

## VACINAS DE mRNA: UMA NOVA ERA NA PRODUÇÃO DE IMUNIZANTES

### mRNA VACCINES: A NEW ERA IN THE PRODUCTION OF IMMUNIZATIONS

Thalia Mesquitta Quintanilha<sup>1</sup>  
Roberta Oriques Becker<sup>2</sup>

**Resumo:** O ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) carrega a informação codificada para a construção de proteínas, o que ocorrerá a partir da tradução dessa sequência nos ribossomos presentes no citosol das células. Considerando a importância do mRNA no funcionamento das células, muitos estudos atuais visam utilizar o mRNA na produção de imunizantes para prevenção de doenças infecciosas e tratamento de doenças autoimunes e neoplasias, o que se relaciona com a capacidade das células em reconhecer e traduzir o mRNA inoculado em diferentes proteínas antigênicas, as quais tem capacidade de estimular a resposta imunológica humoral e celular. Com isso, para reunir achados científicos atualizados que descrevem os diferentes tipos de vacinas de mRNA, foi realizada uma revisão da literatura nas bases de dados “Biblioteca Virtual em Saúde” e “Pubmed”, nas quais foram selecionados 24 artigos para compor esta revisão. Os estudos selecionados demonstraram um novo panorama de vacinação, com produção rápida e flexível, capaz de induzir a imunidade de forma segura. Nos últimos anos estão sendo desenvolvidas vacinas de mRNA para diversas doenças infectocontagiosas, como a COVID-19, a toxoplasmose e outras, esse novo método imunógeno tem demonstrado ser eficaz e tolerável em ensaios clínicos e até mesmo no uso emergencial de algumas dessas vacinas, pois conseguem atuar sobre mais de um antígeno presente nesses hospedeiros. Por outro lado, as vacinas de mRNA também estão sendo projetadas para a terapia de doenças autoimunes e neoplásicas, visto que não são mutagênicas, mas podem fornecer respostas contra essas doenças de forma personalizada e com longa duração. Sendo assim, as vacinas de mRNA surgem como uma maneira terapêutica para neoplasias e autoimunidade e para proteção da população contra possíveis doenças pandêmicas.

**Palavras-chave:** vacinas de mRNA; vacinas de ácidos nucleicos; imunoterapia.

**Abstract:** Messenger ribonucleic acid (mRNA) carries the coded information for the construction of proteins, which will occur from the translation of this sequence in the ribosomes present in the cytosol of the cells. Considering the importance of mRNA in the functioning of cells, many current studies aim to use mRNA in the production of immunizations for the prevention of infectious diseases and the treatment of autoimmune diseases and neoplasms, which is related to the ability of cells to recognize and translate the inoculated mRNA. in different antigenic proteins, which can stimulate the humoral and cellular immune response. Therefore, to gather up-to-date scientific findings that describe the different types of mRNA vaccines, a literature review was

<sup>1</sup> Acadêmica Biomedicina- UNICNEC.

<sup>2</sup> Professora Biomedicina - UNICNEC.

*carried out in the “Biblioteca Virtual em Saúde” and “Pubmed” databases, in which 24 articles were selected to compose this review. The selected studies demonstrated a new vaccination scenario, with fast and flexible production, capable of inducing immunity safely. In recent years, mRNA vaccines have been studied and developed for several infectious diseases, such as COVID-19, toxoplasmosis and others, this new immunogenic method has been shown to be effective and tolerable in clinical trials and even in the emergency use of some of these vaccines, as they can act on more than one antigen present in these hosts. Bedside, mRNA vaccines are also being designed for the therapy of autoimmune and neoplastic diseases, as they are not mutagenic, but can provide responses against these diseases in a personalized and long-lasting manner. Therefore, the possible mRNA vaccines are as a therapeutic way for neoplasms and autoimmunity and to protect the population against pandemic diseases.*

**Keywords:** *mRNA vaccines; nucleic acid vaccines; immunotherapy.*

## **Introdução**

O ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), sequência de bases nitrogenadas transcritas a partir do ácido desoxirribonucleico (DNA), carrega a informação codificada para a construção de proteínas, o que ocorrerá a partir da tradução dessa sequência nos ribossomos <sup>(1)</sup>. Essa molécula foi descoberta, por volta de 1960, pelos pesquisadores François Jacobs e Jacques Monod, os quais receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina pelo feito científico. Desde a sua descoberta, ocorreram muitos avanços que incluem o conhecimento da função e dos mecanismos de transporte do mRNA do núcleo até o citoplasma <sup>(2)</sup>.

Considerando a importância do mRNA no funcionamento das células, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de utilizar o mRNA na produção de imunizantes para prevenção de doenças infecciosas e tratamento de doenças autoimunes e neoplasias, o que se relaciona com a capacidade das células em reconhecer e traduzir o mRNA inoculado em diferentes proteínas antigênicas, as quais tem capacidade de estimular a resposta imunológica humoral e celular <sup>(1,2)</sup>. Assim, os imunizantes que utilizam o mRNA tem apresentado diversas vantagens sobre as vacinas com microorganismos atenuados ou inativados, assim como as vacinas de subunidades e de DNA, pois tem demonstrado alta eficácia e segurança em diferentes populações, podendo ser utilizadas em larga escala para evitar a disseminação de doenças <sup>(3)</sup>.

