

Concórdia, SC / Julho, 2024

Imunidade e vacinas para influenza em suínos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura e Pecuária**

e-ISSN 2965-8047

Documentos 248

Julho, 2024

Imunidade e vacinas para influenza em suínos

*Vanessa Haach
Danielle Gava
Ana Paula Almeida Bastos
Rejane Schaefer*

Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2024

Embrapa Suínos e Aves
Rodovia BR 153 - KM 110
89.715-899, Concórdia, SC
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Franco Muller Martins

Secretário-executivo

Tâni Maria Biavatti Celant

Membros

Clarissa Silveira Luiz Vaz

Cátia Silene Klein

Gerson Neudi Scheuermann

Jane de Oliveira Peixoto

Joel Antonio Boff

Revisão de texto

Jean Carlos Porto Vilas Boas Souza

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Vivian Fracasso

Foto da capa

Danielle Gava

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Suínos e Aves

Imunidade e vacinas para influenza em suínos / Vanessa Haach [et al.] – Concórdia :
Embrapa Suínos e Aves, 2024.

PDF (33 p.) : il. color. – (Documentos / Embrapa Suínos e Aves, e-ISSN 2965-8047;
248)

1. Suinocultura. 2. Vírus influenza. 3. Imunidade. 4. Vacina. I. Ana Paula Almeida
Bastos. II. Danielle Gava. III. Rejane Schaefer. IV. Título. V. Série.

CDD (21. ed.) 636.4 089 697 9

Claudia Antunez Arrieche (CRB-14/880)

© 2024 Embrapa

Autores

Ana Paula Almeida Bastos

Médica veterinária, doutora em Ciência,
pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC

Danielle Gava

Médica veterinária, doutora em Ciências
Veterinárias, analista da Embrapa Suínos e
Aves, Concórdia, SC

Rejane Schaefer

Médica veterinária, doutora em Ciências
Veterinárias, pesquisadora da Embrapa
Suínos e Aves, Concórdia, SC

Vanessa Haach

Bióloga, doutora em Ciências Veterinárias,
pós-doutoranda na Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC

Apresentação

A influenza, causada pelo vírus influenza A (IAV) é uma doença endêmica em suínos e a presença do vírus nos rebanhos leva a perdas econômicas significativas devido à redução da produtividade, aumento da mortalidade e aumento nos gastos com antimicrobianos para controlar as infecções bacterianas secundárias. Além disso, ao manter-se circulando na população de suínos, existe o risco de surgimento de uma cepa de IAV com potencial pandêmico para os seres humanos. Como consequência dessa possibilidade, é muito importante que sejam realizadas medidas de prevenção e controle da influenza em rebanhos suínos, onde, de tais medidas, destaca-se principalmente a vacinação. A vacinação promove a ativação de diferentes células imunológicas e a produção de anticorpos específicos contra o IAV, resultando em uma resposta imune mais rápida em uma futura infecção. Diferentes plataformas vacinais já foram desenvolvidas para suínos, como vacinas que utilizam vírus inativados, vírus vivos atenuados,

vacinas vetorais e de ácidos nucleicos, sendo que cada vacina apresenta vantagens e desvantagens.

A evolução genética dos vírus influenza A em suínos, bem como o desenvolvimento de novas vacinas e avaliação da resposta imunológica pós-vacinação é uma das linhas de estudo da Embrapa Suínos e Aves, e a presente revisão é originada da tese de doutorado da Dra. Vanessa Haach. As contribuições dessa pesquisa estão alinhadas aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 2 (fome zero e agricultura sustentável), 3 (saúde e bem-estar) e 9 (indústria, inovação e infraestrutura), pois o avanço da sanidade de suínos reflete em melhoria da produção de proteína animal, traz benefícios à saúde humana sob a ótica da Saúde Única, e aborda o conhecimento e avanço científico para a manutenção da sanidade dos rebanhos suínos contra a influenza. Esse documento visa apresentar as diferentes plataformas vacinais já avaliadas para o controle da influenza A em suínos e as respostas imunológicas resultantes para cada tipo de vacina.

Vanessa Haach
Pós-doutoranda

Sumário

Introdução	9
Vírus influenza	9
Imunidade contra influenza	11
Imunidade passiva	11
Imunidade inata	11
Imunidade adaptativa	13
Vacinas para influenza	16
Vacinas inativadas	18
Vacinas vivas atenuadas	20
Vacinas vetoriais não replicantes	21
Vacinas de ácido nucleico	21
Vacinas recombinantes, com base em proteínas e partículas semelhantes a vírus (VLPs; <i>virus-like particles</i>)	22
Vacinas universais	23
Protocolos vacinais para influenza em suínos	24
Considerações finais	25
Referências	25

Introdução

O vírus influenza A (IAV) causa infecção em aves e mamíferos, incluindo suínos e humanos, e representa risco para a saúde pública devido ao seu potencial de ocasionar pandemias (Vincent; Anderson; Lager, 2020). Em suínos, o IAV pode gerar prejuízos econômicos significativos em consequência da alta morbidade, ocasionando redução na ingestão de ração e assim redução do ganho de peso, bem como, aumento de gastos com antimicrobianos para controlar as infecções bacterianas secundárias (Rajão *et al.*, 2014).

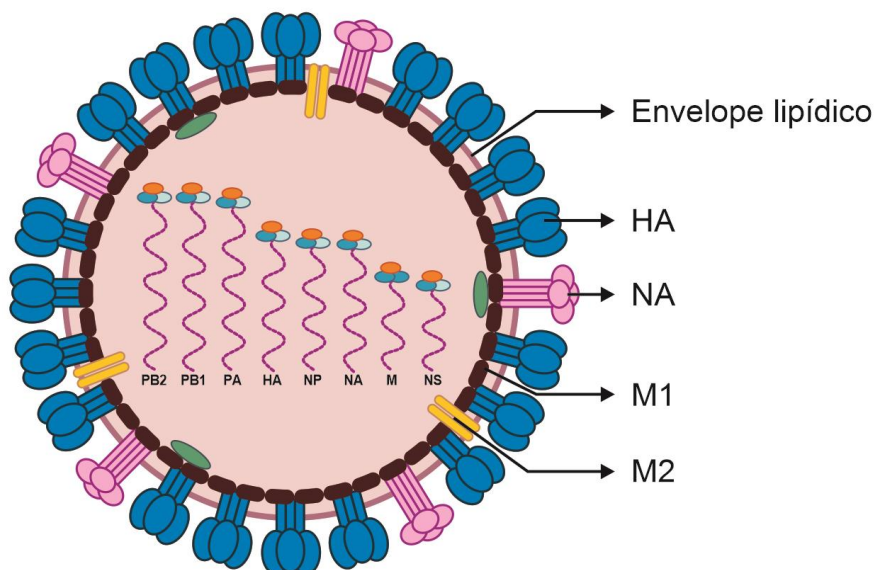
Durante a fase inicial da infecção pelo IAV, o sistema imunológico do hospedeiro é estimulado, sendo acionado inicialmente o sistema imune inato e, em seguida, o sistema imune adaptativo, envolvendo resposta imune humoral e celular. Em infecções subsequentes, a resposta imunológica é aprimorada e ocorre mais rapidamente devido a proliferação de células de memória induzidas pela infecção primária. Contudo, a resposta imune é dirigida para vírus antigenicamente similares (ou homólogos), podendo haver proteção parcial ou até mesmo nula para vírus heterólogos.

Uma grande diversidade genética e antigênica dos vírus influenza que circulam em suínos tem sido descrita, como resultado de mutações pontuais nos genes que codificam as glicoproteínas de superfície, hemaglutinina e neuraminidase e ocorrência de eventos de rearranjo gênico entre os vírus que circulam em suínos (Anderson *et al.*, 2021; Lewis *et al.*, 2016). Essa rápida evolução viral, juntamente com a cocirculação de múltiplas linhagens distintas dos IAVs, são desafios para o controle da doença em suínos, bem como para o desenvolvimento de vacinas eficazes que induzam proteção cruzada entre os diferentes subtipos e linhagens virais.

Vírus influenza

Os vírus influenza pertencem à família Orthomyxoviridae, que é uma família de vírus que apresenta material genético (genoma) composto por moléculas de RNA de sentido negativo composta por nove gêneros: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Mykissvirus*, *Quaranjavirus*, *Sardinovirus* e *Thogotovirus* (ICTV, 2023). Os vírus pertencentes ao gênero *Alphainfluenzavirus* (*Influenzavirus A*) são classificados em subtipos e os demais gêneros apenas em tipos virais. A nomenclatura segue um padrão universal com as seguintes informações: tipo do vírus, espécie hospedeira de origem (exceto vírus de origem humana), região geográfica de origem, número da amostra, ano de isolamento, subtipo da amostra (entre parênteses); como por exemplo, *A/swine/Brazil/07/2023(H1N1)*. Em suínos, o vírus influenza A (IAV) é o único tipo viral que apresenta relevância clínica (Van Reeth; Vincent, 2019).

Os IAVs são partículas pleomórficas (sem uma forma fixa, podendo apresentar-se ora mais alongados, ora mais circulares), com cerca de 80 a 120 nanômetros de diâmetro, possuem capsídeo helicoidal e um envelope lipídico que os tornam altamente suscetíveis a solventes e detergentes, além de serem sensíveis a temperaturas elevadas (Van Reeth; Vincent, 2019). O genoma viral é segmentado, composto por oito fragmentos lineares de RNA fita simples com polaridade negativa, denominados: polimerase básica 2 (PB2), polimerase básica 1 (PB1), polimerase ácida (PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidase (NA), matriz (M), e não estrutural (NS) (Goneau *et al.*, 2018) (Figura 1). Tais segmentos gênicos codificam 12 a 13 proteínas, sendo que o segmento PB1 codifica as proteínas PB1, PB1-F2 e PB1-N40, o segmento PA codifica as proteínas PA e PA-X, o segmento M codifica as proteínas M1 e M2, o segmento NS codifica as proteínas NS1 e NS2/NEP. Os outros segmentos codificam apenas uma proteína cada (Vincent *et al.*, 2017; Zhang; Gauger; Harmon, 2016).



Legenda: Exterior: HA = hemaglutinina codificada pelo gene HA; NA = neuraminidase codificada pelo gene NA; M1 = matriz 1 codificada pelo gene M; M2 = matriz 2 codificada pelo gene M. Interior: PB2 = segmento polimerase básica 2; PB1 = segmento polimerase básica 1; PA = segmento polimerase ácida; HA = segmento hemaglutinina; NP = segmento nucleoproteína; NA = segmento neuraminidase; M = segmento matriz; NS = segmento não estrutural.

Figura 1. Diagrama do vírus influenza A mostrando os oito segmentos gênicos virais, destacando as glicoproteínas de superfície e o envelope viral.

Fonte: Adaptado de Rajão; Pérez, 2018.

Os genes HA e NA codificam as principais glicoproteínas de superfície, as quais são alvo do sistema imune do hospedeiro e, conseqüentemente, são mais propensas a sofrerem mutações (Gaymard *et al.*, 2016). Logo, a alta variabilidade da HA e NA permite que os IAVs escapem da ação do sistema imunológico do hospedeiro. A glicoproteína de superfície mais abundante, a HA, é formada por uma região globular (HA1), mais variável, e uma região da haste (HA2), mais conservada (Krammer, 2019). A glicoproteína HA possui capacidade de se ligar ao receptor de ácido siálico na célula do hospedeiro, ocasionando a fusão celular e a entrada viral (Zhang *et al.*, 2013). Já a proteína NA tem como função a clivagem de porções de ácido siálico, promovendo a liberação dos vírions produzidos na célula hospedeira, facilitando a dispersão do IAV (Wang *et al.*, 2012).

Em proporções menores à HA e NA, a proteína M2 é uma proteína integral do envelope viral codificada pelo gene M, auxiliando a HA na fusão com a célula hospedeira. A proteína M2 muda sua conformação formando poros iônicos no vírus, importantes para a invasão da célula. O IAV possui os genes M e NP que codificam proteínas internas e, por conseguinte, são mais conservados. As proteínas internas são importantes para a montagem (proteínas M1

e NP) e replicação do genoma viral (polimerases) (Shaw; Palese, 2013).

As aves silvestres aquáticas são os reservatórios dos IAVs na natureza. Nesses animais já foram identificados dezesseis tipos diferentes de HA (H1-H16) e nove tipos de NA (N1-N9) (Gamblin; Skehel, 2010; Neumann; Kawaoka, 2015) sendo que a determinação dos subtipos virais tem como base a antigenicidade das glicoproteínas de superfície (HA e NA) (Nelson; Vincent, 2015; Short *et al.*, 2015). Em 2009 e 2010, na Guatemala e no Peru, foram identificados em morcegos os subtipos H17N10 e H18N11, porém não há registros de que esses novos vírus possam infectar outras espécies animais além dos próprios morcegos (Tong *et al.*, 2012, 2013; Wu *et al.*, 2014b). Além disso, no Brasil, também foi detectado o subtipo H18N11 em morcegos (Campos *et al.*, 2019). Os IAVs infectam uma ampla variedade de espécies, como aves (selvagens e domésticas), humanos, suínos, equinos, caninos, felinos e mamíferos marinhos (Brown, 2000; Short *et al.*, 2015). Em suínos, os subtipos considerados endêmicos na maioria dos países produtores de suínos são H1N1, H1N2 e H3N2 (Baudon *et al.*, 2017; Zanella *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2015).

