente no meio acadêmico, mas em outras áreas como as das indústrias farmacêutica e de alimentos e medicina.

O reconhecimento da bioinformática como área autônoma foi impulsionado pela criação de programas de pós-graduação específicos para a formação de pessoal capacitado e pela formação de sociedades científicas especializadas. O surgimento de editais de fomento e investimentos vultosos da iniciativa privada voltados ao desenvolvimento de plataformas tecnológicas também foram importantes nesse processo.

Se, por um lado, o foco inicial voltou-se para a análise de sequências e estruturas moleculares, seguida de genomas inteiros e perfis transcricionais (OUZOUNIS, 2009; SILVA; NOTARI; DALLALBA, 2020), por outro, a crescente geração de dados, incluindo complexos supramoleculares, compartimentos celulares, variação específica de células, tecido, organismos e populações, aumentou a complexidade no desenvolvimento de abordagens de análises em múltiplas escalas e integração. O desafio é desvendar sistemas biológicos em contexto geral, incluindo dados de genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas inteiros e seus ambientes, modelados computacionalmente, com todas as categorias moleculares sendo consideradas simultaneamente. O *Mycoplasma genitalium* foi o primeiro organismo de célula única a ser modelado, e do qual todos os genes, produtos e interações metabólicas conhecidas foram reconstruídos computacionalmente. Espera-se que,

em breve, seja possível a modelagem de um sistema composto por um organismo pluricelular com milhões de células, algo impensável 15 anos atrás.

Os dados gerados com ferramentas de bioinformática são capazes de exibir cada vez mais informações sobre os seres vivos que têm impactado positivamente quando aplicadas na saúde, contribuindo tanto para avanços na pesquisa básica quanto na ciência aplicada (HAGEN, 2000). A bioinformática é utilizada no desenvolvimento de algoritmos computacionais para manipulação de dados biológicos a fim de identificar sequências de genes, prever estruturas tridimensionais de proteínas, identificar inibidores de enzimas, direcionar o agrupamento de proteínas e construir árvores filogenéticas e analisar experimentos de expressão gênica. As técnicas e ferramentas com base em bioinformática são essenciais para organizar e agrupar os resultados da análise de sequências genéticas, o que produz um corpo crescente de dados sobre composição de DNA, RNA e proteínas. Nesse contexto, a bioinformática tornou-se uma área de intenso interesse e tem se caracterizado como uma das ferramentas mais importantes para os profissionais médicos, podendo ser aplicada no desenvolvimento de cuidados de saúde, na produção de medicamentos e em terapias personalizadas.

A bioinformática também se propõe a fornecer informações biológicas e médicas para cuidados de saúde individualizados, permitindo pesquisa e comparação com dados em bancos de dados biológicos específicos, e seleção de ferramentas apropriadas a fim de analisar diferentes tipos de dados para a tomada de decisões médicas e otimizar o tratamento. A bioinformática na clínica médica usa informações de uma gama de dados provenientes de tecnologia ômica, vias metabólicas e de sinalização, análise de imagem de alto rendimento, genética molecular humana, banco de tecidos humanos, expressão gênica e biologia de sistemas. No entanto, a contribuição da bioinformática para a área médica é praticamente ilimitada, graças aos avanços no campo da manipulação e da terapia gênicas por meio da identificação detalhada de novos genes e seus mecanismos reguladores. As ferramentas computacionais, em contrapartida, permitem a detecção molecular de parasitas e podem ser usadas diretamente para o diagnóstico e a epidemiologia de inúmeras condições médicas.

Extrair conhecimento importante a partir de dados provenientes das áreas ômicas é custoso e laborioso. Abordagens envolvendo aprendizado de máquinas vêm sendo cada vez mais úteis, permitindo aos computadores que melhorem a performance preditiva com base em experiências e exemplos, por meio da construção de um modelo matemático gerado a partir de conjuntos de dados de amostra (conhecidos como conjuntos de

dados de treinamento) para realizar previsões ou decisões sobre os conjuntos de dados novos. As abordagens de aprendizado de máquina desempenham um papel crucial na bioinformática, incluindo descobertas de genes e anotação de genoma, previsão de estrutura de proteínas, análise de expressão gênica, modelagem de interação complexa em sistemas biológicos, descoberta de medicamentos, mineração de textos e processamento de imagem digital.

O escopo e as limitações dos novos aspectos da bioinformática, particularmente combinando ciência da computação e técnicas e ferramentas de biologia molecular, têm implicações de longo alcance para o campo das ciências da vida e suas práticas de pesquisa. Nas próximas décadas, espera-se que a aplicação do conhecimento gerado pela bioinformática se torne ainda mais difundido, passando mais rapidamente da pesquisa básica para a prática industrial e clínica padrão.

A identificação de proteínas-alvo que podem ser diretamente alteradas por interações medicamentosas pode minimizar os sintomas e as causas da doença. A identificação de moléculas que conseguem atuar como ingredientes ativos na fabricação de produtos terapêuticos, inibindo ou acelerando reações bioquímicas específicas, pode impactar a cura ou o alívio de doenças.

No Brasil, o marco inicial ocorreu em 2000 com a publicação, na revista *Nature*, da montagem do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, agente causador da clorose variegada dos citros (CVC), considerada uma praga nas plantações de laranja. O projeto coordenado pelos doutores João Carlos Setúbal e João Meidanis, ambos da UNICAMP, foi financiado pelo consórcio Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis – The Virtual Genomics Institute (ONSA), que integrou diversos centros de pesquisa do país. O sucesso do projeto deu espaço para o sequenciamento e a montagem do genoma de diversos outros organismos no país, tornando o Brasil uma referência, na época, em montagem de genomas de organismos relacionados com a agricultura. Outra iniciativa importante na pesquisa do câncer surgiu, liderada pelo Instituto Ludwig, com o estudo de genes relacionados a diversos tipos da doença e tumores malignos, contribuindo para o mapeamento do genoma humano. Desde 2004, a Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional (AB3C), a maior associação de bioinformática brasileira, vinculada à Sociedade Internacional de Biologia Computacional, promove encontros anuais a fim de profissionais da área apresentarem dados científicos relevantes e discutirem o avanço da bioinformática no país (NESHICH, 2007).

17.3 TECNOLOGIAS DIGITAIS PARA O DESENVOLVIMENTO *IN SILICO*

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) na área da saúde é intensivo em investimentos, e também caracterizado por elevada incerteza e risco. Pela natureza intrínseca de seus resultados, é da mesma forma altamente regulado para assegurar a qualidade, a segurança e a eficácia de medicamentos, vacinas e diagnósticos.

Diante disso, a preocupação com o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem encurtar o desenvolvimento de novos produtos é antiga. Em meados dos anos 1990, apontava-se para o déficit inovativo da indústria, tendo se observado certa flutuação e dinamicidade na introdução de novos produtos, mas não na velocidade que se esperava com o surgimento da biotecnologia moderna (DREWS, 1998; DREWS; RYSER, 1996; URAL; BARAL; SUSSHOLZ, 2023). Desde então, empresas, instituições acadêmicas e governos, principalmente sediados nos países desenvolvidos e em alguns países emergentes, têm investido no aprimoramento e no monitoramento de tecnologias que possam acelerar a introdução de novos produtos. Uma das áreas que têm permitido acelerar o desenvolvimento e a introdução de novos produtos são as novas tecnologias digitais que têm dado suporte às atividades de P&D, conforme Quadro 17.1.

Outras tecnologias que estão em prova de conceito prometem uma nova revolução dentro da revolução tecnológica em andamento, como: nanorrobôs criados a partir de DNA (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE, 2022); biomáquinas (SREEKANTH et al., 2018); *microchips* do sistema imunológico (GOYAL et al., 2022; POLINI et al., 2019); materiais sintéticos com propriedades de organismos vivos (HAYES, 2019); novos biossensores (NI et al., 2021; SOARES et al., 2021), metaverso (MEHRA, 2022; PATEL, 2022; RYAN; HUBER, 2022), entre outras.

Além das tecnologias em uso ou em fase de prototipagem com a convergência tecnológica junto à computação quântica, a IA, o armazenamento de dados e a mobilidade alterarão significativamente as tecnologias da P&D na produção industrial (BLUNT et al., 2022; BUVAILO, 2022; COVA et al., 2022; EVERS; HEID; OSTOJIC, 2021; MULLER; RABAL; DIAZ GONZALEZ, 2022). Todo esse processo requer o trabalho de grupos multidisciplinares, com engenheiros, físicos, cientistas sociais, biofísicos, médicos, economistas, biólogos, farmacêuticos, cientistas de dados; engenheiros químicos e de bioprocessos; desenhistas industriais, entre outros. Isso porque a tecnologia e a aplicação dela interagem com sistemas sociais, instituições, normas, hábitos etc.

QUADRO 17.1 Biotecnologias em saúde da Indústria 4.0

Domínio principal	Foco das aplicações	Referências
Conectividade	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Monitoramento em tempo real em casa + diagnósticos baseados em IA → digitalização da atenção à saúde. ▪ Nanotecnologia + diagnóstico remoto, monitoramento ativo (medicação, biomarcadores, dispositivos médicos como <i>wearables</i>, nanorrobôs e nanomedicamentos etc.). ▪ Tecnologias imersivas apoiando a aprendizagem, transição da P&D para a escala industrial e assistência médica remota; análise estrutural, visualização e simulação das moléculas; telemedicina imersiva, simulações mais acuradas (imagem, patologia, P&D, treinamento). 	Arboleda (2022); Aronowitz et al. (2022); Brazaca et al. (2019); Chui; Roberts; Yee (2022); Giri; Maddahi; Zareinia (2021); Govindarajan; Trappey; Trappey (2018); Halwani (2022); Harvey et al. (2017); IQVIA (2021); Paul et al. (2021b); Proniewska et al. (2021); Walters et al. (2022); Yang; Shah; Chang (2020)
Grandes volumes de dados	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Modelagem preditiva, simulação baseada em IA e aprendizado de máquina para a elaboração de protocolos pré-clínicos e clínicos e a aceleração do desenvolvimento de novos produtos. ▪ IA para criar algoritmos que permitam reduzir os vieses nas análises de resultados de experimentos e melhorar a reprodutibilidade. ▪ Tecnologias para melhor compreensão das condições de saúde e doenças, tratamento, resultados diante de questões éticas e de longo. ▪ Novas metodologias analíticas baseadas em multiatributos. ▪ Análises clínicas e patologia clínica, estudos toxicológicos preditivos digitais. 	Arboleda (2022); Auclair; Rathore (2021); Ayers et al. (2022); Businesswire (2021); Castañeda (2022); Chui; Roberts; Yee (2022); FDA (2017, 2020, 2021 e 2022); Fultinavičiūtė et al. (2022); Goyal et al. (2022); IQVIA (2021); Leung et al. (2022); Ma et al. (2021); Millán-Martín et al. (2023); MPO (2017); Pappalardo et al. (2019); Paul et al. (2021b); Jose et al. (2022); Ingber (2022)
Automação e sistemas ciberfísicos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Modelagem, otimização e controle de bioprocessos. ▪ Desenvolvimento e produção de moléculas com base em processos digitais e otimizados. ▪ Monitoramento contínuo de equipamentos (maior rendimento, qualidade e segurança). ▪ Manufatura aditiva (impressão 3D de medicamentos, confecção de peças auxiliares de equipamentos laboratoriais e industriais). ▪ Biomarcadores digitais baseados na respiração para diagnóstico de uma série de doenças. ▪ Organoides simulando um ou mais de um órgão do corpo humano em microchips. ▪ Biossensores implantáveis sem necessidade de bateria e tecnologias vestíveis, monitor de sinais vitais ou de fluidos corporais para apoiar decisões médicas e estudos clínicos. 	Arboleda (2022); Arden et al. (2021); Ayers et al. (2022); Chui; Roberts; Yee (2022); Fultinavičiūtė et al. (2022); Guha et al. (2020); Hunter (2020); Ingber (2022); Kaefer et al. (2021); Karatas et al. (2022); Koydemir; Ozcan (2018); Leung et al. (2022); Ma et al. (2021); Ouyang; Jameel (2022); Paul et al. (2021b); Skarysz et al. (2022); Vasudevan et al. (2022)
Poder computacional	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Obtenção de insumos, desenho de moléculas, e exploração da relação moléculas/compostos. ▪ Computadores quânticos para simulação molecular no desenvolvimento de novos materiais e identificação de moléculas-alvo. ▪ Acesso mais seguro aos dados dos pacientes, modelos avançados de IA para atenção à saúde, diagnóstico, desenvolvimento de produto e tratamento; ▪ Gestão da atenção à saúde (tratamento personalizado), desenvolvimento de produtos customizados mais próximos ao paciente. 	An; Cockrell (2022); Arboleda (2022); Arden et al. (2021); Chui; Roberts; Yee (2022); Geris et al. (2022); Guha et al. (2020); Hallal et al. (2021); Hessler; Baringhaus (2018); Hunter (2020); Karatas et al. (2022); Pappalardo et al. (2019); Paul et al. (2021a), (2021b); Saldanha; Langel; Vale (2023); Tran; Tayara; Chong (2023); Zang et al. (2017); Zhang et al. (2017)

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

Além das abordagens, um tema que tem obtido cada vez mais destaque é o da saúde digital. A saúde digital pode ser definida como um conjunto de tecnologias digitais (p. ex., aplicativos, prontuários eletrônicos, *softwares*, plataformas *on-line* etc.) usadas no sistema de saúde para diferentes necessidades (UNSWORTH et al., 2021; WHO, 2017, 2019, 2021). Inicialmente, a maioria das aplicações estava associada à atividade física,

ao estilo de vida e à alimentação, por meio de aplicativo de celular, relógios inteligentes ou prontuários eletrônicos. Com o tempo, vem se observando uma transição com um foco cada vez maior em aplicações voltadas ao acompanhamento, ao tratamento e à prevenção de doenças, em particular associadas à saúde mental, à diabetes, a doenças cardiovasculares e ao sistema digestivo (IQVIA, 2021).

