



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

Centro Universitário de Lisboa

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

FLAVIVÍRUS E DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS: UMA REVISÃO RETROSPETIVA DO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, orientada por Nuno Saraiva com título académico Doutor.

Gonçalo Manuel Ribeiro da Costa Dias Marques, nº 21002332

2025

www.ulusofona.pt

Universidade Lusófona
Centro Universitário de Lisboa
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

FLAVIVÍRUS E DOENÇAS TROPICAIS
NEGLIGENCIADAS: UMA REVISÃO
RETROSPETIVA DO DESENVOLVIMENTO DE
VACINAS

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida/o por Gonçalo Manuel Ribeiro da Costa Dias Marques em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 08/10/2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 439/2025, de setembro de 2025, com a seguinte composição:

Presidente:

Profª. Doutora Ana Sofia Gregório Fernandes, Professora Associada da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa;

Vogais:

Prof. Doutor João Pedro Bernardo Gregório, Professor Associado da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa (arguente);

Prof. Doutor Nuno Ricardo de Almeida Saraiva, Professor Auxiliar da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa.

Gonçalo Manuel Ribeiro da Costa Dias Marques, nº 21002332

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmã, tios e avós, que suportaram e acompanharam o meu percurso académico, permitindo tornar-me na pessoa que sou hoje.

À minha mulher Madalena, pelo amor incondicional, força e ânimo, que me deu alento para retomar e terminar este trabalho.

Ao meu amigo André, pelas palavras amigas e sempre sábias.

Ao Professor Doutor Nuno Saraiva, pelo seu apoio e paciência na orientação desta dissertação.

A todos, muito obrigado.

Resumo

De um ponto de vista histórico, as vacinas são um dos marcos tecnológicos que maior impacto provocou a nível da saúde da população mundial, estimando-se que tenham salvo milhões de vidas. Apesar das vacinas terem sido eficazes na minimização dos efeitos nefastos de muitas doenças na população, existe ainda um conjunto de doenças, denominadas doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que, por questões geográficas e/ou socioeconómicas, carecem de meios para serem combatidas eficazmente. Algumas destas doenças, como a dengue, zika, encefalite japonesa e vírus do Nilo Ocidental, causadas por vírus da família *Flaviviridae*, fazem parte desse conjunto de doenças.

Nesse âmbito, com suporte da plataforma Pubmed, foi possível selecionar um total de 116 ensaios clínicos entre 2014 e 2024 para estas doenças que quantificaram o esforço prestado pela comunidade científica na investigação de vacinas contra estas doenças. Apesar dos extensos resultados relativamente à dengue, foram encontrados poucos ensaios clínicos no âmbito de outras doenças como a zika e o vírus do Nilo ocidental. Estas diferenças devem-se a diversos fatores, como a frequência de surtos destas doenças, flutuações de frequência dos ensaios devido a focos de atenção mediática e diversos fatores socioeconómicos.

Torna-se assim imperativo que a investigação e desenvolvimento de estratégias de controlo destas doenças se mantenha e que seja imune à pressão da atenção mediática, sendo complementada com melhorias continuas nas infraestruturas de saúde que auxiliam as populações.

Abstract

From a historical point of view, vaccines are one of the technological milestones that have had the greatest impact on the health of the world's population, and it is estimated that they have saved millions of lives. Although vaccines have been effective in minimizing the harmful effects of many diseases on the population, there are still a number of diseases, known as neglected tropical diseases (NTDs), which, for geographical and/or socio-economic reasons, lack the means to be effectively fought. Some of these diseases, such as dengue, Zika, Japanese encephalitis and West Nile virus, caused by viruses from the *Flaviviridae* family, are part of this group of diseases.

In this context, with the support of the Pubmed platform, it was possible to select a total of 116 clinical trials between 2014 and 2024 for these diseases which quantified the effort made by the scientific community in researching vaccines against these diseases. Despite the extensive results for dengue, few clinical trials were found for other diseases such as Zika and West Nile virus. These differences are due to various factors, such as the frequency of outbreaks of these diseases, fluctuations in the frequency of trials due to media attention and various socio-economic factors.

It is therefore imperative that the research and development of strategies to control these diseases continues and is immune to the pressure of media attention, complemented by continuous improvements in the health infrastructures that help the population.

Acrónimos e símbolos

Acrónimo/Símbolo	Descrição
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controlo e Prevenção de Doenças - EUA)
OMS	Organização Mundial da Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
TLR	Toll-like receptors (Recetores do tipo Toll)
APC	Antigen Presenting Cells (Células Apresentadoras de Antígeno)
DTN / NTD	Doenças Tropicais Negligenciadas (Neglected Tropical Diseases)
EVCI / DALY	Anos de Vida Perdidos por Incapacidade (Disability-Adjusted Life Years)
JE	Encefalite Japonesa (Japanese Encephalitis)
VNO / WNV	Vírus do Nilo Ocidental (West Nile Virus)
ZIKV	Vírus Zika
DENV	Vírus da Dengue (Dengue Virus)
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
ISCOM	Immune Stimulating Complex (Complexo Imunoestimulante)
PUBMED	Base de dados de artigos científicos da área biomédica
EUA	Estados Unidos da América
JE-VAX	Vacina antiga contra a encefalite japonesa
IXIARO	Vacina inativada contra a encefalite japonesa
IMOJEV	Vacina viva atenuada contra a encefalite japonesa
CYD-TDV (Dengvaxia)	Vacina atenuada contra a dengue desenvolvida pela Sanofi-Pasteur
TAK-003 (Qdenga)	Vacina atenuada contra a dengue desenvolvida pela Takeda
PIZV	Purified Inactivated Zika Vaccine
FeLV	Feline Leukemia Virus (Vírus da leucemia felina)
HydroVax-001	Candidato a vacina inativada contra o vírus do Nilo Ocidental

Índice

Dedicatória	3
Resumo	4
Abstract	5
Acrónimos e símbolos	6
Índice	7
Índice de Tabelas	8
Índice de figuras	9
1. Introdução	10
1.1. Definição e Contexto Histórico	10
1.2. Desenvolvimento de Vacinas	11
1.2.1. Primeira Geração	12
1.2.2. Segunda geração	14
1.2.3. Terceira geração	15
1.3. Doenças Tropicais Negligenciadas	17
1.4. Aquecimento global e aparecimento de novas doenças em países desenvolvidos	19
1.5. Vírus da Família Flaviviridae	21
1.5.1. Febre amarela	22
1.5.2. Dengue	23
1.5.3. Zika	24
1.5.4. Encefalite Japonesa	25
1.5.5. Vírus do Nilo Ocidental	27
2. Objetivo	29
3. Metodologia	30
4. Resultados e Discussão	31
4.1. Dengue	31
4.2. Encefalite Japonesa	35
4.3. Zika	38
4.4. Vírus do Nilo Ocidental	39
Conclusão e Perspetivas Futuras	41
Bibliografia	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Esquematização dos tipos de vacinas de 1ª geração e correspondência com os seus componentes e exemplos de vacinas.....	13
Tabela 2 - Esquematização dos tipos de vacinas de 2ª geração e correspondência com os seus componentes e exemplos de vacinas.....	15
Tabela 3 - Esquematização dos tipos de vacinas de 3ª geração e correspondência com os seus componentes e exemplos de vacinas.....	16
Tabela 4 - Lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da World Health Organization (WHO) e respectivos tipos de agentes causadores. (Casulli, 2021)	18
Tabela 5 - <i>Search words</i> pesquisadas na plataforma PUBMED, com respectivo número de artigos de ensaios clínicos pesquisados e selecionados entre os anos de 2014 e 2024.	31
Tabela 6 - Número de artigos de ensaios clínicos selecionados e respectiva correspondência com a vacina estudada e o seu tipo usando a <i>search word</i> “Dengue vaccine” entre os anos de 2014 e 2024.....	32
Tabela 7 - Número de artigos de ensaios clínicos selecionados e respectiva correspondência com a vacina estudada e o seu tipo usando a <i>search word</i> “Japanese Encephalitis vaccine” entre os anos de 2014 e 2024.	35
Tabela 8 - Número de artigos de ensaios clínicos selecionados e respectiva correspondência com a vacina estudada e o seu tipo usando a <i>search word</i> “zika vaccine” entre os anos de 2014 e 2024.....	38

Índice de figuras

Figura 1 – Figura esquemática das gerações de vacinas e respectivos tipos (Acosta-Coley et al., 2022).....	12
Figura 2 - Variação da temperatura média, em graus celcius, da superfície do planeta registadas nos meses de setembro desde 1940 até à atualidade. Os pontos negros assinalam os anteriores recordes de temperatura registados.	20
Figura 3 - Árvore filogenética da família de vírus Flaviridae. A barra de escala indica as substituições de aminoácidos por posição. (Knipe, & Howley, 2014).....	21
Figura 4 - Distribuição global da febre amarela (Golding et al., 2015). A verde estão representadas as regiões onde a doença é considerada endêmica, nomeadamente, nas regiões da América do Sul e da África Subsariana.	22
Figura 5 - Distribuição global da probabilidade de ocorrência da doença de dengue em 2010. (Bhatt et al., 2013) As áreas com elevada probabilidade de ocorrência de dengue são apresentadas a vermelho e as áreas com baixa probabilidade a verde,	23
Figura 6 – Mapa esquemático que demonstra a expansão do vírus Zika no mundo entre os anos de 1947 e 2016. (Morris et al., 2018) As numerações no mapa indicam a deteção pela primeira vez do vírus na respetiva região. O primeiro caso reportado em humanos ocorreu em 1954 na Nigéria, 7 anos após a isolamento do vírus pela primeira vez em macacos Rhesus.....	25
Figura 7 - Distribuição geográfica do vírus da Encefalite Japonesa. (Golding et al., 2015) A verde estão assinaladas as regiões onde a doença é considerada endêmica, nomeadamente, nas regiões do Subcontinente Indiano, Sudoeste Asiático e Extremo Oriente.	26
Figura 8 - Distribuição geográfica da doença da WNV (Campbell et al., 2002). A azul estão assinaladas as zonas onde a doença é considerada endêmica. O vírus já se encontra disseminado por diversas regiões do continente africano, europeu, Oceânia e América do Norte.	28
Figura 9 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos por ano selecionados usando a <i>search word</i> “dengue vaccine”, desde 2014 até 2024.	32
Figura 10 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados, por ano e por fase, usando a <i>search word</i> “dengue vaccine”, desde 2014 até 2024.	33
Figura 11 - Gráfico representante da distribuição, por ano, do número de ensaios clínicos selecionados, usando a <i>search word</i> “dengue vaccine”, onde a vacina Qdenga foi alvo de estudo, desde 2019 e 2024.....	34
Figura 12 - Gráfico representante da distribuição, por ano, do número de ensaios clínicos selecionados, usando a <i>search word</i> “dengue vaccine”, onde a vacina Dengvaxia foi alvo de estudo, desde 2014 e 2022.....	34
Figura 13 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados por ano, usando a <i>search word</i> “japanese encephalitis vaccine”, desde 2014 até 2024..	36
Figura 14 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados por ano e respetiva fase, usando a <i>search word</i> “japanese encephalitis vaccine”, desde 2014 até 2024. ...	37
Figura 15 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados por ano, usando a <i>search word</i> “zika vaccine”, desde 2017 até 2024.....	39

1.Introdução

1.1. Definição e Contexto Histórico

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), as vacinas podem ser definidas como preparados biológicos capazes de induzir uma resposta imunitária no organismo contra um determinado agente patogénico. São geralmente compostos por microrganismos vivos ou inativados (por exemplo, bactérias ou vírus), frações ou material genético pertencentes ao agente patogénico. (Pollard & Bijker, 2021)

Os primeiros registos do uso das vacinas remontam ao século XI no continente asiático e referem-se à prática da variolação. Esta técnica consistia em retirar pus da vesícula de uma pessoa infetada e aplicá-la na pele de outra pessoa não infetada. Esta prática não evitava que sintomas mais ligeiros fossem observados, mas prevenia significativamente que estes indivíduos morressem fruto de uma infeção natural. (De Gregorio & Rappuoli, 2014) Mais tarde, nos finais do século XVIII, Edward Jenner replicou o mesmo princípio ao aplicar o pus de uma lesão provocada pela varíola bovina (ou *cowpox* em inglês), uma doença não letal em humanos, numa criança saudável. A criança apresentou sintomas da varíola bovina após a exposição. Esta infeção fez com que o organismo da criança desenvolvesse defesas contra este vírus, e por consequência, contra o vírus da varíola, pertencente à mesma família de vírus. (Knipe, & Howley, 2014) Mais tarde, este procedimento foi testado em mais 16 indivíduos que ficaram igualmente imunizados contra a varíola, comprovando a eficácia do tratamento. (Kaynarcalidan et al., 2021) Desta forma, e com o suporte de novos desenvolvimentos ocorridos durante os séculos XIX e XX, a vacinação contra a varíola usando vacinas de “vírus vivos” generalizou-se pela população, sendo que em 1979 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a varíola como uma doença oficialmente erradicada. (Stern & Markel, 2005)

