



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INGRID ANDRÊSSA DE MOURA

**SISTEMAS DE ENTREGA E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
DE VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Recife
2022

INGRID ANDRÊSSA DE MOURA

**SISTEMAS DE ENTREGA E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
DE VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Dra. Anna Jéssica Duarte Silva

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Moura, Ingrid Andrêssa de.

Sistemas de entrega e sua influência na resposta imunológica de vacinas de ácidos nucleicos / Ingrid Andrêssa de Moura. - Recife, 2022.
65 : il., tab.

Orientador(a): Antonio Carlos de Freitas

Cooorientador(a): Anna Jéssica Duarte Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

1. resposta imune. 2. adjuvantes. 3. transportadores. 4. DNA. 5. RNA. I. Freitas , Antonio Carlos de . (Orientação). II. Duarte Silva, Anna Jéssica . (Cooorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

INGRID ANDRÊSSA DE MOURA

**SISTEMAS DE ENTREGA E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
DE VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do curso
de Bacharelado em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à
obtenção do título em Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/08/22

Nota: _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador) /
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

MSc. Larissa Silva de Macêdo (1º Titular) /
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

MSc. Georon Ferreira de Sousa (2º Titular) /
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico esse trabalho a minha mãe e ao meu pai,
que nunca hesitaram em investir na minha educação
e sempre me encorajaram a ser quem sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo e me dar sabedoria e capacidade para realizar esta tarefa.

Agradeço aos meus pais, fonte de constante incentivo, carinho e amor. Se eu sei tudo o que sei hoje é por causa deles. Minha mãe, minha rainha, uma cachoeira de amor, empatia, simpatia e coragem. Meu pai, meu herói, parceiro de filmes, enciclopédia humana, sempre atencioso e sem medir esforços para me ajudar.

Ao meu orientador Dr. Antonio Carlos de Freitas, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no LEMTE, por acreditar em mim e ser uma grande fonte de inspiração.

Ao minha Co-orientadora, Dra. Anna Jéssica Duarte Silva por me ajudar em cada passo do trabalho. Sua motivação e ajuda foi o que me ajudou a concluir esta tarefa com mais calma e segurança.

Agradeço a todas as pessoas do LEMTE por me encorajarem, me orientarem e estarem lá para me fortalecer com confiança todas as vezes que me senti fraca ou desanimada. Vocês foram essenciais para me mostrar que também posso parar por um momento e relaxar com boas risadas e conversas aleatórias.

A todos os amigos, principalmente a minha amiga Lorena que nesses últimos anos sempre escutou e entendeu as minhas loucuras e compartilhou as dela comigo. A Alícia Lira, Allícyia Dias, Tainah Guerra, Geisa Maria, Leonardo Carvalho, Viviane Albuquerque, Débora Brígida e a todos os amigos que fiz ao longo da graduação e com os quais compartilhei bons momentos e conhecimento.

Também gostaria de expressar minha gratidão a todos aqueles que, direta e indiretamente, desempenharam um papel na realização deste trabalho.

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você lembrar de acender a luz.”
(Alvo Dumbledore)

RESUMO

As vacinas de ácidos nucleico são plataformas seguras, rápidas, fáceis de fabricar e capazes de evocar respostas celulares e humorais eficientes tanto em estratégias profiláticas quanto terapêuticas. No entanto, são menos imunogênicas e estáveis que as abordagens convencionais, necessitando de otimização por moléculas e estruturas capazes de proteger o material genético e favorecer a indução de respostas imunológicas. Uma forma de otimização atualmente aplicada consiste na utilização de sistemas de entrega para permitir a captação específica do antígeno e ajudar a modular a resposta imunológica. Dessa forma, esta revisão sistemática objetiva discutir a influência desses diferentes sistemas nas respostas geradas por vacinas de ácidos nucleicos, avaliando sua eficácia, mecanismo, vias de administração, vantagens e limitações. Para isso, foi executada uma pesquisa bibliográfica e transversal por meio de artigos científicos publicados em meios eletrônicos nas bases de dados: PubMed, Embase, Science Direct e Google Scholar. Após a leitura e aplicação dos critérios adotados, restaram 84 artigos, sendo 4 ensaios clínicos, 19 pré-clínicos e 61 revisões. Mediante a pesquisa realizada, foi observado que para garantir a estabilidade e o transporte das vacinas de ácidos nucleicos até seus respectivos compartimentos de síntese proteica, sistemas de entrega baseados em lipídeos, polímeros e microrganismos são os mais utilizados. Porém, fatores como tamanho, carga, reações imunes não desejadas, reconhecimento por receptores e vias de administração influenciam na interação com os ácidos nucleicos, na forma como são percebidos por células imunes e na geração de inflamação e efeitos citotóxicos. Sendo assim, durante o projeto de elaboração de uma vacina é importante considerar o tipo de sistema de entrega a ser utilizado, seu custo-benefício, características estruturais, impacto na resposta imunológica e o efeito final almejado para que as construções gerem respostas imunes ideais.

Palavras-chave: resposta imune; adjuvantes; transportadores; DNA; RNA;

ABSTRACT

Nucleic acid vaccines are safe, fast, and easy to manufacture platforms capable of evoking efficient cellular and humoral responses in both prophylactic and therapeutic strategies. However, they are less immunogenic and less stable than conventional approaches, requiring optimization by molecules and structures capable of protecting the genetic material and favouring the induction of immune responses. One form of optimization currently applied is the use of delivery systems to allow specific antigen uptake and help modulate the immune response. Thus, this systematic review aims to discuss the influence of these different systems on the responses generated by nucleic acid vaccines, evaluating their efficacy, mechanism, routes of administration, advantages, and limitations. Bibliographic and transversal research was carried out through scientific articles published in electronic media in the databases: PubMed, Embase, Science Direct, and Google Scholar. After reading and applying the adopted criteria, 84 articles remained, being 4 clinical trials, 19 pre-clinical and 61 reviews. Through the research carried out, it was observed that to ensure the stability and transport of nucleic acid vaccines to their respective protein synthesis compartments, delivery systems based on lipids, polymers, and microorganisms are the most commonly used. However, factors such as size, load, unwanted immune reactions, recognition by receptors, and routes of administration influence the interaction with nucleic acids, the way they are perceived by immune cells, and the generation of inflammation and cytotoxic effects. Therefore, during the design of a vaccine, it is crucial to consider the type of delivery system to be used, its cost-effectiveness, structural characteristics, impact on the immune response, and the final effect desired for the constructs to generate optimal immune responses.

Keywords: immune response; adjuvants; carriers; DNA; RNA;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Balanço das respostas imunes adaptativas humorais e mediadas por células frente à vacinação.	15
Figura 2	Composição estrutural das vacinas de ácidos nucleicos	18
Figura 3	Diagrama de fluxo PRISMA adaptado para a triagem e seleção dos estudos.	28
Figura 4	Composição dos Sistemas baseados em Lipídeos	34
Figura 5	Ativação de vias imunológicas geradas por vacinas gênicas com sistemas de entrega	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de ensaios clínicos e pré-clínicos recentes de vacinas de DNA com adjuvantes imunomoduladores.....	24
Tabela 2	Estudos recentes de vacinas de ácidos nucleicos com sistemas de entrega baseados em lipídeos, polímeros e microrganismos.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Copolímero em Blocos anfifílicos
APC	Células apresentadora de antígeno
bmRNA	mRNA não amplificador modificado por base
CPMV	Vírus do mosaico do caupi
DAMPs	Damage-associated molecular pattern (Padrões Moleculares Associados a Danos)
DDA	Dimetildioctadecilamônio
DNA	DeoxyribonucleicAcid (Ácido desoxirribonucléico)
DOPE	1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOTAP	1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamônio
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleiloxi) cloreto de propil]-N,N,Ntrimetilamônio
DTMUV	Duck Tembusuvirus
FDA	Food and Drug Administration
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GRAS	Generally Recognized As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
HCV	Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)
HIV	Human immunodeficiency vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPV	Human papilomavírus (Papilomavírus Humano)
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
IFN- γ	Interferon gamma
LAB	Bactérias do Ácido Lático
LNPs	Nanopartículas lipídicas
LPPs	Lipopoliplexos
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC	Linfócito T citotóxico
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC II	Complexo maior de histocompatibilidade de classe II
MPL	Monophosphoryl Lipid A (Monofosforil Lipídio A)
mRNA	RNA mensageiro

NE	Nanoemulsões
NKs	Natural killers
NLRs	NOD-like receptors (Receptores do tipo NOD)
nsPs	Proteínas não estruturais de alfavírus
ORF	Open Reading Frame (Fase de leitura aberta)
PAMAM	Poli (amidoamina)
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern (Padrões moleculares associados a patógenos)
PDMAEMA	Poli[2- (dimetilamino)etilmetacrilato]
PEI	Polietilenoimina
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLL	Polylysine (polilisina)
PLO	Poly(L-ornithine) (poli-L-ornitina)
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (Itens de Relatórios preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises)
PRRs	Pattern recognition receptors (Receptores de reconhecimento padrão)
PVNPs	Nanopartículas de vírus de plantas
P β AE	Poli(β -amino éster
RLRs	RIG-like receptors (Receptores do tipo RIG)
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
saRNA	RNA mensageiro auto-amplificador
shRNA	RNA em gancho curto
siRNA	RNA interferente pequeno
Tfh	Linfócitos T auxiliares foliculares
TLR	Toll-like receptors (Receptores do tipo Toll)
Treg	Célula T reguladora
UTRs	Untranslated regions (Regiões não traduzidas)
VLP	Partícula semelhante a vírus
VME	Vesículas de membrana externa
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 VACINAS PROFILÁTICAS E TERAPÊUTICAS: PROTEÇÃO CONTRA AGENTES INFECCIOSOS E MALIGNIDADES, UM BALANÇO ENTRE A INDUÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E CELULAR	15
2.2 VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	17
2.3 ADJUVANTES	20
2.3.1 Moléculas Imunomoduladoras	22
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 METODOLOGIA	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 SISTEMAS BASEADOS EM LIPÍDEOS	33
5.1.1 Lipossomas	34
5.1.2 Lipoplexos	35
5.1.3 Emulsões e Nanoemulsões Catiônicas	36
5.1.4 Nanopartículas Lipídicas	37
5.2 SISTEMAS BASEADOS EM POLÍMEROS	38
5.2.1 Poliplexos	39
5.2.2 Copolímeros	39
5.2.3 Dendrímeros	40
5.2.4 Micelas Poliméricas	41
5.3 SISTEMAS BASEADOS EM MICRORGANISMOS	41
5.3.1 Vetores virais, Virossomas, e Proteínas de vírus de plantas	42
5.3.2 Archeias, Bactérias e seus derivados	43

5.3.3 Leveduras	45
5.4 INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS DE ENTREGA NA RESPOSTA IMUNE	46
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A descoberta das vacinas constituiu um divisor de águas na história da humanidade, levou a diminuição da incidência de doenças infecciosas, e resultou em menores taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a infecções por patógenos. (MACDONALD et al., 2020; MEYER; EHMANN; SMITH, 2020). O cenário de pandemia da COVID-19 iniciado em 2020, consolidou ainda mais a necessidade de avanços conceituais e tecnológicos a fim de gerar vacinas novas e aprimoradas, bem como melhorar o entendimento nos campos da vacinologia e imunologia (D'SOUZA et al., 2021). Atrelado a isso, o design racional de vacinas vem ganhando popularidade, e visa facilitar a seleção de compostos vacinais de forma mais adequada a fim de gerar respostas ótimas do sistema imunológico (SCHIJNS et al., 2021).

Ao longo da história da produção de vacinas, muitas abordagens falharam devido à elaboração inadequada e incapacidade de produzir respostas imunes direcionadas contra patógenos e neoplasias (NG'UNI; CHASARA; NDHLOVU, 2020). Com foco principalmente na resposta humoral para produção de anticorpos neutralizantes, várias vacinas voltadas para doenças que requerem indução mais expressiva da imunidade celular ou mesmo uma resposta mais balanceada, não obtiveram o sucesso esperado (SCHIJNS et al., 2021). Conforme determinado pela biologia da infecção, seleção de antígeno, sistema de entrega, moléculas adjuvantes e vias de administração, cada vacina gerada pode ser diferente em potência e eficácia (PARK et al., 2021). Por isso, antes de iniciar um projeto de vacina, é importante considerar que tipo de resposta imune a vacina deverá induzir para alcançar o efeito desejado, pois a depender do modelo construído, podem ser gerados diferentes mecanismos imunológicos adaptativos (VETTER et al., 2018).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas diferentes plataformas vacinais que interagem com o sistema imune de forma particular e apresentam diferentes custos-benefícios (RODRIGUES; PLOTKIN, 2020). Comparativamente às vacinas convencionais, partículas semelhantes a vírus (VLPs) e de vetores virais, as de terceira geração baseadas em ácidos nucleicos (DNA e RNA) são consideradas mais seguras, rápidas e fáceis de fabricar (POLLARD; BIJKER, 2021). Essas vacinas podem ser utilizadas não só de forma profilática no combate a doenças infecciosas, mas também como uma ferramenta no tratamento de cânceres, alergias e doenças

autoimunes (ZHANG et al., 2019; ZHANG; NANDAKUMAR, 2018). Porém, são menos imunogênicas, necessitando de otimização por moléculas e sistemas capazes de ajudar na captação do antígeno e na modulação do sistema imune (HOBERNIK; BROS, 2018).

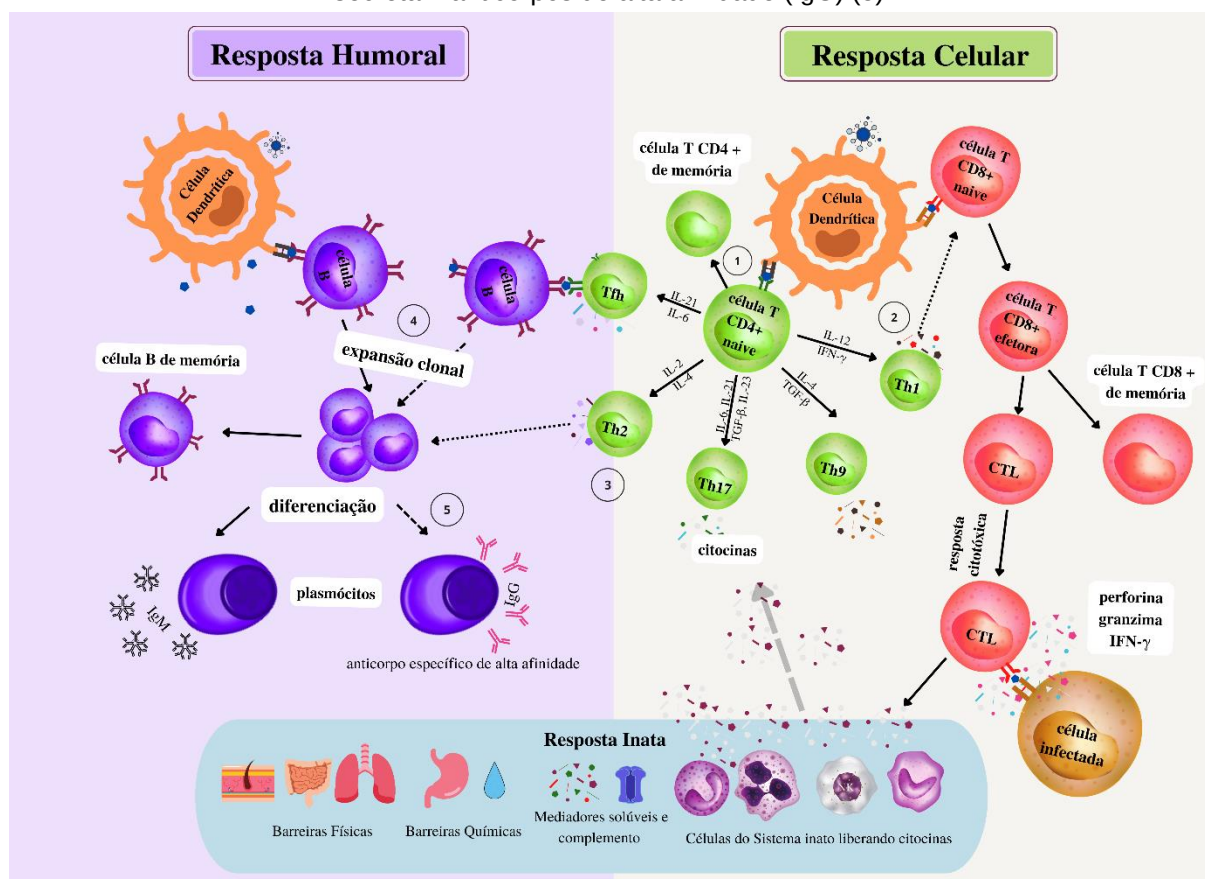
Desse modo, os sistemas de entrega são definidos como um conjunto de adjuvantes que permitem a captação específica do antígeno pelas células do sistema imune e ajudam a modular a resposta imunológica de maneira direcionada (SCHIJNS et al., 2020). Para garantir a estabilidade e o transporte das vacinas de ácidos nucleicos até seus respectivos compartimentos de síntese antigênica, sistemas de entrega baseados em lipídeos, polímeros e microrganismos costumam ser utilizados (HOBERNIK; BROS, 2018). Porém, o arranjo molecular desses sistemas influencia na interação com os ácidos nucleicos, na forma como são percebidos por células imunes e na geração de inflamação e efeitos citotóxicos (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021). Neste contexto, surge a pergunta norteadora do presente trabalho que é: “Como esses sistemas ajudam, então, a orientar a resposta imune das vacinas de ácido nucleico?”