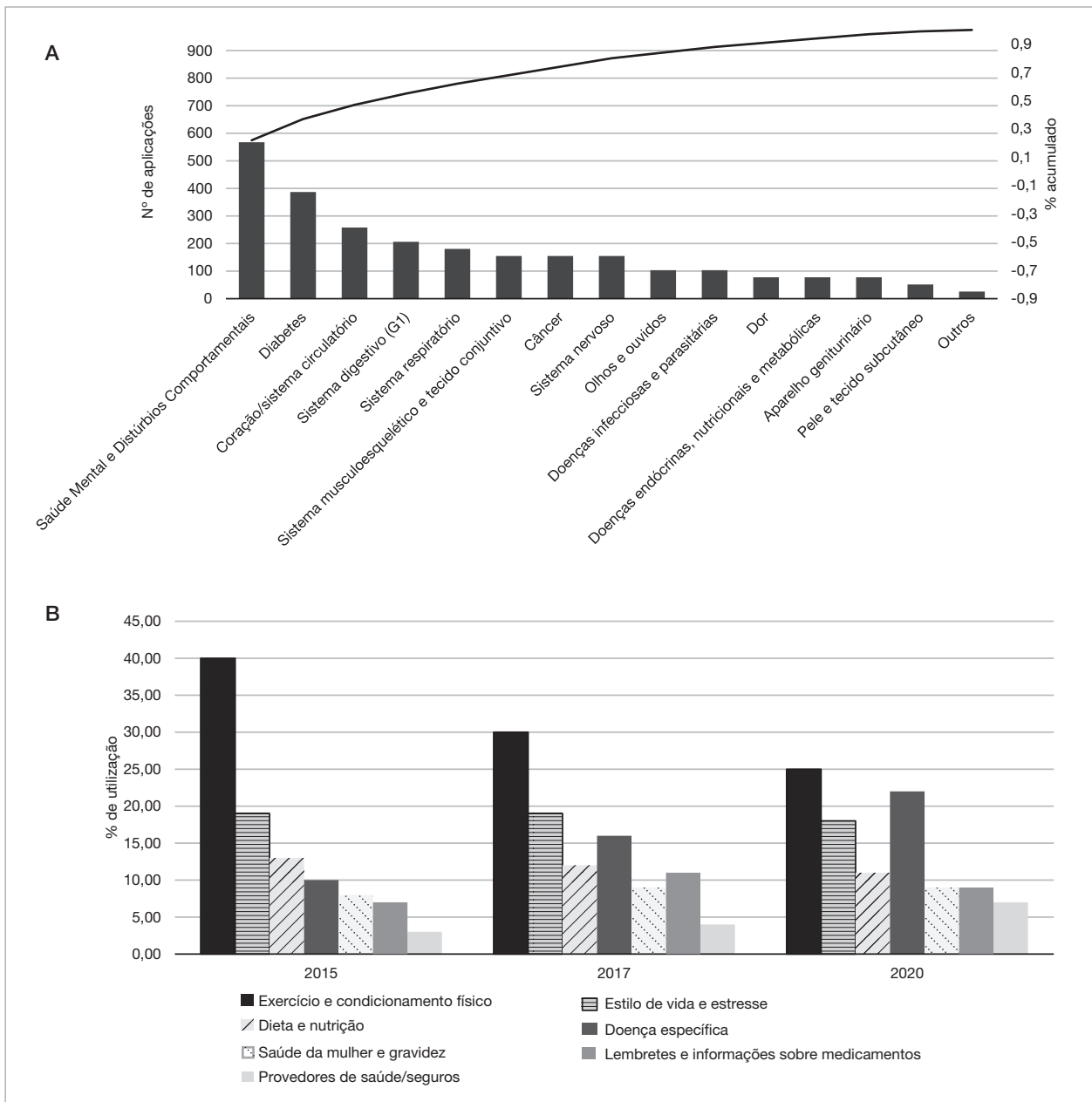


FIGURA 17.6 Evolução da aplicação em saúde digital (2015-2020).

Fonte: elaborada a partir de IQVIA (2021).

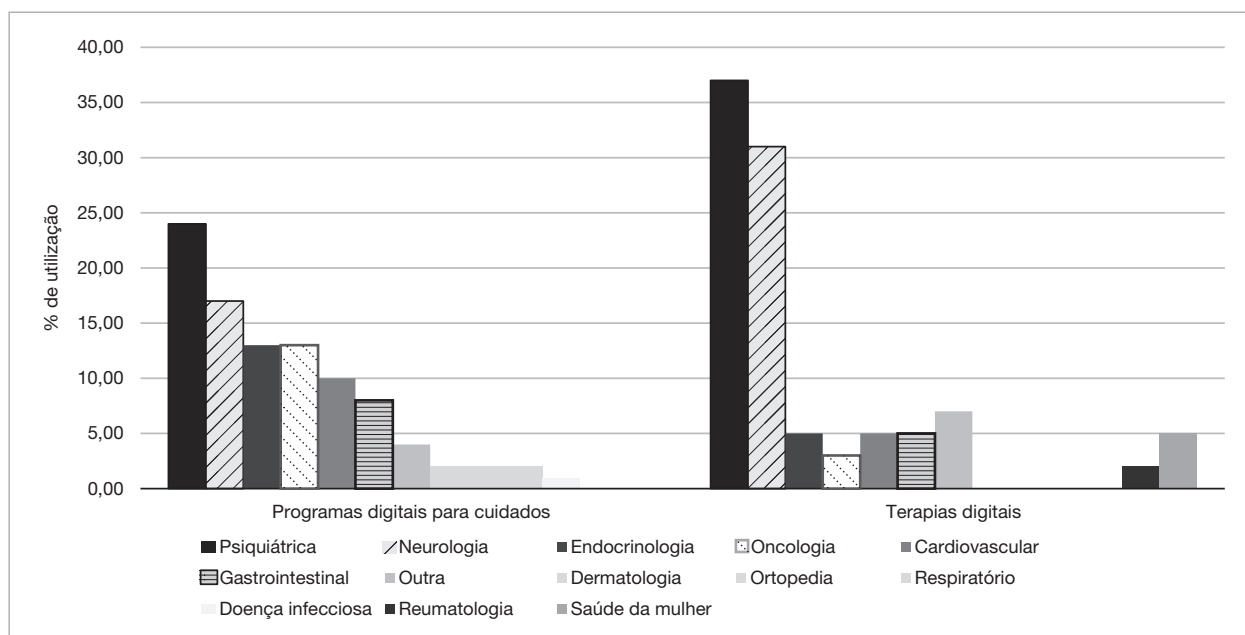


FIGURA 17.7 Programas de atenção digital e terapêuticos digitais por indicação.

Fonte: elaborada a partir de IQVIA (2021).

No caso dos terapêuticos digitais (DTx), eles são considerados um novo segmento. Embora os DTx possuam uma característica em comum com *softwares* usados como dispositivos médicos (*software as a medical device*, SaMD), são aplicações que intervêm no tratamento ou acompanhamento clínico ou na prevenção de doenças. A maioria dos DTx são utilizados com dispositivos móveis, como *tablets* e celulares, com os dados gerenciados na *web*, conforme a Figura 17.8 (CAPOBIANCO, 2015; IQVIA, 2021; MAKIN, 2019; WANG; LEE; SHIN, 2023).

Não obstante, a regulamentação e a aprovação desses produtos é algo bastante complexo, pois é preciso validar o *software* e o aplicativo para diagnósticos, e não apenas para monitoramento de sinais e dados de saúde. Dentre outras preocupações, destaca-se também a proteção aos dados. Não há uma convergência e harmonização internacional no que tange à regulamentação e ao registro desses produtos, muito embora vários países tenham registrados produtos, como é o caso da Agência Regulatória dos Estados Unidos (FDA – traduzido do inglês *Food and Drug Administration*) em 2015 (HALUCK, 2017; SPINNER, 2021; WANG; LEE; SHIN, 2023).

Em relação à situação do Brasil, a adoção de tecnologias na área de saúde digital apresenta grandes diferenças (THE MEDICAL FUTURIST, 2023), tanto no que diz respeito às áreas urbanas, rurais e comunidades indígenas e quilombolas quanto em relação ao sistema público e privado (NETHERLANDS ENTERPRISE AGENCY, 2019). É importante destacar que, por conta

da pandemia de Covid-19, a telemedicina experimentou um grande avanço em sua difusão.

No Brasil, em 2020 foi publicada a “Estratégia de Saúde Digital para o Brasil 2020-2028” (Brasil, 2020). Mais recentemente, foi criada a Secretaria de Informação e Saúde Digital no âmbito do Ministério da Saúde com o objetivo de dar suporte aos órgãos do Ministério da Saúde no que tange a tecnologias digitais e infraestrutura necessária para atender às crescentes demandas do SUS nessa área (BRASIL, 2023).

17.4 MEDICINA PERSONALIZADA

A medicina personalizada se fundamenta no conceito de que determinada intervenção terapêutica (farmacológica ou não) pode ser determinada por características do paciente ou da doença dele. Alguns dos exemplos compreendem a identificação de variantes genéticas que alteram a resposta do indivíduo a determinado fármaco, como é o caso dos estudos de farmacogenética e/ou farmacogenômica, ou, no caso específico do tratamento oncológico, características do tumor que levem à resposta ou à falta de resposta a determinado tratamento.

Esse campo tem sido profundamente impactado pelas revoluções no campo da genética, a princípio com a identificação de variantes gênicas na população que levam à redução ou à perda de efetividade de certos fármacos (ASIIMWE et al., 2020; DANESE et al., 2019), ou mesmo a um aumento de toxicidade de certos compostos.

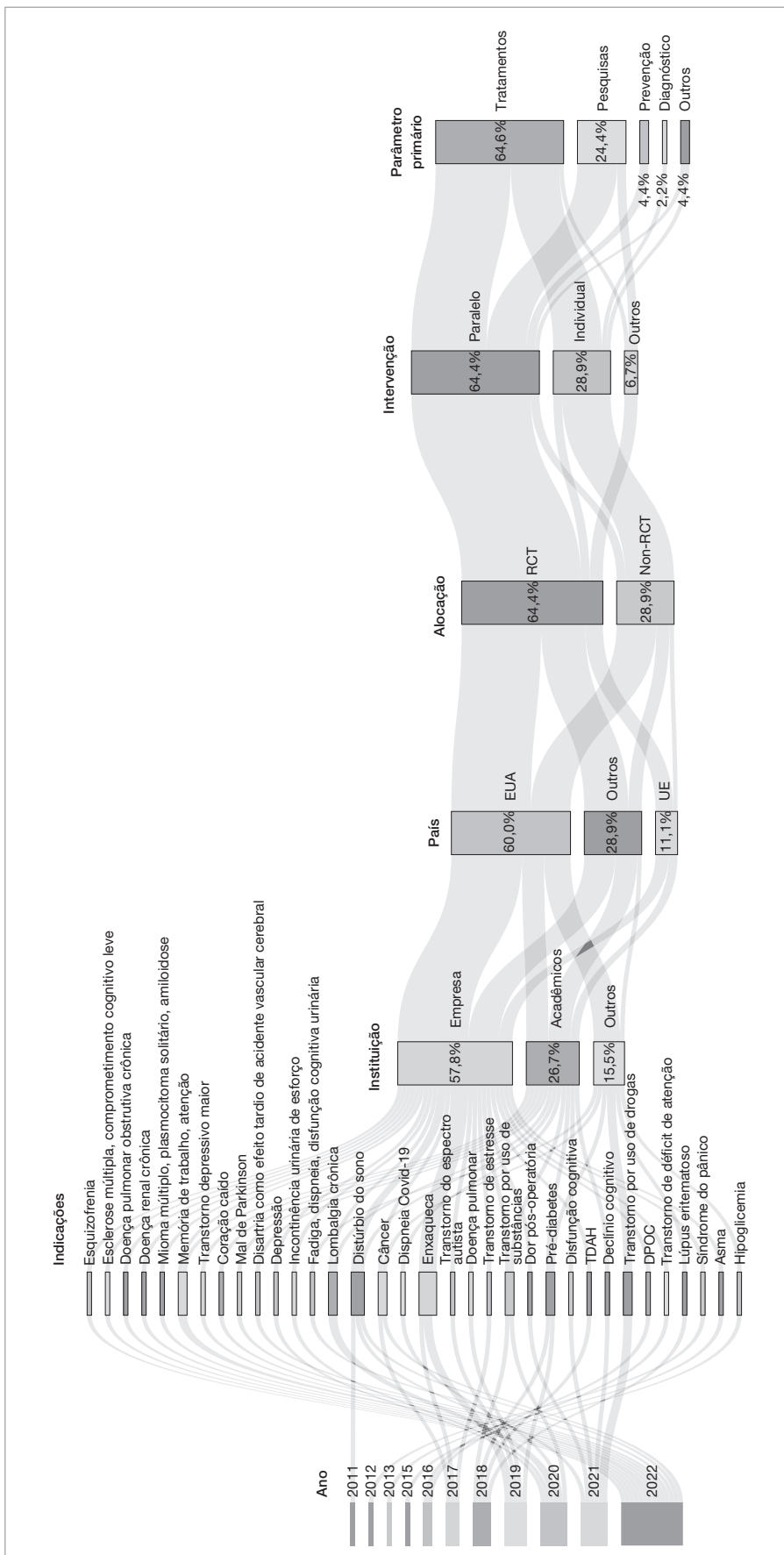


FIGURA 17.8 Terapêuticos digitais em pesquisa clínica registrados no Clinical Trials Gov (2015-2022).
 Fonte: Traduzido de Wang, Lee e Shin (2023).