Outra personalidade preponderante no desenvolvimento das vacinas foi Louis Pasteur, que além do desenvolvimento de uma conhecida técnica de conservação de alimentos designada pasteurização, desenvolveu a primeira vacina contra a raiva, preparada a partir de tecido desidratado da espinhal medula de um coelho infetado com vírus da raiva. O tratamento deste tecido permitiu a inativação do vírus, mantendo a estrutura dos antigénios virais o mais intacta possível, gerando o que hoje conhecemos como uma vacina de “vírus inativado”. Apesar deste preparado não ser infeccioso por si só, é capaz de gerar uma resposta imunitária e assim conferir proteção contra o antigénio da raiva quando administrado num organismo vivo. Esta vacina foi testada numa criança de 9 anos que tinha sido mordida 2 dias antes por um cão raivoso, num regime de

administração que compreendeu 13 tomas em dias distintos. Tal regime permitiu ao rapaz permanecer saudável e sem sinais da doença. (Knipe, & Howley, 2014)

Mais tarde, nos anos 30 do século XX, mais avanços significativos foram feitos com o desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças. Uma dessas é a vacina contra a febre amarela, que se revelou um caso de sucesso no controlo da doença, levando os seus investigadores a receber o Prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina em 1951. (Barnett, 2007; Gardner & Ryman, 2010) Esta vacina serviu de base para a criação de outras vacinas eficazes contra outros vírus como por exemplo o vírus da encefalite japonesa. (Guy et al., 2010)

Já no final do ano 2019, com o aparecimento do vírus SARS-CoV-2 e a sua consequente pandemia com efeitos na vida quotidiana da população global, grandes esforços foram feitos pela comunidade científica para desenvolver uma vacina eficaz contra este vírus. Durante esse período, vários tipos de vacinas foram desenvolvidos e inúmeros ensaios clínicos foram realizados em tempo recorde para se determinar a eficácia e segurança destes novos candidatos. Dos vários tipos de vacinas, as vacinas de pre-RNA, desenvolvidas pelas empresas Pfizer e Sanofi, foram distribuídas inicialmente por países desenvolvidos e mostraram resultados mais promissores na diminuição da mortalidade em indivíduos infetados do que a restante concorrência. (Chavda et al., 2021)

1.2. Desenvolvimento de Vacinas

Ao longo do tempo, o desenvolvimento de vacinas pode ser dividido por 3 gerações distintas (como demonstrado na figura 1), onde cada uma representa um conjunto de inovações científicas e tecnológicas que foram capazes de gerar vacinas eficazes para determinadas doenças. Para efeitos deste trabalho, será dado enfoque apenas a vacinas de vírus.

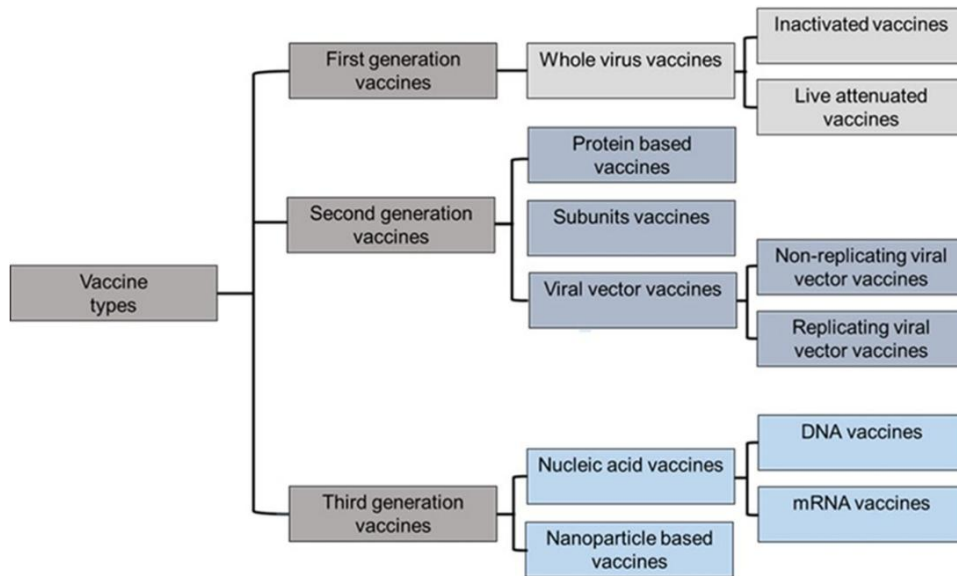


Figura 1 – Figura esquemática das gerações de vacinas e respectivos tipos (Acosta-Coley et al., 2022)

1.2.1. Primeira Geração

Também chamadas de vacinas tradicionais, esta primeira geração de vacinas é maioritariamente composta por agentes patogénicos atenuados ou inativados. O desenvolvimento das primeiras vacinas produzidas em massa foi impulsionado pela descoberta de novas técnicas como por exemplo a cultura de vírus nas membranas de embriões de galinhas (Tahamtan et al., 2017)

De modo geral, as vacinas pertencentes a esta geração têm como vantagens a indução de uma imunidade de longo prazo, alta capacidade de estimular uma resposta imunitária inata, baixos custos e facilidade de produção (Noazin et al., 2008) Por outro lado, para o caso das vacinas de vírus atenuados existe a possibilidade de reversão da atenuação de virulência e a possibilidade de indução da própria doença, o que constitui uma grande limitação no que toca à segurança e fiabilidade deste tipo de vacinas. (Huang et al., 2004)

Tabela 1 - Esquematização dos tipos de vacinas de 1ª geração e correspondência com os seus componentes e exemplos de vacinas.

Tipo de vacinas	Componentes	Exemplos de vacinas
Atenuadas	Vírus submetidos a atenuação por meios laboratoriais	Vacina contra febre amarela (17D) Poliomielite.
Inativadas	Vírus inativados por reagentes químicos.	Vacina contra hepatite A.

Como indica o seu nome, as **vacinas atenuadas** consistem no uso de agentes patogênicos inteiros atenuados em ambiente laboratorial. Esta atenuação era feita numa fase inicial com recurso à passagem sucessiva dos vírus em culturas celulares, tendo como consequência a ocorrência de mutações de modo a enfraquecer a sua virulência. Estes agentes patogênicos modificados mantêm a capacidade de infeção, levando a que o organismo inicie uma resposta imunitária que terá um efeito protetivo no organismo (Clem, 2011). Exemplos de vacinas deste tipo são a vacina contra a febre amarela (17D), a primeira vacina contra a gripe (i.e. vírus influenza) e a vacina contra a poliomielite (Tahamtan et al., 2017)

Nas **vacinas inativadas**, que consistem no uso de agentes patogênicos inativados, ou seja, não infecciosos, existe uma vantagem face às vacinas atenuadas no que toca à segurança e resposta imunitária. (Tahamtan et al., 2017) No processo de inativação são usadas estratégias como a pasteurização, o uso de agentes detergentes ou desnaturantes químicos. Neste contexto, a pasteurização consiste no uso de altas temperaturas com vista à inativação dos vírus. É uma técnica simples, pois apenas requer uma fonte de calor e não requer reagentes adicionais. A pasteurização a baixas temperaturas (63°C durante 30 minutos) permite a inativação de grande parte dos vírus, mantendo ao mesmo tempo a estrutura de DNA do vírus intacta. (McAdams et al., 2021) Os agentes detergentes e desnaturantes químicos, como o formaldeído e o dodecil sulfato de sódio (SDS), respetivamente, atuam na disrupção das membranas do vírus expondo assim o material genético. (Acosta-Coley et al., 2022) A vacina da hepatite A é um exemplo de uma vacina que foi criada com recurso ao uso de formaldeído para a sua inativação (Bovier, 2008)

1.2.2. Segunda geração

Em vez do uso de vírus atenuados ou inativados, a segunda geração de vacinas tem como base vacinas de **subunidades**, compostas de partes ou porções do agente patogénico incapazes de provocar a doença por si só, no entanto, capazes de produzir uma resposta imunitária contra esse mesmo agente patogénico. (Melo et al., 2022a)

Apesar das primeiras vacinas de subunidades usadas contra o vírus influenza terem mostrado fraca imunogenicidade face às vacinas do tipo atenuadas, foram tentadas modificações nas formulações que consistem na disponibilização das subunidades em vesículas de lípidos com vista ao aumento da sua imunogenicidade e eficácia. (Francis, 2018) De acordo com a proveniência destes lípidos, podemos chamar estas estruturas de virossomas, caso os lípidos sejam provenientes de outros vírus, ou lipossomas, caso os lípidos usados não provenham de material viral. A preparação destas vacinas com recurso a estruturas micelares revelou igualmente um incremento da imunogenicidade. Devido à estrutura ser semelhante à de outros vírus, são referidos como “*virus-like particles*”. (Francis, 2018)

A estas estruturas lipídicas podemos chamar de compostos adjuvantes, que, atuando como sistemas de entrega, têm a capacidade de tornar a resposta imune mais eficiente, permitindo o uso de menores quantidades de antígeno e melhorando a eficácia da vacina. Mais concretamente, estes atuam com o intuito de prolongar a biodisponibilidade do antígeno ao controlar a sua exposição ao sistema imunitário, direcionar o antígeno às estruturas imunitárias de onde surgirá a resposta do organismo e diminuir a taxa de degradação do antígeno. Existem também compostos adjuvantes que atuam como imunoestimulantes que, por meio de recetores do tipo Toll (em inglês, *Toll-like receptors* (TLR)), vão facilitar o processo de maturação das células apresentadoras de antígenos (APC), permitindo uma resposta mais robusta da vacina no organismo. São exemplos deste tipo o hidróxido de alumínio, os agonistas de TLR e os agonistas de recetores do tipo lectina. (Zhao et al., 2023)

As primeiras vacinas de subunidades foram aprovadas para uso veterinário, nomeadamente, contra o vírus influenza equino e o vírus da leucemia felina (FeLV). Apesar da inconsistência na determinação da imunogenicidade desta última vacina, a adição da subunidade num complexo imunoestimulante (ISCOM) com propriedades adjuvantes capazes de aumentar a imunogenicidade mostrou ser eficaz em dotar proteção a todos os animais vacinados. (Francis, 2018)

Tabela 2 - Esquematização dos tipos de vacinas de 2ª geração e correspondência com os seus componentes e exemplos de vacinas.

Tipo de vacinas	Componentes	Exemplos de vacinas
Subunidades	Estruturas proteicas e polipéptidos virais não infecciosos	Vacina contra vírus influenza equino Vacina contra Vírus da leucemia felina
Recombinantes	Organismos geneticamente modificados	Vacina contra Difteria Vacina contra Tétano Vacina contra Hepatite B Vacina contra Herpes-vírus. Vacina contra Vírus do papiloma humano (HPV)

Com recurso à engenharia genética, as vacinas **recombinantes**, também conhecidas por vacinas sintéticas, são produzidas com recurso a organismos geneticamente modificados com o intuito de produzirem em quantidade compostos capazes de induzir respostas imunológicas no organismo. Os vetores utilizados para a produção destas vacinas podem ser de origem bacteriana, como a *Escherichia coli*, leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, ou células de mamíferos, insetos e plantas. (Francis, 2018) Apesar de cada um destes vetores apresentar vantagens e desvantagens, todos estes foram usados como vetor para a expressão e produção de vacinas contra diversas doenças no âmbito veterinário, como a febre suína e o vírus da doença de Newcastle, assim como doenças que afetam a espécie humana como a difteria, tétano, hepatite B, herpes-vírus e vírus do papiloma humano (HPV). (Francis, 2018; Tahamtan et al., 2017)

Estes tipos de vacinas caracterizam-se por terem um bom rácio de custo-efetividade, terem processos de produção rápidos, serem facilmente transpostas para escala industrial e serem bastante seguras. (De Pinho Favaro et al., 2022)

1.2.3. Terceira geração

No princípio dos anos 90 do século XX, começou a ser desenvolvida uma terceira geração de vacinas, que consiste na administração de plasmídeos ou de moléculas de RNA que possuem sequências que codificam um ou mais genes capazes de levar à produção do antígeno viral que irá provocar a resposta imunitária no

organismo. Nesse sentido, e ao contrário de vacinas de anteriores gerações, o antígeno não será introduzido no organismo pela vacina em si, mas sim pela própria célula que, com a introdução do plasmídeo ou do RNA, tratará de produzir o antígeno. (Tahamtan et al., 2017)

No seu todo, estas vacinas de **DNA** apresentam vantagens face às anteriores gerações, como a capacidade de produzir uma resposta imunitária estável, os métodos de fabrico facilmente replicáveis e adaptáveis, rápidos e similares aos métodos de outras gerações de vacinas, manter-se estável a uma alargada gama de temperaturas (sem ser necessário o seu transporte em cadeia de frio), e não existir possibilidade de interagir com outras vacinas. Estes aspetos favorecem o uso destas vacinas em pessoas com sistemas imunitários mais débeis. (Chavda et al., 2021; Tahamtan et al., 2017) Apesar destas vantagens, o facto destas vacinas produzirem apenas proteínas como antígeno, afetarem o crescimento celular, aumentarem a probabilidade de aparecimento de tumores por via do risco de interação do DNA da vacina com o genoma humano e possibilidade de provocar doenças autoimunes constituem limitações para o uso destas vacinas em humanos. (Tahamtan et al., 2017)

Tabela 3 - Esquematização dos tipos de vacinas de 3ª geração e correspondência com os seus componentes e exemplos de vacinas.

