



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GERMANA FERNANDA DE SOUZA

**MODELOS ANIMAIS NA ELABORAÇÃO DE VACINAS CONTRA A COVID-19:
METANÁLISE DOS DESFECHOS PRÉ-CLÍNICOS**

Presidente Prudente - SP
2022

GERMANA FERNANDA DE SOUZA

**MODELOS ANIMAIS NA ELABORAÇÃO DE VACINAS CONTRA A COVID-19:
METANÁLISE DOS DESFECHOS PRÉ-CLÍNICOS**

Dissertação apresentada á Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador:
Prof. Dr.Vamilton Alvares Santarém

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.241 4 Souza, Germana Fernanda de
S729m Modelos animais na elaboração de vacinas contra a
Covid-19: metanálise dos desfechos pré-clínicos \
Germana Fernanda de Souza; orientador Vamilton
Alvares Santarém -- Presidente Prudente, 2022.
46 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2022.
Bibliografia.

1. Estudos pré-clínicos. 2. Imunização. 3. Modelos
animais. 4. SARS-CoV-2. I. Santarém, Vamilton Alvares,
orient. II. Título.

Bibliotecária: Jakeline Margaret de Queiroz Ortega - CRB 8/6246

GERMANA FERNANDA DE SOUZA

Modelos animais na elaboração de vacinas contra a Covid-19: metanálise dos desfechos pré-clínicos

Dissertação apresentada à Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 26 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Caio Ferreira de Oliveira
Universidade de Dracena – Unifadra
Dracena - SP

Prof. Dr. Willian Marinho Dourado Coelho
Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina - FCAA
Andradina - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que me deu forças para chegar até aqui.

Pela vida e pela oportunidade de estar concluindo mais essa etapa.

Aos meus filhos pela ausência.

Aos meus pais pelo apoio com meus filhos na minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Vamilton Santarém por todo apoio e ajuda na pesquisa e no trabalho, sem ele não teria concluído este trabalho.

Ao professor Idiberto Zotarelli, pela ajuda com os gráficos e desenvolvimento da pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão do mestrado.

MUITO OBRIGADA

RESUMO

Modelos animais na elaboração de vacinas contra a Covid-19: metanálise dos desfechos pré-clínicos

A pandemia de COVID-19 vem ocasionando doenças respiratórias e mortes, principalmente em grupos de risco, constituindo emergência de saúde pública de importância internacional segundo a OMS, com o desafio de produção de vacinas eficazes e seguras contra a infecção por SARS-CoV-2 em humanos em curto espaço de tempo. Nesse contexto, fez-se necessária a exploração de modelos animais para a aceleração da criação de vacinas eficazes e com menos efeitos adversos possíveis. A presente revisão sistemática e metanálise foi delineada com o objetivo de avaliar os desfechos pré-clínicos com a utilização de modelos animais para produção da vacina contra SARS-CoV-2. A pesquisa foi desenvolvida nas bases do SCOPUS, PubMed, Embase, OVID, Cochrane, Science Direct, LILACS e EBSCO, com utilização dos unitermos "Animal models; Pre-clinical studies; Vaccines; Immunization; SARS-CoV-2; COVID-19". Os critérios de inclusão foram estudos pré-clínicos, com testes de vacinas contra o SARS-CoV-2 em modelos animais *in vivo*, com pelo menos 2 doses de vacina, publicados de 2020 a 2021. A qualidade da evidência científica nos estudos abordados foi classificada como alta, moderada, baixa ou muito baixa, de acordo com o risco de viés de evidência, clareza das comparações, precisão e consistência nos efeitos do tratamento. Do total de 326 estudos avaliados, dezenove (n= 19) foram considerados elegíveis para inclusão na metanálise. Dez vacinas apresentaram grau de confiança e recomendação que variaram de 85% a 95%. Destas, cinco vacinas apresentaram 95% de grau de confiança e recomendação: (1) vacina inativada para SARS-CoV-2 por β -propiolactona; (2) vacinas BNT162b1 e BNT162b2 contendo RNA mensageiro modificado por nucleosídeos com nanopartículas lipídicas; (3) combinação de uma vacina de DNA que codifica a proteína Spike (S) de comprimento total do SARS-CoV-2 e outra de proteína S1 recombinante; (4) vacina S-Trimer, com subunidade trimérica inativa (tecnologia Trimer-Tag); e, (5) vacina com base na produção de proteína recombinante da porção extracelular (solúvel) da proteína spike (S). Evidenciou-se a importância de estudos em modelos animais para a produção de vacinas contra SARS-CoV-2. Ademais, a segurança e eficácia da vacina foi determinada pelo número de animais envolvidos, utilização de grupo controle randomizado e o tempo de seguimento dos estudos.

Palavras-chave: Estudos pré-clínicos; Imunização; Modelos animais; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Animal models for development of Covid-19 vaccines: meta-analytic study of pre-clinical outcomes

The COVID-19 pandemic has been considered the main cause of respiratory disease and deaths over the world in the last years, particularly in risk groups. The disease, caused by the SARS-CoV-2, became a Public Health emergency of international importance. Therefore, development of vaccines was urgently needed to control the ongoing pandemic COVID-19. Consequently, animal models have been widely tested for accelerating the development of effective and safe vaccines. Herein, a systematic review and a meta-analysis was carried out to identify pre-clinical outcomes of studies using animal models for developing COVID-19 vaccines based on the PubMed, SCOPUS, Embase, OVID, Cochrane, Science Direct, LILACS e EBSCO databases. “Animal models; pre-clinical studies; vaccines; immunization; SARS-CoV- 2; COVID-19” keywords were used as search strategy. Inclusion criteria were pre-clinical studies, involving studies of vaccine tests against SARS-CoV-2 in vivo animal models, with at least 2 doses of vaccine, published from 2020 to 2021. The quality of scientific evidence in the studies addressed was classified as high, moderate, low, or very low, according to the GRADE rules and the risk of bias according to the Cochrane instrument. Nineteen important preclinical studies of vaccine tests in animal models were found of the total of 326 identified studies. The studies evaluated showed the high quality of scientific evidence, with an average degree of confidence and recommendation of 75%. Furthermore, the analysed studies showed high homogeneity in the results, presenting 98.95% (I²) to studies with larger sample size. The results showed ten outstanding vaccines with a degree of confidence and recommendation that ranged from 85% to 95%, and of these ten vaccines, five vaccines showed a degree of confidence and recommendation of 95%, most of them coming from technological manufacturing protocols, such as the BNT162b1 and BNT162b2 vaccines, the DNA vaccine encoding the full-length Spike (S) protein of SARS-CoV-2, and a recombinant S1 protein vaccine, the S-Trimer vaccine, and Nanocovax. It was evidenced that safety and efficacy are determined by the number of animals involved, the use of a randomized control group, and the follow-up time of the studies.

Key words: pre-clinical trials; Immunization; Pandemic; SARS-CoV-2.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ChAdOx1	- Adenovírus de chimpanzé
COVID-19	- Doença causada pelo novo coronavírus
ECA2	- Enzima conversora de angiotensina 2 Ag – antígeno
GRADE	- (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation)
HIV	- Human immunodeficiency virus (AIDS)
MS	- Ministério da Saúde
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PICOS	- (P=Participants; I=Intervention; C= Control; O=Outcomes; S=Study Design).
PNH	- primatas não humanos
PRISMA	- (preferred reporting items for systematic reviews and metanalysis)
PSV	- Partícula semelhante a vírus
RaTG13	- Coronavírus do morcego
SARS	- Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	- Novo coronavírus
Vero, A549, MDCK	- Tipos celulares

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fluxograma e elegibilidade dos estudos para realização da metanálise dos desfechos pré-clínicos em modelos animais na elaboração de vacinas contra a COVID-19.....	18
Figura 2 -	Gráfico Funnel Plot Assimétrico.....	20
Figura 3 -	Gráfico modelo Forest Plot.....	21
Figura 4 -	Esquema apresentando as vacinas destaques em modelo animal para posterior uso clínico.....	22
Figura 5 -	Gráfico Forest Plot mostrando os resultados da análise de Tukey (ANOVA).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro do PICOS (Participantes; Intervenção; Controle; Resultados e Modelo de estudo).....	15
Tabela 2 - Resultados sobre segurança e eficácia do uso dos diversos tipos de vacinas em nível pré-clínico em modelos animais.....	19

SUMÁRIO

Artigo Científico: Modelos animais na elaboração de vacinas contra a covid-19:

metanálise dos desfechos pré-clínicos	12
1 Introdução	14
2 Material e Métodos.....	15
2.1 Desenho do estudo	15
2.2 Critérios de elegibilidade dos estudos.....	16
2.3 Risco de Viés	17
2.4 Fontes de dados e estratégia de pesquisa.....	17
2.5 Análise estatística	17
3 Resultados	17
3.1 Resumo dos achados literários	17
3.2 Principais Resultados	18
4 Discussão	23
4.1 Modelos animais	23
4.2 Tipos de vacinas.....	28
Referências	31

Artigo Científico*

**Modelos animais na elaboração de vacinas contra a covid-19: metanálise dos
desfechos pré-clínicos**

Germana Fernanda de Souza¹; Idiberto José Zotarelli Filho ²;
Vamilton Alvares Santarém^{1*}

1- Mestrado em Ciências da saúde. Universidade do Oeste Paulista. Presidente
Prudente– São Paulo, Brasil.

2- Faculdade de Medicina FACERES de São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

* autor para correspondência: vamilton@unoeste.br

* Normas para publicação Revista: Translational Research (ISSN 1931-5244). Disponível em:
https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/709553?generatepdf=true

Resumo

A pandemia da COVID-19 vem ocasionando doenças respiratórias e mortes, principalmente em grupos de risco, constituindo emergência de saúde pública de importância internacional segundo OMS, com o desafio de produção de vacinas eficazes contra a infecção por SARS-CoV-2 em humanos em curto espaço de tempo. Nesse contexto, fez-se necessária a exploração de modelos animais para a aceleração da criação de vacinas eficazes e com menos efeitos adversos possíveis. O objetivo da revisão sistemática e metanálise foi o de avaliar os desfechos pré-clínicos com a utilização de modelos animais para produção da vacina contra SARS-CoV-2. A pesquisa foi desenvolvida nas bases do SCOPUS, PubMed, Embase, OVID, Cochrane, Science Direct, LILACS e EBSCO, com utilização dos unitermos “Animal models; Pre-clinical studies; Vaccines; Immunization; SARS-CoV- 2; COVID-19”. Os critérios de inclusão foram estudos pré-clínicos, envolvendo estudos de testes de vacinas contra o SARS-CoV-2 em modelos animais in vivo, com pelo menos duas doses de vacina, publicados de 2020 a 2021. A qualidade da evidência científica nos estudos abordados foi classificada como alta, moderada, baixa ou muito baixa, de acordo com o risco de viés de evidência, clareza das comparações, precisão e consistência nos efeitos do tratamento. Do total de 326 estudos avaliados, dezenove foram considerados elegíveis para inclusão na metanálise. Dessas, dez vacinas apresentaram grau de confiança e recomendação que variaram de 85% a 95%. Destas, cinco vacinas apresentaram 95% de grau de confiança e recomendação: (1) vacina inativada para SARS-CoV-2 por β -propio-lactona; (2) vacinas BNT162b1 e BNT162b2 contendo RNA mensageiro modificado por nucleosídeos com nanopartículas lipídicas; (3) combinação de uma vacina de DNA que codifica a proteína Spike (S) de comprimento total do SARS-CoV-2 e outra de proteína S1 recombinante; (4) vacina S-Trimer, com subunidade trimérica inativa (tecnologia Trimer-Tag); e, (5) vacina com base na produção de proteína recombinante da porção extracelular (solúvel) da proteína Spike (S). Evidenciou-se a importância de estudos em modelos animais para a produção de vacinas contra SARS-CoV-2. Ademais, a segurança e eficácia da vacina foi determinada pelo número de animais envolvidos, utilização de grupo controle randomizado e o tempo de seguimento dos estudos.