Esses eventos estão, em geral, associados a variantes genéticas em genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização, na ativação ou na detoxificação de certos grupos de compostos (SUAREZ-KURTZ; DE ARAÚJO, 2022).

Mais recentemente, o ganho de escala tanto no sequenciamento de ácidos nucleicos quanto na análise das variantes genéticas de indivíduos levou a abordagens de integração de dados com avaliações farmacogenômicas. Essa mesma revolução de escala permitiu a variantes germinativas que fossem identificadas com maior facilidade em indivíduos carreadores de variantes ou mutações associadas às mais diversas doenças, desde as monogênicas até as poligênicas de associação genética mais complexa.

Ainda, essa revolução permitiu ao campo da oncologia, no qual se estabeleceu há algumas décadas a associação de certas mutações com eventos oncogênicos, a obtenção da resolução a ponto de identificar múltiplas variantes e mutações que podem ser acionadas farmacologicamente de maneira precisa, em geral por meio de moléculas inibidoras, como é o caso de inibidores de cinases (CARR et al., 2016). Esses estudos vêm sendo aplicados para determinar a coleção de mutações dos tumores e guiar a terapêutica, mas também para a avaliação temporal de indivíduos por testes seriados detectando alterações genéticas em ácidos nucleicos circulantes.

Como exemplificado no caso das variantes que influenciam as respostas aos fármacos ou no contexto das mutações acionáveis, boa parte das inovações em saúde podem ser impactadas por características únicas do indivíduo ou mesmo associadas a determinadas populações, seja no aspecto morfológico, funcional, bioquímico ou mesmo cognitivo. A identificação de marcadores associados a essas características permitirá que ajustes sejam feitos para que as novas tecnologias possam, de fato, resultar na maior magnitude de melhorias que impactem positivamente a saúde dos indivíduos. Um aspecto desafiador diz respeito à disparidade no volume e na qualidade de dados disponíveis relativos às características de populações de países desenvolvidos vs. países em desenvolvimento. Grande parte das iniciativas que guiam a personalização da medicina é desenhada com base em conjuntos de dados (de morfométricos a genéticos) gerados a partir de populações menos miscigenadas ou muito concentradas em certas características étnicas. Esse fato traz um desafio para a implementação e a melhoria dos resultados das revoluções tecnológicas em curso quando é considerado seu alcance em países em desenvolvimento ou mesmo em indivíduos com características específicas, menos prevalentes nas populações predominantes nos países desenvolvidos.

As novas tecnologias descritas podem auxiliar a democratização da medicina personalizada para uma aplicação mais ampla em saúde pública. Isso porque a medicina personalizada promete, de certa forma, ser potencialmente mais custo-efetiva, uma vez que propõe uma série de vantagens em relação à medicina tradicional na medida em que: (i) propõe diagnosticar doenças de maneira mais precoce usando sistemas de vigilância e, portanto, definindo mais opções de intervenções e tratamentos; (ii) evita complicações relacionadas a eventos adversos a drogas resultantes do pensamento “um tamanho serve para todos – *one size fits all*”, predominante na medicina tradicional; (iii) certifica que a droga certa será utilizada para o paciente certo e que o regime de doses é adequado à genética do paciente, aumentando, por exemplo, a aderência ao tratamento e, ao identificar propensão genética a determinadas doenças, agindo em favor de metodologias preventivas, começando o quanto antes na vida do indivíduo (GAJARE; DESHMUKH; SHINDE, 2021; MATEO et al., 2022) .

O uso de IA, por exemplo, é uma revolução ao propor o aumento da qualidade de vida de uma maneira geral. Para nós, humanos, pode ser muito difícil integrar dados de expressão gênica de um indivíduo com seus níveis de biomarcadores e estilo de vida, além de escanear as mais de 22 mil drogas disponíveis no mercado que possam tratar particularmente suas condições de saúde. No entanto, essa é uma tarefa relativamente fácil para um sistema de IA. Nesse sentido, à medida que esses sistemas são implementados, em diversos países, aumenta o conhecimento a respeito de diversidade genética, engajamento social, meio ambiente e dados de qualidade de vida e saúde, o que amplia nosso conhecimento em epigenética e cria condições para melhores tratamentos em determinadas populações – e, talvez, diminui iniquidades em um futuro próximo (PRAVIN; KISHOR; ASHWINI, 2021).

Outra tecnologia importante e que poderia revolucionar o tratamento de doenças em uma perspectiva personalizada é a impressão 3D, ou a também chamada manufatura aditiva, que consiste na deposição de material sobre material até formar um modelo tridimensional. Na indústria farmacêutica, ela tem sido empregada para a fabricação de inúmeros produtos, como comprimidos de liberação controlada, polipílulas, filmes orodispersíveis, comprimidos gastroflutuantes, sistemas de administração de medicamentos autoemulsificantes, microagulhas e adesivos transdérmicos. Uma das populações que podem ser mais beneficiadas com a impressão de medicamentos em 3D é o grupo pediátrico, no qual a dose terapêutica varia de acordo com a idade e o peso corporal de seus integrantes. Várias formas de dosagem podem ser modificadas adequadamente com impressoras 3D para

ser dispensada a melhor dose a esses pacientes. Nesse caso, a ideia é usar a impressão 3D nas farmácias dos hospitais. O médico poderia prescrever diversos medicamentos diferentes para tratar a condição do paciente, e todos seriam dispensados combinadamente em um ou dois comprimidos, em vez de vários, aumentando a acessibilidade aos diversos tratamentos em países com dificuldades logísticas (VAZ; KUMAR, 2021).

No entanto, todas essas tecnologias trazem também inerente o desafio de como é possível testar essas novas apresentações e drogas em uma perspectiva personalizada. As informações genômicas sobre um indivíduo podem ser de considerável valor para o processo de desenvolvimento de medicamentos. Por meio do uso dessas informações, dá para determinar se um paciente deve ser incluído ou não em determinados estudos clínicos. Identificar os pacientes que mais se beneficiarão com um estudo clínico aumentará a segurança deles, com ensaios menores e mais rápidos, além de custos menores. Ainda, medicamentos ineficazes para uma parcela maior da população podem obter aprovação do órgão de vigilância norte-americano, o FDA, a depender do fato de que as informações genômicas de uma parcela menor, beneficiada por esses medicamentos, venham à tona, provando sua eficácia para essa população.

Além disso, outros avanços promissores também prometem auxiliar nos testes de novos medicamentos/tratamentos em uma perspectiva de medicina personalizada. O desenvolvimento de órgãos em matrizes de microfluídica (*organ on a chip* – OaC) é um deles. Ao serem acoplados, nessas matrizes, dois ou mais *chips* de órgãos, podem ser criados sistemas de múltiplos órgãos humanos “*body-on-chips*”, que imitam a fisiologia do corpo inteiro e podem ajudar a mimetizar a distribuição e a disposição de drogas. Avanços na tecnologia de células-tronco permitiram o fornecimento dessas células específicas de cada paciente que agora podem ser integradas em *chips* de órgãos para criar modelos pré-clínicos específicos e individuais. Se os *chips* de órgãos humanos forem considerados superiores aos modelos animais pré-clínicos tradicionais, podem ser adotados para desenvolver ou selecionar terapias personalizadas a pacientes individuais, subpopulações genéticas distintas ou mesmo subgrupos com comorbidades de doenças específicas, o que pode revolucionar a maneira como os ensaios clínicos são desenhados no momento (INGBER, 2022). Os exemplos de como essa tecnologia pode auxiliar no desenvolvimento e na implantação da medicina personalizada estão na Figura 17.9.

Chips de órgãos revestidos por células derivadas de pacientes podem ser usados para modelar distúrbios genéticos raros, para identificar toxicidades difíceis de serem estudadas clinicamente (p. ex., efeitos da exposi-

ção à radiação letal ou exposição de mulheres grávidas a potenciais teratogênicos) ou para comparar respostas a medicamentos em diferentes subpopulações (como mulheres vs. homens ou jovens vs. idosos). Quando diversos *chips* são criados, cada um revestido com células de um doador diferente, representando uma subpopulação distinta ou um paciente com uma comorbidade diversa, eles também podem ser empregados para projetar e otimizar medicamentos a subgrupos específicos cujos membros podem ser aproveitados como participantes em futuros estudos clínicos direcionados. *Chips* individualizados de órgão único e sistemas de *chip* de múltiplos órgãos revestidos por um ou mais tipos de células organotípicas do mesmo paciente – por exemplo, usando tecnologia de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), de uma população de indivíduos geneticamente relacionados ou de pacientes com comorbidades semelhantes – também podem ser usados para personalizar a seleção de medicamentos a fim de otimizar a eficácia do medicamento, minimizar a toxicidade, determinar as rotas de entrega ideais e, quando combinadas com previsões de farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD), projetar regimes de dosagem ideais ao uso em fase clínica I (INGBER, 2022).

17.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das tendências descritas, discutir os impactos na sociedade das transformações que vêm sendo observadas com a Quarta e a Quinta Revoluções Industriais torna-se algo bastante complexo. Se, por um lado, essas tecnologias têm potencial para acelerar o desenvolvimento de novos produtos, alterar a assistência médica e os cuidados com saúde e bem-estar, por outro lado, há grandes desafios, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. A Figura 17.10 apresenta de maneira sintética os prós e os contras dessas tecnologias de uma forma abrangente.

O potencial da bioinformática e de novas tecnologias digitais no cuidado extremamente personalizado do paciente, mirando características específicas de cada doença, tem criado uma expectativa consistente desde que o tema começou a pautar incontáveis publicações em todas as áreas, especialmente a da saúde. Avanços em toda a ciência estão concretizando essa promessa, incluindo um refinamento tecnológico com rapidez impressionante.

A partir de uma grande quantidade de dados e após inúmeras camadas de processamento de informação, um computador aprende, por si mesmo, a executar tarefas semelhantes – ou até melhores – às dos seres humanos (*deep learning*) e se adapta a mudanças (*machine learning*) que estão muito presentes na literatura médica. Como

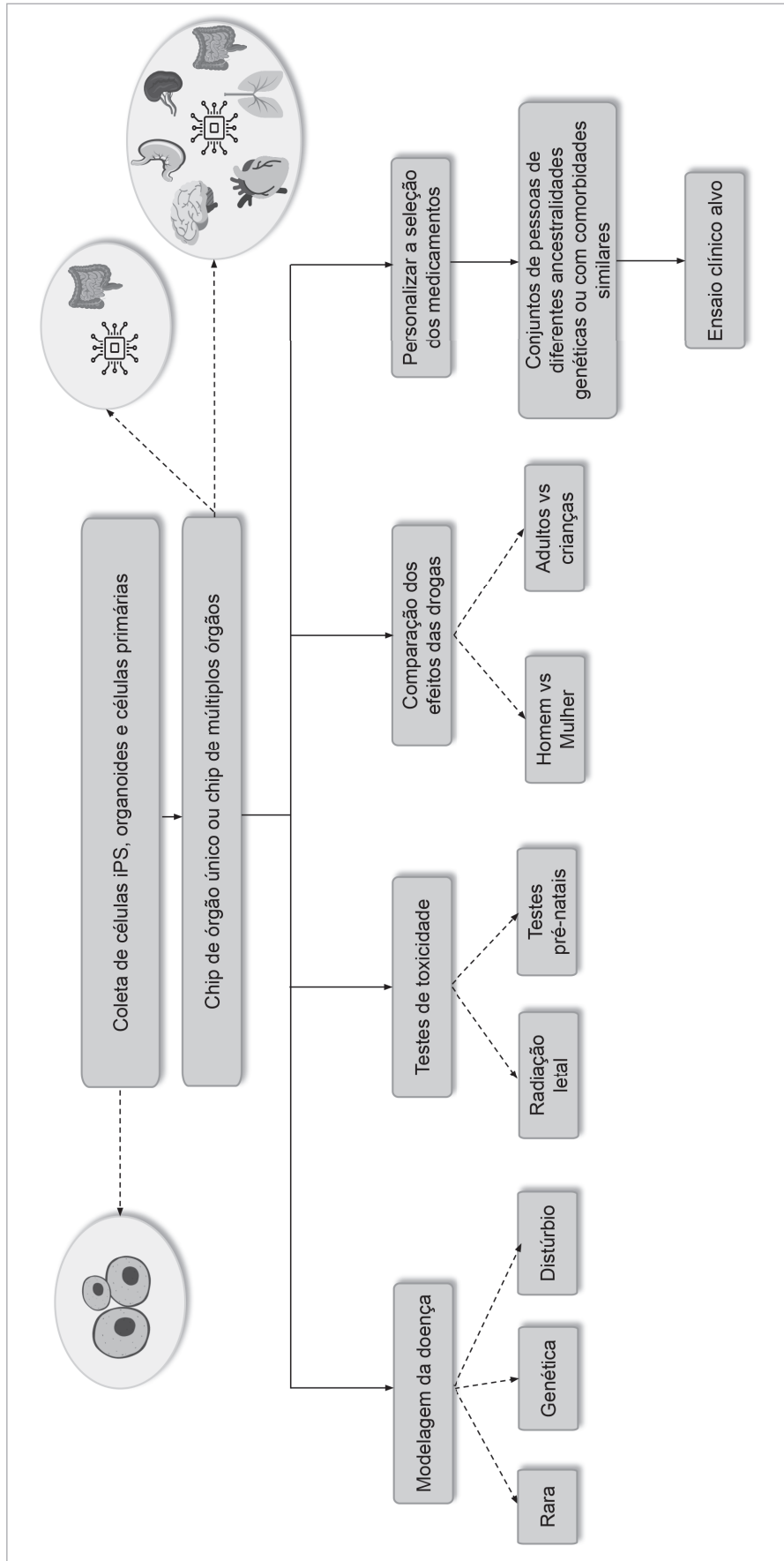


FIGURA 17.9 Aplicações de chip de órgão humano para medicina personalizada.
 Fonte: elaborada a partir de Ingber (2022).