Tipo de vacinas	Componentes	Exemplos de vacinas
DNA	Antígenos virais codificados por um plasmídeo recombinante	Vacina contra ébola Vacina contra influenza A subtipo H1N1 Vacina contra HPV
mRNA	mRNA encapsulado por vetores, proteínas virais ou polipéptidos.	Vacina contra SARS-CoV-2

Nas vacinas de **RNA mensageiro** (mRNA), uma das suas principais limitações prende-se com o fato destas necessitarem de ser armazenadas e transportadas em cadeia de frio, limitando a sua acessibilidade quando comparadas com as vacinas de DNA. Na sua generalidade, a passagem do mRNA pela membrana celular revela-se difícil, o que faz com que seja necessário desenvolver métodos que visem melhorar a sua biodisponibilidade, imunogenicidade e estabilidade. Outra limitação prende-se com o facto do mRNA ter propriedades imunoestimulantes que terão de ser tidas em conta, sob o risco de existir um excesso de estímulo que provocará reações adversas como hipersensibilidade. (Baghban et al., 2023)

Dentro deste grupo de vacinas de 3ª geração, as vacinas de mRNA têm demonstrado recentemente várias vantagens face às vacinas de DNA, nomeadamente no que toca à ausência do risco da sua integração no genoma fruto da sua ação direcionada apenas no citoplasma da célula. Têm ainda um tempo de vida relativamente curto que permite melhor controlar a produção de antigénio. Podem ser divididas em vacinas não replicantes e replicantes: como o nome indica, as últimas têm um mecanismo de ação idêntico ao das vacinas não replicantes, no entanto, a RNA replicase viral é mantida intacta, levando à capacidade de replicar mais moléculas da vacina no organismo, permitindo que seja necessária uma dose muito menor do que a usada para atingir a imunização face às vacinas não replicantes. (Melo et al., 2022b)

Existem exemplos candidatos de vacinas desta geração contra o HPV, malária, ébola, HIV e diversos tipos de cancro, no entanto, atualmente, as vacinas mais conhecidas que usam ácidos nucleicos são as vacinas contra o vírus SARS-COV-2, que ajudaram a mitigar em tempo recorde os efeitos nefastos deste vírus na população. (Chavda et al., 2021; Melo et al., 2022b)

1.3. Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTN, ou NTD em inglês) podem ser compreendidas como um conjunto de doenças que afeta populações de regiões tropicais pouco desenvolvidas, fustigadas pela falta de recursos financeiros e investimento por parte das agências e *stakeholders* da área da saúde. (Weng et al., 2018) A maioria destas doenças são endémicas em países em desenvolvimento e, individualmente, têm pouca expressão em termos de mortalidade associada. Este facto faz com que exista menos interesse em investir e desenvolver novas terapêuticas para estas doenças, levando o foco para doenças que causem maiores taxas de mortalidade. (Engels & Zhou, 2020) Devido à ausência ou maior demora no acesso ao diagnóstico ou ao tratamento, estas populações estão mais suscetíveis a fatores como comorbilidades acrescidas, invalidez e estigmatização, e têm como consequência custos elevados para a economia destes países. (Weng et al., 2018) Em 2010, estimou-se que cerca de 2 mil milhões de pessoas em todo o mundo estariam afetadas com pelo menos uma doença deste tipo. Em termos de comparação, os efeitos na redução dos anos de vida devido à incapacidade (EVCI, ou DALY) induzida por estas doenças é comparável à de doenças como o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e tuberculose (Engels & Zhou, 2020)

Aliado à diminuta taxa de sucesso de produção de novas terapêuticas eficazes, e aos altos riscos financeiros para as empresas do sector farmacêutico, os fundos disponíveis para concluir processos de investigação e desenvolvimento são insuficientes

e condicionam avanços significativos na investigação. (Cohen et al., 2014) No ano 2012, a OMS lançou o *road-map* “Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases” com vista a promover a coordenação entre os estados para a prevenção, controlo e erradicação de um determinado número de doenças tropicais negligenciadas, mostradas na tabela 4. (*Ending the Neglect to Attain the Sustainable Development Goals*, 2021)

Tabela 4 - Lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da World Health Organization (WHO) e respetivos tipos de agentes causadores. (Casulli, 2021)

Doenças	Agente causador
Úlcera de Buruli	Bactéria
Doença de Chagas	Parasita
Dengue	Vírus
Chikungunya	Vírus
Dracunculíase	Parasita
Equinococose	Parasita
Trematodíases de origem alimentar	Parasita
Tripanossomíase humana africana	Parasita
Leishmaniose	Parasita
Lepra	Bactéria
Filariose linfática	Parasita
Micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas	Bactérias e Fungos
Oncocercose	Parasita
Raiva	Vírus
Sarna e outras ectoparasitoses	Parasita
Esquistossomose	Parasita
Helmintíases transmitidas pelo solo	Parasita
Envenenamento por mordedura de cobra	Toxinas
Taeníase e cisticercose	Parasita
Tracoma	Bactéria
Bouba	Bactéria

Em 2020, um novo *road-map* foi atualizado pela OMS com objetivos concretos até 2030 que implicam a redução de 90% do número de pessoas a necessitar tratamento

para uma DTN, redução das DALY relacionada com DTN's e erradicação de pelo menos uma DTN de 100 países. Existe igualmente o objetivo de erradicar a dracunculíase e a boubu a nível global. (*Ending the Neglect to Attain the Sustainable Development Goals*, 2021)

Um dos países mais fustigado por este tipo de doenças é a Índia, que tem feito esforços para combater a incidência deste tipo de doenças. Apesar desse esforço, o registo de incidência é apenas feito para um conjunto restrito de doenças, o que limita a atuação das autoridades perante as mesmas. Não obstante, a contribuição da Índia para o desenvolvimento de novos medicamentos, métodos de diagnóstico e vacinas tem sido significativa. (Ca et al., 2024)

1.4. Aquecimento global e aparecimento de novas doenças em países desenvolvidos.

O aquecimento global é um fenómeno que consiste no aumento da temperatura média do planeta. Este fenómeno pode ser provocado por fatores naturais, como erupções vulcânicas e variações da atividade solar, ou fatores antropogénicos como a queima de combustíveis fósseis, que produz gases de estufa para a atmosfera. (Adepoju et al., 2023) Este fenómeno é facilmente constatado quando se comparam as temperaturas médias do planeta desde a época pré-industrial até ao presente momento, tal como evidenciado na figura 2, onde se verifica um aumento significativo nas últimas décadas.

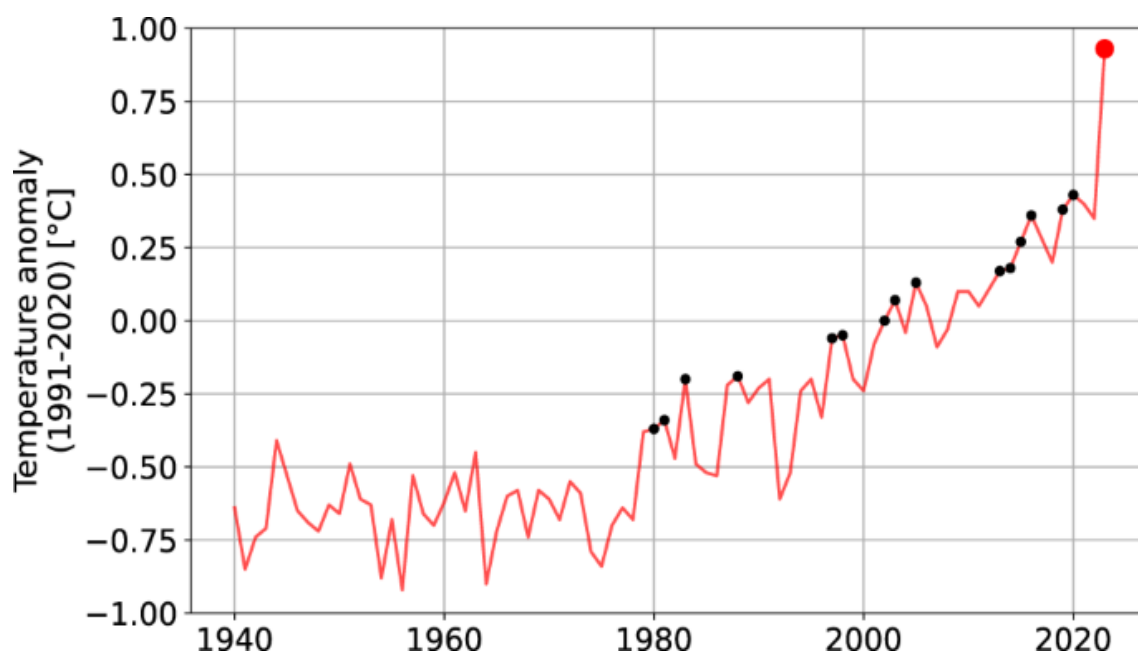


Figura 2 - Variação da temperatura média, em graus Celcius, da superfície do planeta registradas nos meses de setembro desde 1940 até à atualidade. Os pontos negros assinalam os anteriores recórdes de temperatura registrados. (Rantanen & Laaksonen, 2024).

Com a insurgência deste fenómeno, o aumento da temperatura global irá precipitar uma mudança no clima várias regiões, produzindo alterações na sua fauna e flora e introduzindo novas doenças para as quais as populações residentes não estarão preparadas para combater. (Semenza et al., 2022) Essas regiões estarão igualmente sujeitas a eventos em cascata que aumentarão a incidência destas doenças. A título de exemplo, com o aumento de episódios de cheias repentinas, surgirá igualmente o aparecimento de zonas de águas estagnadas propícias proliferação de espécies de mosquitos e à contaminação de água potável, que trará como consequência o aumento de incidência de doenças transmitidas por via destes vetores. (Adepoju et al., 2023)

Fenómenos demográficos relacionados como êxodo de populações rurais para grandes centros urbanos são igualmente fatores que facilitam o aparecimento de novas zonas endémicas para doenças tropicais negligenciadas, observando-se igualmente a tendência de doenças até agora consideradas exclusivas de países em desenvolvimento passarem a ser endémicas em países mais desenvolvidos. Tal irá fazer com que no futuro o interesse pelo desenvolvimento de novos métodos para cura e tratamento destas doenças aumente. (Baharom et al., 2021)

1.5. Vírus da Família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae*, disposta na figura 3, é composta por vírus envelopados com genoma de RNA de cadeia simples com sentido positivo (ssRNA), pode ser dividida em quatro géneros (*Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*), que apesar de terem características semelhantes entre si, como a estratégia de replicação e organização genómica, são biologicamente distintos. (Knipe, & Howley, 2014)

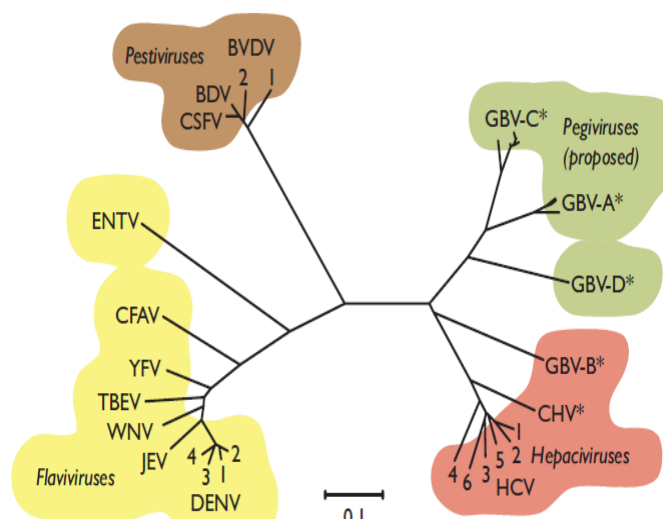


Figura 3 - Árvore filogenética da família de vírus *Flaviviridae*. A barra de escala indica as substituições de aminoácidos por posição. (Knipe, & Howley, 2014)

O género *Flavivirus* engloba um grupo de aproximadamente 50 espécies de vírus, sendo que a esmagadora maioria necessita de um vetor para infectar o hospedeiro. Podemos subdividir este género em dois grupos: os vírus que se propagam por intermédio de mosquitos, como o vírus da febre amarela e do dengue, e os que se propagam por intermédio de carraças, como o vírus da encefalite da carraça. Ainda são categorizados os vírus que não necessitam de um vetor ou que ainda não têm um vetor conhecido, como o vírus Apoi. (Fenner et al., 2017)