Existem dois mecanismos responsáveis pela grande variabilidade genética dos IAVs: *antigenic drift* e *antigenic shift*. O *antigenic drift* é ocasionado por uma alta frequência de erros introduzidos pela enzima RNA polimerase do vírus durante o processo de cópia do genoma viral durante a replicação, devido à ausência de um sistema de correção de erros ou *proofreading*, resultando em mutações pontuais nos diferentes genes (Hampson, 2002; Zhang; Gauger; Harmon, 2016). Nos genes que codificam as proteínas HA e NA, mutações pontuais ocorrem com maior frequência devido à pressão de seleção induzida pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Correia; Abecasis; Rebelo-de-Andrade, 2018; De, 2018; Klein *et al.*, 2014). O *antigenic shift* ou *reassortment* ocorre quando dois ou mais vírus infectam uma mesma célula do hospedeiro e trocam segmentos gênicos, podendo surgir um vírus novo distinto dos vírus parentais (Lowen, 2018; Zhang; Gauger; Harmon, 2016). O novo vírus que sofreu rearranjo gênico pode apresentar propriedades antigênicas e patogênicas distintas dos vírus parentais, podendo também ser capaz de infectar outras espécies (Garten *et al.*, 2009). Os erros induzidos pela polimerase viral durante a replicação e o genoma segmentado dos vírus influenza possibilitam uma rápida evolução dos IAVs, e assim, uma alta variabilidade nas glicoproteínas de superfície, o que contribui para que os vírus não sejam neutralizados pela imunidade prévia do hospedeiro. Mutações pontuais, rearranjos gênicos e transmissão interespecíficas, com introdução e manutenção em suínos de genes oriundos de aves e humanos, favorecem o aumento da diversidade genética dos vírus circulantes, contribuindo para a perpetuação desses vírus na natureza (Vincent *et al.*, 2017).

Imunidade contra influenza

Imunidade passiva

Os leitões recebem a imunidade materna de forma passiva através da ingestão do colostro que contém anticorpos e células leucocitárias maternas. Os anticorpos adquiridos passivamente podem controlar a ocorrência de doença clínica nos leitões, mas não impedem a infecção e a excreção viral (Allerson *et al.*, 2013; Loeffen *et al.*, 2003). Dessa

forma, os anticorpos maternos não inibem a replicação do IAV nos leitões, e conseqüentemente, não previnem a transmissão do IAV entre os suínos, mas diminuem a quantidade de vírus excretado (Cador *et al.*, 2016; Deblanc *et al.*, 2018). A presença de anticorpos maternos para o IAV protege os leitões contra vírus antigenicamente relacionados, porém, interfere no desenvolvimento da resposta imune ativa, por vacinação ou infecção (Kitikoon *et al.*, 2006). Isso acontece porque os anticorpos maternos ligam-se ao antígeno viral e também ao receptor Fc expresso nas células B. Por sua vez, o antígeno viral é reconhecido pelo receptor de célula B (BCR), formando uma ligação cruzada entre o BCR e o receptor Fc, inibindo assim a produção de anticorpos em resposta ao reconhecimento do antígeno (Albrecht; Arck, 2020; Vazquez-Pagan; Schultz-Cherry, 2021). Os níveis de anticorpos maternos em leitões são dependentes da concentração inicial de anticorpos da fêmea, e declinam no soro de leitões até a sexta semana de vida em rebanhos não vacinados para a influenza (Janke, 2000). Em rebanhos onde as matrizes são vacinadas antes do parto, os anticorpos maternos persistem em leitões aproximadamente até as 14 semanas de idade (Markowska-Daniel; Pomorska-Mól; Pejsak, 2011).

Imunidade inata

A resposta imune inata é uma resposta rápida e a primeira linha de defesa do organismo, incluindo respostas químicas, físicas e celulares, desencadeando respostas pró-inflamatórias (Figura 2). Em suínos essa primeira linha de defesa contra o IAV é iniciada pelas células caliciformes presentes no trato respiratório superior, e células epiteliais respiratórias ciliadas que revestem a superfície traqueal. Durante uma infecção pelo IAV, a proteção inicia pela camada de muco respiratório secretada pelas células caliciformes e pelas glândulas submucosas. Os IAVs que escapam dessas barreiras físicas e químicas ligam-se aos receptores de ácido siálico nas células epiteliais, ocasionando a fusão celular, e assim, a entrada nas células (Ma; Loving; Driver, 2023).

Após a entrada do IAV nas células do hospedeiro, as células imunes inatas que empregam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhecem componentes virais conservados chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), iniciando assim respostas imunológicas. Os PRRs envolvidos na detecção de infecção pelo IAV incluem os receptores do tipo Toll (TLR) 3, TLR7,

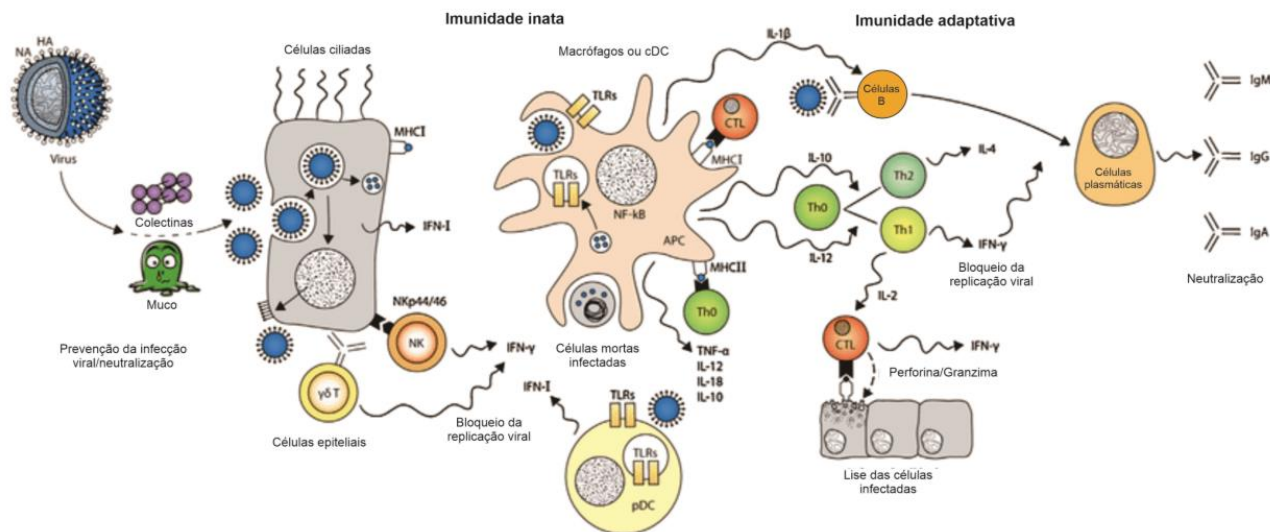


Figura 2. Imunidade inata e adaptativa durante infecção pelo vírus influenza A em suínos.

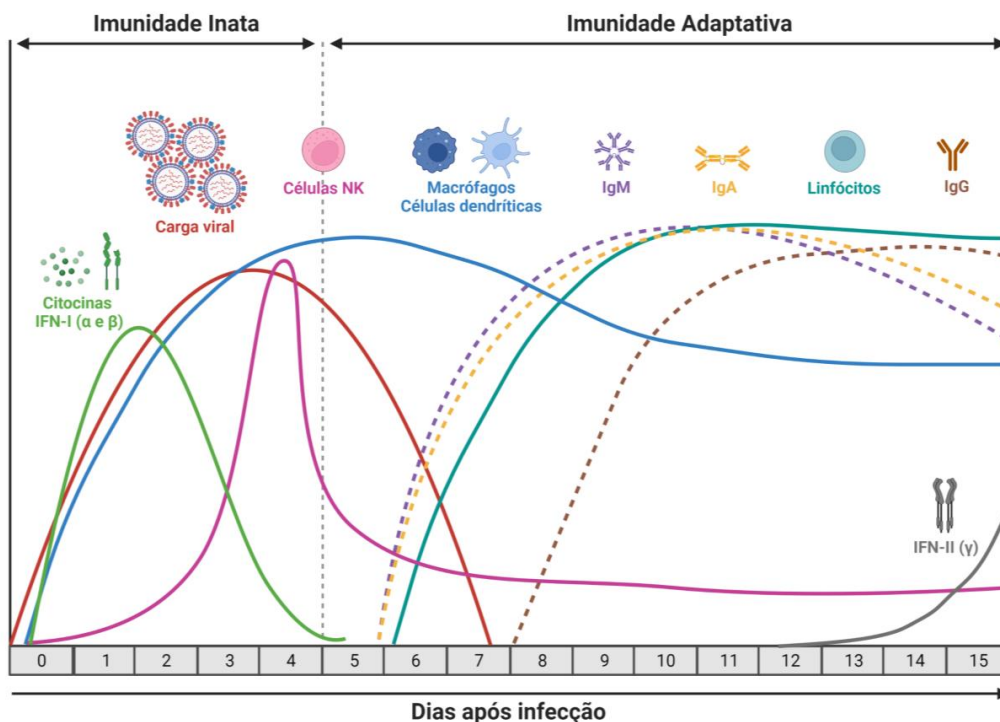
Fonte: Adaptado de Crisci et al., 2013.

TLR8, gene 1 induzido pelo ácido retinoico (RIG-I), domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NOD) e gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) (Cao, 2016; Ouyang *et al.*, 2014). Esses PRRs ativam fatores de transcrição, incluindo o fator regulador de interferon (IRF) 3, IRF7 e fator nuclear κ B (NF- κ B), causando a expressão de citocinas, quimiocinas e interferons (IFNs) (Hiscott *et al.*, 2006; Kumar; Kawai; Akira, 2011) (Figura 3). Dessa maneira, após a entrada do vírus mediada por endocitose, as ribonucleoproteínas virais (vRNPs) são liberadas no núcleo para transcrição e replicação. O RNA viral de fita simples é reconhecido pelo TLR7 nos endossomos, e a sinalização do TLR7 desencadeia a expressão de pró-IL-1 β , pró-IL-18 e outras citocinas pró-inflamatórias dependentes do NF- κ B (Diebold *et al.*, 2004). As células infectadas são fagocitadas, permitindo o reconhecimento de RNA de fita dupla pelo receptor TLR3 no fagossomo, que resulta na expressão de pró-IL-1 β dependente de NF- κ B, pró-IL-18 e outras citocinas pró-inflamatórias, bem como IFNs do tipo I (Le Goffic *et al.*, 2006). O RNA viral no citosol é detectado pelo RIG-I, que ativa a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) e induz IFNs do tipo I. A atividade da M2 no aparelho de Golgi estimula a formação do inflamosoma da proteína 3 (NLRP3) (Malik; Zhou, 2020; Niu; Meng, 2023).

O primeiro alvo dos IAVs são as células epiteliais das vias aéreas superiores, as quais produzem moléculas antivirais e quimiotáticas que iniciam a resposta imunológica pelo recrutamento rápido de

células efetoras, como as células *natural killer* (NK), monócitos e neutrófilos (Chen *et al.*, 2018). A fim de limitar a replicação viral e preparar as células para a imunidade adaptativa, todos os tipos celulares possuem mecanismos próprios para interagir com as células infectadas pelo vírus (Chen *et al.*, 2018). O fator de necrose tumoral (TNF) α e a interleucina (IL) 1 induzem moléculas de adesão endotelial, que desencadeiam a migração de células imunes inatas, como macrófagos, células dendríticas (DCs) mieloides e plasmocitoides, e células NK para o local da infecção (Chen *et al.*, 2018) (Figura 3). Nas primeiras 48 horas pós-infecção, há redução de células NK no sangue concomitante com o aumento de células NK no pulmão (Forberg *et al.*, 2014). As células NK provocam a lise das células infectadas, auxiliando na eliminação do IAV (Guo; Kumar; Malarkannan, 2011). Os macrófagos ativados fagocitam as células infectadas pelo IAV, limitando a disseminação viral e regulando a resposta imune adaptativa (Tumpey *et al.*, 2005). As DCs plasmocitoides são as principais células na imunidade antiviral, pois entram rapidamente no espaço bronquiolar após a infecção, produzindo grandes quantidades de IFN- α para suprimir a replicação viral, e apresentam os antígenos para os linfócitos T (Ma; Loving; Driver, 2023).

Além disso, no trato respiratório dos suínos encontram-se células T $\gamma\delta$ em abundância que podem contribuir para o controle de infecções pelo IAV, produzindo grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, e destruindo células infectadas por mecanismos citotóxicos e não citotóxicos (Ma; Loving;



Legenda: IFN = interferon; Ig = imunoglobulina; NK = *natural killer*.

Figura 3. Curva da resposta imunológica inata e adaptativa do vírus influenza A em suínos. Cinética geral da carga viral e diferentes componentes do sistema imunológico durante uma infecção pelo vírus influenza A em suínos. A magnitude das respostas está relacionada com os dias após a infecção (0-15).

Fonte: Criado com BioRender.com.

Driver, 2023). Nos suínos também se encontram células NKT que apresentam fenótipo de células NK e células T, as quais contribuem para o controle da infecção. As células NKT regulam a imunidade mediante a liberação de citocinas e por ataque citolítico, havendo aumento da proliferação dessas células no pulmão na fase inicial da infecção (Mair *et al.*, 2016).

Quando os linfócitos T imaturos e de memória reconhecem antígenos virais que foram apresentados pelas DCs, a resposta imunológica adaptativa é iniciada. As DCs imaturas monitoram constantemente os pulmões em busca de patógenos invasores (Bahadoran *et al.*, 2016; Holt *et al.*, 2008). As DCs convencionais (mieloides) migram dos pulmões para os linfonodos, após a infecção pelo IAV, onde apresentam os antígenos virais para os linfócitos T (Heer *et al.*, 2008; Hintzen *et al.*, 2006). Os epítopos degradados no citosol são exportados para o retículo endoplasmático, ligando-se às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, sendo transportados para a membrana celular através do complexo de Golgi para o reconhecimento por células T CD8⁺. Os epítopos degradados em endossomos/lisossomos ligam-se

às moléculas do MHC de classe II, sendo transportados para a membrana celular para o reconhecimento pelas células T CD4⁺ (Van De Sandt; Kreijtz; Rimmelzwaan, 2012).

Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa é importante para a eliminação viral, recuperação e proteção contra a reinfecção e as células T e B apresentam um papel importante nessa etapa (Figura 2). O sistema imune responde rapidamente às infecções pelo IAV, resultando na eliminação do vírus do trato respiratório em até uma semana após a infecção. Com o passar do tempo, os títulos de anticorpos e a produção das células imunológicas diminuem, mas as populações de células T e B de memória são mantidas nas vias aéreas e nos tecidos linfoides. Em uma nova infecção pelo IAV, essas células irão desencadear uma resposta imune amplificada e acelerada (Van Reeth; Ma, 2013).