Novas tecnologias em saúde	Prós	Contras
<ul style="list-style-type: none"> • Impressão 3D (medicina regenerativa, órgãos e tecidos artificiais, sistema de liberação); • Realidade virtual; • Realidade aumentada; • Diagnóstico cognitivo; • Prognósticos baseados em IA; • Gerenciamento de doenças crônicas; • Medicina personalizada; • Registros médicos eletrônicos; • Cirurgia remota controlada por robôs; • Sensores de ambiente; • Desenvolvimento de produtos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhores consultas <i>online</i>; • Melhor assistência médica e gestões das prescrições; • Diagnósticos baseados em IA em casa; • Avanço na medicina de precisão; • Desenhos de tratamentos mais específicos; • Desenvolvimento mais rápido de produtos e serviços; • Potencializa a gravidade cognitiva; • Melhores ferramentas de triagem e anamnese. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade na explicação dos conceitos, técnicas etc.; • Curso elevado para gerenciar dados de qualidade; • Privacidade de dados; • Questões legais e de responsabilização; • Confiança; • Viés de ferramentas baseadas em IA (gênero, racismo, classe social, fisionomia, etc.); • Estigmatização; • Aumento/persistência de iniquidades; • Novas formas de colonialismo baseado em dados.

FIGURA 17.10 Prós e contras das novas tecnologias em saúde.

Fonte: elaborada pelos autores com base em Arnold (2021), Gao (2020, 2021), Meskó e Görög (2020) e Miller e Brown (2018).

este capítulo ilustrou, esse não é somente um cenário hipotético. Em diagnóstico e na construção da tomada de decisões que envolvem algoritmos, existem resultados com desempenho comparável ao de experientes médicos especialistas. Com o aumento da capacidade de desempenho dos computadores, se vislumbra a viabilidade de identificação de alterações em exames de sangue ou tecidos muito antes do que é perceptível pela cognição humana. Ainda que isso seja fascinante, se abrem várias questões práticas e éticas. A começar, nenhuma tecnologia vai responder bem se a pergunta não for boa. Em sistemas de saúde fragmentados e com importante carência de informação uniformizada, é possível que as incertezas sejam muito altas.

Em cenários ideais, sistemas de coleta de dados padronizados deveriam ser instalados e validados antes da execução de ferramentas de IA. A possibilidade de haver grupos de pacientes sub-representados também é um problema a ser considerado com atenção, uma vez que grande parte das investigações científicas são a respeito de europeus e norte-americanos, brancos e com acesso a toda uma jornada de assistência médica. A discussão da incerteza da validade da extrapolação de dados para populações latino-americanas, com suas particularidades étnicas e sociais, merece muita prudência e um plano real de inclusão. É imperativo, ainda, que se invista esforços em treinamento e integração na agenda da saúde, que deve estar apta a acompanhar os largos passos que a tecnologia percorre. Enfim, é necessário

realizar uma adaptação do modelo assistencial e que o paciente se torne verdadeiramente o centro do cuidado.

Há necessidade de uma reengenharia científica, desde o financiamento da pesquisa, relações comerciais transparentes e equilibradas entre investidores e indústrias da saúde, modelo regulatório responsável e uma formação profissional adequada aos novos tempos. Dados científicos devem trafegar com mais facilidade para aproveitamento ágil de toda a experiência dos diferentes atores do sistema de saúde, como entidades reguladoras ou órgãos financiadores, a fim de reduzir as discrepâncias entre as recomendações das diretrizes da prática clínica e o acesso real a uma tecnologia ou um medicamento. Essa lacuna existente pode gerar frustração nos pacientes e nos profissionais de saúde, quando eles veem que uma intervenção preconizada não está realmente disponível. Com todas essas ações, o avanço tecnológico pode se traduzir em benefícios na prática clínica real de maneira mais efetiva e precoce.

Portanto, é importante haver políticas científicas, tecnológicas, industriais e econômicas que sejam capazes de contornar os obstáculos e desafios colocados por essas novas tecnologias. É fundamental mitigar os efeitos negativos da desindustrialização, diminuir a defasagem tecnológica, (re)qualificar os trabalhadores, reduzir o desemprego, combater a precarização do trabalho, investir e ampliar o acesso equitativo a novas tecnologias de maneira sustentável, ampliar o acesso equitativo à saúde, entre outros aspectos. Além disso,

considerando que as novas tecnologias digitais também imprimirão novas formas de relação social, é extremamente importante que o desenvolvimento e a adoção de novas tecnologias e práticas sejam centrados no ser humano e em sua relação com o ecossistema.

REFERÊNCIAS

- AAEN, J.; NIELSEN, J. A.; CARUGATI, A. The dark side of data ecosystems: A longitudinal study of the DAMD project. **European Journal of Information Systems**, v. 31, n. 3, p. 288–312, 4 maio 2022.
- AKALIN, P. K. Introduction to bioinformatics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 7, p. 610–619, jul. 2006.
- AN, G.; COCKRELL, C. Drug development digital twins for drug discovery, testing and repurposing: A schema for requirements and development. **Frontiers in Systems Biology**, v. 2, 20 jun. 2022.
- ARBOLEDA, P. Six winning roles for MedTech to thrive in the future of health. **Deloitte**, p. 1–14, 2022.
- ARCHIBUGI, D.; MICHIE, J. The globalisation of technology: A new taxonomy. **Cambridge Journal of Economics**, fev. 1995.
- ARDEN, N. S. et al. Industry 4.0 for pharmaceutical manufacturing: Preparing for the smart factories of the future. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 602, p. 120–554, jun. 2021.
- ARNOLD, M. H. Teasing out artificial intelligence in medicine: An ethical critique of artificial intelligence and machine learning in medicine. **Journal of Bioethical Inquiry**, v. 18, n. 1, p. 121–139, 7 mar. 2021.
- ARONOWITZ, S. et al. Transforming biopharma R&D at scale. **McKinsey & Company**. [s. d.]. Disponível em: <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/transforming-biopharma-r-and-d-at-scale>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- ARORA, A. et al. Evolution of industry structure in the chemical industry. In: **Chemicals and Long-Term Economic Growth: Insights from the Chemical Industry**. Nova Jersey: Wiley, 1998. p. 379–413.
- ASIIMWE, I. G. et al. Genetic factors influencing warfarin dose in black-african patients: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 6, p. 1.420–1.433, 28 jun. 2020.
- AUCLAIR, J.; RATHORE, A. S. The multi-attribute method (MAM) for the characterization of biopharmaceuticals. **LCGC North America**, p. 28–32, 1º jan. 2021.
- AYERS, M. et al. Adopting AI in drug discovery. **BCG**, 29 mar. 2022. Disponível em: <https://www.bcg.com/publications/2022/adopting-ai-in-pharmaceutical-discovery>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- BLUNT, N. S. et al. Perspective on the current state-of-the-art of quantum computing for drug discovery applications. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 18, n. 12, p. 7.001–7.023, 13 dez. 2022.
- BRASIL. **Estratégia de saúde digital para o Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
- BRASIL. Competências. **gov.br**. 16 fev. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/seidigi/competencias>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- BRAZACA, L. C. et al. Colorimetric paper-based immunosensor for simultaneous determination of Fetuin B and Clusterin toward early Alzheimer's diagnosis. **ACS Nano**, v. 13, n. 11, p. 13.325–13.332, 26 nov. 2019.
- BUSINESSWIRE. Paige receives first ever fda approval for ai product in digital pathology. 22 set. 2021. Disponível em: <https://www.businesswire.com/news/home/20210922005369/en/Paige-Receives-First-Ever-FDA-Approval-for-AI-Product-in-Digital-Pathology>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- BUVAILO, A. Combining AI and quantum mechanics to improve drug and vaccine discovery. **BiopharmaTrend.com**. 22 mar. 2022. Disponível em: <https://www.biopharmatrend.com/post/484-combining-ai-and-quantum-mechanics-to-improve-drug-and-vaccine-discovery/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- CAPOBIANCO, E. On digital therapeutics. **Frontiers in Digital Humanities**, v. 2, 10 nov. 2015.
- CARR, T. H. et al. Defining actionable mutations for oncology therapeutic development. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 5, p. 319–329, 26 maio 2016.
- CASTAGNOLI, R. et al. Evolution of Industry 4.0 and international business: A systematic literature review and a research agenda. **European Management Journal**, v. 40, n. 4, p. 572–589, ago. 2022.
- CASTAÑEDA, R. Internet of Things: A tsunami of clinical trial data. **Clinical Trials Arena**. 29 jul. 2022. Disponível em: <https://www.clinicaltrialsarena.com/features/internet-of-things-a-tsunami-of-clinical-trial-data/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- CHANDRA, V. et al. Chasing a moving frontier. In: BRAGA, Carlos A. Primo et al. (ed.). **Innovation and Growth**. Paris: OECD, 2009. p. 266.
- CHUI, M.; ROBERTS, R.; YEE, L. **McKinsey Technology Trends Outlook 2022**. ago. 2022. Disponível em: <https://www.mckinsey.com/-/media/mckinsey/business-functions/mckinsey-digital/our-insights/the-top-trends-in-tech-2022/mckinsey-tech-trends-outlook-2022-full-report.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- CIRERA, X.; COMIN, D.; CRUZ, M. Bridging the technological divide: Technology adoption by firms in developing countries. **worldbankgroup**, v. 1, 2022.
- CNI. Desafios para Indústria 4.0 no Brasil. **Portal da Indústria**. ago. 2016. Disponível em: <https://www.portaldaindustria.com.br/publicacoes/2016/8/desafios-para-industria-40-no-brasil/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- CNI. **Indústria 4.0 e digitalização da economia**. 2018. Disponível em: https://static.portaldaindustria.com.br/media/filer_public/95/95/959553b4-4f9f-40f5-9c1c-55da1733ddaa/industria_4_0_web.pdf. Acesso em: 10 dez. 2023.
- COMMISSION, E. et al. **Industry 5.0**: towards a sustainable, human-centric and resilient European industry. [s. l.]: Publications Office of the European Union, 2021.
- CONSTANTIOU, I. D.; KALLINIKOS, J. New games, new rules: Big data and the changing context of strategy. **Journal of Information Technology**, v. 30, n. 1, p. 44–57, 1º mar. 2015.
- CONTADOR, J. C. et al. Flexibility in the Brazilian Industry 4.0: Challenges and opportunities. **Global Journal of Flexible Systems Management**, v. 21, n. S1, p. 15–31, 18 jun. 2020.
- COVA, T. et al. Artificial Intelligence and quantum computing as the next pharma disruptors. In: SPRINGER (ed.). **Artificial Intelligence in Drug Design**. Nova York: Springer, 2022. p. 321–347.
- CUGNO, M.; CASTAGNOLI, R.; BÜCHI, G. Openness to Industry 4.0 and performance: The impact of barriers and incentives. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 168, p. 120–756, jul. 2021.