Da família destes vírus, destaca-se o vírus do dengue que, segundo a OMS, está sinalizado como sendo doença tropical negligenciável. Outras doenças causadas por arbovírus como a febre amarela, a zika, a encefalite japonesa e o vírus do Nilo ocidental, apesar não serem consideradas pela OMS como doenças tropicais negligenciáveis, são tidas em conta por alguns peritos, que advogam a sua inclusão na lista de doenças tropicais negligenciáveis da OMS, dado que afetam tipicamente regiões mais pobres do globo. (Norman et al., 2010)

1.5.1. Febre amarela

A febre amarela é originária do continente africano, e alastrou-se ao continente americano com o advento do comércio escravagista e consequente êxodo das populações indígenas. O primeiro relato de epidemia no continente americano remonta aos meados do século XVII. Posteriormente, foram relatados inúmeros focos de epidemia tanto na zona norte do continente americano, como em países europeus. (Knipe, & Howley, 2014) Em 1900, Walter Reed e os seus colegas mostraram que o agente infeccioso da febre amarela era transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, levando a que campanhas de erradicação dos mosquitos fossem postas em marcha, eliminando assim a doença nos grandes centros urbanos do hemisfério ocidental (Fenner et al., 2017)

Atualmente, o vírus da febre amarela é endêmico nas regiões tropicais e subtropicais da África Subsariana e América do Sul, que envolve cerca de 900 milhões de habitantes. Números da OMS apontam para 200 mil novos casos de doença, resultando em 30 mil mortes anuais, maioritariamente ocorridos no continente africano. (Knipe, & Howley, 2014)

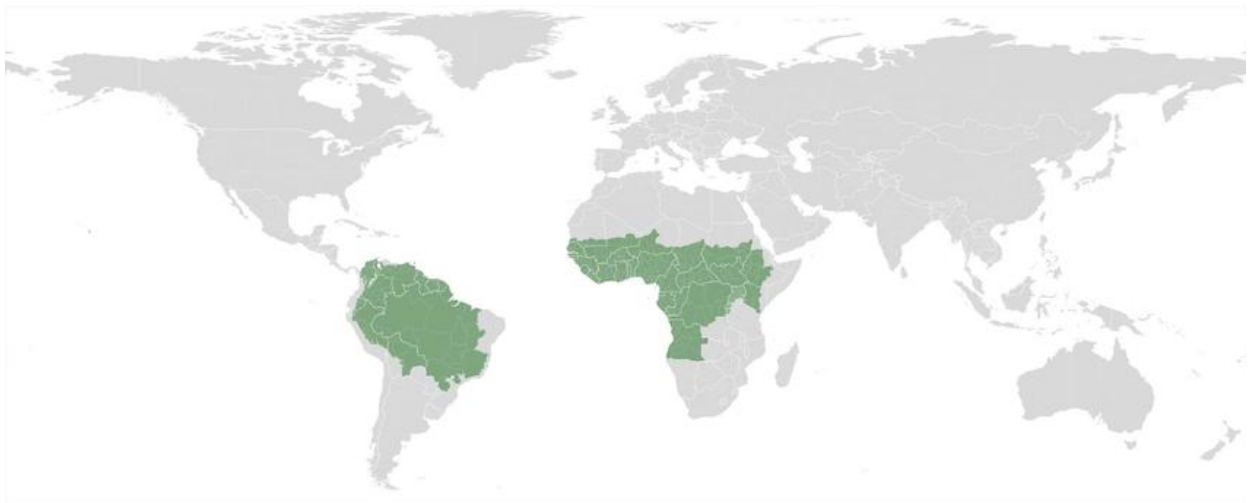


Figura 4 - Distribuição global da febre amarela (Golding et al., 2015). A verde estão representadas as regiões onde a doença é considerada endêmica, nomeadamente, nas regiões da América do Sul e da África Subsariana.

Apesar do sucesso das medidas de irradiação dos mosquitos nas grandes cidades, a descoberta do ciclo silvático em 1932 veio dificultar os esforços de erradicação real da doença nos humanos, uma vez que basta um ser humano entrar em contato com um macaco ou mosquito infectados para recomeçar o ciclo urbano da doença, transmitindo assim a doença a outras pessoas, e despoletando outra epidemia. (Fenner et al., 2017)

Em 1927, Max Theiler desenvolve a estirpe 17D do vírus da febre amarela (YF17D), fruto de sucessivas passagens do vírus da estirpe *Asibi* em embriões de galinha de modo a remover as propriedades neurotrópicas e viscerotrópicas assim como a afinidade do vírus para com o mosquito. Mais concretamente, foram necessárias 176 passagens para se obter a estirpe atenuada, tornando-se numa das vacinas mais eficazes e seguras desenvolvidas. Esta descoberta foi responsável pela vacinação de mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo, com uma imunização prevista para 10 anos em 98% dos vacinados. O desenvolvimento desta vacina foi premiado com o Prémio Nobel da Medicina em 1951. (Barrett, 2017; Bonaldo et al., 2014; Heinz & Stiasny, 2012)

1.5.2. Dengue

O dengue é uma doença cujo vírus é transmitido pelo mosquito fêmea da espécie *Aedes*. A doença está vastamente distribuída pelos continentes americano e asiático, com especial foco nos países com climas tropicais e subtropicais (Fig. 9). Atualmente, é considerada como a doença transmitida pelo mosquito mais prevalente do mundo. (Shrivastava et al., 2017)

Um estudo da OMS estima que as taxas de incidência da doença rondem os 390 milhões de infeções por ano, com aproximadamente 96 milhões a manifestar clinicamente a doença. A falha no diagnóstico e a falta de acesso da população a cuidados de saúde indicia que os números reais poderão ser maiores. (Brady et al., 2012)

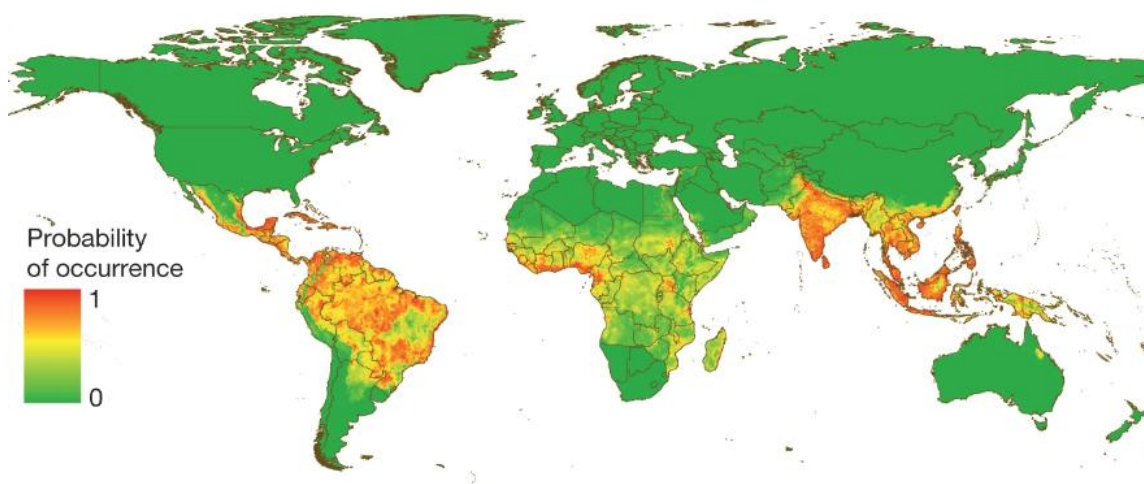


Figura 5 - Distribuição global da probabilidade de ocorrência da doença de dengue em 2010. (Bhatt et al., 2013) As áreas com elevada probabilidade de ocorrência de dengue são apresentadas a vermelho e as áreas com baixa probabilidade a verde.

O vírus do dengue é caracterizado por ter quatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) com os mesmos padrões epidemiológicos e clínicos, mas com características genéticas diferentes. Apesar desta categorização, descobriu-se que existem diferenças genéticas entre vírus do mesmo serotipo em zonas distintas do globo, criando assim a necessidade de criação de novas categorias onde possam ser incluídos todas as diferentes vertentes genéticas do vírus. Algumas dessas categorias são as diferenças entre genótipos, variante da estirpe e quase espécies, que podem vir a ter um papel importante no entendimento dos mecanismos de defesa do próprio vírus, assim como as interações deste com o hospedeiro. (Knipe, & Howley, 2014)

No que toca a terapêuticas para o tratamento da doença causada pelo vírus do dengue, não existem medicamento retrovirais e qualquer tratamento existente consiste em cuidados básicos de estabilização do doente. A técnica mais utilizada para a mitigação do dengue nos territórios endêmicos consiste no controlo do vetor, no entanto, sem a eficácia desejada.

Atualmente existem duas vacinas vivas atenuadas já licenciadas com o nome Dengvaxia e Qdenga, desenvolvida pela Sanofi-Pasteur e Takeda, respetivamente, e encontra-se disponível em mais de 20 países. (Ferguson et al., 2016) Outras vacinas quiméricas, como a TV003/TV005, apesar de ainda não se encontrarem licenciadas, detêm dados de ensaios clínicos de fase II e III que demonstram uma eficácia promissora na prevenção da doença. Existem candidatos de diversos outros tipos, vacinas de subunidades e DNA, que se encontram a ser desenvolvidas e estudadas. (Pereira et al., 2025a)

1.5.3. Zika

O vírus do Zika (ZIKV), pertencente ao género Flavivírus, com cadeia positiva de RNA, foi pela primeira vez isolado em 1947 na floresta Zika no Uganda, a partir de um macaco Rhesus. Até ao século XX, o vírus foi sendo isolado em diversos locais, maioritariamente em países do sudoeste e centro asiático, com sintomas manifestados muito semelhantes com a febre do dengue. (Morris et al., 2018)

Apesar da aparente propagação do vírus pelos continentes africano e asiático, até 2007 apenas 14 casos de infeção foram reportados pela literatura médica. Nesse ano, uma epidemia afetou cerca de 70% da população das Ilhas Yap dos Estados Federados da Micronésia, tendo sido considerado um caso inesperado de perigo para a saúde publica na região. Outro surto epidémico foi sentido na Polinésia Francesa, com cerca de 32,000 pessoas infetadas manifestando sintomas semelhantes aos sentidos na Ilhas Yap. (Morris et al., 2018)

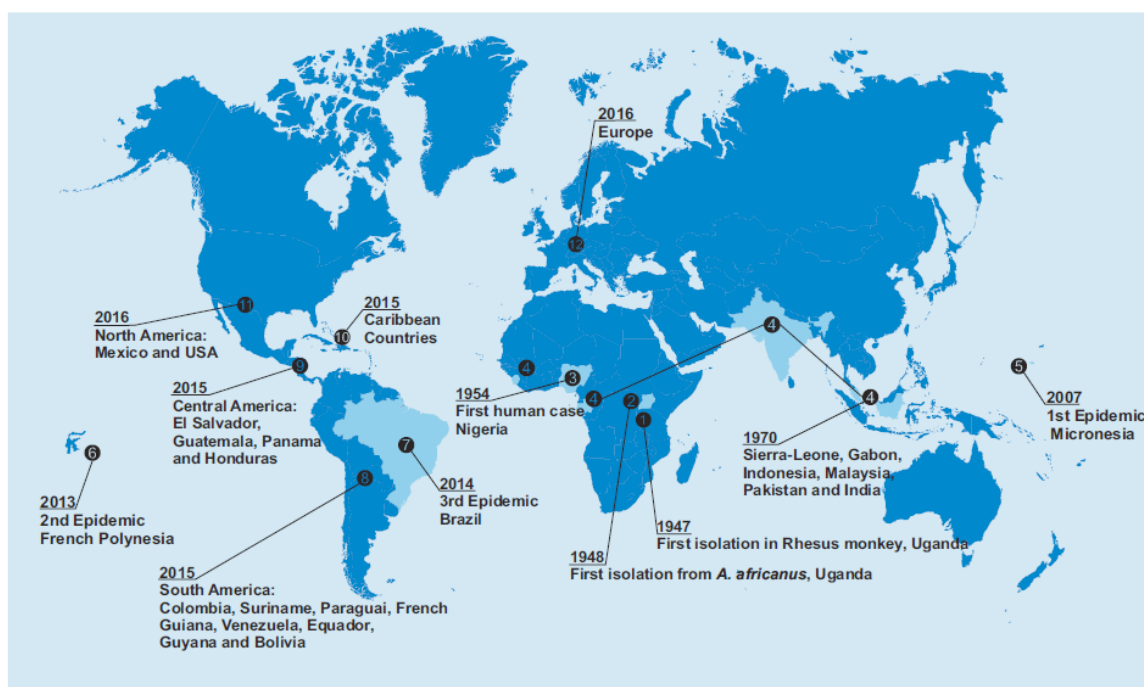


Figura 6 – Mapa esquemático que demonstra a expansão do vírus Zika no mundo entre os anos de 1947 e 2016. (Morris et al., 2018) As numerações no mapa indicam a detecção pela primeira vez do vírus na respetiva região. O primeiro caso reportado em humanos ocorreu em 1954 na Nigéria, 7 anos após a isolamento do vírus pela primeira vez em macacos Rhesus.