Após infecção primária pelo IAV, é induzida proteção contra a reinfecção pelo mesmo vírus ou por vírus semelhante antígenicamente (De Vleeschauwer

et al., 2011; Van Reeth *et al.*, 2003). Provavelmente, os principais mediadores dessa imunidade homóloga sejam os anticorpos vírus-neutralizantes específicos para a HA. Devido à circulação simultânea de diferentes subtipos e linhagens do vírus influenza, os suínos normalmente são expostos a IAVs antigenicamente distintos durante sua vida (Van Reeth; Vincent, 2019). Pode haver proteção cruzada completa ou parcial entre as linhagens H1 e entre as linhagens H3 (Busquets *et al.*, 2010; De Vleeschauwer *et al.*, 2011; Qiu; De Hert; Van Reeth, 2015; Van Reeth *et al.*, 2003). No entanto, a proteção cruzada entre vírus H1 e H3 é muito restrita ou nula (Kappes *et al.*, 2012; Qiu; De Hert; Van Reeth, 2015).

Imunidade humoral

Durante a infecção pelo IAV, o antígeno viral é apresentado ao sistema imune e as células B imaturas localizadas nos linfonodos mediastínicos diferenciam-se em células produtoras de anticorpos (Jung; Lee, 2020). Além disso, os anticorpos não neutralizantes produzidos pelos plasmócitos, colaboram para acelerar a expansão clonal dos linfócitos T CD8+ de memória, facilitando a eliminação viral (Rangel-Moreno *et al.*, 2008). A imunoglobulina (Ig) do isotipo IgG é o anticorpo dominante nesse processo, e o isotipo IgA é importante para proteção das mucosas no trato respiratório (Chen *et al.*, 2018). As células B iniciam a resposta contra o IAV aproximadamente três dias após a infecção, e os plasmócitos começam a secretar IgG no sétimo dia pós-infecção (Waffarn; Baumgarth, 2011). Nas vias aéreas do trato respiratório, a IgM possui atividade neutralizante, iniciando a ativação do sistema complemento (Choi; Baumgarth, 2008). No soro suíno, as imunoglobulinas IgM e IgG são dominantes, sendo a IgM detectada no início da infecção, com pico sete dias após a infecção e, posteriormente, é detectada a IgG, que atinge o pico de produção 25 dias após a infecção ou mais tarde (Figura 3). Os títulos permanecem elevados durante várias semanas e começam a declinar cerca de oito a dez semanas após a infecção. No trato respiratório superior, os plasmócitos no tecido da mucosa nasal produzem IgA, que são detectados quatro dias após a infecção (Heinen *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1995; Van Reeth; Labarque; Pensaert, 2006). A IgA secretada na mucosa do trato respiratório é capaz de neutralizar o vírus, sendo uma importante linha de defesa do hospedeiro. No trato respiratório inferior, em amostras de lavado broncoalveolar de suínos infectados com IAV, são detectadas IgG e IgA (Heinen *et al.*, 2000; Kitikoon *et al.*, 2006; Larsen

et al., 2000), atingindo o pico em torno de dez dias após a infecção (Geurts Van Kessel *et al.*, 2008) (Figura 3).

A resposta por anticorpos é dirigida principalmente para as proteínas HA, NA, M e NP (Shaw; Palese, 2013). Os anticorpos contra a proteína HA são neutralizantes e são a principal resposta protetora contra o IAV, sendo predominantemente dirigidos para a região globular da HA (HA1) (Rajão; Pérez, 2018). Porém, a região HA1 é altamente variável, abrigando mutações que podem levar à variação antigênica. Assim, a maioria dos anticorpos produzidos contra a região HA1 induzem proteção contra vírus antigenicamente relacionados. Os anticorpos anti-HA1 bloqueiam a ligação do vírus aos receptores das células do hospedeiro, impedindo a infecção (Figura 4). Já a região da haste da HA (HA2) é mais conservada, dessa forma os anticorpos contra a região HA2 apresentam reação cruzada, podendo se ligar a diferentes subtipos, porém anticorpos anti-HA2 estão presentes em baixos níveis (Ekiert *et al.*, 2009; Krammer, 2019) (Figura 4). Os anticorpos produzidos contra a proteína NA limitam a liberação dos IAVs das células infectadas. Outras de suas funções, e também dos anticorpos contra a proteína M2, são restringir a replicação viral e desencadear a morte das células infectadas por mecanismos dependentes de anticorpos (Rajão; Pérez, 2018) (Figura 4). Além da neutralização viral, anticorpos específicos para o IAV podem apresentar funções efetoras mediadas pelo domínio Fc. Subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG4) podem desencadear funções de citotoxicidade celular mediada pelo complemento (CDCC), citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e fagocitose celular mediada por anticorpos (ADCP) (Paudyal *et al.*, 2022). Assim, anticorpos não neutralizantes também contribuem para a proteção e eliminação do IAV das células infectadas (Ma; Loving; Driver, 2023).

Imunidade celular

As respostas de células T são detectadas a partir de sete dias após a infecção (Heinen; De Boer-Luijtz; Bianchi, 2001; Khatri *et al.*, 2010), e são amplamente direcionadas contra epítomos presentes em todas as proteínas virais. Os linfócitos T efetores são detectáveis no sangue, lâmina própria do pulmão, vias aéreas pulmonares e linfonodos traqueobrônquicos. A maior quantidade de linfócitos T específicos para o IAV é detectada nas vias aéreas pulmonares e a menor no sangue (Ma; Loving; Driver, 2023). Os linfócitos T consistem em populações

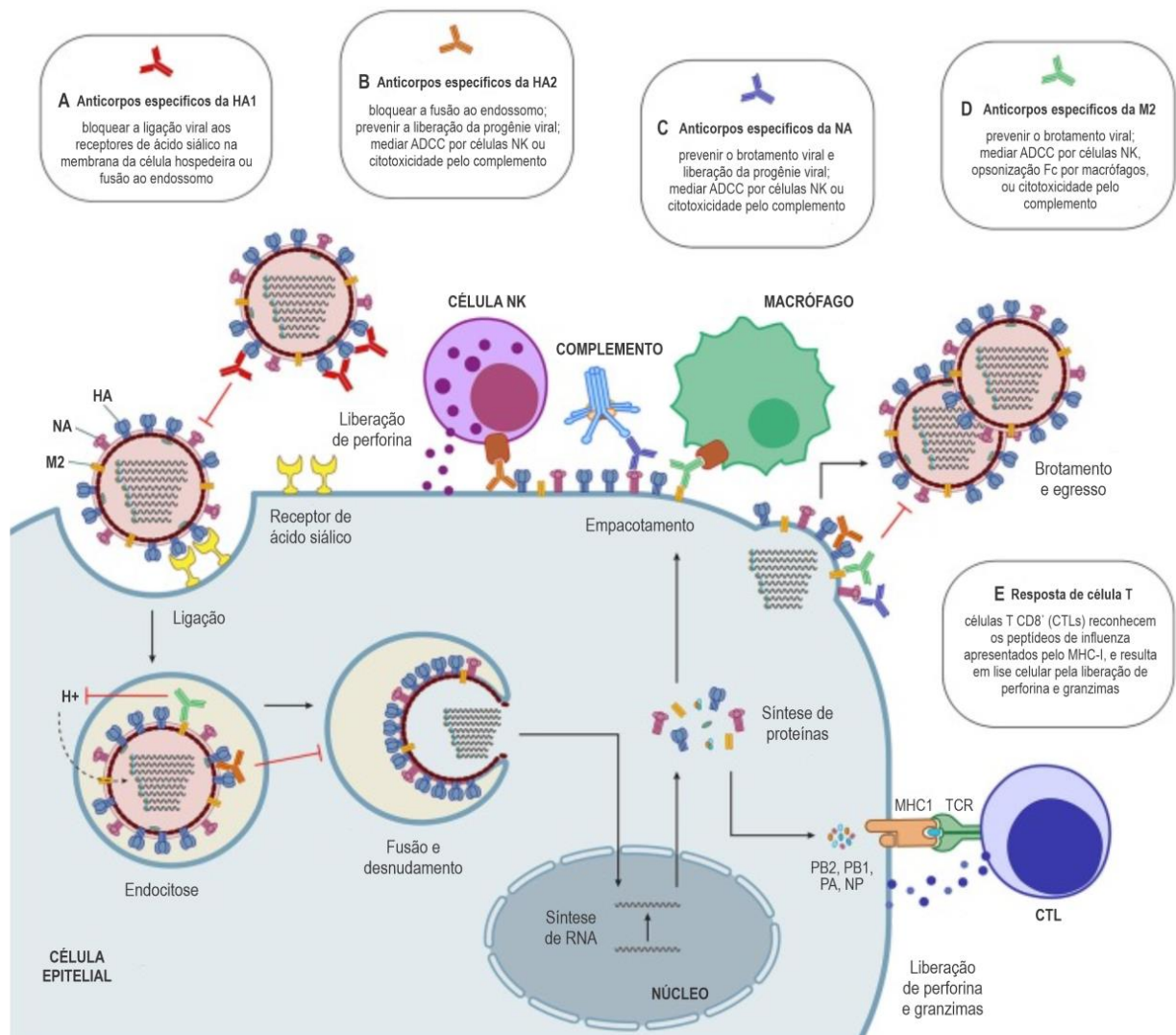


Figura 4. Resposta imunológica induzida por diferentes proteínas do vírus influenza A.
 Fonte: Adaptado de Rajão; Pérez, 2018.

funcionalmente distintas, sendo as células T CD4⁺ e células T CD8⁺ as mais bem definidas. Os linfócitos T CD4⁺ auxiliam as respostas de imunidade celular e humoral, isto é, fornecem auxílio para a ativação das células T CD8⁺ e para a expansão clonal dos linfócitos B. Os linfócitos T CD8⁺ se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs), produzindo citocinas e moléculas efetoras para restringir a replicação viral e matar as células-alvo infectadas pelo IAV (Van Reeth; Vincent, 2019) (Figura 3). Os CTLs são específicos para epítomos de proteínas conservadas do IAV, principalmente NP e M1, conferindo resposta imunológica de reação cruzada, ou seja, heterosubtípica (Grant *et al.*, 2016; Sridhar, 2016). Além disso, os suínos também possuem uma população de linfócitos T CD4⁺CD8⁺ duplamente positivos, que possuem propriedades de células T auxiliares,

citotóxicas e de memória, importantes para “depuração viral” (De Bruin *et al.*, 2000; Zuckermann, 1999).

As células T CD8⁺ reconhecem o IAV apresentado ao sistema imune pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) associadas às proteínas do MHC de classe I (Jung; Lee, 2020). As DCs que migraram dos pulmões para os linfonodos ativam a proliferação e diferenciação das células T CD8⁺ imaturas em CTLs (Ho *et al.*, 2011; Kreijtz; Fouchier; Rimmelzwaan, 2011). Também contribuem para essa diferenciação, IFNs do tipo I, IFN-γ, IL-2 e IL-12 (Pipkin *et al.*, 2010; Whitmire; Tan; Whitton, 2005). Dentro do citoplasma dos CTLs existem numerosos grânulos que contêm moléculas, incluindo perferinas e granzimas. As perferinas se agrupam na superfície da membrana plasmática das células alvo que expressam o antígeno associado ao MHC de classe I formando poros, conseqüentemente,

promovem a difusão passiva das granzimas para induzir apoptose (Voskoboinik; Whisstock; Trapani, 2015) (Figura 4). Além disso, a replicação viral pode ser restringida pela clivagem de proteínas virais e de células hospedeiras envolvidas na replicação e defesa viral, devido a ação das granzimas (Andrade, 2010; Van Domselaar; Bovenschen, 2011). Os CTLs também podem expressar citocinas que interagem com receptores das células infectadas com IAV, promovendo apoptose (Allie; Randall, 2017). Ademais, as células T CD8⁺ produzem IFN- γ e TNF- α , que contribuem para os mecanismos de defesa viral (Schmidt; Varga, 2018). As células T CD8⁺ também controlam a inflamação pulmonar durante uma infecção aguda do IAV pela produção de IL-10 (Sun *et al.*, 2009).

Após a infecção pelo IAV, os CTLs e DCs que tornaram-se específicos circulam no sangue, órgãos linfoides e no local da infecção (Chen *et al.*, 2018). Em uma infecção secundária por IAV, os CTLs respondem rapidamente, e a eficiência dos CTLs durante a infecção secundária é afetada pelo processo de ativação e diferenciação recebido na infecção primária (Van Gisbergen *et al.*, 2011). Com o passar do tempo, há redução na citotoxicidade das células T CD8⁺ de memória relacionada a diminuição da expressão das moléculas citolíticas e da capacidade de matar as células-alvo (Grant *et al.*, 2016). A disseminação do IAV das vias respiratórias superiores para o pulmão é impedida pelos linfócitos T CD8⁺ de memória do epitélio nasal, bloqueando o desenvolvimento de doença pulmonar (Pizzolla *et al.*, 2017). A maioria dos linfócitos T CD8⁺ específicos para a NP do IAV nas vias aéreas e tecidos pulmonares são células de memória residentes (Martini *et al.*, 2022). As células T CD8⁺ de memória dos pulmões contribuem para a defesa contra infecção por IAVs heterólogos, já que os principais alvos dessas células são as proteínas virais conservadas, restringindo a replicação e facilitando a eliminação do vírus do hospedeiro (Van Braeckel-Budimir; Harty, 2017). Além disso, durante uma infecção por IAV, os monócitos presentes nos pulmões contribuem para o estabelecimento de linfócitos T CD8⁺ nesse tecido (Dunbar *et al.*, 2017).