33. CULOT, G. et al. Behind the definition of Industry 4.0: Analysis and open questions. **International Journal of Production Economics**, v. 226, p. 107-617, ago. 2020.
34. DANESE, E. et al. Effect of CYP 4F2, VKORC 1, and CYP 2C9 in influencing coumarin dose: A single-patient data meta-analysis in more than 15,000 individuals. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, n. 6, p. 1.477-1.491, 17 jun. 2019.
35. DEMIR, K. A.; DÖVEN, G.; SEZEN, B. Industry 5.0 and human-robot co-working. **Procedia Computer Science**, v. 158, p. 688-695, 2019.
36. DHAR, P. The carbon impact of artificial intelligence. **Nature Machine Intelligence**, v. 2, n. 8, p. 423-425, 12 ago. 2020.
37. DINGLI, S. M.; HARPER, J. C. History of foresight techniques for creativity and innovation. [s.d.]. Disponível em: <https://www.eolss.net/sample-chapters/C15/E6-45-17.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2023.
38. DREWS, J. Innovation deficit revisited: Reflections on the productivity of pharmaceutical R&D. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 11, p. 491-494, nov. 1998.
39. DREWS, J.; RYSER, S. Innovation deficit in the pharmaceutical industry. **Drug Information Journal**, v. 30, n. 1, p. 97-108, 28 jan. 1996.
40. DUGGAL, A. S. et al. A sequential roadmap to Industry 6.0: Exploring future manufacturing trends. **IET Communications**, v. 16, n. 5, p. 521-531, 7 mar. 2022.
41. EHLS, D. et al. Guest editorial: Foresight in strategy and innovation management. **IEEE Transactions on Engineering Management**, v. 69, n. 2, p. 483-492, abr. 2022.
42. EUGSTER, J. L. et al. International knowledge spillovers. **Research Department (RES)**, p. 1-37, 2018.
43. EVERS, M.; HEID, A.; OSTOJIC, I. Pharma's digital Rx: Quantum computing in drug research and development. **McKinsey & Company**. 18 jun. 2021. Disponível em: <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/pharmas-digital-rx-quantum-computing-in-drug-research-and-development>. Acesso em: 10 dez. 2023.
44. FDA. FDA allows marketing of first whole slide imaging system for digital pathology. 12 abr. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-allows-marketing-first-whole-slide-imaging-system-digital-pathology>. Acesso em: 10 dez. 2023.
45. FDA. FDA's predictive toxicology roadmap. 25 set. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/fdas-predictive-toxicology-roadmap>. Acesso em: 10 dez. 2023.
46. FDA. Advancing new alternative methodologies at FDA. [s.d.]. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/144891/download>. Acesso em: 10 dez. 2023.
47. FDA. Advancing alternative methods at FDA. 14 nov. 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/advancing-alternative-methods-fda>. Acesso em: 10 dez. 2023.
48. FIALHO, B. **Dependência tecnológica e biodiversidade: um estudo histórico sobre a indústria farmacêutica no Brasil e nos Estados Unidos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005.
49. FIESP. Sondagem Fiesp da Indústria 4.0. nov. 2019. Disponível em: https://www.sicongel.org.br/wp-content/uploads/2019/12/Sondagem-FIESP-de-Indústria-4_0-2-Ed.pdf. Acesso em: 10 dez. 2023.
50. FILHA, M. et al. **Estratégias de desenvolvimento, política industrial e inovação: ensaios em memória de Fabio Erber**. 2014. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1441>. Acesso em: 10 dez. 2023.
51. FRANK, A. G.; DALENOGARE, L. S.; AYALA, N. F. Industry 4.0 technologies: Implementation patterns in manufacturing companies. **International Journal of Production Economics**, v. 210, p. 15-26, abr. 2019.
52. FULTINAVIČIŪTĖ, U. et al. DCT Tracker: tracing industry's adoption of decentralised clinical trials. **Clinical Trials Arena**. 3 fev. 2022. Disponível em: <https://www.clinicaltrialsarena.com/features/dct-adoption-tracker-who-and-what-is-at-the-crest-of-the-trial-decentralisation-wave/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
53. GAJARE, S. R.; DESHMUKH, A. S.; SHINDE, C. K. Personalized medicine: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 69, n. 1, 15 jul. 2021.
54. GAO. **Artificial intelligence in health care: Benefits and challenges of technologies to augment patient care**. nov. 2020. Disponível em: <https://www.gao.gov/assets/gao-21-7sp.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2023.
55. GAO. Artificial Intelligence in Health Care: Benefits and Challenges of Machine Learning in Drug Development. 20 dez. 2019. Disponível em: <https://www.gao.gov/products/gao-20-215sp>. Acesso em: 10 dez. 2023.
56. GAUTHIER, J. et al. A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1.981-1.996, 27 nov. 2019.
57. GERIS, L. et al. **The role of artificial intelligence within in silico medicine**. 2022. Disponível em: https://www.vph-institute.org/upload/ai-in-health-white-paper_6331c4e3c60cb.pdf. Acesso em: 10 dez. 2023.
58. GHOBAKHLOO, M. The future of manufacturing industry: A strategic roadmap toward Industry 4.0. **Journal of Manufacturing Technology Management**, v. 29, n. 6, p. 910-936, 13 jul. 2018.
59. GIRI, G.; MADDAHI, Y.; ZAREINIA, K. A brief review on challenges in design and development of nanorobots for medical applications. **Applied Sciences**, v. 11, n. 21, p. 10.385, 5 nov. 2021.
60. GOVINDARAJAN, U. H.; TRAPPEY, A. J. C.; TRAPPEY, C. V. Immersive technology for human-centric cyberphysical systems in complex manufacturing processes: A comprehensive overview of the global patent profile using collective intelligence. **Complexity**, v. 2.018, p. 1-17, 2018.
61. GOYAL, G. et al. Ectopic lymphoid follicle formation and human seasonal influenza vaccination responses recapitulated in an organ-on-a-chip. **Advanced Science**, v. 9, n. 14, p. e2103241, 14 maio 2022.
62. GUHA, R. et al. Future of pharma manufacturing: how digital could transform pharma manufacturing in future. **BCG**. 16 dez. 2020. Disponível em: <https://www.bcg.com/future-of-pharma-manufacturing>. Acesso em: 10 dez. 2023.
63. HAGEN, J. B. The origins of bioinformatics. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 3, p. 231-236, dez. 2000.
64. HALLAL, P. C. et al. Slow spread of SARS-CoV-2 in Southern Brazil over a 6-month period: Report on 8 sequential statewide serological surveys including 35 611 participants. **American Journal of Public Health**, v. 111, n. 8, p. 1.542-1.550, 29 jun. 2021.
65. HALUCK, N. Who's really first in FDA cleared digital therapeutics? **Reflections on healthcare & life sciences innovation**. 13 nov. 2017. Disponível em: <https://healthadvances.com/insights/blog/whos-really-first-in-fda-cleared-digital-therapeutics>.

66. HALWANI, A. A. Development of pharmaceutical nanomedicines: From the bench to the market. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 106, 3 jan. 2022.
67. HARPER, J. C.; GEORGHIU, L. Foresight in innovation policy: Shared visions for a science park and business–university links in a city region. **Technology Analysis & Strategic Management**, v. 17, n. 2, p. 147–160, jun. 2005.
68. HARVEY, D. **The fetish of technology: causes and consequences**. Nova York: City University of New York, 2003.
69. HARVEY, J. D. et al. A carbon nanotube reporter of microRNA hybridization events in vivo. **Nature Biomedical Engineering**, v. 1, n. 4, p. 41, 13 mar. 2017.
70. HAYES, M. Engineers create “lifelike” material with artificial metabolism. **Cornell Chronicle**. 10 abr. 2019. Disponível em: <https://news.cornell.edu/stories/2019/04/engineers-create-lifelike-material-artificial-metabolism>. Acesso em: 10 dez. 2023.
71. HESSLER, G.; BARINGHAUS, K.-H. Artificial intelligence in drug design. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2.520, 2 out. 2018.
72. HUNTER, P. The “industrial” revolution in biomedical research. **EMBO reports**, v. 21, n. 2, 5 fev. 2020.
73. INGBER, D. E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 8, p. 467–491, 25 ago. 2022.
74. INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE. A “nano-robot” built entirely from DNA to explore cell processes. **Phys.org**. 28 jul. 2022. Disponível em: <https://phys.org/news/2022-07-nano-robot-built-dna-explore-cell.html>. Acesso em: 10 dez. 2023.
75. IQVIA. Digital health trends 2021: Innovation, evidence, regulation, and adoption. **IQVIA**, p. 1–76, jul. 2021.
76. IVALÉ, A. H.; SILVA, M. C. da; NÄÄS, I. de A. Cenário da publicação científica sobre a Indústria 4.0 no Brasil: Uma revisão bibliométrica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e10610513838, 29 abr. 2021.
77. JOSE, J. et al. In silico trial approach for biomedical products: A regulatory perspective. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 25, n. 12, p. 1.991–2.000, out. 2022.
78. KAEFER, K. et al. Implantable Sensors based on gold nanoparticles for continuous long-term concentration monitoring in the body. **Nano Letters**, v. 21, n. 7, p. 3.325–3.330, 14 abr. 2021.
79. KARATAS, M. et al. Big data for healthcare Industry 4.0: Applications, challenges and future perspectives. **Expert Systems with Applications**, v. 200, p. 116912, 2022.
80. KELLER, W. International Technology Diffusion. **Journal of Economic Literature**, v. 42, n. 3, p. 752–782, 1º ago. 2004.
81. KLIMEK, L. et al. Practical handling of allergic reactions to Covid-19 vaccines: A position paper from German and Austrian Allergy Societies AeDA, DGAKI, GPA and ÖGAI. **Allergo Journal International**, v. 30, n. 3, p. 79–95, 2021.
82. KLINGENBERG, C. O.; BORGES, M. A. V.; ANTUNES, J. A. do V. Industry 4.0: What makes it a revolution? A historical framework to understand the phenomenon. **Technology in Society**, v. 70, p. 102.009, ago. 2022.
83. KOYDEMIR, H. C.; OZCAN, A. Wearable and implantable sensors for biomedical applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 127–146, 12 jun. 2018.
84. KPMG. **Indústria 4.0 no Brasil: cenários e perspectivas**. Disponível em: <https://materiais.kpmgbrasil.com.br/industria-4-0-no-brasil-todos-os-capitulos>. Acesso em: 10 dez. 2023.
85. LACOSTE, A. et al. Quantifying the carbon emissions of machine learning. **CoRR**, v. abs/1910.0, 2019.
86. LEMSTRA, M. A. M. S.; DE MESQUITA, M. A. Industry 4.0: a tertiary literature review. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 186, p. 122204, jan. 2023.
87. LEUNG, C. M. et al. A guide to the organ-on-a-chip. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, n. 1, p. 33, 12 maio 2022.
88. LI, J.; CARAYON, P. Health care 4.0: A vision for smart and connected health care. **IISE Transactions on Healthcare Systems Engineering**, p. 1–10, 15 fev. 2021.
89. LIAO, Y. et al. Past, present and future of Industry 4.0 – a systematic literature review and research agenda proposal. **International Journal of Production Research**, v. 55, n. 12, p. 3.609–3.629, 18 jun. 2017.
90. LIEBENAU, J. **Medical science and medical industry**. Londres: Palgrave Macmillan UK, 1987.
91. LOBO BORBA, H. H.; WORANOVICZ CARVALHO, D. M. Impact of the Fourth Industrial Revolution on clinical pharmaceutical services: A scoping review. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v. 19, n. 2, p. 235–242, fev. 2023.
92. MA, C. et al. Organ-on-a-chip: A new paradigm for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 42, n. 2, p. 119–133, fev. 2021.
93. MAKIN, S. The emerging world of digital therapeutics. **Nature**, v. 573, n. 7.775, p. S106–S109, 26 set. 2019.
94. MALERBA, F.; ORSENIGO, L. The evolution of the pharmaceutical industry. **Business History**, v. 57, n. 5, p. 664–687, 4 jul. 2015.
95. MARX, K. **Capital: A critique of political economy**. Volume I: The process of capitalist production. Chicago: Charles H. Kerr and Company, 1867.
96. MATEO, J. et al. Delivering precision oncology to patients with cancer. **Nature Medicine**, v. 28, n. 4, p. 658–665, 19 abr. 2022.
97. MEHRA, M. Bio-Metaverse: The inception of new digital healthcare. **PharmaShots**. 14 jun. 2022. Disponível em: <https://www.pharmashots.com/7607/bio-metaverse-the-inception-of-new-digital-healthcare>. Acesso em: 10 dez. 2023.
98. MESKÓ, B.; GÖRÖG, M. A short guide for medical professionals in the era of artificial intelligence. **npj Digital Medicine**, v. 3, n. 1, p. 126, 24 set. 2020.
99. MILES, I. The development of technology foresight: A review. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 77, n. 9, p. 1.448–1.456, nov. 2010.
100. MILLÁN-MARTÍN, S. et al. Comprehensive multi-attribute method workflow for biotherapeutic characterization and current good manufacturing practices testing. **Nature Protocols**, v. 18, n. 4, p. 1.056–1.089, 16 abr. 2023.
101. MILLER, D. D.; BROWN, E. W. Artificial intelligence in medical practice: The question to the answer? **The American Journal of Medicine**, v. 131, n. 2, p. 129–133, fev. 2018.
102. MPO. FDA clears first whole slide imaging system for digital pathology. **MPO**. 13 abr. 2017. Disponível em: https://www.mpo-mag.com/contents/view_breaking-news/2017-04-13/fda-clears-first-whole-slide-imaging-system-for-digital-pathology/. Acesso em: 10 dez. 2023.
103. MULLER, C.; RABAL, O.; DIAZ GONZALEZ, C. Artificial intelligence, machine learning, and deep learning in real-life drug design cases. *In: Methods in Molecular Biology*. Nova York: Springer, 2022. p. 383–407.
104. NASSIF, A.; MORCEIRO, P. C. Industrial policy for prematurely deindustrialized economies after the Covid-19 pandemic