O objetivo desta revisão é, portanto, discutir a influência dos diferentes sistemas de entrega nas respostas geradas por vacinas de DNA e RNA. Para isso, foi feita uma revisão sistemática com base em publicações de artigos científicos obtidos em meios eletrônicos nas bases de dados: PubMed, Embase, Science Direct e Google Scholar. Após a leitura e aplicação dos critérios, restaram 84 artigos, que incluem estudos pré-clínicos, clínicos e revisões de literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VACINAS PROFILÁTICAS E TERAPÊUTICAS: PROTEÇÃO CONTRA AGENTES INFECCIOSOS E MALIGNIDADES, UM BALANÇO ENTRE A INDUÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL E CELULAR

Figura 1 – Balanço das respostas imunes adaptativas humorais e mediadas por células frente à vacinação. Na resposta celular, após a ativação pela célula dendrítica, as células T CD4+ naïve são polarizadas em subpopulações mediante a presença de citocinas específicas (1). As citocinas liberadas pelas células Th1 estimulam as células T CD8+ citotóxicas, que então se diferenciam e liberam moléculas efetoras para destruir células hospedeiras infectadas (2). Por outro lado, as citocinas liberadas pelas células Th2 influenciam na resposta humoral incitando a diferenciação das células B para a produção de anticorpos específicos para um antígeno individual (3). Como uma APC, as células B podem liberar anticorpos frente a exposição aos antígenos (4), porém apenas após a ativação e co-estimulação por células T CD4+ (como Tfh e Th2), transformam-se em plasmócitos que secretam anticorpos de alta afinidade (IgG) (5).



Fonte: Autora

As vacinas profiláticas tem como principal objetivo evitar a infecção por um patógeno e, assim, proteger o indivíduo de reinfecções futuras através da memória imunológica (ROSALES; ROSALES, 2017). A aplicação de vacinas profiláticas induz uma resposta imune adaptativa focada principalmente na resposta imune humoral (TANNER et al., 2019). Essa imunidade é obtida por meio de células B, porém para ser bem-sucedida, requer a participação de células T CD4 +, dependendo, portanto,

de uma imunidade celular efetiva (Figura 1) (PULENDRAN; S. ARUNACHALAM; O'HAGAN, 2021).

Embora a ativação direta das células B com o antígeno resulte em produção de anticorpos, as células B devem interagir com células T_{fh} para produzir anticorpos de alta afinidade (IgG) e se diferenciar em células de memória de longo prazo (QIN et al., 2018). Sendo assim, após a ativação dos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), o desenvolvimento de linfócitos B dependentes de células T CD4⁺ resulta na maturação da resposta mediada por anticorpos, diferenciação de plasmócitos, secreção de anticorpos neutralizantes e geração de células B e T de memória (Figura 1) (JISKOOT et al., 2019; POLLARD; BIJKER, 2021). Os anticorpos produzidos se ligam então aos patógenos ou seus derivados, e interferem na proliferação pela interação com células e mecanismos do sistema imune inato levando a opsonização, neutralização, fagocitose e ativação do complemento (LUO; YIN, 2021).

Quanto às vacinas terapêuticas, essas requerem modulação diferenciada do sistema imunológico, pois tanto as infecções crônicas quanto os cânceres estão associados à imunossupressão específica e comprometimento do sistema de vigilância imunológica (KAMPHORST; ARAKI; AHMED, 2015). Essas vacinas têm o potencial de mudar radicalmente o tratamento médico e podem ser utilizadas no combate de algumas doenças infecciosas crônicas, cânceres, alergias e doenças autoimunes (ZHANG et al., 2019; ZHANG; NANDAKUMAR, 2018).

Alguns vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), podem sobrecarregar o sistema imunológico impedindo o combate contra doenças e infecções (STEPHENSON, 2018). Já as doenças autoimunes, que são direcionadas contra autoantígenos, são acompanhadas por perda de tolerância imunológica (ROSENTHAL; CARAMBULA; ZIMMERMAN, 2019). Desta forma, as vacinas terapêuticas trabalham visando eliminar a doença, aumentando, modulando ou redirecionando a resposta imune, forçando assim, o sistema imunológico a reconhecer patógenos e células anormais (BOUKHEBZA et al., 2012; EGGENHUIZEN; NG; OOI, 2020; HU; OTT; WU, 2018).

Esse tipo de vacina é voltado para a imunidade mediada por células e envolve a interação entre APCs e células T naive que se tornarão células efetoras CD4⁺ (via MHC-II), ou CD8⁺ (via MHC-I) (MELSSSEN; SLINGLUFF, 2017). As células CD4⁺ se diferenciam em células T auxiliares secretoras de moléculas efetoras, como as

citocinas, e podem atuar aumentando a resposta imune LTC (Linfócito T citotóxico), ativando células B produtoras de anticorpos e modulando para perfis regulatórios ou inflamatórios (Figura 1) (BOILESEN; NIELSEN; HOLST, 2021). A exemplo das vacinas contra o câncer, as células T CD4 + e CD8 + trafegam para o local do tumor e, ao encontrar antígenos correspondentes, matam as células tumorais por citotoxicidade e produção de citocinas (MELSEN; SLINGLUFF, 2017). Neste contexto, estratégias destinadas a melhorar a função das células T podem ser necessárias para alcançar respostas imunes ideais (HU; OTT; WU, 2018; KAMPHORST; ARAKI; AHMED, 2015).

2.2 VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

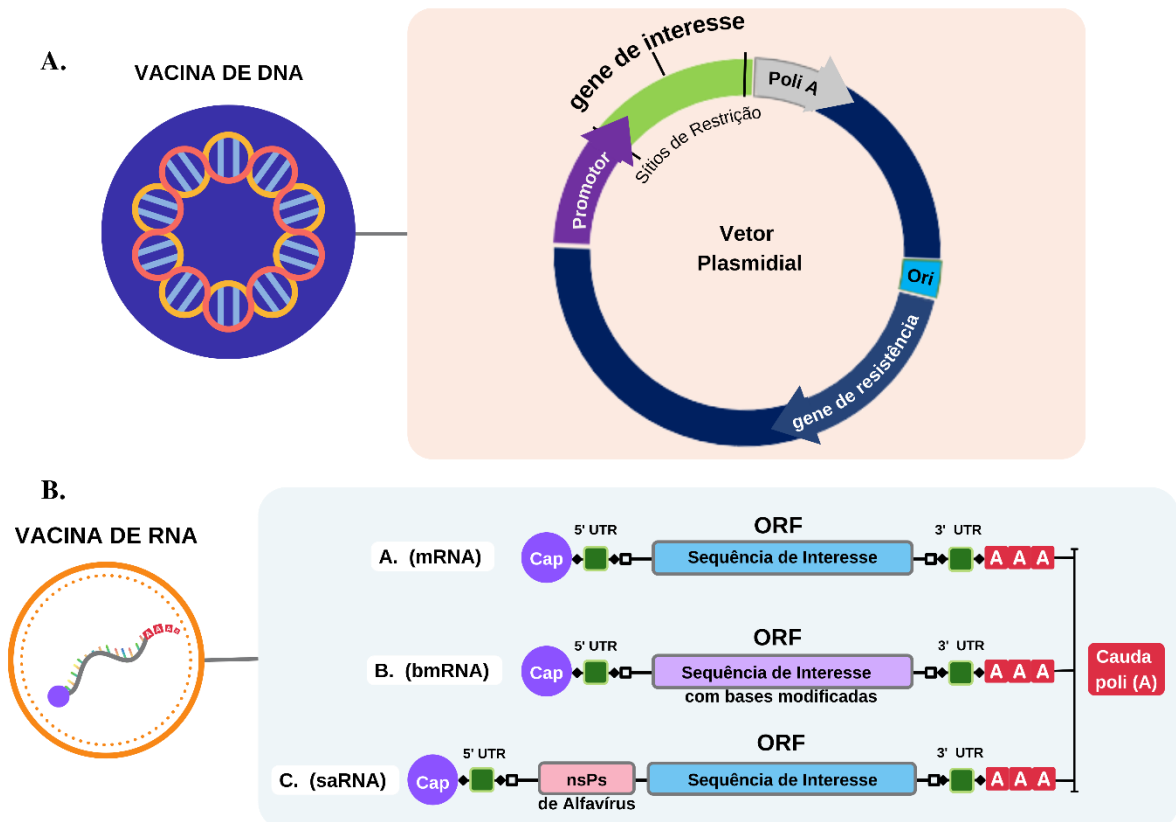
As plataformas que consistem em patógenos atenuados ou inativados, em sua maioria, geram um sinal suficiente ao sistema imunológico para que ele possa produzir células de memória e anticorpos (PAN et al., 2021). No entanto, apresentam problemas associados à segurança, como reversão de virulência, limitações relacionadas à eficácia contra patógenos de rápida evolução e demanda por sistemas de produção com altos níveis de biossegurança (QIN et al., 2021). Comparativamente às vacinas convencionais e as baseadas em proteínas, a vacina de DNA é capaz de evocar respostas celulares e humorais eficientes, e é considerada mais segura, estável, e fácil de fabricar (LEE et al., 2018).

De modo geral, esse tipo de vacina é produzido a partir da tecnologia de DNA recombinante, e consiste em um plasmídeo contendo um ou mais genes que codificam o antígeno vacinal (Figura 2-A) (HOBERNIK; BROS, 2018). Consequentemente, ela é projetada para aumentar a tradução e processamento dos antígenos nas células-alvo, para que assim, ocorra a ativação de células T CD4 +, melhor indução de LTCs, e produção de anticorpos por células B (HOBERNIK; BROS, 2018). Após sua internalização pela célula e entrada no núcleo, o DNA é transcrito e depois traduzido no citoplasma (BAI et al., 2017). Em seguida, o antígeno codificado é expresso e apresentado pelo MHC para gerar ativação de células T CD4 + e CD8 + e ativação indireta da imunidade humoral (GHAFARIFAR, 2018; LOPES; VANDERMEULEN; PRÉAT, 2019).

É importante notar que, embora ainda exista destaque sobre um potencial de genotoxicidade por integração cromossômica, estudos já demonstraram que é

altamente improvável que o vetor se integre ao DNA genômico (FAUREZ et al., 2010; SHAFATI et al., 2022; WANG et al., 2004). A primeira vacina baseada em DNA administrada em humanos de forma emergencial, foi desenvolvida na Índia para a COVID-19. Denominada de ZyCoV-D, foi capaz de produzir a proteína Spike do vírus SARS-CoV-2 e provocar respostas imunes visando a proteção à infecção. Resultados provisórios dos ensaios clínicos de fase III, mostraram imunogenicidade robusta e perfil de tolerabilidade e segurança (KHOBRADE et al., 2022). No entanto, apesar de liberadas na veterinária contra agentes infecciosos de peixes, animais de companhia e fazenda, atualmente não existem vacinas de DNA aprovadas pela “Food and Drug Administration” (FDA) para uso em humanos (AIDA et al., 2021). Isso se deve ao fato de que muitas das respostas geradas por essa vacina não gerou resultados clínicos significativos. Sendo refletido muitas vezes pela imunogenicidade reduzida e baixa taxa de transfecção, ocasionada pelos baixos níveis de expressão de proteínas e má absorção pelas APCs (HOBERNIK; BROS, 2018; PORTER; RAVIPRAKASH, 2017).

Figura 2. Composição estrutural das vacinas de ácidos nucleicos.



Fonte: Autora

Assim como a vacina de DNA, a vacina de RNA é uma plataforma segura e eficaz que codifica proteínas antigênicas e induz uma resposta imune via apresentação de antígenos (VETTER et al., 2018). Até então, existem três tipos de vacinas de RNA desenvolvidas, que incluem: moléculas de RNA mensageiro convencionais não amplificadoras (mRNA), vacinas de mRNA auto-amplificador (saRNA) que contém sequências de proteínas não estruturais (nsPs) de alfavírus, e mRNA não amplificador convencional modificado por base (bmRNA) (Figura 2-B) (BLAKNEY; IP; GEALL, 2021). A estrutura básica dessas vacinas consiste no arranjo convencional das moléculas codificadoras presentes no corpo, apresentando um CAP 5', regiões UTRs, fase de leitura aberta (ORF) e uma cauda PoliA (Figura 2-B) (YANG et al., 2022). Porém, é importante destacar que embora alguns autores utilizem o termo "mRNA" para englobar as vacinas de RNA não amplificadoras, essas vacinas podem ser, na verdade, de bmRNA.

Embora sua aplicação tenha sido anteriormente restrita pela instabilidade do RNA e entrega ineficiente, vários estudos têm investigado essa plataforma para aplicações profiláticas e terapêuticas (KNEZEVIC et al., 2021). Recentemente as vacinas de mRNA desenvolvidas pela Moderna e Pfizer/BioNTech foram licenciadas para uso emergencial contra a COVID-19, reafirmando o potencial desta plataforma há muito estudada (JEEVA et al., 2021). Em vacinas de mRNA e saRNA, foi verificado a propriedade de estimular a imunidade adaptativa com indução de células B e de células T CD4 + e CD8 + (IAVARONE et al., 2017). Em contraste com a vacina de DNA, as vacinas de RNA não requerem direcionamento e entrada no núcleo, pois sua tradução em proteínas antigênicas já ocorre no citoplasma (WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019). Depois de processados, os epítomos oriundos dessas proteínas são apresentados via MCH-I por apresentação cruzada com APCs, o que resulta na ativação de células T CD8 + e indução da resposta imune (QIN et al., 2021). No caso das proteínas exógenas, essas podem ser captadas por APCs, degradadas por endossomos e apresentadas via MHC-II levando a indução de células T CD4 + (WADHWA et al., 2020).

No entanto, as vacinas de mRNA também apresentam limitações. Essas estão relacionadas principalmente à baixa estabilidade devido a degradação e problemas de otimização de entrega, uma vez que são necessários sistemas de entrega especializados que permitam não só a integridade do material genético, mas também sua entrada nas células-alvo (LIANG et al., 2020; PARDI et al., 2018). Além disso,

embora também sejam consideradas fáceis de fabricar e seguras, há limitações logísticas quanto à distribuição dessas vacinas devido à exigência de uma cadeia fria para sua estocagem e transporte (MASCOLA; FAUCI, 2020; POLLARD; BIJKER, 2021). Essa necessidade de armazenamento em condições ultrafrias, além da menor vida útil, também implica na relação custo-benefício, pois essas exigências limitam sua distribuição em países em desenvolvimento (UDDIN; RONI, 2021).

2.3 ADJUVANTES

Tendo em vista a menor imunogenicidade das vacinas de ácidos nucleicos bem como as diferenças entre os perfis profiláticos e terapêuticos, medidas que auxiliem ou otimizem a formulação vacinal vêm sendo cada vez mais pesquisadas a fim de transpor essa barreira (LI; PETROVSKY, 2017). O uso de moléculas e sistemas capazes de ajudar a modular respostas imunes e facilitar a captação por APCs se faz cada vez mais necessário para gerar respostas robustas e bem direcionadas (HOBERNIK; BROS, 2018).

Os adjuvantes são compostos co-injetados com o antígeno que melhoram ou modulam a resposta imune, visando aumentar a imunogenicidade das vacinas, reduzir o número de doses necessárias e estender a memória imunológica (NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010; PULENDRAN; S. ARUNACHALAM; O'HAGAN, 2021). Isso é realizado por meio de mecanismos associados à ativação do sistema imune inato que se relacionam a processos de captação, apresentação, indução de mediadores inflamatórios, e ajuste de moléculas co-estimulatórias (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; KAMPHORST; ARAKI; AHMED, 2015; LI; PETROVSKY, 2017). Essas substâncias devem, idealmente, possuir estabilidade e compatibilidade com o antígeno, segurança, baixo custo e serem passíveis de degradação (LI et al., 2022a). Descobertos na segunda década do século XX por Gaston Ramon, os sais de alumínio foram os primeiros adjuvantes a serem utilizados para potencializar a eficácia de vacinas (NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010). Marcados por uso predominantemente empírico, hoje em dia, embora haja um esforço voltado para o descobrimento de novos compostos e entendimento de seus mecanismos, o desenvolvimento tem sido lento e poucos desses encontram-se licenciados para uso humano (DEL GIUDICE; RAPPUOLI; DIDIERLAURENT, 2018).