As células T CD4⁺ reconhecem o IAV associado às proteínas do MHC de classe II nas APCs, como DCs, macrófagos e células B (Jung; Lee, 2020). Ademais, os linfócitos T CD4⁺ expressam ligantes coestimuladores que contribuem para a ativação das células B, e assim, a produção de anticorpos, como o ligante CD40 (CD40L) (Swain; Mckinstry; Strutt, 2012). Durante a infecção pelo IAV, as DCs migram dos pulmões para os linfonodos, ativando

as células T CD4⁺ (Lukens *et al.*, 2009). Antígenos, moléculas coestimuladoras e citocinas secretadas pelas DCs, células epiteliais e células inflamatórias estimulam a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em linfócitos T auxiliares (Th) do tipo 1 para responder em uma infecção do IAV (Chen *et al.*, 2018). As células Th1 ativam macrófagos alveolares e expressam citocinas antivirais, como IFN- γ , TNF- α e IL-2. A diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ para eliminar a infecção viral é regulada pela IL-2 e IFN- γ que são expressos pelas células Th1 (Chen *et al.*, 2018).

Vacinas para influenza

A utilização da vacinação para o controle da influenza tem sido uma das medidas profiláticas adotadas em rebanhos suínos em vários países. A vacinação tem por objetivo induzir uma resposta imune robusta e duradoura, reduzindo a excreção viral, as lesões pulmonares, e a doença clínica. A resposta de memória, idealmente, deve proteger contra infecções futuras por IAV antigenicamente semelhante ao antígeno da vacina. Ademais, vários fatores influenciam a resposta imune à vacinação e a imunogenicidade da vacina, como por exemplo: fatores intrínsecos do hospedeiro, fatores extrínsecos, fatores nutricionais, fatores ambientais, fatores da vacina e fatores relacionados a administração da vacina (Zimmermann; Curtis, 2019). No entanto, pensando em resposta vacinal de rebanho é importante avaliarmos a plataforma ou tipo de vacina (Figura 5), qualidade e quantidade do antígeno, a via de administração da vacina, quantidade de doses e a forma como os antígenos são apresentados ao sistema imunológico (Vincent *et al.*, 2017) (Figura 6).

São considerados como fatores determinantes para a eficácia das vacinas a similaridade antigênica entre o vírus vacinal e os vírus circulantes em suínos, a imunogenicidade do vírus vacinal, carga antigênica e tipo de adjuvante (Van Reeth; Vincent, 2019). A imunogenicidade intrínseca de um antígeno vacinal é aumentada e/ou modulada pelo uso dos adjuvantes, principalmente nas plataformas com vírus inativado. Os adjuvantes apresentam propriedades diferentes, porque podem ser compostos de diferentes constituintes com distintas funções e atividades, incluindo funções de transporte, de direcionamento, imunoestimulantes e/ou atividade imunomoduladora (Charerntantanakul, 2020). Portanto, dependendo do tipo de adjuvante utilizado pode haver indução de um melhor processamento e entrega

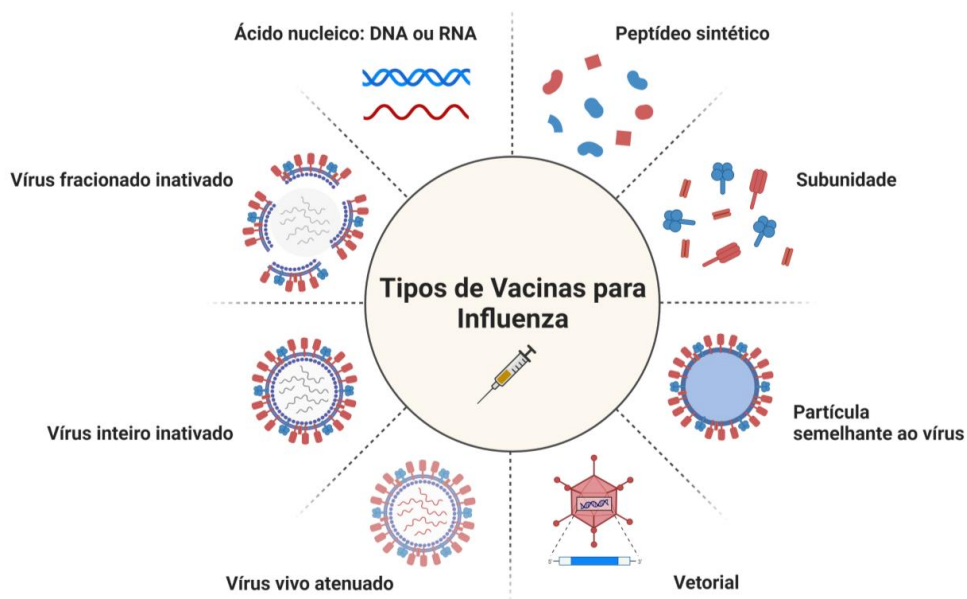


Figura 5. Diferentes tipos de vacinas para o vírus influenza.

Fonte: Criado com BioRender.com.

	INATIVADA	VETORIZADA	VIVA ATENUADA
Via de aplicação	IM	IM/IN	IN
Resposta de HI	+++	++	+
Células secretoras de anticorpos	++	+	+
Células B de memória	+	+	+
IgA de mucosa	-/+	-/+	+++
Anticorpos NA	+++	-/+	++
Células T CD4	++	++	+++
Células T CD8	-	+	+
Imunidade de proteção cruzada	-/+	+	++
VAERD	sim	-/+	não

Legenda: IM = intramuscular; IN = intranasal; HI = inibição da hemaglutinação; NA = neuraminidase; VAERD = doença respiratória exacerbada associada à vacina (*vaccine-associated enhanced respiratory disease*).

Figura 6. Diferentes plataformas vacinais e vias de administração da vacina para influenza em suínos, e resposta imunológica resultante.

Fonte: Adaptado de Vincent et al., 2017.

do antígeno às APCs, estímulo à produção de citocinas imunomoduladoras específicas, ativação de vias específicas da resposta imune inata (De Veer; Meeusen, 2011) e também produção de anticorpos com maior reação cruzada (Vincent *et al.*, 2017). Novos alvos de vacinas requerem frequentemente a indução de fortes respostas celulares, incluindo células T auxiliares e, por vezes, linfócitos T citotóxicos, além de anticorpos (Guy, 2007). Entretanto, em suínos, a maioria das vacinas contra o IAV utilizam adjuvantes a base de óleo, como por exemplo, Emulsigen-D e Montanide (Rajão; Pérez, 2018; Souza *et al.*, 2018). Como os sais de alumínio induzem predominantemente respostas de anticorpos, a descoberta de novos adjuvantes é crucial para o desenvolvimento de vacinas que requerem uma resposta mediada por células (Charerntantanakul, 2020; Guy, 2007).

De um modo geral, a eficácia das vacinas pode ser prejudicada pela presença de anticorpos maternos no momento da vacinação dos leitões (Kitikoon *et al.*, 2006), bem como pela rápida evolução viral e aumento da diversidade genética e antigênica do vírus. Um grande desafio na seleção de estirpes vacinais do IAV de suínos é a co-circulação de múltiplas linhagens de vírus na mesma região. Dessa forma, isso traz desafios para o desenvolvimento de vacinas que induzam proteção cruzada para todas as linhagens virais circulantes (Rajão *et al.*, 2014). As características de uma vacina ideal contra o IAV para uso em suínos são sumarizadas na Tabela 1 (Bedi; Bayless; Glanville, 2023; Ma; Richt, 2010; Who, 2022).

Tabela 1. Características de uma vacina ideal para influenza A para uso em suínos.

Características de uma vacina ideal para influenza
Ser segura
Prevenir a doença clínica, excreção e transmissão do vírus
Induzir imunidade esterilizante
Induzir proteção de amplo espectro (homossubtípica e heterossubtípica)
Superar a interferência dos anticorpos maternos
Ser universal
Ser de fácil atualização dos antígenos virais
Ser DIVA (diferenciar animais infectados de vacinados)
Poder ser armazenada em temperatura ambiente
Ser de fácil aplicação
Ser de dose única
Possuir baixo custo

Diversas plataformas e vias de aplicação de vacinas contra o IAV foram descritas (Tabela 2). Contudo, para o controle da influenza em suínos as vacinas mais utilizadas são as produzidas com vírus inteiro inativado (comerciais e autógenas). A vacinação para o IAV é rotineiramente realizada pelos produtores de suínos na América do Norte e Europa (Ma; Richt, 2010; Rajão *et al.*, 2013). Entretanto, essa não é uma prática de rotina nas granjas brasileiras. No Brasil, desde 2014 é comercializada uma vacina inativada produzida com uma amostra do vírus H1N1 pandêmico (A/California/04/2009; FluSure, Zoetis). A partir de 2017, começaram a ser utilizadas no Brasil vacinas autógenas, produzidas a partir de cepas virais isoladas no próprio rebanho. No Brasil, as vacinas veterinárias comerciais são avaliadas quanto à eficácia, segurança, potência e estabilidade, e precisam ser registradas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa), conforme Decreto no 5.053, de 22 de abril de 2004 (Brasil, 2004).

Vacinas inativadas

As vacinas contendo vírus inativado são utilizadas para o controle de influenza, por apresentarem custo de produção relativamente baixo, amplo histórico de práticas de fabricação, segurança e eficácia. Dentre as vacinas inativadas, encontram-se as vacinas produzidas com vírus inteiro, vacinas com vírus fracionado (*split-virus*) e vacinas de subunidades (Yamayoshi; Kawaoka, 2019). Essas diferem na organização estrutural e componentes antigênicos, tendo impacto na imunogenicidade da vacina (Soema *et al.*, 2015a). As vacinas contendo vírus inteiro são inativadas quimicamente com formaldeído, etilenoimina binária ou β -propiolactona, concentradas e purificadas. Na produção de vacinas com vírus fracionado, ocorre tratamento do antígeno viral com éter dietílico ou detergente, que rompe o envelope viral expondo todas as proteínas (Neurath *et al.*, 1971). Nas vacinas de subunidades há a separação do nucleocapsídeo e lipídios das glicoproteínas de superfície por etapas adicionais de purificação (Laver; Webster, 1976).

A maioria das vacinas disponíveis mundialmente para suínos são compostas por vírus inteiro e inativadas, acrescidas de emulsão, óleo em água, como adjuvante, e administradas pela via intramuscular (Sandbulte *et al.*, 2015). Comumente, para suínos é necessária aplicação de duas doses de vacinas, com duas a três semanas de intervalo (Rajão *et al.*, 2014). A proteção induzida pelas vacinas inativadas

Tabela 2. Exemplos de vacinas experimentais contra o vírus influenza A testadas em suínos.

Plataforma vacinal	Antígeno	Inativação/Atenuação/Vetor/Sistema de expressão	Adjuvante	Via de administração	Referência
Inativada	Vírus inteiro	Irradiação UV	Emulsigen-D	Intramuscular	Rajão <i>et al.</i> , 2016
	Vírus inteiro	Irradiação UV	Emulsigen-D	Intramuscular	Vincent <i>et al.</i> , 2008b
Viva atenuada	Vírus inteiro	Elastase dependente	-	Intratraqueal	Landreth <i>et al.</i> , 2021
	Vírus inteiro	Sensível a temperatura	-	Intranasal	Gauger <i>et al.</i> , 2014
	Vírus inteiro	Sensível a temperatura	-	Intranasal	Pena <i>et al.</i> , 2011
	Vírus inteiro	Elastase dependente	-	Intranasal	Masic <i>et al.</i> , 2010
Vetorial	HA	Adenovirus 5	-	Intramuscular	Petro-Turnquist <i>et al.</i> , 2023
	HA e HA-NP	Parapox orf virus	-	Intramuscular	Joshi <i>et al.</i> , 2021
	HA e NP	Alphavirus	-	Intramuscular	Vander Veen <i>et al.</i> , 2013
	HA	Adenovirus 5	Emulsigen-D	Intranasal	Braucher <i>et al.</i> , 2012
Ácido nucleico (DNA)	HA	-	Diluvac Forte	Intradérmica	Sisteré-Oró <i>et al.</i> , 2019
	NP, M, HA e NA	-	Diluvac Forte	Intradérmica	Karlsson <i>et al.</i> , 2018
	HA	-	-	Intramuscular e subcutânea	Gorres <i>et al.</i> , 2011
VLP	HA	Baculovirus	Montanide ISA 660 VG	Intramuscular	Mai <i>et al.</i> , 2023
	HA	Baculovirus	Emulsigen-D	Intramuscular	Hernandez; Miller; Vaughn, 2016
	M1, HA e NA	Baculovirus	Emulsigen-D	Intramuscular	Pyo <i>et al.</i> , 2012
	HA	HEK296T	Specol	Intramuscular	Loeffen <i>et al.</i> , 2011
Virosomal	HA e NA	-	Emulsigen-D	Intramuscular	Haach <i>et al.</i> , 2023

Legenda: HA = hemaglutinina; M = matriz; NA = neuraminidase; NP = nucleoproteína; UV = ultravioleta; VLP = partícula semelhante a vírus (*virus-like particle*).

é dirigida contra vírus antigenicamente similares, estimulando altos níveis de anticorpos séricos contra a HA, todavia a produção de anticorpos de mucosa é limitada (Holzer *et al.*, 2019; Rajão *et al.*, 2014). Uma limitação desse tipo de vacina é que sua capacidade de induzir proteção é afetada pela presença de alterações antigênicas nos vírus de campo, bem como pela redução de reação cruzada no ensaio de inibição da hemaglutinação (HI) (Rajão; Pérez, 2018). Além disso, quando os suínos vacinados são desafiados com um vírus homossubtípico (mesmo subtipo), mas antigenicamente distinto (heterólogo), pode haver intensificação dos sinais clínicos da doença nos animais vacinados. Esse fenômeno é conhecido como doença respiratória exacerbada associada à vacina (VAERD; *vaccine-associated*

enhanced respiratory disease) (Gauger *et al.*, 2011; Rajão *et al.*, 2014), caracterizada por pneumonia broncointersticial severa com bronquiolite necrótica e hiperplasia (Gauger *et al.*, 2011, 2012).