Este vírus é transmitido principalmente pelos mosquitos do género *Aedes* e é transmissível entre humanos pela via sexual e vertical, sendo também detetável no sangue, saliva, urina e leite materno. (Ali et al., 2017)

Atualmente não existem tratamentos para o ZIKV, daí a melhor estratégia para o controlo e prevenção desta patologia será o controlo populacional dos principais vetores virais, os mosquitos. Ações de formação junto da população em países endémicos são também um fator a ter em conta nesse aspeto, especialmente no que toca à franja populacional das mulheres em idade fértil. Em mulheres grávidas, a disponibilização de exames periódicos é essencial para detetar problemas no feto num estágio precoce. (Ali et al., 2017) Neste momento, não existem vacinas aprovadas contra esta doença, no entanto, várias tecnologias têm sido utilizadas como base para o desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV, nomeadamente vírus atenuados, vacinas vetorizadas, vacinas de vetores virais e RNA ou DNA modificados. (Pereira et al., 2025a)

1.5.4. Encefalite Japonesa

A encefalite japonesa é uma doença transmitida pelos mosquitos *Culex* e *Aedes*, sendo capaz de infetar o sistema nervoso central, causando efeitos severos e

potencialmente letais para os indivíduos infetados. Esta doença foi descrita pela primeira vez no Japão nos anos 80 do século XIX, e o seu vírus foi pela primeira vez isolado a partir do cérebro de um humano infetado em 1935. (Knipe, & Howley, 2014)

Encontra-se distribuída principalmente pelo continente asiático, havendo uma maior concentração de novos casos na região abrangida pelo sudoeste asiático. De modo geral, o número de casos tem vindo a aumentar em todos os países, com especial exceção da China, onde os indicadores demonstram um decréscimo de casos reportados, possivelmente devido a implementação de grandes campanhas de vacinação da população. Nos últimos anos foram relatados surtos em países como a Papua Nova Guiné e Austrália, revelando a expansão da zona de influência deste vírus. (Knipe, & Howley, 2014)

Esta doença é classificada como tendo cinco genótipos diferentes, nomeados I, II, III, IV e V, que estão distribuídos pelas diferentes regiões afetadas, sendo que os genótipos I e III são mais prevalentes em regiões epidémicas, e os genótipos II e IV ocorrem em maior número nas regiões endémicas. (Knipe, & Howley, 2014)



Figura 7 - Distribuição geográfica do vírus da Encefalite Japonesa. (Golding et al., 2015)
A verde estão assinaladas as regiões onde a doença é considerada endêmica, nomeadamente, nas regiões do Subcontinente Indiano, Sudoeste Asiático e Extremo Oriente.

Os cuidados de saúde prestados aos indivíduos infetados consistem na tentativa de controlar os sintomas à medida que se manifestam, pelo que ainda não existe um tratamento específico contra a encefalite japonesa. Como tal, a prevenção pelo meio da vacinação e as medidas de controlo do vetor mosquito permanecem os melhores métodos para travar os surtos da doença. (Chin & Torresi, 2013)

A partir de 1954, foi introduzida no mercado internacional a vacina JE-VAX, criada a partir do cérebro de ratos infetados com o vírus da encefalite japonesa. Os tecidos

cerebrais são homogeneizados e purificados recorrendo a hiper-centrifugação e várias filtrações, sendo depois adicionada formalina de modo a inativar o vírus. Esta vacina usa diferentes estirpes da doença para diferentes mercados, e a sua modesta imunogenicidade faz com que sejam necessários vários reforços para que se mantenha eficaz. Além disso, foram reportadas várias reações adversas aquando a administração da vacina, como reações alérgicas e neurológicas, levando a que esta tenha sido descontinuada em 2005 face ao surgimento de novas vacinas com melhores perfis de segurança. (Knipe, & Howley, 2014)

Uma vacina disponível no mercado é a IXIARO, criada em células Vero e adjuvada com hidróxido de alumínio, num regime posológico de duas doses administradas com 28 dias de intervalo entre elas. Esta vacina inativada foi admitida no mercado após ter sido garantido que não era menos imunogénica que um regime de 3 doses de JE-VAX. (Knipe, & Howley, 2014) Esta é a única vacina que se encontra autorizada no Estados Unidos.

Existe ainda outra vacina para a encefalite japonesa, IMOJEV. Esta caracteriza-se por ser uma vacina viva atenuada, e é composta principalmente pela estirpe vírus da febre amarela com genes da encefalite japonesa. Os ensaios clínicos onde esta vacina foi testada mostram resultados favoráveis para o seu uso no mercado, com a vantagem de ser apenas necessária uma dose para produzir uma proteção duradoura. No entanto, esta vacina é contraindicada para certas franjas da população devido aos seus efeitos secundários, fruto de se tratar uma vacina viva atenuada. Esta vacina está aprovada em diversos países asiáticos e na Austrália, não estando aprovada no Estados Unidos.

1.5.5. Vírus do Nilo Ocidental

O vírus do Nilo ocidental (VNO) (em inglês, *West Nile Virus (WNV)*), é um flavivírus de RNA com cadeia positiva. Foi isolado pela primeira vez no ano de 1937 no Uganda num doente que manifestava sintomas febris. (Knipe, & Howley, 2014) Ao longo do tempo, ocorreram surtos esporádicos da doença em diversas regiões dos continentes africano e asiático, médio-oriental e Austrália, considerados como surtos menores, sem grande importância clínica. No final do século XXI, o vírus alastrou-se ao continente americano, causando a morte a 7 pessoas e a dezenas de pássaros e cavalos na zona de Nova Iorque. Atualmente, o vírus está disseminado em grande parte do continente americano, com o número de indivíduos infetados com o vírus a aumentar anualmente. (Knipe, & Howley, 2014)

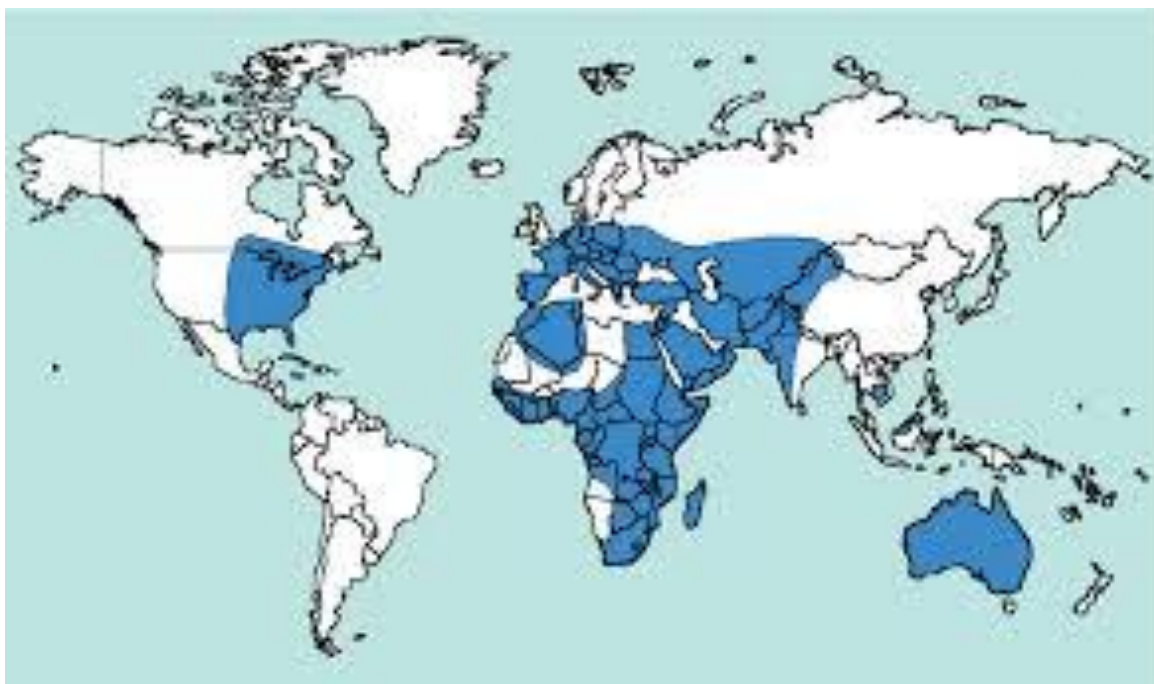


Figura 8 - Distribuição geográfica da doença da WNV (Campbell et al., 2002). A azul estão assinaladas as zonas onde a doença é considerada endêmica. O vírus já se encontra disseminado por diversas regiões do continente africano, europeu, Oceânia e América do Norte.

Apesar da existência de vacinas para uso veterinário, ainda não existem vacinas licenciadas para uso em seres humanos. Mesmo após vários candidatos terem sido submetidos a estudos tipo I e II, nenhum progrediu para estudos mais avançados, o que pode ser resumidamente explicado por diversos fatores como dificuldades técnicas, falta de investimento, ou dificuldades relacionadas com o desenho dos próprios estudos. (Ulbert, 2019) Acresce ainda o facto que a única vacina que foi submetida a estudos tipo II foi desenvolvida com recurso à mesma tecnologia usada numa vacina com o DENV (CYD-TDV) ter demonstrado limitações em pessoas não infetadas contra um dos seus serotipos, levando a crer que os fabricantes desta vacina quererão clarificar totalmente a causa desta limitação antes de expandir a tecnologia a outras frentes. (Sridhar et al., 2018)

2.Objetivo

Dada a importância atual e crescente que as infecções virais causadoras de DTNs representam, a presente monografia propõe um estudo retrospectivo, num espaço temporal de 10 anos, sobre a investigação e desenvolvimento de diversas vacinas para doenças causadas por vírus da família *Flaviviridae* (Dengue, Zika, Encefalite Japonesa, e Vírus do Nilo Ocidental). Este estudo tem assim como objetivo determinar os tipos e número de candidatos a vacinas em desenvolvimento para cada uma destes vírus ao longo de 10 anos, compreendidos entre 2014 e 2024 e analisar a sua evolução no que toca ao número de ensaios clínicos realizados.

3. Metodologia

O objetivo deste estudo consiste na realização de uma análise que tem em conta a contabilização de todos os ensaios clínicos decorridos entre 2014 e 2024 que estudaram o efeito de candidatos a vacinas contra vírus pertencentes à família *Flaviviridae*.

A pesquisa e seleção de artigos que foi realizada na plataforma PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) com base no descritos nos seus títulos e resumos, teve em conta o tipo de doença que os candidatos a vacina se propõem a tratar e o tipo de vacina usada para esse efeito. Foram apenas incluídos ensaios clínicos, não tendo sido selecionados outro tipo de entradas. Não foram incluídos ensaios clínicos relativos a métodos de diagnóstico ou prevenção, ensaios cujo objetivo não sejam eficácia e segurança dos candidatos, artigos incompletos ou que não forneçam dados suficientes e ensaios clínicos realizados em animais.

Com estes resultados, obteve-se uma visão temporal sobre diversos fatores como a evolução de número de ensaios para cada doença, em que fases se encontram os ensaios, e as vacinas e respetivos tipos em desuso ou em ascensão.

Sempre que aplicável, foram elaboradas figuras com vista a promover a análise dos fatores redigidos em cima, nomeadamente, gráficos que mostram o número de ensaios por ano para determinada doença, as fases dos ensaios por ano para determinada doença, as vacinas e seus tipos usadas por anos para determinada doença.

As plataformas Clinicaltrials.gov e Clinicaltrialsregister.eu foram utilizadas como suporte na definição da fase de estudo do ensaio clínico em questão em casos em que o título e o resumo do artigo não sejam claros quanto a este aspeto. Ainda assim, quando não foi possível determinar a fase do estudo, o estudo não foi selecionado.

4.Resultados e Discussão

De acordo com a metodologia descrita no ponto 3, os resultados obtidos nesta pesquisa de ensaios clínicos encontram-se dispostos na tabela em baixo, descrevendo o número de artigos encontrados durante a pesquisa da respetiva *search word* face ao número de artigos selecionados de acordo com os critérios definidos:

Tabela 5 - *Search words* pesquisadas na plataforma PUBMED, com respetivo número de artigos de ensaios clínicos pesquisados e selecionados entre os anos de 2014 e 2024.

Doença	Search Word	Total de artigos encontrados	Artigos selecionados
Dengue	"Dengue vaccine"	132	75
Encefalite Japonesa	"Japanese Encephalitis vaccine"	57	29
Zika	"Zika vaccine"	26	11
Vírus no Nilo Ocidental	"West Nile vírus vaccine"	7	1

De uma forma geral, é possível observar na tabela 5 que existe uma maior prevalência de artigos encontrados para a doença de dengue do que para as outras doenças. Em termos de artigos pesquisados, os 132 artigos encontrados para a doença de dengue perfazem cerca de 59,5% dos artigos encontrados com todas as *search words*. A segunda doença com mais artigos encontrados é a encefalite japonesa com 25.6% do total de artigos encontrados.