Os adjuvantes atualmente incorporados nas vacinas aprovadas pela FDA incluem principalmente substâncias à base de alumínio, como fosfato e hidróxido de alumínio, e AS04 (combina hidróxido de alumínio com o agonista monofosforil lipídio A-MPL) (SHI et al., 2019). Porém, vários outros adjuvantes foram desenvolvidos e aprovados para uso em vacinas humanas licenciadas. Além daquelas formuladas com sais de alumínio, são utilizados Virossomas, Imiquimod (R837), RIBI-529, emulsões de óleo-em-água (AS03, AF03 e MF59) e substâncias agonistas do receptor Toll-like (TLR) como os agonistas de TLR9 baseados em sequências de DNA sintéticas (CpG 1018), e constituídos de MPL (agonista de TLR4) e QS-21, como o adjuvante AS01B (SHI et al., 2019; YANG et al., 2022; ZHANG et al., 2022b). Com a pandemia da COVID-19, novos adjuvantes, principalmente para vacinas inativadas e de subunidade proteica, foram formulados para uso convencional ou para demanda emergencial (YANG et al., 2022). Estes incluem toxóides tetânicos, Matrix-M (composta por nanopartículas de saponinas, colesterol e fosfolipídios) e vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis* Grupo B (EUGENIA TOLEDO-ROMANÍ et al., 2021, p.; MAGNUSSON et al., 2018; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2021).

Na linha de frente de defesa contra um patógeno, o sistema imune inato fornece uma resposta inespecífica mediada por células (fagocíticas, dendríticas, natural killers (NKs)) e por moléculas do complemento através do reconhecimento de padrões moleculares por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os do tipo Toll-like (TLRs), NOD (NLRs), RIG-I (RLRs) e lectinas do tipo C (BONAM et al., 2021; CIABATTINI et al., 2016). Muitos adjuvantes podem ativar direta ou indiretamente esses receptores para estimular diferentes tipos de respostas imunes inatas que, se ligadas a antígenos, podem iniciar e potencializar áreas do sistema imune adaptativo (composto por linfócitos T e B, NKs e moléculas mediadoras, como citocinas) (NANISHI; DOWLING; LEVY, 2020). Este mecanismo de ativação ocorre pelo reconhecimento do antígeno por meio da sinapse imune com moléculas co-estimulantes e MHC, e permite a inativação do patógeno e desenvolvimento da memória imunológica (BONAM et al., 2017).

Dessa forma, os adjuvantes são capazes de afetar a resposta imune equilibrando a indução de respostas humorais e celulares. Isso é viabilizado pela maneira como as células T CD4⁺ são ativadas e os tipos de citocinas liberadas, o que resulta na expansão dos subconjuntos de células auxiliares (como Th1, Th2, Th17 e Treg) (KORSHOLM et al., 2010). Pela secreção de anticorpos e ativação de

granulócitos (como neutrófilos e eosinófilos) as células Th2 mediam a ativação e manutenção da resposta imune humoral, necessária para atuar contra infecções extracelulares, como as induzidas por parasitas e alérgenos (ZHU; ZHU, 2020). A resposta Th1, por outro lado, está envolvida no estabelecimento da imunidade celular contra patógenos intracelulares e células cancerosas (ABBASI; UCHIDA, 2021). Além dessas, um subconjunto anti-inflamatório de células T CD4 +, chamadas células T reguladoras (Tregs), estão atreladas a homeostase imunológica, promovendo a autotolerância (ROCAMORA-REVERTE et al., 2021). As Tregs ajudam a prevenir doenças autoimunes, alergias e alguns tipos de cânceres, garantindo que a reação do sistema imunológico a antígenos próprios e antígenos estranhos seja equilibrada (EGGENHUIZEN; NG; OOI, 2020).

Por isso, para produzir uma vacina com potencial para aumentar a resposta imune, além de considerar os parâmetros que afetam sua potência e eficácia, também pode ser necessário adicionar adjuvantes adequados à sua composição para amplificar a estimulação do sistema imunológico (KARIMI et al., 2020). Embora não de forma absoluta, os adjuvantes são geralmente classificados de acordo com o mecanismo de ação como moléculas imunomoduladoras, sistemas de entrega ou de sistemas de composição integrada (CIABATTINI et al., 2016; HOGENESCH; O'HAGAN; FOX, 2018).

2.3.1 Moléculas Imunomoduladoras

Os adjuvantes imunomoduladores, representados principalmente por citocinas, quimiocinas, agonistas do receptor Toll-like e peptídeos antimicrobianos, atuam aumentando a resposta imune do hospedeiro (NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010). Em vacinas de ácidos nucleicos, há uma certa limitação no número de estudos clínicos e pré-clínicos utilizando imunomoduladores em sua formulação, em especial em vacinas de mRNA. Isso pode ser refletido pela auto-adjuvanticidade do material genético que leva a respostas imunes humorais e celulares específicas devido a capacidade inerente de ativação do sistema imune inato pelos PRRs, bem como a natureza da vacina (OLIVEIRA MANN; HORNUNG, 2021).

Na vacina de DNA, há adjuvância intrínseca do DNA plasmidial pelo reconhecimento de receptores como TLR9, NALP3 e cGAS (SCHLEE; HARTMANN,

2016). Embora seu uso geral como adjuvante tenha limitações, a vacinação com DNA induz uma resposta imune mais inclinada a Th1 e ativa vias de apresentação de antígenos do MHC para indução de respostas imunes de células T CD8+ e CD4+ (GHAFARIFAR, 2018). Estratégias de co-formulação de adjuvantes em plasmídeos de DNA codificando o gene de interesse, ou co-imunização, foram testadas em poucos estudos, mas têm sido usados para melhorar e aumentar a potência da vacina (HOBERNIK; BROS, 2018).

Nos ensaios clínicos e pré-clínicos dos últimos 5 anos com vacinas de DNA utilizando imunomoduladores a maioria consistiu em agentes imunoestimuladores solúveis, como as interleucinas, interferons, quimiocinas e fatores de crescimento (Tabela 1). Dessas moléculas, a que apresentou respostas e modulação da resposta imune mais expressivas foi o IFNL3 na vacina de DNA profilática contra o Vírus da Hepatite C (HCV), que aumentou as respostas das células T CD4 + e reduziu a frequência de células Treg, induzindo uma polarização mais voltada para Th1 (HAN et al., 2020). Em fase pré-clínica, a vacina profilática contra Herpes Zoster utilizando IL-7 e IL-33 também foi beneficiada com um aumento significativo de magnitude das respostas de células T específicas (KIM et al., 2018). Em especial, IL-33 demonstra-se como uma citocina interessante para o uso em vacinas devido suas atividades pleiotrópicas. Na vacina profilática contra o HIV-1 (SARKAR et al., 2019), potencializou a qualidade e influenciou a cinética da resposta ao anticorpo, enquanto que no trabalho de ZHU et al. (2020b) auxiliou na promoção de imunidade protetora contra infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos.

Dentre as interleucinas, IL-12 tem sido a mais utilizada, e de modo geral, parece melhorar os aspectos de eficácia da vacina de DNA ajudando na produção de respostas humorais e de células T específicas (DA'DARA et al., 2019; HASAN et al., 2020). Essa citocina pró-inflamatória tem vários efeitos, incluindo regulação de células NK e ativação de células T, resultando em uma resposta protetora Th1 que estimula a produção de IFN pelos linfócitos T (MORELLI et al., 2020). Além disso, no ensaio clínico de Fase I da vacina de DNA terapêutica contra o câncer (TRT-001), este imunomodulador se mostrou responsável por induzir respostas celulares maiores, incluindo produção de IFN- γ , e ativação de células T CD4+, CD8+ e CTLs (VONDERHEIDE et al., 2021). Todavia, na Vacina Profilática contra o HIV-1 (HVTN 087), não afetou a frequência de linfócitos, e não foram observadas alterações significativas após a vacinação de DNA com ou sem essa citocina (ELIZAGA et al.,

2018). Em contrapartida, nas vacinas de DNA terapêuticas contra câncer de próstata metastático e progressivo, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), conhecido por alterar o balanço das citocinas Th1/Th2, favoreceu a indução de células T multifuncionais específicas e resultou em uma resposta de maior magnitude e durabilidade tipo Th1 (KYRIAKOPOULOS et al., 2020; MCNEEL et al., 2019). Por fim, na vacina veterinária profilática contra a *Vibrio anguillarum*, as quimiocinas CCL3, CCL19, CCL4 e CCL21, ampliaram a resposta imune humoral e celular induzida pela vacina de DNA e aumentaram o nível de imunidade protetora (XU et al., 2020).

Tabela 1. Exemplos de ensaios clínicos e pré-clínicos recentes de vacinas de DNA com adjuvantes imunomoduladores em sua formulação.

Imunoadjuvantes	Tipo de Vacina	Resposta Imune	Fase	Ref.
IL-12	Profilática contra o HIV-1	A IL-12 não afetou as frequências globais de leucócitos.	I	(ELIZAGA et al., 2018)
	Terapêutica contra o Papiloma Vírus Humano (HPV)	Induziu maiores magnitudes de respostas celulares,	I	(HASAN et al., 2020)
	Profilática veterinária contra a esquistossomose em búfalos	incluindo produção de IFN- γ , células T CD4+ e CD8+ e CTLs	I	(DA'DARA et al., 2019)
IL-7	Profilática contra a Herpes Zoster	Gera $\uparrow$ sobrevivência das células T. Regula a expressão de genes antiapoptóticos	Pré-clínica	(KIM et al., 2018)
IL-33	Profilática contra a Herpes Zoster		Pré-clínica	(KIM et al., 2018)
	Profilática contra o HIV-1	Promoção da diferenciação de Th1, Th2 e Th9	Pré-clínica	(SARKAR et al., 2019)
	Profilática contra a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>		Pré-clínica	(ZHU et al., 2020b)
IFNL3	Vacina profilática contra o HCV	Principalmente Th1. O adjuvante IFNL3 reduziu a frequência de células Treg e aumentou as respostas de células T específicas do vírus.	I	(HAN et al., 2020)

GM-CSF	Vacina terapêutica contra câncer de próstata metastático	Pode alterar o equilíbrio de citocinas Th1/Th2	I	(KYRIAKOPOULOS et al., 2020)
	Vacina terapêutica contra câncer de próstata progressivo		II	(MCNEEL et al., 2019)
CCL3				
CCL4	Vacina profilática veterinária contra o <i>Vibrio anguillarum</i>	Aumentaram a frequência de células Th1 e Th2	Pré-clínica	(XU et al., 2020)
CCL19				
CCL21				

Fonte: Autora

Quanto ao mRNA, pode ser reconhecido por receptores Toll-Like como TLR3, TLR7, TLR8, TLR13, receptores semelhantes ao gene I (RIG-I) e associado à diferenciação de melanoma MDA-5 (FREUND et al., 2019). No entanto, como o RNA é altamente imunogênico e propenso à degradação, foram feitas modificações que, em última análise, prolongaram sua vida útil, mas também reduziram sua modulação de respostas imunes por meio de receptores citoplasmáticos (KOBIYAMA; ISHII, 2022).

Embora atualmente não tenha na literatura ensaios clínicos e pré-clínicos utilizando moléculas imunomoduladoras para essa vacina, as pesquisas atuais visam através de modificações de nucleosídeos e de componentes do mRNA (como CAP 5'), aumentar a estabilidade e modular a resposta imune para alcançar diferentes níveis de imunogenicidade e expressão do antígeno (DÜLMEN; MUTHMANN; RENTMEISTER, 2021; FREUND et al., 2019). Uma dessas modificações foi a troca de uridina para pseudouridina, que aumentou a estabilidade do mRNA, e a metilação de bases para reduzir o reconhecimento por TLRs, que facilitou seu uso como plataforma vacinal (KARIKÓ et al., 2005, 2008). Porém, dependendo dos resultados desejados da vacina, é crucial equilibrar os efeitos adjuvantes e a atividade de tradução resultantes para alcançar as respostas imunes ideais (ABBASI; UCHIDA, 2021).

A incorporação de imunoadjuvantes em vacinas de ácidos nucleicos representa uma abordagem promissora para permitir uma indução controlada do sistema imune inato (ABBASI; UCHIDA, 2021). No entanto, além de conhecer o perfil destes imunomoduladores, é importante levar em consideração como os antígenos serão entregues e apresentados para as células do sistema imune. Assim, outra estratégia

para essa vacina, está no uso de sistemas de entrega carreadores ou de adjuvância integrada para aumentar a eficiência de transfecção, garantir a integridade do material genético e propiciar melhor reconhecimento de células do sistema imune (LIANG; HUANG; LIU, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Discutir os perfis de resposta obtidos por sistemas de entrega em vacinas de ácidos nucleicos, levando em consideração sua eficácia, mecanismo, via de administração, vantagens e limitações.

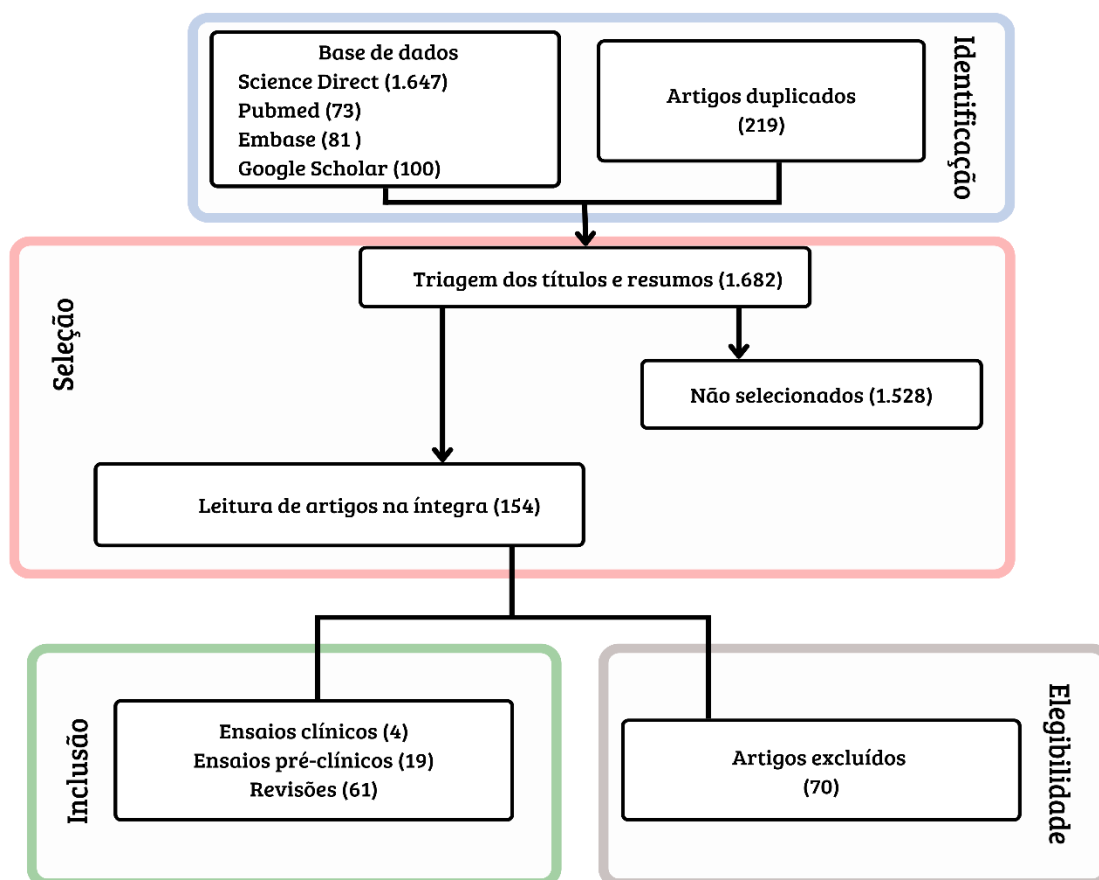
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elucidar e distinguir conceitos sobre adjuvantes, imunomoduladores e sistemas de entrega;
- Relacionar os principais estudos clínicos e pré-clínicos em vacinas de ácidos nucleicos utilizando sistemas de entrega;
- Apontar quais os principais tipos de sistemas de entrega utilizados para carrear vacinas de ácidos nucleicos;
- Avaliar a possível relação entre o tipo de sistema de entrega e o perfil imunológico desencadeado pelas vacinas.