- crisis: Integrating economic, social and environmental goals with policy proposals for Brazil. **Instituto de Economia**. [s.d.]. Disponível em: <https://www.eco.unicamp.br/observatorio-da-economia-contemporanea/producao-e-tecnologica/industrial-policy-for-prematurely-deindustrialized-economies-after-the-covid-19-pandemic-crisis-integrating-economic-social-and-environmental-goals-with-policy-proposals-for-brazil>. Acesso em: 13 mar. 2023.
105. NESHICH, G. Computational biology in Brazil. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 10, p. e185, 2007.
 106. NETHERLANDS ENTERPRISE AGENCY. **Brazil LSH Market Study Final**. dez. 2019. Disponível em: <https://www.rvo.nl/sites/default/files/2019/12/Brazil-Life-Sciences-Health-Market-Study-2019.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2023.
 107. NI, Y. et al. A plug-and-play platform of ratiometric bioluminescent sensors for homogeneous immunoassays. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 4.586, 28 jul. 2021.
 108. OPENAI. AI and compute. 16 maio 2018. Disponível em: <https://openai.com/research/ai-and-compute>. Acesso em: 10 dez. 2023.
 109. OUYANG, A.; JAMEEL, A. L. Artificial intelligence model can detect Parkinson's from breathing patterns. MIT News. 22 ago. 2022. Disponível em: <https://news.mit.edu/2022/artificial-intelligence-can-detect-parkinsons-from-breathing-patterns-0822>. Acesso em: 10 dez. 2023.
 110. OUZOUNIS, C. A. The emergence of bioinformatics: Historical perspective, quick overview and future trends. In: **Bioinformatics in Cancer and Cancer Therapy**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 1–11.
 111. PAPPALARDO, F. et al. In silico clinical trials: Concepts and early adoptions. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 1.699–1.708, 27 set. 2019.
 112. PATEL, S. K. R&D using the metaverse and digital twins. **Applied Clinical Trials**. 11 ago. 2022. Disponível em: <https://www.appliedclinicaltrials.com/view/r-d-using-the-metaverse-and-digital-twins>. Acesso em: 10 dez. 2023.
 113. PAUL, A. et al. Peoples' understanding, acceptance, and perceived challenges of vaccination against Covid-19: A cross-sectional study in Bangladesh. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8, ago. 2021a.
 114. PAUL, D. et al. Artificial intelligence in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 1, p. 80–93, jan. 2021b.
 115. PAUL, S. et al. Industry 4.0 applications for medical/healthcare services. **Journal of Sensor and Actuator Networks**, v. 10, n. 3, p. 43, 30 jun. 2021c.
 116. POLINI, A. et al. Towards the development of human immune-system-on-a-chip platforms. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 2, p. 517–525, fev. 2019.
 117. POPPER, R. Foresight Methodology. In: GEORGHIOU, L. et al. (ed.). **The handbook of technology foresight: Concepts and practice**. Manchester: Edward Elgar Pub, 2009. p. 45–88.
 118. PRAVIN, B.; KISHOR, O.; ASHWINI, B. Personalized medicine: the future of Modern Medicine. **Authorea**, 2021.
 119. PRONIEWSKA, K. et al. Immersive technologies as a solution for general data protection regulation in Europe and impact on the Covid-19 pandemic. **Cardiology Journal**, v. 28, n. 1, p. 23–33, 25 fev. 2021.
 120. RAJ, A. et al. Barriers to the adoption of Industry 4.0 technologies in the manufacturing sector: An inter-country comparative perspective. **International Journal of Production Economics**, v. 224, p. 107546, jun. 2020.
 121. RAJA SANTHI, A.; MUTHUSWAMY, P. Industry 5.0 or Industry 4.0? Introduction to Industry 4.0 and a peek into the prospective Industry 5.0 technologies. **International Journal on Interactive Design and Manufacturing (IJIDeM)**, v. 17, n. 2, p. 947–979, 5 abr. 2023.
 122. RAMÍREZ-DJUMENA, N. Digital divide. **International Monetary Fund**. set. 2016. Disponível em: <https://www.imf.org/external/pubs/ft/fandd/2016/09/picture.htm>. Acesso em: 10 dez. 2023.
 123. REINHARDT, I. C.; OLIVEIRA, D. J. C.; RING, D. D. T. Current perspectives on the development of Industry 4.0 in the pharmaceutical sector. **Journal of Industrial Information Integration**, v. 18, p. 100131, jun. 2020.
 124. ROCHA, M. A. Indústria 4.0 e desemprego tecnológico na manufatura brasileira. **Revista Brasileira de Economia Social e do Trabalho (RBEST)**, v. 3, p. e021019, 24 dez. 2021.
 125. ROHRBECK, R.; BATTISTELLA, C.; HUIZINGH, E. Corporate foresight: An emerging field with a rich tradition. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 101, p. 1–9, dez. 2015.
 126. ROSTOW, W. W.; KENNEDY, M. **Theorists of economic growth from David Hume to the present: With a perspective on the next century**. Oxford: Oxford University Press, 1990.
 127. RYAN, K.; HUBER, L. Are you (meta)versed and ready for health 3.0? **PharmExec.com**. 4 abr. 2022. Disponível em: <https://www.pharmexec.com/view/are-you-meta-versed-and-ready-for-health-3-0->. Acesso em: 10 dez. 2023.
 128. SALDANHA, L.; LANGEL, Ü.; VALE, N. In silico studies to support vaccine development. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 654, 15 fev. 2023.
 129. SATYRO, W. C. et al. Implementation of Industry 4.0 in Germany, Brazil and Portugal: Barriers and Benefits. In: [s.l.]:[s.n.]. p. 323–330.
 130. SCHMIDT, V. et al. **Machine learning emissions calculator**. [s.d.]. Disponível em: <https://mlco2.github.io/impact/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
 131. SCHWARTZ, R. et al. Green AI. **Communications of the ACM**, v. 63, n. 12, p. 54–63, 17 nov. 2020.
 132. SILVA, S. de A. E.; NOTARI, D. L.; DALL'ALBA, G. **Bioinformática: contexto computacional e aplicações**. Caxias do Sul: Fundação Universidade de Caxias do Sul, 2020.
 133. SIMON, H. A. A behavioral model of rational choice. **The Quarterly Journal of Economics**, v. 69, n. 1, p. 99, fev. 1955.
 134. SISODIA, A.; JINDAL, R. A meta-analysis of Industry 4.0 design principles applied in the health sector. **Engineering Applications of Artificial Intelligence**, v. 104, n. Complete, 2021.
 135. SKARYSZ, A. et al. Fast and automated biomarker detection in breath samples with machine learning. **PLOS ONE**, v. 17, n. 4, p. e0265399, 12 abr. 2022.
 136. SOARES, J. C. et al. Detection of a SARS-CoV-2 sequence with genosensors using data analysis based on information visualization and machine learning techniques. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 15, p. 5.658–5.670, 2021.
 137. SPINNER, J. FDA grants breakthrough device designation to digital therapeutic. **OutsourcingPharma**. 29 jul. 2021. Disponível em: <https://www.outsourcing-pharma.com/Article/2021/07/29/FDA-grants-breakthrough-designation-to-digital-therapeutic>. Acesso em: 10 dez. 2023.

138. SREEKANTH, J. V. et al. Fiber-type solar cells, nanogenerators, batteries, and supercapacitors for wearable applications. **Advanced Science**, v. 5, n. 9, p. 1800340, 17 set. 2018.
139. SRINIVAS, S. Technological learning and the evolution of the Indian pharmaceutical and biopharmaceutical sectors. **MIT Libraries**. 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1721.1/17719>. Acesso em: 10 dez. 2023.
140. SUAREZ-KURTZ, G.; DE ARAÚJO, G. S. Pharmacogenetic differentiation across Latin America. **Pharmacogenomics**, v. 23, n. 4, p. 225–233, mar. 2022.
141. SUZIGAN, W.; GARCIA, R.; ASSIS FEITOSA, P. H. Instituições e os desafios da política industrial no Brasil. [s.d.]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/356617118_INSTITUICOES_E_OS_DESAFIOS_DA_POLITICA_INDUSTRIAL_NO_BRASIL/citation/download. Acesso em: 10 dez. 2023.
142. THE MEDICAL FUTURIST. Hype cycle of the top 50 emerging digital health trends by the medical futurist. **The Medical Futurist**. 20 abr. 2023. Disponível em: <https://medicalfuturist.com/healthcare-trends-hype-cycle/#>. Acesso em: 10 dez. 2023.
143. TORTORELLA, G. L. et al. Organizational learning paths based upon Industry 4.0 adoption: An empirical study with Brazilian manufacturers. **International Journal of Production Economics**, v. 219, p. 284–294, jan. 2020.
144. TORTORELLA, G. L.; FETTERMANN, D. Implementation of Industry 4.0 and lean production in Brazilian manufacturing companies. **International Journal of Production Research**, v. 56, n. 8, p. 2.975–2.987, 18 abr. 2018.
145. TRAN, T. T. VAN; TAYARA, H.; CHONG, K. T. Recent studies of artificial intelligence on in silico drug distribution prediction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1.815, 17 jan. 2023.
146. UNCTAD. Digital Economy Report 2019. **United Nations**, p. 1–194, set. 2019.
147. UNCTAD. **DIGITAL ECONOMY REPORT 2021**. Nova York: [s.n.]. 2021. Disponível em: https://unctad.org/system/files/official-document/der2021_en.pdf. Acesso em: 10 dez. 2023.
148. UNITED NATIONS. **World Economic And Social Survey 2018: Frontier Technologies For Sustainable Development**. 8 out. 2018. Disponível em: <https://www.un.org/development/desa/dpad/publication/world-economic-and-social-survey-2018-frontier-technologies-for-sustainable-development/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
149. UNSWORTH, H. et al. The NICE Evidence Standards Framework for digital health and care technologies: Developing and maintaining an innovative evidence framework with global impact. **Digital Health**, v. 7, p. 205520762110186, 24 jan. 2021.
150. URAL, A.; BARAL, S.; SUSSHOLZ, E. **How ecosystems can help fill the life sciences innovation gap**. [s.l.]: [s.n.], [s.d.].
151. VAN LIESHOUT, L. L. F. et al. Induction and relief of curiosity elicit parietal and frontal activity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 38, n. 10, p. 2.579–2.588, mar. 2018.
152. VAN LIESHOUT, L. L. F. et al. Curiosity or savouring? Information seeking is modulated by both uncertainty and valence. **PLoS one**, v. 16, n. 9, p. e0257011, 2021.
153. VASUDEVAN, A. et al. In silico and in vitro screening of natural compounds as broad-spectrum β -lactamase inhibitors against *Acinetobacter baumannii* New Delhi Metallo- β -lactamase-1 (NDM-1). **BioMed Research International**, v. 2.022, p. 4230788, 2022.
154. VAZ, V. M.; KUMAR, L. 3D printing as a promising tool in personalized medicine. **AAPS PharmSciTech**, v. 22, n. 1, p. 49, 17 jan. 2021.
155. VILAÇA JUNIOR, A. P. Underdevelopment in contemporary world: Is structuralism still relevant? **Brazilian Journal of Political Economy**, v. 37, n. 4, p. 755–771, dez. 2017.
156. WALTERS, R. K. et al. The emerging potential of interactive virtual reality in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, n. 7, p. 685–698, 3 jul. 2022.
157. WANG, C.; LEE, C.; SHIN, H. Digital therapeutics from bench to bedside. **npj Digital Medicine**, v. 6, n. 1, p. 38, 10 mar. 2023.
158. WHO. **mHealth: Use of appropriate digital technologies for public health: report by the Director-General**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274134>. Acesso em: 10 dez. 2023.
159. WHO. **WHO guideline: Recommendations on digital interventions for health system strengthening: evidence and recommendations**. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311980>. Acesso em: 10 dez. 2023.
160. WHO. **Global strategy on digital health 2020–2025**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/gsdhdaa2a9f352b0445bafbc79ca799dce4d.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2023.
161. WORLD BANK. Global outlook: The turning of the tide? **Global Economic Prospects**, v. 1, 2018.
162. WORLD UNCERTAINTY INDEX. Data. **World Uncertainty Index**. 2023. Disponível em: <https://worlduncertaintyindex.com/data/>. Acesso em: 10 dez. 2023.
163. YANG, T.; SHAH, S.; CHANG, C. The future of biopharma: Remaining traditional business models in 2040. **Deloitte**, p. 1–24, 2020.
164. ZANG, Q. et al. In silico prediction of physicochemical properties of environmental chemicals using molecular fingerprints and machine learning. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 1, p. 36–49, 23 jan. 2017.
165. ZHANG, L. et al. From machine learning to deep learning: Progress in machine intelligence for rational drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 11, p. 1.680–1.685, nov. 2017.

Índice remissivo

A

Abatacepte 241
Ácido siálico N-glicolilneuramínico 189
Acordo TRIPS 179
Adalimumabe 180, 241, 246
11-17-Adenosina desaminase bovina 193
Adenovírus 336
Aedes aegypti 50, 81
Aflibercepte 219
Agência Nacional de Vigilância Sanitária 19
 análise de um registro de produto biotecnológico 298
Agências reguladoras 296, 297
Agricultura 3
Agrobacterium tumefaciens 34
Alfa-alglicosidase 219
Alfacerliponase 219
Alfadamocotogue pegol 219
Alfaelossulfase 219
Alfaepoetina 219
Alfa-galactosidade A 193
Alfaglicosidase ácida 193
Alfainterferona 219
Alfamanosidase lisossomal 193
Alfapeginterferona 219
Alfataliglicerase 199, 219
Alfavestronidase 219
Alteplase 219
Amplificação isotérmica 129
Anatoxina diftérica 92
Animais transgênicos 36
Antibody-dependent cell cytotoxicity 345
Anticorpo(s)
 antidroga 232
 anti-*Saccharomyces cerevisiae* 156
 conjugado a drogas 239, 368
 de neutrófilos 156
 monoclonais 167, 197, 293
 aprovados no Brasil para tratamento de doenças onco-hematológicas 243
 hibridomas 225
 metodologia de *phage display* 228
 para o Complexo Econômico Industrial da Saúde 244
 terapêuticos 170, 224, 231, 240
 químicos 368
 terapêuticos 238
Antígeno 54
 carcinoembrionário 152
Antiguidade 2
Anti-inflamatórios não esteroidais 156, 170
Aperfeiçoamento biotecnológico 3
Aptâmeros 367, 368
 radiomarcados *in vivo* 374
Arrowia lipolytica 31
Artrite psoriásica 180
Artrite reumatoide 157, 180, 205
Aspectos
 da qualidade 323
 históricos sobre a farmacovigilância no Brasil e no mundo 303
 político-estruturais relacionados à produção 178
 técnicos para a aprovação de um produto biotecnológico 296
Atezolizumabe 153, 244

Ativador do plasminogênio tecidual 185
Atrofia muscular espinhal 375
Aumento de escala 260
Automação e sistemas ciberfísicos 387
Avaliação
 da biossimilaridade 315
 de registro de produto biotecnológico 296
 dos eventos adversos 310
Avelumabe 153, 244

