

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Ana Flávia Bráz

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS VACINAIS BASEADOS EM FORMULAÇÕES DE
mRNA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA CONTRA
LEISHMANIOSE**

Belo Horizonte

2025

Ana Flávia Bráz

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS VACINAIS BASEADOS EM FORMULAÇÕES DE
mRNA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA CONTRA
LEISHMANIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro
Teixeira

Coorientadora: Dra. Gabriela de Assis Burle-
Caldas

Belo Horizonte
2025

043

Bráz, Ana Flávia.

Avaliação de protocolos vacinais baseados em formulações de mRNA para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose [manuscrito] / Ana Flávia Bráz. – 2025.

110 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira. Coorientadora: Dra. Gabriela de Assis Burle Caldas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Leishmaniose. 3. Vacinas de mRNA. 4. Vacinas Sintéticas. I. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. II. Caldas, Gabriela de Assis Burle. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA FLÁVIA BRÁZ. Aos vinte e um dias do mês de agosto de 2025 às 14:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação de protocolos vacinais baseados em formulações de mRNA para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (CPqRR/FIOCRUZ-MG), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Gabriela de Assis Burle Caldas - Coorientadora (Centro de Tecnologia de Vacinas), aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de agosto de 2025.

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (CPqRR/FIOCRUZ-MG)

Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)

Dra. Gabriela de Assis Burle Caldas - Coorientadora (CT-Vacinas)

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho representa não apenas uma conquista significativa na minha trajetória acadêmica, mas também um marco importante na minha vida pessoal. Ao longo desse percurso, contei com o apoio e a dedicação de pessoas fundamentais, a quem agradeço profundamente.

Aos meus pais, Rosa e Orlando, por sempre apoiarem minhas escolhas, me incentivarem e depositarem em mim toda a confiança do mundo. À minha irmã, Natália, por se fazer presente e alegrar meus dias. Obrigada por sempre me esperarem de braços abertos quando eu volto pra casa.

Agradeço aos meus amigos da vida toda de Itaguara e aos feitos em BH — Bia, Bryan, Edu, Jardim, Júlia, Millene, Nathália e Ygor — por tornarem a vida mais leve e feliz. Às meninas do 702A, por compartilharem a rotina e sempre serem suporte.

À minha orientadora, Profa. Dra. Santuza, pela confiança depositada em mim na condução do projeto. Obrigada pela orientação atenciosa, pelos ensinamentos e pelo rigor científico que foram essenciais para a construção desta dissertação e para o meu crescimento acadêmico e pessoal. À minha coorientadora, Gabriela, obrigada por compartilhar cada etapa da pesquisa, com todas as alegrias e angústias que ela nos trouxe. Sua generosidade e seus ensinamentos científicos foram fundamentais não só para o desenvolvimento do trabalho, mas também para que eu me sentisse motivada durante toda a jornada.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Paula Fernandes e ao Tiago Ricotta pela colaboração indispensável. Ao Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli, à Natália Satchiko e a todos do IP/Fiocruz, cuja ajuda nos experimentos foi essencial para o avanço do projeto.

A todos os outros pesquisadores e técnicos que contribuíram diretamente, Bianca, Renata, Alex, Tânia e Cristiane, meu sincero agradecimento. Aos amigos da Biomol e do CT Vacinas como um todo, obrigada pelas discussões científicas, pelas risadas, pelos cafezinhos e pelo vôlei! Vocês fizeram esses anos muito mais felizes.

A caminhada até aqui foi construída com o apoio, a paciência e o carinho de muitas pessoas. A todas elas, meu sincero agradecimento.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada de distribuição global, que ainda acomete cerca de 700 mil a 1 milhão de pessoas por ano. As opções de prevenção e controle são limitadas, e não há vacinas aprovadas para uso em humanos. Nesse contexto, vacinas baseadas em RNA mensageiro (mRNA) surgem como uma abordagem promissora, por induzirem predominantemente resposta Th1, essencial no combate a parasitas intracelulares como *Leishmania*. Estudos anteriores mostraram que a proteína recombinante LinKAP, em associação ao adjuvante Poly ICLC (Hiltonol®), induziu uma resposta imune com produção de IFN- γ e conferiu proteção parcial em camundongos infectados com *L. infantum*. Neste estudo, desenvolvemos uma vacina de mRNA codificando o antígeno LinKAP e comparamos sua imunogenicidade e eficácia protetora com a vacina à base de proteína recombinante frente à infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foram testados protocolos homólogos de três doses de mRNA ou de proteína e protocolos heterólogos de duas ou três doses combinando mRNA e proteína. Os mRNAs codificantes para LinKAP foram transcritos *in vitro*, e a expressão da proteína foi validada por Western blot e imunofluorescência. Em seguida, os mRNAs foram encapsulados em nanopartículas lipídicas (LNPs) e suas características físico-químicas foram avaliadas, confirmando sua adequação para a imunização de camundongos. Em camundongos C57BL/6, o protocolo homólogo com mRNA gerou predominância de IgG2c, enquanto a proteína induziu IgG1. Tanto a proteína quanto o mRNA induziram a produção de IFN- γ , porém nenhuma das formulações conferiu proteção contra a infecção por *L. amazonensis*. Protocolos heterólogos apresentaram níveis semelhantes de IgG total, com aumento de IgG1 e IFN- γ proporcional às doses de proteína, protegendo parcialmente contra *L. amazonensis*. No protocolo homólogo em BALB/c apenas a proteína rLinKAP induziu resposta humoral e celular, com perfil equilibrado de citocinas inflamatórias, sendo também a única formulação capaz de proteger parcialmente contra *L. infantum*. Em conclusão, a vacina de mRNA mostrou-se promissora na indução de resposta humoral, mas a proteína recombinante foi mais eficaz na indução de resposta Th1 e proteção. Os dados destacam o impacto da plataforma vacinal e da apresentação antigênica no perfil imune, reforçando a necessidade de otimização da formulação de mRNA e do modelo animal usado.

Palavras-chave: leishmaniose; vacina de mRNA; antígeno recombinante; LinKAP.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease of global distribution, still affecting around 700,000 to 1 million people per year. Prevention and control options are limited, and no vaccines are approved for human use. In this context, messenger RNA (mRNA)-based vaccines emerge as a promising approach, as they predominantly induce a Th1 response, which is essential for controlling intracellular parasites such as *Leishmania*. Previous studies have shown that the recombinant protein LinKAP, in association with the adjuvant Poly ICLC (Hiltonol®), induced an immune response with IFN- γ production and conferred partial protection in mice infected with *L. infantum*. In the present study, we developed an mRNA vaccine encoding the LinKAP antigen and compared its immunogenicity and protective efficacy with the recombinant protein-based vaccine against infection by *L. amazonensis* and *L. infantum*. Homologous regimens of three doses of mRNA or protein, as well as heterologous regimens of two or three doses combining mRNA and protein, were tested. LinKAP-encoding mRNAs were transcribed in vitro, and protein expression was validated by Western blot and immunofluorescence. Subsequently, the mRNAs were encapsulated in lipid nanoparticles (LNPs), and their physicochemical characteristics were evaluated, confirming their suitability for mouse immunization. In C57BL/6 mice, the homologous mRNA regimen induced a predominance of IgG2c, whereas the protein induced IgG1. Both protein and mRNA induced IFN- γ production, but neither formulation conferred protection against *L. amazonensis* infection. Heterologous regimens elicited similar levels of total IgG, with increased IgG1 and IFN- γ proportional to protein doses, partially protecting against *L. amazonensis*. In the homologous regimen in BALB/c mice, only recombinant LinKAP protein induced both humoral and cellular responses, with a balanced profile of inflammatory and regulatory cytokines, and was also the only formulation able to partially protect against *L. infantum*. In conclusion, the mRNA vaccine proved promising in inducing humoral responses, but the recombinant protein was more effective in inducing Th1 responses and protection. These data highlight the impact of the vaccine platform and antigen presentation on the immune profile, reinforcing the need to optimize the mRNA formulation and the animal model used.

Keywords: leishmaniasis; mRNA vaccine; recombinant antigen; LinKAP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Situação de endemicidade da Leishmaniose Cutânea.	14
Figura 2. Situação de endemicidade da Leishmaniose Visceral.	15
Figura 3. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	17
Figura 4. Manifestações clínicas da Leishmaniose Cutânea Localizada.	18
Figura 5. Manifestações clínicas da Leishmaniose Cutânea Difusa e Leishmaniose Mucocutânea.	19
Figura 6. Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.	20
Figura 7. Mecanismo de indução da resposta imune das vacinas de mRNA.	35
Figura 8. Confirmação da identidade e linearização dos plasmídeos para transcrição in vitro.	56
Figura 9. Síntese dos mRNAs.	57
Figura 10. Análise da expressão de LinKAP por Western blot em células HEK293T transfectadas com mRNA LinKAP ou secLinKAP utilizando um agente de transfecção.	58
Figura 11. Expressão de LinKAP em células HeLa transfectadas com mRNA LinKAP.	59
Figura 12. Caracterização físico-química e morfológica das LNPs formuladas.	61
Figura 13. Análise da expressão de LinKAP por western blot em células HEK293T transfectadas com LNP mRNA LinKAP.	62
Figura 14. Análise de deglicosilação por PNGase F e perfil de massa por MALDI-TOF da proteína LinKAP expressa em eucarioto.	65
Figura 15. Avaliação da resposta imune induzida pelo protocolo homólogo de três doses.	68
Figura 16. Avaliação da eficácia protetiva em camundongos imunizados com esquema homólogo de três doses e desafiados com <i>Leishmania amazonensis</i> .	70
Figura 17. Avaliação da resposta imune induzida pelo protocolo heterólogo de três doses. D72	
Figura 18. Avaliação da eficácia protetiva em camundongos imunizados com esquema heterólogo de três doses e desafiados com <i>Leishmania amazonensis</i> .	73
Figura 19. Avaliação da resposta imune induzida pelo protocolo heterólogo de duas doses.	75
Figura 20. Avaliação da proteção em camundongos imunizados com protocolo de duas doses e desafiados com <i>Leishmania amazonensis</i> .	76
Figura 21. Avaliação da resposta humoral induzida pelo protocolo homólogo de três doses em BALB/c.	78

Figura 22. Produção de citocinas em resposta à estimulação com a proteína rLinKAP em camundongos BALB/c imunizados com protocolo homólogo de três doses. 79

Figura 23. Avaliação da proteção conferida por protocolo homólogo de três doses contra *Leishmania infantum* em camundongos. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e cronograma de imunização homóloga com 3 doses.	46
Tabela 2. Grupos experimentais e cronograma de imunização heteróloga com 3 doses.	46
Tabela 3. Grupos experimentais e cronograma de imunização heteróloga com 2 doses.	47
Tabela 4. Grupos experimentais e cronograma de imunização homóloga com 3 doses em BALB/c.	48
Tabela 5. Propriedades físico-químicas das LNPs mRNA LinKAP e secLinKAP.	60

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 As Leishmanioses.....	13
1.2. Imunidade do hospedeiro vertebrado na infecção por <i>Leishmania</i>	20
1.3 Diagnóstico, tratamento e estratégias de controle das leishmanioses.....	26
1.4 Vacinas para leishmaniose.....	27
1.5 Tecnologia de vacinas mRNA.....	30
1.6 Vacinas de mRNA para doenças infecciosas.....	35
2. OBJETIVO GERAL.....	37
2.1 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Obtenção dos plasmídeos codificantes.....	38
3.2 Transcrição <i>in vitro</i> dos mRNAs.....	39
3.3 Transfecção celular.....	39
3.4 Western blot para avaliação da expressão da proteína LinKAP a partir de células transfectadas.....	40
3.5 Ensaio de imunofluorescência.....	41
3.6 Formulação de mRNAs em Nanopartículas Lipídicas.....	42
3.7 Análise de LNP contendo mRNA LinKAP por Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM).....	42
3.8 Deglicosilação enzimática com PNGase F.....	43
3.9 Imunoprecipitação de LinKAP a partir do extrato de células transfectadas com mRNA LinKAP.....	43
3.10 Análise de massa intacta por MALDI-TOF.....	44
3.11 Animais de experimentação.....	45
3.12 Protocolos de imunização.....	45
3.12.1 Imunização homóloga com três doses.....	45
3.12.2 Imunização heteróloga com três doses.....	46
3.12.3 Protocolo de imunização com duas doses.....	47
3.12.4 Protocolo de imunização homólogo com 3 doses em camundongos BALB/c.....	47
3.13 Ensaio imunoenzimáticos.....	48
3.14 Preparo de esplenócitos e reestimulação <i>in vitro</i>	49
3.15 ELISA de citocinas.....	50

3.16 Cytometric Bead Array (CBA).....	50
3.17 Parasitos.....	51
3.18 Desafio de animais.....	51
3.19 Medida do tamanho da lesão	52
3.20 Avaliação da carga parasitária através de Diluição limitante.....	52
3.21 Análises estatísticas	53
4. RESULTADOS	54
4.1 Construção dos plasmídeos e síntese <i>in vitro</i> dos mRNAs LinKAP e secLinKAP	54
4.2 Avaliação da capacidade de tradução dos mRNAs em células de mamíferos <i>in vitro</i> ...	57
4.3 Produção e caracterização físico-química e estrutural de LNPs com mRNAs LinKAP e secLinKAP	59
4.4 Expressão de LinKAP em células transfectadas com LNPs contendo mRNA LinKAP	61
4.5 Avaliação de modificações pós traducionais da proteína LinKAP expressa em célula de eucarioto	62
4.6 Comparação entre protocolos homólogos de vacinação com três doses utilizando proteína recombinante ou mRNA.....	65
4.6.1 Análise da resposta imune humoral e celular	66
4.6.2 Desafio com <i>L.amazonensis</i> em camundongos C57BL/6 imunizados com o protocolo homólogo de três doses	69
4.7 Comparação entre protocolos heterólogos de vacinação com três doses	70
4.7.1 Resposta imune humoral e celular.....	70
4.7.2 Desafio com <i>L. amazonensis</i> em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolo heterólogo de três doses	73
4.8 Comparação entre protocolos de vacinação homólogo e heterólogo com duas doses ...	74
4.8.1 Análise da resposta imune humoral e celular	74
4.8.2 Desafio com <i>L. amazonensis</i> em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolo homólogo e heterólogo de duas doses.....	76
4.9 Comparação entre protocolos homólogos de vacinação com três doses utilizando proteína recombinante ou mRNA em camundongos BALB/c	77
4.9.1 Análise da resposta imune humoral e celular	77
4.9.3 Desafio com <i>L. infantum</i> em camundongos BALB/c imunizados com o protocolo homólogo de três doses	80
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÃO.....	91

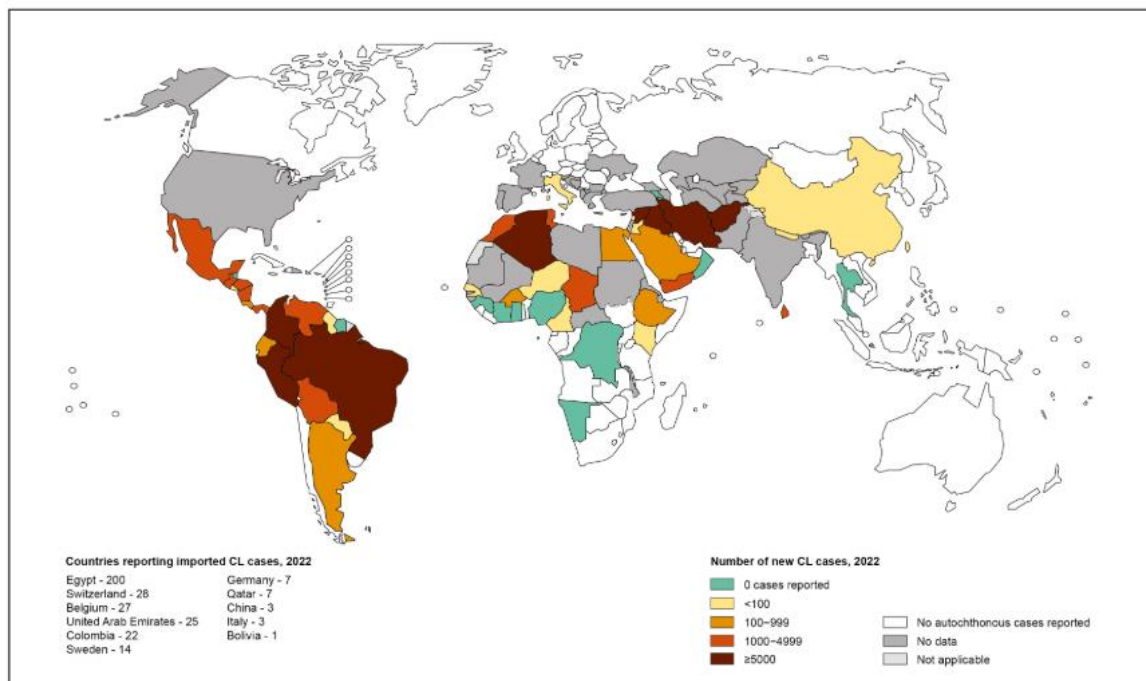
7.	PERSPECTIVAS	92
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9.	ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença negligenciada de distribuição global, presente em cerca de 99 países, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas e Mediterrâneo, sendo considerada uma das principais doenças tropicais pela World Health Organization (WHO), devido a seu impacto nas populações mais vulneráveis e à falta de recursos para pesquisa, diagnóstico e tratamento. Apesar da redução da incidência global da leishmaniose visceral na última década, a doença ainda representa um problema de saúde pública em várias regiões, com surtos recorrentes relacionados a guerras, migração forçada, pobreza e destruição ambiental. Estima-se que entre 700 mil a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente, com aproximadamente 70 mil mortes associadas à doença (World Health Organization, 2023).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, com cerca de 600.000 a 1 milhão de casos novos anuais globalmente (Burza; Croft; Boelaert, 2018). Está amplamente distribuída nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Os países com maior carga incluem Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Peru e Síria, que juntos concentram cerca de 70% dos casos (Alvar et al., 2012) (Figura 1). A LC é geralmente causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*. A transmissão é principalmente zoonótica, e fatores como desmatamento, atividades rurais, deslocamentos populacionais e conflitos armados contribuem para a sua disseminação (Reithinger et al., 2007).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2023. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1. Situação de endemidade da Leishmaniose Cutânea. Adaptado de WHO, 2023.