Palavras-chave: Estudos pré-clínicos; Imunização; Pandemia; SARS-CoV-2.

1. Introdução

A Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo SARS-COV-2 (COVID-19) tem infectado e causado a morte de milhões de pessoas no mundo nos últimos dois anos, desde que foi considerada pandemia pela Organização Mundial de Saúde no início de 2020 (OMS, 2022). Em virtude dos efeitos da pandemia da COVID-19 sobre a saúde humana e a sociedade, vários programas de pesquisa colaborativa têm sido realizados para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra COVID-19, necessárias para imunização de grande quantidade de pessoas (Chung et al., 2021; Vogel et al., 2021).

Os modelos animais têm sido considerados de grande importância para avaliar os antígenos candidatos a vacinas, incluindo os mecanismos de transmissão da doença, a duração da imunidade induzida, a resposta à infecção e à vacinação. Dessa forma, o conhecimento sobre os modelos animais que podem imitar os comportamentos de coronavírus e reproduzir a patologia de COVID-19 têm sido importantes para o desenvolvimento de vacinas (Griffin, 2020).

Modelos murinos (camundongos selvagem, camundongos transgênicos com enzima conversora de angiotensina 2 humana, hamsters sírios) e outros mamíferos (furões, gatos, macacos *Cynomolgus* e macacos Rhesus) têm sido usados para avaliar vacinas e medicamentos contra SARS-CoV-2 para humanos (Takayama, 2020; Tiwari et al., 2020; Wang et al., 2020).

As vacinas de DNA podem expressar comprimento total ou formas truncadas de imunidade humoral e celular induzida pela proteína SARS-CoV S, fornecendo proteção contra infecção pelo vírus em modelos murinos. O coronavírus SARS-CoV-2 infecta as células do hospedeiro humano através da ligação da proteína Spike com a enzima conversora de angiotensina 2 (Yang et al., 2004; Kong et al., 2005; Hu et al., 2007). As vacinas de DNA que codificam as proteínas SARS-CoV induziram respostas de células T e anticorpos em camundongos, mas sua eficácia protetora não foi totalmente investigada (Chunling et al., 2006; Hu et al., 2009). Em relação às vacinas baseadas em vetores virais, para evitar imunidade pré-existente contra adenovírus humano, o adenovírus de chimpanzé (ChAdOx1) foi utilizado no desenvolvimento de vacinas (Dicks et al., 2012), induzindo respostas de células T e anticorpos neutralizantes em camundongos transgênicos hDPP4 (Alharbi et al., 2017; Munster et al., 2017).

Nesse sentido, os modelos animais podem fornecer contribuições significativas para avaliar as vacinas, ajudando na compreensão do processo da doença e consequente desenvolvimento profilático e terapêutico (Dhama et al., 2020).

O conhecimento sobre a produção de vacina em modelos experimentais é particularmente importante uma vez que pode fornecer informações críticas para a concepção de uma vacina contra a COVID-19 e de outros coronavírus.

No presente estudo metanalítico, objetivou-se avaliar os principais modelos animais para testes na concepção de vacina contra a COVID-19, bem como os desfechos pré-clínicos dos estudos, por meio de uma metanálise.

2. Material e Métodos

2.1 Desenho do estudo

O presente estudo seguiu as regras do PRISMA (*preferred reporting items for systematic reviews and metanalysis*) (Moher et al., 2009). A Tabela 1 mostra as principais variáveis do presente estudo que foram abordadas de acordo com a classificação da sigla PICOS (*P=Participants; I=Intervention; C= Control; O=Outcomes; S=Study Design*).

Tabela 1. Quadro do PICOS (Participantes; Intervenção; Controle; Resultados e Modelo de estudo) utilizado no estudo.

PARTICIPANTES	Modelos animais
INTERVENTION (INTERVENÇÕES)	Testes de vacinas
CONTROL (CONTROLE)	Controle positivo (com vacinas) Controle negativo (sem vacinas)
OUTCOMES (DESFECHOS)	Conquista profilática ou imunidade terapêutica positiva e duradoura
STUDY DESIGN (DESENHOS DE ESTUDOS)	Estudos pré-clínicos em modelos animais (<i>in vivo</i>) Estudos pré-clínicos em modelos animais (<i>ex vivo</i>)

2.2 Critérios de elegibilidade dos estudos

Os critérios de inclusão foram estudos pré-clínicos, envolvendo testes de vacinas contra o SARS-CoV-2 em modelos animais *in vivo*, com pelo menos duas doses de vacina, publicados nos anos de 2020 a 2021. De forma específica, os critérios de inclusão foram estudos que abordaram os resultados da segurança e eficácia; imunogenicidade; estabilidade da resposta imune; anticorpos neutralizantes; produção de subtipos de anticorpos específicos e proteína Spike; sinais de toxicidade; perda de peso; análise microscópica (histopatologia) e análise macroscópica de órgãos e tecidos.

Os critérios de exclusão do presente estudo foram cartas ao editor, estudos de revisão e meta-análises.

2.3 Risco de Viés

A qualidade da evidência científica nos estudos abordados foi classificada como alta, moderada, baixa ou muito baixa, de acordo com o risco de viés de evidência, clareza das comparações, precisão e consistência nos efeitos do tratamento. Uma alta qualidade de evidência foi atribuída por meio de quatro critérios: 1) Ensaio pré-clínicos *in vivo* ou *in vitro* controlados, 2) Tamanho amostral maior que 30 animais, 3) Estudos com resultados bem elaborados estatisticamente, 4) Estudos publicados em jornais indexados e com fator de impacto.

A qualidade da evidência foi rebaixada para moderada caso um dos quatro critérios de qualidade da evidência não fora atendido, e mais baixa, se dois ou mais não forem atendidos. Uma baixa qualidade de evidência foi atribuída a estudos com resultados pouco conclusivos, conforme os critérios do *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* (GRADE) (Andrews et al., 2013). O Instrumento da Cochrane foi adotado para avaliar a qualidade dos estudos incluídos.

Os critérios adotados foram:

- Número de Animais (N): $N \leq 10$ e/ou Seguimento (S) ≤ 14 dias = 25%;
- Número de Animais: $10 < N < 20$ e/ou Seguimento $14 \leq S \leq 28$ dias = 50%;
- Número de Animais: $N \geq 20$ e/ou Seguimento ≥ 28 dias = acima de 50%;

O grau em porcentagem de confiança e recomendação dos achados foi baseada no número de animais e tempo de seguimento. Assim, os Critérios de Confiança foram: Número de Animais (N): $N \leq 10$ e/ou Seguimento (S) ≤ 14 dias = 25%; Número de Animais: $10 < N < 20$ e/ou Seguimento $14 \leq S \leq 28$ dias = 50%, e Número de Animais: $N \geq 20$ e/ou Seguimento ≥ 28 dias = acima de 50% (de acordo com o desenho do estudo, se usou

placebo e randomização (>15%), variedade de animais no mesmo estudo (>15%), descrição reprodutível da fabricação da vacina (>10%), utilização de fármacos coadjuvantes divididos em grupos com e sem fármacos (>10%).

2.4 Fontes de dados e estratégia de pesquisa

As estratégias de busca para o presente estudo foram baseadas nas palavras-chave (MeSH Terms) “*Animal models; Pre-clinical studies; Vaccines; Immunization; SARS-CoV- 2; COVID-19*”. A pesquisa foi desenvolvida nas bases das plataformas SCOPUS, PubMed, Embase, OVID, Cochrane, Science Direct, LILACS e EBSCO.

2.5 Análise estatística

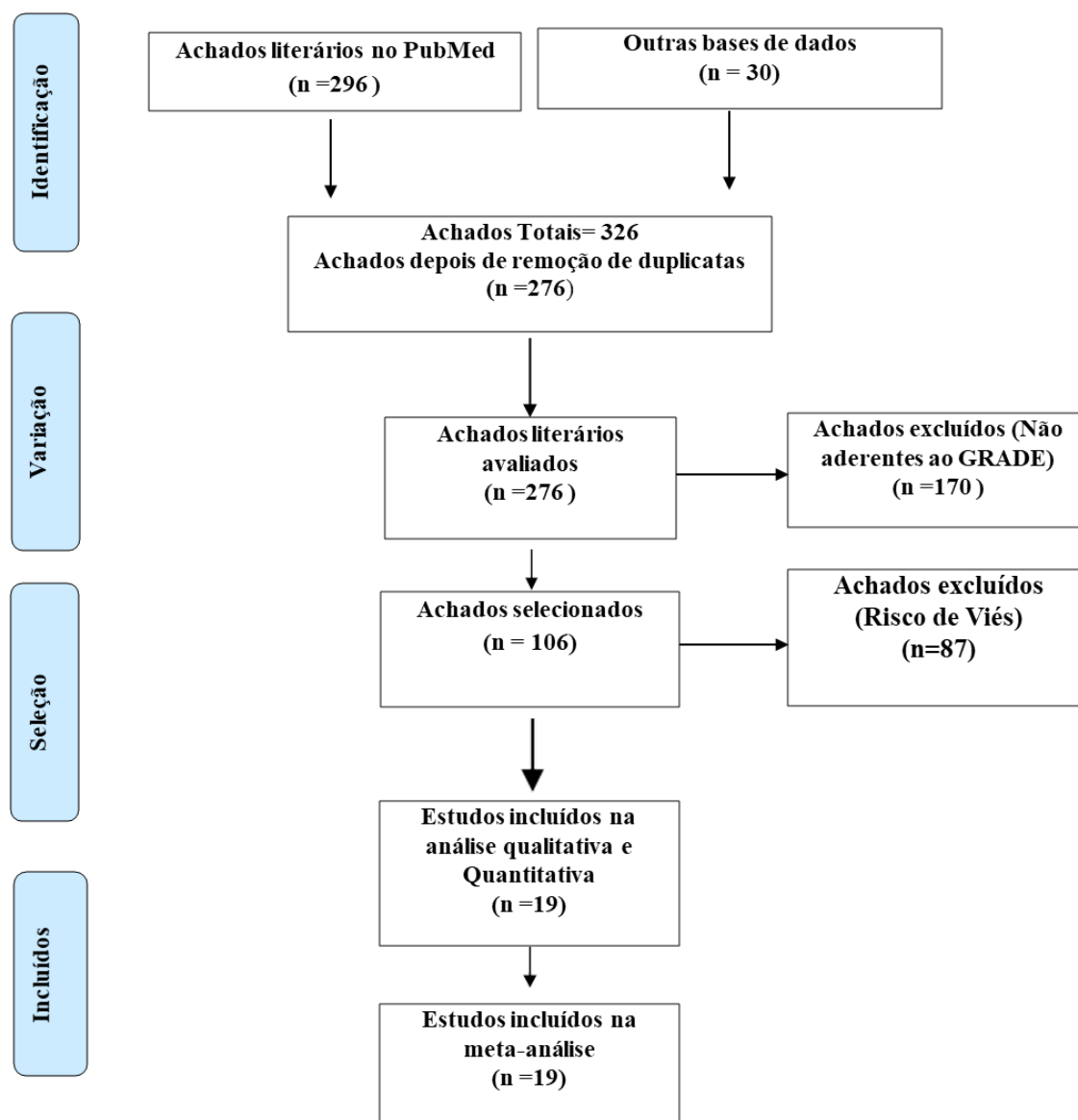
Para análise dos dados, um banco de dados foi construído na planilha do Microsoft Excel, posteriormente exportada para o programa estatístico Minitab 18® (version 18, Minitab, LLC, State College, Pennsylvania, USA) (Minitab®) e OriginPro® 9 (DPR Group, Inc., Northampton, Massachusetts, USA) (Moberly, Bernards, Waynant, 2018). Realizou-se análise estatística descritiva comum, obtendo-se os valores de N total, média, desvio-padrão, intervalo de confiança (IC-95%) e porcentagem (frequência) para todos as variáveis. O valor de R-sq (I^2) foi analisado para avaliar a imprecisão ou heterogeneidade das análises, sendo adotados os códigos de baixa associação $\leq 25\%$, média associação $25\% < X < 50\%$ e elevada associação $\geq 50\%$. As análises seguiram o Teste Qui-quadrado de Pearson, com $p < 0,05$ com significância estatística de associação, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Foram aplicados o teste ANOVA e o Teste de Tukey, adotando-se nível α menor que 0,05 com diferença estatística significativa para o IC 95%.