O primeiro imunizante disponibilizado para a população foi o BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), que no ano de 2021 tornou-se também a primeira vacina contra o vírus SARS-Cov-2 para combate da COVID-19, em seguida outros imunizantes para doença a base de mRNA foram autorizados <sup>(4)</sup>. Esse feito só foi possível porque já estavam sendo desenvolvidos estudos utilizando a metodologia do mRNA para a produção de outros imunizantes, como por exemplo a vacina AGS-004 para vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a TriMixDC-MEL para o tratamento do melanoma <sup>(5,6)</sup>. Assim, considerando as evidências científicas que destacam o potencial terapêutico das vacinas de mRNA em doenças infecciosas ou não infecciosas, como as neoplasias, esta revisão teve como objetivo reunir achados científicos atualizados que descrevem os diferentes tipos de vacinas de mRNA, assim como as perspectivas sobre essa nova era no desenvolvimento de imunizantes.

### **Metodologia**

O presente trabalho é uma revisão da literatura, ou seja, um estudo retrospectivo e secundário, que é caracterizado pela busca, pela apreciação crítica de múltiplos artigos científicos e pela síntese da informação sobre determinado tema. Os artigos utilizados nessa revisão foram localizados a partir das bases de dados “Biblioteca Virtual em Saúde” e “Pubmed”. Na busca pelos artigos indexados nessas bases de dados, foram utilizados os seguintes descritores em ciências da saúde (DeCS) em inglês: *mRNA vaccine AND Neoplasms AND Infectious Diseases OR Virus Diseases OR Parasitic Diseases OR Bacterial Infections*.

A utilização dos critérios para a seleção dos artigos pertinentes a inclusão foram os seguintes: artigos publicados nos últimos cinco anos; estudos pré-clínicos e clínicos; a disponibilidade do texto completo online. Critério de exclusão foi a retirada dos artigos de revisão e daqueles artigos que foram considerados fora da temática pelos pesquisadores. Dessa forma, foram selecionados 24 estudos para compor esta revisão da literatura. Como se trata de uma revisão de dados da literatura, não foi necessária aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Cenequista de Osório (CEP-CNEC/Osório).

## Resultados e Discussão

### A Produção de Vacinas de mRNA

A produção de vacinas de mRNA baseia-se na obtenção de mRNA transcrito do DNA do patógeno que se deseja promover a proteção, pois, após entrar na célula humana, esse mRNA é utilizado na produção de proteínas específicas com propriedades antigênicas. Nesse contexto, dois tipos principais de RNA são utilizados na produção de imunizantes: o mRNA não replicante, que codifica o antígeno de interesse e contém regiões não traduzidas (UTRs) nos terminais 5' e 3', assim como cauda poli-A; o RNA auto-replicante, do inglês self-amplifying RNA (saRNA), que codifica não apenas o antígeno de interesse, mas também a maquinaria de replicação viral, a qual a amplificação do RNA intracelular e a expressão abundante de proteínas<sup>(7,2)</sup>. Quanto a este último tipo de mRNA, foi desenvolvida uma nova tecnologia conhecida como replicon de RNA, do inglês self-amplifying replicon RNA (RepRNA,) que permite que o RNA seja capaz de se autorreplicar dentro das células, comumente o RepRNA é baseado no genoma de um vírus<sup>(8)</sup>.

O mRNA transcrito *in vitro* é produzido a partir de um molde de DNA linear usando uma RNA polimerase, sendo que o produto resultante pode conter algumas estruturas que aumentam a estabilidade e a capacidade de tradução do mRNA, como: Cap 5'; cauda poli-A; regiões não traduzidas (UTRs) nos terminais 5' e 3' que flanqueiam a sequência de leitura aberta, do inglês open reading frame (ORF), *do mRNA*; códon de parada; sequência de Kozak. Além disso, é essencial manter o conteúdo guanina-citosina (GC) da sequência para obter uma maior estabilidade e uma maior produção de proteínas<sup>(9)</sup>.

Conforme o alvo do imunizante, o transporte do mRNA através da membrana das células até o citoplasma pode ocorrer de diferentes formas, o que depende da disponibilidade e da estabilidade do imunizante, visto que as ribonucleases (RNases) presentes no organismo podem facilmente degradar o mRNA. Assim, conforme esse transporte, o imunizante poderá ser classificado como: vacinas de mRNA não encapsulado (*naked mRNA*), que não utiliza moléculas transportadoras; vacinas de

mRNA com eletroporação *in vivo*, que é um método de entrega físico baseado em pulsos elétricos de alta tensão para facilitar a penetração na membrana plasmática; vacina de mRNA baseada em peptídeos, principalmente o peptídeo catiônico protamina, o qual consegue proteger o mRNA das RNases, porém seu uso ainda é questionável; vacina de mRNA baseada em nanoemulsão catiônica, na qual um cátion estabiliza a molécula de mRNA que é dispersa entre uma fase oleosa e outra aquosa; vacina de mRNA baseada em nanopartículas de dendrímeros modificados, que são estudados como metodologias de transporte a anos, contudo evidenciou-se que devido a conformação ramificada torna-se difícil sua degradação, sendo assim, modificações são geradas para que não haja toxicidade; vacina de mRNA baseada em lipídeos, as chamadas nanopartículas lipídicas (LNP), que são muito utilizadas pois podem estar associadas de maneira ionizável, catiônica ou com material polimérico; vacina de mRNA baseada em materiais poliméricos, as quais são capazes de liberar mRNA após rearranjo seguido de degradação, todavia não é um método muito utilizado, mas espera-se que estudos complementares melhorem sua biodegradação e facilitem a tradução do mRNA. Com isso, os mecanismos de transporte do mRNA podem ser utilizados para facilitar a entrega do imunizante e garantir um estímulo imunogênico mais eficaz<sup>(10, 11, 12)</sup>.