As vacinas inativadas tradicionais induzem uma resposta imune celular muito limitada, ou até mesmo ausente, sendo menos eficazes em infecções causadas por vírus heterólogo. Além disso, essas vacinas são fracas indutoras de imunidade inata (Rajão; Pérez, 2018). As vacinas baseadas em vírus inteiro inativado protegem os suínos contra a doença clínica, e dependendo do título de anticorpos vírus-específico obtidos pelos ensaios de HI ou soro-vírus neutralização (SVN), a replicação viral pode ser reduzida (Van Reeth; Vincent; Lager, 2016). Estudos prévios demonstraram maior proteção, com redução

de doença clínica e excreção viral em suínos vacinados com vacinas comerciais contendo vírus inteiro inativado e desafiados com vírus antigenicamente similar (Kitikoon *et al.*, 2006, 2013; Lee; Gramer; Joo, 2007; Loving *et al.*, 2013), do que com vírus antigenicamente distintos (Van Reeth; Van Gucht; Pensaert, 2003; Vincent *et al.*, 2008a, 2010). Parys *et al.* (2022) demonstraram que alternar três diferentes vacinas de IAV inativadas em suínos pode resultar em resposta mais ampla de anticorpos e em proteção do que o procedimento de vacinação tradicional de reforço com a mesma vacina.

Vacinas autógenas

De um modo geral, a vacinação é realizada usando:

- **Vacinas clássicas padrão licenciadas:** que exigem testes extensivos (ou seja, segurança, pureza, eficácia e potência) e, portanto, são caras para desenvolver e lentas para licenciar (por exemplo, 3 ± 10 anos);
- **Vacinas licenciadas condicionalmente:** que exigem testes moderados (ou seja, segurança, pureza e expectativa razoável de eficácia e potência) e são, portanto, menos dispendiosas e exigem um processo regulatório moderado;
- **Vacinas autógenas licenciadas pelo governo federal:** que, por regulamentação devem ser inativadas. Essas vacinas autógenas requerem testes básicos (ou seja, pureza básica e segurança básica) (Brasil, 2012).

As vacinas autógenas, portanto, são vacinas inativadas personalizadas para cada granja ou propriedades adjacentes, usando os seus isolados recentes, fornecendo dessa forma proteção contra vírus homólogo. A grande diversidade genética de IAVs circulantes em suínos juntamente com a limitação do número de cepas virais em vacinas comerciais é o principal motivo para o uso de vacinas autógenas nos rebanhos suínos (Vincent *et al.*, 2008b).

A produção dessas vacinas envolve as mesmas etapas exigidas para vacinas comerciais, compreendidas por isolamento viral, purificação, concentração do antígeno, inativação, acréscimo de adjuvante, e registro junto ao Mapa, de acordo com a Instrução Normativa SDA/Mapa no 31, de 20 de maio de 2003 (Brasil, 2003). As vacinas autógenas também devem atender aos requisitos gerais para a produção de vacinas virais, garantindo a inativação viral completa, e testadas quanto à segurança e pureza. Esse tipo de vacina pode ser produzido mais

rapidamente do que uma vacina comercial, porém, o período para realizar o isolamento viral, caracterização do isolado e produção da vacina pode ser maior em comparação à realização de um pedido de vacina comercial já disponível.

Vacinas vivas atenuadas

Existem diferentes métodos de atenuação viral para a produção de vacinas. As mutações que geram atenuação viral podem ser inseridas em um ou mais segmentos gênicos. As abordagens de atenuação podem, por exemplo, tornar o vírus adaptado ao frio e sensível à temperaturas mais altas (Pena *et al.*, 2012), prejudicar a capacidade do vírus de resistir ao interferon do tipo I da célula hospedeira, com o truncamento da proteína NS1 (Solórzano *et al.*, 2005), ou pela modificação do local de clivagem da HA para requerer a enzima elastase (Masic; Babiuk; Zhou, 2009).

As vacinas contendo vírus vivo atenuado mimetizam a rota natural de infecção se forem administradas por via intranasal, resultando em uma resposta imunológica sistêmica e de mucosa (Barría *et al.*, 2013), além de uma menor taxa de reações adversas. Diferentemente das vacinas que contêm vírus inteiro inativado, as vacinas vivas atenuadas induzem resposta imune celular e humoral, podendo induzir IgA de mucosa no trato respiratório superior se forem administradas pela via intranasal, fornecendo uma resposta imunológica mais duradoura e com reatividade cruzada abrangente (Hoft *et al.*, 2017; Loving *et al.*, 2012). No entanto, as vacinas vivas atenuadas geralmente induzem títulos de anticorpos mais baixos (Basha *et al.*, 2011). As vacinas vivas atenuadas induzem a produção de células T CD4+ e CD8+ específicas, fornecendo uma resposta imunológica mais ampla, com sensibilidade menor à correspondência antigênica entre a vacina e os IAVs circulantes (Cheng *et al.*, 2013). Além disso, vacinas vivas atenuadas podem induzir resposta imunológica pulmonar e células de memória residentes em tecidos, que podem proporcionar maior proteção do que as células T CD8+ de memória circulantes, bem como auxiliar na proteção contra IAVs heterólogos (Wu *et al.*, 2014a; Zens; Chen; Farber, 2016). Ainda, durante a replicação viral as vacinas vivas atenuadas ativam TLR3 e TLR7, levando à regulação de citocinas inflamatórias (Diebold, 2008).

Gauger *et al.* (2014) demonstraram que suínos vacinados com uma vacina viva atenuada e posteriormente desafiados com um vírus heterólogo, não apresentaram VAERD. Outros estudos em suínos

vacinados com vacina viva atenuada também resultaram em proteção superior contra infecções heterólogas (Kappes *et al.*, 2012; Loving *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2007). Além disso, em suínos vacinados foi demonstrada indução de resposta imune robusta, redução da replicação viral e das lesões pulmonares (Aubrey *et al.*, 2022; Landreth *et al.*, 2021). Recentemente, foi avaliada em suínos uma vacina viva atenuada contendo uma proteína indutora de IgA. Foi demonstrado um número elevado de células secretoras de IgA, redução da replicação e excreção viral, bem como o bloqueio da transmissão viral entre os suínos sentinelas (Rajão *et al.*, 2023). Todavia, mais pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de aumentar a segurança das vacinas vivas atenuadas, uma vez que o uso dessas vacinas em suínos nos Estados Unidos foi associado à ocorrência de rearranjo gênico entre o vírus vacinal e os vírus endêmicos em suínos (Sharma *et al.*, 2020).

Vacinas vetorais não replicantes

As vacinas vetorais utilizam como vetor um vírus já bem caracterizado, como adenovírus, alfavírus, poxvírus, mas com replicação limitada e que apresentam ao sistema imune do hospedeiro uma proteína de um vírus-alvo contra a qual se quer uma resposta imunológica (Rajão; Pérez, 2018). Para o desenvolvimento desse tipo de imunizante, o vetor pode ser modificado geneticamente para não se replicar no animal e causar doença. Dessa forma, são removidos alguns genes não essenciais ao vetor viral (para não ter patogenicidade) e é inserido um trecho do material genético do patógeno de interesse, como por exemplo o gene HA do vírus influenza. Assim, o vetor produzido com o gene de interesse terá a capacidade de ligar-se aos receptores celulares do hospedeiro e direcionar a expressão do gene inserido, contudo, não será capaz de espalhar-se além das células iniciais infectadas (Vander Veen; Harris; Kamrud, 2012).

A tecnologia de vacinas vetorais permite a rápida atualização do gene de interesse, por meio de clonagem de algum amplicon, gene sintetizado, ou região de interesse no vetor viral, possibilitando o pronto estabelecimento de replicons para a produção de vacinas. Esse sistema possui a capacidade de gerar vacinas personalizadas, como as autógenas, com vírus circulantes em cada rebanho (Rajão; Pérez, 2018; Sandbulte *et al.*, 2015). No entanto, um dos riscos existentes em vacinas baseadas em vetores virais é a indução de anticorpos contra o vetor, um mecanismo conhecido como tolerância

imunológica (Soema *et al.*, 2015a). A imunidade pré-existente ao vetor utilizado tende a reduzir as respostas imunológicas pela vacina vetorial (Ertl, 2016), todavia essa limitação é pouco esperada em suínos devido ao seu rápido ciclo de produção associado ao baixo número de doses administradas. Contudo, no caso de matrizes suínas, que tendem a permanecer mais tempo no plantel e receber múltiplas doses vacinais, esse risco precisa ser levado em consideração.

As vacinas vetorais induzem uma excelente resposta imune humoral e uma robusta resposta de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), bem como imunidade de mucosa se administradas por via intranasal (Tutykhina *et al.*, 2011), além dos antígenos de interesse serem expressos em sua conformação nativa, o que resulta em maior especificidade dos anticorpos (Ertl, 2016; Ewer *et al.*, 2016; Humphreys; Sebastian, 2018). Em suínos, demonstrou-se que vacinas vetorais induziram proteção contra o desafio com vírus homólogo (Bosworth *et al.*, 2010; Wesley; Tang; Lager, 2004), proteção parcial contra vírus heterólogo (Abente *et al.*, 2019; Braucher *et al.*, 2012; Vander Veen *et al.*, 2013), e indução de anticorpos IgA em suínos vacinados por via intranasal (Braucher *et al.*, 2012). Em suínos vacinados também foi demonstrada indução de troca de classe de anticorpos IgM para IgG, além de redução da excreção viral, redução de carga viral nos pulmões e de lesões pulmonares (Petro-Turnquist *et al.*, 2023). Os vetores virais são caracterizados por serem excelentes imunógenos e ótimos veículos de entrega de antígenos vacinais.

Vacinas de ácido nucleico

As vacinas baseadas em ácido nucleico (DNA e RNA) possibilitam a indução da expressão do antígeno de interesse nas células do hospedeiro, induzindo imunidade celular e humoral, resultando em uma proteção ampla, sem expor o hospedeiro ao vírus viável (Kim; Jacob, 2009; Ma; Richt, 2010). Essas vacinas de ácido nucleico podem estimular o sistema imune inato, e também permitem que os antígenos expressos sejam apresentados pelo MHC de classe I e II, estimulando células T CD4⁺ e CD8⁺ (Li; Petrovsky, 2016).

Essa tecnologia é segura, rápida, estável, escalável e não há necessidade de multiplicar o vírus em ovos embrionados, como na produção tradicional de vacinas contra influenza (Kutzler; Weiner, 2008). Além disso, permite a combinação de diferentes IAVs e a substituição de um IAV por outro

(Sandbulte *et al.*, 2015). Produz-se uma cópia de DNA do segmento de RNA viral que codifica a proteína do vírus de interesse, liga-se a um plasmídeo de expressão, o DNA plasmidial é inserido em bactérias para propagação, e os plasmídeos são posteriormente purificados. Os plasmídeos purificados são administrados ao hospedeiro permitindo a produção do antígeno de interesse nas células, resultando em uma resposta imune contra esse antígeno (Soema *et al.*, 2015a).

Geralmente, as vacinas de DNA contra influenza são baseadas na expressão da HA. Ao comparar essas vacinas com as vacinas tradicionais contra a influenza foi observada imunidade humoral subótima em humanos e animais (Rajão; Pérez, 2018). Para aumentar a imunogenicidade, é necessário otimizar a eficiência da vacina, podendo ser com o uso de adjuvantes, diferentes combinações de doses de reforço, vias de administração ou maior volume vacinal. Entretanto, essas otimizações podem aumentar o custo da vacina e não ser economicamente viável, em comparação com as outras plataformas de vacinas (Sandbulte *et al.*, 2015). Fotouhi *et al.* (2017) observaram que camundongos vacinados com uma vacina de DNA acrescida de adjuvante apresentaram aumento significativo nos títulos de IgG e IFN- γ , em comparação com os camundongos que receberam a vacina de DNA sem adjuvante. Além disso, estudos em suínos demonstraram resposta imune mediada por células e por anticorpos (Borggren *et al.*, 2016), e forte indução de resposta humoral que resultou na redução da carga viral nos pulmões dos suínos vacinados (Gorres *et al.*, 2011; Larsen; Olsen, 2002). Ainda, demonstrou-se redução da excreção viral após o desafio e altos títulos de anticorpos em suínos vacinados (Sisteré-Oró *et al.*, 2019).

Um dos riscos em relação à segurança das vacinas de DNA é que anticorpos produzidos contra o vetor plasmidial podem tornar a vacina ineficaz. A produção de antígenos de influenza no hospedeiro pode alterar o sistema imunológico ou induzir tolerância contra esses antígenos (Soema *et al.*, 2015a).

As vacinas de RNA mensageiro permitem a produção de antígenos nas células hospedeiras, porém são mais seguras do que as vacinas de DNA, pois abrigam apenas os componentes necessários para a expressão da proteína, sendo rapidamente degradadas (Rajão; Pérez, 2018). As vacinas de RNA podem estimular o sistema imune inato através do TLR3, TLR7, TLR8, RIG-I e MDA5, induzindo IFN do tipo I e citocinas inflamatórias (Zhang *et al.*, 2019). Essas vacinas também podem promover resposta robusta de células T CD4⁺ e CD8⁺, além de

respostas de anticorpos neutralizantes (Pardi *et al.*, 2018). Uma vacina de RNA mensageiro protegeu tanto camundongos jovens quanto mais velhos contra o desafio com diferentes IAVs, bem como, induziu proteção clínica e reduziu a excreção viral em suínos após o desafio com vírus homólogo (Petsch *et al.*, 2012).

Vacinas recombinantes, com base em proteínas e partículas semelhantes a vírus (VLPs; *virus-like particles*)

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a produção de antígenos proteicos do IAV que podem induzir diferentes respostas imunológicas. Além de promover respostas de anticorpos contra a proteína HA, também podem desenvolver resposta imune contra a região da haste da HA (HA2) e proteína M2, potencializando a reação cruzada (Soema *et al.*, 2015a). As vacinas produzidas usando o sistema de expressão de baculovírus para proteínas virais permitem a expressão *in vitro* de grandes quantidades das proteínas HA e NA do IAV em um processo de fabricação relativamente rápido (Pliasis *et al.*, 2022). As partículas semelhantes a vírus (VLPs; *virus-like particles*) são partículas de vírus recombinante que não possuem nenhum componente genômico, sendo formadas apenas por proteínas estruturais. Ademais, a produção das VLPs pode utilizar diferentes sistemas de expressão, como baculovírus, células de insetos, bactérias e plantas (Li *et al.*, 2017; Low *et al.*, 2014; Pillet *et al.*, 2016; Valero-Pacheco *et al.*, 2016). As VLPs não são replicantes, possuem a morfologia, tamanho e conformação estrutural semelhante aos vírus, podendo apresentar o antígeno em sua conformação nativa ligada à membrana (Kang; Kim; Compans, 2012). As VLPs podem estimular as APCs, especialmente as DCs, ocorrendo a apresentação de antígenos por moléculas do MHC de classe I e II para ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Keshavarz *et al.*, 2019; Mohsen *et al.*, 2017). Além disso, a ativação dos linfócitos B resulta em uma resposta imune humoral robusta (Braun *et al.*, 2012; Cimica; Galarza, 2017).