3. Resultados

3.1 Resumo dos achados literários

Após o processo detalhado de busca literária e a utilização de filtros de busca (PICOS) e dos MeSH Terms, conforme foram destacados nas Tabelas 1 e 2, o presente estudo encontrou dezenove ($n = 19$) importantes estudos pré-clínicos de testes de vacinas em modelos animais de 2020 a 2021 do total de 326 estudos avaliados, de acordo com os critérios de elegibilidade do presente estudo (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma e elegibilidade dos estudos para realização de metanálise dos desfechos pré-clínicos em modelos animais na elaboração de vacinas contra COVID-19.



3.2 Principais Resultados

Os estudos avaliados apresentaram alta qualidade de evidência científica nos estudos abordados, com grau médio de confiança e recomendação de 75%. Ainda, os estudos analisados apresentaram elevada homogeneidade nos resultados, apresentando 98,95% (I2) em relação àqueles com maior tamanho amostral (maior precisão).

Um quadro suplementar (final texto) apresenta dados gerais dos dezenove estudos selecionados, considerando-se apenas estudos que realizaram pelo menos duas aplicações de vacinas, e ainda, o número de animais, presença de grupo controle e randomização. O tempo de seguimento foram considerados relevantes para

determinação do grau de confiança e recomendação das vacinas analisadas em cada estudo.

A tabela 2 observa-se os resultados sobre a segurança e a eficácia do uso das vacinas apresentados pelos estudos do presente trabalho, bem como a correlação entre o uso da vacina e controle, valores do *Effect Size* (tamanho do efeito entre o grupo teste e controle), e tamanho amostral ($1/Standard\ Error$) para determinação do risco de viés.

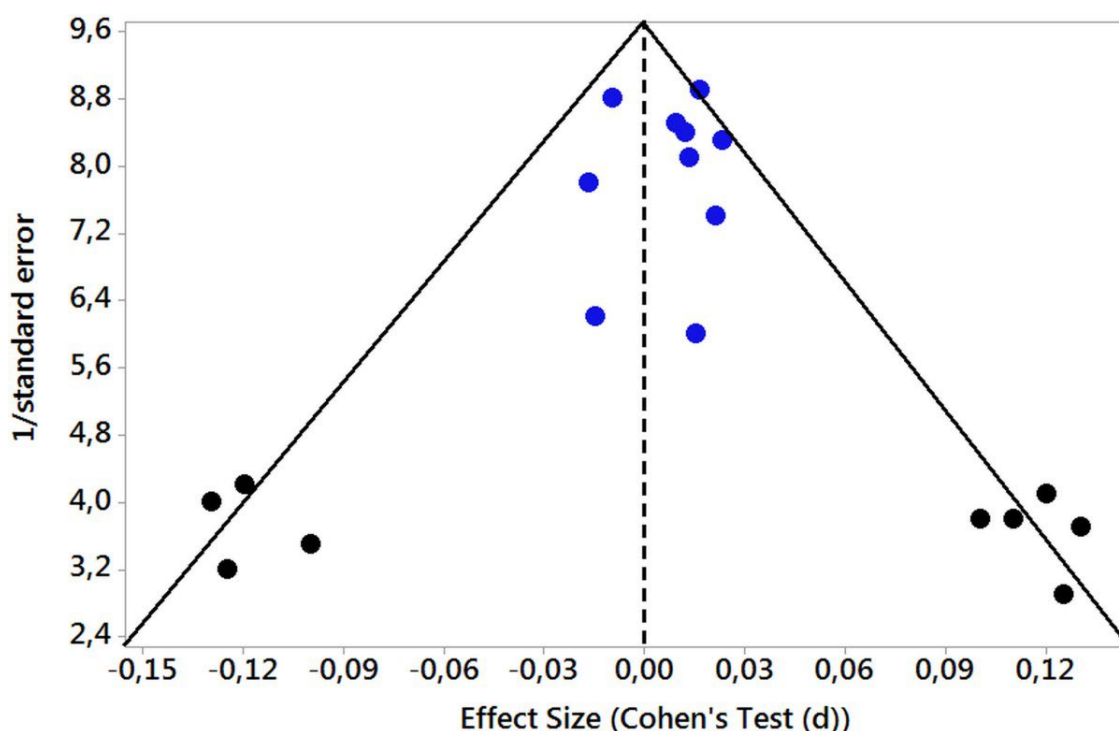
Tabela 2. Resultados sobre segurança e eficácia do uso dos diversos tipos de vacinas em nível pré-clínico em modelos animais.

<i>Autores/Ano</i>	<i>Vacina segura e eficaz</i>	<i>p-value</i>	<i>Effect Size</i>	<i>1/Standard Error</i>
n=19 estudos	Grupo Teste Vs. Controle		Teste de Cohen (d)	Precisão e Tamanho amostral
1. Bao et al., 2020	1	>0.05	0,05	4,5
2. Kalnin et al., 2021	1	>0.05	-0,02	7,6
3. Wang et al., 2020	1	>0.05	0,08	5,7
4. Sun et al., 2020	1	>0.05	-0,07	4,0
5. Lu et al., 2021	1	>0.05	0,70	2,4
6. Vogel et al., 2021	1	>0.05	0,55	2,9
7. Li et al., 2021	1	>0.05	0,26	3,3
8. Kozlovskaya et al., 2021	1	>0.05	-0,60	1,4
9. Arunachalam et al., 2021	1	>0.05	0,06	7,9
10. Saunders et al., 2021	1	>0.05	0,21	5,0
11. Ragan et al., 2021	1	>0.05	0,35	2,9
12. Liang et al., 2021	1	>0.05	0,48	1,3
13. DiPiazza et al., 2021	1	>0.05	-0,21	1,2
14. Brouwer et al., 2021	1	>0.05	-0,12	5,2
15. Lien et al., 2021	1	>0.05	0,48	1,5
16. Dey et al., 2021	1	>0.05	-0,04	6,5
17. Geng et al., 2021	1	>0.05	0,05	4,7
18. Tran et al., 2021	1	>0.05	0,04	6,4
19. Tostanoski et al., 2021	1	>0.05	0,03	6,7

Legenda: Os códigos denotam 1=Sim e 0=Não. Realizou-se Correlação entre os grupos teste e controle em cada estudo, com o teste do Chi-Square method (χ^2), com $p<0,05$ sem diferença estatística significativa, no IC de 95%. Calculou-se o tamanho do efeito

(Magnitude da diferença) pelo Teste de Cohen (d). A precisão (tamanho da amostra) foi determinada indiretamente pelo inverso do erro-padrão (1/Standard Error).

Figura 2. Gráfico Funnel Plot Assimétrico.

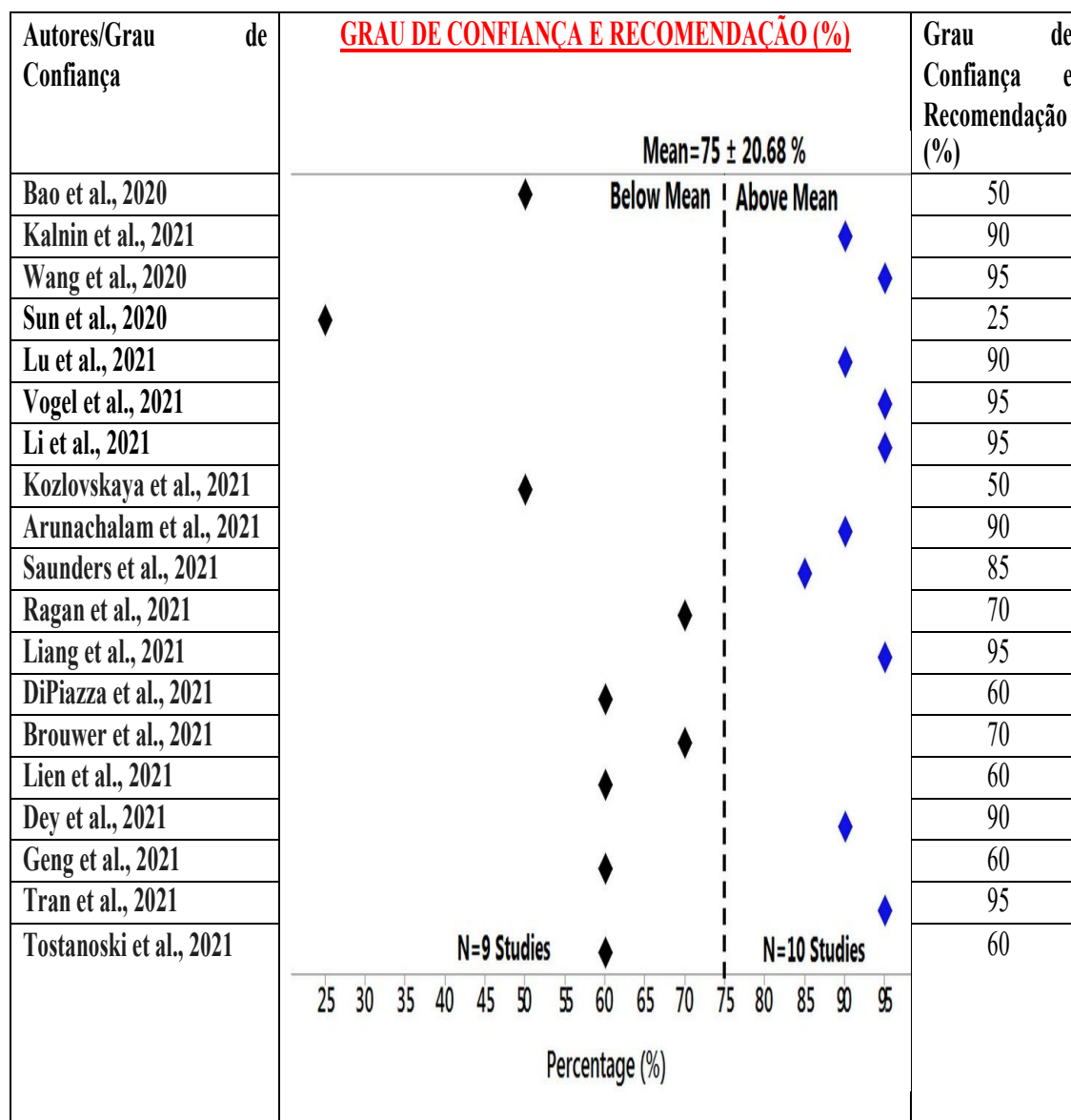


Legenda: estudos de pequeno tamanho amostral e com menor tempo de seguimento estão demonstrados na base do gráfico pelas bolas pretas. Os estudos de elevada confiança e recomendação são representados pelas bolas azuis acima do gráfico.