B

Bacille Calmette-Guérin – BCG 90
Bacillus anthrax 45
Backlog tecnológico 62
Bactérias do ácido lático 100
Baculovírus 31
 expression vector system 31
Balança comercial da saúde 15
Belimumabe 241
Betaglucocerebrosidase 185, 193
Betaglucuronidase 193
Betainterferona 180, 219
Bevacizumabe 243
Biblioteca de fagos 229
Biobetters 181, 200
Biobrás 15
Bioconvergência 3, 4
Biofármacos 15, 185
 armazenamento 188
 classificação 167
 descoberta 175
 e reativos para diagnóstico 95
 evolução 198

mais vendidos 171

Biogênese da produção de vesícula de membrana externa na bactéria 96

Bioinformática 3, 394

Biomarcadores 145

de diagnóstico 147

de prognóstico 147

de resposta 148

de eficácia ou *endpoints* substitutos 150

de segurança 148

em oncologia 150

farmacodinâmicos 149

na reumatologia 157

nas doenças inflamatórias intestinais 153

preditivos 147

de resposta terapêutica 158

principais classes 148

transcriptômicos 146

Biorreatores 256

Biossimilares 181, 297

e produto inovador 315

em doenças raras 323

Biossuperiores 200

Biotecnologia

aplicada à terapia gênica e celular 350

dimensão regulatória no Brasil 19

em biofármacos 166

em testes para diagnóstico 116

em vacinas 42

farmacêutica 18

no Brasil 8

no mundo 4

publicações na área 8

vegetal 34

Bioterapêuticos produzidos em *E. coli* 28

Bioterapia 369

Biotina-rizavidina 56

Boas Práticas 289

Clínicas 291

de Fabricação 61, 135, 291, 297

certificado 291

clínicas e laboratoriais 289

normas sanitárias para 292

de Laboratório 292

princípios 293

etapas do ciclo de vida do produto 290

Bordetella pertussis 91

Borrelia burgdorferi 49

C

Cadeia de frio 62

Calendário vacinal 54

Calprotectina fecal 154

Campanha de vacinação 51

contra a varíola 51

Campylobacter jejuni 58

Camundongos humanizados e *single cell sequencing* 230

Câncer 147, 369

de mama 371

de próstata 370

Carboxypeptidase G2 de *Pseudomonas* sp. 194

Cassete de seleção 25

Catapora 75

Caxumba 76

Célula(s)

animais mais utilizadas na indústria para a produção de biofármacos 33

cancerígenas 172, 371

CAR-T 335

e seu processo de preparo 338

de mamíferos 32, 189

hematopoiéticas 340

inteiras mortas 90

inteiras vivas 89

natural killer 339, 344

ativação 345

uso clínico 346

T 52

helper 1 54

Células-tronco 343

Cemiplimabe 244

Centro Nacional de Monitorização de Medicamentos 303

Centros de referência de imunobiológicos especiais 65, 72

Cepas de *E. coli* utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes 30

Certificado de Qualidade em Biossegurança 20

Certolizumabe pegol 241

Cetuximabe 243

Chikungunya 71, 131

Ciclo de desenvolvimento de uma vacina 102

Citocinas 190

Citomegalovírus 26, 32, 56, 71

Citometria de fluxo 123, 224

Citotoxicidade celular dependente de anticorpo 328

Clinical Disease Activity Index 157

Clonagem do gene de interesse 25

Clonagem e expressão 24

Clones 225

produtores de anticorpos 231

Clostridium tetani 91

Comercialização de produtos biotecnológicos 288

Comissão

de revisão institucional 292

Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos 19

Técnica Nacional de Biossegurança 19

Comitê independente de ética 292

Comparabilidade de biossimilares 314

Compatibilidade entre doador e receptor 342

Complexo Econômico Industrial da Saúde 63, 109, 352

contribuições 62

papel das vacinas bacterianas 109

Complexo receptor interferon-gama 191

Comunicação

de risco 311, 312

dos eventos adversos 311

Condicionamento e imunossupressão 344

Conectividade 387

Congelamento 281

Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano 288

Controles de qualidade 59

Coqueluche 91, 105

Corynebacterium diphtheriae 91

Covid-19 19, 61, 69, 81, 272, 295, 379

e bactérias RAM 99

Cromatografia 268

CTNBio e a biossegurança 19

Cultivo de células 259

de insetos 31

Cut-off point 115

D

Daratumumabe 243

Declaração de Helsinque 292

- Dengue 65, 71, 81, 131
 Descontinuação do Produto 289
 Desenvolvimento
 de novas vacinas 58
 de vacinas 363
 desafios nacionais 62
 tecnológico 136
 Desinformação e a desconfiança 311
 Desoxirribonuclease I 194
 Detecção de anticorpos neutralizantes 124
 Diabetes 180
 melito 214
 Diafiltração 102
 Diagnóstico 118
 parasitológico 119
 Difteria 104
 Diretrizes Gerais de Boas Práticas de
 Fabricação de Medicamentos 293
Disease Activity Score 157
 DNA recombinante e sistemas de
 expressão 24
 Doador 343
 Doença(s)
 ácido-relacionadas e úlcera péptica 156
 de Creutzfeld-Jakob 185
 de Crohn 154, 180
 de Gaucher 185, 217
 gastrointestinal enxerto *vs.*
 hospedeiro 156
 imuno-oncológicas 172
 inflamatórias imunomediadas 170,
 240
 interesse na reumatologia 240
 invasiva
 causada por *Haemophilus influenzae* tipo b 106
 causada por pneumococo 107
 meningocócica 106
 modificadoras da doença sintéticas 170
 raras 332
 reumatológicas 159
Downstream 102, 176, 304
 Dupla bacteriana do tipo infantil 104
 Durvalumabe 153, 244
- E**
- Ebola 56, 84
 ELISA 122, 224
 Embriões 253
 Emergência de Saúde Pública de
 Importância Internacional 82
 Empresas 309
 Encefalite espongiforme bovina 258
 Encomenda tecnológica 16
 Endocrinologia 169
Endpoints 148
 Engenharia
 de anticorpos e variações de formatos 232
 genética 49
Enhancers 26
 Enoxaparina 219
 Ensaio
 clínico 321
 de equivalência 322
 imunoenzimático 121
 Envase 278
 Enxertia 344
 Enxerto contra o tumor mediado por
 determinantes antigênicos
 menores 343
 Enzima 192
 hepática alaninagioxilato
 aminotransferase 367
 terapêutica recombinante de uso
 humano 193
 Era de ouro do desenvolvimento de
 vacinas 48
 Eritropoetina 185
 recombinante 188
 Erlotinibe 371
 Erro de medicação 303
 Escalonamento por volume 270
Escherichia coli 24, 26, 49
 recombinante 58
 Esclerose múltipla 180
 Escore de Allred 151
 Esfingomielinase ácida 194
 Espondilite ancilosante 180
 Esquema vacinal 74, 75
 Estomatite vesicular 56
 Estratégias de *prime and boost* 69
 Estrutura e função de anticorpos 223
 Estudos de desenvolvimento por
 comparabilidade
 analíticos 317
 clínicos 319
 confirmatórios 320
 não clínicos 318
 pré-clínicos 58
 Etanercepte 180, 205, 219, 241, 246
- Etapa
 de conjugação 265
 de *downstream* 252
 de desenvolvimento de um produto
 biológico 294
 de *upstream* 252, 304
 do desenvolvimento do processo de
 produção de uma vacina 59
 Eventos adversos 311
 de interesse especial 305
 envolvendo medicamentos biológicos 308
 não graves 305
 quanto à relação causal com o
 medicamento 306
 Evento supostamente atribuível à
 vacinação ou imunização 305
 Exames laboratoriais e testes para
 diagnóstico 114
- F**
- Fabricante do medicamento inovador 317
 Farmacovigilância 58, 297, 302-304, 312
 na detecção, notificação, investigação
 e avaliação dos eventos
 adversos 305
 para segurança dos produtos de
 origem biotecnológica 304
 Fase
 de desenvolvimento clínico 177
 pré-clínica 175
 e clínicas durante o
 desenvolvimento de vacinas 60
 Fator de necrose tumoral 191
 Fatores
 de coagulação sanguínea 185, 190
 de crescimento hematopoiéticos 191
 Febre
 amarela 46, 72, 73
 de Lassa 71
 do Nilo Ocidental 71
 tifoide 92, 108
 Fenilalanina hidroxilase 194
 Fibrose cística 156
 Filtração
 com membranas e inativação viral 269
 tangencial automatizado 271
 Flavivírus 71
 Fonte das células-tronco 343

G

Galsulfase 219
 Gasto com biológicos de 2ª geração 13
 Gastos em vacinas 14
 Gastroenterologia 153
 Gene recombinante 26
 Genômica 3
 Gerenciamento de sinais de segurança 311
 Gestantes 105
 Glicoengenharia 31
 Glicoproteínas 189
 Glicosilação 186
 de uma proteína recombinante 259
 Golimumabe 180, 241, 246
 Gripe espanhola de 1918 47
 Guia internacional ICHE6 (R2) 292
 Guselcumabe 241

H

Haemophilus influenzae 48
 b 78
Hansenula polymorpha 31
 Hemaglutinina 69
 Hepatite 68, 77
 Herpesvírus 336
 Herpes-zóster 81
 Hialuronidase 194
 Hibridização genômica comparativa 146
 Híbridomas 224, 226
 Hidradenite supurativa 180
 Hiperglicemia 215
 Hiperinsulinemia 209
 Hipopituitarismo 180
 História das vacinas no Brasil 49
 Homogeneização do cultivo 258
 Homogeneizador de alta pressão 267
 Hormônio recombinante de crescimento humano 169
 Hormônios 190
Host cell proteins 189
Human epidermal growth factor receptor 2 151
 Humanização de anticorpos 234

I

Idursulfase 219
 Implementação de testes para diagnóstico 137

Imunidade
 antivector 69
 de mucosa 79
 de rebanho 54
 mediada por células 358
 pós-vacinação 75
 Imunocromatografia de duplo percurso 126
 Imunodiagnóstico 120
 Imunoensaios de quimiluminescência 122
 Imunofluorescência 120
 Imunogenicidade 65
 Inclisirana 367
 Indústria farmacêutica 166
 Inefetividade terapêutica 303
 Infarto agudo do miocárdio 185
 Infecções 155
 Infliximabe 180, 241, 246
 Influenza 47, 62, 74
 Infusão das células-tronco 341
 Ingrediente farmacêutico ativo 252
 Inibidores do fator de necrose tumoral alfa 170
 Inotersen 378
 Inovação no SUS 16
 Inspeção visual e teste de integridade 283
 Instituto
 de Tecnologia em Imunobiológicos 10, 51
 Nacional da Propriedade Industrial 19
 Instrução normativa 292
 Insuficiência hepática aguda 149
 Insulina 169, 180, 188
 glargina 210
 história 206
 humana recombinante 24
 lispro 210
 recombinante 209
 Insumo farmacêutico ativo 275
 Interação medicamentosa 303
 Intercambialidade de biossimilares 323
 Interferons 191
 recombinantes 192
 Interleucinas 191
 Intoxicações por medicamentos 303
 Investigação de novos medicamentos 177
 Investimento
 em Ciência e Tecnologia 22
 em plataformas tecnológicas 57

Ipilimumabe 243
 Isoenzima tecidual não específica da fosfatase alcalina 194
 Isolamento
 de proteínas 102
 do antígeno do meio de cultivo 102
 Ixequizumabe 241

K

Klebsiella spp. 63
Kluyveromyces lactis 31

L

Larga escala de vacinas e biofármacos 276
 Laronidase 219
 L-asparaginase 195
 Lei
 de Competição e Inovação de Preços de Biológicos 315
 de Controle Biológico 290
 Leite de coelho 199
 Lentivírus 336
 Lesão renal aguda 149
 Leucemia 147
 Licenciamento 65
 abreviado 315
 Limitação de estudos em animais para biossimilares 319
 Linfócitos
 infiltrantes tumorais 339
 T citotóxicos CD8+ 348
 Linfodepleção 341
 Linfoma não Hodgkin de células B 180
 Linha do tempo
 da evolução das tecnologias utilizadas em métodos diagnósticos 117
 da introdução de vacinas 53
 Liofilização 281
 Lipase ácida lisossomal 195
 Lote 283
 experimental 294
 Lumasirana 367
 Lúpus eritematoso sistêmico 158

M

Manipulação do ácido desoxirribonucleico 24
 Mapa Biotec 11
Dashboard 9

- Máquina de inspeção visual para frascos 284
- Marcos no desenvolvimento de vacinas 44
- Medicamento(s)
biológicos 19, 180
biossimilar 314
experimental 295
uso *off label* 303
inovadores e biossimilares 318
- Medicina
de precisão 146
personalizada 399
translacional 5
- Medula óssea 343
- Meia-vida de circulação plasmática 203
- Melanoma com linfócitos T que infiltram os tumores 348
- Meningite meningocócica 51
ACWY conjugada 107
- Microambiente tumoral 348
- Microarranjos sólidos e líquidos 129
- Microarray* 146
- Microorganismos vivos com baixa virulência 42
- Mieloablação 341
- Modelos animais 319
- Modificações
de formulação 202
pós-traducionais 26
- Modified vaccinia ankara* 71
- Monkeypox* 82, 135
- MRNA 356
- Mycobacterium bovis* 90
- N**
- N-acetilgalactosamina 195
- Nanopartículas 363
lipídicas 356
- Nanotecnologia 363
- Neisseria meningitidis* 48, 92
- Neoantígenos 361
- Neoplasias 155
- Neurotrophic tyrosine receptor kinase* 152
- Nicotiana benthamiana* 34
- N-iduronato-2-sulfatase 195
- Níveis de reatogenicidade 89
- Nivolumabe 153, 243
- Notificação e registro dos eventos adversos 308
- O**
- Onabotulinotoxina 219
- Oncologia
anticorpos monoclonais 242
- Operações de *downstream* 261
- Operações de *upstream* 254
- Organismos geneticamente modificados 19
- Origem de replicação 25
- Orthopoxvirus* 83
- Oswaldo Cruz 50
- Ovos de galinha 57
- P**
- Palivizumabe 180
- Pandemia de Covid-19 61
- Panitumumabe 243
- Papel da qualidade na produção de vacinas e biofármacos 293
- Papilomavírus 69
humano 80
vacinas 358
- Paradoxo das vacinas polissacarídicas 94
- Paralisia
associada à vacina 79
aguda flácida 79
- Parcerias para o desenvolvimento produtivo 136, 180
vigentes de anticorpos monoclonais 246
- Patrocinadores de ensaios clínicos 309
- PCR em tempo real 128
- Pecuária 3
- Pegaptanibe 369
- Pembrolizumabe 153, 243
- Pertuzumabe 243
- Phage display* 227
- Pichia pastoris* 31, 208
- Planta fabril 297
- Plantas transgênicas e expressão transiente 34
- Plasmina humana 195
- Plataforma
de expressão transiente em plantas 35
de vacinas atenuadas 89
de vetor viral 69
tecnológica para diagnóstico de doenças infecciosas 118
vacinal 52
- Pneumo 10 107
- Pneumo 13 107
- Point-of-care* molecular 129
- Polietilenoglicol 203
- Polineuropatia amiloidótica familiar 376
- Poliomielite 47, 48, 78
paralítica 79
- Poliovírus derivado da vacina 79
- Polissacarídeos meningocócicos 92
- Porfirias agudas hepáticas 378
- Portarias e leis para apoio das atividades de biotecnologia 9
- Potenciadores 25
- Prime and boost* 62
- Primeira geração de vacina 55
- Princípio
biológico ativo 294
da precaução ou prudência 21
dos 3Rs 58
- Processamento final 275
- Processo
de obtenção da anatoxina tetânica após etapa de fermentação 263
de produção de pDNA 266
industrial biotecnológico convencional 253
de purificação 262
- Produção
comercial 289
de alimentos 3
de biorreatores 255
de ingrediente farmacêutico ativo de vacinas e biofármacos 254
de *kit* diagnóstico 272
de proteínas recombinantes 26
de RNAm e encapsulamento em LNPs 266
de vacinas atenuadas em ovos embrionários 254
de vacinas conjugadas 95
e desenvolvimento de biofármacos 174
- Produtos
biológicos 167, 181, 290, 293
desenvolvimento 174
biotecnológicos 10
farmacêuticos com maior faturamento 168
para diagnóstico *in vitro* 295
registrados em outro país 298
- Profissionais de saúde 308
- Programa