As técnicas de biologia molecular permitem gerar sequência de mRNA sintéticos, os quais são capazes de induzir respostas imunes específicas para antígenos previamente selecionados<sup>(12)</sup>. O imunógeno após ser administrado no paciente e carregado até as células, conforme descrito anteriormente, é capturado por células apresentadoras de antígenos (APCs), e dentro dessas “gera” as proteínas que devem ser reconhecidas pelo corpo como antígenos, os quais são expressos na superfície das APCs, o que estimula as outras células do sistema imunológico. Com isso, os linfócitos T são ativados ocorrendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a destruição direta do antígeno e o recrutamento de linfócitos B, que por sua vez, produzem anticorpos específicos contra o antígeno e são capazes de desenvolver a “memória” imunológica protetora. Dessa forma, o corpo é capaz de combater esses antígenos, caso o indivíduo entre em contato com eles, ou estimular respostas imunológicas contra doenças já instaladas<sup>(13)</sup>.

Dentre as vantagens do uso de mRNA na produção de vacinas pode-se destacar o seguinte: a alta potência, pois o mRNA tem mecanismos ágeis de execução, ao contrário das vacinas convencionais; a flexibilidade, já que o mRNA pode ser modificado facilmente, conforme o antígeno desejado e suas variantes; a eficácia, porque até o momento os dados comprovam que seu uso estimula de forma significativa o sistema imunológico; a segurança, pois o perfil de segurança da utilização de vacinas de mRNA tem se apresentado benéfico, com poucos efeitos colaterais e sem riscos graves; a produção, devido sua alta potência e flexibilidade esse tipo de imunógeno consegue ter um processo padronizado de produção em alta escala. Essas características se sobrepõem a outros modelos de imunizantes, que podem causar reversão da virulência, como nas vacinas vivas atenuadas, que são menos imunogênicas e exigem diversas etapas de purificação, como nas vacinas de subunidade proteicas, e que trazem dúvidas quanto a integração no material genético dos pacientes, como nas vacinas de DNA <sup>(3)</sup>.

### **Tipos de Vacinas de mRNA**

Como citado anteriormente, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas visando a utilização de mRNA como estrutura de imunizantes para proteção e terapia de doenças. Os estudos realizados com animais de pequeno porte, primatas não humanos e humanos trouxeram respostas eficazes contra vários antígenos, com isso, alguns desses imunizantes já estão sendo submetidos a testes clínicos e até utilizados pelas populações <sup>(12)</sup>. A seguir, estão reunidos importantes achados pré-clínicos e clínicos sobre vacinas de mRNA desenvolvidas para prevenção de doenças infectocontagiosas e tratamento de doenças autoimunes e neoplasias.

### **Prevenção de Doenças Infectocontagiosas**

Os imunizantes baseados na utilização de mRNA para prevenir doenças virais estão sendo discutidos e estudados a anos, principalmente após a pandemia de influenza A do subtipo H1N1 (H1N1), em 2009, mas foi no ano de 2020 que as vacinas ganharam destaque da população geral, devido a pandemia mundial da doença conhecida como COVID-19. Essa doença é causada pelo do vírus infeccioso da síndrome respiratória

aguda grave (SARS-CoV-2), um coronavírus que apresenta alta taxa de transmissão, de morbidade e de mortalidade. Neste contexto, foi desenvolvido um imunizante que utiliza o mRNA para combater a COVID-19, o BNT162b2 da empresa Pfizer-BioNTech, sendo está a primeira vacina de mRNA aprovada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o uso em humanos de forma emergencial. Logo após, também foi aprovada para uso emergencial, nos Estados Unidos (EUA), a vacina mRNA-1273 (Moderna) e a vacina alemã de mRNA CVnCoV (CureVac)<sup>(4)</sup>. Essas vacinas têm como objetivo comum produzir memória protetora contra uma glicoproteína específica do SARS-CoV-2, conhecida como proteína Spike (S), a qual é responsável pela entrada do vírus nas células humanas<sup>(4, 14)</sup>. Com isso as vacinas de mRNA produzem uma forma inativada da proteína Spike para estimular a resposta celular e humoral contra ela, o que irá promover uma imunidade protetora ao indivíduo frente a infecção pelo SARS-CoV-2<sup>(15)</sup>. Considerando que a produção dessas vacinas foi realizada em pouco tempo e seu uso foi admitido de forma emergencial, muitas dúvidas surgiram quanto a sua segurança e eficácia, por isso foram realizados diversos estudos clínicos para comprovação de eficácia e para compreensão dos mecanismos imunológicos associados<sup>(16)</sup>.