De acordo com o desenho do estudo, utilizou-se placebo e randomização (>15%), variedade de animais no mesmo estudo (>15%), descrição reprodutível da fabricação da vacina (>10%), utilização de fármacos coadjuvantes divididos em grupos com e sem fármacos (>10%). Critérios de Confiança foram: Número de Animais (N): $N \leq 10$ e/ou Seguimento (S) ≤ 14 dias = **25%**; Número de Animais: $10 < N < 20$ e/ou Seguimento $14 \leq S \leq 28$ dias = **50%**, e Número de Animais: $N \geq 20$ e/ou Seguimento ≥ 28 dias = acima de **50%** (de acordo com o desenho do estudo, se usou placebo e randomização (>15%), variedade de animais no mesmo estudo (>15%), descrição reprodutível da fabricação da vacina (>10%), utilização de fármacos coadjuvantes divididos em grupos com e sem fármacos (>10%)).

A figura 3 representa o gráfico modelo Forest Plot que mostra os artigos e autores selecionados e seus respectivos graus de confiança e recomendação.

Figura 3. Gráfico modelo Forest Plot.



241

242 Legenda: Apresentação dos artigos e autores selecionados e seus respectivos graus de confiança
243 e recomendação.

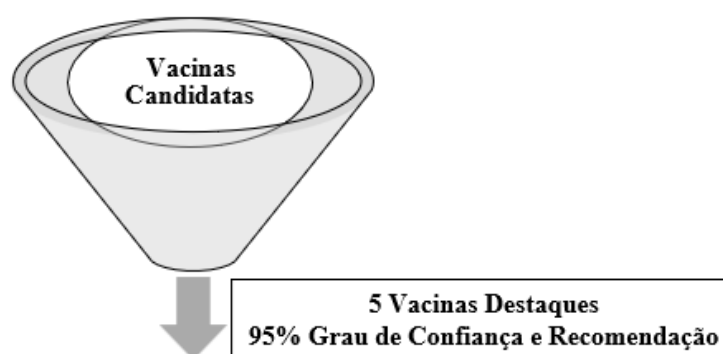
244

245 Foram verificados dez (n=10) estudos com grau de confiança e recomendação
246 acima da média geral (75±20,68%) representados pelos autores Kalnin et al., (2021),
247 Wang et al., (2020), Lu et al., (2021), Vogel et al., (2021), Li et al., (2021a),
248 Arunachalam et al., (2021), Saunders et al., (2021), Liang et al., (2021), Dey et al.,

(2021) e Tran et al., (2021), sendo que, entre esses, cinco estudos apresentaram grau de confiança e recomendação de 95%, sendo representados pelos autores Wang et al., (2020), Vogel et al., (2021), Li et al., (2021a), Liang et al., (2021) e Tran et al., (2021).

As vacinas utilizadas pelos autores que obtiveram 95% no grau de confiança e recomendação estão representadas na figura 4.

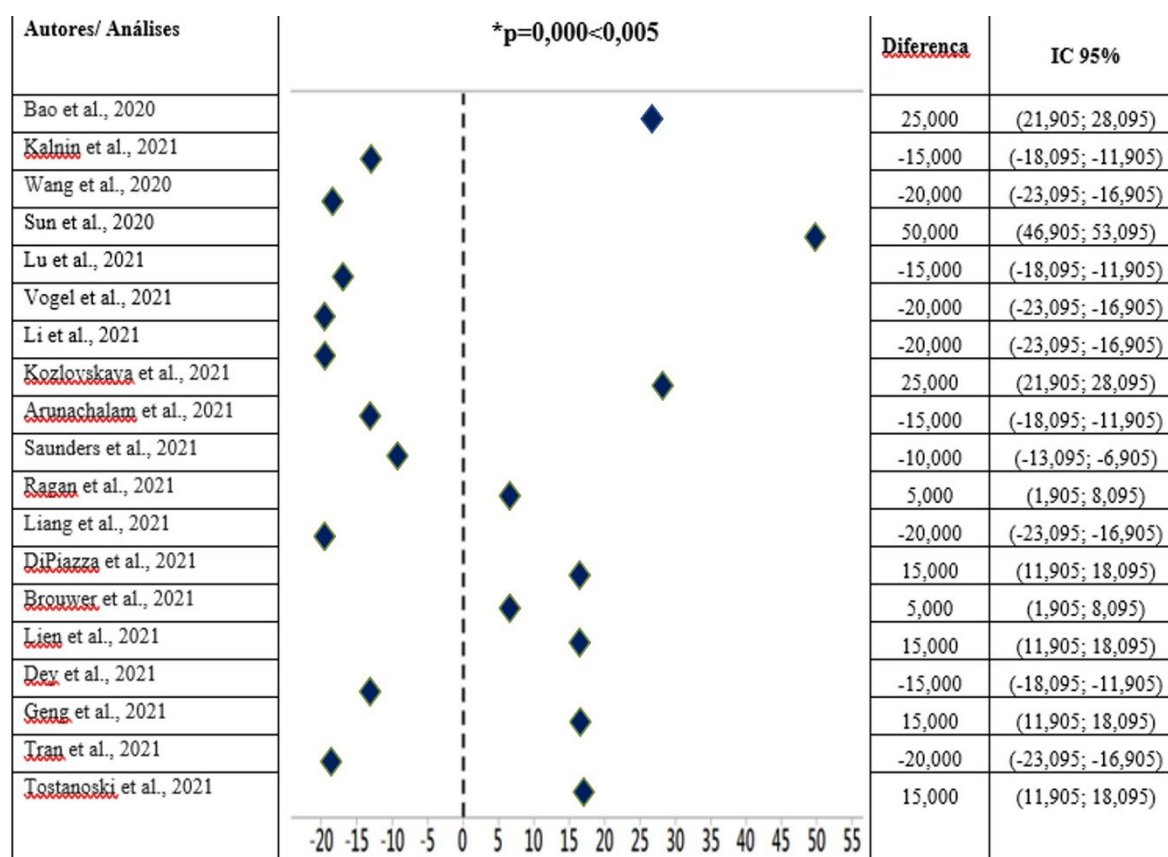
Figura 4. Esquema apresentando as vacinas destaques em modelo animal para posterior uso clínico.



- (1) Vacina inativada para SARS-CoV-2 por β -propio-lactona;
- (2) Vacinas BNT162b1 e BNT162b2 que contêm RNA mensageiro modificado por nucleosídeos com nanopartículas lipídicas;
- (3) Combinação de uma vacina de DNA que codifica a proteína Spike (S) de comprimento total do SARS-CoV-2 e uma vacina de proteína S1 recombinante;
- (4) Vacina S-Trimer, com subunidade trimérica nativa (tecnologia Trimer-Tag), tanto com AS03 (emulsão de óleo em água) quanto com CpG 1018 (agonista de TLR9) mais adjuvantes de alumínio e vacina SARS-CoV-2;
- (5) Nanocovax, com base na produção de proteína recombinante da porção extracelular (solúvel) da proteína spike (S).

A figura 5 mostra o gráfico Forest Plot com os resultados da ANOVA que analisou a diferença entre o grau de confiança de cada estudo e a média geral ($75 \pm 20,68$ %). Os resultados mostraram que o p-value, $p=0,000 < 0,005$, apresentou o mesmo valor para todas as análises, evidenciando que os resultados do grau de confiança e recomendação de cada estudo são estatisticamente diferentes em relação ao valor médio, o que confirma as diferenças entre os estudos em relação ao risco de viés do tamanho amostral (número de animais) e seguimento.

Figura 5. Gráfico Forest Plot com os resultados da análise de Tukey (ANOVA).



Legenda: Analisou-se a diferença entre o grau de confiança de cada estudo e a média geral ($75 \pm 20,68$ %), com $p > 0.05$ sem diferença estatística significativa (IC 95%), assumindo igualdade de variâncias. *O p-value apresentou o mesmo valor para todas as análises.

4. Discussão

4.1 Modelos animais

Em fevereiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um painel internacional para desenvolver modelos animais para COVID-19 para acelerar os testes de vacinas e agentes terapêuticos. A presente metanálise mostrou que os modelos animais são importantes para o desenvolvimento de vacinas para COVID-19, especialmente os modelos murinos.

As alternativas animais para estudar vírus respiratórios envolveram abordagens *in vitro*, como linhas celulares, por exemplo, células Vero, A549, MDCK ou células humanas derivadas de tecidos primários (Muñoz-Fontela et al., 2020). Nesse cenário, e com base nos resultados de metanálise do presente estudo, pode-se observar que ainda existem poucos estudos que evidenciem resultados oriundos de um planejamento metodológico e respaldado com números de animais acima de $n=100$, tempo de seguimento acima de 12 meses, variedades de animais em um mesmo estudo (com foco em primatas não humanos) e com modelos animais apresentando comorbidades como diabetes, hipertensão, obesidade e síndromes metabólicas que podem ser potencializadas ou potencializar as vacinas ou a COVID-19.

Apesar disso, o presente estudo conseguiu apontar, os dez estudos destaques com grau de confiança e recomendação que variaram de 85% a 95%, ou seja, as vacinas que apresentaram nos modelos animais as possíveis chances de sucesso em estudos clínicos, dessas dez vacinas, cinco apresentaram 95% de grau de confiança e recomendação, sendo que a maioria dessas vacinas foram oriundas de protocolos tecnológicos de fabricação. Essas cinco principais vacinas foram elencadas como (1) vacina inativada para SARS-CoV-2 por β -propio-lactona, (2) vacinas BNT162b1 e BNT162b2 que contêm RNA mensageiro modificado por nucleosídeos com nanopartículas lipídicas, (3) combinação de uma vacina de DNA que codifica a proteína Spike (S) de comprimento total do SARS-CoV-2 e uma vacina de proteína S1 recombinante, (4) vacina S-Trimer, com subunidade trimérica nativa (tecnologia Trimer-Tag), tanto com AS03 (emulsão de óleo em água) quanto com CpG 1018 (agonista de TLR9) mais adjuvantes de alumínio e vacina SARS-CoV-2, (5) Nanocovax, com base na produção de proteína recombinante da porção extracelular (solúvel) da proteína spike (S).

No presente estudo, os resultados mostraram que o p-value apresentou o mesmo valor para todas as análises em relação a análise da diferença de cada valor de grau de confiança e o valor médio geral, com $p=0,000<0,005$, evidenciando que os resultados do grau de confiança e recomendação de cada estudo são estatisticamente diferentes em relação ao valor médio geral ($75\pm 20,68\%$), o que confirma as diferenças entre os estudos em relação ao risco de viés do tamanho amostral e seguimento.

Evidenciou-se que a segurança e eficácia é determinada pelo número de animais envolvidos, utilização de grupo controle randomizado e o tempo de seguimento em um estudo, pois os dez principais estudos apresentados neste estudo foram estatisticamente

melhores em suas respostas de evidência científica. Entretanto, os modelos animais validados representam importantes ferramentas na tradução de vacinas candidatas pois permitem a compreensão da biologia da doença e os requisitos para o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes. A validação de modelos animais é com base nos critérios que os modelos animais representam os humanos em termos de (i) biologia de doença e sintomas clínicos comparáveis, ou seja, validade de face, (ii) exibindo intervenções clínicas, que exibem efeito biológico semelhante, ou seja, validade preditiva e (iii) função análoga do alvo terapêutico, isto é, alvo validade (Belzung; Lemoine, 2011). Um modelo animal ideal é imunocompetente e reproduz as características típicas de doenças humanas tão próximas quanto possível ao receber uma dose bio-relevante de vírus de desafio por uma via de inoculação apropriada (Safronetz et al., 2013).