Estudos com vacinas VLPs relataram indução de títulos robustos de anticorpos, bem como redução das lesões pulmonares e da excreção viral após o desafio em suínos (Hernandez; Miller; Vaughn, 2016; Mai *et al.*, 2023; Pyo *et al.*, 2012). Também observou-se redução nos sinais clínicos respiratórios (Kitikoon *et al.*, 2009) e da replicação viral nos suínos vacinados e desafiados (Loeffen *et al.*, 2011).

Vacinas virossomais

Os virossomas são partículas semelhantes ao vírus, tanto em tamanho como na composição do envelope viral, contudo não possuem material genético viral (Huckriede *et al.*, 2005; Wilschut, 2009). Os virossomas podem interagir com o sistema imune através de vias semelhantes a dos vírus, e apresentar elevada imunogenicidade e antigenicidade específica (Huckriede *et al.*, 2005; Wilschut, 2009). Nas vacinas virossomais, as proteínas HA e NA são integradas em lipossomas de bicamada de fosfatidilcolina, formando virossomas unilamelares com diâmetro de 150 nanômetros aproximadamente, que posteriormente irão se fundir com as células-alvo, mas sem resultar em infecção das células, uma vez que os virossomas não possuem RNA viral (Herzog *et al.*, 2009). Além dos virossomas mimetizarem o vírus, a sua capacidade de se ligar e fundir às células do hospedeiro, como faz o vírus nativo, também pode contribuir para uma imunidade robusta (Huckriede *et al.*, 2005; Wilschut, 2009).

Os virossomas possuem a capacidade de estimular a expressão de MHC de classe I e II, e moléculas coestimulatórias, induzindo a maturação de DCs. As glicoproteínas do envelope do IAV na superfície virossomal facilitam a apresentação de antígenos pelas APCs, como as DCs, para os linfócitos T, estimulando resposta de Th1 e Th2, e induzindo resposta de CTLs (Huckriede *et al.*, 2005; Wilschut, 2009; Zurbriggen, 2003). Ademais, as vacinas virossomais levam à ativação de células B, resultando na produção de anticorpos. Além da resposta sistêmica de anticorpos IgG, também podem induzir resposta imune local de anticorpos IgA pela administração da vacina por via intranasal (Bernasconi *et al.*, 2016).

Os peptídeos podem ser utilizados para induzir resposta imunológica específica de células B e T contra epítomos conservados. Os virossomas também são usados como sistemas de entrega de antígenos peptídicos (Soema *et al.*, 2015a). Virossomas induziram CTLs capazes de lisar células-alvo infectadas com o IAV (Arkema *et al.*, 2000), resposta de células T CD8+, resultando na recuperação de camundongos desafiados com IAV heterólogo (Soema *et al.*, 2015b), e resposta imune humoral e celular robusta em camundongos, com indução de células T CD8+ (Kammer *et al.*, 2007). Uma vacina virossomal polivalente foi desenvolvida e avaliada em camundongos (Fonseca *et al.*, 2023) e posteriormente em suínos, nos quais estimulou anticorpos neutralizantes e específicos para HA, bem como a proliferação de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+ efetores e de memória central (Haach *et al.*, 2023).

Vacinas universais

As vacinas universais para o IAV são embasadas em proteínas conservadas, gerando uma proteção mais ampla contra os diversos subtipos virais. As vacinas universais têm como princípio tentar superar as desvantagens da natureza altamente mutável dos IAVs, baseando-se no desenvolvimento de respostas imunológicas contra epítomos conservados. Essas vacinas têm por objetivo estimular a resposta humoral e celular, induzindo imunidade neutralizante de ampla proteção cruzada, além de minimizar as atualizações, prolongando as respostas imunológicas (Rajão; Pérez, 2018). No entanto, as proteínas conservadas utilizadas normalmente são também proteínas pouco imunogênicas, requerendo estratégias para melhorar a imunogenicidade (Rajão; Pérez, 2018). As vacinas universais têm como alvo os epítomos conservados da HA, NA ou domínio extracelular da proteína M2 (M2e) para induzir anticorpos de reação cruzada, e proteínas internas NP ou M1 para induzir respostas de células T (Rajão; Pérez, 2018).

A região da haste da HA (HA2) é muito mais conservada entre os subtipos virais, diferentemente da região globular da HA (HA1). Os anticorpos contra a HA1 neutralizam a infecção, prevenindo a ligação do vírus aos receptores celulares ou a fusão da membrana. Os anticorpos contra a HA2 normalmente não neutralizam o vírus, mas protegem através da inibição de entrada, inibição da liberação da progênie viral, indução de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) ou da citotoxicidade pelo complemento (Rajão; Pérez, 2018). Em uma infecção pelo IAV, os anticorpos são produzidos principalmente contra a região HA1 e em baixos níveis contra a região HA2 (Corti *et al.*, 2011). Além disso, há regiões específicas na HA1 que são alvos para as vacinas universais, como o local de ligação ao receptor na HA1 (Rajão; Pérez, 2018). Estudos demonstraram que vacinas que possuem HA2 como antígeno protegeram camundongos contra o desafio homólogo (Corti *et al.*, 2011) e heterosubtípico (Steel *et al.*, 2010), e uma vacina com antígeno HA2 e diferentes HA1s protegeu contra o desafio heterólogo (Krammer *et al.*, 2013).

A proteína NA é mais conservada do que a proteína HA do IAV. Os anticorpos contra a NA facilitam a eliminação viral, mediando o reconhecimento e a morte de células infectadas por células efetoras imunológicas através da citotoxicidade mediada por ADCC (Dilillo *et al.*, 2016). Em camundongos vacinados com antígeno NA, observou-se imunidade contra vírus homólogo e proteção parcial contra

infecção heteróloga (Wohlbald *et al.*, 2015). Suínos vacinados com uma vacina de vírus inteiro inativado desenvolveram VAERD ao serem desafiados com um vírus antigenicamente distinto para as proteínas HA e NA, entretanto, o fenômeno VAERD não foi observado no desafio com um vírus com HA não homóloga mas com NA homóloga (Rajão *et al.*, 2016).

Os anticorpos contra a M2e não neutralizam o vírus, mas evitam o brotamento viral, medeiam a morte de células infectadas por células NK ou macrófagos através de ADCC, opsonização Fc ou ativação do complemento (El Bakkouri *et al.*, 2011). A proteína M2e é pouco imunogênica, pois está presente em pequenas quantidades no IAV (Wu *et al.*, 2007). Sendo assim, são utilizadas estratégias para melhorar a imunogenicidade, como uso de adjuvantes, formas multiméricas da M2e, co-imunização com outras vacinas de IAV, e fusão com proteínas transportadoras (Kim *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2017). Uma vacina baseada no peptídeo M2e induziu anticorpos anti-M2e, porém não forneceu proteção contra o desafio do IAV em suínos, indicando que apenas o antígeno M2e não foi suficiente para reduzir os sinais clínicos, lesões ou excreção viral (Opriessnig *et al.*, 2024).

Os CTLs são direcionados principalmente às proteínas internas do IAV, como NP e M1, gerando respostas imunológicas de reação cruzada (Hillaire *et al.*, 2013). As proteínas NP e M possuem epítopos conservados que são compartilhados por vários subtipos do IAV (Lee *et al.*, 2008). Vacinas compostas pelas proteínas internas induziram resposta de células T, bem como reduziram a excreção viral pós-desafio em humanos (Lillie *et al.*, 2012) e em suínos (Morgan *et al.*, 2016). As vacinas indutoras de CTLs auxiliam na redução da gravidade da doença após uma infecção heteróloga, contribuindo para a eliminação viral e restringindo a progressão da doença, uma vez que essas respostas imunes mediadas por células não evitam a infecção. Dessa forma, seriam mais eficientes se utilizadas em complemento às tecnologias que estimulam produção de anticorpos (Rajão; Pérez, 2018).

Protocolos vacinais para influenza em suínos

A vacinação é a principal estratégia de controle da influenza em suínos. De um modo geral, os protocolos vacinais para o IAV em suínos podem ser divididos em: vacinação apenas de leitões, vacinação apenas de matrizes, e vacinação massal do rebanho. A escolha do protocolo a ser utilizado vai depender da fase de produção em que os desafios por influenza sejam maiores, resultando em prejuízos econômicos acentuados, sendo particular para cada sistema de produção. Ainda, particularidades inerentes à plataforma vacinal escolhida podem ser levadas em consideração.

Em leitões a recomendação é vacinar após o desmame, em torno de quatro a oito semanas de idade, após a queda da imunidade passiva, uma vez que a presença de anticorpos maternos para o IAV durante a vacinação interfere no desenvolvimento da imunidade adaptativa. A vacinação em leitões após o desmame os protegerá durante a fase de crescimento e terminação, podendo persistir até a idade de abate (Kitikoon *et al.*, 2006; Loeffen *et al.*, 2003; Markowska-Daniel; Pomorska-Mól; Pejsak, 2011).

Em matrizes, a vacinação é realizada antes do parto, protegendo os leitões da doença clínica durante a fase de maternidade e início da fase de creche. Ainda, a vacinação rotineira de reforço das matrizes antes do parto pode resultar em níveis elevados e duradouros de anticorpos, protegendo não só os leitões, mas também as fêmeas (Van Reeth; Vincent, 2019). Para as fêmeas primíparas recomenda-se vacinar duas vezes antes do parto com intervalo de duas a quatro semanas entre as doses, e para as porcas recomenda-se vacinação de reforço semestral, que geralmente é realizada de três a seis semanas antes do parto (Van Reeth; Ma, 2013; Van Reeth; Vincent, 2019).

Ainda, pode ser realizada a vacinação massal do rebanho, combinando a vacinação de matrizes e leitões. Essa estratégia de vacinação pode ser benéfica em granjas onde o IAV é um problema desde a fase de creche até a fase de terminação (Van Reeth; Vincent, 2019). Contudo, a imunidade passiva prolongada pode interferir no desenvolvimento da imunidade pós-vacinação dos leitões (Van Reeth; Vincent, 2019). Para evitar a interferência dos anticorpos maternos em rebanhos com matrizes com altos níveis de anticorpos por vacinação ou infecção,

a vacinação dos leitões deve ser adiada até a idade de 12 a 16 semanas (Van Reeth; Ma, 2013).

Considerações finais

A infecção causada pelo IAV é considerada um dos principais problemas sanitários na produção de suínos, pelas perdas na produção e pelos potenciais impactos na saúde humana. O entendimento sobre a resposta imune inata, bem como a resposta imune adaptativa humoral e celular pós-infecção, juntamente com a implementação de medidas de prevenção e controle da doença nos rebanhos suínos pela vacinação, são de extrema importância para reduzir o impacto da doença em rebanhos. Novas plataformas vacinais vêm sendo desenvolvidas para suínos, como as vacinas universais que utilizam epítomos conservados a fim de estimular a imunidade cruzada entre os subtipos virais e minimizar a necessidade de atualizações frequentes. Entretanto, o desenvolvimento de vacinas eficazes com amplo espectro de proteção ainda é bastante desafiador, devido à grande diversidade genética e antigênica dos IAVs circulantes em suínos.

Dessa forma, compreender o sistema de defesa anti-influenza do hospedeiro auxiliará na progressão das vacinas efetivas, que são necessárias para controlar a doença. A vacinação de suínos contra o IAV poderá reduzir o impacto da doença em rebanhos suínos, pela redução da transmissão viral entre suínos, e com isso reduzindo a possibilidade de surgimento de novos vírus. Ademais, contribui para a saúde humana, reduzindo a transmissão zoonótica de influenza, e a possibilidade de ocorrência de pandemias.