Mudd e colaboradores<sup>(14)</sup> procuraram avaliar as respostas imunológicas adquiridas pela BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), que é baseada em mRNA modificado, através de um estudo observacional em 15 indivíduos adultos. Os pesquisadores comprovaram que a vacina induz a uma resposta alta e eficaz de células T auxiliares foliculares (TFH), um subtipo de células TCD4<sup>+</sup>, e de células B de centros germinativos (CG). Entretanto, algumas limitações foram observadas, como a necessidade de realizar reforços vacinais ao longo do ano para garantir uma adequada resposta imunológica<sup>(14)</sup>. Em outro estudo clínico, realizado por Baden et al.<sup>(17)</sup>, foi observada que a vacina mRNA-1273 (Moderna) induz uma imunidade protetora contra a infecção pelo SARS-CoV-2, até mesmo nos casos graves da doença. Ainda, um estudo feito por Woldemeskel et al.<sup>(18)</sup> demonstrou que as vacinas BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) e mRNA-1273 (Moderna) apresentam capacidade de proteger os indivíduos contra outros tipos de coronavírus, o que está relacionado com a indução prolongada da resposta imune celular.

Masuda e colaboradores<sup>(16)</sup> estudaram os efeitos adversos e a imunogenicidade da vacina mRNA-1273 (Moderna) na população adulta do Japão. Segundo os

pesquisadores, |os efeitos adversos de grau 3 e 4, principalmente sistêmicos como fadiga, mialgia, calafrios, dor de cabeça e febre, apresentam um aumento na ocorrência conforme o número de doses da vacina aplicadas, também foi observada a presença de anticorpos anti-S-PC <sup>(16)</sup>. Enquanto isso, Rosenblum e colaboradores (2022) avaliaram os efeitos adversos observados nos primeiros seis meses após vacinação com BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) e mRNA-1273 (Moderna) e observaram uma prevalência na ocorrência de efeitos transitórios, como febre e cansaço, os quais ocorreram principalmente após a administração da segunda dose. Quanto aos efeitos adversos mais graves, que ocorrem raramente, os mais prevalentes são os quadros de trombose e de miocardite <sup>(19)</sup>.

A vacina CVnCoV (CureVac), que é baseada em mRNA transportado por nanopartículas lipídicas, foi avaliada por Kresmsner e colaboradores <sup>(4)</sup> em um estudo clínico randomizado de fase IIb/III, o qual demonstrou que a vacina é segura e eficaz, principalmente, para os casos de COVID-19 leve. Adicionalmente, o grupo de pesquisadores tem desenvolvido uma vacina de segunda geração, a CV2CoV (CureVac), que tem como objetivo aumentar a eficácia do imunógeno nos casos mais graves de COVID-19 e nos casos de variantes deste coronavírus. Neste contexto, Gebre et al. <sup>(20)</sup> vacinaram 18 macacos cynomolgus com a CVnCoV (Curevac) ou a CV2CoV (Curevac), os quais foram expostos a cepas de SARS-CoV-2 com a finalidade de comparar as respostas imunológicas. Os pesquisadores observaram que a vacina CV2CoV (Curevac) induziu uma resposta imune mais eficaz, com aumento das concentrações plasmáticas de interferon- $\alpha$  2a (IFN $\alpha$ 2a), ligante 10 de quimiocina (IP-10 ou CXCL10) e proteína inflamatória de macrófagos-1, da produção de células B e T específicas e de anticorpos, quando comparada com a vacina BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) <sup>(20)</sup>.

Apesar das vacinas contra o SARS-CoV-2 serem os primeiros imunizantes de mRNA utilizados em seres humanos, outros já estão em desenvolvimento para o combate de doenças viriais. Por exemplo, Aldrich e colegas (2021) realizaram os estudos clínicos de fase I de uma vacina de mRNA encapsulado em nanopartículas lipídicas para gerar resposta imunológica contra uma glicoproteína do vírus da raiva (RABV-G). Essa vacina, denominada CV7202, foi administrada pela via intramuscular com objetivo de

avaliar sua segurança e reatividade. Como resultado, foi observado que doses mais baixas do imunógeno apresentaram uma melhor tolerância com a ocorrência de efeitos adversos leves. Além disso, foram identificados títulos médios geométricos (GMT) maiores de imunoglobulinas G (IgG) neutralizantes específicas para raiva, IgG específicas para RABV-G e imunoglobulinas M (IgM).

A farmacêutica Moderna está realizando ensaios clínicos de fase I de vacinas de mRNA contra o HIV, as quais são denominadas eOD-GT8 60mer (mRNA-1644) e Core-g28v2 60mer (mRNA-1644v2-Core), para avaliar os efeitos adversos e a imunogenicidade das vacinas em adultos saudáveis <sup>(21)</sup>. Enquanto isso, Gay e colaboradores <sup>(5)</sup> realizaram testes clínicos da vacina AGS-004, que é baseada em mRNA de células dendríticas co-eletroporizadas, em pacientes com infecção aguda pelo HIV. Os pacientes testados (n=6) obtiveram um aumento da contagem de células T CD8+ específicas, assim como da concentração plasmática de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e a uma redução na carga viral, que não foi duradoura, mas indica que AGS-004 pode ser uma estratégia útil contra o HIV após aprimoramento <sup>(5)</sup>.