A leishmaniose visceral (LV), ou *kala-azar*, é a forma mais grave e potencialmente letal da doença, responsável por cerca de 50.000 a 90.000 casos anuais (WHO, 2023). Os casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil, sendo que o Brasil concentra mais de 90% dos casos registrados (Figura 2). A LV é causada principalmente por *L. donovani* (Ásia e África) e *L. infantum* (Mediterrâneo, América Latina). A transmissão pode ser antroponótica, quando o homem é o único reservatório, como na Índia, ou zoonótica, com o cão como principal reservatório, como ocorre na América Latina e Europa (Guerin et al., 2002). A LV atinge principalmente crianças menores de 5 anos e adultos imunocomprometidos, incluindo pessoas que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A coinfeção LV-HIV representa um desafio crescente, especialmente em áreas onde ambas as doenças coexistem, como na Etiópia e no Brasil (Pagliano; Esposito, 2017). Se não tratada, a LV pode evoluir para óbito. Estima-se que 20.000 a 40.000 mortes por leishmaniose ocorram anualmente, embora esse número possa ser subestimado devido à subnotificação (Pan American Health Organization, 2023).

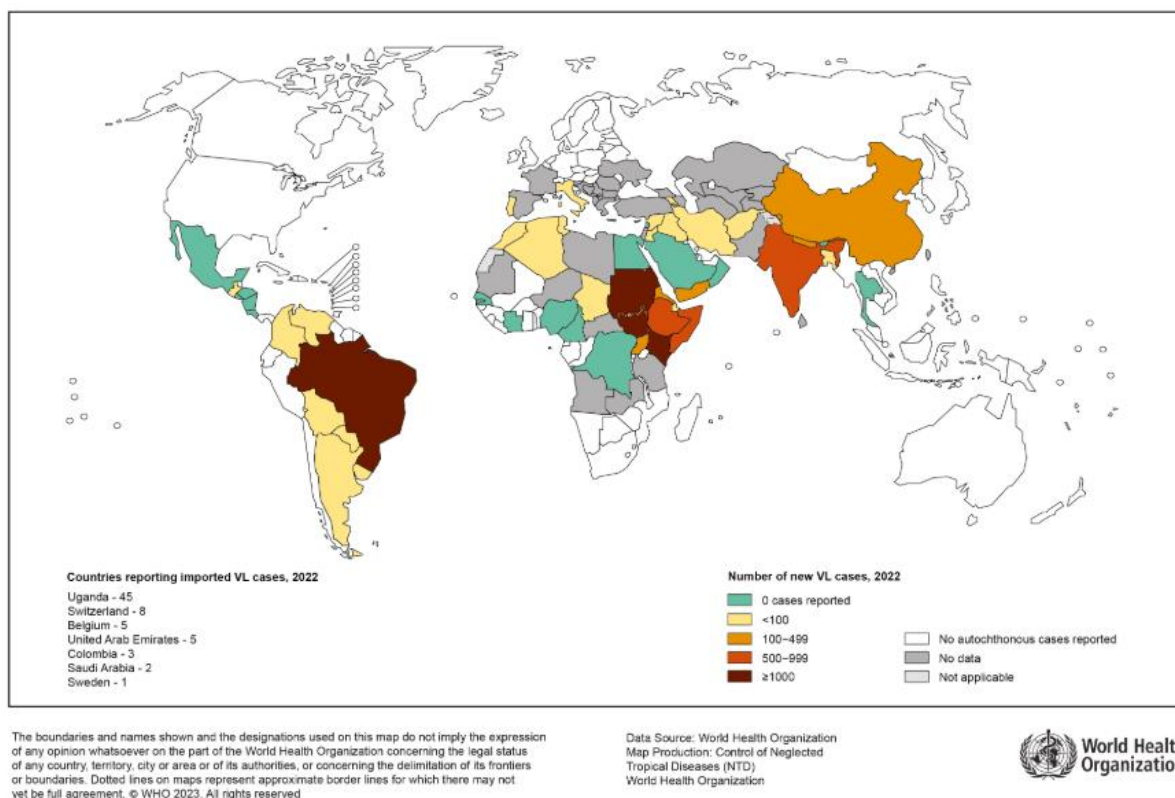


Figura 2. Situação de endemicidade da Leishmaniose Visceral. Adaptado de WHO, 2023.

As leishmanioses constituem um espectro de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae. As principais espécies envolvidas em infecções humanas pertencem aos subgêneros *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Mundinia*) (Espinosa et al., 2018).

A transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos, conhecidos como mosquitos-palha, insetos artrópodes pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Por possuírem espécies antropófagas, os gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo mundo), desempenham um papel importante na transmissão de *Leishmania* spp. para humanos (Arenas et al., 2017).

O ciclo biológico de *Leishmania* dura de 53 a 100 dias e envolve duas formas morfológicas principais: promastigota e amastigota. A promastigota é a forma flagelada e extracelular presente no intestino do vetor; mede de 12 a 20 µm e é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Já a amastigota é uma forma intracelular, arredondada e sem flagelo

aparente, com 2,5 a 3,5 μm , que se desenvolve, principalmente, no interior de macrófagos e outras células fagocíticas (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022).

Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos laceram a pele do hospedeiro vertebrado com suas mandíbulas dentadas e se alimentam do sangue extravasado. Por meio da sua saliva, os flebotomíneos introduzem várias moléculas que auxiliam em sua alimentação, como moléculas vasodilatadoras, inibidores da agregação plaquetária, da cascata de coagulação e inibidores das vias do complemento (Cavalcante; Pereira; Gontijo, 2003; Ferreira et al., 2016; Mendes-Sousa et al., 2013). Ao se alimentar de um hospedeiro infectado, a fêmea do vetor inocula promastigotas metacíclicas na derme. Esses parasitas são então fagocitados por macrófagos, e no fagolisossomo as amastigotas se multiplicam por fissão binária, promovendo a expansão local e sistêmica da infecção. Quando um flebotomíneo se alimenta de um hospedeiro infectado, ele ingere amastigotas e, em seu trato digestivo, esses amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, uma forma proliferativa e não infectante. Nessa fase, além da multiplicação assexuada, já foi demonstrada a ocorrência de eventos de recombinação genética semelhantes à reprodução sexual. Os promastigotas passam por um processo de diferenciação sequencial (procíclicas \rightarrow nectomonas \rightarrow haptomonas \rightarrow promastigotas metacíclicas), culminando na formação de formas metacíclicas altamente infectantes, que serão transmitidas na próxima picada. Um achado recente é a capacidade de promastigotas metacíclicas, antes consideradas diferenciadas terminalmente, de se desdiferenciarem em formas procíclicas proliferativas após uma segunda refeição de sangue do vetor. Esse processo aumenta significativamente a carga parasitária no intestino do flebotomíneo, permitindo maior multiplicação e garantindo maior eficiência de transmissão. Assim, a plasticidade no ciclo de vida de *Leishmania* favorece tanto a manutenção no vetor

quanto a amplificação da infecção em hospedeiros vertebrados (Figura 3) (Serafim et al., 2018; Silva-Moreira et al., 2025).

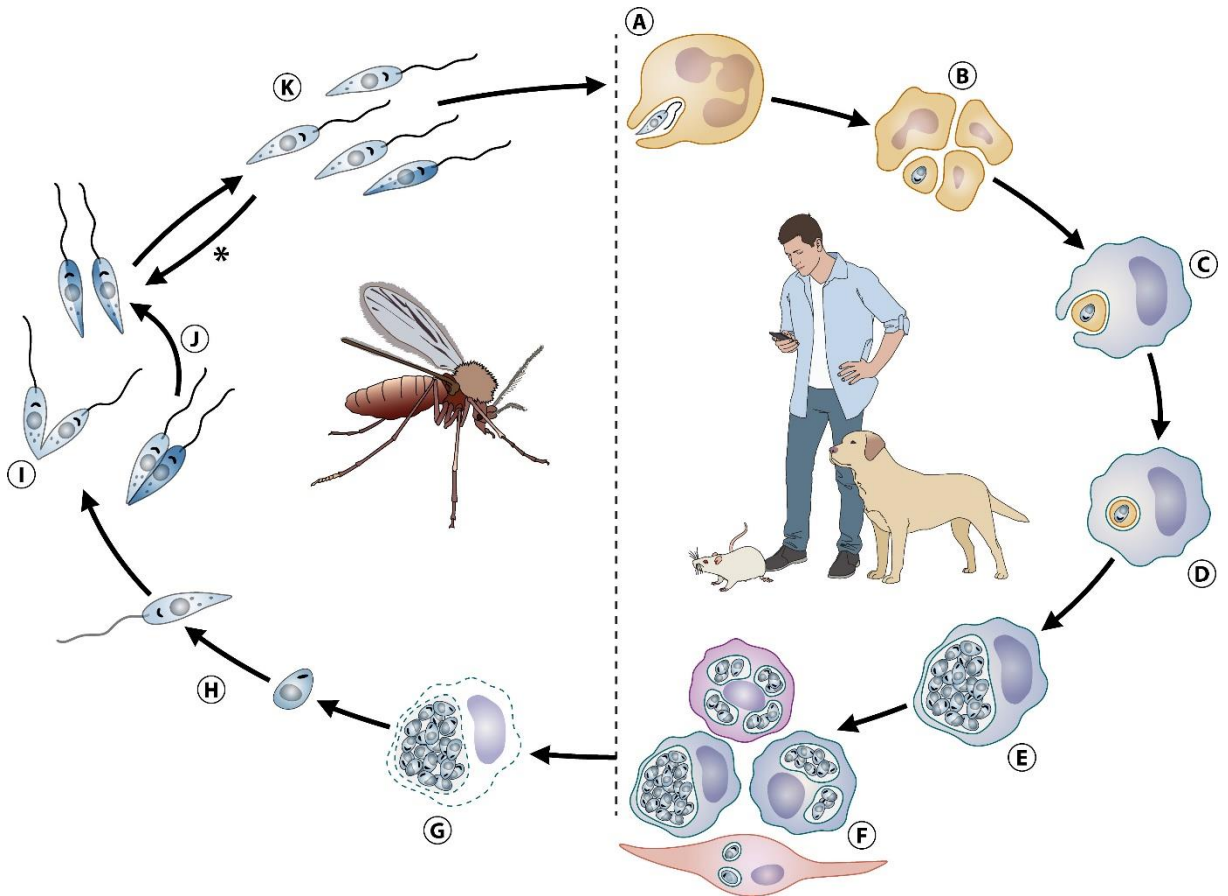


Figura 3. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (A) a fêmea infectada de flebotomíneo inocula promastigotas metacíclicas na derme de um hospedeiro; (B) diferenciação em amastigotas no interior de neutrófilos; (C–D) macrófagos fagocitam corpos apoptóticos infectados e tornam-se hospedeiros; (E–F) multiplicação de amastigotas por fissão binária em vacúolos lisossomais, ampliando a infecção. No vetor: (G) ingestão de células contendo amastigotas; (H–I) liberação e diferenciação em promastigotas procíclicas, que se multiplicam por fissão binária; (J) ocorrência de eventos de recombinação genética; (K) diferenciação sequencial (procíclicas → nectomonas → haptomonas → promastigotas metacíclicas). Após um segundo repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas podem se desdiferenciar em procíclicas proliferativas, aumentando a carga parasitária e a eficiência de transmissão (Silva-Moreira et al., 2025).

A leishmaniose se expressa e manifesta como uma doença de apresentação clínica heterogênea devido às características de cada parasito, sua espécie e região de endemicidade, bem como às respostas do hospedeiro. Clinicamente, a leishmaniose pode ser dividida em:

Leishmaniose Cutânea (LC), podendo ser localizada (LCL) ou disseminada (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), e Leishmaniose Visceral (LV) ou *kala-azar*.

Diversas espécies de leishmania podem causar a LC. A forma cutânea localizada (LCL) geralmente é associada a *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis*, e *L. panamensis*. Após a inoculação do parasita pela picada do flebotomíneo, que ocorre nas áreas do corpo mais expostas, com rosto, braços e pernas, há um período de incubação que pode variar de uma a quatro semanas, podendo se estender por anos (Reithinger et al., 2007). O primeiro sinal da infecção é um pequeno edema com aumento de temperatura local, evoluindo para uma pápula eritematosa que se transforma em vesícula, pústula e, finalmente, uma úlcera nodular típica dessa forma da doença (Figura 4). A LCL pode evoluir para cura espontânea em 2-6 meses (*L. major*), 3-9 meses (*L. mexicana*) ou 6-15 meses (*L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*). Apesar do bom prognóstico, a doença pode recidivar, apresentando manifestações que podem ser mais graves que a inicial (Arenas et al., 2017).

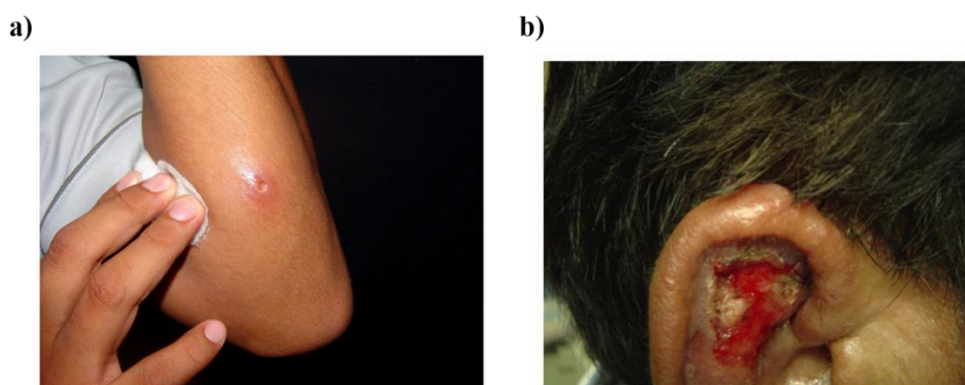


Figura 4. Manifestações clínicas da Leishmaniose Cutânea Localizada. (a) Úlcera precoce no antebraço de paciente com LCL. (b) Estágio atrófico de úlcera com cicatriz deformante na orelha de paciente com LCL. Adaptado de Arenas et al., 2017.

A forma disseminada da LC (LCD), causada pelas espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, é caracterizada por uma anergia aos antígenos do parasita, favorecendo sua disseminação por toda a pele e mucosas. Nesses casos, surgem múltiplas lesões ulcerativas ou não ulcerativas associadas a sinais como febre, linfedema e linfadenopatia. O comprometimento de mucosas leva ao aparecimento de úlceras dolorosas, e o curso clínico tende a ser crônico, estigmatizante e de difícil tratamento, sem resolução espontânea (Figura 5a). (Reithinger et al., 2007; Vannier-Santos; Martiny; de Souza, 2002). A Leishmaniose Mucocutânea (LMC) é causada pelo chamado complexo *L. braziliensis*, que inclui *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*. A maioria dos casos de LMC surge anos após a

resolução aparente de uma lesão cutânea prévia. A disseminação ocorre lentamente, causando distúrbios muitas vezes imperceptíveis, como inchaço e prurido. A lesão tem início na mucosa nasal e se espalha para a nasofaringe, laringe, boca e para a pele que recobre essas regiões. Nas lesões da nasofaringe, os pacientes geralmente relatam obstrução nasal, epistaxe e secreção. Queixas de dor, inflamação e deformidade nasal são comuns. Ao exame, podem ser observados placas granulomatosas, úlceras ou pólipos no epitélio do septo nasal, podendo evoluir para perda parcial ou total do septo cartilaginoso. Na cavidade oral, a doença frequentemente compromete o palato duro, podendo se estender para o palato mole, úvula, faringe ou, menos frequentemente, para as gengivas e o lábio superior. O palato mole pode aderir à parede da orofaringe, bloqueando a nasofaringe, e a fibrose na região das amígdalas pode causar deformidade do canal oral (Figura 5b). O envolvimento da laringe é geralmente indicado por rouquidão e tosse. Embora seja possível alcançar a cura com o tratamento adequado, o processo inflamatório frequentemente resulta em sequelas deformantes e permanentes (Marsden, 1986).

a)



b)



Figura 5. Manifestações clínicas da Leishmaniose Cutânea Difusa e Leishmaniose Muco-cutânea. (a) Paciente com a forma difusa da leishmaniose cutânea. (b) Paciente com a forma muco-cutânea da doença, caracterizada pelo comprometimento da cavidade nasal e oral. Adaptado de Arenas et al., 2017.