Em camundongos, o SARS-CoV é capaz de interagir com ECA2 murino e replicar em tecidos de camundongo, incluindo os pulmões e o intestino delgado (Glass et al., 2004), mas os sintomas da doença são limitados a doença respiratória leve e perda de peso corporal mínima que é inferior a 5%. Camundongos idosos apresentam um número relativamente maior de sintomas graves do que camundongos jovens (Frieman et al., 2012; Roberts et al., 2005; Zhao et al., 2011). Para melhorar a disponibilidade de um modelo de SARS murino, foram desenvolvidas cepas de SARS-CoV adaptadas a camundongos (Roberts et al., 2007) e camundongos transgênicos que expressam ECA2 humano (hECA2) (Yang et al., 2007; McCray et al., 2007).

Os modelos baseados em ratos, que são fáceis de criar e manusear, frequentemente representam os modelos animais de escolha na área biomédica pesquisa e modelos murinos seriam relevantes para COVID-19 pesquisa de vacinas. No entanto, os camundongos de tipo selvagem são resistentes à infecção por SARSCoV-2 porque o ECA2 murino é significativamente diferente do receptor humano. No entanto, camundongos heterozigotos geneticamente modificados que expressam tanto o murino quanto o humano. O receptor ECA2 foi desenvolvido e usado para o teste de novas vacinas candidatas durante o surto de SARS-CoV (McCray et al., 2007).

Em comparação com os camundongos do tipo selvagem que apresentam apenas sintomas leves, camundongos transgênicos que expressam o receptor ECA2 humano desenvolvem doença clínica após infecção por SARS-CoV-2, incluindo peso perda e pneumonia intersticial, e os antígenos virais foram detectados em suas células epiteliais brônquicas, macrófagos alveolares, e células epiteliais alveolares (Bao et al., 2020). No entanto, a expressão do receptor ECA2 humano em camundongos transgênicos não é

fisiológico, e camundongos transgênicos atualmente não estão prontamente disponíveis para teste de candidatos à vacina SARS-CoV-2. Camundongos knockout ECA2 têm sido usados em pesquisas sobre ARDS e SARS, e também podem ser úteis para estudar SDRA associada a COVID-19 (Imai et al., 2005).

Adaptação de SARS-CoV por passagem nos pulmões de camundongos BALB/c resultou em um vírus (MA15) que foi letal para camundongos jovens após inoculação intranasal e foi precedido por alto título viral nos pulmões, viremia, e disseminação do vírus para outros órgãos sistêmicos (Roberts et al., 2007). Com a disponibilidade de isolados de SARS-CoV-2 adaptados a camundongos, é esperado que os ratos consanguíneos podem ser úteis para estudar a doença e avaliar novas vacinas candidatas e drogas antivirais. Camundongos jovens consanguíneos, por exemplo das cepas BALB/c, C57BL/6 e 129S6, suporte a replicação SARS-CoV, mas sem o desenvolvimento de doença, e essas cepas podem ser úteis para avaliar respostas à infecção COVID-19 e vacinas (Day et al., 2009).

Por outro lado, camundongos BALB/c velhos (12-14 meses) exibem pneumonia intersticial irregular após infecção por SARS-CoV, portanto, podem ser usados para a pesquisa COVID-19, especialmente para modelar os dados relacionados a maior mortalidade em pacientes idosos. Camundongos C57BL/6 e 129S6 senis também podem ser usados para esses estudos, mas exibem viremia mais baixa, em comparação com camundongos BALB/c, após infecção por SARS (Roberts et al., 2005). Os furões têm sido amplamente usados como modelo para estudar vários vírus respiratórios. A replicação viral foi detectada no trato respiratório superior e inferior de furões após infecção com influenza e SARS-CoV (Zhang et al., 2013).

O hamster sírio dourado é outro modelo animal amplamente utilizado, que suporta a replicação de SARS-CoV, mas não MERS-CoV, que usa a proteína dipeptidil peptidase-4 para entrada viral. Hamsters sírios dourados representam um modelo animal adequado para infecção por SARS-CoV-2, em virtude da replicação viral eficiente que ocorre na parte superior e células epiteliais respiratórias inferiores, os animais apresentam aparente sinais clínicos acompanhados de perda de peso e altos títulos virais são encontrados nos pulmões e no intestino (de Wit et al., 2013; Chan et al., 2020).

Além disso, a infecção por SARSCoV-2 em hamsters sírios dourados não apenas satisfaz os postulados de Koch: ((I) o patógeno deve estar presente em cada caso da doença, (II) o patógeno deve ser isolado do hospedeiro doente e cultivado em cultura

pura, (III) a doença específica deve ser reproduzido quando uma cultura pura do patógeno é inoculado em um hospedeiro saudável suscetível, e (IV) o patógeno deve ser recuperável do hospedeiro experimentalmente infectado), mas também indica transmissão de vírus entre hamsters desafiados e hamsters de contato ingênuos alojados nas mesmas gaiolas (Chan et al., 2020).

As diferenças na suscetibilidade de camundongos e hamsters sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 esteja relacionada ao fato que em camundongos, 11 dos 29 aminoácidos presentes nas regiões de contato do pico de SARSCoV-2 de ECA2 diferem em humanos em comparação com apenas quatro aminoácidos no hamster ECA2 (Chan et al., 2020). No entanto, em contraste com os grandes modelos animais e camundongos transgênicos ECA2, o modelo de hamster sírio dourado é facilmente disponível, fisiologicamente relevante e reflete de perto a infecção por COVID-19, representando uma ferramenta útil para estudar a patogênese, tratamento e vacinas para COVID-19.

Nesse cenário, os primatas não humanos (PNH) muitas vezes representam o último estágio de teste em animais antes que qualquer medicamento ou vacina candidata possa entrar em ensaios clínicos. PNH são os guardiões dos ensaios clínicos devido à sua estreita relação genética com os humanos. Entre o PNH, africanos verdes, macacos rhesus, macacos *cynomolgus*, e saguis estão sendo estudados para infecção por SARS-CoV-2. Em um estudo incluindo oito macacos *cynomolgus*, quatro dos os macacos mais velhos excretaram vírus do nariz e da garganta sem quaisquer sinais clínicos após infecção por SARS-CoV-2. O vírus foi detectado em pneumócitos tipo I e II e em células ciliadas epiteliais da mucosa nasal, brônquica e bronquiolar (Rockx et al., 2020).

Em outro estudo, dois macacos rhesus que se recuperaram de infecção por SARS-CoV-2 foram reinfectados após a recuperação confirmada, mas eles não mostraram nenhum sinal de COVID-19 quatro semanas depois. Este achado sugere uma possível proteção após infecção natural ou vacinação contra COVID-19. Macacos rhesus mais velhos infectados com SARS-CoV-2 exibiram pneumonia intersticial mais grave do que macacos mais jovens (Yu et al., 2020). Esta diferença relacionada à idade na patogenicidade de SARS-CoV2 em PNH pode ser útil para avaliação de terapêutica e vacinas devido à estreita correlação com humanos. Em um recente estudo, macacos rhesus foram desafiados novamente com SARS-CoV-2 e exibiu uma redução de 5 log₁₀ nos títulos virais no lavado broncoalveolar e mucosa nasal, em comparação com a infecção primária, o que sugere que a infecção por SARS-CoV-2 induz imunidade protetora contra uma exposição subsequente. Esforços também estão em andamento

para desenvolver modelos de PNH que pode imitar as comorbidades em COVID- 19, por exemplo, hipertensão e diabetes (Frederiksen et al., 2020).

4.2 Tipos de vacinas

Nos últimos anos, uma grande variedade de novas plataformas de tecnologia de vacinas foram desenvolvidas, graças aos avanços principalmente em biologia molecular e vacinologia, cujas vacinas podem ser inativadas e atenuadas para a entrega de antígenos peptídicos sintéticos e antígenos de proteína produzidos de forma recombinante, bem como partículas semelhantes a vírus (PSV), vírus não replicantes, vetores replicantes, conjugados de polissacarídeo-proteína e vacinas baseadas em ácido nucléico (DNA e RNA) (Delany et al., 2014; Rappuoli et al., 2018). Isso aumenta a diversidade e as chances de desenvolvimento de vacinas candidatas (Frederiksen et al., 2020).

Ainda, em relação à vacina de vírus vivo atenuado, esta é composta de quase todas as proteínas do vírus, e as suas respostas imunológicas induzidas são mais semelhantes às da infecção viral real. No entanto, a modificação baseada na tecnologia de recombinação do gene alvo foi mais amplamente estudada em vacinas contra o coronavírus. (Lauring et al., 2010).

Entre as proteínas do coronavírus, E e nsp16 têm sido considerados os alvos mais potenciais devido a potencial associação com a virulência *in vivo* (DeDiego et al., 2011). A imunização de SARS-CoV mutante projetado sem a proteína E (rSARS-CoV- Δ E) forneceu imunidade protetora em camundongos transgênicos hECA2 e hamsters sírios dourados contra o desafio viral (Lamirande et al., 2008; Netland et al., 2010).

Já em relação às vacinas de vírus inteiro inativadas são preparadas por inativação do vírus cultivado por calor, ultravioleta (UV) ou produtos químicos, como formalina. Quando comparados a uma vacina de vírus vivo atenuado, eles podem ser produzidos de forma relativamente rápida e fácil com o surgimento de um vírus novo ou variante. Em estudos de vacina de coronavírus, a vacina de vírus inativada induziu anticorpos neutralizantes de alto título e respostas imunes mediadas por células. A imunização com SARS-CoV inativado com luz ultravioleta (Yang et al., 2007; McCray et al., 2007), formaldeído (McCray et al., 2007) e β -propiolactona induziu respostas de células T neutralizantes potentes de anticorpos e CD4 + e CD8 + em camundongos e coelhos (Takasuka et al., 2004; Kong et al., 2005; Spruth et al., 2006). Somado a isso,

as vacinas de proteína recombinante têm sido estudadas e avaliadas em termos de eficácia e segurança. A imunização foi alcançada com o domínio extracelular de comprimento total de proteínas S ou proteínas RBD fundidas com Fc (fração cristalizável) de anticorpos neutralizantes potentes induzidos por SARS-CoV em camundongos e/ou coelhos. Proteínas S ou RBD triméricas também induziram respostas imunes humorais e celulares e forneceram proteção contra infecção por SARS-CoV em hamsters (He et al., 2004; He et al., 2005; Bisht et al., 2005).

Em termos de SARS-CoV-2, Novavax (Gaithersburg, MD, EUA) vem desenvolvendo uma vacina de nanopartícula de pico na fase 1/2 do estágio clínico, e outras 50 instituições vêm trabalhando em vacinas de proteína recombinante com foco em proteínas S ou RBD em um período pré -estágio clínico (OMS, 2021).

Um dos avanços mais notáveis no estudo recente de vacinas de proteína recombinante é o projeto de uma forma de pré- fusão de antígenos de superfície viral com base na biologia estrutural. Os antígenos alvo expressos como uma forma de pré-fusão estável induziram respostas anticorpos neutralizantes mais potentes e de alta afinidade do que proteínas de tipo selvagem em vários modelos de doenças infecciosas (Valkenburg et al., 2016; Crank et al., 2019).