de Monitoramento Internacional de Medicamentos 303, 308, 310
 Nacional de Imunizações 51, 53, 91
 Parceria para o Desenvolvimento Produtivo 10
Programmed cell death 1/PDL-1 programmed-death ligand 1 152
 Projeto Genoma Humano 146
 Promotores 25
 Protease derivada de *Streptococcus pyogenes* 196
 Proteína
 C-reativa 157
 da célula hospedeira 189
 de fusão 197
 de uso terapêutico incorporadas para distribuição pelo Sistema Único de Saúde 219
 heterólogas em *E. coli* 30
 recombinantes 24, 27, 169, 184
 de uso terapêutico 189
 terapêutica 189
 viral hemaglutinina 68
 Proteômica 3
 Protocolo
 Charité 273
 de Vigilância Epidemiológica e Sanitária de Eventos Adversos Pós-Vacinação 309
Pseudomonas aeruginosa 63
 Psoríase 180
 Purificação
 da insulina 169
 da proteína de interesse 31
 de polissacarídeos capsulares 265

Q

Qualidade 288
 e Regulação Sanitária 288
 na produção de testes para diagnósticos 295
 Queixa técnica 303
 Quimioterapia 369

R

Rabies lyssavirus 84
 Radionuclídeos 374
 Radioterapia 369
 Raiva 84
 Ramucirumabe 243

Reação adversa a medicamento 303
 Reativos
 em Bio-Manguinhos/Fiocruz 136
 para diagnóstico 134
 de doenças infecciosas 114
 no CEIS 139
 de estrogênio 151
 Receptores quiméricos de antígenos 334
 Recravação 283
 inspeção visual, rotulagem e embalagem 282
 Registro
 de produtos biotecnológicos 297
 de produtos de terapias avançadas no Brasil 351
 Regulação em biotecnologia e biossimilares no mundo e no Brasil 296
 Resistência aos antimicrobianos 97
 Retocolite ulcerativa 154, 180
 Retrovírus 336
 Risanquizumabe 241
 Rituximabe 180, 241, 243, 246
 RNA mensageiro 356
 prevenção e tratamento de doenças 355
 Rotavírus 83
 Rotulagem
 do produto biotecnológico 297
 e embalagem 284
 de produtos biológicos 285
 Rubéola 76
 Ruptura celular e clarificação 267

S

Saccharomyces cerevisiae 31, 198, 208
Salmonella enterica 92
Salmonella typhi 45
 Sarampo 47, 76
 SARS-CoV-2 56, 69, 295
 Saúde Pública 22
Schizosaccharomyces pombo 31
 Secuquinumabe 241
 Segurança dos produtos biológicos 289
 Sequenciamento
 completo do genoma 146
 de nova geração 146
 do exoma 146
 Serviços de saúde 308
 Silenciamento de genes através de siRNA 366

Simplified Disease Activity Index 157
 Simulação asséptica 280
 Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos 9
 Síndrome
 de Turner 180
 pós-poliomielite 79
Single cell sequencing 230
 Sistema da qualidade
 farmacêutica 288, 289
 na produção de produtos biotecnológicos 288
 Sistema de expressão
 bacteriano 26
 de células de inseto 31
 de células de mamífero 32
 de leveduras 31
 de vegetais 33
 Sistema integrado de diagnóstico remoto 133
 Sistemas de entrega 360
 Sistemas de expressão mais utilizados para proteínas terapêuticas 26
 Sistema *single-use* de formulação de vacinas 277
 Sistemas integrados para diagnóstico remoto 133
 Sistemas *in vitro* de cultura de células 61
 Somatropina 180, 219
Staphylococcus aureus 63
Streptococcus pneumoniae 84
 Subnotificação 308
 Substância ativa 295
 Substâncias ultrapuras 188
 Survivina 371

T

Tanques de aço inoxidável 277
 Técnicas de separação na indústria farmacêutica 254
 Técnica SELEX 367, 368
 Tecnologia 386
 de hibridomas 224
 de *phage display* 227
 baseada em ácidos nucleicos 378
 digital
 na área da saúde e a bioinformática 392
 para o desenvolvimento *in silico* 396
 SELEX 367, 368

- single-use* 276
- Tecnovigilância 139
- Tempo até o lançamento 118
- Tendências tecnológicas 131, 389, 390
- Terapia(s)
- alvo 224
 - baseadas em ácidos nucleicos 173
 - às doenças genéticas 375
 - baseadas em aptâmeros 367
 - baseadas em RNAi 364
 - celular 173, 333
 - CAR-T 335
 - NK 347
 - TCR 338
 - com TIL 348
 - de reposição de proteínas 357
 - gênica
 - e celular 332, 333, 351
 - germinativa 334
 - somática 335
 - imunológicas não modificadas
 - geneticamente 339
- Termoestabilidade 62
- Teste(s)
- ELISA 121
 - laboratoriais 120
 - parasitológico Helm Teste 119
 - pré-clínico 58
 - rápido para detecção de anticorpos 125, 126
- Tétano 104, 257
- Tetanoespasmina 92
- Time of refrigeration* 283
- TMO alogênico 342, 343
- Tocilizumabe 180, 241
- Toxina botulínica 219
- Toxina tetânica 92
- Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights* 179
- Transferência de tecnologia 62, 136, 289
- Transplantados de células-tronco hematopoiéticas 105
- Transplante
- de medula óssea 339, 341
 - de precursores hematopoiéticos 341
- Trastuzumabe 243, 246
- entansina 243
- Tripanossomíase africana 47
- Tripeptidil-peptidase 1 196
- Tríplice bacteriana 105
- Tuberculose 103
- Tumores 360
- U**
- Upstream* 102, 176
- Urato oxidase 196
- Uricase 196
- Ustequinumabe 241
- V**
- Vacina(s) 43, 253, 254, 293
- antivaríola 45
 - antivaríólica jennericiana 50
 - atenuadas 67, 89
 - e inativadas 55
 - bacterianas 48
 - aplicações clínicas e recomendações 102
 - desenvolvimento e produção 101
 - tipos 89
 - de primeira geração 101
 - em desenvolvimento clínico e pré-clínico 98
 - baseadas em ácido nucleicos 56
 - baseadas em RNA 362
 - BCG 103
 - candidatas em desenvolvimento pré-clínico por patógeno 98
 - combinadas 54
 - conjugadas (polissacarídeo –proteína carreadora) 93
 - contra a coqueluche 91
 - contra a Covid-19 355
 - contra bactérias RAM 98
 - contra hepatite B 68, 78
 - contra tuberculose 90
 - da febre amarela 73
 - de ácidos nucleicos 71
 - de Ebola 56
 - de pertussis celular 256
 - de subunidade 68, 91
 - baseadas em anatoxinas 91
 - baseadas em polissacarídeos capsulares 92
 - baseadas em proteínas nativas 91
 - baseadas em vesícula de membrana externa 96
 - de vetores bacterianos 100
 - de vetores virais 69
 - dupla bacteriana – contra difteria e tétano 104
 - Haemophilus influenzae* tipo b 106
 - inativadas 66, 67, 90
 - meningocócica C conjugada 95, 107
 - para bactérias multirresistentes 97
 - para herpes-zóster 65
 - para influenza 69
 - para sarampo, caxumba e rubéola 76
 - para varicela 48
 - penta 106
 - pesquisa, desenvolvimento e produção 56
 - pneumocócica
 - conjugada 107
 - polissacarídica 23-valente 108
 - polissacarídicas 92
 - conjugada 264
 - preventiva 358
 - Salk 47
 - Sputnik V 69
 - utilizadas no Brasil 90
 - virais 65
 - aplicações clínicas e recomendações 72
 - disponibilizadas no Brasil 73
 - e incidência de infecções bacterianas RAM 100
 - tríplice de sarampo, caxumba e rubéola 67
- Vacinação 43
- antipneumocócica 108
 - contra a varíola 43, 45
- Vacinologia reversa 57, 97
- 2,0 97
- Varicela-zóster 75
- Varíola 47
- Vedolizumabe 241
- Vegetais manipulados geneticamente para a produção de antígenos 58
- Velocidade de hemossedimentação 157
- Vetor de expressão 29
- plasmidial 25
- Vetores bacterianos
- atenuados por modificações genéticas 100
 - baseados em bactérias não patogênicas 100
 - baseados em BCG 100
- Vetores virais
- comumente usados em terapia genética 336
 - usados para vacinas contra doenças infecciosas 70
- Vetor plasmidia* 25
- Viabilidade regulatória de um produto biológico 311

- Via de administração 202
Vibrio cholerae 45
VigiBase 309
Vigilância
ativa 308
de eventos adversos a medicamentos 307
epidemiológica 62
sanitária 308
VigiMed 309
Vírus
adeno associado (todos os sorotipos 336
da estomatite vesicular 69, 71
da febre amarela 67, 71
da hepatite 185
da imunodeficiência humana 185
da raiva 48, 84
da varíola 42, 71
do papiloma humano 68
do sarampo 56
ebola 84
like particles 65
SARS-CoV-2 61
sincicial respiratório 180
Vaccinia 69, 71
Vírus Zaire ebola 71
Volumes de dados 387
Vutrisirana 367
- ## W
- Western blot* 224
- ## Z
- Zaire ebolavirus* 84
Zé Gotinha 52
Zika 71, 131

Tratado Brasileiro de Biotecnologia em Saúde

DA BANCADA AO LEITO

A Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) tem como missão “Promover a excelência da reumatologia, fornecendo soluções acessíveis e confiáveis para congregar especialistas, desenvolver atualização científica, ensino e pesquisa, contribuindo para formulação de políticas públicas efetivas e sustentáveis, com base na ética e no aperfeiçoamento das práticas clínicas.”

Esta obra tem início na gestão 2018-2020 do Presidente da SBR, Dr. José Roberto Provenza, que percebeu a importância da aproximação com Bio-Manguinhos/Fiocruz. Dentre outras conquistas, este livro comprova que o estudo em conjunto traz excelentes resultados, levando a avanços que abrangem várias áreas.

Tratado Brasileiro de Biotecnologia em Saúde: Da Bancada ao Leito é uma obra inédita neste campo de aproximação da ciência básica com o atendimento ao paciente, que é aquele que recebe diretamente os benefícios de pesquisas. A abrangência da obra, desde os primórdios da biotecnologia, seu desenvolvimento através do tempo, chegando às vacinas recombinantes e aos medicamentos anticorpos mononucleares é de uma didática fantástica.

Atenderá a vários setores de conhecimento e a várias especialidades e áreas de estudos, que necessitem de informação. A biotecnologia é um setor excepcionalmente dinâmico e estimulante das ciências biomédicas. Contribui na prevenção e terapia de doenças, diagnóstico, agricultura e horticultura, alimentação, produção de energia, produção de produtos químicos e materiais, tratamento de água e resíduos, reciclagem, aquisição e agregação de valor aos recursos naturais, monitoramento ambiental, ciência forense, práticas sustentáveis etc.

Prometem revolucionar as nossas vidas de forma semelhante à introduzida pelo desenvolvimento dos computadores, da internet e dos *smartphones*. A extensão do enriquecimento presente e futuro do esforço humano, a prosperidade e o bem-estar proporcionados pela biotecnologia, bem como sua contribuição para soluções para problemas fundamentais que nós e o planeta Terra enfrentamos – os Grandes Desafios – só agora começam a ser apreciados.

A biotecnologia poderia parar o envelhecimento? A resposta pode ser sim, não ou algo intermediário, dependendo de quem está sendo questionado e do que significa “parar” o envelhecimento. Para aqueles que estão num extremo do espectro – aqueles que procuram prolongar a vida (incluindo alguns investidores endinheirados do Vale do Silício) – a resposta é “Sim”, a resposta é mais matizada e envolve um sonho de prolongamento da saúde, em vez de imortalidade. Eles imaginam um futuro em que as pessoas com mais de 65 anos sejam saudáveis, ativas, independentes e não sobrecarregadas por doenças, e que esta é a norma e não a exceção. Os “*Healthspanners*”; acreditam que um dia a ciência atrasará o aparecimento de doenças relacionadas com o envelhecimento e, como efeito secundário, prolongará modestamente a vida. O envelhecimento tal como o conhecemos – e tememos – poderá tornar-se uma história antiga.

Aos Editores e aos Autores, nossos parabéns por este belo livro. Será aproveitado imensamente por aqueles que necessitam e aqui encontram uma obra completa. Consideramos que este é um momento oportuno para analisar estrategicamente o futuro imediato do campo da biotecnologia.

Acreditamos que esta edição especial será uma leitura imediata interessante para pesquisadores da área e servirá como um guia útil.

Marco Antônio Araújo da Rocha Loures

Reumatologista.

Doutor pela Universidade Estadual de Maringá.
Presidente da Sociedade Brasileira de Reumatologia.