A leishmaniose visceral é a forma mais grave e potencialmente fatal. Os principais agentes etiológicos dessa doença são *L. donovani* e *L. infantum* (ou *L. chagasi*, como era anteriormente conhecida), *L. tropica* e *L. amazonensis* têm sido relatadas em casos de visceralização. O período de incubação da doença varia de 3 a 8 meses e sua expressão pode se

dar de forma subclínica, oligossintomática ou sintomática (Guerin et al., 2002). Em indivíduos imunossuprimidos, como transplantados, gestantes, pessoas em uso de corticosteroides ou portadores de HIV/Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a LV pode recidivar ou recrudescer devido à depleção de células T CD4⁺ (Pagliano; Esposito, 2017). Tipicamente, pacientes com LV apresentam sintomas como febre, tosse, perda de peso e dor abdominal, que podem se resolver espontaneamente ou podem progredir para *kala-azar*, a forma estabelecida da doença. Nessa condição, pode ocorrer anorexia, palidez, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, pigmentação cutânea, anemia, leucopenia, trombocitopenia (Figura 6). Se não tratada, pode levar a um acometimento sistêmico e evoluir para morte (Arenas et al., 2017).



Figura 6. Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral. Hepatoesplenomegalia e atrofia em jovens com leishmaniose visceral. Adaptado de Murray et al., 2005.

1.2. Imunidade do hospedeiro vertebrado na infecção por *Leishmania*

O sistema do complemento desempenha um papel importante na infecção por *Leishmania* spp. ao aumentar a habilidade de anticorpos e fagócitos de eliminar o protozoário recém inoculado no hospedeiro vertebrado. Assim que as promastigotas metacíclicas são inoculados na pele pelo flebotomíneo, elas entram em contato com o sangue do hospedeiro, ativando rapidamente as vias do complemento. A ativação de qualquer uma dessas vias resulta na deposição de fragmentos C3b e iC3b na superfície do parasita, levando à sua opsonização e favorecendo a fagocitose por macrófagos e neutrófilos através de receptores do complemento, como CR1, CR2 e CR3 (Corbett et al., 1996). Assim, a cascata do complemento é responsável por eliminar 85% dos parasitas ali presentes, porém os restantes são capazes de subverter esse processo e estabelecer a infecção (Domínguez et al., 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células imunes a serem recrutadas para o sítio da infecção e podem desempenhar um papel protetivo ou progressivo, a depender da espécie de *Leishmania* e de fatores intrínsecos ao hospedeiro. Os neutrófilos fagocitam as promastigotas através da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) e as matam através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que vai levar à liberação de grânulos contendo enzimas líticas e antimicrobianas e à produção de óxido nítrico (NO) (Guimarães-Costa *et al.*, 2009). Entretanto, a infecção de neutrófilos por *Leishmania* também pode favorecer a sobrevivência do parasita. Ao produzir citocinas e quimiocinas a fim de atrair mais células fagocíticas para o local da infecção, os neutrófilos parasitados podem atuar como um “cavalo de Tróia”, sendo fagocitados por macrófagos, que proporcionarão um ambiente favorável para a sobrevivência e proliferação desses parasitas no seu interior (Van Zandberger; Solbach; Laskay, 2004).

Os macrófagos exercem um papel importante na resposta imune contra a *Leishmania*, atuando como o principal reservatório no hospedeiro e também eliminando o parasita. Esses fagócitos podem ser ativados de duas formas. A ativação clássica, ou polarização M1, é induzida por citocinas como o interferon-gama (IFN- γ), produzido por células Th1 e células natural killers (NK). Os macrófagos M1 são pró-inflamatórios e produzem NO, molécula que possui atividade microbicida e desempenha um papel importante no controle e na eliminação da *Leishmania* (Loría-Cervera; Andrade-Narvaez, 2020). A polarização M2, é induzida por citocinas associadas à resposta Th2, como IL-4 e IL-13. Os macrófagos M2 apresentam um perfil anti-inflamatório, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , o que favorece a sobrevivência e a multiplicação do parasita no interior dos vacúolos parasitóforos (Pessenda; Silva, 2020). Dessa forma, os macrófagos se configuram como elementos-chave tanto na defesa quanto na permissividade à infecção por *Leishmania*, dependendo do contexto imunológico e das estratégias de evasão utilizadas pelo parasita.

As células dendríticas (DCs) desempenham um papel essencial na resposta imune contra a *Leishmania*, atuando como pontes entre a imunidade inata e adaptativa (Feijó *et al.*, 2016). Elas são responsáveis por capturar e processar antígenos do parasita no local da infecção, migrar para os linfonodos drenantes e apresentar esses antígenos às células T, iniciando a resposta adaptativa (Von Stebut; Tenzer, 2018).

As células da resposta imune adaptativa são indispensáveis para a eliminação do parasita e para a proteção contra reinfecções, entretanto, também participam da patogênese da

doença. As células T CD4⁺ são importantes mediadores da resposta imune adaptativa e são ativadas após seus receptores reconhecerem peptídeos de *Leishmania* ligadas ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Jawed; Dutta; Majumdar, 2019). De acordo o modelo murino de infecção por *L.major*, as citocinas presentes no microambiente influenciam a diferenciação das células T CD4⁺ em dois subtipos, tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2) (Reed; Scott, 1993). Na presença de IL-12, IL-2 e outras citocinas pró-inflamatórias, as células T CD4⁺ se diferenciam em células Th1, que vão produzir IFN- γ e TNF- α , ativando macrófagos parasitados, matando as amastigotas presentes ali via produção de NO (Luckheeram et al., 2012). Por outro lado, a presença de IL-4 no microambiente leva à diferenciação em células Th2, que são responsáveis pela secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, que mediam a susceptibilidade à *Leishmania*. Entretanto, essa correlação é mais bem descrita em camundongos, em humanos já foi visto que a altos níveis de TNF- α e IFN- γ estão associados a casos graves de LC e LMC, respectivamente (Bacellar et al., 2002; Melby, et al., 1994).

As células CD4⁺ Th17 geralmente relacionadas a doenças autoimunes, mostraram ser predominantemente patogênicas na infecção por *Leishmania*. Em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, a presença de IL-17 está associada à piora da doença, e camundongos deficientes nessa citocina controlam melhor a infecção (Lopez Kostka et al., 2009). O bloqueio de IL-10, leva ao aumento da IL-17, aumentando também a inflamação e a carga parasitária (Gonzalez-Lombana et al., 2013). Já em humanos, níveis elevados de IL-17, tem sido relacionado a lesões cutâneas e mucosas exacerbadamente inflamatórias causadas por *L.braziliensis* (Bacallar et al., 2009). Por fim, células T reguladoras (Treg), uma subpopulação especializada de T CD4⁺, possuem função imunomoduladora ao evitar o dano tecidual causado por uma resposta imune exacerbada em infecção por *L.infantum*. As Tregs produzem citocinas como IL-10 e TGF- β , que inibem a ativação de macrófagos e a produção de IFN- γ , acabando por suprimir a resposta imune protetora e aumentando a carga parasitária (Bhattacharya et al., 2016).

As células T CD8⁺ têm um papel controverso na resposta imune a *Leishmania*. Nos estágios iniciais da infecção, essas células produzem IFN- γ , que promove a ativação de células dendríticas e a produção de IL-12, citocina essencial para a diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 e supressão da resposta Th2 (Cardoso et al., 2015). Por outro lado, as CD8⁺ citotóxicas com alta expressão de granzimas e IL-10 estão associadas a formas graves e destrutivas da

doença, como a leishmaniose mucocutânea (MCL) e cutânea difusa (DCL). Ao matar células infectadas, os parasitas são liberados juntamente a moléculas associadas a dano tecidual (DAMPs), o que contribui para a inflamação exacerbada e facilita a disseminação do parasita (Novais et al., 2013).

As células B medeiam a imunidade humoral pela produção de anticorpos específicos e geração de memória imunológica. Entretanto, *Leishmania* spp. são parasitas intracelulares, estando assim protegidos da ação de anticorpos, o que faz com que a resposta humoral seja pouco eficaz no controle da doença. As células B ainda podem contribuir para a susceptibilidade do hospedeiro a infecções por *L.amazonensis* ou *L.donovani* pela produção de IL-10 (Smelt et al., 2000; Wanasen; Xin; Soong, 2008).

Leishmania spp. desenvolveram diversos mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro que lhes permitem sobreviver, replicar e persistir no interior das células fagocíticas, principalmente dos macrófagos. Um dos primeiros mecanismos utilizados pelo parasita é a evasão do sistema complemento. A susceptibilidade ao sistema do complemento varia de acordo com a forma e a espécie de *Leishmania*, mas parece estar relacionada a expressão de antígenos de superfície. Por exemplo, as formas metacíclicas expressam moléculas de superfície como lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease GP63, capazes de degradar componentes do complemento, inibir a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e converter C3b em iC3b, fragmento inativo que não leva a lise celular (Hoover et al., 1984). Ainda, moléculas da superfície do parasita como ecotina e LdISP2 podem inibir MASP-1, MASP-2 e MASP-3, responsáveis pelo início da cascata do complemento pela via das lectinas (NAGY et al., 2019; VERMA et al., 2018).

Outro mecanismo importante envolve a modulação de receptores Toll-like (TLRs), principalmente TLR2 e TLR4, que estão envolvidos no reconhecimento de componentes da superfície de parasitas e na sinalização que leva à produção de IL-12, TNF- α e NO, que levarão à ativação de macrófagos. A *Leishmania* pode desviar essas vias de sinalização ativando moléculas reguladoras negativas como SHP-1 e SOCS, que suprimem a produção de citocinas inflamatórias (De Veer et al., 2003). Além disso, espécies como *L. amazonensis* e *L. mexicana* se beneficiam da ativação de TLR2, que induz a produção de IFN- β e enzimas antioxidantes, favorecendo sua sobrevivência intracelular (Carvalho Vivarini et al., 2011). O TLR4 reconhece principalmente as moléculas glico-esfingofosfolípídeos (GSPL) e o complexo proteoglicolípídico P8GLC presentes na superfície de amastigotas e induz uma resposta

antiparasitária coordenada por TNF- α , porém *Leishmania* também desenvolveu mecanismos para modular negativamente essa via (Kropf et al., 2004). Em *L. major* foi relatado a utilização de inibidores de serina protease (ISP) para bloquear a ativação de TLR4, dificultando a fagocitose e destruição do parasita (Faria et al., 2011). Já *L. mexicana* modula negativamente a via de sinalização do TLR4 para inibir a produção de IL-12 pelos macrófagos, o que torna o ambiente favorável à permanência do parasita (Holm et al., 2001; Vinet et al., 2009).

Para sobreviver no interior dos macrófagos, a *Leishmania* precisa resistir a condições adversas como pH ácido, altas temperaturas e estresse oxidativo. Assim, após a fagocitose, as formas promastigotas adotam estratégias para escapar do fagolisossomo. O parasita retarda a fusão do fagossomo com o lisossomo, impedindo sua maturação e acidificação, através da ação do lipofosfoglicano (LPG), que interfere na bomba V-ATPase e promove acúmulo de F-actina ao redor do vacúolo. Essa interferência permite que os promastigotas se diferenciem em formas amastigotas mais resistentes (Holm et al., 2001; Vinet et al., 2009). Além disso, as amastigotas consomem esfingolipídios do hospedeiro para se proteger do ambiente ácido e modulam a proteína LYST, levando à formação de vacúolos parasitóforos maiores, ajudando a diluir os efeitos do óxido nítrico e favorecendo a sobrevivência do parasita (Wilson et al., 2008).

As formas amastigotas de *Leishmania* necessitam de nutrientes como ferro e arginina para sua divisão e sobrevivência. O ferro é crucial para o metabolismo do parasita, mas sua disponibilidade é limitada pela ação da proteína Nramp1 do hospedeiro, que o transporta para fora do fagolisossomo. Para contornar isso, *Leishmania* expressa transportadores próprios, como LIT1 e LIT2, que competem por esse nutriente. A arginina também é essencial para o crescimento do parasita, mas também é substrato para a produção de NO pelos macrófagos. Assim, *Leishmania* expressa a enzima arginase, que converte arginina em poliaminas para seu próprio benefício, ao mesmo tempo em que reduz a disponibilidade de arginina para a produção de NO (Reguera et al., 2009).

A apresentação de antígenos pelos macrófagos também é prejudicada durante a infecção. A *Leishmania* pode sequestrar antígenos e impedir sua ligação ao MHC de classe II, como é o caso do antígeno LACK (*Leishmania homolog of receptors for activated C kinase*), interferindo na sua apresentação (Courret et al., 1999), como também pode internalizar o MHC II em megassomos e utilizar proteases como a cisteína protease, para degradá-lo, impedindo a apresentação de antígenos (Leão et al., 1995). *Leishmania* também possui a habilidade de alterar a fluidez da membrana plasmática dos macrófagos infectados e alterar a apresentação de

antígenos (Pradhan et al., 2021). As *lipid rafts* são regiões ricas em colesterol e esfingolipídios onde se localizam proteínas importantes para a sinalização imune, como os complexos MHC-peptídeo. A *Leishmania* consegue retirar colesterol da membrana das células fazendo com que as *lipid rafts* se desorganizem, assim, o complexo MHC-peptídeo perde a estabilidade ou fica mal posicionado, dificultando o reconhecimento por células T e, conseqüentemente, resultando numa resposta imune fraca e ineficaz (Chakraborty et al., 2005; Ghosh et al., 2014)

A *Leishmania* também emprega múltiplos mecanismos para interferir nas cascatas de sinalização de macrófagos. Um dos primeiros alvos do parasita é a produção de espécies ROS, essenciais para a resposta imune inata. A ativação do complexo NADPH oxidase, responsável por gerar ROS, depende da fosforilação de subunidades como p67 e p47, processo que é bloqueado em macrófagos infectados por *L. donovani* devido à inibição da via da proteína quinase C (PKC) (Bhattacharyya et al., 2001). Em *L. mexicana*, o LPG presente nas formas promastigotas também interfere na ativação da PKC ao bloquear sua associação com cálcio e diacilglicerol, impedindo sua translocação para a membrana, o que reduz a explosão oxidativa e permite a sobrevivência do parasita (Delgado-Domínguez et al., 2010).

A *Leishmania* também interfere na via de sinalização do IFN- γ por meio da via JAK/STAT. O parasita ativa a fosfatase SHP-1, que inibe a fosforilação da JAK2, resultando em diminuição da produção de NO (Blanchette et al., 2009). A via MAPK, composta por proteínas como ERK1/2, JNK e p38MAPK, crítica para a produção de citocinas inflamatórias, como IL-12 e TNF- α ; também é manipulada por *Leishmania*. Em infecções por *L. donovani*, observa-se a inibição de ERK1/2, JNK e p38, resultando na supressão da resposta inflamatória (Privé; Descoteaux, 2000). Já em infecções por *L. amazonensis*, ERK1/2 é ativado, promovendo a produção de IL-10, uma citocina reguladora que favorece a persistência do parasita (Yang; Mosser; Zhang, 2007). Por fim, outro alvo importante são os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, ambos essenciais para a expressão de genes envolvidos na defesa imune. *Leishmania* reduz a expressão da subunidade p65 de NF- κ B e, por meio da ação de GP63 e proteases, realiza sua clivagem em uma forma menor (p35), que ativa genes relacionados à sobrevivência do parasita. Já os amastigotas induzem a degradação de p65 via fosfatases (Abu-Dayyeh et al., 2010). O fator de transcrição AP-1, também tem sua atividade reduzida, o que impacta negativamente na produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-12 (Abu-Dayyeh et al., 2008).

1.3 Diagnóstico, tratamento e estratégias de controle das leishmanioses

O diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) requer confirmação laboratorial, já que seus sintomas são inespecíficos. O padrão-ouro é a identificação de amastigotas em aspirados de órgãos como baço ou medula óssea (Sundar; Rai, 2002). Testes sorológicos, como o rK39, são amplamente usados, embora apresentem limitações em algumas regiões (Boelaert et al., 2014). PCR e outros testes moleculares são úteis em casos atípicos, mas pouco acessíveis em áreas endêmicas. Já o teste de Montenegro tem aplicação apenas epidemiológica na LV. Para a LC, o diagnóstico baseia-se na observação direta do parasita em lesões, complementada por PCR para maior sensibilidade e identificação da espécie (Jara et al., 2013). A sorologia tem valor limitado, e o teste de Montenegro é útil como marcador de exposição. Uma vez confirmado o diagnóstico, a definição rápida da conduta terapêutica é essencial para evitar complicações.