No decorrer da seleção de artigos, apenas 116 artigos (cerca de 52.3%) cumpriram com os critérios de seleção. Cerca de metade desses artigos são referentes à doença da dengue, seguindo-se a doença da encefalite japonesa como a segunda doença com mais artigos selecionados

4.1. Dengue

Entre 2014 e 2024 foram selecionados 75 ensaios clínicos que envolveram vacinas ou candidatos a vacinas contra a dengue. Na tabela 6 é possível observar o número de ensaios por vacina e o respetivo tipo de vacina estudado. É possível constatar que duas vacinas, TAK-003 (Qdenga) e CYD-TDV (Dengvaxia), são bastante mais prevalentes que as restantes, perfazendo 72% da totalidade dos ensaios clínicos selecionados. Nota-se igualmente um domínio das vacinas atenuadas face a outros tipos também presentes nestes ensaios clínicos.

Tabela 6 - Número de artigos de ensaios clínicos selecionados e respetiva correspondência com a vacina estudada e o seu tipo usando a *search word* “Dengue vaccine” entre os anos de 2014 e 2024.

Vacina	Tipo de Vacina	Número de ensaios clínicos selecionados
TAK-003/ DENVax (Qdenga)	Atenuada	32
CYD-TDV (Dengvaxia)	Atenuada	22
TDENV-PIV	Inativada	5
TV003	Atenuada	4
V180 (TetraVax-DV)	Subunidades	3
TDEN	Atenuada	2
TV005	Atenuada	2
Butantan-DV	Atenuada	2
DENV-1 PIV	Inativada	1
Dengusil	Atenuada	1
V181	Atenuada	1

De igual modo, as figuras 9 e 10 demonstram a distribuição dos ensaios clínicos ao longo deste período de tempo.



Figura 9 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos por ano selecionados usando a *search word* “dengue vaccine”, desde 2014 até 2024.

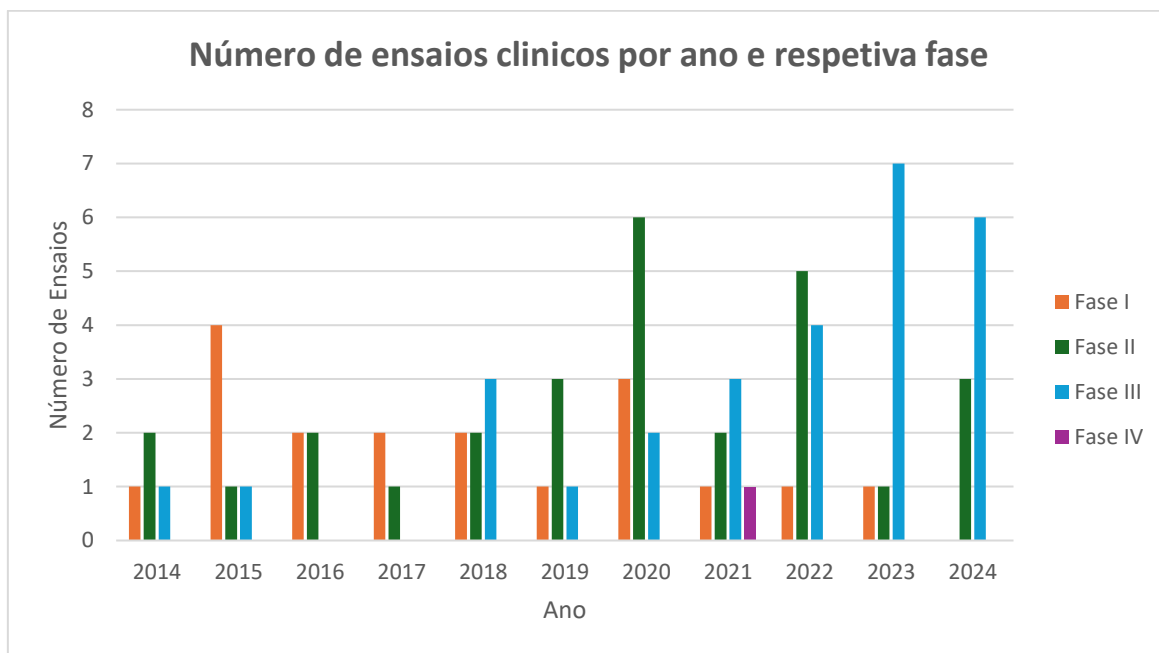


Figura 10 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados, por ano e por fase, usando a search word “dengue vaccine”, desde 2014 até 2024.

Tendo em conta estes dados, podemos afirmar que a investigação de vacinas contra esta doença tem sido feita de forma regular ao longo do período de 2014 e 2024.

Tal como observado na figura 9, existe um aumento estável do número de ensaios clínicos a partir do ano 2020. Relativamente à descrição da fase dos ensaios selecionados, disposta na figura 10, é igualmente possível observar um aumento dos ensaios clínicos de fases III desde 2019 em diante.

Existem duas vacinas que se destacam como sendo as mais estudadas, *Qdenga* e *Dengvaxia*. Ambas as vacinas já se encontram licenciadas em diversos países e têm em comum o facto de serem ambas vacinas atenuadas. A vacina *Qdenga* apresenta uma taxa de eficácia na prevenção geral da doença sintomática em 80,2% e demonstrou a capacidade de prevenir hospitalizações em 90,4%, demonstrando assim a sua elevada eficácia. Já a vacina *Dengvaxia* demonstra uma taxa de eficácia de redução de hospitalizações na ordem dos 80%. (Tricou et al., 2024)

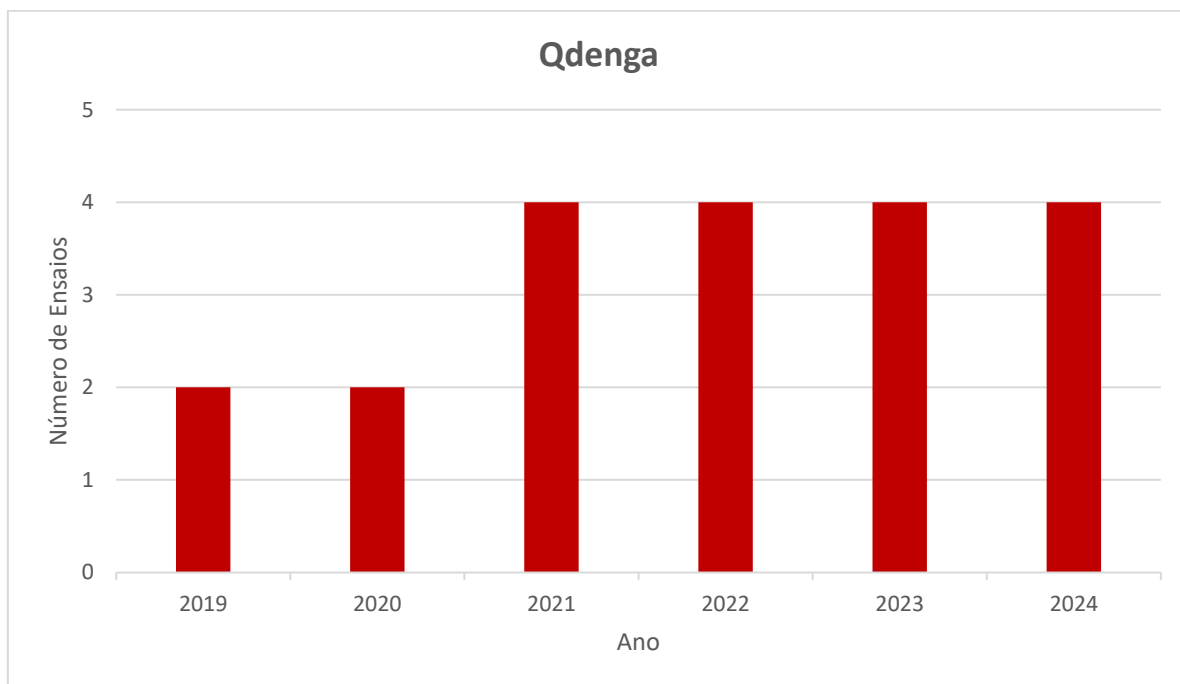


Figura 11 - Gráfico representante da distribuição, por ano, do número de ensaios clínicos selecionados, usando a *search word* “dengue vaccine”, onde a vacina Qdenga foi alvo de estudo, desde 2019 e 2024.

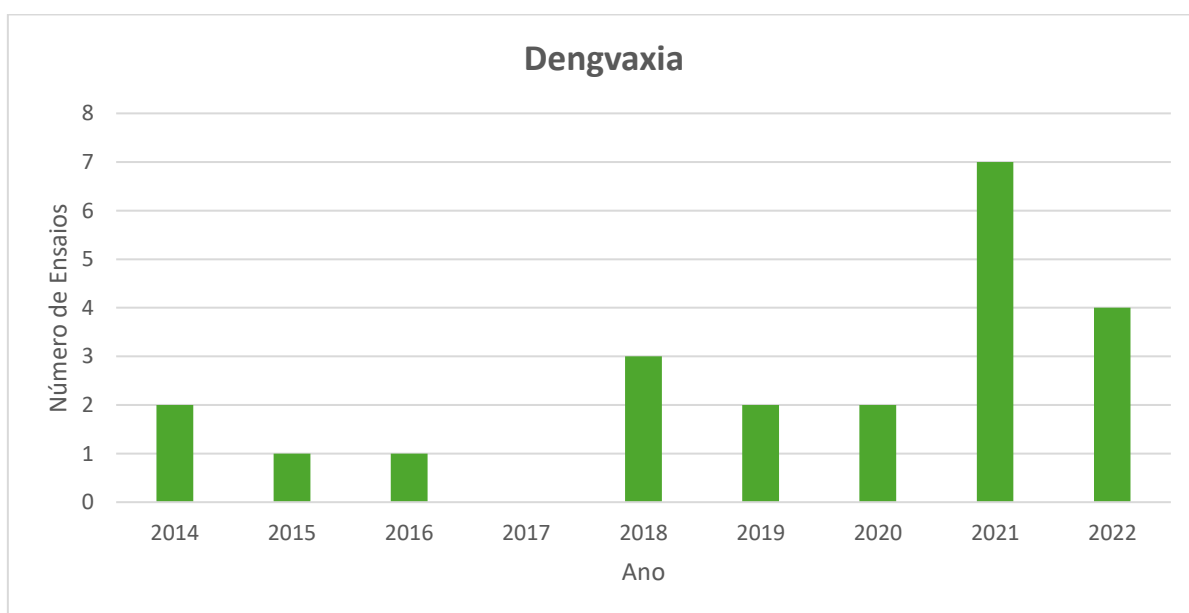


Figura 12 - Gráfico representante da distribuição, por ano, do número de ensaios clínicos selecionados, usando a *search word* “dengue vaccine”, onde a vacina Dengvaxia foi alvo de estudo, desde 2014 e 2022.

Para a vacina Qdenga, como mostrado na figura 11, é possível verificar que os primeiros ensaios foram publicados no ano 2019, enquanto que a vacina concorrente Dengvaxia teve os seus primeiros ensaios no ano 2014. Nota-se, tal como mostrado na

figura 12, uma maior concentração de estudos nos anos mais recentes para a vacina Qdenga.

Uma das razões para este facto poderá estar relacionada com a limitação da vacina Dengvaxia, em indivíduos que não tenham sido expostos ao vírus da dengue. De acordo com os estudos disponíveis, tal limitação não afeta a vacina Qdenga, que demonstra resultados semelhantes entre indivíduos previamente infetados e não infetados. (Tricou et al., 2024)

Não obstante das vacinas previamente mencionadas, foram feitos recentemente ensaios clínicos com outros candidatos a vacinas. Um desses candidatos é a TV005, que recentemente mostrou produzir uma resposta imunológica semelhante para todos os serotipos da dengue. Não obstante, será necessário obter resultados de ensaios clínicos mais abrangentes para atestar a reprodutibilidade destes resultados. (Walsh et al., 2024)

4.2. Encefalite Japonesa

Entre 2014 e 2024 foram selecionados 28 ensaios clínicos que envolveram vacinas ou candidatos a vacinas contra a encefalite japonesa. Na tabela 7 é possível observar o número de ensaios por vacina e o respetivo tipo de vacina estudado.

Tabela 7 - Número de artigos de ensaios clínicos selecionados e respetiva correspondência com a vacina estudada e o seu tipo usando a *search word* “Japanese Encephalitis vaccine” entre os anos de 2014 e 2024.

Vacina	Tipo de vacina	Número de ensaios clínicos selecionados
JE-CV (IMOJEV)	Atenuada	15
IXIARO	Inativada	9
JENVAC	Inativada	2
Encevac	Inativada	1
JE-PI/JE-LI	Inativada	1

Dos resultados extraídos para as vacinas contra a encefalite japonesa, podemos observar na figura 13 uma regularidade assinalável do número de ensaios clínicos publicados desde 2014 até 2020, sendo que a partir de 2021 observa-se um decréscimo de publicações neste âmbito.