Chahal e colaboradores <sup>(3)</sup> desenvolveram vacinas com nanopartículas de dendrímeros modificadas, do inglês *modified dendrimer nanoparticle (MDNP)*, com RepRNA encapsulado e baseado no vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), contra o vírus do Ebola (EBOV), o vírus influenza (H1N1) e o *Toxoplasma gondii*. A vacina para o EBOV promoveu uma resposta de células T específicas para o antígeno escolhido em camundongos e proteção total contra a doença. Quanto a vacina desenvolvida contra o vírus influenza (H1N1), um mRNA que codifica a glicoproteína hemaglutinina (HA) foi utilizado como base para a sua produção e os camundongos, que receberam uma dose letal do vírus, sobreviveram e produziram IgG reativa a HÁ <sup>(3)</sup>. Em outro estudo, Chahal e colaboradores <sup>(22)</sup>, utilizando mesma tecnologia, estudaram os efeitos da vacina de mRNA para combater o vírus da Zika (ZIKV), sendo que mRNA utilizado codificava proteínas da pré-membrana e do envelope viral. Como resultado, foi observada uma resposta de células T CD8+ induzida por apenas um epítipo apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade do tipo I (MHC I), o que surpreendeu os autores, os quais esperavam respostas a múltiplos epítipos <sup>(22)</sup>.

Considerando que a resistência bacteriana a antibióticos representa uma das principais preocupações da comunidade médica e científica, o desenvolvimento de novos imunizantes, como os baseados no mRNA representam uma esperança nesse horizonte desafiador.<sup>12</sup> Nesse contexto, Maruggi e colaboradores<sup>12</sup> desenvolveram vacinas de RNA auto-replicante contra antígenos de estreptococos do grupo A (GAS, *Streptococcus pyogenes*) e do grupo B (GBS, *Streptococcus agalactiae*), que utilizou as nanopartículas lipídicas ou nanoemulsões catiônicas como meio de transporte. Os camundongos foram vacinados com três doses desse imunizante, sendo que algumas fêmeas estavam prenhas e, assim, as repostas imunes da prole também foram avaliadas após infecção. Como resultado, ocorreu produção de anticorpos e resposta Th1 contra a infecção bacteriana, enquanto a prole recebeu imunidade materna contra os antígenos<sup>(12)</sup>. Outro avanço nesta área foram os estudos *in silico* contra a *Mycobacterium tuberculosis*, que utilizou a simulação da dinâmica molecular para pesquisar um imunizante mais adequado contra a tuberculose, visto que a vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), desenvolvida em 1921, tem apresentado uma baixa eficácia vacinal em adultos<sup>(9)</sup>.

Na área da parasitologia, considerando que as vacinas convencionais são incapazes de intervir no ciclo dos parasitas, os recentes avanços com os imunizantes de mRNA representam um grande avanço no controle das doenças parasitárias<sup>(23,3)</sup>. Assim, como citado anteriormente, Chahal e colaboradores<sup>(3)</sup> desenvolveram uma vacina de nanopartícula de dendrímeros modificadas com RepRNA para combater o *Toxoplasma gondii*, um dos parasitas mais recorrentes em países emergentes e extremamente preocupante no período gestacional, a qual se mostrou eficaz nos testes pré-clínicos, visto que promoveu o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias após exposição ao patógeno. Em um outro estudo, foi desenvolvida uma vacina utilizando a proteína recombinante *nucleoside triphosphate hydrolase-II* (NTPase-II), que está presente na maioria das cepas, sendo capaz de desencadear uma proteção imunológica, mediada por células Th1, contra esse parasita. Nesse caso, foram utilizadas duas formas de transporte do saRNA, a não encapsulada e a LNP, sendo que ambas as vacinas tiveram respostas eficazes, contudo a baseada em LNP teve uma resposta mais potente,

pois a concentração plasmática de INF- $\gamma$  e a quantidade de células T de memória foi significativamente maior do que a não encapsulada <sup>(13)</sup>.

Duthie e colaboradores <sup>(24)</sup> desenvolveram dois imunógeno de RepRNA, que codifica as proteínas LEISH-F2 (RNA-F2) e LEISH-F3 (RNA-F3), contra a *Leishmania donovani*, parasita que causa a leishmaniose visceral. A vacina RNA-F2 aumentou o tamanho dos linfonodos de drenagem e a quantidade de células T antígeno-específicas, assim como de células B expressando imunoglobulinas específicas. Os camundongos imunizados novamente, mas dessa vez utilizando a vacina RNA-F3 como reforço, apresentaram uma resposta de memória de células TCD4<sup>+</sup> e CD8. Contudo, as vacinas que utilizaram a metodologia de transporte com glucopiranosil lipídeo A de segunda geração em emulsão óleo-em-água estável, do inglês *second generation glucopyranosyl lipid A in stable oil-in-water emulsion* (SLA-SE), associadas as proteínas LEISH-F2 e LEISH-F3, mostraram-se mais eficazes do que a associação ao RNA não encapsulado, evidenciando que os métodos de entrega do RNA podem ser cruciais na produção dessas vacinas <sup>(24)</sup>.