O tratamento de primeira linha para LV há décadas vem sendo os antimoniais pentavalentes, sódio estibogluconato ou antimoniato de meglumina. Os antimonais necessitam ser administrados sob supervisão médica, o que leva o paciente a uma internação que vai de três a quatro semanas, que é o tempo de tratamento (Sundar; Chakravarty, 2010). Seu uso causa efeitos colaterais como náuseas, dores nas articulações, dor abdominal e cardiotoxicidade em tratamentos prolongados. Além disso, a resistência aos antimoniais têm sido relatada na Índia, onde 65% dos novos pacientes com LV são irresponsivos ao tratamento (Sundar; Chakravarty, 2010). A busca por tratamentos alternativos aos antimoniais levou à miltefosina e à paromicina. A miltefosina é o único fármaco oral disponível e se mostra eficaz para o tratamento da LV, apesar da sua queda de desempenho anos após uso. Apresenta efeitos gastrointestinais leves, mas é contraindicado na gravidez devido à sua ação teratogênica. Seu uso pode favorecer o surgimento de cepas resistentes, especialmente por sua longa meia-vida, sendo recomendada a terapia combinada para mitigar esse risco (Bryceson, 2001). A paromicina é um fármaco geralmente utilizado em combinação com os antimonais e tem se mostrado efetiva, bem tolerada e barata. No entanto, sua administração ocorre apenas em algumas regiões, como na África Oriental. Atualmente, a anfotericina B lipossomal (LAMB) é considerada o tratamento mais eficaz e seguro contra LV, apresentando altas taxas de sucesso. Entretanto, apresenta um alto custo e sua disponibilidade em áreas endêmicas é escassa. Seu uso é bem tolerado, mas

ainda assim alguns efeitos colaterais como febre, calafrios, hipocalcemia e insuficiência renal são relatados (Balasegaram et al., 2012).

A maioria dos casos de LC apresentam cura espontânea em 2 a 18 meses, a decisão de tratamento se deve à necessidade de acelerar a cura, evitar cicatrizes e deformidades e diminuir o risco de disseminação. A Sociedade de Doenças Infecciosas da América publicou um guia sugerindo uma classificação em leishmaniose cutânea simples ou complexa, onde o tratamento seria local ou sistêmico (Aronson et al., 2016). Os tratamentos locais para LC geralmente são injeções intralesionais de estibogluconato de sódio, aplicação tópica de paromicina, crioterapia ou terapia termal. A combinação dessas terapias resulta em altas taxas de cura (Gakidou et al., 2017). Os tratamentos sistêmicos são reservados para pessoas imunossuprimidas, com lesões extensas e para pacientes com leishmaniose mucocutânea. As opções incluem estibogluconato de sódio, miltefosina e LAMB nas mesmas concentrações usadas no tratamento de LV. Apesar da falta de estudos clínicos, estudos observacionais evidenciaram taxas de cura de até 90% (Kim et al., 2009; Mosimann et al., 2016; Solomon et al., 2013). Embora o tratamento seja fundamental para a recuperação dos pacientes, ele não é suficiente para interromper o ciclo de transmissão. Assim, medidas de controle são estratégias complementares indispensáveis para prevenir e conter a disseminação da doença.

A estratégia de controle de vetores baseia-se principalmente na pulverização residual intradomiciliar com inseticidas. Devido à resistência emergente ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), o inseticida mais usado, países como Índia, Bangladesh e Nepal têm adotado inseticidas piretróides sintéticos como alternativa (Coleman et al., 2015). O uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas oferece proteção individual contra picadas, mas estudos não comprovaram redução significativa da incidência de leishmaniose visceral em nível populacional. Isso se deve, em parte, ao fato de que a transmissão ocorre frequentemente fora das residências, em áreas peridomiciliares (Picado et al., 2011). As vacinas são uma estratégia de controle de doenças de maior impacto preventivo a longo prazo, entretanto, ainda não existe vacina licenciada para uso humano contra a leishmaniose, embora alguns candidatos estejam em fases clínicas e muitos outros em desenvolvimento pré-clínico.

1.4 Vacinas para leishmaniose

Como visto anteriormente, as estratégias de controle disponíveis atualmente para a leishmaniose são limitadas. Nesse cenário, as vacinas surgem como uma alternativa promissora pois oferecem a possibilidade de atuar de forma integrada com outras medidas de controle, além de prevenir a infecção e o desenvolvimento da doença, reduzir a carga parasitária na população humana e animal e diminuir a transmissão do parasita entre vetores e humanos (Kaye et al., 2023). O fato de que a infecção natural por *Leishmania* spp. pode induzir uma imunidade protetora duradoura, conhecida como imunidade concomitante, fornece uma base imunológica para o desenvolvimento de vacinas (Peters et al., 2014). Essa imunidade é mediada, principalmente, por células T CD4⁺ Th1 produtoras de IFN- γ , fundamentais para a ativação de macrófagos e o controle da infecção intracelular. Por essa razão, os esforços vacinais buscam reproduzir esse perfil de resposta, estimulando a imunidade celular capaz de conter o parasita e prevenir as formas graves da doença (Hohman; Peters, 2019). Embora ainda não exista uma vacina eficaz aprovada para uso humano contra a leishmaniose, avanços significativos têm sido alcançados nos últimos anos nesse campo.

As vacinas de primeira geração surgiram em substituição à chamada Leishmanização, uma prática onde se inoculava parasitas vivos retirados de lesões ativas ou de cultivo celular em pessoas saudáveis para induzir uma infecção controlada para que depois a pessoa adquirisse uma imunidade protetora duradoura. As vacinas de primeira geração utilizam parasitos mortos ou inativados. Em alguns estudos, parasitas mortos foram combinados com BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), usada na vacina contra tuberculose (Armijos et al., 1998; Khalil et al., 2000). Essa combinação, em tese, atuaria como um adjuvante biológico ao potencializar a resposta celular, induziria uma polarização Th1 e compensaria a baixa imunogenicidade da leishmania morta. Esses estudos não seguiram uma padronização, apresentaram resultados inconsistentes e foram abandonados. As vacinas vivas atenuadas representam uma estratégia de primeira geração, na qual os parasitas são geneticamente modificados, por exemplo, por meio da tecnologia CRISPR-Cas9, para a deleção de genes associados à virulência e/ou à sobrevivência, resultando em formas atenuadas incapazes de causar doença, mas ainda capazes de induzir uma resposta imune protetora. Um exemplo promissor é a vacina LmCen^{-/-}, desenvolvida a partir de uma cepa de *L. major* com deleção do gene centrina. A ausência desse gene compromete a capacidade do parasita de se replicar dentro dos macrófagos. Camundongos imunizados com essa cepa atenuada não desenvolveram lesões após o desafio com flebotomíneos infectados, enquanto os animais não imunizados apresentaram lesões e elevada carga parasitária. A vacina

LmCen^{-/-} está em processo avançado para estudos clínicos em humanos (Pacheco-Fernandez et al., 2021).

As vacinas de segunda geração são desenvolvidas a partir de antígenos do parasita, podendo incluir proteínas recombinantes, proteínas nativas purificadas ou peptídeos sintéticos que representam epítomos imunogênicos. A vantagem dessa abordagem é segurança, pois não utiliza parasitos vivos. Entretanto, as proteínas recombinantes purificadas utilizadas como antígeno são pouco imunogênicas, para superar essa limitação, passaram a ser incorporados adjuvantes capazes de induzir uma resposta imune do tipo Th1, essencial para o controle da infecção por *Leishmania* spp. Entre os adjuvantes mais eficazes testados em modelos murinos destacam-se os oligodesoxirribonucleotídeos contendo motivos CpG, formas sintéticas de monofosforil lipídio A (MPL), e o Poly-ICLC (Hiltonol®) (Marques et al., 2024; Moura et al., 2024; Rhee et al., 2002). Esses compostos atuam por meio da ativação de TLRs, TLR9 no caso do CpG, TLR4 para MPL e TLR3 para Hiltonol®. A ativação de TLRs em células apresentadoras de antígeno leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ , resultando na ativação de células T CD4⁺ Th1 (Duthie et al., 2011). Assim, diversos antígenos recombinantes têm sido testados na presença ou ausência de adjuvantes e mostrado uma proteção em modelos pré-clínicos. Exemplo disso são LEISH 111F/MPL-SE, LACK, GPL3, TSA, LmSTI1, LeIF, HASPB, SMT, KMPH11, A2 (Alvar et al., 2013). A proteína recombinante LinKAP adjuvantada com Hiltonol® induziu respostas humorais e celulares protetoras em modelos murinos e de hamster, reduzindo significativamente a carga parasitária em infecção por *L. infantum*, tanto em protocolos profiláticos quanto terapêuticos (De Oliveira et al., 2025). As vacinas recombinantes LEISH-F1, LEISH-F2 e LEISH-F3 adjuvantadas com a emulsão estável de Glucopiranosil Lipídeo A (GLA-SE) chegaram a estudos clínicos de fase II apresentando resultados promissores (Chakravarty et al., 2011). A proteína A2 de amastigota de *Leishmania* associada à saponina apresentou proteção parcial em cães desafiados com *L. chagasi*, resultando no desenvolvimento da vacina Leish-Tec®, comercializada no Brasil entre 2008 e 2023 (Fernandes et al., 2008).

As vacinas de terceira geração são baseadas em ácidos nucleicos, seja DNA plasmidial, vetores virais ou mais recentemente, RNA mensageiro (mRNA). O exemplo mais avançado quando se fala em vacinas para leishmaniose e vacinas de terceira geração é a ChAd63-KH, baseada em um adenovírus símio não replicativo que expressa os antígenos KMP-11 e HASPB de *L. donovani*. Essa formulação demonstrou segurança e induziu resposta celular robusta em

ensaios clínicos de fase I e IIa, representando uma abordagem promissora para a prevenção e o tratamento da leishmaniose visceral e dérmica pós kala-azar (Osman et al., 2017). Avanços mais recentes também exploraram o uso de vacinas de mRNA com antígenos recombinantes como LEISH-F2 e LEISH-F3+ que, ao imunizar camundongos induziram respostas Th1 potentes. A combinação heteróloga de vacina de mRNA seguida de vacina de proteína recombinante com gera respostas robustas de células T CD4+ e CD8+ e protege contra infecção por *Leishmania donovani* (Duthie et al., 2022).

1.5 Tecnologia de vacinas mRNA

Desde seu descobrimento em 1961, o mRNA vem sendo aplicado em pesquisas para várias doenças e o primeiro estudo mostrando a produção de proteínas em camundongos vacinados com mRNA transcrito in vitro (IVT mRNA) foi publicado em 1990 (Wolf et al., 1990). Apesar dos resultados promissores, não houve um interesse financeiro no desenvolvimento de terapias utilizando mRNA. Na última década, entretanto, o surgimento de algumas inovações tecnológicas possibilitou o aprimoramento da tecnologia de mRNA, levando a um avanço no campo das terapias utilizando essa molécula e, principalmente, no desenvolvimento de vacinas. Por fim, as vacinas de mRNA ganharam um grande destaque durante a pandemia de COVID-19, ao serem aprovadas em tempo recorde e mostrarem sua eficácia e segurança no combate ao Sars-CoV-2 (Corbett et al., 2020; Polack et al., 2020). Essas vacinas desenvolvidas pela Pfizer-BioNTech e Moderna, consolidaram a plataforma de vacinas de mRNA e despertaram o interesse em sua aplicação para outras doenças.

Ao contrário de vacinas baseadas em DNA ou vetores virais, as vacinas de mRNA não se integram ao genoma, evitando o risco de inserção de mutações. Para serem traduzidas em proteínas, as vacinas de mRNA necessitam apenas entrar no citoplasma das células. Além disso, sua produção ocorre por síntese in vitro, sem a necessidade de cultivo em células ou bactérias, o que reduz o risco de contaminação biológica e permite maior rapidez e escalabilidade na produção (Chaudhary; Weissman; Whitehead, 2021). As vacinas de mRNA são divididas em dois tipos, as não-replicativas e as autorreplicativas. As vacinas não-replicativas são desenhadas para codificar apenas o antígeno de interesse, enquanto as vacinas autorreplicativas são projetadas para incluir também genes que codificam proteínas não estruturais de alfavírus. Essas proteínas são traduzidas na célula hospedeira e formam um complexo enzimático capaz

de amplificar o próprio mRNA, resultando em uma produção intracelular muito maior do antígeno sem, no entanto, formar partículas infectantes, já que as sequências que codificavam as proteínas virais estruturais foram removidas (Geall; Mandl; Ulmer, 2013). As vacinas de mRNA são projetadas para reproduzir a estrutura do mRNA endógeno, assim, são compostas do cap 5', região 5' não traduzida (UTR), uma janela de leitura aberta que codifica o antígeno de interesse contendo ou não as proteínas não estruturais de alfavírus, a região 3' UTR e uma cauda poli (A).

O cap 5' é responsável por proteger estericamente o mRNA da degradação por exonucleases e por viabilizar a tradução ao se ligar a proteínas que recrutarão o ribossomo (Ziemniak et al., 2013). Em eucariotos, o cap 5' é uma 7-metilguanossina ligada por uma ponte trifosfatada à região 5' do mRNA. No caso de mRNAs IVT o capeamento pode ser realizado de maneira pós-transcricional ou cotranscricional. A abordagem pós-transcricional utiliza enzimas derivadas de vaccinia vírus, que irão remover um fosfato 5' do mRNA e adicionar uma guanossina em seu lugar e, em seguida, adicionar um grupo metil na posição 7 dessa guanossina, formando o cap 0. A abordagem cotranscricional utiliza um análogo de cap que é adicionado durante a transcrição *in vitro*. Esse análogo é uma guanossina modificada que compete com o nucleotídeo GTP, o que pode resultar em uma baixa proporção de mRNA efetivamente capeado. Para contornar essa limitação, é feito um ajuste na razão molar entre o análogo de cap e o GTP na reação, permitindo que a guanossina seja incorporada em intervalos e garantindo o capeamento eficiente da maioria do mRNA nascente (Sahin; Karikó; Türeci, 2014).

As regiões 5' e 3' UTR flanqueiam a região codificadora do antígeno de interesse e são responsáveis pela estabilidade e modulação da tradução do mRNA (Zinckgraf; Silbart, 2003). Geralmente essas regiões escolhidas são conhecidas por aumentar a tradução e prolongar a estabilidade do mRNA no citoplasma, exemplos disso são a região 5' de mRNA de orthopoxvirus e a região 3' de β -globina humana (Jia et al., 2013). Apesar dessa região codificadora não ser tão maleável como as UTRs, é possível realizar modificações estratégicas que aumentem a eficiência traducional sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína, um processo conhecido como códon-otimização. Essa técnica permite a substituição de códons raros por códons sinônimos mais frequentes no organismo-alvo. Códons mais frequentes tendem a ser traduzidos mais rapidamente e de forma mais eficaz, resultando em maior produção do antígeno de interesse (Cannarrozzi et al., 2010).

Modificações na estrutura dos nucleotídeos também podem ser incorporadas ao mRNA sintético para otimizar sua tradução. Em mRNAs endógenos, nucleosídeos modificados ocorrem naturalmente e desempenham um papel crucial no reconhecimento do RNA como “self” pelo sistema imunológico, evitando sua ativação contra o próprio organismo. Por outro lado, o mRNA obtido por transcrição *in vitro* sem essas modificações é frequentemente identificado como um sinal de infecção, sendo reconhecido por sensores de RNA, como os TLRs (TLR3, TLR7 e TLR8) e o receptor do gene induzível por ácido retinóico I (RIG I). A ativação desses receptores leva à produção de interferons do tipo I, que resulta na inibição ou degradação do mRNA (Karikó et al., 2005). O uso de nucleosídeos modificados como pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 2'-O-metiladenosina, 5-metiluridina, reduz a ativação de TLRs, preservando a integridade do mRNA que seja traduzido. A descoberta desse mecanismo de supressão da resposta imune pelo uso de nucleosídeos modificados foi fundamental para viabilizar as vacinas de mRNA contra a COVID-19, e resultou a Katalin Karikó o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2023.

Por fim, a cauda poli (A) é uma sequência de 100-150 adeninas adicionadas após a extremidade 3' UTR do RNA que serão fundamentais na regulação da tradução e estabilidade do mRNA. Essa estrutura recruta proteínas de ligação à poli(A), que se associam à cauda e interagem com fatores de iniciação da tradução, como eIF4G (Mugridge; Collier; Gross, 2018). Essa interação permite a formação de um arranjo denominado loop fechado, no qual as extremidades 5' e 3' do mRNA são aproximadas, facilitando o recrutamento do ribossomo para o início da tradução. Além de promover a tradução, a cauda poli(A) também protege o mRNA da degradação por exonucleases (Gallie; Wolff; Riddle, 1991).

Para que o antígeno seja traduzido e induza o sistema imune, o mRNA precisa transpor a membrana das células e chegar ao citoplasma. Entretanto, a difusão das moléculas de mRNA através da membrana é termodinamicamente desfavorável, uma vez que os fosfolípides negativamente carregados da membrana celular e suas cabeças polares repelem eletrostaticamente as moléculas de mRNA, que também são carregadas negativamente, além de serem grandes e hidrofílicas (Iavarone et al., 2017). Além disso, as moléculas de mRNA desnudas seriam degradadas por exonucleases ao passar pela pele e entrar em contato com o sangue (Hajj; Whitehead, 2017). Para que o mRNA chegue ao citoplasma da célula e não seja degradado, ele necessita ser encapsulado em sistemas de entrega. Muitas estratégias de entrega de mRNA têm sido desenvolvidas e a mais bem sucedida são as nanopartículas lipídicas

(LNPs). Além de proteger e entregar o mRNA, as LNPs propiciam a captação celular, aumentam a expressão antigênica e ainda podem atuar como um adjuvante para o sistema imune (Kanasty et al., 2012; Pepini et al., 2017). Todas as vacinas de mRNA contra Sars-CoV-2 licenciadas para uso em humanos utilizam LNPs. A estrutura das LNPs é composta por quatro componentes principais: um lipídeo ionizável, colesterol, um lipídeo auxiliar (*helper*) e um lipídeo contendo polietilenoglicol (PEG) (Chaudhary; Weissman; Whitehead, 2021b).