4 METODOLOGIA

Para a revisão sistemática, foi executada uma pesquisa bibliográfica e transversal por meio de publicações de artigos científicos obtidos em meios eletrônicos nas bases de dados: PubMed, Embase, Science Direct e Google Scholar. A busca teve como palavras chaves: “Delivery Systems”, “nucleic acid vaccines”, e “adjuvants”, com adaptações dependendo da base de dados e estratégia de combinação das palavras chaves para ampliação da busca por artigos. A fim de avaliar a estratégia e relação dos principais estudos clínicos utilizando adjuvantes e sistemas de entrega, foram aplicados os seguintes filtros: *Clinical Trial*, *Meta-Analysis* e *Randomized Controlled Trial*. Os artigos identificados foram importados para a biblioteca do Zotero e os artigos elegíveis foram filtrados seguindo o diagrama de fluxo de Itens de Relatório Preferidos para Revisões Sistemáticas e Meta-análises (PRISMA) (Figura 3).

Figura 3. Diagrama de fluxo PRISMA adaptado para a triagem e seleção dos estudos.



Fonte: Autora

Excetuando-se trabalhos pioneiros e necessários para caracterização de definições, foram incluídos artigos entre 2018 e 2022, tendo inglês como idioma e que tratassem de aspectos relacionados à utilização de adjuvantes e sistemas de entregas em vacinas de ácidos nucleicos profiláticas e terapêuticas, bem como os perfis de respostas gerados. Foram excluídos artigos duplicatas, resumos publicados em eventos científicos, trabalhos de conclusão de curso, teses, dissertações, artigos que não abordassem sobre adjuvantes e sistemas de entrega em vacinas, e por fim, os que não abordassem o perfil de resposta gerado por esses componentes na formulação vacinal. Após a leitura e aplicação dos critérios de seleção adotados, restaram 84 artigos para serem utilizados nesta revisão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas vacinas para humanos, sejam em pesquisas *in vitro*, ou de fases pré-clínicas e clínicas, utilizam materiais como lipossomas, nanopartículas lipídicas, sais de alumínio, emulsões e virossomas como plataformas de entrega dos antígenos vacinais (WANG; CHEN; WANG, 2019). Além desses, outros sistemas baseados em microrganismos, lipídeos, polímeros, moléculas inorgânicas e ácidos nucleicos são investigados como partículas carreadoras (CHEN et al., 2022). Uma vez injetados e contendo o antígeno de interesse, esses sistemas podem danificar ou matar as células hospedeiras no local da injeção, desencadeando assim, respostas contra os compostos liberados pelas células (TORRES-VANEGAS; CRUZ; REYES, 2021).

Diferente das moléculas imunoestimuladoras que aumentam diretamente a resposta imune, os sistemas de entrega atuam na facilitação da captação antígeno-específico e podem atuar como um instrumento de liberação controlável, influenciando na resposta de maneira mais indireta (ANDRIANOV; FUERST, 2021; DING et al., 2021). Em outras palavras, os carreadores vacinais podem atuar de maneira integrada como um transportador associado ao antígeno e recrutador de células imunes, devido à geração de uma resposta pró-inflamatória no local da injeção (TIZARD, 2021). Dado a vasta diversidade de sistemas, cada um com suas propriedades únicas, fatores como hidrofobicidade, tamanho, carga, modificações de superfície, e tipo do material podem influenciar na interação com os ácidos nucleicos e a forma como estes serão percebidos pelas células imunológicas após a inoculação das vacinas (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021). Assim, considerado as diferenças físicas e imunológicas dos diferentes carreadores para vacinas de ácidos nucleicos, os principais sistemas baseados em lipídeos, polímeros e microrganismos serão abordados a seguir (Tabela 2).

Tabela 2. Estudos recentes de vacinas de ácidos nucleicos com sistemas de entrega baseados em lipídeos, polímeros e microrganismos.

Sistema de Entrega	Tipo de Vacina	Resposta Imune	Carga	Tamanho	Via	Estudo	Ref.	
Baseados em Lipídeos	Lipossomas	RNA - Lipo-MERIT- FixVac (BNT111) contra o melanoma maligno	Resposta celular	-	200–400 nm	i.v.	c. F-I	(SAHIN et al., 2020a)

	Híbridos de Lipossomas	DNA - ssPalmE-LNP TgGRA15 contra o <i>Toxoplasma gondii</i>	Humoral e tipo Th1	+	140 nm	s.c.	p.c	(HASAN et al., 2021)
		DNA com DDA-MPLA-TDB contra Tuberculose	Th1 e produção de células T de memória	+	417 ± 60 nm	i.m.	p.c	(TIAN et al., 2018)
		DNA com nanopartícula híbrida de lipossoma-polímero (pSFV-MEG/LNPs) contra a diarreia do viajante	Humoral e celular	-	161,61 ± 15,63 nm	i.m.	p.c	(ZHAO et al., 2021)
	Lipoplexos	DNA contra SARS-CoV-2 com lipossomas catiônicos baseados em DOTAP	Humoral e celular Th1/Th2 em equilíbrio	+	130,9 ± 5,8 nm	i.m.	p.c	(PELETT A et al., 2021)
		Lipopoliplexos com Vacina de RNA codificando antígeno de influenza	Indução de células T específicas	neutra	180/10 nm	i.m.	p.c	(PERCHE et al., 2019)
	Emulsões	DNA contra o HIV coadministrada com proteína + MF59	Sem relação direta com resposta	n.i	± 160 nm	i.m.	c. F-I	(HOSSEI NIPOUR et al., 2020)
	Nanoemulsões catiônicas	DNA terapêutica contra muco-polissacaridose tipo I	Aumento da expressão da enzima	+	150 ± 265 nm	i.n.	p.c	(SCHUH et al., 2018b)
	Nanopartículas Lipídicas	mRNA-1273 Vacina profilática contra a COVID-19	Humoral e celular e tipo Th1	+	59 ± 100 nm	i.m.	c. F-III ap	(BADEN et al., 2021)
		BNT162 (3 LNP-mRNA)	Humoral e celular e tipo Th1	+	60 ± 100 nm	i.m.	c. F-III ap	(POLACK et al., 2020)
		DNA para imunoprofilaxia em animais usando LUNAR®	Aumento da resposta celular	n.i	n.i	i.m.	p.c	(MUCKE R et al., 2020)
Baseados em Polímeros	Poliplexos	DNA terapêutica com NPs poliméricos catiônicos contra a Leishmaniose	*	+	125 ± 130 nm	*	i.vt	(SOLER BESUMBES et al., 2019)
		DNA contra a Hepatite B utilizando poliplexos de PDMAEMA:PβAE com β-glucana	Nenhuma resposta imune baseada em células específicas	+	≈180 nm	s.c	p.c	(SOARES et al., 2019)

		contra o antígeno						
Baseado em Microrganismos	Copolímero	DNA com ABC tetrafuncional contra o Zika Virus	Aumento da resposta humoral	-	50 nm	i.m.	p.c	(HRABER et al., 2018)
	Dendrímeros	DNA com Dendrigrift contra vírus da influenza aviária H9N2 em galinhas	Resposta humoral e forte resposta imune celular	+	68,9 ± 2,1 nm	i.m.	p.c	(ZHAO et al., 2020)
	Micelas Poliméricas	mRNA com polietilenoimina modificada com succinato de vitamina E (PVES) contra o SARS-CoV-2	Resposta celular Th1 e respostas humorais	+	144,7 ± 0,76 nm	i.m.	p.c	(REN et al., 2021)
	Bactérias	DNA profilática entregue por <i>Salmonella typhimurium</i> aro A atenuada contra o Duck Tembusuvirus (DTMUV)	Humoral com alto nível de anticorpos específicos	*	2–5 µm	o	p.c	(HUANG et al., 2018)
		DNA carregada e expressa por <i>Mycobacterium paragordoniae</i> contra o SARS-CoV-2	Forte resposta celular e indução de Th1	*	2–3 µm	s.c	p.c	(KIM et al., 2021)
	Arquéias	DNA terapêutica carregada na superfície ou encapsulada por Arqueossomo contra o HPV	Forte resposta humoral e celular, indução de Th1	-	(S) 127 ± 2,1 nm e (E) 429 ± 5 nm	s.c	p.c	(KARIMI et al., 2020)
	Leveduras	Vacina terapêutica de siRNA e Trp2 revestidos com (PEI)-IDO e entregues por <i>S. cerevisiae</i> recombinante	Inibiu a expressão de IDO, diminuiu a geração de Tregs e induziram respostas de células T	+	140 ± 20,0 nm	s.c	p.c	(LIU et al., 2018)
		DNA veterinária profilática entregue por <i>S. cerevisiae</i> contra <i>A. hydrophila</i>	Induziu respostas humorais antígeno-específicas	-	2–5 µm	o	p.c	(HAN et al., 2019)

DNA terapêutica carreada por <i>S. cerevisiae</i> para regular a miostatina	Inibição da proteína miostatina e modulação pela supressão de IL21	-	2–5 µm	o	p.c	(ZAKRIA et al., 2019)
Vacina de IL-1β shRNA entregue por microcápsulas de <i>S. cerevisiae</i> para terapia de osteoartire pós- traumática	Regulou a resposta inflamatória e reduziu a expressão de IL- 1β	-	n.i	o	p.c	(ZHANG et al., 2021)

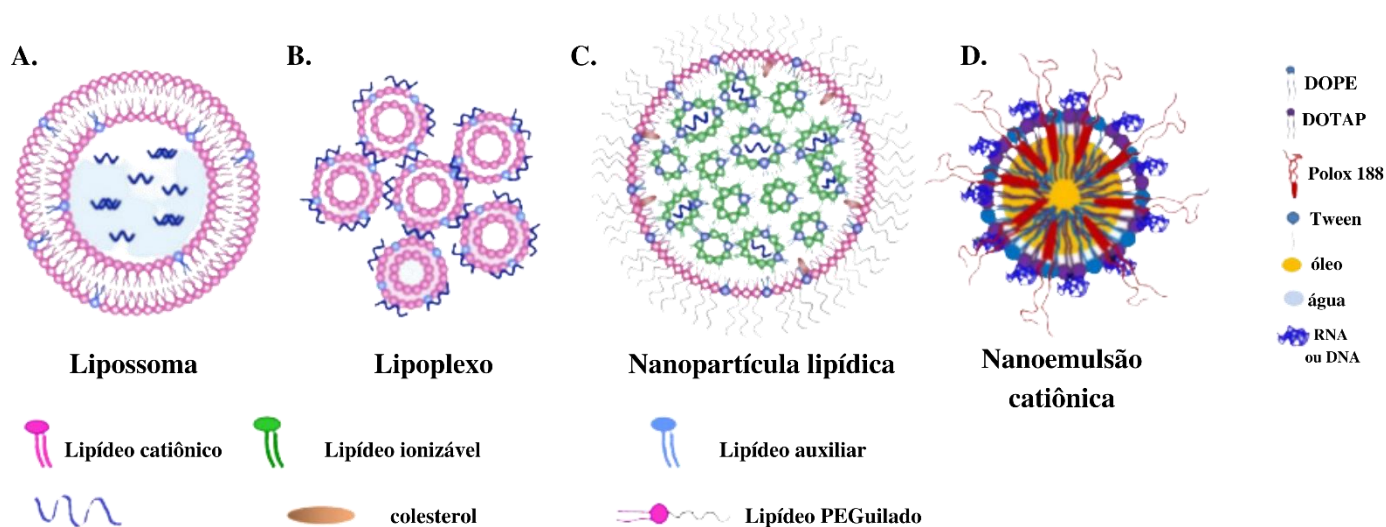
Fonte: Autora.

Notas: i.v. (intravascular), i.m. (intramuscular), o (oral), i.n. (intranasal), s.c. (subcutânea), n.i (não informado), c. F-I (clínico de Fase I), c.F-III ap (clínico de fase III, aplicação), p.c (pré-clínica), * (não estudado)

5.1 SISTEMAS BASEADOS EM LIPÍDEOS

As nanopartículas lipídicas (LNPs) são um tipo de vetor não viral intensamente pesquisado para a administração *in vivo* de vacinas de ácido nucleico (YAN et al., 2022). LNPs referem-se a todas as nanopartículas compostas de lipídios, incluindo uma variedade de classes, como lipossomas, lipoplexos, carreadores lipídicos nanoestruturados e nanoemulsões catiônicas (Figura 4) (MUKAI et al., 2022). Os LNPs estão sendo cada vez mais usados no campo da imunoterapia contra cânceres e doenças infecciosas e requerem tipos e proporções específicas dos componentes lipídicos quando utilizados em vacinas de ácidos nucleicos (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021). Tipicamente, consistem em um lipídio catiônico ou ionizável e lipídios auxiliares, como fosfolipídios, colesterol e/ ou lipídios PEGuilados(HOU et al., 2021). Alguns LNPs mais sofisticados podem não ter uma bicamada lipídica e, em vez disso, criar micelas que contêm moléculas dentro de um núcleo não aquoso(TENCHOV et al., 2021). Além desses, adjuvantes como MF59, AS03, AF03 e o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) formam emulsões de óleo-em-água e água-em-óleo e são considerados sistemas de entrega (FACCIOLÀ et al., 2022)

Figura 4. Composição dos Sistemas baseados em Lipídeos.



Fonte: Modificado e adaptado de (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021)

5.1.1 Lipossomas

Os lipossomas foram as primeiras partículas carregadoras de ácidos nucleicos a serem aprovadas pela FDA (com o Lipossoma Doxil) e a primeira plataforma de entrega de nanomedicina a avançar com sucesso da prova de conceito à aplicação clínica (FAN; MARIOLI; ZHANG, 2021). Consistem em partículas esféricas anfifílicas compostas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas envoltas em um núcleo aquoso no qual os materiais de escolha podem ser encapsulados (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021). Em sua composição, há a interação entre as partes hidrofílicas (cabeça polar) e hidrofóbicas (cauda apolar), formando vesículas (Figura 4-A) (HOU et al., 2021). São compostos biodegradáveis, versáteis, fáceis de formular, com eficácia substancial e que podem exibir toxicidade mínima a depender da natureza de seus componentes (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; FILIPCZAK et al., 2020).

Apesar de estudos *in vivo* ainda avaliarem a eficiência do transporte de ácidos nucleicos na forma pura, as formas lipossômicas mais comuns atualmente são hibridizadas com moléculas adjuvantes, ligantes de direcionamento e polímeros (TENCHOV et al., 2021). Estudos mais recentes de vacinas de ácidos nucleicos com lipossomas conjugados mostraram-se promissores contra doenças infecciosas e imunoterapia contra o câncer e apontam para auxílio da indução de respostas

celulares e humorais (Tabela 2). Além disso, é sabido que o tamanho dos lipossomas afeta a indução da resposta da vacina. De modo geral, lipossomas pequenos induzem uma resposta mais polarizada a Th2, sendo por tanto, mais visados em vacinas profiláticas (TRETIAKOVA; VODOVOZOVA, 2022). Por outro lado, lipossomas maiores ajudam no viés Th1, sendo almejados em vacinas terapêuticas para formação de respostas celulares (KARIMI et al., 2020).

Devido a composição aniônica dos ácidos nucleicos, há uma preferência por lipossomas contendo lipídeos catiônicos como o DOTMA (N-[1-(2,3-dioleiloxi) cloreto de propil]-N,N,N-trimetilamônio), DOTAP (1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamônio), e o DDA (dimetildioctadecilamônio) (PONTI et al., 2021; SAHIN et al., 2020a; TIAN et al., 2018). Esses lipídeos, por possuírem carga positiva, interagem eletrostaticamente com a carga negativa dos ácidos nucleicos, permitindo estabilidade no encapsulamento do material genético no núcleo aquoso (PONTI et al., 2021). Adicionalmente, possuem efeitos adjuvantes que podem ser modulados pela natureza da molécula catiônica, estimulando a resposta imune inata, mediadores pró-inflamatórios e citocinas (WANG; CHEN; WANG, 2019). Por outro lado, DOPE (1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) que também é bastante utilizado, é um lipídeo auxiliar de carga neutra utilizado para favorecer a desestabilização da membrana celular e ajudar no escape endossomal dos ácidos nucleicos para o citoplasma (FILIPCZAK et al., 2020; HASAN et al., 2021). No entanto, a desestabilização por proteínas séricas quando fornecidos por via intravenosa, a citotoxicidade dependente da carga e a rápida eliminação do corpo tornam problemática a transição dos lipossomas para a pesquisa clínica (ZHAO et al., 2021).