É possível constatar que a vacina atenuada JE-CV foi testada em mais ensaios clínicos do que todas as outras vacinas combinadas, tendo até quatro ensaios clínicos de fase IV publicados. Por comparação, a segunda vacina mais frequente, IXIARO, detém 9 ensaios clínicos realizados durante este período com um estudo de fase IV detetado.

Com suporte da figura 13, é possível constatar que o número absoluto de ensaios clínicos durante o período estudado teve um decréscimo da sua frequência ao longo do tempo. Tal pode dever-se ao facto de já existirem no mercado mundial duas vacinas aprovadas que correspondem às necessidades das populações, e juntamente com o facto de existirem cada vez mais ensaios com maior especificidade, potencia a que haja um crescente desinteresse no estudo de outras alternativas a estas vacinas. Estes fatores também podem impactar no número de ensaios clínicos realizados a outros candidatos a vacinas contabilizados neste estudo, como a Encevac, Jenvac e JE-PI/JE-LI.



Figura 13 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados por ano, usando a *search word* "japanese encephalitis vaccine", desde 2014 até 2024.



Figura 14 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados por ano e respetiva fase, usando a *search word* “japanese encephalitis vaccine”, desde 2014 até 2024.

Durante o período de tempo de 2014 a 2024 não foram notados ensaios de fase I uma vez que estes ensaios foram realizados antes de 2014. Tal demonstra que estas vacinas e candidatos têm sido estudados gradualmente ao longo do tempo, sendo que nestes 10 anos os ensaios realizados foram de fases mais avançadas, o que se coaduna com o facto de já existirem vacinas aprovadas em diversos mercados. Estas vacinas detêm taxas de eficácia bastante elevadas. Foi observado que, para a vacina JE-CV, 99% dos adultos adquirem imunidade ao fim de 28 dias após a administração da vacina. (Torresi et al., 2010) Do mesmo modo, a vacina IXIARO também apresenta taxas de imunidade superiores a 95% num período de tempo semelhante. (Hills et al., 2019)

A diferença notada entre o número de estudos para ambas as vacinas aprovadas poderá ser explicada pelo uso de cada uma das vacinas na sua população-alvo. Por exemplo, a vacina JE-CV é usada em zonas endémicas do globo, que se caracterizam por ser menos desenvolvidas e ter mais população afetada por esta doença, onde dose única é uma vantagem. Já a vacina IXIARO está aprovada para o uso em países não endémicos, como os Estados Unidos da América (EUA), onde o seu uso é feito maioritariamente em viajantes para estas zonas endémicas, que beneficiam de uma vacina com menos efeitos secundários apesar do esquema de duas doses.

A diferença de tipo de vacinas pode ser determinante, uma vez que a tecnologia das vacinas inativadas está mais estabelecida do que as vacinas vivas atenuadas, levando à necessidade de existirem mais estudos para a este último tipo no que toca ao seu perfil de segurança e eficácia.

4.3. Zika

Entre 2014 e 2024 foram selecionados 11 ensaios clínicos que envolveram vacinas ou candidatos a vacinas contra a zika. Na tabela em baixo é possível observar o número de ensaios por vacina e o respetivo tipo de vacina estudado.

Tabela 8 - Número de artigos de ensaios clínicos selecionados e respetiva correspondência com a vacina estudada e o seu tipo usando a *search word* “zika vaccine” entre os anos de 2014 e 2024.

Vacina	Tipo de Vacina	Número de ensaios clínicos selecionados
PIZV (TAK-426)	Inativada	4
VRC-ZKADNA085-00-VP	DNA	1
VRC-ZKADNA090-00-VP	DNA	1
GLS-5700	DNA	1
Ad26.ZIKV.001	DNA	1
mRNA-1325	mRNA	1
mRNA-1893	mRNA	1
VLA1601	Inativada	1

Destes resultados dispostos na tabela 8 podemos averiguar que a vacina PIZV (TAK-426) é a mais estudadas face às restantes vacinas, que apenas detêm um artigo cada. Esta vacina beneficiou de ser um dos primeiros candidatos a ser testado em humanos com resultados promissores, o que levou a uma maior facilidade em obter os recursos financeiros necessários para concluir os ensaios mais rapidamente e com maior abrangência. (Morabito & Graham, 2017) Nos seus ensaios, a vacina PIZV revelou potencial no que toca à resposta imunitária provocada pela sua administração com perfil de segurança aceitável e ausência de eventos adversos graves. (Kim et al., 2024)

Todos estes ensaios têm a particularidade de serem de fase I, o que revela o estado prematuro da investigação destas vacinas até poderem ser autorizadas para comercialização. Uma das razões por detrás da inexistência de estudos mais abrangentes poderá estar relacionada com o decréscimo acentuado da incidência da doença depois do seu pico em 2016, o que limitou a elaboração de ensaios de fase II e III para vacinas contra esta doença. (Vannice et al., 2019)



Figura 15 - Gráfico representante do número de ensaios clínicos selecionados por ano, usando a *search word* “zika vaccine”, desde 2017 até 2024.

Tal como mostrado na figura 15, não é possível obter uma relação de estabilidade no que toca à publicação de ensaios clínicos para vacinas contra a zika. Este facto poderá estar relacionado com o facto de o uso desta vacina estar sujeito ao aumento da incidência da doença de dengue grave em zonas endémicas. Esta é uma das limitações que pode abrandar a investigação em torno da vacina PIZV. O mecanismo por detrás desta constatação ainda não se encontra completamente esclarecido, pelo que futuros estudos deverão ter em conta a monitorização de eventos adversos relacionados com a doença do dengue. (Flores et al., 2025)

4.4. Vírus do Nilo Ocidental

Entre 2014 e 2024 foi selecionado apenas 1 ensaio clínico que envolveu um candidato a vacina contra o vírus do Nilo Ocidental. Essa vacina é a HydroVax-001, que se caracteriza por se uma vacina inativada que revela um nível de imunogenicidade moderado e perfis de segurança bem tolerados em várias dosagens estudadas. (Woods et al., 2019)

Apesar deste estudo se centrar em resultados obtidos desde 2014 até 2024, é possível perceber que existem diversos ensaios clínicos realizados em anos anteriores que estudam diferentes candidatos a vacinas contra o vírus do Nilo ocidental, que nunca passaram da barreira dos ensaios clínicos de fase I.

A ausência de ensaios clínicos mais abrangentes para estes candidatos poderá estar relacionada com diversos fatores: a maioria dos indivíduos infectados não apresenta sintomas da doença, a frequência de surtos epidêmicos é irregular e a localização dos surtos é incerta e de difícil previsão. Estes fatores dificultam a elaboração de ensaios robustos para o estudo destas vacinas e impedem a sua progressão para ensaios de fases mais avançadas. (Ulbert, 2019)

De salientar que existem atualmente vacinas já aprovadas para uso veterinário, e que as medidas mais tomadas para a prevenção desta doença consistem no controlo da população de mosquitos, que servem de vetor para esta doença.

Conclusão e Perspetivas Futuras

Esta dissertação abordou integradamente o desenvolvimento de vacinas contra vírus pertencentes à família *Flaviviridae* com foco em doenças como Zika, Dengue, Encefalite Japonesa e Vírus do Nilo Ocidental. Por meio de uma análise narrativa de ensaios clínicos publicados entre 2014-2024 foi possível identificar os padrões de desenvolvimento, avaliar as progressões, tanto científicas como tecnológicas, bem como os desafios encontrados pelas equipas de investigação na luta contra estas doenças, das quais algumas foram classificadas como doenças tropicais negligenciadas.

Foi possível constatar que o investimento em investigação e desenvolvimento de vacinas é frequentemente impulsionado pela ocorrência de surtos epidémicos e posterior atenção mediática resultante. Tal é observado concretamente com a Zika, onde, apesar de ter surgido um número significativo de ensaios clínicos após os surtos sentidos entre 2015 e 2016, a queda acentuada da incidência global limitou o avanço de candidatos para ensaios de fase II e III. Por outro lado, o vírus da dengue, com prevalência e impacto regulares em regiões tropicais, foi investigado com regularidade ao longo do período estudado, tal como pode ser verificado pela frequência de artigos publicados. De notar ainda que para esta doença existem duas vacinas já licenciadas, a Dengvaxia (CYD-TDV) e a Qdenga (TAK-003), ambas vacinas vivas atenuadas com eficácia demonstrada em diversos ensaios clínicos.

O estudo de novos tipos de vacinas poderá estar também relacionado com características requeridas por diferentes tipos de populações. No caso das vacinas aprovadas para a encefalite japonesa, podemos atestar que uma das vacinas, a IMOJEV, é uma vacina de dose única usada em zonas endémicas geralmente com menos recursos e infraestruturas, sendo uma vantagem no que toca a este tipo de populações. No caso da vacina IXIARO, apesar do seu plano de administração implicar a toma de uma segunda dose, é uma vacina administrada sobretudo em viajantes oriundos de países desenvolvidos não endémicos, e, apesar desta particularidade, confere a vantagem de deter um melhor perfil de segurança face à vacina IMOJEV, sendo preferível a sua toma em países desenvolvidos onde os cuidados de saúde estão melhor distribuídos pela população.

Existe ainda a particularidade em que a ausência de surtos da doença constitui uma dificuldade acrescida para o avanço dos ensaios clínicos. No caso das vacinas contra o vírus do Nilo Ocidental, a ausência de sintomas na maioria dos indivíduos infetados, aliada à ausência de surtos, constituem fatores que fazem com que os candidatos existentes ainda não tenham avançado para ensaios clínicos de fases mais

avançadas. Mesmo a vacina mais promissora para esta doença, HydroVax-001, permanece apenas com estudos em fases iniciais devido a estes fatores.

Foi também possível concluir que o tipo de vacinas para estas doenças tem vindo a evoluir ao longo do tempo. No caso de vacinas usadas contra os flavivírus, as vacinas de primeira geração, atenuadas e inativas, foram as mais estudadas. Tal poderá ser devido à eficácia comprovada destas vacinas e perfis de segurança mais bem documentados. Apesar desta constatação, é possível observar um aumento de ensaios clínicos para vacinas de gerações posteriores, como vacinas de subunidades, RNA e mRNA, que poderá ser explicado pelo excecional enfoque dado à investigação de vacinas contra a COVID-19 desde 2020.

Outro ponto a ter em atenção será o impacto das alterações climáticas e do aquecimento global para o aparecimento de doenças em zonas não endémicas. Usando o exemplo das doenças causadas por flavivírus, o aumento da temperatura é um fator que favorece o aumento da proliferação de mosquitos que servem de vetores para este tipo de doenças, levando consequentemente ao aumento da sua incidência na população. Este poderá ser um fator a ter em conta para os sistemas de saúde destes países, que terão inevitavelmente de se adaptar ao tratamento destas novas doenças nos seus territórios.

Nesse sentido, será também necessário um esforço conjunto entre entidades de saúde internacionais e locais para o controlo e prevenção destas doenças, assim como o melhoramento de infraestruturas essenciais por parte dos próprios órgãos governamentais. Além das próprias vacinas e terapêuticas adotadas, será igualmente importante capacitar as populações mais necessitadas com acesso a água potável e boas condições sanitárias aumentando assim a capacidade de prevenir o aparecimento de novos surtos.

Num modo geral, esta análise revelou um cenário complexo e atual do progresso das vacinas contra os flavivírus. Diversos fatores socioeconómicos podem estar a limitar o sucesso das vacinas contra estas doenças, apesar dos avanços tecnológicos mais recentes. Adicionalmente, e com o acentuar das alterações climáticas, as áreas endémicas para estas doenças poderão sofrer mudanças e expandir-se para outras zonas do globo em breve, pondo em risco um maior número de pessoas e sobrecarregando os sistemas e infraestruturas de saúde que não se encontram devidamente preparadas. Torna-se fundamental que as entidades de saúde, públicas e privadas, mantenham e reforcem os meios, independentemente das flutuações de atenção mediática, para garantir uma boa preparação na resposta a novos surtos destas doenças, protegendo assim as populações mais necessitadas.