Por fim, o estudo de Baeza Garcia et al. <sup>(25)</sup>, teve como objetivo o desenvolvimento de uma vacina contra o *Plasmodium sp.* para combater a malária. A vacina utilizou como base o mRNA do gene do fator de migração de macrófagos (MIF), o qual é encontrado em várias cepas do *Plasmodium sp.* e apresenta uma função semelhante ao gene, de mesmo nome, encontrado em mamíferos. Esse gene, denominado *Plasmodium sp.* MIF (PMIF) induz inflamação através do receptor MIF e impede que as células se tornem específicas para combater o patógeno, apresentando assim, maior potencial infectante. Assim, foram desenvolvidos replicons de RNA auto-replicante, os quais foram inoculados em camundongos que, após esse processo, foram infectados com cepas de *Plasmodium berghei ANKA (PbA)*. Como resultado da imunização, ocorreu o desenvolvimento de IgG anti-PMIF, o qual bloqueia ação inflamatória do parasita, sem bloquear os receptores MIF, e promove o controle parasitário. Assim, as vacinas antiparasitárias representam uma esperança para reduzir o impacto das parasitoses na população e na economia dos países emergentes <sup>(25)</sup>.

## **Tratamento de Doenças Autoimunes e de Neoplasias**

As doenças autoimunes, que são caracterizadas pelo ataque do sistema imunológico a células saudáveis do organismo, apresentam quadros clínicos de grande complexidade e de difícil tratamento, pois os imunossupressores, que são comumente utilizados no tratamento, deixam o paciente susceptível a outras doenças. Nesse contexto, Krienke e colegas <sup>(26)</sup> desenvolveram uma vacina de mRNA para o tratamento de esclerose múltipla (EM), que é uma doença autoimune que causa desmielinização progressiva dos neurônios. Os testes pré-clínicos dessa vacina foram realizados em um modelo animal de encefalomielite autoimune, no qual os animais são sensibilizados contra autoantígenos de uma glicoproteína presente na mielina produzida pelos oligodendrócitos. Os pesquisadores tinham como objetivo controlar a resposta imunológica das células T reguladoras (Treg), para isso utilizaram um mRNA purificado e modificado, substituindo uracina (U) por 1-metilpseudouridina (m1ψ) formulada com nanopartículas. Assim, nos primeiros experimentos, a expressão gênica foi estudada através da detecção da enzima luciferase de vagalume (LUC), a qual apresentou uma maior detecção nos animais tratados com mRNA m1ψ. O estudo comprovou que o imunizante garantiu bom desempenho de APCs, não estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias, regulou marcadores de exaustão de células T, não prejudicou a resposta imunológica contra novos antígenos (tolerância cruzada), não agravou repostas de autoanticorpos pré-formados, não promoveu a produção de anticorpos IgG anticorpos antiglicoproteína da mielina de oligodendrócitos, do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55* (anti-MOG35-55), assim como ocorreu a supressão de células TH1, TH7 e THA17 específicas para MOG35-55, ao invés de suprimir as células T autorreativas, o que contribuiu para a tolerância específica ao antígeno. Por fim, a vacina de mRNA m1ψ foi capaz de bloquear os sinais clínicos da EM, indicando ser um bom controlador da progressão da doença no modelo animal, assim devem ser realizados estudos clínicos para verificar se esses resultados irão se repetir em seres <sup>(26)</sup>.

O sistema imunológico é capaz de reconhecer, bloquear e destruir células tumorais, contudo esse mecanismo pode acabar sobrecarregado devido a facilidade dessas células se multiplicarem. Dessa forma, entende-se que ao potencializar os mecanismos naturais

da imunidade com as terapias vacinais, pode-se chegar a um tratamento com alto potencial curativo <sup>(6, 27)</sup>. Assim, as vacinas de mRNA tem sido desenvolvidas com o objetivo atingir neoantígenos (neoAgs), que estão presentes exclusivamente nas células tumorais e são gerados como consequência de mutações em sequência codificantes de genes expressos, representando assim um alvo promissor para a vacinação contra as neoplasias <sup>(28)</sup>.

As vacinas baseadas em mRNA são desenvolvidas para auxiliar no tratamento de neoplasias, ou seja, são terapêuticas e não profiláticas, assim, a maioria dos estudos clínicos, avalia a sobrevida dos pacientes e a recidiva da doença após a vacinação <sup>(29)</sup>. Os principais estudos clínicos, que utilizam essa abordagem imunoterapêutica, estão relacionados com o tratamento de melanomas, tumores de pulmão, glioblastomas (GBM) e tumores leucêmicos, como o que ocorre na leucemia mieloide aguda (LMA). Além disso, os estudos apontam que as vacinas são capazes de estimular respostas contra múltiplos antígenos tumorais <sup>(27)</sup>. De forma, os pesquisadores têm utilizado biopsias dos tumores ou o conhecimento científico já evidenciado para selecionar neoantígenos, sendo que, de forma geral, são utilizadas sequências de moléculas tumorais específicas, para cada tipo de neoplasia, como base para construção do mRNA desejado, o qual irá desencadear a produção de peptídeos que serão capturados pela APCs e irão estimular resposta de linfócitos T para combater os neoantígenos <sup>(28, 30)</sup>. Além disso, como demonstrado no estudo de Boudewijns e colaboradores <sup>(30)</sup>, podem ser utilizados outros componentes nas vacinas, como por exemplo a cisplatina, um medicamento antineoplásico, o que está associado com aumento da eficácia da resposta imunológica. Por fim, os ensaios clínicos encontrados são de fase I e II, os quais tem demonstrado uma boa segurança da imunoterapia antitumoral, que está associada com a ocorrência de efeitos adversos de grau 1 e 2, como dor no local da aplicação, febre e enjoos <sup>(28, 31)</sup>.