Ainda, as vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLP) são partículas nanométricas compostas de proteínas virais. Elas imitam a morfologia de uma partícula de vírus real, mas não se replicam devido à falta de material genômico. Como as VLP mantêm a conformação ideal dos antígenos nativos, elas podem desencadear uma resposta imune forte e apropriada (Kushnir et al., 2012).

Além disso, embora vacinas de DNA não tenham sido aprovadas para humanos, sua imunogenicidade e efeitos terapêuticos foram testados por muito tempo em vários ensaios clínicos para doenças infecciosas (Kushnir et al., 2012; Gary et al., 2020). Assim, as vacinas de DNA que expressam formas inteiras ou truncadas de imunidade humoral e celular induzida pela proteína SARS- CoV S mostrou fornecer proteção contra a infecção por SARS-CoV em modelos murinos (Yang et al., 2004; Hu et al., 2007). Além disso, a imunização primária-reforço heteróloga com vacinas de DNA e SARS-CoV inativado induziu respostas fortes de células T CD4+ e anticorpos (Zakhartchouk et al., 2005).

Também, em destaque, as vacinas de mRNA são caracterizadas pelo rápido desenvolvimento e produção com alta potência. Os métodos de encapsulamento e entrega foram substancialmente melhorados. O uso de moléculas transportadoras, como

lipossomas, polímeros catiônicos e partículas de polissacarídeo, aumenta significativamente a eficácia de entrega, permitindo a rápida absorção e alta expressão de antígenos alvo. Devido à segurança e eficácia, bem como produção em massa e imediata, as vacinas de mRNA estão sendo extensivamente avaliadas em várias doenças infecciosas e cânceres. No entanto, nenhum resultado notável foi relatado nos estudos das vacinas SARS (Pardi et al., 2018). Ainda nesse cenário, mas em relação às vacinas de vetores virais, o vetor adenoviral com defeito de replicação que expressa as proteínas S e N de SARS-CoV induziu respostas imunes humorais e celulares em camundongos. Para evitar imunidade pré-existente contra o adenovírus humano, o adenovírus de chimpanzé (ChAdOx1) foi utilizado no desenvolvimento recente de vacinas (Dicks et al., 2012).

Por fim, os modelos animais, incluindo camundongos, hamsters dourados, furões, primatas não humanos e outros animais suscetíveis estão envolvidos nos estudos da COVID-19. Além disso, 117 vacinas candidatas entraram em ensaios clínicos após a avaliação primária em modelos animais, das quais vacinas inativadas, vacinas de subunidades, vacinas com vetor de vírus e vacinas de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) são candidatas a vacinas promissoras (Wang et al., 2021).

Apesar da literatura apresentar cerca de 23 vacinas em fase de avaliação clínica e pelo menos 140 vacinas candidatas em avaliação pré-clínica (Li et al., 2021a,b), o presente estudo evidenciou a segurança e eficácia, por meio do grau de confiança e recomendação em dezenove (19) estudos em modelos animais, sendo que desses, dez estudos apontaram apresentar maiores chances de evoluírem nos estudos clínicos e comercialização.

Uma das principais limitações do presente estudo foi a delimitação do período de busca para os estudos, uma vez que a quantidade de artigos publicados sobre o tema COVID-19 resultou na impossibilidade de atualização dos dados. Dessa forma, o nosso estudo foi delimitado até a busca de artigos publicado até dezembro de 2021.

O presente estudo metanalítico apresenta dados que suportam a importância dos animais para os estudos pré-clínico para o desenvolvimento de vacinas contra COVID-19. Evidenciou-se ainda que a segurança e eficácia da vacina é determinada pelo número de animais envolvidos, utilização de grupo controle randomizado e o tempo de seguimento dos estudos.

Referências

- 523 Alharbi NK, Padron-Regalado E, Thompson CP, Kupke A, Wells D, Sloan MA, et al.
 524 ChAdOx1 and MVA based vaccine candidates against MERS-CoV elicit neutralising
 525 antibodies and cellular immune responses in mice. *Vaccine* 2017; 35:3780-3788.
- 526 Andrews JC, Schunemann HJ, Oxman AD, Pottie K, Meerpohl JJ, Coello PA, et al.
 527 GRADE guidelines: 15. Going from evidence to recommendation-determinants of a
 528 recommendation's direction and strength. *J Clin Epidemiol.* 2013; 66: 726-35.
- 529 Arunachalam PS, Walls AC, Golden N, Atyeo C, Fischinger S, Li C, et al. Adjuvanting a
 530 subunit COVID-19 vaccine to induce protective immunity. *Nature.* 2021; 594 (7862):
 531 253-8.
- 532 Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, et al. The pathogenicity of SARS-
 533 CoV-2 in hECA2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830-3.
- 534 Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders:
 535 focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2011; 1:9.
- 536 Bisht H, Roberts A, Vogel L, Subbarao K, Moss B. Neutralizing antibody and protective
 537 immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant
 538 polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein. *Virology.*
 539 2005; 334:160-5.
- 540 Brouwer PJM, Brinkkemper M, Maisonnasse P, Dereuddre-Bosquet N, Grobben M,
 541 Claireaux M, et al. Two-component spike nanoparticle vaccine protects macaques from
 542 SARS-CoV-2 infection. *Cell.* 2021;184(5):1188-1200.e19.
- 543 Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, et al. Simulation of the
 544 clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in
 545 golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and
 546 transmissibility. *Clin Infect Dis.* 2020; doi: 10.1093/cid/ciaa325.
- 547 Choi YJ, Hur SY, Kim TJ, Hong SR, Lee JK, Cho CH, et al. A phase II, prospective,
 548 randomized, multicenter, open-label study of GX-188E, an HPV DNA vaccine, in
 549 patients with cervical intraepithelial neoplasia 3. *Clin Cancer Res.* 2020; 26:1616-23.
- 550 Chung JY, Thone MN, Kwon YJ. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in

- 551 delivery points of view. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021; 170:1-25. doi:
552 10.1016/j.addr.2020.12.011.
- 553 Chunling M, Kun Y, Jian X, Jian Q, Hua S, Minsheng Z. Enhanced induction of SARS-
554 CoV nucleocapsid protein-specific immune response using DNA vaccination followed
555 by adenovirus boosting in BALB/c mice. *Intervirology.* 2006; 49:307-8.
- 556 Crank MC, Ruckwardt TJ, Chen M, Morabito KM, Phung E, Costner PJ, et al. A proof
557 of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science.* 2019;
558 365:505-9.
- 559 Day CW, Baric R, Cai SX, Frieman M, Kumaki Y, Morrey JD, et al. A new mouse-
560 adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents *in vitro* and
561 *in vivo*. *Virology.* 2009; 395:210–22.
- 562 de Wit E, Prescott J, Baseler L, Bushmaker T, Thomas T, Lackemeyer MG, et al. The
563 Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) does not replicate in Syrian
564 hamsters. *PLoS ONE.* 2013;8: e69127.
- 565 DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jiménez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Alvarez E,
566 Oliveros JC, et al.. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein
567 regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002315.
- 568 Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol*
569 *Med.* 2014; 6:708–20.
- 570 Dey A, Chozhavel Rajanathan TM, Chandra H, Pericherla HPR, Kumar S, Choonia HS,
571 et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-
572 2 in animal models. *Vaccine.* 2021; 39(30):4108-16.
- 573 Dhama K, Sharun K, Tiwari R, Dadar M, Malik YS, Singh KP, et al. COVID-19, an
574 emerging coronavirus infection: Advances and prospects in designing and developing
575 vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics. *Human Vacc Immunotherap.*
576 2020;16(6):1232–8.
- 577 Dicks MD, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, Gilbert SC, et al. A novel
578 chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for

- 579 vector derivation and comparative immunogenicity. PLoS One. 2012; 7: e40385.
- 580 DiPiazza AT, Leist SR, Abiona OM, Moliva JJ, Werner A, Minai M, et al. COVID-19
581 vaccine mRNA-1273 elicits a protective immune profile in mice that is not associated with
582 vaccine-enhanced disease upon SARS-CoV-2 challenge. Immunity. 2021;54(8):1869-
583 82.e6.
- 584 Frederiksen LSF, Zhang Y, Foged C, Thakur A. The Long Road Toward COVID-19
585 Herd Immunity: Vaccine platform technologies and mass immunization strategies. Front
586 Immunol. 2020; 11:1817.
- 587 Frieman M, Yount B, Agnihothram S, Page C, Donaldson E, Roberts A, et al.
588 Molecular determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis
589 and virulence in young and aged mouse models of human disease. J Virol. 2012;
590 86:884-97.
- 591 Gary EN, Weiner DB. DNA vaccines: prime time is now. Curr Opin Immunol. 2020;
592 65:21-7.
- 593 Geng Q, Tai W, Baxter VK, Shi J, Wan Y, Zhang X, et al. Novel virus-like nanoparticle
594 vaccine effectively protects animal model from SARS-CoV-2 infection. PLoS Pathog.
595 2021;17(9):e1009897.
- 596 Glass WG, Subbarao K, Murphy B, Murphy PM. Mechanisms of host defense
597 following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary
598 infection of mice. J Immunol. 2004; 173:4030-9.
- 599 Griffin S. Covid-19: Governments should demand transparency on vaccine deals, says
600 MSF. Brit Med J. 2020; 371:m4430. He Y, Lu H, Siddiqui P, Zhou Y, Jiang S. Receptor-
601 binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains
602 multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing
603 antibodies. J Immunol. 2005; 174:4908-15.
- 604 He Y, Zhou Y, Liu S, Kou Z, Li W, Farzan M, Jiang S. Receptor-binding domain of
605 SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for
606 developing subunit vaccine. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 324:773-81.

- 607 Higgins J, Green S. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions.
608 Version 5.1.0 (updated March 2011). The Cochrane Collaboration; 2011.
- 609 Hu H, Lu X, Tao L, Bai B, Zhang Z, Chen Y, et al. Induction of specific immune
610 responses by severe acute respiratory syndrome coronavirus spike DNA vaccine with or
611 without interleukin-2 immunization using different vaccination routes in mice. Clin
612 Vaccine Immunol. 2007; 14:894-901.
- 613 Hu H, Tao L, Wang Y, Chen L, Yang J, Wang H. Enhancing immune responses against
614 SARS-CoV nucleocapsid DNA vaccine by co-inoculating interleukin-2 expressing
615 vector in mice. Biotechnol Lett. 2009; 31:1685-93.
- 616 Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin converting enzyme
617 2 protects from severe acute lung failure. Nature. 2005;436:112–6.
- 618 Kalnin KV, Plitnik T, Kishko M, Zhang J, Zhang D, Beauvais A, et al. Immunogenicity
619 and efficacy of mRNA COVID-19 vaccine MRT5500 in preclinical animal models. NPJ
620 Vaccines. 2021 19;6(1):61.
- 621 Kong WP, Xu L, Stadler K, Ulmer JB, Abrignani S, Rappuoli R, et al. Modulation of
622 the immune response to the severe acute respiratory syndrome spike glycoprotein by
623 gene-based and inactivated virus immunization. J Virol. 2005; 79:13915-23.
- 624 Kozlovskaya LI, Piniaeva AN, Ignatyev GM, Gordeychuk IV, Volok VP, Rogova YV,
625 et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated
626 vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. Emerg Microbes Infect.
627 2021;10(1):1790-806.
- 628 Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine
629 platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical
630 development. Vaccine 2012; 31:58-83.
- 631 Lamirande EW, DeDiego ML, Roberts A, Jackson JP, Alvarez E, Sheahan T. et al. A
632 live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and
633 efficacious in golden Syrian hamsters. J Virol. 2008; 82:7721-4.
- 634 Lauring AS, Jones JO, Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus

- 635 vaccines. *Nat Biotechnol* 2010; 28:573-9.
- 636 Li Y, Bi Y, Xiao H, Yao Y, Liu X, Hu Z, et al. A novel DNA and protein combination
637 COVID-19 vaccine formulation provides full protection against SARS-CoV-2 in rhesus
638 macaques. *Emerg Microbes Infect.* 2021a;10(1):342-55.
- 639 Li L, Guo P, Zhang X, Yu Z, Zhang W, Sun H. SARS-CoV-2 vaccine candidates in
640 rapid development. *Hum Vaccin Immunother.* 2021b;17(3):644-53.
- 641 Liang JG, Su D, Song TZ, Zeng Y, Huang W, Wu J, et al. S-Trimer, a COVID-19
642 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. *Nat*
643 *Commun.* 2021;12(1):1346.
- 644 Lien CE, Lin YJ, Chen C, Lian WC, Kuo TY, Campbell JD, et al. CpG-adjuvanted
645 stable prefusion SARS-CoV-2 spike protein protected hamsters from SARS-CoV-2
646 challenge. *Sci Rep.* 2021;11(1):8761.
- 647 Lu M, Dravid P, Zhang Y, Trivedi S, Li A, Harder O, Kc M, et al. A safe and highly
648 efficacious measles virus-based vaccine expressing SARS-CoV-2 stabilized prefusion
649 spike. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(12): e2026153118.
- 650 McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, Hickey M, Manzel L, et al. Lethal
651 infection of K18-hECA2 mice infected with severe acute respiratory syndrome
652 coronavirus. *J Virol.* 2007; 81:813–21.
- 653 Moberly JG, Bernards MT, Waynant KV. Key features and updates for origin 2018. *J*
654 *Cheminform.* 2018; 10(1):5.
- 655 Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. The PRISMA Group Preferred Reporting
656 Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PloS Med.*
657 2009;6(7):e1000097.
- 658 Muñoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SGP, Gsell PS, Riveros-Balta AX, Albrecht
659 RA, et al. Animal models for COVID-19. *Nature.* 2020;586(7830):509-5.
- 660 Munster VJ, Wells D, Lambe T, Wright D, Fischer RJ, Bushmaker T, et al. Protective
661 efficacy of a novel simian adenovirus vaccine against lethal MERS-CoV challenge in a

- transgenic human DPP4 mouse model. *NPJ Vaccines* 2017;2:28.
- Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, van Doremalen N, Pérez-Pérez L, Schulz, J., et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020. [https:// doi.org/10.1038/s41586-020-2324-7](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2324-7).
- Netland J, DeDiego ML, Zhao J, Fett C, Álvarez E, Nieto-Torres JL, et al.. Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology*. 2010; 399:120-8.
- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17:261-79.
- Ragan IK, Hartson LM, Dutt TS, Obregon-Henao A, Maison RM, Gordy P, et al. A Whole Virion Vaccine for COVID- 19 Produced via a Novel Inactivation Method and Preliminary Demonstration of Efficacy in an Animal Challenge Model. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(4):340.
- Rappuoli R, Santoni A, Mantovani A. Vaccines: an achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. *J Exp Med*. 2018; 216:7–9.
- Roberts A, Deming D, Paddock CD, Cheng A, Yount B, Vogel L, et al. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog*. 2007; 3:e5.
- Roberts A, Paddock C, Vogel L, Butler E, Zaki S, Subbarao K. Aged BALB/c mice as a model for increased severity of severe acute respiratory syndrome in elderly humans. *J Virol*. 2005; 79:5833-8.
- Rockx B, Kuiken T, Herfst S, Bestebroer T, Lamers MM, Oude Munnink BB, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 2020; 368:1012-5.
- Safronetz D, Geisbert TW, Feldmann H. Animal models for highly pathogenic emerging viruses. *Curr Opin Virol*. 2013; 3:205–9.
- Saunders KO, Lee E, Parks R, Martinez DR, Li D, Chen H, et al. Neutralizing antibody

- 689 vaccine for pandemic and pre-emergent coronaviruses. *Nature*. 2021;594(7864):553-9.
- 690 Spruth M, Kistner O, Savidis-Dacho H, Hitter E, Crowe B, Gerencer M, et al. A double-
 691 inactivated whole virus candidate SARS coronavirus vaccine stimulates neutralising and
 692 protective antibody responses. *Vaccine*. 2006; 24:652-61.
- 693 Sun J, Zhuang Z, Zheng J, Li K, Wong RL, Liu D, et al. Generation of a Broadly Useful
 694 Model for COVID-19 Pathogenesis, Vaccination, and Treatment. *Cell*.
 695 2020;182(3):734-43.e5.
- 696 Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, et al. A
 697 subcutaneously injected UV- inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic
 698 humoral immunity in mice. *Int Immunol*. 2004; 16:1423-30.
- 699 Takayama K. In vitro and animal models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharm Sci*.
 700 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.005>.
- 701 Tiwari, R, Dhama, K, Sharun, K, Iqbal Yattoo, M, Malik, YS, Singh, R, et al.
 702 COVID-19: Animals, veterinary and zoonotic links. *Vet. Quart*. 2020; 40(1):169–82.
- 703 Tostanoski LH, Gralinski LE, Martinez DR, Schaefer A, Mahrokhian SH, Li Z, et al.
 704 Protective Efficacy of Rhesus Adenovirus COVID-19 Vaccines against Mouse-Adapted
 705 SARS-CoV-2. *J Virol*. 2021; 95(23): e0097421.
- 706 Tran TNM, May BP, Ung TT, Nguyen MK, Nguyen TTT, Dinh VL, et al. Preclinical
 707 Immune Response and Safety Evaluation of the Protein Subunit Vaccine Nanocovax for
 708 COVID-19. *Front Immunol*. 2021; 12:766112.
- 709 Valkenburg SA, Mallajosyula VV, Li OT, Chin AW, Carnell G, Temperton N, et al.
 710 Stalking influenza by vaccination with pre-fusion headless HA mini-stem. *Sci Rep*.
 711 2016; 6:22666.
- 712 Vogel AB, Kanevsky I, Che Y, Swanson KA, Muik A, Vormehr M, et al. BNT162b
 713 vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*. 2021; 592(7853):283-9.
- 714 Wang S, Li L, Yan F, Gao Y, Yang S, Xia X. COVID-19 Animal Models and Vaccines:
 715 Current Landscape and Future Prospects. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(10):1082.

- 716 Wang W, Tang J, Wei F Updated understanding of the outbreak of 2019 novel
717 coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *J Med Virol.* 2020;92(4):441–7.
- 718 Wang ZJ, Zhang HJ, Lu J, Xu KW, Peng C, Guo J, et al. Low toxicity and high
719 immunogenicity of an inactivated vaccine candidate against COVID-19 in different
720 animal models. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1):2606-18.
- 721 World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines
722 (Internet). Available at [https://www.who.int/who-documents-detail/draft- landscape-of-](https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines)
723 covid-19-candidate-vaccines (accessed on 22 June 2021).
- 724 Yang XH, Deng W, Tong Z, Liu YX, Zhang LF, Zhu H, et al. Mice transgenic for
725 human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus
726 infection. *Comp Med.* 2007; 57:450-9.
- 727 Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K, et al. A DNA
728 vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice.
729 *Nature.* 2004; 428:561-4.
- 730 Yu P, Qi F, Xu Y, Li F, Liu P, Liu J, et al. Age-related rhesus macaque models of
731 COVID-19. *Animal Model Exp Med.* 2020; 3:93-7.
- 732 Zakhartchouk AN, Liu Q, Petric M, Babiuk LA. Augmentation of immune responses to
733 SARS coronavirus by a combination of DNA and whole killed virus vaccines. *Vaccine*
734 2005; 23:4385-91.
- 735 Zhang Q, Shi J, Deng G, Guo J, Zeng X, He X, et al. H7N9 influenza viruses are
736 transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science.* 2013; 341:410–4.
- 737 Zhao J, Zhao J, Legge K, Perlman S. Age-related increases in PGD2 expression impair
738 respiratory DC migration, resulting in diminished T cell responses upon respiratory
739 virus infection in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121:4921-30.
- 740 Zhou J, Wang W, Zhong Q, Hou W, Yang Z, Xiao SY, et al. Immunogenicity, safety,
741 and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus
742 monkeys. *Vaccine.* 2005;23(24):3202-3209.

743 Dados suplementares 1. Resumo dos achados literários de 19 estudos selecionados com modelos
 744 animais para desenvolvimento de vacinas contra SARS-COV, com foco no tamanho das amostras
 745 (número de animais), variedade de animais em cada estudo e seguimento dos estudos.

Autores	Modelos Animais (n amostral)	Vacinas	Principais Resultados	Seguimento (dias)
Bao et al., 2020	Camundongos transgênicos hECA2 (n=19)	Vírus inativado	Perda de peso e replicação do vírus nos pulmões de camundongos hECA2 infectados com SARS-CoV-2. Histopatologia: pneumonia intersticial com infiltração de número considerável de macrófagos e linfócitos no interstício alveolar e acúmulo de macrófagos nas cavidades alveolares. Antígenos virais em células epiteliais brônquicas, macrófagos e epitélios alveolares. Achados não observados em camundongos do tipo selvagem infectados com SARS-CoV-2. Confirmação da patogenicidade do SARS-CoV-2 em camundongos.	14
Sun et al., 2020	Camundongos transduzidos com Ad5-hECA2	Plasma humano convalescente	Protocolo de infecção de camundongos transduzidos muito reprodutível. Altos níveis de replicação viral nos pulmões. Não houve letalidade, mas camundongos sensibilizados com Ad5-hECA2 úteis para avaliação de vacinas e terapias antivirais. Demonstração de papéis críticos para a sinalização de IFN-I e STAT1 e anticorpos específicos de vírus e células T na resposta do hospedeiro ao SARS-CoV-2. Eficácia do plasma convalescente derivado do paciente.	5
Wang et al., 2020	- camundongos Balb/c -ratos Sprague– Dawley - ratos Wistar -porquinhos-da-índia - coelhos brancos -macacos	Vacina inativada para SARS-CoV-2 por β-propio- lactona	Boa tolerância e estímulo de altos níveis de IgG específica e anticorpos neutralizantes. Baixa ou nenhuma toxicidade em três espécies de animais no estudo pré-clínico da vacina candidata. A vacina de	28