5.1.2 Lipoplexos

Lipoplexos são formulações baseadas em lipossomos que se formam sobre interação eletrostática do cátion do lipossomo com a parte aniônica do material genético (PAL SINGH et al., 2020). Essas formulações são caracterizadas por sua pobre encapsulação, baixa tolerabilidade e tendência a agregar e não liberar completamente o ácido nucléico na célula alvo (BERGER et al., 2021). Embora a existência de lipoplexos no medicamento Patisiran tenha proporcionado um marco no desenvolvimento de fármacos a base de RNA interferente pequeno (siRNA), devido a

esses entraves há poucos estudos pré-clínicos e clínicos que empreguem esse sistema (YONEZAWA; KOIDE; ASAI, 2020).

Assim como nos lipossomas, alguns trabalhos produzem formulações híbridas com partículas poliméricas, formando Lipopoliplexos (LPPs) e alteram sua carga para aumentar a segurança e chances de retenção nos órgãos desejados após a injeção (PERCHE et al., 2019). Por outro lado, PELETTA et al., (2021) desenvolveram uma vacina de DNA administrada por lipoplexos catiônicos contra o SARS-CoV-2. Nesse estudo, foi verificado que os lipoplexos amplificaram na promoção da indução de anticorpos e geração de respostas Th1/Th2 equilibradas em camundongos contra a SARS-CoV-2, comparável às obtidas por eletroporação com o DNA nu. Já no campo da imunoterapia, siRNA e sua interação com lipoplexos de lipídeos sensíveis ao pH, peptídeos e polímeros penetrantes de células são estudados para melhor captação por células tumorais (BERGER et al., 2021).

5.1.3 Emulsões e Nanoemulsões Catiônicas

As emulsões adjuvantes de óleo-em-água compreendem o MF59, AS03 e AF03. No entanto, são utilizados prevalentemente com vacinas proteicas e de subunidade, sendo pouco utilizados em vacinas de ácidos nucleicos. Possivelmente devido a inclusão somente de estudos publicados entre 2018-2022, apenas um trabalho de vacina de ácido nucléico com MF59 foi recuperado. Elaborado por HOSSEINIPOUR et al., (2020), consiste em uma vacina de DNA profilática contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) - HVTN 111. Mesmo assim, nesse estudo clínico de Fase I, a vacina de DNA foi utilizada como prime, seguida por coadministração ou prime/boost com uma vacina proteica misturada com MF59. Na literatura, é sugerido que o MF59 apresenta tendências a respostas imunológicas de Th2, ativação da resposta humoral e celular, e baixa toxicidade (KO; KANG, 2018). No entanto, por não ter sido utilizado diretamente como sistema de entrega para a vacina de DNA, não foi possível observar uma relação direta com resposta gerada pela vacina.

Quanto as nanoemulsões catiônicas, são partículas coloidais constituídas por um núcleo oleoso em uma fase aquosa estabilizadas por um lipídeo catiônico ou uma mistura de lipídeos PEGuilados ou fosfolipídios (ZHANG et al., 2022a). Essas

nanoemulsões tem a capacidade de prevenir a agregação de partículas, gerar estabilidade e promover o escape endossomal (TEIXEIRA et al., 2017). No entanto, devido a existência de cargas positivas e sua potencial toxicidade, indica-se o uso de tensoativo não iônicos como os utilizados na composição do MF59 (Tween e Span) (Figura 4-D) (TEIXEIRA et al., 2017). Além disso, são estudadas como carreadores para terapia de edição de genes, e na entrega para expressão proteínas por ácidos nucleicos em imunoterapia de doenças de origem mucosa (SCHUH et al., 2018a, 2018b). No trabalho de SCHUH et al., (2018b), por exemplo, foi feita a administração nasal das nanoemulsões carreando um plasmídeo de DNA visando a expressão da proteína IDUA (pIDUA) como tentativa de atingir o cérebro visando a terapia gênica da Mucopolissacaridose Tipo I.

5.1.4 Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas lipídicas são os sistemas baseados em lipídeos mais utilizados em vacinas de ácidos nucleicos. Embora as LNPs também englobem outros tipos de sistemas lipídicos e possuam composição semelhante, elas são por si só um tipo de sistema, pois exibem uma organização diferente (SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Ao contrário dos lipossomas que contêm um núcleo aquoso cercado por uma bicamada, as nanopartículas lipídicas podem conter lipídeos no núcleo, bem como outras partículas como lipídeos ionizáveis e PEGuilados (Figura 4) (TENCHOV et al., 2021).

As LNPs ganharam ainda mais destaque recentemente devido a sua utilização nas vacinas de mRNA da Moderna e Pfizer contra a COVID-19 (BADEN et al., 2021; POLACK et al., 2020). Além disso, no campo da vacina de DNA, o trabalho de MUCKER et al., (2020) mostrou que LNPs comumente utilizados em vacinas de RNA, também propiciavam melhor estabilidade ao DNA e a indução de respostas celulares para imunoprevenção em animais. Nas vacinas aprovadas contra a COVID-19, os LNPs são constituídos por um lipídeo catiônico ionizável, para facilitar a internalização, um PEG-lipídeo, para evitar agregação, colesterol e um fosfolipídio neutro que contribuem estruturalmente (THI et al., 2021). Ambos os tipos de vacina geram títulos de anticorpos neutralizantes significativos e respostas robustas de células T CD8+ específicas ao antígeno e CD4+ tipo Th1 (SAHIN et al., 2020b; TEIJARO; FARBER,

2021). Nessas vacinas, as LNPs propiciam a entrega e a proteção contra a degradação por ribonucleases e geram ativação da resposta imune inata pela geração de inflamação local transitória no local da injeção (SCHOENMAKER et al., 2021). Todavia, precisam ser armazenadas em temperaturas baixas, necessitando de cadeia fria ao longo da distribuição (FAHRNI et al., 2022). Além disso, por conterem certa quantidade de água no núcleo, existe a possibilidade de diminuição da eficácia e instabilidade devido a possível hidrolisação do mRNA (SCHOENMAKER et al., 2021). Uma alternativa é a utilização de nanopartículas lipídicas sólidas, que podem ser liofilizadas, melhorando a distribuição em larga escala da vacina e promovendo menores chances de hidrólise (WANG; GRAINGER, 2019).

5.2 SISTEMAS BASEADOS EM POLÍMEROS

Assim como as nanopartículas lipídicas, sistemas poliméricos apresentam uma grande diversidade de moléculas e são bastante utilizados na formulação de fármacos e terapia gênica (VAN DEN BERG et al., 2021). Os sistemas baseados em polímeros podem ser divididos quanto a origem como: polímeros naturais e sintéticos, e quanto ao tipo em: poliaminoácidos, polissacarídeos, poliaminas, poliamidoaminas e poliésteres (CHEN et al., 2022).

Nos últimos anos, grande progresso foi feito no emprego de materiais poliméricos como transportadores de proteínas e vacinas de terceira geração (TORRES-VANEGAS; CRUZ; REYES, 2021). Embora apresentem menos estudos clínicos do que outros sistemas, em especial para vacinas de mRNA, estes polímeros têm benefícios semelhantes, incluindo estabilidade, diversidade, direcionamento, atividade imunomoduladora e personalização (CHEN et al., 2022). Nanopartículas poliméricas catiônicas, poliplexos, micelas, lipopoliplexos, copolímeros e dendrímeros são exemplos de formulações poliméricas representativas utilizadas para distribuição de vacinas de ácido nucleico (Tabela 2).

No entanto, assim como ocorre com as LNPs, problemas como citotoxicidade induzida por carga podem levar a efeitos colaterais indesejados, e por isso é feito a PEGuilação do material para aumentar a estabilidade e diminuir a carga global, ou a utilização de polímeros neutros (GRUN et al., 2021). O problema é que esse material PEGuilado pode passar a gerar anticorpos específicos ao sistema de entrega após administrações, como ocorre com sistemas de entrega baseados em microrganismos

(SHIRAISHI; YOKOYAMA, 2019). Já os polímeros neutros são menos estáveis e oferecem uma transfecção menos eficiente do ácido nucleico (VAN DEN BERG et al., 2021). Além disso, fatores como a biodegradabilidade, peso molecular, carga, agregação, hemólise e escape endossomal subótimo precisam ser considerados e otimizados para montagem de um sistema de entrega polimérico de sucesso (SU; KANG, 2020).

5.2.1 Poliplexos

Quando os polímeros são complexados com ácidos nucleicos são formados poliplexos, em sua maioria compostos por polímeros catiônicos como o PEI, PLL, PLO, PAMAM e PLGA, visando atingir a estabilidade de carregamento via interação eletrostática com o material genético (ITA, 2020). Um exemplo de poliplexo pode ser observado no trabalho de SOLER BESUMBES et al., (2019). Nesse estudo *in vitro*, foi verificado que nanopartículas catiônicas de PLGA, preparadas usando nanoemulsões (NE) como molde podem ser utilizados como sistemas de entrega para vacinas de DNA. Graças à liberação pelo FDA de seu uso para aplicações médicas, o ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA) é um dos polímeros sintéticos mais comumente usados para a criação de nanocarreadores poliméricos (MAKADIA; SIEGEL, 2011). É interessante notar que macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos absorvem facilmente poliplexos, incluindo nanopartículas de PLGA, que são conhecidas por gerarem uma resposta imune maior e mais duradoura (SOLER BESUMBES et al., 2019). Outro exemplo no campo pré-clínico é a vacina DNA contra a Hepatite B utilizando poliplexos de polímeros sintéticos de poli(β -amino éster) (P β AE) e poli[2- (dimetilamino)etilmetacrilato] (PDMAEMA) conjugados com o polissacarídeo de origem natural β -glucana (SOARES et al., 2019). Embora nenhuma resposta imune baseada em células específicas contra o antígeno tenha sido desenvolvida via vacinação subcutânea, foi demonstrado que os bioefeitos das formulações vacinais quanto a hemocompatibilidade e citotoxicidade são dose-dependentes.

5.2.2 Copolímeros

Diferentemente de outras formulações, os copolímeros contêm mais de um monômero na sua composição (LU; CAI; ZHANG, 2021). São fáceis de administrar, relativamente simples de fabricar e são conhecidos por propiciar aumento das respostas adaptativas (BOSE et al., 2019). Isso pode ser visto no estudo de HRABER et al., (2018), que produziu uma vacina de DNA contendo antígenos do ZIKV carregada por copolímeros em blocos anfifílicos (ABC) tetrafuncional. Embora ABC não possua atividades adjuvantes (HRABER et al., 2018), nessa vacina aplicada em camundongos gerou um grande aumento na captação por APCs e consequente elevação na produção da proteína alvo por ativação de sensores moleculares.

5.2.3 Dendrímeros

Dendrímeros são macromoléculas sintéticas, extremamente ramificadas, simétricas, globulares, geralmente catiônicas e semelhantes a um dendrito (ZHAO et al., 2020). São usadas principalmente como nanocarreadores para liberação direcionada de drogas e solubilização de drogas pouco solúveis em água (VAN DEN BERG et al., 2021). Os dendrímeros têm um tamanho menor do que alguns dos nanocarreadores usuais, de modo que podem ser facilmente encapsulados para formar um nanohíbrido e podem ser absorvidos na superfície ou ligados quimicamente (MITTAL et al., 2021). As estruturas tridimensionais características dos dendrímeros permitem que eles passem pelas membranas celulares sem gerar ruptura como os polímeros convencionais (ZHAO et al., 2020). Polímeros como a poliamidoamina PAMAM forma dendrímeros de carga positiva e interagem facilmente com os ácidos nucleicos (ABEDI-GABALLU et al., 2018). Porém, apresenta a desvantagem de não ser degradável e apresentar alto peso molecular, que reflete em certa toxicidade, além de ser reconhecido pelo sistema imune inato e ativar o complemento (CHEN et al., 2022). Em contrapartida, ZHAO et al., (2020) desenvolveu uma vacina de DNA veterinária com entrega de poli-L-lisinas Dendrigrft que aumentou as respostas celulares e humorais contra o vírus da influenza aviária H9N2 em galinhas. Esse dendrímero gerado é biodegradável, menos tóxico, solúvel e não imunogênico, representando uma alternativa para os dendrímeros sintéticos comumente utilizados e conhecidos por seus efeitos adversos.

5.2.4 Micelas Poliméricas

As micelas poliméricas, feitas pela combinação em solução aquosa de ácidos nucleicos e copolímeros (cuja propriedade podem ser moduladas), são frequentemente utilizadas como carreadores de mRNA (GHEZZI et al., 2021). Como tal, uma nova micela polimérica com base no copolímero de polietilenoimina (PEI) modificado com succinato de vitamina E (PVES) para entrega de mRNA foi desenvolvida por REN et al. (2021) para avaliação da construção e profilaxia contra o SARS-CoV-2. Em termos de indução de complemento e toxicidade inerente devido ao peso molecular e carga, o PEI tem as mesmas desvantagens do PAMAM (CHEN et al., 2022). Nessa construção, porém, o PEI foi modificado e junto com a vitamina E, que é hidrofóbica, formou copolímeros anfifílicos automontáveis em micelas, reduzindo a toxicidade e induzindo células T, resposta imune do tipo Th1 e amplificação das repostas humorais contra o antígeno RBD do SARS-CoV-2.

5.3 SISTEMAS BASEADOS EM MICRORGANISMOS

Curiosamente, embora a atividade principal dos sistemas de entrega seja facilitar a captação específica do antígeno pelas células do sistema imunológico, alguns possuem composição integrada, apresentando atividades imunomoduladoras potentes (OU et al., 2022).

Como visto anteriormente, sistemas que possuem materiais catiônicos e polímeros sintéticos como PEI e PAMAM, podem ser reconhecidos por células de defesa, potencializando a resposta imune (VAN DEN BERG et al., 2021). Além desses, outra plataforma carreadora já conhecida desde os primórdios para imunização contra agentes infecciosos, vem ganhando mais visibilidade atualmente para entrega de compostos. Essa consiste nos sistemas baseados em microrganismos, especialmente os voltados para bactérias e leveduras (YURINA, 2018; ZHANG et al., 2021). Vírus e arqueias também se apresentam como plataformas carreadoras, principalmente na forma de virossomas e arqueossomas, respectivamente, ou por proteínas adjuntas transportadoras (ASADI; GHOLAMI, 2021; KARIMI et al., 2020). Embora os estudos se concentrem mais em vacinas de subunidade, mostram-se potencialmente úteis para a entrega de ácidos nucleicos (ASADI; GHOLAMI, 2021).

Como adjuvantes naturais, podem ativar eficientemente as vias de sinalização nas células imunes e mobilizar o sistema imunológico enquanto carregam os ácidos nucleicos ancorados na superfície ou internamente (CIABATTINI et al., 2019). Dado o tamanho e composição complexa, são naturalmente reconhecidos pelo sistema de defesa, e podem atuar como adjuvantes pela ativação de receptores associados a patógenos, induzindo a captação específica por APCs (LIU et al., 2018). Além disso, amplificam a gama de métodos de administração para as vias mucosas intranasal, oral e intravaginal (YURINA, 2018). Alguns desses organismos são usados como adjuvantes imunológicos e aditivos alimentares e possuem certificação e reconhecimento como seguros (GRAS) pela FDA (SILVA et al., 2021; TAN et al., 2022). Inclusive, para garantir a segurança do hospedeiro, podem ser inativados pelo calor ou modificados de modo a deletar seus componentes de patogenicidade (SILVA et al., 2021; YURINA, 2018).

Porém, embora esses vetores sejam capazes de induzir respostas imunes robustas, alguns deles, principalmente vírus e bactérias, podem ser neutralizados por componentes da imunidade humoral do hospedeiro após administrações repetidas e apresentar certa citotoxicidade (CORIA et al., 2022).

5.3.1 Vetores virais, Virossomas, e Proteínas de vírus de plantas

As tecnologias baseadas em vetores virais são geralmente consideradas meios eficazes de fornecer material genético às células, mas a pesquisa atual tende a usar sistemas não virais para entrega de vacinas de ácido nucleico (RAMAMOORTHY, 2015). Isso ocorre porque sua aplicação às vezes é limitada pelo desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra o vetor, preocupações de segurança e limitações de fabricação (ZHU et al., 2020a). Embora a triagem dos artigos não tenha recuperado ensaios clínicos e pré-clínicos de sistemas de entrega virais para entrega de ácido nucleico, virossomas e nanopartículas virais de plantas já vem sendo empregados como carreadores (ASADI; GHOLAMI, 2021; KHEIRI et al., 2012).