Os lipídios ionizáveis são o componente principal das LNPs e são projetados para serem protonados apenas em pH baixo. Durante a formulação das LNPs, realizada em meio ácido, os lipídios ionizáveis adquirem carga positiva, atraem e complexam o mRNA, que é carregado negativamente. Após a administração em pH fisiológico, os lipídios ionizáveis tornam-se neutros, o que reduz sua toxicidade e evita interações indesejadas com células e proteínas do sangue (Cullis; Hope, 2017; Kowalski et al., 2019; Meng et al., 2021). Após sua entrada na célula, as LNPs são direcionadas aos endossomos, cujo ambiente ácido confere novamente carga positiva aos lipídios. Essa mudança facilita a interação com a membrana endossomal, promovendo sua desestabilização e permitindo o escape do mRNA para o citoplasma, onde será traduzido (Patel et al., 2019).

O colesterol é um componente estrutural, responsável por modular a rigidez e a integridade da LNP. Sua geometria poliedral multilamelar ajuda no preenchimento dos espaços entre os lipídeos (Eygeris et al., 2020; Yang et al., 2016b). Os lipídios auxiliares (*helper*) ajustam a fluidez das LNPs e desempenham um papel essencial durante a entrega do mRNA. Os lipídios *helper* ajudam os lipídios da LNP a mudar sua conformação de lamelar para hexagonal, favorecendo a fusão da LNP e o escape endossomal. A escolha do lipídio *helper* deve ser feita de acordo com o tipo de lipídio ionizável e o RNA utilizado. Entre os mais utilizados em vacinas de mRNA estão o dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e o distearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Cheng; Lee, 2016).

Os lipídios PEG possuem muitas funções. Sua cauda de PEG se projeta para fora da superfície da LNP, formando uma barreira estérica, impedindo que as LNPs se aproximem demais uma da outra, reduzindo sua agregação. Essa barreira também dificulta sua opsonização pelas proteínas do complemento, favorecendo a evasão do sistema imune e prolongando o tempo de circulação no organismo (Zhu et al., 2017). Além disso, por ser altamente hidrofílico, o PEG contribui para neutralizar parcialmente a carga superficial das LNPs, reduzindo o

potencial zeta, e minimizando as interações indesejadas entre as LNPs e entre proteínas plasmáticas (Ryals et al., 2020).

As vacinas de mRNA induzem respostas imunes por meio da expressão do antígeno diretamente pelas células apresentadoras de antígenos (Figura 7). Após a administração do mRNA formulado em LNPs, alguns eventos imunológicos ocorrem simultaneamente. Além de proteger o mRNA da degradação e facilitar sua entrada nas células, as LNPs também atuam como adjuvantes ativando o sistema imune inato (Verbeke et al., 2022). No local da injeção, as LNPs se acumulam no tecido e são captadas por células do sistema imune inato residentes ou recrutadas, como macrófagos, DCs e monócitos. Essas células são capazes de internalizar as LNPs por diferentes mecanismos como endocitose mediada por clatrina, caveolina e macropinocitose.

Após a internalização, as LNPs são direcionadas para compartimentos endossomais, onde ficam retidas. O escape endossomal é uma etapa crítica para que o mRNA atinja o citoplasma e seja traduzido em proteína e embora esse mecanismo ainda não esteja completamente elucidado, sabe-se que os lipídios ionizáveis presentes nas LNPs se tornam protonados no ambiente ácido do endossomo, adquirindo carga positiva. Isso favorece a interação eletrostática com a membrana endossomal, que é negativamente carregada, promovendo sua desestabilização e subsequente rompimento, liberando o mRNA no citoplasma (Hassett et al., 2019).

A partir desse momento, ocorrem dois processos interligados: no citoplasma, o mRNA é traduzido pelos ribossomos, levando à produção de proteínas antigênicas. Essas proteínas são processadas pelo proteassoma e apresentadas via MHC classe I, ativando linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Parte do antígeno também pode ser secretada ou processada por via endossomal e apresentada via MHC classe II, promovendo a ativação de células T CD4⁺ auxiliares, que, por sua vez, estimulam a produção de anticorpos por células B e a ativação de fagócitos como os macrófagos (Chaudhary; Weissman; Whitehead, 2021).

Simultaneamente, o processo de entrada das LNPs e a perturbação das membranas endossomais ativam sensores de estresse intracelulares. Os lipídios ionizáveis das LNPs desencadeiam a ativação do inflamassoma NLRP3, um complexo proteico presente no citosol de células imunes inatas que, quando ativado, leva à clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18, levando à liberação de IL-1 β e IL-18. A via do TLR4 também pode ser ativada nesse processo,

levando à produção local de TNF- α , IL-6 e IL-12 que promovem o recrutamento de mais células imunes e aumentam a apresentação de antígeno (Tahtinen et al., 2022).

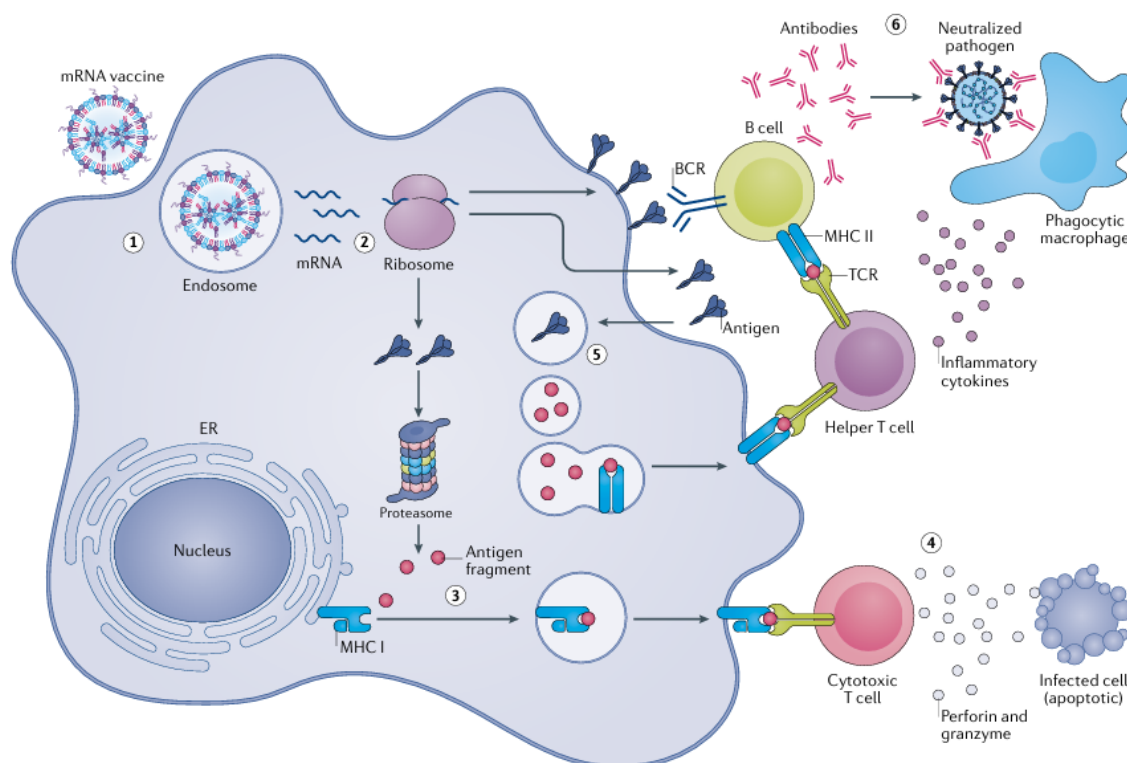


Figura 7 . Mecanismo de indução da resposta imune das vacinas de mRNA. (1) Após a injeção, o mRNA é internalizado pelas células por endocitose. (2) Uma vez liberado no citoplasma, o mRNA é traduzido pelos ribossomos, originando proteínas antigênicas. Essas proteínas podem ativar o sistema imune por diferentes vias. (3) Os antígenos produzidos no interior da célula são degradados em pequenos peptídeos pelo complexo do proteossoma e apresentados na superfície celular por moléculas do MHC de classe I, sinalizando para linfócitos T citotóxicos. (4) Esses linfócitos, quando ativados, eliminam as células-alvo por meio da liberação de perforina e granzima. (5) Além disso, antígenos secretados podem ser capturados por outras células, processados em endossomos e apresentados por moléculas do MHC de classe II para linfócitos T auxiliares. (6) Esses linfócitos T auxiliam na eliminação de patógenos circulantes, estimulando a produção de anticorpos neutralizantes por células B e ativando fagócitos, como os macrófagos, por meio da liberação de citocinas inflamatórias. Adaptado de Chaudhary et al., 2021.

1.6 Vacinas de mRNA para doenças infecciosas

Nos últimos anos, a plataforma de vacinas de mRNA tem sido usada no desenvolvimento de imunizantes contra doenças infecciosas, principalmente infecções virais como influenza (Hekele et al., 2013; Petsch et al., 2012), Zika (Pardi et al., 2017; Pattnaik;

Sahoo; Pattnaik, 2020) e Chikungunya (Ge et al., 2022), com algumas dessas candidatas já em estudos clínicos de fase III. Mais recentemente, esforços têm sido direcionados para o uso dessa tecnologia em doenças infecciosas negligenciadas causadas por parasitas intracelulares, como a malária e a doença de Chagas.

No caso da malária, candidatos vacinais baseados em mRNA que codificam os antígenos PfCSP (*Plasmodium falciparum*) e Pvs25 (*Plasmodium vivax*) demonstraram resultados promissores, promovendo proteção estéril em camundongos knockout e induzindo anticorpos que bloqueiam a transmissão do parasita (Kunkeaw et al., 2023; Mallory et al., 2021). Para a doença de Chagas, duas abordagens distintas com vacinas de mRNA também mostraram eficácia: uma estratégia de imunização heteróloga (mRNA/proteína) induziu uma resposta imune celular ampla e polifuncional, enquanto outra, com uma vacina terapêutica, resultou na redução da carga parasitária e da inflamação cardíaca em um modelo murino crônico (Duthie et al., 2018; Mancino et al., 2024; Versteeg et al., 2024).

Entretanto, no campo das leishmanioses, apenas um imunizante apresentou eficácia ao reduzir a carga parasitária de camundongos desafiados com *L. donovani* e previamente imunizados com uma vacina heteróloga combinando mRNA autorreplicativo e proteína, utilizando os antígenos F2/F3 (Duthie et al., 2018). Até o momento, nenhuma vacina de mRNA não-replicativo foi testada para leishmaniose.

Sabe-se que as vacinas de mRNA são reconhecidas por sua capacidade de induzir uma resposta imune celular robusta, com polarização Th1, levando à produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ , fundamentais para a ativação de macrófagos e destruição do parasita. Além disso, as vacinas de mRNA promovem a geração de células T e B de memória de longa duração, o que é fundamental para garantir proteção sustentada. Dessa forma, as vacinas de mRNA representam uma estratégia promissora para o combate à leishmaniose, superando as limitações de vacinas tradicionais e da imunidade adquirida apenas pela infecção natural.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes protocolos baseados em formulações de mRNA codificando o antígeno LinKAP de leishmania e compará-los à vacinação com a proteína recombinante LinKAP.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar os mRNAs LinKAP e secLinKAP, e analisar a expressão da proteína LinKAP após transfecção *in vitro*;
- Caracterizar a formulação vacinal de Nanopartículas Lipídicas (LNPs) contendo mRNA LinKAP e secLinKAP, e analisar a expressão da proteína LinKAP após transfecção *in vitro*;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolo homólogo de três doses de LNP mRNA LinKAP ou de proteína rLinKAP, bem como a proteção após desafio com *L.amazonensis*;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolo heterólogo de três doses associando LNP mRNA LinKAP e proteína rLinKAP, bem como a proteção após desafio com *L.amazonensis*;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolos de duas doses, empregando LNP mRNA LinKAP e a proteína rLinKAP, bem como a proteção após desafio com *L.amazonensis*;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular em camundongos BALB/c imunizados com protocolo homólogo de três doses de LNP mRNA LinKAP ou de proteína rLinKAP, bem como a proteção após desafio com *L.infantum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos plasmídeos codificantes

O plasmídeo pcDNA3.1LinKAP, contendo o gene que codifica a proteína LinKAP, a sequência Kozak, o gene de resistência à ampicilina, o promotor da T7 RNA polimerase, uma região 5'UTR e 3'UTR da α -globina humana e uma cauda poli(A) com 110 adeninas, foi sintetizado pela empresa GenScript Biotech (Piscataway, NJ, EUA). Um segundo plasmídeo, denominado pcDNA3.1secLinKAP, foi construído com a mesma arquitetura básica, diferenciando-se pelas UTRs, contendo a 5' UTR do *Tobacco etch virus* (TEV) e a 3' UTR da β -globina de *Xenopus*, além da adição na extremidade 5' do gene LinKAP, de uma sequência codificante para o peptídeo sinal do ativador do plasminogênio tecidual (tPA), com o objetivo de favorecer a secreção da proteína expressa. Cada um dos plasmídeos, pcDNA3.1LinKAP e pcDNA3.1secLinKAP, foi individualmente transformado em 100 μ L de bactérias competentes *E. coli* XL-1 Blue preparadas conforme protocolo de competência por cloreto de cálcio, como descrito por Sambrook et al. 1989. Os microtubos contendo as bactérias transformadas foram incubados no gelo por 30 minutos, seguidos de um choque térmico a 42 °C por 1 minuto e novo resfriamento por 2 minutos no gelo.

Em seguida, foram adicionados 400 μ L de meio LB (Lysogeny Broth – triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v)) e as suspensões bacterianas foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Após recuperação bacteriana, 60 μ L de cada cultura foram plaqueados em 25 mL de meio LB sólido (LB com ágar 1,5% (m/v)) contendo 25 μ L de ampicilina (100 mg/mL) e incubados a 37 °C por 16 horas. De cada placa, uma colônia foi selecionada e inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo 5 μ L de ampicilina (100 mg/mL), com incubação a 37 °C por mais 16 horas sob agitação. A extração plasmidial de cada cultura foi realizada utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha), e os plasmídeos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ OneC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Precedente à produção do mRNA, os plasmídeos pcDNA3.1LinKAP e pcDNA3.1secLinKAP foram digeridos com as enzimas de restrição NheI e XhoI, e NdeI e XhoI, respectivamente (Promega, Madison, EUA), para confirmação da identidade e integridade dos insertos. Para a síntese de mRNA, 50 μ g de cada plasmídeo foram linearizados com a enzima XhoI e posteriormente purificados do gel de agarose após

eletroforese, utilizando o kit Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). A concentração dos DNAs linearizados foi determinada por absorvância a 260 nm no NanoDrop® OneC e eles foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

3.2 Transcrição *in vitro* dos mRNAs

Os mRNAs foram sintetizados por transcrição *in vitro* utilizando o kit MEGAscript™ T7 Transcription (Thermo Fisher Scientific), a partir dos plasmídeos linearizados. Durante a reação de transcrição, o nucleotídeo uridina trifosfato (UTP) foi substituído pelo nucleosídeo modificado N1-metilpseudouridina (TriLink Biotechnologies, San Diego, EUA), e o capeamento dos mRNAs nascentes foi realizado de forma cotranscricional com a adição do análogo de trinucleotídeo cap1 CleanCap® AG (TriLink). A transcrição foi realizada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas, sob agitação a 2500 rpm. Após a transcrição, os mRNAs sintetizados foram incubados com $1\text{ }\mu\text{L}$ de DNase (fornecida no kit MEGAscript™ T7 Transcription) por 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, também sob rotação a 2500 rpm, para degradação do DNA molde. A precipitação dos mRNAs foi realizada pela adição de cloreto de lítio (LiCl), seguida de incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. As amostras foram então centrifugadas a $14.000 \times g$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e os sobrenadantes foram descartados. O pellet dos mRNAs foi lavado três vezes com etanol 75%, com centrifugações entre cada etapa. Ao final da purificação, o mRNA LinKAP e secLinKAP foram quantificados com o ensaio de RNA no Qubit™ Flex (Thermo Fisher Scientific) e tiveram sua integridade avaliada em gel de 1% de agarose. Os mRNAs purificados foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da encapsulação em nanopartículas lipídicas (LNPs).

3.3 Transfecção celular

As células HEK293T foram plaqueadas em placas de 6 poços para cultivo celular (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), na densidade de 7×10^5 células por poço, utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) livre de endotoxinas, vírus e micoplasma (Gibco), além de 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina e $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As células foram incubadas por 16 horas em estufa úmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 para permitir a adesão.

As transfecções foram realizadas separadamente para as sequências LinKAP e secLinKAP. Para as transfecções com mRNA, foram utilizados 3 µg de mRNA por poço (LinKAP ou secLinKAP), conforme as instruções do kit TransIT®-mRNA Transfection Kit (Mirus Bio, Madison, EUA). Como controles positivos, foram utilizados os plasmídeos pcDNA3.1LinKAP e pcDNA3.1secLinKAP, também transfectados separadamente, seguindo o protocolo do reagente Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific), com 3 µg de DNA por poço. Foi incluído também um controle negativo, composto por células submetidas ao mesmo protocolo de transfecção, porém sem adição de nenhum DNA ou RNA. Após as transfecções, a placa com células transfectadas foi mantida por 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂.