Keersmaecker et al. <sup>(6)</sup> desenvolveram uma vacina contra o melanoma avançado (estágio III e IV) utilizando células dendríticas eletroporadas com mRNA e associadas Ipilimumab, um anticorpo monoclonal humano utilizado no tratamento de melanoma. Os resultados do estudo demonstraram uma melhora clínica dos pacientes, com o desenvolvimento de resposta imunológica específica de células T CD8<sup>+</sup> contra

melanoma em estágio III ou IV <sup>(6)</sup>. Outros estudos semelhantes também evidenciaram a indução de resposta das células T, principalmente CD8+, contudo novos ensaios clínicos devem ser realizados para verificar a eficácia clínica dessas vacinas na terapia contra neoplasias <sup>(6, 27, 31)</sup>.

### **Conclusões**

A imunização baseada no mRNA representa um avanço nos métodos de vacinação, devido a possibilidade de tratar e prevenir doenças através de um processo realizado de forma mais segura e eficaz do que os métodos tradicionais de vacinação. Nesse contexto, as vacinas de mRNA desenvolvidas para doenças infectocontagiosas tem apresentado um perfil de tolerabilidade aceitável e evidências de respostas imunes, enquanto as vacinas de mRNA contra vírus e bactérias surgem como uma forma de produção mais rápida e mais segura do que outros métodos vacinais já utilizados, ademais as vacinas de mRNA contra parasitas são totalmente inovadoras, visto que poderão intervir em mais de uma fase do ciclo dos parasitas. Enquanto isso, a imunoterapia para doenças autoimunes e neoplasias tem representado uma forma de controle personalizada sobre as doenças, com a eliminação de células neoplásicas e/ou autorreativas, com o aumento na sobrevivência dos pacientes e com a diminuição das chances de recidiva. Assim, avanços nas pesquisas, com a descoberta de novos antígenos, de sequências genéticas mais adequadas para cada doença, de meios de entrega mais eficazes e de testes com maior sensibilidade e especificidade são aguardados para os próximos anos. Assim, o potencial preventivo e terapêutico das vacinas de mRNA deve continuar a ser explorado, principalmente, devido a segurança e a eficácia que esses imunizantes da “nova era” têm demonstrado nos ensaios clínicos.

### **Referências bibliográficas**

1. Sebastian M, Schröder A, Scheel B, Hong H S, Muth A, von Boehmer L, *et. al.* A phase I/IIa study of the mRNA-based cancer immunotherapy CV9201 in patients with stage IIB/IV non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2019; 68(5): 799-812 <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02315-x>

2. Kowalski P S, Rudra A, Miao L, Anderson D G. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. In *Molecular Therapy*, 2019; 10;27(4):710-728. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>.
3. Chahal J S, Khan O F, Cooper C L, McPartlan J S, Tsosie J K, Tilley L D, Sidik S M, et. al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016; 113(29): E4133-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600299113>
4. Kremsner P G, Ahuad Guerrero R A, Arana-Arri E, Aroca Martinez G J, Bonten M, Chandler R, et. al. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022; 22(3):329-340. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00677-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00677-0)
5. Gay C L, Debenedette M A, Tcherepanova I Y, Gamble A, Lewis W E, Cope A B, et. al. Immunogenicity of AGS-004 Dendritic Cell Therapy in Patients Treated during Acute HIV Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2018; 34(1): 11-122. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0071>
6. de Keersmaecker B, Claerhout S, Carrasco J, Bar I, Corthals J, Wilgenhof S, et. al. TriMix and tumor antigen mRNA electroporated dendritic cell vaccination plus ipilimumab: Link between T-cell activation and clinical responses in advanced melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2020; 8(1): e000329. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000329>
7. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, et. al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 2006; 108(13): 4009-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015024>
8. Démoulin T, Ruggli N, Gerber M, Thomann-Harwood L J, Ebensen T, Schulze K, et. al. Self-Amplifying Pestivirus Replicon RNA Encoding Influenza Virus Nucleoprotein and Hemagglutinin Promote Humoral and Cellular Immune Responses in Pigs. *Frontiers in Immunology*, 2021; 11: 622385. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622385>
9. Al Tbeishat, H. Novel In Silico mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Scientific Reports*, 2022; 12(1): 4645. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08506-4>