Os virossomos são nanocarreadores que imitam a estrutura de um vírus envelopado cujo nucleocapsídeo foi eliminado (ASADI; GHOLAMI, 2021). Similar aos lipossomas, o virossoma é um nanomaterial lipídico emergente como nanocarreador aprovado pela FDA e constituído de vesículas esféricas unilamelares de 60-200 nm

(FAN et al., 2022). Suas técnicas de preparação são simples, econômicas e seguem etapas principais semelhantes (ASADI; GHOLAMI, 2021). Ao transportar ácidos nucleicos, esse sistema interage com os receptores da célula hospedeira, induzindo respostas humorais e celulares via células B e endocitose por outras APCs (LOO et al., 2021). Por outro lado, as nanopartículas de vírus de plantas (PVNPs) possuem capacidade imunoestimulante inerente e têm sido investigadas como adjuvantes imunológicos para estimular uma resposta imune antitumoral (ALEMZADEH et al., 2018). Vírus de plantas como o vírus do mosaico do caupi (CPMV) em forma de nanopartículas virais são vantajosos pela não infecciosidade e ausência de toxicidade em humanos e tem sido bem-sucedido na entrega de materiais de ácidos nucleicos entrando nas células por vias alternativas ou escapando das vesículas endossomais (BEATTY; LEWIS, 2019).

5.3.2 Arqueias, Bactérias e seus derivados

Como vetores vivos, as bactérias são agentes promissores para a entrega de vacinas de ácidos nucleicos (YURINA, 2018). O vetor bacteriano induz uma resposta imune robusta devido aos seus componentes naturais, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano e flagelina que são reconhecidos pelo sistema imunológico (CAO; LIU, 2020a).

As bactérias têm características específicas denominadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), reconhecidos por receptores do tipo Toll e Nod (LONG et al., 2022). Esta introdução induz a resposta imune nativa e aumenta a resposta imune adaptativa (HUANG et al., 2018). Porém, para algumas espécies, os mecanismos precisos pelos quais os vetores bacterianos disponibilizam os ácidos nucleicos nas células hospedeiras ainda não são totalmente compreendidos (YURINA, 2018). Notavelmente, cepas recombinantes e atenuadas como algumas espécies de *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Listeria* e *Shigella* bem como bactérias não patogênicas, como bactérias do ácido lático (LAB), são consideradas carreadoras de vacinas de ácidos nucleicos (HUANG et al., 2018; YURINA, 2018).

Esses organismos trazem ainda o benefício da via de administração através da via mucosa que induz benéficamente respostas imunes mucosas e sistêmicas (YURINA, 2018). As LAB por exemplo, são ainda mais adequadas, pois além de serem

não patogênicas, suportarem as condições ácidas no sistema gastrointestinal (GI) e protegerem os ácidos nucleicos, apresentam efeitos probióticos (KAZI et al., 2022). Além dessas, derivados bacterianos podem ser utilizados como nanocarreadores potencialmente úteis para entrega de antígenos, alguns como “fantasmas bacterianos” possuem a capacidade de estimular a resposta imune tão potente quanto a das bactérias vivas (KANG et al., 2022). Outros componentes como a camada S, endosporos e vesículas de membrana externa também são aplicados, no entanto esse último contém LPS podendo causar toxicidade imunológica (LONG et al., 2022).

No campo da vacinação, VMEs foram usadas recentemente no estudo de LI et al. (2022b) para entregar vacina de mRNA e proteína de escape lisossomal. Com essa construção, foi inibida significativamente a progressão do melanoma e provocou regressão em um modelo de câncer de cólon em camundongos. Como carreador de vacina de DNA, *Salmonella typhimurium* A atenuada foi utilizada na vacina profilática contra o Duck Tembusu virus (DTMUV) e administrada por via oral, induzindo fortes respostas humorais com alto nível de anticorpos específicos contra o antígeno (HUANG et al., 2018). Essa bactéria gram-negativa demonstra fortes atividades adjuvantes, contém LPS que é reconhecido pelo receptor TLR4, e flagelina, que se liga ao TLR5. Essas ligações ativam vias que então induzem a liberação de citocinas e potencializam a resposta imune (YURINA, 2018). Já na profilaxia, uma vacina de DNA carregada e expressa por *Mycobacterium parafortitum* administrada subcutaneamente contra o SARS-Cov-2 gerou forte resposta celular e indução de Th1 em camundongos (KIM et al., 2021).

No entanto, embora os sistemas de entrega bacterianos apresentem várias vantagens como indução potente da resposta imune, capacidade de entrega via oral, e direcionamento maior para APCs, também apresentam desvantagens significativas que devem ser levadas em consideração (CAO; LIU, 2020b). Primeiro, o uso de bactérias vivas embora de forma modificada ou atenuada inclui a probabilidade de causar infecção, particularmente em lactentes e pacientes imunocomprometidos (YURINA, 2018). Em segundo lugar, podem assim como os vírus, desenvolverem anticorpos neutralizantes contra o próprio vetor, resultando na diminuição da eficácia do antígeno vacinal (CORIA et al., 2022).

As arqueias, um domínio de seres vivos unicelulares morfologicamente semelhantes às bactérias, mas distintos geneticamente também são usados como sistemas de entrega de vacinas, especialmente na forma de arqueossomos

(ADAMIAK et al., 2021). O arqueossomo é um sistema de nano-entrega baseado em lipossomas desenvolvido para entrega de genes. A exemplo, KARIMI et al. (2020) produziu uma vacina de DNA terapêutica carregada na superfície ou encapsulada por Arqueossomo contra o papilomavírus humano (HPV), essa vacina administrada pela via subcutânea, induziu forte resposta humoral, celular e polarização voltada para Th1.

5.3.3 Leveduras

As leveduras são microrganismos unicelulares versáteis comumente utilizados na indústria de alimentos e que tem potencial valor de aplicação como biofábrica de proteínas terapêuticas e transportador de moléculas biológicas (TAN et al., 2022). Algumas cepas foram certificadas como rótulos de geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, do inglês *Generally Recognized As Safe*) pela FDA e têm sido utilizadas para a bioprodução (ALEXANDER (IVANOVA), 2021). Espécies como *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* são predominantemente utilizadas como carreadores para entrega de drogas, produção de vacina de subunidade e proteínas recombinantes (ALEXANDER (IVANOVA), 2021; SILVA et al., 2021). Além disso, foram avaliadas como um veículo para ácidos nucleicos apresentando várias vantagens, como a capacidade de administração oral, atividade adjuvante, ausência de toxicidade e entrega específica (SILVA et al., 2021).

Os veículos de entrega à base de leveduras são excelentes candidatos para vacina oral, uma vez que possuem característica celulares que conferem maior resistência a digestão enzimática, ao ambiente ácido e às barreiras mucosas do trato gastrointestinal (HAN et al., 2019). Sua atividade adjuvante é obtida pelos vários componentes que podem estimular ou modular a resposta imune do hospedeiro (KUMAR; KUMAR, 2019). A parede celular compreende principalmente β -1,3 e β -1,6-glucana, quitina, manana, e outros polissacarídeos (TAN et al., 2022). Esses promovem a imunoestimulação pela ligação com receptores de dectina, manose-fucose e TLRs como TLR-2, 4 e 6 presentes nas CDs (LIU et al., 2018). Essa interação leva a secreção de citocinas do tipo Th1 e Th17 através dos padrões moleculares associados a patógenos e ativação dos componentes da imunidade inata, induzindo captação específica por APCs (ALEXANDER (IVANOVA), 2021). Após serem

fagocitadas, são degradadas pelos fagolisossomos e o ácido nucléico é liberado e transportado para suas regiões de síntese (SILVA et al., 2021).

S. cerevisiae é a espécie de levedura não patogênica mais utilizada para de entrega de vacinas de ácidos nucleicos, tanto na forma de células recombinante inteira, quanto na configuração de cápsula, microcápsula ou sistema de exibição de superfície (DUMAN-SCHEEL, 2019). Atualmente os estudos de vacinas de DNA e RNA entregues por essa cepa englobam tanto a profilaxia quanto terapia contra doenças de humanos e de outros animais, como peixes (ZAKRIA et al., 2019). Han et al. (2019) por exemplo, desenvolveu uma vacina oral de DNA à base de *S. cerevisiae* inteira que induziu respostas antígeno-específicas, protegendo carpas contra a infecção por *Aeromonas hydrophila*. No campo da terapia por controle pós transcricional, uma vacina de siRNA e Trp2 revestidos com nanopartículas de PEI e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) entregues por *S. cerevisiae* recombinante inibiram a expressão de IDO e induziram respostas de células T contra melanoma em camundongos (LIU et al., 2018). ZHANG et al., (2021) por sua vez, produziu uma vacina composta de IL-1 β shRNA (RNA em gancho curto) entregue por microcápsulas de *S. cerevisiae* para terapia de osteoartire pós-traumática, e verificou a regulação da resposta inflamatória e expressão de IL-1 β por via oral. Por fim, uma vacina de DNA terapêutica em fase pré-clínica foi carregada para regular a miostatina e gerou modulação imunológica pela supressão de IL-21(ZAKRIA et al., 2019). Quanto a segurança, essas vacinas não produziram efeitos adversos, e por serem entregues por via oral ou subcutânea, diminuíram o desconforto, facilitando a aplicação.

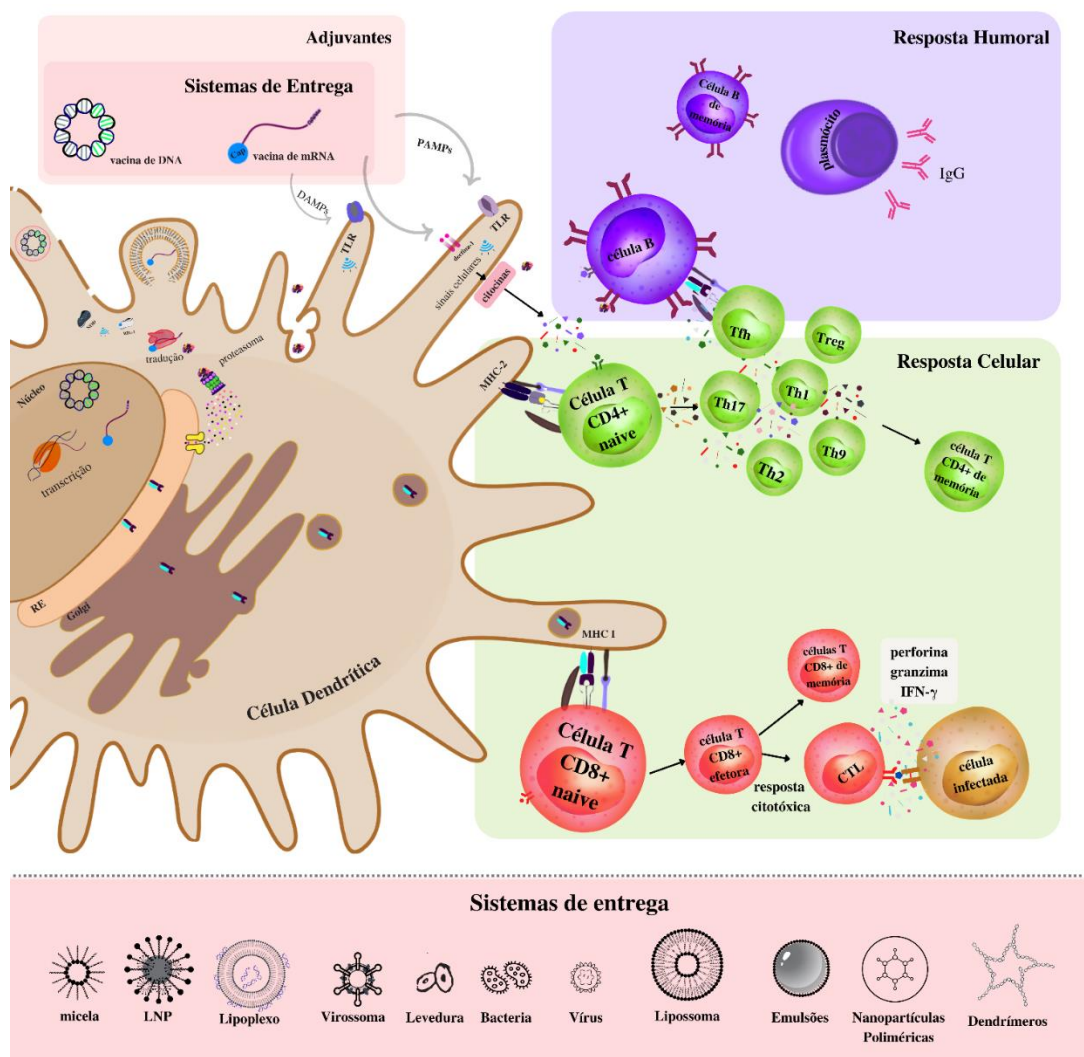
No entanto, embora os transportadores de liberação de leveduras demonstrem grande potencial, ainda há necessidade de pesquisa e entendimento das vantagens observadas, bem como a melhor avaliação da quantidade de material genético a ser carregado, absorção específica no organismo, e o transporte dos mesmos *in vivo* (TAN et al., 2022).

5.4 INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS DE ENTREGA NA RESPOSTA IMUNE

Para realizar uma entrega eficiente, o desenvolvimento de uma plataforma que supere as barreiras existentes é de grande importância (TORRES-VANEGAS; CRUZ; REYES, 2021). Ademais, esses sistemas devem permitir o transporte dos ácidos nucleicos para seus locais de síntese de proteínas. Para a vacina de DNA, é

necessário ultrapassar a membrana celular e em seguida a membrana nuclear para que ocorra a transcrição do DNA em mRNA, que conterá a informação em códons para a síntese do antígeno (Figura 5) (GHAFFARIFAR, 2018). Diferentemente, os sistemas de vacinas de mRNA devem proporcionar uma maior estabilidade a essa macromolécula, assegurando a sua passagem pela membrana celular para que ocorra sua tradução no citoplasma (WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019).

Figura 5. Ativação de vias imunológicas geradas por vacinas gênicas com sistemas de entrega. Após a administração da vacina, os ácidos nucleicos são introduzidos na célula dendrítica ou por outras APCs por meio dos sistemas de entrega. Na vacina de DNA, os sistemas de entrega devem facilitar a entrada da vacina na célula e favorecer o acesso do material genético ao núcleo para que seja transcrito em mRNA. Em seguida, as rotas para as vacinas de DNA e mRNA são as mesmas, com a tradução da proteína do antígeno ocorrendo no citoplasma, processamento por proteossomos e apresentação dos epítopos pelo MHC-I. Essa apresentação, ativa células T CD8+ naíve levando à produção de células efetoras, indução de respostas citotóxicas e expansão de células T CD8+ de memória. Por outro lado, proteínas exógenas liberadas por células transfectadas podem ser reconhecidas diretamente pelas células B ou fagocitadas pelas CDs, processadas e apresentadas pelo MHC-II. Nesse caso, eles podem ativar células T CD4+ específicas do antígeno que se expandem em subtipos correspondentes, liberam citocinas e interagem com células B levando a uma forte resposta humoral.



Fonte: Autora

Alguns sistemas como os Lipossomas, LNPs e Lipoplexos possuem características anfifílicas e conseguem penetrar na célula pela membrana celular, outros, como os baseados em microrganismos são identificados e fagocitados pelas APCs (HOBERNIK; BROS, 2018). Levando em consideração o tamanho e o reconhecimento de APCs por patógenos, partículas de 20-200 nm similar aos tamanhos virais, são normalmente ingeridas por CDs (células dendríticas), enquanto macrófagos geralmente engolfam partículas maiores (0.5-5 μm) (BARANOV et al., 2021). O tamanho das partículas vacinais também determina a rota de transporte do antígeno para os linfonodos, partículas menores geralmente entram na circulação pelos capilares periféricos, enquanto as com tamanhos de 10-200 nm trafegam para os capilares linfáticos (CAI et al., 2021). Nesses capilares há uma abundância de APCs e células T e B, e por tanto, as partículas que alcançam os linfonodos desencadeiam respostas mais fortes (HAMPTON; CHTANOVA, 2019).