O sobrenadante das células HEK293T transfectadas com pcDNA3.1secLinKAP e com mRNA secLinKAP foi recolhido e armazenado a -20 °C até o uso. O sobrenadante das células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1LinKAP e com mRNA LinKAP foi removido por aspiração e a monocamada celular foi lavada e ressuspensa em 1 mL de PBS 1X. As células foram então transferidas para um microtubo cônico e centrifugadas a 1200 × g por 10 minutos a 4 °C (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão para garantir a completa remoção do meio de cultivo. Aos pellets celulares foram adicionados 40 µL de RIPA Buffer 1X (Thermo Fischer Scientific), seguidos de vortexação por 1 minuto e incubação no gelo por 10 minutos para promover a lise celular. As amostras foram centrifugadas a 14 000 × g por 10 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes, contendo os extratos celulares, foram transferidos para novos microtubos cônicos de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado tampão de amostra 4X, e as amostras foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos. As amostras preparadas foram armazenadas a -20 °C até o uso.

3.4 Western blot para avaliação da expressão da proteína LinKAP a partir de células transfectadas

As proteínas totais obtidas dos extratos celulares e 50 ng da proteína LinKAP recombinante foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o sistema IBlot 3 Western Blot Transfer (Thermo Fischer Scientific) para detecção por Western Blot. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó (m/v) diluído em TBS com

0,1% de Tween-20 (TBS-T) durante 1 hora sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T por 10 minutos sob agitação entre cada etapa. O anticorpo primário (soro de anticorpo de coelho gerado contra a proteína LinKAP recombinante) foi diluído em TBS-T na proporção de 1:5000 (anticorpo:diluyente). A incubação da membrana com o anticorpo primário ocorreu por 1 hora sob agitação. Após as lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho conjugado com HRP) diluído em TBS-T na proporção de 1:10000 (anticorpo:diluyente). A incubação da membrana com o anticorpo secundário ocorreu por 1 hora sob agitação. Ao final da incubação, a membrana foi novamente lavada três vezes com TBS-T durante 10 minutos sob agitação. Em seguida, a detecção por quimioluminescência foi feita adicionando 1 mL da solução de ECL Prime Western Blotting System (Cytiva, Marlborough, EUA) e a aquisição das imagens foi feita em fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

3.5 Ensaio de imunofluorescência

Células HeLa foram plaqueadas em *chambers slides* de oito poços (Thermo Fischer Scientific), na densidade 2×10^4 células por poço, utilizando meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) livre de endotoxinas, vírus e micoplasma (Gibco), além de 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina). As células foram incubadas por 16 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ para permitir a adesão. Após a adesão, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS por 10 minutos. Após nova lavagem, as células foram bloqueadas com solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% em PBS com 0,2% de Tween-20 (PBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente, com o objetivo de reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-LinKAP, diluído 1:1000 em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente. Como controle negativo, poços foram incubados sem o anticorpo primário. Após três lavagens com PBS-T, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, EUA), também diluído 1:1000 em solução de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após as lavagens finais, os núcleos celulares foram corados com 1 µg/mL de DAPI (49,6-diamidino-2-fenilindole) (Life

Technologies) por 5 minutos. Após novas lavagens com PBS-T, as lâminas foram montadas com o reagente ProLong Gold (Life Technologies) e cobertas por uma lamínula de vidro. As imagens foram adquiridas com objetiva 63 no Microscópio de Fluorescência invertido Zeiss Axio Observer.A1 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha) na Rede de Plataformas Tecnológicas do Instituto René Rachou da Fiocruz Minas.

3.6 Formulação de mRNAs em Nanopartículas Lipídicas

As LNPs usadas nesse trabalho apresentaram composição semelhante à descrita anteriormente (Fernandes et al., 2025). Mas brevemente, as LNPs foram formadas por quatro lipídios (lipídio catiônico ionizável, DSPC, colesterol e lipídio peguilado), na proporção 50:38,5:10:1,5, pelo método de nanoprecipitação. Os mRNAs LinKAP e secLinKAP foram encapsulados em LNPs utilizando um processo de automontagem, no qual uma solução aquosa de mRNA em tampão citrato pH 3,0 foi rapidamente misturada a uma solução contendo uma pré-mistura dos lipídios previamente dissolvidos em etanol. Essa mistura ocorreu em sistema microfluídico (Particle Works, Royston, Reino Unido) na proporção 1:3 (fase orgânica:fase aquosa), em uma velocidade de fluxo de 3,0 e 9,0 mL/minuto, respectivamente. Após a produção, as LNPs foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido), e a eficiência de encapsulação foi determinada por meio do kit RNA Quant-iT RiboGreen (ThermoFisher Scientific). As LNPs foram armazenadas de 4 a 8 °C por um dia antes de serem administradas em camundongos.

3.7 Análise de LNP contendo mRNA LinKAP por Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)

As LNPs contendo mRNA LinKAP foram concentradas e aplicadas diretamente em grades Quantifoil R1.2/1.3 de cobre com filme de carbono, previamente tratadas com plasma. Aproximadamente 3 µL da amostra foram depositados sobre a grade, seguidos pela remoção do excesso de líquido por blotting durante 3 segundos e pela vitrificação imediata em etano líquido, utilizando um sistema de plunge-freezing (Leica EM GP Automatic Plunge Freezing - Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) mantido a 4 °C e 100% de umidade. As imagens

foram adquiridas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI (Thermo Fisher Scientific) equipado com uma câmera direta. As imagens foram coletadas no modo de dose fracionada com uma dose total de $\sim 50 e^-/\text{\AA}^2$, a uma magnitude que corresponde a um pixel size de, aproximadamente, 1 Å. A variação de desfoco ocorreu entre -1,0 e -2,5 μm , para otimizar a função de contraste de transferência (CTF). O processamento dos dados, incluindo alinhamento de quadros, correção de movimento e estimação do contraste por função de transferência (CTF), foi realizado utilizando o software cryoSPARC. A qualidade estrutural das LNPs foi avaliada com base na morfologia, tamanho e integridade da nanopartícula, bem como na visibilidade da carga interna presumida como mRNA. O processamento e aquisição das amostras foi feito no Centro de Microscopia da UFMG.

3.8 Deglicosilação enzimática com PNGase F

Para a deglicosilação de proteínas sob condições desnaturantes, foi utilizado o protocolo com a enzima PNGase F (Promega). Inicialmente, 10 μg do extrato total de proteínas obtido no item 3.3 ou o controle, a proteína Spike produzida em célula eucariota (Arruda et al., 2023), foram diluídos em água em um volume final de 12 μL . Em seguida, foram adicionados 1 μL de SDS a 5% e 1 μL de DTT 1 M. As amostras foram então desnaturadas por aquecimento a 95 °C por 5 minutos, e posteriormente resfriadas à temperatura ambiente por mais 5 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 2 μL de tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,5) e 2 μL de Triton X-100 a 10%. Por fim, foram adicionados 2 μL da enzima PNGase F. As reações foram incubadas a 37 °C por 3 horas. A eficiência da deglicosilação foi avaliada por análise em SDS-PAGE para a proteína Spike e por Western Blot para o extrato total de proteínas, observando-se o deslocamento da banda correspondente à proteína deglicosilada.

3.9 Imunoprecipitação de LinKAP a partir do extrato de células transfectadas com mRNA LinKAP

A imunoprecipitação foi realizada conforme o protocolo do kit Dynabeads® Protein A (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, 200 μL de beads foram transferidos para um microtubo e colocados em uma rack magnética para separação das beads e remoção do sobrenadante. Em seguida, as beads foram lavadas com tampão de eluição (glicina 50 mM, pH

2,5) para eliminar possíveis contaminantes. Posteriormente, 100 µg do anticorpo anti-LinKAP, diluído em 1 mL de tampão de lavagem (PBS com 0,02% Tween®-20), foi adicionado às beads. A mistura foi incubada sob rotação a 4 °C por 1 hora. Após esse período, o tubo foi novamente colocado na rack magnética, o sobrenadante foi descartado e as beads foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lavagem. Essa lavagem foi repetida duas vezes nas mesmas condições. Em seguida, foi adicionada ao complexo beads-anticorpo a amostra contendo 100 µg de antígeno, diluída em 1 mL de tampão de lavagem. A mistura foi incubada sob rotação a 4 °C por 1 hora para permitir a ligação do antígeno. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e o complexo beads-anticorpo-antígeno foi lavado três vezes com 200 µL de tampão de lavagem, utilizando a rack magnética entre cada etapa e ressuspendendo por pipetagem suave. Após a última lavagem, o complexo foi ressuspendido em 200 µL de tampão de lavagem e transferido para um tubo limpo, a fim de evitar coeluição de proteínas aderidas às paredes do tubo original. Para a eluição da proteína LinKAP, o microtubo foi colocado na rack magnética para remoção da fração não ligada. Em seguida, foram adicionados 40 µL de tampão de eluição, com ressuspensão suave para evitar formação de espuma. A mistura foi incubada sob rotação por 15 minutos a 4 °C. Por fim, o microtubo foi colocado na rack magnética e o sobrenadante, contendo o anticorpo e o antígeno eluídos, foi transferido para um novo tubo. O eluato foi quantificado por ensaio de proteína utilizando o Qubit™ Flex (Thermo Fischer Scientific).

3.10 Análise de massa intacta por MALDI-TOF

A espectrometria de massas por dessecção/ionização a laser assistida por matriz acoplada ao analisador de tempo de voo (MALDI-TOF) foi realizada no modo linear positivo utilizando o equipamento MALDI-8020 (Shimadzu Corporation, Japão), equipado com um laser de estado sólido de 200 Hz, 355 nm. As frações imunoprecipitadas obtidas do extrato de células não transfectadas (mock), e do extrato de células transfectadas com mRNA LinKAP, bem como a proteína rLinKAP, foram co-cristalizadas com a matriz ácido sinápico (SA) na proporção 1:1 (v/v), em placas FlexiMass-SR48 (Shimadzu Corporation). O instrumento foi calibrado em massa utilizando dois picos com m/z 33.215,55 e 66.431,077 provenientes da albumina sérica bovina. Três espectros de massa foram adquiridos na faixa de m/z 10.000–30.000, com supressão de íons inferior a m/z 9.000. Os resultados foram analisados utilizando o software MALDI Solutions Data Acquisition (Shimadzu Corporation).

3.11 Animais de experimentação

Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no Biotex (Bio-Experimentação) do IRR da Fiocruz Minas. Foram utilizados camundongos com idade entre 6 e 8 semanas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as boas práticas para uso de animais em pesquisa e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (protocolo CEUA-Fiocruz LW03/21).

3.12 Protocolos de imunização

3.12.1 Imunização homóloga com três doses

Camundongos C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, foram randomicamente distribuídos em grupos de 11 animais e submetidos a um protocolo de imunização homólogo, detalhado na Tabela 1. Brevemente, os animais foram imunizados por via intramuscular no coxim plantar da pata traseira com 10 µg da formulação de LNP mRNA LinKAP ou LNP mRNA secLinKAP, ou por via subcutânea na região dorsal com 10 µg da proteína rLinKAP associada a 50 µg do adjuvante Poly ICLC (Hiltonol®), uma forma estabilizada de ácido poliinosínico-policitidílico (poly I:C) complexada com carboximetilcelulose e polilisina (Oncovir, Inc., Washington, DC, EUA).

Os grupos controles foram imunizados por via intramuscular com 50 µL de PBS 1X estéril ou com 100 µL de formulação de LNP vazia, conforme o grupo. Todas as imunizações seguiram um esquema de três doses, com intervalo de 21 dias entre as aplicações. Amostras de sangue foram coletadas entre os intervalos de imunização para separação do soro, que foi armazenado a -20 °C até a análise da produção de anticorpos.

Trinta dias após a última imunização, quatro camundongos de cada grupo foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com Xilazina (50 mg/kg) e Ketamina (500 mg/kg), e tiveram seus baços coletados de forma asséptica para avaliação da resposta imune celular, conforme descrito adiante. Os seis camundongos restantes de cada grupo foram

desafiados com *Leishmania amazonensis*, de acordo com os protocolos descritos posteriormente.

Tabela 1. Grupos experimentais e cronograma de imunização homóloga com 3 doses.

Grupo	Prime	Boost	2º boost	Nº de animais
1	PBS	PBS	PBS	11
2	LNP vazia	LNP vazia	LNP vazia	11
3	LNP mRNA LinKAP	LNP mRNA LinKAP	LNP mRNA LinKAP	11
4	LNP mRNA secLinKAP	LNP mRNA secLinKAP	LNP mRNA secLinKAP	11
5	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	11

3.12.2 Imunização heteróloga com três doses

Camundongos C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, foram randomicamente distribuídos em grupos de 10 animais e submetidos a um protocolo heterólogo combinando as imunizações com a formulação de LNP mRNA LinKAP e a proteína rLinKAP, detalhadas na Tabela 2. Para essa estratégia de vacinação, foi mantido o cronograma de três imunizações com intervalos de 21 dias entre as aplicações, bem como as vias de administração e as quantidades injetadas de cada formulação, conforme descrito anteriormente. Trinta dias após a última dose, quatro camundongos por grupo foram eutanasiados para coleta asséptica dos baços e análise da resposta imune celular. Os demais foram desafiados com *Leishmania amazonensis*, conforme protocolos descritos a seguir.

Tabela 2. Grupos experimentais e cronograma de imunização heteróloga com 3 doses.

Grupo	Prime	Boost	2º boost	Nº de animais
1	PBS	PBS	PBS	10
2	LNP vazia	LNP vazia	LNP vazia	10
3	LNP mRNA LinKAP	LNP mRNA LinKAP	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	10

4	LNP mRNA LinKAP	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	10
5	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	10

3.12.3 Protocolo de imunização com duas doses

Camundongos C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, foram randomicamente distribuídos em grupos de 10 animais e submetidos a um protocolo de imunização composto por duas doses, com o objetivo de avaliar uma estratégia heteróloga combinando a formulação de LNP mRNA LinKAP e a proteína rLinKAP; e uma estratégia homóloga com duas doses da formulação LNP mRNA, como descrito na Tabela 3. O intervalo entre as aplicações foi de 21 dias, e as vias de administração e quantidades injetadas seguiram o mesmo padrão previamente descrito. Trinta dias após a última imunização, quatro camundongos por grupo foram eutanasiados para coleta asséptica dos baços e análise da resposta imune celular. Os demais foram desafiados com *Leishmania amazonensis*.

Tabela 3. Grupos experimentais e cronograma de imunização heteróloga com 2 doses.

Grupo	Prime	Boost	Nº de animais
1	PBS	PBS	10
2	LNP mRNA LinKAP	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	10
3	LNP mRNA LinKAP	LNP mRNA LinKAP	10

3.12.4 Protocolo de imunização homólogo com 3 doses em camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, foram randomicamente distribuídos em grupos de 10 animais e submetidos a um protocolo de imunização homólogo, detalhado na Tabela 4. Os animais foram imunizados por via intramuscular no coxim plantar

da pata traseira com 10 µg da formulação de LNP mRNA LinKAP ou por via subcutânea na região dorsal com 10 µg da proteína rLinKAP associada a 50 µg do adjuvante Poly ICLC (Hiltonol®) (Oncovir, Inc.).

Os grupos controles foram imunizados por via intramuscular com 50 µL de PBS 1X estéril ou com 100 µL de formulação de LNP vazia, conforme o grupo. Todas as imunizações seguiram um esquema de três doses, com intervalo de 21 dias entre as aplicações. Amostras de sangue foram coletadas entre os intervalos de imunização para separação do soro, que foi armazenado a -20 °C até a análise da produção de anticorpos.

Trinta dias após a última dose, quatro camundongos por grupo foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. Em seguida, os baços foram retirados de maneira asséptica para posterior análise da resposta imune celular. Os demais animais (n = 6 por grupo) foram submetidos ao desafio com *Leishmania infantum*.

Tabela 4. Grupos experimentais e cronograma de imunização homóloga com 3 doses em BALB/c.

Grupo	Prime	Boost	2º boost	Nº de animais
1	PBS	PBS	PBS	10
2	LNP vazia	LNP vazia	LNP vazia	10
3	LNP mRNA LinKAP	LNP mRNA LinKAP	LNP mRNA LinKAP	10
4	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	Proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol)	10

3.13 Ensaio imunoenzimáticos

O ensaio imunoenzimático (ELISA) de diluição final foi realizado para determinar os títulos de anticorpos específicos contra a proteína LinKAP após a vacinação. Placas de 96 poços para ELISA (Sarstedt) foram sensibilizadas com 100 ng/poço de rLinKAP, diluída em solução de sensibilização (Carbonato de sódio ($\geq 99,5\%$, granular) 105,99 mM; bicarbonato de sódio 84,01 mM; pH $9,5 \pm 0,3$), e incubadas a 37 °C por 16 horas. Após o descarte do conteúdo, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de solução de bloqueio (sacarose 10% p/v; cloreto de sódio 150 mM; albumina bovina 1% p/v; pH $7,4 \pm 0,3$), por 2 horas a 37 °C.