10. Midoux P, Pichon C. Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. In *Expert Review of Vaccines*, 2015; 14(2): 221-34. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.986104>
11. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
12. Maruggi G, Chiarot E, Giovani C, Buccato S, Bonacci S, Frigimelica E, et. al. Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens. *Vaccine*, 2017; 35(2): 361-368. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.040.
13. Luo F, Zheng L, Hu Y, Liu S, Wang Y, Xiong Z, et. al. Induction of Protective Immunity against *Toxoplasma gondii* in Mice by Nucleoside Triphosphate Hydrolase-II (NTPase-II) Self-amplifying RNA Vaccine Encapsulated in Lipid Nanoparticle (LNP). *Front Microbiol*, 2017; 8: 605. doi: 10.3389/fmicb.2017.00605.
14. Mudd P A, Minervina A A, Pogorelyy M v, Turner J S, Kim W, Kalaidina E, et. al. SARS-CoV-2 mRNA vaccination elicits a robust and persistent T follicular helper cell response in humans. *Cell*, 2022; 185(4): 603-613.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.026>
15. Corbett K S, Edwards D K, Leist S R, Abiona O M, Boyoglu-Barnum S, Gillespie R A, et. al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 2020; 586(7830): 567-571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
16. Masuda T, Murakami K, Sugiura K, Sakui S, Philip Schuring R, Mori M. A phase 1/2 randomised placebo-controlled study of the COVID-19 vaccine mRNA-1273 in healthy Japanese adults: An interim report. *Vaccine*, 2022; 40(13): 2044-2052. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.02.030.
17. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et. al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*, 2021; 384(5): 403-416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
18. Woldemeskel BA, Dykema AG, Garliss CC, Cherfils S, Smith KN, Blankson JN. CD4+ T cells from COVID-19 mRNA vaccine recipients recognize a conserved epitope present in diverse coronaviruses. *J Clin Invest*, 2022; 132(5): e156083. doi: 10.1172/JCI156083.
19. Rosenblum HG, Gee J, Liu R, Marquez PL, Zhang B, Strid P, et. al. Safety of mRNA vaccines administered during the initial 6 months of the US COVID-19 vaccination programme: an observational study of reports to the Vaccine

- Adverse Event Reporting System and v-safe. *Lancet Infect Dis*, 2022; 22(6): 802-812. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00054-8.
20. Gebre, M. S., Rauch, S., Roth, N., Yu, J., Chandrashekar, A., Mercado, N. B., He, X., Liu, J., McMahan, K., Martinot, A., Martinez, D. R., Giffin, V., Hope, D., Patel S, Sellers D, Sanborn O, Barrett J, Liu X, Cole A C, et. al. Optimization of non-coding regions for a non-modified mRNA COVID-19 vaccine. *Nature*, 2022; 601(7893): 410-414. doi:10.1038/s41586-021-04231-6
  21. Moderna TX, Inc. A Phase 1 Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of eOD-GT8 60mer mRNA Vaccine (mRNA-1644) and Core-g28v2 60mer mRNA Vaccine (mRNA-1644v2-Core). *ClinicalTrials.gov*. Updated March 24, 2022. Acesso em: 25/06/2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05001373>.
  22. Chahal JS, Fang T, Woodham AW, Khan OF, Ling J, Anderson DG, Ploegh HL. An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model. *Sci Rep*, 2017; 7(1): 252. doi: 10.1038/s41598-017-00193-w.
  23. Versteeg L, Almutairi MM, Hotez PJ, Pollet J. Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections. *Vaccines (Basel)*, 2019; 7(4): 122. doi: 10.3390/vaccines7040122.
  24. Duthie MS, Van Hoveven N, MacMillen Z, Picone A, Mohamath R, Erasmus J, et. al. Heterologous Immunization With Defined RNA and Subunit Vaccines Enhances T Cell Responses That Protect Against *Leishmania donovani*. *Front Immunol*, 2018; 9: 2420. doi: 10.3389/fimmu.2018.02420.
  25. Baeza Garcia A, Siu E, Sun T, Exler V, Brito L, Hekele A, et. al. Neutralization of the Plasmodium-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection. *Nat Commun*, 2018; 9(1): 2714. doi: 10.1038/s41467-018-05041-7.
  26. Krienke C, Kolb L, Diken E, Streuber M, Kirchhoff S, Bukur T, et. al. A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 2021; 371(6525): 145-153. doi: 10.1126/science.aay3638.
  27. Podaza E, Carri I, Aris M, von Euv E, Bravo AI, Blanco P, et. al. Evaluation of T-Cell Responses Against Shared Melanoma Associated Antigens and Predicted Neoantigens in Cutaneous Melanoma Patients Treated With the CSF-470 Allogeneic Cell Vaccine Plus BCG and GM-CSF. *Front Immunol*, 2020; 11: 1147. doi: 10.3389/fimmu.2020.01147.
  28. Cafri G, Gartner JJ, Zaks T, Hopson K, Levin N, Paria BC, et. al. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with

- gastrointestinal cancer. *J Clin Invest.* 2020 Nov 2;130(11):5976-5988. doi: 10.1172/JCI134915.
29. Anguille S, Van de Velde AL, Smits EL, Van Tendeloo VF, Juliusson G, Cools N, et. al. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2017; 130(15): 1713-1721. doi: 10.1182/blood-2017-04-780155.
30. Boudewijns S, Bloemendal M, de Haas N, Westdorp H, Bol KF, Schreibelt G, et. al. Autologous monocyte-derived DC vaccination combined with cisplatin in stage III and IV melanoma patients: a prospective, randomized phase 2 trial. *Cancer Immunol Immunother*, 2020; 69(3): 477-488. doi: 10.1007/s00262-019-02466-x.
31. Rodríguez-Ruiz ME, Perez-Gracia JL, Rodríguez I, Alfaro C, Oñate C, Pérez G, et. al. Combined immunotherapy encompassing intratumoral poly-ICLC, dendritic-cell vaccination and radiotherapy in advanced cancer patients. *Ann Oncol*, 2018; 29(5): 1312-1319. doi: 10.1093/annonc/mdy089.