A carga superficial, outra propriedade vital dos sistemas de distribuição de vacinas, também apresenta efeitos adversos no processo de direcionamento de captação de antígeno pela APC (PETKAR et al., 2021). A carga superficial foi comprovada por ser um dos principais fatores influenciadores de sua eficiência de internalização por APCs e de citotoxicidade (BLAKNEY et al., 2018). Partículas catiônicas, como as presentes em sistemas baseados em lipídeos e polímeros são internalizadas melhor por APCs, mas também são mais propensas a induzir agregação e hemólise (KESHARWANI et al., 2018; MITCHELL et al., 2021). Mecanicamente, a alta citotoxicidade de materiais carregados positivamente é principalmente correlacionada com a ruptura da carga negativa das membranas celulares durante o processo de penetração, que induz a morte celular (AUGUSTINE et al., 2020). Materiais carregados negativamente são mais favoráveis para um melhor movimento intersticial para um melhor desempenho de entrega de captação linfática e retenção nos linfonodos, que abrigam células relevantes ao controle da infecção (SCHUDEL; FRANCIS; THOMAS, 2019). No entanto, como os ácidos nucleicos possuem carga líquida negativa, sua estabilidade é mais bem assegurada pela interação eletrostática com materiais catiônicos (JIANG; THAYUMANAVAN, 2020). Maiores preocupações sobre a segurança, estão associadas com os diversos sistemas de entrega estão relacionadas com: biocompatibilidade, biodistribuição, e a indução de reações imunes não desejadas (HOBERNIK; BROS, 2018). Por exemplo, a aplicação repetida de sistemas adenovirais, bacterianos e a base de PLL e PAMAM

pode resultar na neutralização específica a molécula carreadora, e não ao antígeno alvo (CHEN et al., 2022; CORIA et al., 2022). Em vacinas terapêuticas que requerem maiores aplicações em menores intervalos, essa neutralização não requerida pode interferir na resposta imune. Por outro lado, em vacinas profiláticas, as aplicações vacinais geralmente têm espaços maiores entre doses, e por tanto, podem ser menos impactadas.

Métodos de entrega física como *gene gun* e eletroporação podem facilitar a entrega do material genético às APCs e aumentar a resposta imune (QIN; DU; SUN, 2021). No entanto, esses métodos de administração exigem equipamentos caros e específicos que podem não ser práticos para campanhas de vacinação em larga escala (PELETTA et al., 2021). As vacinas carreadas pelos sistemas de entrega aqui mencionados são administradas principalmente a pacientes em duas vias de administração principais, a intramuscular e a subcutânea, seguidas das vacinações orais e intranasais. Para transfectar o maior número de APCs possíveis, entrega de vacinas de ácidos nucleicos para órgãos linfoides secundários via aplicação sistêmica como administração intravenosa, oral, ou pulmonar, pode ser uma estratégia apropriada (DING et al., 2021). As vacinas orais são valorizadas nos países em desenvolvimento como estratégias potenciais para melhorar a eficácia da distribuição de vacinas, reduzindo os custos de administração e aumentando a adesão a vacina (JAZAYERI et al., 2021). Porém, a via oral pode não ser a rota mais indicada para direcionamento dos linfonodos, dado a existências de barreiras do trato gastrointestinal, baixo pH, e presença de enzimas (ALEXANDER (IVANOVA), 2021). Sistemas utilizando bactérias conseguem realizar administrações de vacinas de ácidos nucleicos por via oral, no entanto são mais sujeitas as barreiras químicas e físicas do que as leveduras que contém β -glucana (YURINA, 2018). Devido a β -glucana resistir mais fortemente aos ácidos e não ser digerida no estômago, o processo de fagocitose por células M é facilitado levando a entrada da vacina no sistema linfático (TAN et al., 2022).

Por fim, alguns sistemas de entrega além de atuarem como moléculas transportadoras, apresentam características adjuvantes inerentes e, portanto, podem auxiliar na polarização da resposta imune (OU et al., 2022). A depender da composição da molécula carreadora, podem ser reconhecidos pelas CDs por receptores como os do tipo Toll-like, NOD, RIG, e Dectina-1 através da identificação de padrões moleculares (Figura 5). Nesse caso, os sinais recebidos pelos receptores

induzem a liberação de citocinas, que interagem com as células do sistema adaptativo alterando o balanço e a indução da resposta imune. Nessa revisão, a maioria das respostas obtidas pelas vacinas de DNA e RNA com os diversos sistemas de entrega foram voltados para Th1 ou respostas Th2/Th1 mais equilibradas. Sistemas de entrega que auxiliam na indução de respostas Th1 são principalmente almejados para o combate de células cancerígenas e contra alguns patógenos intracelulares como vírus, por influenciarem nas respostas celulares e citotóxicas (ABBASI; UCHIDA, 2021). No SARS-CoV-2, por exemplo, essa resposta é especialmente mais interessante, dado que vacinas com adjuvantes de viés Th2 mostraram uma associação a patogênese pulmonar aprimorada (PELETTA et al., 2021). Porém, outras vacinas requerem uma ativação e manutenção da imunidade humoral mais forte, necessária para remover infecções extracelulares, como os parasitas e alérgenos e portanto, nesse caso, uma resposta Th2, ou um viés mais balanceado pode ser necessário (TANNER et al., 2019).

6 CONCLUSÃO

O arranjo molecular dos sistemas de entrega influencia na interação com os ácidos nucleicos, no transporte aos locais de síntese antigênica, na forma como são percebidos por células imunes e na geração de inflamação e efeitos citotóxicos. Dentre os transportadores existentes, os baseados em lipídeos são os mais utilizados no carregamento de vacinas de ácidos nucleicos. Porém, a toxicidade dependente da carga dessas partículas ocasiona efeitos citotóxicos e gera instabilidade, sendo requeridas modificações que podem alterar a sua eficácia. Além disso, a interação de componentes dos sistemas de entrega com células do sistema imune adaptativo pode influenciar no balanço e indução da resposta imune. Dessa forma, o uso de microrganismos, que possuem atividade adjuvante natural e status GRAS, como carreadores apresentam potencial por induzirem menos efeitos citotóxicos, serem passíveis de administração por via oral e gerarem fortes respostas adaptativas. Portanto, além de conhecer a resposta imunológica desencadeada pelo patógeno, é importante considerar o tipo de sistema de entrega a ser utilizado, seu custo-benefício, impacto na resposta imunológica e o efeito final almejado para que as construções vacinais gerem respostas imunes ideais.

REFERÊNCIAS

ABBASI, S.; UCHIDA, S. Multifunctional Immunoadjuvants for Use in Minimalist Nucleic Acid Vaccines. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 644, 1 maio 2021.

ABEDI-GABALLU, F. et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. **Applied Materials Today**, v. 12, p. 177–190, set. 2018.

ADAMIAK, N. et al. Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 746235, 10 set. 2021.

AIDA, V. et al. Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 654289, 15 abr. 2021.

ALDOSARI, B. N.; ALFAGIH, I. M.; ALMURSHEDI, A. S. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 206, 2 fev. 2021.

ALEMZADEH, E. et al. Plant virus nanoparticles: Novel and robust nanocarriers for drug delivery and imaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 20–27, 2018.

ALEXANDER (IVANOVA), E. Yeasts in nanotechnology-enabled oral vaccine and gene delivery. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 8325–8335, 1 jan. 2021.

ANDRIANOV, A. K.; FUERST, T. R. Immunopotentiating and Delivery Systems for HCV Vaccines. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 981, 25 maio 2021.

ASADI, K.; GHOLAMI, A. Virosome-based nanovaccines; a promising bioinspiration and biomimetic approach for preventing viral diseases: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 648–658, 2021.

AUGUSTINE, R. et al. Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. **Materials Today Communications**, v. 25, p. 101692, 2020.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of Action of Adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

BADEN, L. R. et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 403–416, 4 fev. 2021.

BAI, H. et al. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 6, p. BSR20160616, 22 dez. 2017.

BARANOV, M. V. et al. Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 607945, 12 fev. 2021.

BEATTY, P. H.; LEWIS, J. D. Cowpea mosaic virus nanoparticles for cancer imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 145, p. 130–144, 2019.

BERGER, M. et al. Innovative lipoplexes formulations with enhanced siRNA efficacy for cancer treatment: Where are we now? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 605, p. 120851, 2021.

BLAKNEY, A. K. et al. One Size Does Not Fit All: The Effect of Chain Length and Charge Density of Poly(ethylene imine) Based Copolymers on Delivery of pDNA, mRNA, and RepRNA Polyplexes. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 7, p. 2870–2879, 2018.

BLAKNEY, A. K.; IP, S.; GEALL, A. J. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. **Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 97, 28 jan. 2021.

BOILESEN, D. R.; NIELSEN, K. N.; HOLST, P. J. Novel Antigenic Targets of HPV Therapeutic Vaccines. **Vaccines**, v. 9, n. 11, p. 1262, 1 nov. 2021.

BONAM, S. R. et al. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 9, p. 771–793, set. 2017.

BONAM, S. R. et al. Potential immuno-nanomedicine strategies to fight COVID-19 like pulmonary infections. **Nano Today**, v. 36, p. 101051, 2021.

BOSE, R. J. et al. Biodegradable polymers for modern vaccine development. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 77, p. 12–24, 2019.

BOUKHEBZA, H. et al. Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases: Current clinical developments using MVA-based vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 12, p. 1746–1757, dez. 2012.

CAI, T. et al. Delivery of nanovaccine towards lymphoid organs: recent strategies in enhancing cancer immunotherapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 389, dez. 2021.

CAO, Z.; LIU, J. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 326, p. 396–407, out. 2020a.

CAO, Z.; LIU, J. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 326, p. 396–407, out. 2020b.

CHEN, G. et al. Advances in the polymeric delivery of nucleic acid vaccines. **Theranostics**, v. 12, n. 9, p. 4081–4109, 2022.

CIABATTINI, A. et al. Modulation of Primary Immune Response by Different Vaccine Adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 17 out. 2016.

CIABATTINI, A. et al. Role of the Microbiota in the Modulation of Vaccine Immune Responses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1305, 3 jul. 2019.

CORIA, L. M. et al. A Novel Bacterial Protease Inhibitor Adjuvant in RBD-Based COVID-19 Vaccine Formulations Containing Alum Increases Neutralizing Antibodies, Specific Germinal Center B Cells and Confers Protection Against SARS-CoV-2 Infection in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 844837, 28 fev. 2022.

DA'DARA, A. A. et al. Prime-Boost Vaccine Regimen for SjTPI and SjC23 Schistosome Vaccines, Increases Efficacy in Water Buffalo in a Field Trial in China. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 284, 20 fev. 2019.

DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; DIDIERLAURENT, A. M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 39, p. 14–21, out. 2018.

DING, Y. et al. Vaccine delivery systems toward lymph nodes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 179, p. 113914, 2021.

D'SOUZA, M. P. et al. Mind the gap from research laboratory to clinic: Challenges and opportunities for next-generation assays in human diseases. **Vaccine**, v. 39, n. 37, p. 5233–5239, ago. 2021.

DÜLMEN, M.; MUTHMANN, N.; RENTMEISTER, A. Chemo-Enzymatic Modification of the 5' Cap Maintains Translation and Increases Immunogenic Properties of mRNA. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 24, p. 13280–13286, 7 jun. 2021.

DUMAN-SCHEEL, M. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 9, p. 942–952, 11 jun. 2019.

EGGENHUIZEN, P. J.; NG, B. H.; OOI, J. D. Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7015, 23 set. 2020.

ELIZAGA, M. L. et al. Safety and tolerability of HIV-1 multiantigen pDNA vaccine given with IL-12 plasmid DNA via electroporation, boosted with a recombinant vesicular stomatitis virus HIV Gag vaccine in healthy volunteers in a randomized, controlled clinical trial. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0202753, 20 set. 2018.

EUGENIA TOLEDO-ROMANÍ, M. et al. **Safety and efficacy of the two doses conjugated protein-based SOBERANA-02 COVID-19 vaccine and of a heterologous three-dose combination with SOBERANA-PLUS: double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 clinical trial.** [s.l.] *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*, 1 nov. 2021. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.10.31.21265703>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

FACCIOLÀ, A. et al. An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives. **Vaccines**, v. 10, n. 5, p. 819, 22 maio 2022.

FAHRNI, M. L. et al. Management of COVID-19 vaccines cold chain logistics: a scoping review. **Journal of Pharmaceutical Policy and Practice**, v. 15, n. 1, p. 16, dez. 2022.

FAN, J. et al. Advances in Infectious Disease Vaccine Adjuvants. **Vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1120, 13 jul. 2022.

FAN, Y.; MARIOLI, M.; ZHANG, K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, p. 113642, jan. 2021.

FAUREZ, F. et al. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3888–3895, maio 2010.

FILIPCZAK, N. et al. Recent advancements in liposome technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 156, p. 4–22, 2020.

FREUND, I. et al. RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors. **Genes**, v. 10, n. 2, p. 92, 29 jan. 2019.

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? **Drugs of Today**, v. 54, n. 5, p. 315, 2018.

GHEZZI, M. et al. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions. **Journal of Controlled Release**, v. 332, p. 312–336, abr. 2021.

GRUN, M. K. et al. PEGylation of poly(amine-co-ester) polyplexes for tunable gene delivery. **Biomaterials**, v. 272, p. 120780, 2021.

HAMPTON, H. R.; CHTANOVA, T. Lymphatic Migration of Immune Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1168, 28 maio 2019.

HAN, B. et al. Oral yeast-based DNA vaccine confers effective protection from *Aeromonas hydrophila* infection on *Carassius auratus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 948–954, jan. 2019.

HAN, J. W. et al. IFNL3-adjuvanted HCV DNA vaccine reduces regulatory T cell frequency and increases virus-specific T cell responses. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 1, p. 72–83, jul. 2020.

HASAN, T. et al. Toxoplasma gondii GRA15 DNA Vaccine with a Liposomal Nanocarrier Composed of an SS-Cleavable and pH-Activated Lipid-like Material Induces Protective Immunity against Toxoplasmosis in Mice. **Vaccines**, v. 10, n. 1, p. 21, 24 dez. 2021.

HASAN, Y. et al. A Phase 1 Trial Assessing the Safety and Tolerability of a Therapeutic DNA Vaccination Against HPV16 and HPV18 E6/E7 Oncogenes After Chemoradiation for Cervical Cancer. **International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics**, v. 107, n. 3, p. 487–498, jul. 2020.

HOBERNIK, D.; BROS, M. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3605, 15 nov. 2018.

HOGENESCH, H.; O'HAGAN, D. T.; FOX, C. B. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. **npj Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 51, dez. 2018.

HOSSEINIPOUR, M. C. et al. Phase 1 Human Immunodeficiency Virus (HIV) Vaccine Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of HIV Subtype C DNA and MF59-Adjuvanted Subtype C Envelope Protein. **Clinical Infectious Diseases**, p. ciz1239, 4 jan. 2020.

HOU, X. et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 6, n. 12, p. 1078–1094, dez. 2021.

HRABER, P. et al. Amphiphilic block copolymer delivery of a DNA vaccine against Zika virus. **Vaccine**, v. 36, n. 46, p. 6911–6917, 2018.

HU, Z.; OTT, P. A.; WU, C. J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 3, p. 168–182, mar. 2018.

HUANG, J. et al. Oral Delivery of a DNA Vaccine Expressing the PrM and E Genes: A Promising Vaccine Strategy against Flavivirus in Ducks. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12360, dez. 2018.

IAVARONE, C. et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 9, p. 871–881, 2 set. 2017.

ITA, K. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, p. 105358, 2020.

JAZAYERI, S. D. et al. Nano and Microparticles as Potential Oral Vaccine Carriers and Adjuvants Against Infectious Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 682286, 2 jun. 2021.

JEEVA, S. et al. An Update on mRNA-Based Viral Vaccines. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 965, 29 ago. 2021.

JIANG, Z.; THAYUMANAVAN, S. Noncationic Material Design for Nucleic Acid Delivery. **Advanced Therapeutics**, v. 3, n. 3, p. 1900206, mar. 2020.

JISKOOT, W. et al. Vaccines. Em: CROMMELIN, D. J. A.; SINDELAR, R. D.; MEIBOHM, B. (Eds.). **Pharmaceutical Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 281–304.

KAMPHORST, A. O.; ARAKI, K.; AHMED, R. Beyond adjuvants: Immunomodulation strategies to enhance T cell immunity. **Vaccine**, v. 33, p. B21–B28, jun. 2015.

KANG, S.-R. et al. Bacteria and bacterial derivatives as delivery carriers for immunotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 181, p. 114085, 2022.

KARIKÓ, K. et al. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. **Immunity**, v. 23, n. 2, p. 165–175, ago. 2005.

KARIKÓ, K. et al. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 11, p. 1833–1840, nov. 2008.