Referências

- ABENTE, E. J. *et al.* Alphavirus-vectored hemagglutinin subunit vaccine provides partial protection against heterologous challenge in pigs. **Vaccine**, v. 37, n. 11, p. 1533–1539, 2019.
- ALBRECHT, M.; ARCK, P. C. Vertically transferred immunity in neonates: mothers, mechanisms and mediators. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 555, 2020.
- ALLERSON, M. *et al.* The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 500–505, 2013.
- ALLIE, S. R.; RANDALL, T. D. Pulmonary immunity to viruses. **Clinical Science**, v. 131, n. 14, p. 1737–1762, 2017.
- ANDERSON, T. K. *et al.* Swine influenza A viruses and the tangled relationship with humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 11, n. 3, p. a038737, 2021.
- ANDRADE, F. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. **Immunological Reviews**, v. 235, n. 1, p. 128–146, 2010.
- ARKEMA, A. *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocyte activity by fusion-active peptide-containing virosomes. **Vaccine**, v. 18, n. 14, p. 1327–1333, 2000.
- AUBREY, L. *et al.* A bivalent live attenuated influenza virus vaccine protects against drifted H1N2 and H3N2 clinical isolates in swine. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 46, 2022.
- BAHADORAN, A. *et al.* Immune responses to influenza virus and its correlation to age and inherited factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1841, 2016.
- BARRÍA, M. I. *et al.* Localized mucosal response to intranasal live attenuated influenza vaccine in adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 115–124, 2013.
- BASHA, S. *et al.* Comparison of antibody and T-cell responses elicited by licensed inactivated- and live-attenuated influenza vaccines against H3N2 hemagglutinin. **Human Immunology**, v. 72, n. 6, p. 463–469, 2011.
- BAUDON, E. *et al.* Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: a systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179044, 2017.
- BEDI, R.; BAYLESS, N. L.; GLANVILLE, J. Challenges and progress in designing broad-spectrum vaccines against rapidly mutating viruses. **Annual Review of Biomedical Data Science**, v. 6, p. 419–441, 2023.
- BERNASCONI, V. *et al.* Mucosal vaccine development based on liposome technology. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, n. 5482087, 2016.
- BORGGREN, M. *et al.* A polyvalent influenza DNA vaccine applied by needle-free intradermal delivery induces cross-reactive humoral and cellular immune responses in pigs. **Vaccine**, v. 34, n. 32, p. 3634–3640, 2016.
- BOSWORTH, B. *et al.* Replicon particle vaccine protects swine against influenza. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 6, p. e99–e103, 2010.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa no 31, de 20 de maio de 2003**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-no-31-de-20-05-2003.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Decreto no 5.053, de 22 de abril de 2004**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/decreto-lei-e-lei/decreto-federal-no-5053-de-22-04-2004.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília: MAPA/ACS, 2012. 401 p.
- BRAUCHER, D. R. *et al.* Intranasal vaccination with replication-defective adenovirus type 5 encoding influenza virus hemagglutinin elicits protective immunity to homologous challenge and partial protection to heterologous challenge in pigs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 11, p. 1722–1729, 2012.
- BRAUN, M. *et al.* Virus-like particles induce robust human T-helper cell responses. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 330–340, 2012.
- BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 29–46, 2000.
- BUSQUETS, N. *et al.* Experimental infection with H1N1 European swine influenza virus protects pigs from an infection with the 2009 pandemic H1N1 human influenza virus. **Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 74, 2010.
- CADOR, C. *et al.* Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. **Veterinary Research**, v. 47, n. 86, 2016.
- CAMPOS, A. C. A. *et al.* Bat influenza A(HL18NL11) virus in fruit bats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 333–337, 2019.
- CAO, X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 35–50, 2016.
- CHARERTANTANAKUL, W. Adjuvants for swine vaccines: mechanisms of actions and adjuvant effects. **Vaccine**, v. 38, n. 43, p. 6659–6681, 2020.
- CHEN, X. *et al.* Host immune response to influenza A virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 320, p. 1–13, 2018.
- CHENG, X. *et al.* Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 4, p. 594–602, 2013.
- CHOI, Y. S.; BAUMGARTH, N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 13, p. 3053–3064, 2008.
- CIMICA, V.; GALARZA, J. M. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. **Clinical Immunology**, v. 183, p. 99–108, 2017.
- CORREIA, V.; ABECASIS, A. B.; REBELO-DE-ANDRADE, H. Molecular footprints of selective pressure in the neuraminidase gene of currently circulating human influenza subtypes and lineages. **Virology**, v. 522, p. 122–130, 2018.
- CORTI, D. *et al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. **Science**, v. 333, n. 6044, p. 850–856, 2011.
- CRISCI, E. *et al.* Review: influenza virus in pigs. **Molecular Immunology**, v. 55, n. 3–4, p. 200–211, 2013.
- DE, A. Molecular evolution of hemagglutinin gene of influenza A virus. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 101–118, 2018.
- DE BRUIN, T. G. M. *et al.* Cytolytic function of pseudorabies virus-stimulated porcine CD4+ CD8dull+ lymphocytes. **Viral Immunology**, v. 13, n. 4, p. 511–520, 2000.
- DE VEER, M.; MEEUSEN, E. New developments in vaccine research - unveiling the secret of vaccine adjuvants. **Discovery Medicine**, v. 12, n. 64, p. 195–204, 2011.
- DE VLEESCHAUWER, A. R. *et al.* Cross-protection between antigenically distinct H1N1 swine influenza viruses from Europe and North America. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 5, n. 2, p. 115–122, 2011.
- DEBLANC, C. *et al.* Maternally-derived antibodies do not inhibit swine influenza virus replication in piglets but decrease excreted virus infectivity and impair post-infectious immune responses. **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 142–152, 2018.
- DIEBOLD, S. S. *et al.* Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1529–1531, 2004.
- DIEBOLD, S. S. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 7, p. 813–823, 2008.

- DILILLO, D. J. *et al.* Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 2, p. 605–610, 2016.
- DUNBAR, P. *et al.* Pulmonary monocytes promote the establishment of lung tissue-resident CD8 T cell memory following influenza infection. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 1, p. 153.18, 2017.
- EKIERT, D. C. *et al.* Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 246–251, 2009.
- EL BAKKOURI, K. *et al.* Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 1022–1031, 2011.
- ERTL, H. C. Viral vectors as vaccine carriers. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 1–8, 2016.
- EWER, K. J. *et al.* Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. **Current Opinion in Immunology**, v. 41, p. 47–54, 2016.
- FONSECA, F. N. *et al.* Immunological profile of mice immunized with a polyvalent virosome-based influenza vaccine. **Virology Journal**, v. 20, n. 187, 2023.
- FORBERG, H. *et al.* Early responses of natural killer cells in pigs experimentally infected with 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100619, 2014.
- FOTOUHI, F. *et al.* Adjuvant use of the NKT cell agonist alpha-galactosylceramide leads to enhancement of M2-based DNA vaccine immunogenicity and protective immunity against influenza A virus. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1251–1260, 2017.
- GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28403–28409, 2010.
- GARTEN, R. J. *et al.* Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 197–201, 2009.
- GAUGER, P. C. *et al.* Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (δ -cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2712–2719, 2011.
- GAUGER, P. C. *et al.* Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 900–912, 2012.
- GAUGER, P. C. *et al.* Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A(H1N1)pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. **Virology**, v. 471–473, p. 93–104, 2014.
- GAYMARD, A. *et al.* Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 12, p. 975–983, 2016.
- GEURTS VAN KESSEL, C. H. *et al.* Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 7, p. 1621–1634, 2008.
- GONEAU, L. W. *et al.* Zoonotic influenza and human health—part 1: virology and epidemiology of zoonotic influenzas. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 10, p. 37, 2018.
- GORRES, J. P. *et al.* DNA vaccination elicits protective immune responses against pandemic and classic swine influenza viruses in pigs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1987–1995, 2011.
- GRANT, E. J. *et al.* Human influenza viruses and CD8+ T cell responses. **Current Opinion in Virology**, v. 16, p. 132–142, 2016.
- GUO, H.; KUMAR, P.; MALARKANNAN, S. Evasion of natural killer cells by influenza virus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 189–194, 2011.
- GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 505–517, 2007.
- HAACH, V. *et al.* A polyvalent virosomal influenza vaccine induces broad cellular and humoral immunity in pigs. **Virology Journal**, v. 20, n. 181, 2023.
- HAMPSON, A. W. Influenza virus antigens and ‘antigenic drift’. **Perspectives in Medical Virology**, v. 7, p. 49–85, 2002.
- HEER, A. K. *et al.* CD4+ and CD8+ T cells exhibit differential requirements for CCR7-mediated antigen transport during influenza infection. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 6984–6994, 2008.
- HEINEN, P. P. *et al.* Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. **Viral Immunology**, v. 13, n. 2, p. 237–247, 2000.
- HEINEN, P. P.; DE BOER-LUIJTZE, E. A.; BIANCHI, T. J. Respiratory and systemic humoral and cellular immune

- responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. **Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 11, p. 2697–2707, 2001.
- HERNANDEZ, L. A.; MILLER, C. L.; VAUGHN, E. M. Particle and subunit-based hemagglutinin vaccines provide protective efficacy against H1N1 influenza in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 191, p. 35–43, 2016.
- HERZOG, C. *et al.* Eleven years of Inflexal® V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. **Vaccine**, v. 27, p. 4381–4387, 2009.
- HILLAIRE, M. L. B. *et al.* Human T-cells directed to seasonal influenza A virus cross-react with 2009 pandemic influenza A (H1N1) and swine-origin triple-reassortant H3N2 influenza viruses. **Journal of General Virology**, v. 94, n. Pt 3, p. 583–592, 2013.
- HINTZEN, G. *et al.* Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7346–7354, 2006.
- HISCOTT, J. *et al.* MasterCARD: a priceless link to innate immunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 53–56, 2006.
- HO, A. W. S. *et al.* Lung CD103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto MHC class I for presentation to CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 11, p. 6011–6021, 2011.
- HOFT, D. F. *et al.* Comparisons of the humoral and cellular immune responses induced by live attenuated influenza vaccine and inactivated influenza vaccine in adults. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 1, p. e00414-16, 2017.
- HOLT, P. G. *et al.* Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 2, p. 142–152, 2008.
- HOLZER, B. *et al.* T and B cell immune responses to influenza viruses in pigs. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 98, 2019.
- HUCKRIEDE, A. *et al.* The virosome concept for influenza vaccines. **Vaccine**, v. 23, n. S1, p. S38, 2005.
- HUMPHREYS, I. R.; SEBASTIAN, S. Novel viral vectors in infectious diseases. **Immunology**, v. 153, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus taxonomy**: 2022 release. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy>>. Acesso em: 25 set. 2023.
- JANKE, B. H. Diagnosis of swine influenza. **Swine Health and Production**, v. 8, n. 2, p. 79–84, 2000.
- JOSHI, L. R. *et al.* Protective efficacy of an orf virus-vector encoding the hemagglutinin and the nucleoprotein of influenza A virus in swine. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 747574, 2021.
- JUNG, H. E.; LEE, H. K. Host protective immune responses against influenza A virus infection. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 504, 2020.
- KAMMER, A. R. *et al.* A new and versatile virosomal antigen delivery system to induce cellular and humoral immune responses. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7065–7074, 2007.
- KANG, S. M.; KIM, M. C.; COMPANS, R. W. Virus-like particles as universal influenza vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 8, p. 995–1007, 2012.
- KAPPES, M. A. *et al.* Vaccination with NS1-truncated H3N2 swine influenza virus primes T cells and confers cross-protection against an H1N1 heterosubtypic challenge in pigs. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 280–288, 2012.
- KARLSSON, I. *et al.* Protective effect of a polyvalent influenza DNA vaccine in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 195, p. 25–32, 2018.
- KESHAVARZ, M. *et al.* Influenza vaccine: where are we and where do we go? **Reviews in Medical Virology**, v. 29, n. 1, p. e2014, 2019.
- KHATRI, M. *et al.* Swine influenza H1N1 virus induces acute inflammatory immune responses in pig lungs: a potential animal model for human H1N1 influenza virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11210–11218, 2010.
- KIM, J. H.; JACOB, J. DNA vaccines against influenza viruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 333, p. 197–210, 2009.
- KIM, M. C. *et al.* Multiple heterologous M2 extracellular domains presented on virus-like particles confer broader and stronger M2 immunity than live influenza A virus infection. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 328–335, 2013.
- KITIKOON, P. *et al.* The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 117–128, 2006.

- KITIKOON, P. *et al.* Swine influenza matrix 2 (M2) protein contributes to protection against infection with different H1 swine influenza virus (SIV) isolates. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 523–531, 2009.
- KITIKOON, P. *et al.* Swine influenza virus vaccine serologic cross-reactivity to contemporary US swine H3N2 and efficacy in pigs infected with an H3N2 similar to 2011-2012 H3N2v. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 7, suppl. 4, p. 32–41, 2013.
- KLEIN, E. Y. *et al.* Influenza A H1N1 pandemic strain evolution - divergence and the potential for antigenic drift variants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93632, 2014.
- KRAMMER, F. *et al.* Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk-specific antibodies. **Journal of Virology**, v. 87, n. 12, p. 6542–6550, 2013.
- KRAMMER, F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 383–397, 2019.
- KREIJTZ, J. H. C. M.; FOUCHIER, R. A. M.; RIMMELZWAAN, G. F. Immune responses to influenza virus infection. **Virus Research**, v. 162, n. 1–2, p. 19–30, 2011.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, 2011.
- KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 776–788, 2008.
- LANDRETH, S. *et al.* A bivalent live attenuated influenza virus vaccine protects against H1N2 and H3N2 viral infection in swine. **Veterinary Microbiology**, v. 253, p. 108968, 2021.
- LARSEN, D. L. *et al.* Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 117–131, 2000.
- LARSEN, D. L.; OLSEN, C. W. Effects of DNA dose, route of vaccination, and coadministration of porcine interleukin-6 DNA on results of DNA vaccination against influenza virus infection in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 5, p. 653–659, 2002.
- LAVIER, W. G.; WEBSTER, R. G. Preparation and immunogenicity of a purified influenza virus haemagglutinin and neuraminidase subunit vaccine. **Postgraduate Medical Journal**, v. 52, p. 373–378, 1976.
- LE GOFFIC, R. *et al.* Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 6, p. 0526–0535, 2006.
- LEE, B. W. *et al.* Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 2–3, p. 241–250, 1995.
- LEE, J. H.; GRAMER, M. R.; JOO, H. S. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 3, p. 207–212, 2007.
- LEE, L. Y. H. *et al.* Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3478–3490, 2008.
- LEE, Y. N. *et al.* Co-immunization with tandem repeat heterologous M2 extracellular proteins overcomes strain-specific protection of split vaccine against influenza A virus. **Antiviral Research**, v. 122, p. 82–90, 2015.
- LEWIS, N. S. *et al.* The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. **eLife**, v. 5, n. e12217, p. 1–17, 2016.
- LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 3, p. 313–329, 2016.
- LI, X. *et al.* Influenza virus-like particles harboring H9N2 HA and NA proteins induce a protective immune response in chicken. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 11, n. 6, p. 518–524, 2017.
- LILLIE, P. J. *et al.* Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 1, p. 19–25, 2012.
- LOEFFEN, W. L. A. *et al.* Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 1–2, p. 23–35, 2003.
- LOEFFEN, W. L. A. *et al.* Vaccination with a soluble recombinant hemagglutinin trimer protects pigs against a challenge with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1545–1550, 2011.
- LOVING, C. L. *et al.* Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs. **Vaccine**, v. 30, n. 40, p. 5830–5838, 2012.
- LOVING, C. L. *et al.* Efficacy in pigs of inactivated and live attenuated influenza virus vaccines against infection and transmission of an emerging H3N2 similar to the