O soro dos camundongos imunizados foi submetido a diluições seriadas com fator 5, iniciando em 1:100 e finalizando em 1:625.000, seguido de incubação a 37 °C por 1 hora em

placas previamente sensibilizadas e bloqueadas. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem (fosfato de sódio dibásico 10 mM; fosfato de potássio monobásico 1,8 mM; cloreto de sódio 150 mM; cloreto de potássio 2,8 mM; Proclin 0,1% v/v; Tween 20 1% v/v; pH $7,4 \pm 0,3$).

Foi então adicionado o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, específico para o isotipo de interesse (IgG total, IgG1, IgG2a ou IgG2c), e incubado por mais 1 hora a 37 °C. Após nova lavagem, adicionou-se o substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 0,5 M e a absorbância foi lida em 450 nm utilizando multimodal Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific). O resultado foi expresso como a absorbância obtida para cada amostra na diluição 1:100.

3.14 Preparo de esplenócitos e reestimulação *in vitro*

O baço dos animais foi coletado assepticamente 30 dias após a última imunização. Cada baço foi macerado com o auxílio do êmbolo de uma seringa, lavado com 5 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) (Gibco), filtrado em *cell strainer* de 100 µm e centrifugado a 450 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet celular foi ressuspensionado em 900 µL de água Milli-Q estéril para lise das hemácias. Após 10 segundos, a lise foi interrompida com a adição de 100 µL de PBS 10X, seguida de nova centrifugação nas mesmas condições. O pellet foi então ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI 1640 completo e novamente filtrado em *cell strainer*. Uma alíquota da suspensão foi diluída na proporção 1:100 e corada com azul de tripan para avaliação da viabilidade celular em contador automático Countess 3 FL (Thermo Fisher Scientific). A partir dessa contagem, foram preparadas suspensões celulares com concentração ajustada para 1×10^7 células/mL.

Para os ensaios de ELISA ou Cytometric Bead Array (CBA), foram plaqueados 100 µL da suspensão contendo 1×10^7 células/mL (ou seja, 1×10^6 células por poço) em placas de 96 poços de fundo em U para cultivo celular (Sarstedt). As células foram estimuladas com 10 µg/mL de proteína rLinKAP ou com 10 µg/mL de Concanavalina A (controle positivo) e incubadas por 72 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes foram coletados para posterior análise.

3.15 ELISA de citocinas

Esse protocolo foi aplicado para a detecção de IFN- γ e IL-10, utilizando os kits Mouse IFN- γ DuoSet ELISA e Mouse IL-10 DuoSet ELISA, respectivamente. A placa de 96 poços foi sensibilizada com 50 μ L por poço do anticorpo de captura diluído em PBS 1X e incubada à temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, os poços foram aspirados e lavados três vezes com 400 μ L de tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS 1X, pH 7.2 - 7.4). Em seguida, os poços foram bloqueados com 300 μ L de tampão de bloqueio (1% BSA em PBS 1X, pH 7.2 - 7.4) por poço e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, foram adicionados 50 μ L de amostras ou padrões, previamente diluídos em diluente (0,1% BSA, 0,05% Tween 20 em TBS 1X, pH 7.2 - 7.4), com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram novamente lavados e adicionou 50 μ L do anticorpo de detecção, previamente diluído no diluente reagente. A placa foi incubada por mais 2 horas à temperatura ambiente, seguida de nova lavagem. Em seguida, adicionaram-se 50 μ L da solução de estreptavidina-HRP a cada poço, com incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após mais uma etapa de lavagem, adicionaram-se 50 μ L da solução de substrato, com nova incubação de 20 minutos sob as mesmas condições. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de solução de parada por poço. A leitura da densidade óptica foi realizada imediatamente a 450 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL), com base na interpolação dos valores de densidade óptica das amostras em relação à curva padrão construída com concentrações conhecidas de cada citocina.

3.16 Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes provenientes da cultura de esplenócitos foram utilizados para quantificar as citocinas produzidas após estímulo com a proteína rLinKAP. Foi usado o BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Jose, EUA), conforme as instruções do fabricante. Inicialmente, as Capture Beads específicas para as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF foram homogeneizadas por inversão suave e brevemente vortexadas. Para o preparo do mix, foi retirada uma alíquota de 10 μ L de cada tipo de bead por amostra a ser analisada. A mistura foi então homogeneizada em vórtex e 50 μ L da suspensão

foi adicionada aos poços de uma placa de fundo U. Para a curva padrão, 50 µL das diluições seriadas do padrão de citocinas foram adicionados aos poços controle, de acordo com as concentrações listadas: 0 (controle negativo, apenas diluente), 20, 40, 80, 156, 312,5, 625, 1.250, 2.500 e 5.000 pg/mL, correspondendo às diluições de 1:256 a 1:2, sendo 5.000 pg/mL a concentração do padrão máximo. Em seguida, 50 µL dos sobrenadantes da cultura de esplenócitos do tópico 3.10 foram adicionados aos poços correspondentes. Posteriormente, 50 µL do reagente de detecção PE (Mouse Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent) foram adicionados a todos os poços. As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de tampão de lavagem a cada poço, seguido de centrifugação a 500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado, e os pellets foram ressuspensos em 200 µL de tampão de lavagem. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSVersE™ (BD Biosciences) pertencente à Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz (Instituto René Rachou) e as análises foram feitas utilizando o FCAP Array Software 3.0 (BD Biosciences).

3.17 Parasitos

Um estoque de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* PH8 e *Leishmania infantum* PP75 foi mantido em nitrogênio líquido. Para os experimentos de desafio, os parasitos foram descongelados em Meio Schneider Insect (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich), e incubados em estufa tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 26 °C até que recuperassem a viabilidade e retomassem o crescimento. Após a recuperação inicial, os parasitos foram repicados, e a cultura foi mantida por cinco dias para permitir o crescimento antes de ser utilizada nos ensaios de infecção.

3.18 Desafio de animais

No desafio com *L. amazonensis*, 30 dias após a última imunização, camundongos C57BL/6 foram inoculados, na almofada plantar da pata traseira esquerda, com 5×10^5 promastigotas metacíclicas. Já para o desafio com *L. infantum*, 30 dias após a última

imunização, camundongos BALB/c foram inoculados de forma intraperitoneal com 1×10^7 promastigotas metacíclicas.

3.19 Medida do tamanho da lesão

Para avaliar o desenvolvimento das lesões nos camundongos C57BL/6 desafiados com *Leishmania amazonensis*, foi realizada semanalmente a medição da diferença de espessura entre as almofadas plantares infectadas e não infectadas, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Kanagawa, Japão).

3.20 Avaliação da carga parasitária através de Diluição limitante

A carga parasitária dos animais imunizados e desafiados foi avaliada por meio do ensaio de Diluição Limitante, conforme descrito por Lima et al. 1997. Ao final de nove semanas de infecção com *Leishmania amazonensis*, os camundongos C57BL/6 foram eutanasiados, e as lesões nas patas foram removidas com auxílio de tesoura e lâminas de bisturi. Cada pata foi colocada separadamente em microtubos contendo meio Schneider e beads magnéticas, sendo, em seguida, submetida à maceração no equipamento TissueLyser LT (Qiagen). Nos animais BALB/c desafiados com *L. infantum*, a eutanásia foi realizada ao final de 60 dias de infecção, com remoção do fígado e baço. Os órgãos foram individualmente macerados com o auxílio do êmbolo de uma seringa.

Após a maceração, tanto os tecidos das patas quanto os órgãos foram filtrados em *cell strainer* de 20 μm . Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 150 x g por 10 minutos a 4 °C, e os parasitas foram concentrados por centrifugação subsequente a 2000 x g. Os pellets foram ressuspensos em 400 μL de meio Schneider Insect suplementado com 10% de SFB. Em uma placa de 96 poços de fundo reto para cultivo celular (Sarstedt), foram adicionados 180 μL de meio Schneider por poço. Aos poços da primeira coluna, foram acrescentados 20 μL do material macerado (patas ou órgãos) de cada animal. As amostras foram então submetidas a diluições seriadas logarítmicas, de 10^{-1} a 10^{-12} , sendo plaqueadas em duplicata. As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D a 26 °C e analisadas por microscopia após 7 dias para *L. amazonensis* ou 14 dias para *L. infantum*. Os resultados foram

expressos como o logaritmo negativo do título, ou seja, a maior diluição na qual ainda se observou a presença de parasitas, ajustado por miligrama de tecido.

3.21 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8.0.2. (GraphPad Software, San Diego, EUA). Verificou-se, através do teste de D'Agostino-Pearson, se a distribuição era paramétrica ou não. Para os dados que apresentaram distribuição normal, aplicou-se o teste t de Student ou One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos, como o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn como pós-teste. Os resultados foram expressos como mediana com intervalo interquartil, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Construção dos plasmídeos e síntese *in vitro* dos mRNAs LinKAP e secLinKAP

Os plasmídeos codificantes para o mRNA LinKAP e mRNA secLinKAP foram sintetizados comercialmente pela empresa GenScript. A sequência de aminoácidos da proteína recombinante LinKAP foi convertida em sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em células humanas e inserida no vetor pcDNA3.1, sob controle do promotor citomegalovírus (CMV). Para o plasmídeo pcDNA3.1LinKAP, a inserção foi realizada entre os sítios de restrição das enzimas NheI e XhoI. No caso do plasmídeo pcDNA3.1secLinKAP, à região N-terminal da sequência da proteína recombinante LinKAP foi adicionada uma sequência codificadora de peptídeo sinal derivada do ativador do plasminogênio tecidual (tPA). A inserção dessa sequência também foi feita entre os sítios de clonagem das enzimas NheI e XhoI.

Para que esses plasmídeos pudessem ser utilizados como molde em reações de transcrição *in vitro*, seus desenhos incluíram todos os elementos necessários à produção de um mRNA funcional. A construção final do pcDNA3.1LinKAP apresenta as seguintes sequências: o promotor da T7 RNA polimerase, responsável por iniciar a transcrição *in vitro*; uma região 5' UTR derivada do gene da α -globina humana; a sequência consenso de Kozak, que favorece o reconhecimento do códon de início pelo ribossomo; o códon de início (ATG), seguido pela sequência codificadora da proteína LinKAP; a 3' UTR, também da α -globina humana, importante para a estabilidade e tradução do mRNA; e uma cauda poliadenilada de 110 nucleotídeos (poliA), essencial para a estabilidade do transcrito e para a eficiência da tradução em células eucarióticas. Para o pcDNA3.1secLinKAP, a construção apresenta as seguintes sequências: promotor da T7 RNA polimerase, região 5' UTR derivada de *Tobacco etch virus* (TEV), a sequência consenso de Kozak, o códon ATG seguido do peptídeo sinal e da sequência codificadora de LinKAP, uma região 3' UTR da β -globina de *Xenopus* e a cauda poliA.

Os plasmídeos foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue. A partir das colônias transformadas, foi preparado um estoque de glicerol, que posteriormente foi utilizado para a propagação em meio seletivo com antibiótico, visando à obtenção de uma maior quantidade de DNA plasmidial para os experimentos subsequentes. Após extração plasmidial, o plasmídeo pcDNA3.1LinKAP foi digerido com as enzimas NheI e XhoI para confirmação da presença e identidade do inserto. A análise por eletroforese em gel

de agarose revelou dois fragmentos com os tamanhos esperados: um fragmento de aproximadamente 5,3 kb, correspondente ao vetor plasmidial, e um fragmento de 891 pb, correspondente ao inserto LinKAP (Figura 8a). Em seguida, o plasmídeo foi linearizado com a enzima XhoI e o fragmento resultante foi purificado diretamente do gel de agarose. A análise da linearização por novo gel de agarose confirmou a presença de um único fragmento, compatível com o plasmídeo linearizado (Figura 8b).

O plasmídeo pcDNA3.1secLinKAP foi digerido com as enzimas NdeI e XhoI para confirmação da presença e identidade do inserto. A análise do produto digerido em gel de agarose revelou dois fragmentos distintos: um de aproximadamente 4,9 kb, representando o vetor, e outro de cerca de 1,4 kb, referente ao inserto secLinKAP (Figura 8c). Na sequência, o plasmídeo foi linearizado com XhoI, e o fragmento linearizado foi purificado a partir do gel. A integridade e linearização completa do plasmídeo foram verificadas por eletroforese, que evidenciou um único fragmento com o tamanho esperado (Figura 8d).

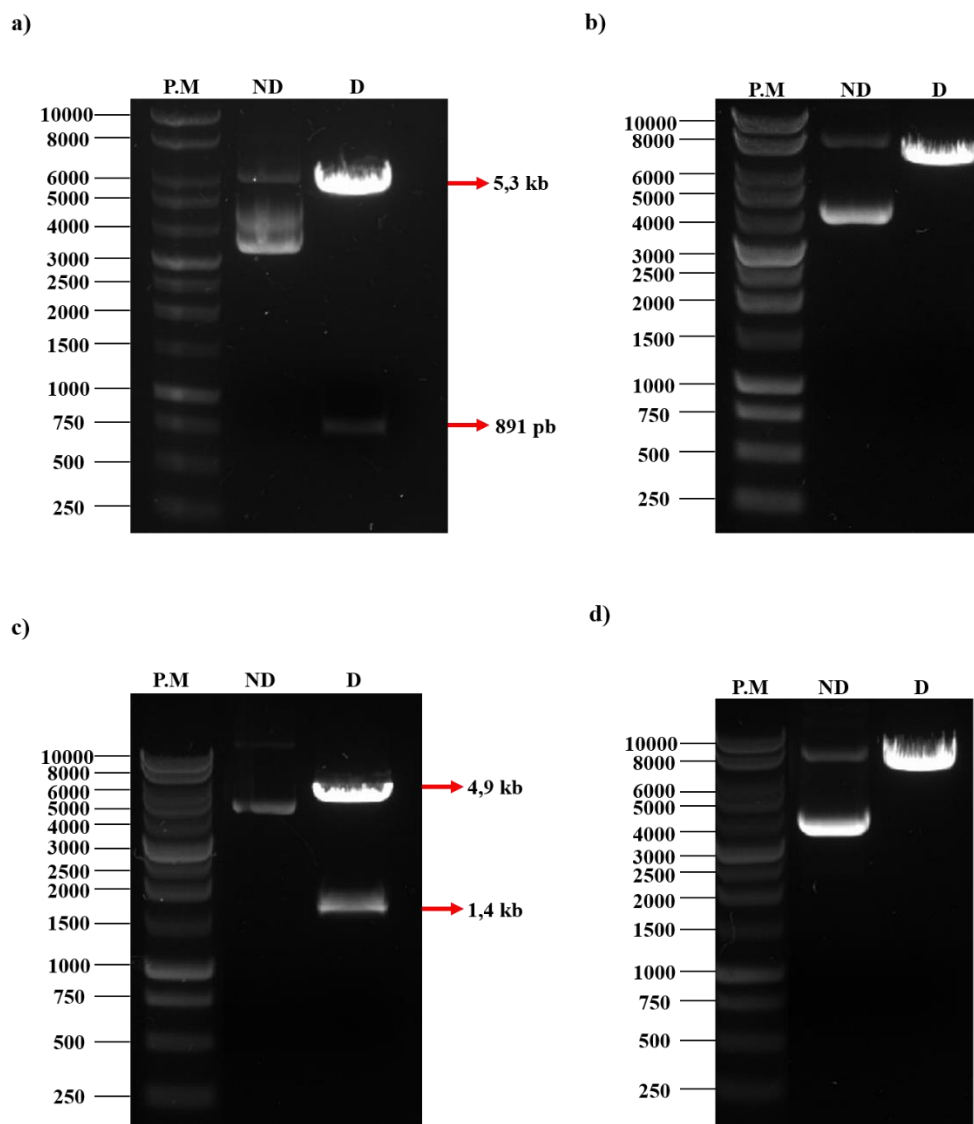


Figura 8. Confirmação da identidade e linearização dos plasmídeos para transcrição *in vitro*. Após extração plasmidial, os plasmídeos pcDNA3.1LinKAP e pcDNA3.1secLinKAP foram digeridos para confirmação da presença do inserto e posteriormente linearizados para a reação de transcrição *in vitro*. (a) O plasmídeo pcDNA3.1LinKAP foi digerido com as enzimas NheI e XhoI para confirmação da identidade. (b) Em seguida, foi linearizado com a enzima XhoI, purificado e analisado em gel de agarose a 0,7%, corado com SYBR Safe. (c) O plasmídeo pcDNA3.1secLinKAP foi digerido com as enzimas NdeI e XhoI para confirmação da identidade. (d) Em seguida, foi linearizado com XhoI, purificado e analisado em gel de agarose a 0,7%, corado com SYBR Safe.

A transcrição *in vitro* dos mRNAs LinKAP e secLinKAP foi realizada utilizando nucleotídeos modificados, com substituição da uridina por N1-metilpseudouridina, e com adição cotranscricional do cap 5'. A integridade e o tamanho dos mRNAs obtidos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. Conforme observado na Figura 9, as amostras

apresentaram bandas íntegras, compatíveis com o tamanho esperado para os transcritos, que é de 909 pb para mRNA LinKAP e de 1106 pb para mRNA secLinKAP.