Bibliografia

- Acosta-Coley, I., Cervantes-Ceballos, L., Tejeda-Benítez, L., Sierra-Márquez, L., Cabarcas-Montalvo, M., García-Espiñeira, M., Coronell-Rodríguez, W., & Arroyo-Salgado, B. (2022). Vaccines platforms and COVID-19: What you need to know. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40794-022-00176-4>
- Adepoju, O. A., Afinowi, O. A., Tauheed, A. M., Danazumi, A. U., Dibba, L. B. S., Balogun, J. B., Flore, G., Saidu, U., Ibrahim, B., Balogun, O. O., & Balogun, E. O. (2023). Multisectoral Perspectives on Global Warming and Vector-borne Diseases: A Focus on Southern Europe. *Current Tropical Medicine Reports*, 10(2), 47–70. <https://doi.org/10.1007/s40475-023-00283-y>
- Ali, A., Wahid, B., Rafique, S., & Idrees, M. (2017). Advances in research on Zika virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(4), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.020>
- Baghban, R., Ghasemian, A., & Mahmoodi, S. (2023). Nucleic acid-based vaccine platforms against the coronavirus disease 19 (COVID-19). *Archives of Microbiology*, 205(4), 150. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03480-5>
- Baharom, M., Ahmad, N., Hod, R., Arsad, F. S., & Tangang, F. (2021). The Impact of Meteorological Factors on Communicable Disease Incidence and Its Projection: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), 11117. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111117>
- Barnett, E. D. (2007). Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 44(6), 850–856. <https://doi.org/10.1086/511869>
- Barrett, A. D. T. (2017). Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*, 35(44), 5951–5955. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.032>

- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R. W., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bonaldo, M. C., Sequeira, P. C., & Galler, R. (2014). The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(5), 1256–1265. <https://doi.org/10.4161/hv.28117>
- Bovier, P. A. (2008). Recent advances with a virosomal hepatitis A vaccine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(8), 1177–1185. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.8.1177>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Moyes, C. L., Farlow, A. W., Scott, T. W., & Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Ca, J., Kumar P, V. B., Kandi, V., N, G., K, S., Dharshini, D., Batchu, S. V. C., & Bhanu, P. (2024). Neglected Tropical Diseases: A Comprehensive Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.53933>
- Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S., & Gubler, D. J. (2002). West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(9), 519–529. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00368-7)
- Casulli, A. (2021). New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021–2030. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(5), e0009373. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009373>

- Chavda, V. P., Pandya, R., & Apostolopoulos, V. (2021). DNA vaccines for SARS-CoV-2: Toward third-generation vaccination era. *Expert Review of Vaccines*, 20(12), 1549–1560. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1987223>
- Chin, R., & Torresi, J. (2013). Japanese B Encephalitis: An Overview of the Disease and Use of Chimerivax-JE as a Preventative Vaccine. *Infectious Diseases and Therapy*, 2(2), 145–158. <https://doi.org/10.1007/s40121-013-0018-2>
- Clem, A. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), 73. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>
- Cohen, J. P., Sturgeon, G., & Cohen, A. (2014). Measuring Progress in Neglected Disease Drug Development. *Clinical Therapeutics*, 36(7), 1037–1042. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.004>
- De Gregorio, E., & Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: A personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 505–514. <https://doi.org/10.1038/nri3694>
- De Pinho Favaro, M. T., Atienza-Garriga, J., Martínez-Torró, C., Parladé, E., Vázquez, E., Corchero, J. L., Ferrer-Miralles, N., & Villaverde, A. (2022). Recombinant vaccines in 2022: A perspective from the cell factory. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01929-8>
- Ending the Neglect to Attain the Sustainable Development Goals: A Road Map for Neglected Tropical Diseases 2021-2030* (1st ed). (2021a). World Health Organization.
- Ending the Neglect to Attain the Sustainable Development Goals: A Road Map for Neglected Tropical Diseases 2021-2030* (1st ed). (2021b). World Health Organization.
- Engels, D., & Zhou, X.-N. (2020). Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9>

- Fenner, F., MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2017). *Fenner's veterinary virology* (5th edition). Elsevier.
- Ferguson, N. M., Rodríguez-Barrquer, I., Dorigatti, I., Mier-y-Teran-Romero, L., Laydon, D. J., & Cummings, D. A. T. (2016). Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science*, 353(6303), 1033–1036. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9590>
- Flores, H. E., Pinzon Burgos, E. F., Camacho Ortega, S., Heredia, A., & Chua, J. V. (2025). From Antibodies to Immunity: Assessing Correlates of Flavivirus Protection and Cross-Reactivity. *Vaccines*, 13(5), 449. <https://doi.org/10.3390/vaccines13050449>
- Francis, M. J. (2018). Recent Advances in Vaccine Technologies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(2), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.002>
- Gardner, C. L., & Ryman, K. D. (2010). Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 237–260. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.001>
- Golding, N., Wilson, A. L., Moyes, C. L., Cano, J., Pigott, D. M., Velayudhan, R., Brooker, S. J., Smith, D. L., Hay, S. I., & Lindsay, S. W. (2015). Integrating vector control across diseases. *BMC Medicine*, 13, 249. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0491-4>
- Guy, B., Guirakhoo, F., Barban, V., Higgs, S., Monath, T. P., & Lang, J. (2010). Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*, 28(3), 632–649. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.098>
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, 30(29), 4301–4306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.114>
- Hills, S. L., Walter, E. B., Atmar, R. L., Fischer, M., ACIP Japanese Encephalitis Vaccine Work Group, Walter, E., Atmar, R. L., Barnett, E., Barrett, A., Bocchini, J. A., Chen,

- L., Deussing, E., Fink, D., Holbrook, M., Levin, M., Marfin, A., Meissner, C., Schechter, R., Shlim, D., ... Hills, S. L. (2019). Japanese Encephalitis Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR. Recommendations and Reports*, 68(2), 1–33. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6802a1>
- Huang, D. B., Wu, J. J., & Tying, S. K. (2004). A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. *Journal of Infection*, 49(3), 179–209. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.05.018>
- Kaynarcalidan, O., Moreno Mascaraque, S., & Drexler, I. (2021). Vaccinia Virus: From Crude Smallpox Vaccines to Elaborate Viral Vector Vaccine Design. *Biomedicines*, 9(12), 1780. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121780>
- Kim, I.-J., Gonzalez, O., Tighe, M. P., Lanthier, P. A., Clark, M. J., Travis, K. L., Low-Beer, T. C., Lanzer, K. G., Bernacki, D. T., Szaba, F. M., De La Barrera, R. A., Dussupt, V., Mendez-Rivera, L., Krebs, S. J., Ross, C. N., Mdaki, S. D., Brasky, K. M., Layne-Colon, D., Tardif, S. D., ... Patterson, J. L. (2024). Protective efficacy of a Zika purified inactivated virus vaccine candidate during pregnancy in marmosets. *Npj Vaccines*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00824-0>
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2014). Fields Virology, 6th Edition. *Clinical Infectious Diseases*, 59(4), 613–613. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu346>
- McAdams, Z., Gustafson, K., & Ericsson, A. (2021). The Effect of Common Viral Inactivation Techniques on 16S rRNA Amplicon-Based Analysis of the Gut Microbiota. *Microorganisms*, 9(8), 1755. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081755>
- Melo, A. R. D. S., De Macêdo, L. S., Invenção, M. D. C. V., De Moura, I. A., Da Gama, M. A. T. M., De Melo, C. M. L., Silva, A. J. D., Batista, M. V. D. A., & Freitas, A. C. D. (2022a). Third-Generation Vaccines: Features of Nucleic Acid Vaccines and

- Strategies to Improve Their Efficiency. *Genes*, 13(12), 2287.
<https://doi.org/10.3390/genes13122287>
- Melo, A. R. D. S., De Macêdo, L. S., Invenção, M. D. C. V., De Moura, I. A., Da Gama, M. A. T. M., De Melo, C. M. L., Silva, A. J. D., Batista, M. V. D. A., & Freitas, A. C. D. (2022b). Third-Generation Vaccines: Features of Nucleic Acid Vaccines and Strategies to Improve Their Efficiency. *Genes*, 13(12), 2287.
<https://doi.org/10.3390/genes13122287>
- Mills, D. J., Gyawali, N., Nammunige, N. A., Mills, C., Devine, G. J., Lau, C. L., & Furuya-Kanamori, L. (2025). Long-term immunogenicity of a single-dose live recombinant chimeric Japanese encephalitis vaccine in adults. *Journal of Travel Medicine*, 32(2), taaf006. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaf006>
- Morabito, K. M., & Graham, B. S. (2017). Zika Virus Vaccine Development. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10), S957–S963.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix464>
- Morris, G., Barichello, T., Stubbs, B., Köhler, C. A., Carvalho, A. F., & Maes, M. (2018). Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions. *Molecular Neurobiology*, 55(5), 4160–4184.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0635-y>
- Noazin, S., Modabber, F., Khamesipour, A., Smith, P. G., Moulton, L. H., Nasser, K., Sharifi, I., Khalil, E. A. G., Bernal, I. D. V., Antunes, C. M. F., Kieny, M. P., & Tanner, M. (2008). First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. *Vaccine*, 26(52), 6759–6767.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.085>
- Norman, F. F., Pérez De Ayala, A., Pérez-Molina, J.-A., Monge-Maillo, B., Zamarrón, P., & López-Vélez, R. (2010). Neglected Tropical Diseases outside the Tropics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7), e762.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000762>

- Pereira, C. A. D. M., Mendes, R. P. G., Silva, P. G. D., Chaves, E. J. F., & Pena, L. J. (2025a). Vaccines Against Urban Epidemic Arboviruses: The State of the Art. *Viruses*, 17(3), 382. <https://doi.org/10.3390/v17030382>
- Pereira, C. A. D. M., Mendes, R. P. G., Silva, P. G. D., Chaves, E. J. F., & Pena, L. J. (2025b). Vaccines Against Urban Epidemic Arboviruses: The State of the Art. *Viruses*, 17(3), 382. <https://doi.org/10.3390/v17030382>
- Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: From basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
- Rantanen, M., & Laaksonen, A. (2024). The jump in global temperatures in September 2023 is extremely unlikely due to internal climate variability alone. *Npj Climate and Atmospheric Science*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41612-024-00582-9>
- Semenza, J. C., Rocklöv, J., & Ebi, K. L. (2022). Climate Change and Cascading Risks from Infectious Disease. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(4), 1371–1390. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00647-3>
- Shrivastava, A., Tripathi, N. K., Dash, P. K., & Parida, M. (2017). Working towards dengue as a vaccine-preventable disease: Challenges and opportunities. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(10), 1193–1199. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1356284>
- Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., Savarino, S., Zambrano, B., Moureau, A., Khromava, A., Moodie, Z., Westling, T., Mascareñas, C., Frago, C., Cortés, M., Chansinghakul, D., Noriega, F., Bouckenooghe, A., Chen, J., ... DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine*, 379(4), 327–340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1800820>

- Stern, A. M., & Markel, H. (2005). The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges. *Health Affairs*, 24(3), 611–621. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.24.3.611>
- Tahamtan, A., Charostad, J., Hoseini Shokouh, S. J., & Barati, M. (2017). An Overview of History, Evolution, and Manufacturing of Various Generations of Vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine, In Press*(In Press). <https://doi.org/10.5812/jamm.12315>
- Torresi, J., McCarthy, K., Feroldi, E., & Méric, C. (2010). Immunogenicity, safety and tolerability in adults of a new single-dose, live-attenuated vaccine against Japanese encephalitis: Randomised controlled phase 3 trials. *Vaccine*, 28(50), 7993–8000. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.035>
- Tricou, V., Yu, D., Reynales, H., Biswal, S., Saez-Llorens, X., Sirivichayakul, C., Lopez, P., Borja-Tabora, C., Bravo, L., Kosalaraksa, P., Vargas, L. M., Alera, M. T., Rivera, L., Watanaveeradej, V., Dietze, R., Fernando, L., Wickramasinghe, V. P., Moreira, E. D., Fernando, A. D., ... Wallace, D. (2024). Long-term efficacy and safety of a tetravalent dengue vaccine (TAK-003): 4·5-year results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Global Health*, 12(2), e257–e270. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00522-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00522-3)
- Ulbert, S. (2019). West Nile virus vaccines – current situation and future directions. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(10), 2337–2342. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1621149>
- Vannice, K. S., Cassetti, M. C., Eisinger, R. W., Hombach, J., Knezevic, I., Marston, H. D., Wilder-Smith, A., Cavaleri, M., & Krause, P. R. (2019). Demonstrating vaccine effectiveness during a waning epidemic: A WHO/NIH meeting report on approaches to development and licensure of Zika vaccine candidates. *Vaccine*, 37(6), 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.040>

- Walsh, M.-C. R., Alam, M. S., Pierce, K. K., Carmolli, M., Alam, M., Dickson, D. M., Bak, D. M., Afreen, S., Nazib, F., Golam, K., Qadri, F., Diehl, S. A., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., Haque, R., & Kirkpatrick, B. D. (2024). Safety and durable immunogenicity of the TV005 tetravalent dengue vaccine, across serotypes and age groups, in dengue-endemic Bangladesh: A randomised, controlled trial. *The Lancet. Infectious Diseases*, 24(2), 150–160. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00520-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00520-0)
- Weng, H.-B., Chen, H.-X., & Wang, M.-W. (2018). Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. *Infectious Diseases of Poverty*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0444-1>
- Woods, C. W., Sanchez, A. M., Swamy, G. K., McClain, M. T., Harrington, L., Freeman, D., Poore, E. A., Slifka, D. K., Poer DeRaad, D. E., Amanna, I. J., Slifka, M. K., Cai, S., Shahamatdar, V., Wierzbicki, M. R., Amegashie, C., & Walter, E. B. (2019). An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus Vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. *Vaccine*, 37(30), 4222–4230. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.026>
- Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., & Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: Mechanisms and platforms. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 283. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01557-7>