- 2011–2012 H3N2v. **Journal of Virology**, v. 87, n. 17, p. 9895–9903, 2013.
- LOW, J. G. H. *et al.* Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 5041–5048, 2014.
- LOWEN, A. C. It's in the mix: reassortment of segmented viral genomes. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. e1007200, 2018.
- LUKENS, M. V. *et al.* Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node. **Journal of Virology**, v. 83, n. 14, p. 7235–7243, 2009.
- MA, W.; LOVING, C. L.; DRIVER, J. P. From snout to tail: a brief review of influenza virus infection and immunity in pigs. **Journal of Immunology**, v. 211, n. 8, p. 1187–1194, 2023.
- MA, W.; RICHT, J. A. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 81–96, 2010.
- MAI, Z. *et al.* Protection efficacy of the H1 and H3 bivalent virus-like particle vaccine against swine influenza virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 280, p. 109719, 2023.
- MAIR, K. H. *et al.* Porcine CD3(+)NKp46(+) lymphocytes have NK-cell characteristics and are present in increased frequencies in the lungs of influenza-infected animals. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 263, 2016.
- MALIK, G.; ZHOU, Y. Innate immune sensing of influenza A virus. **Viruses**, v. 12, n. 7, p. 755, 2020.
- MARKOWSKA-DANIEL, I.; POMORSKA-MÓL, M.; PEJSKAK, Z. The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 1–2, p. 81–86, 2011.
- MARTINI, V. *et al.* Spatial, temporal and molecular dynamics of swine influenza virus-specific CD8 tissue resident memory T cells. **Mucosal Immunology**, v. 15, n. 3, p. 428–442, 2022.
- MASIC, A. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of an elastase-dependent live attenuated swine influenza virus vaccine administered intranasally in pigs. **Vaccine**, v. 28, n. 43, p. 7098–7108, 2010.
- MASIC, A.; BABIUK, L. A.; ZHOU, Y. Reverse genetics-generated elastase-dependent swine influenza viruses are attenuated in pigs. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 2, p. 375–385, 2009.
- MOHSEN, M. O. *et al.* Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 34, p. 123–132, 2017.
- MORGAN, S. B. *et al.* Aerosol delivery of a candidate universal influenza vaccine reduces viral load in pigs challenged with pandemic H1N1 virus. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 12, p. 5014–5023, 2016.
- NELSON, M. I. *et al.* Global migration of influenza A viruses in swine. **Nature Communications**, v. 6, n. 6696, p. 1–11, 2015.
- NELSON, M. I.; VINCENT, A. L. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 142–153, 2015.
- NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Transmission of influenza A viruses. **Virology**, v. 479–480, p. 234–246, 2015.
- NEURATH, A. R. *et al.* The effect of nonaqueous solvents on the quaternary structure of viruses: a procedure for the simultaneous concentration, purification and disruption of influenza viruses. **Microbios**, v. 4, n. 14, p. 145–150, 1971.
- NIU, J.; MENG, G. Roles and mechanisms of NLRP3 in influenza viral infection. **Viruses**, v. 15, n. 6, p. 1339, 2023.
- OPRIESSNIG, T. *et al.* An experimental universal swine influenza A virus (IAV) vaccine candidate based on the M2 ectodomain (M2e) peptide does not provide protection against H1N1 IAV challenge in pigs. **Vaccine**, v. 42, n. 2, p. 220–228, 2024.
- OUYANG, J. *et al.* NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through suppression of interferon-stimulated gene transcription. **Cell Host and Microbe**, v. 16, n. 5, p. 616–626, 2014.
- PARDI, N. *et al.* mRNA vaccines - a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 4, p. 261–279, 2018.
- PARYS, A. *et al.* Alternating 3 different influenza vaccines for swine in Europe for a broader antibody response and protection. **Veterinary Research**, v. 53, n. 1, p. 44, 2022.
- PAUDYAL, B. *et al.* Fc-mediated functions of porcine IgG subclasses. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 903755, 2022.
- PENA, L. *et al.* Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. **Journal of Virology**, v. 85, n. 1, p. 456–469, 2011.

- PENA, L. *et al.* Strain-dependent effects of PB1-F2 of triple-reassortant H3N2 influenza viruses in swine. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 10, p. 2204–2214, 2012.
- PETRO-TURNQUIST, E. *et al.* Adenoviral-vectored epigraph vaccine elicits robust, durable, and protective immunity against H3 influenza A virus in swine. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1143451, 2023.
- PETSCH, B. *et al.* Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 1210–1216, 2012.
- PILLET, S. *et al.* A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. **Clinical Immunology**, v. 168, p. 72–87, 2016.
- PIPKIN, M. E. *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 79–90, 2010.
- PIZZOLLA, A. *et al.* Resident memory CD8+ T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection. **Science Immunology**, v. 2, n. 12, p. eaam6970, 2017.
- PLIASAS, V. C. *et al.* A novel neuraminidase virus-like particle vaccine offers protection against heterologous H3N2 influenza virus infection in the porcine model. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 915364, 2022.
- PYO, H. M. *et al.* Pandemic H1N1 influenza virus-like particles are immunogenic and provide protective immunity to pigs. **Vaccine**, v. 30, n. 7, p. 1297–1304, 2012.
- QIU, Y.; DE HERT, K.; VAN REETH, K. Cross-protection against European swine influenza viruses in the context of infection immunity against the 2009 pandemic H1N1 virus: studies in the pig model of influenza. **Veterinary Research**, v. 46, p. 105, 2015.
- RAJÃO, D. S. *et al.* Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 30–36, 2013.
- RAJÃO, D. S. *et al.* Pathogenesis and vaccination of influenza A virus in swine. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 385, p. 307–326, 2014.
- RAJÃO, D. S. *et al.* Vaccine-associated enhanced respiratory disease is influenced by haemagglutinin and neuraminidase in whole inactivated influenza virus vaccines. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 7, p. 1489–1499, 2016.
- RAJÃO, D. S. *et al.* Live attenuated influenza A virus vaccine expressing an IgA-inducing protein protects pigs against replication and transmission. **Frontiers in Virology**, v. 3, p. 1042724, 2023.
- RAJÃO, D. S.; PÉREZ, D. R. Universal vaccines and vaccine platforms to protect against influenza viruses in humans and agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 123, p. 1–21, 2018.
- RANGEL-MORENO, J. *et al.* B cells promote resistance to heterosubtypic strains of influenza via multiple mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 1, p. 454–463, 2008.
- SANDBULTE, M. R. *et al.* Optimal use of vaccines for control of influenza A virus in swine. **Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 22–73, 2015.
- SCHMIDT, M. E.; VARGA, S. M. The CD8 T cell response to respiratory virus infections. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 678, 2018.
- SHARMA, A. *et al.* Detection of live attenuated influenza vaccine virus and evidence of reassortment in the U.S. swine population. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 301–311, 2020.
- SHAW, M. L.; PALESE, P. Orthomyxoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2013. p. 1151–1185.
- SHORT, K. R. *et al.* One health, multiple challenges: the inter-species transmission of influenza A virus. **One Health**, v. 1, p. 1–13, 2015.
- SISTERÉ-ORÓ, M. *et al.* DNA vaccine based on conserved HA-peptides induces strong immune response and rapidly clears influenza virus infection from vaccinated pigs. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e0222201, 2019.
- SOEMA, P. C. *et al.* Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 251–263, 2015a.
- SOEMA, P. C. *et al.* Influenza T-cell epitope-loaded virosomes adjuvanted with CpG as a potential influenza vaccine. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 4, p. 1505–1515, 2015b.
- SOLÓRZANO, A. *et al.* Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7535–7543, 2005.
- SOUZA, C. K. *et al.* The type of adjuvant in whole inactivated influenza A virus vaccines impacts vaccine-associated enhanced respiratory disease. **Vaccine**, v. 36, n. 41, p. 6103–6110, 2018.

- SRIDHAR, S. Heterosubtypic T-cell immunity to influenza in humans: challenges for universal T-cell influenza vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 195, 2016.
- STEEL, J. *et al.* Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. **mBio**, v. 1, n. 1, p. e00018-10, 2010.
- SUN, J. *et al.* Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p. 277–284, 2009.
- SWAIN, S. L.; MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 136–148, 2012.
- TANG, X. *et al.* Recombinant adenoviruses displaying matrix 2 ectodomain epitopes on their fiber proteins as universal influenza vaccines. **Journal of Virology**, v. 91, n. 7, p. e02462-16, 2017.
- TONG, S. *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012.
- TONG, S. *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.
- TUMPEY, T. M. *et al.* Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14933–14944, 2005.
- TUTYKHINA, I. L. *et al.* Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, p. 331–341, 2011.
- VALERO-PACHECO, N. *et al.* Antibody persistence in adults two years after vaccination with an H1N1 2009 pandemic influenza virus-like particle vaccine. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0150146, 2016.
- VAN BRAECKEL-BUDIMIR, N.; HARTY, J. T. Influenza-induced lung Trm: not all memories last forever. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n. 8, p. 651–655, 2017.
- VAN DE SANDT, C. E.; KREIJTZ, J. H. C. M.; RIMMELZWAAN, G. F. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. **Viruses**, v. 4, n. 9, p. 1438–1476, 2012.
- VAN DOMSELAAR, R.; BOVENSCHEN, N. Cell death-independent functions of granzymes: hit viruses where it hurts. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 5, p. 301–314, 2011.
- VAN GISBERGEN, K. P. J. M. *et al.* The costimulatory molecule CD27 maintains clonally diverse CD8+ T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants. **Immunity**, v. 35, n. 1, p. 97–108, 2011.
- VAN REETH, K. *et al.* Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. **Vaccine**, v. 21, n. 13–14, p. 1375–1381, 2003.
- VAN REETH, K.; LABARQUE, G.; PENSAERT, M. Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses. **Viral Immunology**, v. 19, n. 3, p. 373–382, 2006.
- VAN REETH, K.; MA, W. Swine influenza virus vaccines: to change or not to change - that's the question. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 173–200, 2013.
- VAN REETH, K.; VAN GUCHT, S.; PENSAERT, M. Investigations of the efficacy of European H1N1- and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. **The Veterinary Record**, v. 153, n. 1, p. 9–13, 2003.
- VAN REETH, K.; VINCENT, A. L. Influenza viruses. In: ZIMMERMAN, J. J. *et al.* (Eds.). **Diseases of Swine**. 11th. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2019. p. 576–593.
- VAN REETH, K.; VINCENT, A. L.; LAGER, K. M. Vaccines and vaccination for swine influenza: differing situations in Europe and the USA. In: SWAYNE, D. E. (Ed.). **Animal Influenza**. 2nd. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016. p. 480–501.
- VANDER VEEN, R. L. *et al.* Haemagglutinin and nucleoprotein replicon particle vaccination of swine protects against the pandemic H1N1 2009 virus. **Veterinary Record**, v. 173, n. 14, p. 344, 2013.
- VANDER VEEN, R. L.; HARRIS, D. L. H.; KAMRUD, K. I. Alphavirus replicon vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2012.
- VAZQUEZ-PAGAN, A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Serological responses to influenza vaccination during pregnancy. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2305, 2021.
- VINCENT, A. L. *et al.* Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. **Vaccine**, v. 25, n. 47, p. 7999–8009, 2007.
- VINCENT, A. L. *et al.* Failure of protection and enhanced pneumonia with a US H1N2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine H1N1 vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 310–323, 2008a.
- VINCENT, A. L. *et al.* Swine influenza viruses: a North American perspective. **Advances in Virus Research**, v. 72, p. 127–154, 2008b.

- VINCENT, A. L. *et al.* Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. **Vaccine**, v. 28, n. 15, p. 2782–2787, 2010.
- VINCENT, A. L. *et al.* Influenza A virus vaccines for swine. **Veterinary Microbiology**, v. 206, p. 35–44, 2017.
- VINCENT, A. L.; ANDERSON, T. K.; LAGER, K. M. A brief introduction to influenza A virus in swine. **Methods in Molecular Biology**, v. 2123, p. 249–271, 2020.
- VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 388–400, 2015.
- WAFFARN, E. E.; BAUMGARTH, N. Protective B cell responses to flu—no fluke! **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 3823–3829, 2011.
- WANG, S. *et al.* Transport of influenza virus neuraminidase (NA) to host cell surface is regulated by ARHGAP21 and Cdc42 proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 9804–9816, 2012.
- WESLEY, R. D.; TANG, M.; LAGER, K. M. Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. **Vaccine**, v. 22, n. 25–26, p. 3427–3434, 2004.
- WHITMIRE, J. K.; TAN, J. T.; WHITTON, J. L. Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1053–1059, 2005.
- WHO (World Health Organization). Vaccines against influenza: WHO position paper – May 2022. **Weekly Epidemiological Record**, v. 97, n. 19, p. 185–208, 2022.
- WILSCHUT, J. Influenza vaccines: the virosome concept. **Immunology Letters**, v. 122, n. 2, p. 118–121, 2009.
- WOHLBOLD, T. J. *et al.* Vaccination with adjuvanted recombinant neuraminidase induces broad heterologous, but not heterosubtypic, cross-protection against influenza virus infection in mice. **mBio**, v. 6, n. 2, p. e02556, 2015.
- WU, F. *et al.* Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8868–8873, 2007.
- WU, T. *et al.* Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 2, p. 215–224, 2014a.
- WU, Y. *et al.* Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 183–191, 2014b.
- YAMAYOSHI, S.; KAWAOKA, Y. Current and future influenza vaccines. **Nature Medicine**, v. 25, n. 2, p. 212–220, 2019.
- ZANELLA, J. R. C. *et al.* Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1–2, p. 118–122, 2015.
- ZENS, K. D.; CHEN, J. K.; FARBER, D. L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. **JCI Insight**, v. 1, n. 10, p. e85832, 2016.
- ZHANG, C. *et al.* Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 594, 2019.
- ZHANG, H. *et al.* Viral and host factors required for avian H5N1 influenza A virus replication in mammalian cells. **Viruses**, v. 5, n. 6, p. 1431–1446, 2013.
- ZHANG, J.; GAUGER, P.; HARMON, K. Swine Influenza A Virus. In: LIU, D. (Ed.). **Molecular Detection of Animal Viral Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 399–406.
- ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. Factors that influence the immune response to vaccination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. e00084–18, 2019.
- ZUCKERMANN, F. A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1–2, p. 55–66, 1999.
- ZURBRIGGEN, R. Immunostimulating reconstituted influenza virosomes. **Vaccine**, v. 21, n. 9–10, p. 921–924, 2003.