	Cynomolgus - macacos Rhesus		virion inteiro inativada foi caracterizada com dupla inativação segura, sem uso de DNases e alta pureza. Dosagens, tempos de reforço, adjuvantes e esquemas de imunização mostraram-se importantes para estimular uma forte resposta imune humoral nos animais testados.	
Arunachalam et al., 2021	- macacos Rhesus	Vacina de subunidade com nanopartículas de proteína I53-50 (RBD-NP)	A imunização com RBD-NP com AS03, CpG1018-alum, emulsão de esqualeno em água (AS37) e uma emulsão óleo-em-água contendo α -tocoferol (AS37) induziram respostas substanciais de anticorpos neutralizantes e células T CD4 e conferiu proteção contra a infecção por SARS-CoV-2 nas faringes, narinas e lavado broncoalveolar. A resposta do anticorpo neutralizante ao vírus vivo foi mantida até 180 dias após a vacinação com RBD-NP em AS03 (RBD-NP-AS03), e correlacionada com a proteção contra infecção. A imunização RBD-NP neutralizou de forma cruzada a variante B.1.1.7 SARS-CoV-2 de forma eficiente, mas mostrou uma resposta reduzida contra a variante B.1.351. Porém, mostrou resposta reduzida contra a variante B.1.351. RBD-NP-AS03 produziu uma redução de 4,5 vezes na neutralização de B.1.351 enquanto o grupo imunizado com RBD-NP-AS37 produziu uma redução de 16 vezes na neutralização de B.1.351.	180
Brouwer et al., 2021	- camundongos (n=8) - coelhos (n=8) - macacos Cynomolgus (n=10)	Vacina de nanopartículas baseada em proteínas de dois componentes que exibem cópias da spike	Os resultados de imunização mostraram que esta vacina induz potentes respostas de anticorpos neutralizantes em camundongos, coelhos e macacos <i>Cynomolgus</i> . A imunidade induzida pela	21

		(SARS-CoV-2 S-I53- 50NP)	vacina protege os macacos contra um desafio de alta dose, resultando em infecção viral fortemente reduzida e replicação nas vias aéreas superiores e inferiores.	
Dey et al., 2021	- camundongos BALB/C - coelhos - porquinhos-da-índia	Vacina ZyCoV-D composta por um vetor de plasmídeo de DNACarregando o gene que codifica a proteína spike (S) do vírus SARS-CoV-2	O estudo demonstrou que a vacina de DNA induziu uma resposta de anticorpos, incluindo anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 e também provocou resposta Th-1, conforme evidenciado por níveis elevados de IFN- γ .	126
DiPiazza et al., 2021	Camundongos (n = 40)	Vacina de proteína spike desnaturada por calor (S- 2P), ou mRNA-1273	A vacina mRNA-1273 induziu anticorpos neutralizantes potentes e resposta balanceada ou assimétrica do tipo 1, particularmente na dose de 1 μ g, e os camundongos foram protegidos da replicação viral e inflamação pulmonar após o desafio viral. É importante ressaltar que uma dose de mRNA subprotetora de 0,1 μ g foi associada à imunopatologia reduzida após o desafio em comparação com os grupos controle e Th2-skewing. Esses resultados demonstram que o mRNA-1273 induz uma potente imunidade antiviral e um perfil imunológico favorável não associado à doença respiratória aumentada associada à vacina, mesmo em doses subprotetoras	14
Geng et al., 2021	Camundongos (n=25)	Vacina nanopartículas semelhantes a vírus (VLP) que exibe 120 cópias do SARS-CoV-2 RBD em sua superfície (VLP-RBD)	Em comparação com a vacina RBD, a vacina VLP-RBD induziu cinco vezes mais anticorpos neutralizantes em camundongos que bloquearam eficientemente o SARS-CoV-2 de se ligar ao seu receptor hospedeiro e neutralizou potentemente a entrada celular de cepas	60

			variantes de SARS- CoV-2, SARS- CoV-1 e coronavírus de morcego relacionado ao SARS-CoV-1. Essas respostas imunes neutralizantes induzidas pela vacina VLP-RBD não diminuíram durante o período de estudo de dois meses. Além disso, a vacina VLP- RBD protegeu efetivamente os camundongos do desafio SARS-CoV-2, reduzindo drasticamente o desenvolvimento de sinais clínicos e alterações patológicas em camundongos imunizados.	
Kalnin et al., 2021	- camundongos (n=10) - macacos Cynomolgus (n=10) - hamsters dourado sírio (n=88)	Vacina de mRNA com base na glicoproteína spike (S) (MRT5500)	Indução de ACs neutralizantes potentes conforme medido em ensaios de neutralização em todos os três modelos pré-clínicos. Proteção contra perda de peso induzida por SARS-CoV-2 e patologia pulmonar em hamsters. Respostas com viés de Th1 em camundongos e primatas não humanos (PNH), reduzindo possíveis doenças respiratórias associadas a respostas com viés de Th2.	49
Kozlovskaya et al., 2021	- camundongos - hamsters sírios - ratos Wistar - porquinhos-da-índia - saguis comuns	Vacina de virion inteiro Inativada com β -propiolactona CoviVac	Vacina não apresentou sinais de toxicidade aguda/crônica, reprodutiva, embrionária e fetal, ou efeitos teratogênicos, bem como não apresentou propriedades alergênicas nas espécies animais estudadas. A vacina induziu uma resposta imune humoral estável e robusta, tanto na forma de IgG e NAbs anti-SARS-CoV-2 específicos em camundongos, hamsters sírios e saguis comuns. Os níveis de NAb não diminuíram significativamente ao longo de um ano. O curso de duas imunizações protegeu hamsters sírios de	14

			pneumonia grave após desafio intranasal com o vírus vivo.	
Liang et al., 2021	- ratos Sprague Dawley (SD) (n=10, - camundongos (n=8) - macaco Rhesus (n=18)	Vacina S-Trimer, com subunidade trimérica nativa (tecnologia Trimer-Tag), tanto com AS03 (emulsão de óleo em água) quanto com CpG 1018 (agonista de TLR9) mais adjuvantes de alumínio.	A imunização de S-Trimer com AS03 (emulsão de óleo em água) ou CpG 1018 (agonista de TLR9) mais adjuvantes de alumínio induziu alto nível de anticorpos neutralizantes e respostas imunes celulares com viés Th1. Macacos rhesus imunizados com S-Trimer adjuvante foram protegidos do desafio SARS-CoV-2 em comparação com controles de veículos, com base em observações clínicas e redução de cargas virais nos pulmões. Portanto, Trimer-Tag pode ser uma importante tecnologia de plataforma para produção escalável e rápido desenvolvimento de vacinas de subunidade seguras e eficazes.	28
Lien et al., 2021	Hamsters sírios dourados (n=40)	Vacina baseada em SARS-CoV-2 spike (S-2P) de pré-fusão estável com adjuvante, MVC-COV1901	Antes do desafio, a vacina induziu altos níveis de Acs neutralizantes (IgG 10.000 vezes mais alto e uma média de títulos neutralizantes de pseudovírus). Seis dias após infecção, hamsters vacinados não exibiram qualquer perda de peso associada à infecção e reduziram significativamente a patologia pulmonar. Níveis de carga viral pulmonar foram reduzidos a níveis inferiores ao limite de detecção em comparação com animais não vacinados. A vacinação com 1µg ou 5µg de S-2P com adjuvante produziu imunogenicidade comparável e proteção contra infecção.	21
Li et al., 2021(a)	- camundongos - coelhos - primatas não humanos	Combinação de vacina de DNA que codifica a proteína Spike(S) de comprimento	Induziu Acs neutralizantes de alto nível e respostas imunes de células T em modelos animais pequenos e grandes. Mais significativamente, a co-	56

		total do SARS-CoV-2 e vacina de proteína S1 recombinante	entrega de componentes de DNA e proteínas ao mesmo tempo provocou proteção total contra o desafio intratraqueal dos vírus SARS-CoV-2 em macacos rhesus imunizados. Como as vacinas de DNA e proteína provaram ser seguras em estudos humanos anteriores, e as vacinas de DNA são capazes de induzir o desenvolvimento de células B do centro germinativo, o que é crítico para respostas de células B de memória de alta afinidade, a abordagem da vacina de co-entrega de DNA e proteína tem grande potencial para servir como uma abordagem segura e eficaz para desenvolver vacinas COVID- 19.	
Lu et al., 2021	- rato de algodão -camundongos IFNAR-/- -camundongos IFNAR-/- hCD46 -hamsters dourados sírios	Vacinas recombinantes atenuadas que expressam várias formas da proteína spike (S) SARS-CoV-2	Animais imunizados com rMeV-preS produziram níveis mais altos de anticorpos neutralizantes do que os encontrados em soros convalescentes de pacientes com COVID-19 e uma forte resposta de células T com viés Th1. O rMeV-preS também forneceu proteção completa de hamsters contra o desafio com SARS-CoV-2, impedindo a replicação em pulmões e cornetos nasais, perda de peso corporal, tempestade de citocinas e patologia pulmonar. Esses dados demonstram que a proteína S de prefusão estabilizada expressando rMeV (rMeV-preS) é um candidato a vacina seguro e altamente eficaz.	32
Ragan et al., 2021	Hamsters (n=32) sírios	Vacina de vírion inteiro inativada (SolaVax)	Resultados preliminares: respostas que ocorrem como resultado da vacina e impacto das formulações adjuvantes, desenvolvidas para promover respostas imunes do tipo Th1, têm na eficácia da vacina e na	28

			proteção contra infecção após o desafio com SARS-CoV-2. Vacina de vírus inteiro para COVID-19 usando esse método fotoquímico específico pode ter utilidade potencial na preparação de uma dessas vacinas candidatas.	
Saunders et al., 2021	Macacos Rhesus (n=13)	RNA ^m modificado por nucleosídeos encapsulado em nanopartículas lipídicas (mRNA-LNP)	Título de neutralização inibitória recíproca de 50% do soro (ID ₅₀) de 47.216 para SARS-CoV-2, bem como na proteção contra SARS-CoV-2 no trato respiratório superior e inferior folhetos. Os mRNAs modificados por nucleosídeos que codificam um pico transmembranar estabilizado ou domínio de ligação ao receptor monomérico também induziram respostas de anticorpos de neutralização cruzada contra SARS-CoV e coronavírus de morcego, embora em títulos mais baixos do que os alcançados com as nanopartículas. As vacinas atuais baseadas em mRNA podem fornecer proteção contra futuros surtos de β -coronavírus.	77
Tran et al., 2021	- camundongos BALB/c (n=60) - hamsters sírio (n=10) - <i>Macaca leonina</i>	Vacina SARS-CoV-2, Nanocovax, com base na produção de proteína recombinante da porção extracelular da proteína spike (S)	Indução de altos níveis de IgG específica para proteína S e anticorpos neutralizantes nos três modelos animais. Além disso, um estudo de desafio viral usando o modelo de hamster mostrou que Nanocovax protegeu o trato respiratório superior da infecção por SARS-CoV-2. Nanocovax não induziu quaisquer efeitos adversos em camundongos e ratos.	45
Tostanoski et al., 2021	- camundongos BALB/c (n=20)	Vacinas de adenovírus rhesus sorotipo 52 (RhAd52)	As vacinas provocaram respostas robustas de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 e protegem contra doenças clínicas e replicação viral nos pulmões. OS títulos de Acs e ligação e neutralização	88

			correlacionaram-se com a eficácia protetora. Os dados validam o modelo inoculado com cepa de SARS-CoV-2 adaptada a camundongos como ferramenta para rastrear e estudar novas vacinas, e o desenvolvimento de vacinas RhAd52 para COVID-19.	
Vogel et al., 2021	- camundongos - macacos Rhesus	Vacinas BNT162b1 e BNT162b2 que contêm RNAm modificado por nucleosídeos com nanopartículas lipídicas.	Em camundongos, dose intramuscular de qualquer vacina candidata provoca resposta de Acs dose-dependente com altos títulos de inibição de entrada de vírus e fortes respostas de células T-helper-1 CD4+ e IFN γ +CD8+. O reforço primário de macacos com candidatos BNT162b induz títulos de média geométrica neutralizantes de SARS-CoV-2 8,2-18,2 vezes aos de um painel de soros humanos convalescentes. Proteção de macacos contra SARS-CoV-2; em particular, BNT162b2 protege trato respiratório inferior contra presença de RNA viral e não mostra aumento da doença.	30