- KARIMI, H. et al. Combination therapy using human papillomavirus L1/E6/E7 genes and archaeosome: a nanovaccine confer immuneadjuvanting effects to fight cervical cancer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5787, dez. 2020.
- KAZI, T. A. et al. Plasmid-Based Gene Expression Systems for Lactic Acid Bacteria: A Review. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1132, 31 maio 2022.
- KESHARWANI, P. et al. Dendrimer nanohybrid carrier systems: an expanding horizon for targeted drug and gene delivery. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 300–314, 2018.
- KHEIRI, M. T. et al. Influenza virosome/DNA vaccine complex as a new formulation to induce intra-subtypic protection against influenza virus challenge. **Antiviral Research**, v. 95, n. 3, p. 229–236, set. 2012.
- KHOBRADE, A. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. **The Lancet**, v. 399, n. 10332, p. 1313–1321, abr. 2022.
- KIM, A. R. et al. Herpes Zoster DNA Vaccines with IL-7 and IL-33 Molecular Adjuvants Elicit Protective T Cell Immunity. **Immune Network**, v. 18, n. 5, p. e38, 2018.
- KIM, B.-J. et al. Recombinant Mycobacterium paragordoniae Expressing SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain as a Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2 Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 712274, 27 ago. 2021.
- KNEZEVIC, I. et al. Development of mRNA Vaccines: Scientific and Regulatory Issues. **Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 81, 23 jan. 2021.
- KO, E.-J.; KANG, S.-M. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 12, p. 3041–3045, 2 dez. 2018.
- KOBIYAMA, K.; ISHII, K. J. Making innate sense of mRNA vaccine adjuvanticity. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 474–476, abr. 2022.
- KORSHOLM, K. S. et al. T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. **Immunology**, v. 129, n. 1, p. 75–86, jan. 2010.
- KUMAR, R.; KUMAR, P. Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 2, 1 mar. 2019.
- KYRIAKOPOULOS, C. E. et al. Multicenter Phase I Trial of a DNA Vaccine Encoding the Androgen Receptor Ligand-binding Domain (pTVG-AR, MVI-118) in Patients with Metastatic Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 19, p. 5162–5171, 1 out. 2020.
- LEE, J. et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. **Acta Biomaterialia**, v. 80, p. 31–47, 2018.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines. **Current Issues in Molecular Biology**, p. 17–40, 2017.

LI, Q. et al. Built-in adjuvants for use in vaccines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 227, p. 113917, 2022a.

LI, Y. et al. Rapid Surface Display of mRNA Antigens by Bacteria-Derived Outer Membrane Vesicles for a Personalized Tumor Vaccine. **Advanced Materials**, v. 34, n. 20, p. 2109984, maio 2022b.

LIANG, Y.; HUANG, L.; LIU, T. Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 718753, 27 jul. 2021.

LIANG, Z. et al. Adjuvants for Coronavirus Vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 589833, 6 nov. 2020.

LIU, D. et al. An indoleamine 2, 3-dioxygenase siRNA nanoparticle-coated and Trp2-displayed recombinant yeast vaccine inhibits melanoma tumor growth in mice. **Journal of Controlled Release**, v. 273, p. 1–12, 2018.

LONG, Q. et al. Engineered bacterial membrane vesicles are promising carriers for vaccine design and tumor immunotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 186, p. 114321, 2022.

LOO, Y. S. et al. Biomimetic bacterial and viral-based nanovesicles for drug delivery, theranostics, and vaccine applications. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 4, p. 902–915, 2021.

LOPES, A.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 146, dez. 2019.

LU, H.; CAI, J.; ZHANG, K. Synthetic approaches for copolymers containing nucleic acids and analogues: challenges and opportunities. **Polymer Chemistry**, v. 12, n. 15, p. 2193–2204, 2021.

LUO, W.; YIN, Q. B Cell Response to Vaccination. **Immunological Investigations**, v. 50, n. 7, p. 780–801, 3 out. 2021.

MACDONALD, N. et al. Global vaccine action plan lessons learned I: Recommendations for the next decade. **Vaccine**, v. 38, n. 33, p. 5364–5371, jul. 2020.

MAGNUSSON, S. E. et al. Matrix-M™ adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice. **Immunologic Research**, v. 66, n. 2, p. 224–233, abr. 2018.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 26 ago. 2011.

MASCOLA, J. R.; FAUCI, A. S. Novel vaccine technologies for the 21st century. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 87–88, fev. 2020.

MCNEEL, D. G. et al. Phase II Trial of a DNA Vaccine Encoding Prostatic Acid Phosphatase (pTVG-HP [MVI-816]) in Patients With Progressive, Nonmetastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 36, p. 3507–3517, 20 dez. 2019.

MELSSSEN, M.; SLINGLUFF, C. L. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 47, p. 85–92, ago. 2017.

MEYER, H.; EHMANN, R.; SMITH, G. L. Smallpox in the Post-Eradication Era. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 138, 24 jan. 2020.

MITCHELL, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 2, p. 101–124, fev. 2021.

MITTAL, P. et al. Dendrimers: A New Race of Pharmaceutical Nanocarriers. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–11, 15 fev. 2021.

MORELLI, M. P. et al. IL-12 DNA Displays Efficient Adjuvant Effects Improving Immunogenicity of Ag85A in DNA Prime/MVA Boost Immunizations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 581812, 23 set. 2020.

MUCKER, E. M. et al. Lipid Nanoparticle Formulation Increases Efficiency of DNA-Vectored Vaccines/Immunoprophylaxis in Animals Including Transchromosomal Bovines. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8764, dez. 2020.

MUKAI, H. et al. Recent advances in lipid nanoparticles for delivery of nucleic acid, mRNA, and gene editing-based therapeutics. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 44, p. 100450, jun. 2022.

NANISHI, E.; DOWLING, D. J.; LEVY, O. Toward precision adjuvants: optimizing science and safety. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 32, n. 1, p. 125–138, fev. 2020.

NG'UNI, T.; CHASARA, C.; NDHLOVU, Z. M. Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 590780, 28 out. 2020.

NICHOLLS, E. F.; MADERA, L.; HANCOCK, R. E. W. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy: Adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 46–61, dez. 2010.

OLIVEIRA MANN, C. C.; HORNUNG, V. Molecular mechanisms of nonself nucleic acid recognition by the innate immune system. **European Journal of Immunology**, v. 51, n. 8, p. 1897–1910, ago. 2021.

OU, B. S. et al. Sustained delivery approaches to improving adaptive immune responses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 187, p. 114401, ago. 2022.

PAL SINGH, P. et al. Lipoplex-based therapeutics for effective oligonucleotide delivery: a compendious review. **Journal of Liposome Research**, v. 30, n. 4, p. 313–335, 1 out. 2020.

PAN, C. et al. Prophylactic vaccine delivery systems against epidemic infectious diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, p. 113867, 2021.

PARDI, N. et al. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 4, p. 261–279, abr. 2018.

PARK, K. S. et al. Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 169, p. 137–151, fev. 2021.

PELETTA, A. et al. DNA Vaccine Administered by Cationic Lipoplexes or by In Vivo Electroporation Induces Comparable Antibody Responses against SARS-CoV-2 in Mice. **Vaccines**, v. 9, n. 8, p. 874, 6 ago. 2021.

PERCHE, F. et al. Neutral Lipopolyplexes for In Vivo Delivery of Conventional and Replicative RNA Vaccine. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 17, p. 767–775, set. 2019.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, S. et al. **A randomized, double-blind phase I clinical trial of two recombinant dimeric RBD COVID-19 vaccine candidates: safety, reactogenicity and immunogenicity.** [s.l.] Infectious Diseases (except HIV/AIDS), 5 out. 2021. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.10.04.21264522>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

PETKAR, K. C. et al. An Overview of Nanocarrier-Based Adjuvants for Vaccine Delivery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 455, 27 mar. 2021.

POLACK, F. P. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 31 dez. 2020.

POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83–100, fev. 2021.

PONTI, F. et al. Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 235, p. 105032, 2021.

PORTER, K. R.; RAVIPRAKASH, K. DNA Vaccine Delivery and Improved Immunogenicity. **Current Issues in Molecular Biology**, p. 129–138, 2017.

PULENDRAN, B.; S. ARUNACHALAM, P.; O'HAGAN, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 6, p. 454–475, jun. 2021.

QIN, F. et al. A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 633776, 25 maio 2021.

QIN, L. et al. Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper-Mediated Immunity and Pathology. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1884, 15 ago. 2018.

QIN, M.; DU, G.; SUN, X. Recent Advances in the Noninvasive Delivery of mRNA. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 23, p. 4262–4271, 7 dez. 2021.

RAMAMOORTHY, M. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2015.

REN, J. et al. Self-assembled polymeric micelle as a novel mRNA delivery carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 338, p. 537–547, out. 2021.

ROCAMORA-REVERTE, L. et al. The Complex Role of Regulatory T Cells in Immunity and Aging. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 616949, 27 jan. 2021.

RODRIGUES, C. M. C.; PLOTKIN, S. A. Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1526, 14 jul. 2020.

ROSALES, C.; ROSALES, R. Prophylactic and Therapeutic Vaccines against Human Papillomavirus Infections. Em: AFRIN, F.; HEMEG, H.; OZBAK, H. (Eds.). **Vaccines**. [s.l.] InTech, 2017.

ROSENTHAL, K. S.; CARAMBULA, R.; ZIMMERMAN, D. H. Why Don't We Have a Vaccine Against Autoimmune Diseases? - A Review. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 10, n. 1, p. 574, 2019.

SAHIN, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 594–599, 22 out. 2020a.

SAHIN, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 594–599, 22 out. 2020b.

SAMARIDOU, E.; HEYES, J.; LUTWYCHE, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 154–155, p. 37–63, 2020.

SARKAR, S. et al. IL-33 enhances the kinetics and quality of the antibody response to a DNA and protein-based HIV-1 Env vaccine. **Vaccine**, v. 37, n. 17, p. 2322–2330, abr. 2019.

SCHIJNS, V. et al. Modulation of immune responses using adjuvants to facilitate therapeutic vaccination. **Immunological Reviews**, v. 296, n. 1, p. 169–190, jul. 2020.

SCHIJNS, V. et al. Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 501, 6 abr. 2021.

SCHLEE, M.; HARTMANN, G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 566–580, set. 2016.

SCHOENMAKER, L. et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120586, 2021.

SCHUDEL, A.; FRANCIS, D. M.; THOMAS, S. N. Material design for lymph node drug delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 4, n. 6, p. 415–428, jun. 2019.

SCHUH, R. S. et al. Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide: Implications for CRISPR/Cas technology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 530, p. 243–255, 2018a.

SCHUH, R. S. et al. Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as Nucleic Acids Delivery Systems Aiming at Mucopolysaccharidosis Type I Gene Therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 11, p. 221, nov. 2018b.

SHAFATI, M. et al. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. **Future Virology**, v. 17, n. 1, p. 49–66, jan. 2022.

SHI, S. et al. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3167–3178, maio 2019.

SHIRAIISHI, K.; YOKOYAMA, M. Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 20, n. 1, p. 324–336, 31 dez. 2019.

SILVA, A. J. D. et al. Yeasts as a promising delivery platform for DNA and RNA vaccines. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 3, p. foab018, 7 abr. 2021a.

SOARES, E. et al. Polymeric nanoengineered HBsAg DNA vaccine designed in combination with β -glucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 930–939, 2019.

SOLER BESUMBES, E. et al. PLGA cationic nanoparticles, obtained from nano-emulsion templating, as potential DNA vaccines. **European Polymer Journal**, v. 120, p. 109229, nov. 2019.

STEPHENSON, K. E. Therapeutic vaccination for HIV: hopes and challenges. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 13, n. 5, p. 408–415, set. 2018.

SU, S.; KANG, P. M. Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, p. 656, 1 abr. 2020.

TAN, Y. et al. Yeast as carrier for drug delivery and vaccine construction. **Journal of Controlled Release**, v. 346, p. 358–379, 2022.

TANNER, R. et al. The Humoral Immune Response to BCG Vaccination. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1317, 11 jun. 2019.

TEIJARO, J. R.; FARBER, D. L. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 4, p. 195–197, abr. 2021.

TEIXEIRA, H. F. et al. Cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 534, n. 1–2, p. 356–367, dez. 2017.

TENCHOV, R. et al. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**, v. 15, n. 11, p. 16982–17015, 23 nov. 2021.

THI, T. T. H. et al. Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines. **Vaccines**, v. 9, n. 4, p. 359, 8 abr. 2021.

TIAN, M. et al. Formulation in DDA-MPLA-TDB Liposome Enhances the Immunogenicity and Protective Efficacy of a DNA Vaccine against Mycobacterium tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 310, 27 fev. 2018.

TIZARD, I. R. Adjuvants and adjuvanticity. Em: **Vaccines for Veterinarians**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 75-86.e1.

TORRES-VANEGAS, J. D.; CRUZ, J. C.; REYES, L. H. Delivery Systems for Nucleic Acids and Proteins: Barriers, Cell Capture Pathways and Nanocarriers. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 428, 22 mar. 2021.

TRETIKOVA, D. S.; VODOVOZOVA, E. L. Liposomes as Adjuvants and Vaccine Delivery Systems. **Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–20, mar. 2022.

UDDIN, M. N.; RONI, M. A. Challenges of Storage and Stability of mRNA-Based COVID-19 Vaccines. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1033, 17 set. 2021.

VAN DEN BERG, A. I. S. et al. Polymeric delivery systems for nucleic acid therapeutics: Approaching the clinic. **Journal of Controlled Release**, v. 331, p. 121–141, mar. 2021.

VETTER, V. et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 110–120, 17 fev. 2018.

VONDERHEIDE, R. H. et al. Phase 1 study of safety, tolerability and immunogenicity of the human telomerase (hTERT)-encoded DNA plasmids INO-1400 and INO-1401 with or without IL-12 DNA plasmid INO-9012 in adult patients with solid tumors. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 9, n. 7, p. e003019, jul. 2021.

WADHWA, A. et al. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 102, 28 jan. 2020.

WALLIS, J.; SHENTON, D. P.; CARLISLE, R. C. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 196, n. 2, p. 189–204, 16 abr. 2019.

WANG, N.; CHEN, M.; WANG, T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. **Journal of Controlled Release**, v. 303, p. 130–150, 2019.

WANG, Y.; GRAINGER, D. W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 151–152, p. 56–71, 2019.

WANG, Z. et al. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. **Gene Therapy**, v. 11, n. 8, p. 711–721, 1 abr. 2004.

XU, H. et al. The effects of CCL3, CCL4, CCL19 and CCL21 as molecular adjuvants on the immune response to VAA DNA vaccine in flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 103, p. 103492, fev. 2020.

YAN, Y. et al. Non-viral vectors for RNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 342, p. 241–279, 2022.

YANG, L. et al. Recent Advances in the Molecular Design and Delivery Technology of mRNA for Vaccination Against Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 896958, 15 jul. 2022.

YONEZAWA, S.; KOIDE, H.; ASAI, T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 154–155, p. 64–78, 2020.

YURINA, V. Live Bacterial Vectors—A Promising DNA Vaccine Delivery System. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 27, 23 mar. 2018.

ZAKRIA, H. M. et al. Significant body mass increase by oral administration of a cascade of shIL21-MSTN yeast-based DNA vaccine in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109147, out. 2019.

ZHANG, C. et al. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 594, 27 mar. 2019.

ZHANG, C. et al. Modification of Lipid-Based Nanoparticles: An Efficient Delivery System for Nucleic Acid-Based Immunotherapy. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1943, 17 mar. 2022a.

ZHANG, L. et al. Yeast microcapsule-mediated oral delivery of IL-1 β shRNA for post-traumatic osteoarthritis therapy. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 23, p. 336–346, 2021.

ZHANG, N. et al. A Perspective on the Roles of Adjuvants in Developing Highly Potent COVID-19 Vaccines. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 387, 14 fev. 2022b.

ZHANG, N.; NANDAKUMAR, K. S. Recent advances in the development of vaccines for chronic inflammatory autoimmune diseases. **Vaccine**, v. 36, n. 23, p. 3208–3220, maio 2018.

ZHAO, K. et al. Dendrigraft poly-L-lysines delivery of DNA vaccine effectively enhances the immunogenic responses against H9N2 avian influenza virus infection in chickens. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 27, p. 102209, 2020.

ZHAO, Z. et al. A novel liposome-polymer hybrid nanoparticles delivering a multi-epitope self-replication DNA vaccine and its preliminary immune evaluation in experimental animals. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 35, p. 102338, 2021.

ZHU, F.-C. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. **The Lancet**, v. 395, n. 10240, p. 1845–1854, 2020a.

ZHU, X.; ZHU, J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8011, 28 out. 2020.

ZHU, Y.-C. et al. Adjuvant cytokine IL-33 improves the protective immunity of cocktail DNA vaccine of ROP5 and ROP18 against *toxoplasma gondii* infection in mice. **Parasite**, v. 27, p. 26, 2020b.