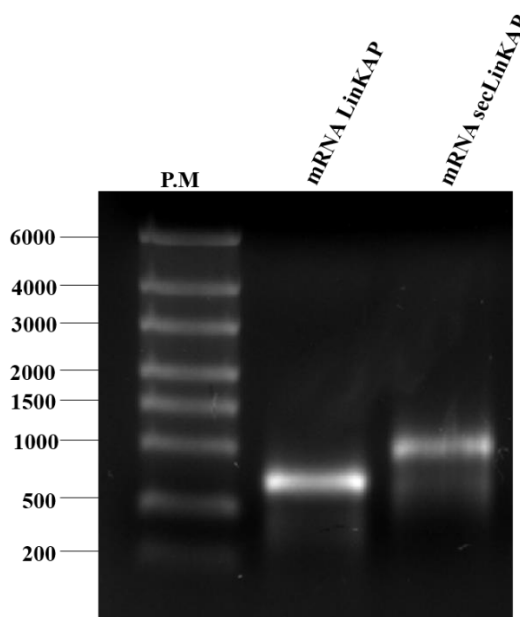


Figura 9. Síntese dos mRNAs. Eletroforese em gel de agarose a 1% demonstrando os produtos da transcrição *in vitro* dos mRNAs LinKAP e secLinKAP. Os mRNAs sintetizados foram purificados, quantificados e analisados quanto à integridade por migração eletroforética. O gel foi corado com brometo de etídio.

4.2 Avaliação da capacidade de tradução dos mRNAs em células de mamíferos *in vitro*

Para avaliar a capacidade de expressão da proteína LinKAP em células de mamífero, células HEK293T (derivadas de rim embrionário humano) foram transfectadas com mRNA LinKAP ou mRNA secLinKAP utilizando um reagente de transfecção. A expressão da proteína foi analisada por Western blot. Como controle positivo foram utilizadas células transfectadas com os plasmídeos que serviram de molde para a síntese dos mRNAs e a proteína recombinante LinKAP. Como controle negativo, foram utilizadas células incubadas apenas com o reagente de transfecção, sem mRNA.

Como mostra a Figura 10, as células transfectadas com mRNA LinKAP e secLinKAP expressaram a proteína LinKAP, detectada por meio de um sinal específico com peso molecular de aproximadamente 40 e 30 kDa, respectivamente. Esse peso molecular é ligeiramente

superior ao da proteína recombinante rLinKAP, o que pode indicar a ocorrência de modificações pós-traducionais ou diferenças no processamento da proteína expressa em células eucarióticas.

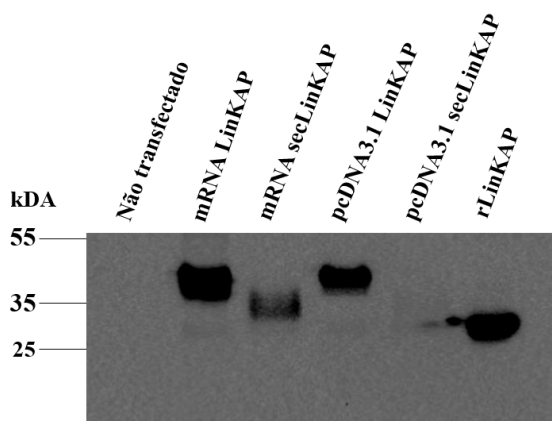


Figura 10. Análise da expressão de LinKAP por Western blot em células HEK293T transfectadas com mRNA LinKAP ou secLinKAP utilizando um agente de transfecção. Células HEK293T foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 7×10^5 células/poço e transfectadas com os plasmídeos que serviram de molde e com os mRNAs. Foi incluído também um controle de células não transfectadas. Após 24 horas, as células foram lisadas com tampão RIPA, e os extratos celulares analisados por Western blot utilizando anticorpo anti-LinKAP. A proteína rLinKAP foi utilizada como controle positivo.

Para confirmar a expressão da proteína LinKAP em células transfectadas com o mRNA LinKAP por outro método além do Western Blot, foi feita uma imunofluorescência. A Figura 11 mostra que a expressão da proteína LinKAP é induzida em células HeLa após a transfecção com mRNA correspondente. Nas células que não foram transfectadas, não há detecção de sinal verde, indicando ausência da proteína LinKAP. Em contraste, nas células transfectadas observa-se um sinal verde no citoplasma, correspondente à proteína LinKAP. Esses dados confirmam que o mRNA usado na transfecção é funcional e capaz de promover a expressão detectável da proteína alvo.

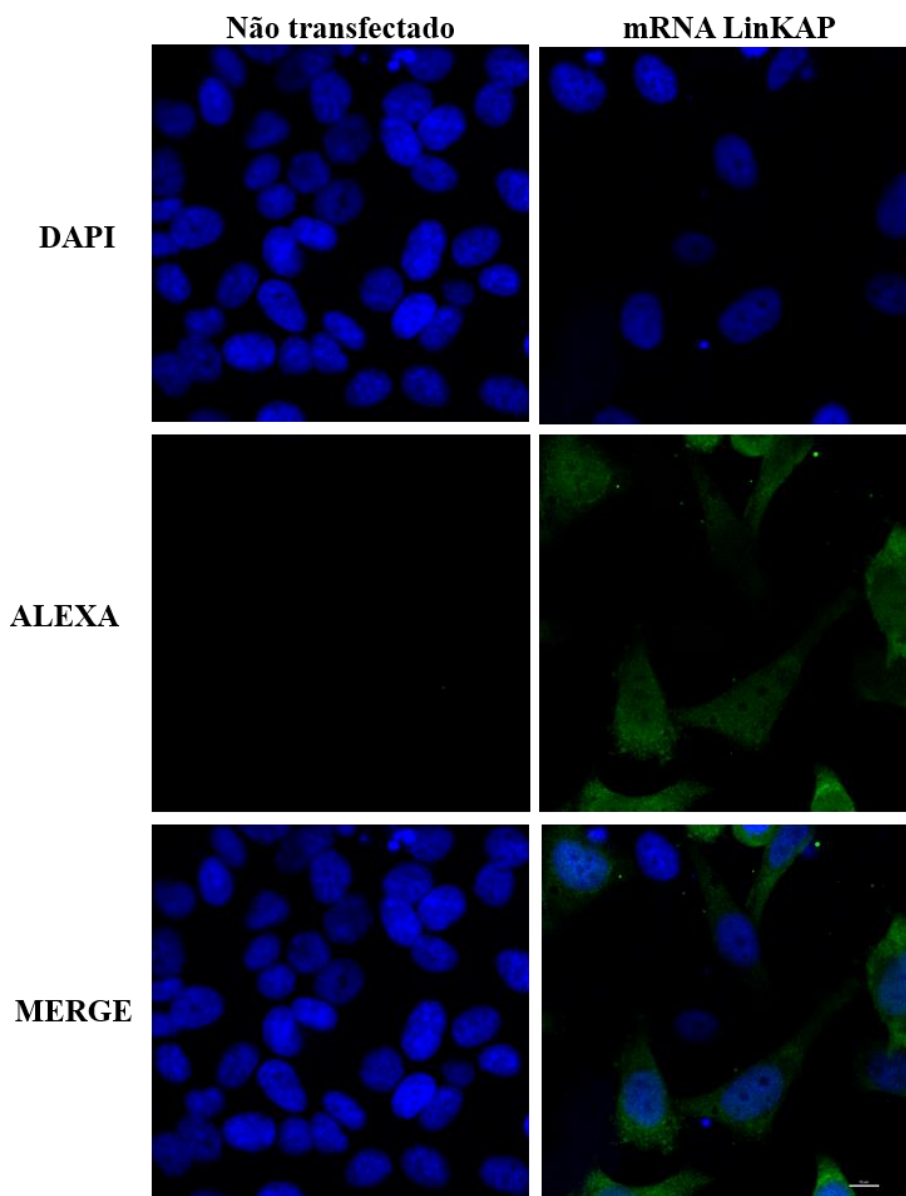


Figura 11. Expressão de LinKAP em células HeLa transfectadas com mRNA LinKAP. Células HeLa foram transfectadas com mRNA LinKAP (coluna da direita) ou, como controle, não foram transfectadas (coluna da esquerda). A proteína LinKAP foi detectada por imunofluorescência usando anticorpo anti-LinKAP (verde). Núcleos foram corados com DAPI (azul). A expressão de LinKAP é observada apenas nas células transfectadas, com padrão de distribuição citoplasmática. As imagens foram adquiridas com objetiva de 100x ao microscópio.

4.3 Produção e caracterização físico-química e estrutural de LNPs com mRNAs LinKAP e secLinKAP

Para que o mRNA não seja degradado por nucleases e seja entregue de forma eficiente dentro da célula, ele deve ser formulado em veículos de entrega. Assim, os mRNAs LinKAP e secLinKAP foram encapsulados em nanopartículas lipídicas (LNPs) desenvolvidas e caracterizadas no CT Vacinas. As LNPs formuladas foram caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas, incluindo tamanho médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta. Para sistemas eficientes de entrega de mRNA, espera-se que as LNPs apresentem tamanho médio entre 80 e 120 nm, um índice de polidispersão próximo a 1,0, indicando homogeneidade da população, e potencial zeta com valores negativos de voltagem (mV), o que confere estabilidade coloidal às partículas. Além da caracterização físico-química, foi quantificada a eficiência de encapsulação do mRNA LinKAP nas LNPs. Conforme apresentado na Tabela 5, as formulações obtidas apresentaram parâmetros físico-químicos dentro dos valores esperados para nanopartículas lipídicas destinadas à entrega de mRNA, apresentando uma taxa de encapsulação elevada, com mais de 80% do mRNA incorporado nas nanopartículas.

A caracterização físico-química por espalhamento dinâmico de luz (DLS) evidenciou que as LNPs formuladas apresentaram distribuição de tamanho homogênea, com diâmetro médio dentro da faixa esperada e baixo índice de polidispersão, confirmando a uniformidade da população de partículas (Figura 12a-b). A análise morfológica por cryo-TEM revelou que as LNPs vazias (sem mRNA), utilizadas como controle, apresentavam formato esférico com superfície lisa e estrutura interna homogênea, porém com densidade eletrônica interna reduzida (Figura 12c). Já as nanopartículas lipídicas contendo mRNA LinKAP exibiam estrutura esférica bem definida, com tamanho aproximado de 100 nm, corroborando os dados obtidos por DLS. Observamos uma fina camada ao redor de uma região central menos densa, sugerindo a presença de uma bicamada lipídica. Núcleos com alta densidade eletrônica e com pequenas bolhas indicam que o mRNA está encapsulado no interior das partículas (Figura 12d).

Tabela 5. Propriedades físico-químicas das LNPs mRNA LinKAP e secLinKAP.

Propriedades	mRNA LinKAP	mRNA secLinKAP
Tamanho (nm)	93,05	92,94
IP	0,125	0,158
Potencial zeta (mV)	-4,15	-4,352
E.E (%)	84,11	91,80

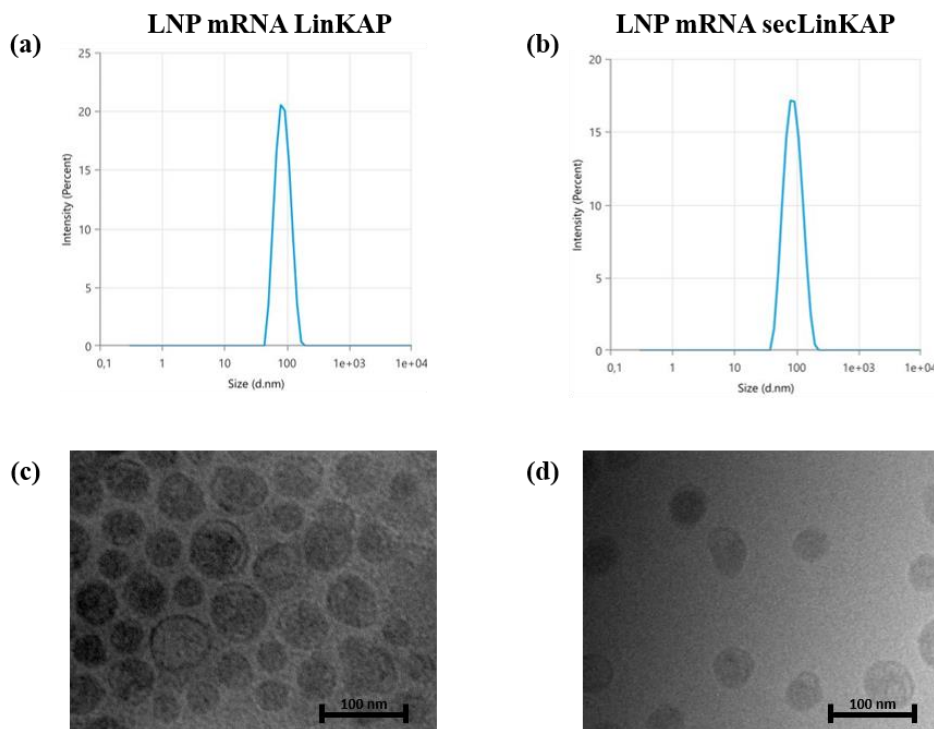


Figura 12. Caracterização físico-química e morfológica das LNPs formuladas. (a) Análise de dispersão de luz dinâmica (DLS) das LNPs mRNA LinKAP e (b) LNPs mRNA secLinKAP indicando um diâmetro médio de, aproximadamente, 100 nm. (c) Micrografia obtida por microscopia crioeletrônica de transmissão (cryo-TEM) de LNPs vazias (sem mRNA), mostrando morfologia esférica e densidade interna reduzida. (d) Imagem por cryo-TEM de LNPs contendo mRNA LinKAP, com estrutura esférica, superfície lisa e presença de um núcleo denso com cavidades internas, compatível com a encapsulação do mRNA. Barra de escala: 100 nm.

4.4 Expressão de LinKAP em células transfectadas com LNPs contendo mRNA

LinKAP

Para avaliar se células de mamífero eram capazes de expressar a proteína LinKAP a partir da formulação, células HEK293T foram transfectadas com a LNP mRNA LinKAP e, após 48 horas o extrato celular foi preparado para análise por Western Blot. Como controle positivo, a proteína recombinante rLinKAP foi utilizada. Os controles negativos incluíram células transfectadas com o mRNA LinKAP naked sem nenhum agente transfectante e células incubadas apenas com meio de cultivo, na ausência de mRNA.

Como mostra a Figura 13, as células transfectadas com o mRNA LinKAP encapsulado em LNPs expressaram a proteína, que foi detectada pelo anticorpo anti-LinKAP. Observamos uma banda específica com peso molecular aproximado de 40 kDa, ligeiramente superior ao da

proteína recombinante rLinKAP, sugerindo possíveis modificações pós-traducionais ou diferenças no processamento da proteína expressa em células de eucarioto. Observamos também a expressão de β -actina nas amostras correspondentes aos extratos celulares, comprovando a uniformidade na quantidade de proteína carregada em cada canaleta do gel. Esse controle de *loading* confirma que as variações na intensidade dos sinais das proteínas de interesse são resultado de diferenças reais na expressão e não de discrepâncias no carregamento das amostras.

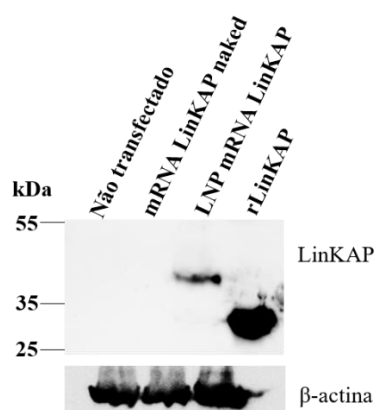


Figura 13. Análise da expressão de LinKAP por western blot em células HEK293T transfectadas com LNP mRNA LinKAP. Células HEK293T foram plaqueadas em placa de 6 poços na concentração de 7×10^5 células /poço e transfectadas com LNP mRNA LinKAP ou com os controles (mRNA LinKAP naked ou meio). 48 horas após a transfecção, as células foram coletadas e lisadas com RIPA. Os extratos celulares foram analisados por western blot utilizando anticorpo anti-LinKAP. A proteína rLinKAP foi incluída como controle positivo. A β -actina foi utilizada como controle de *loading*.

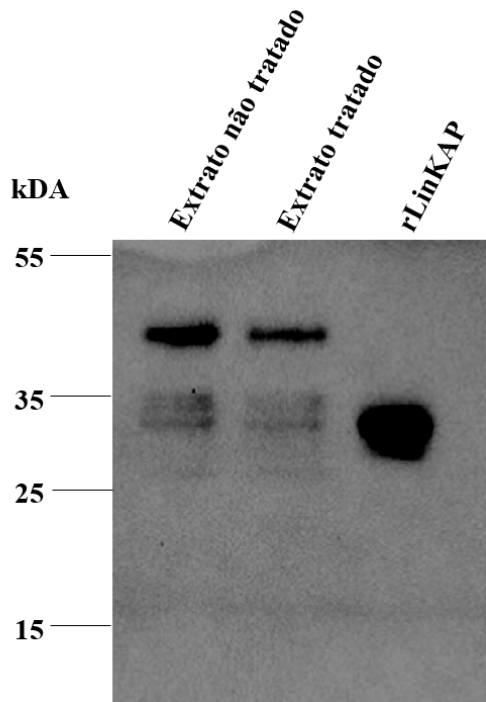
4.5 Avaliação de modificações pós traducionais da proteína LinKAP expressa em célula de eucarioto

Para avaliar se a proteína LinKAP expressa a partir do mRNA sofre modificações pós-traducionais por N-glicosilação realizamos um ensaio de deglicosilação utilizando a enzima PNGase F, que remove resíduos de N-glicanos de proteínas glicosiladas. Extrato de células HEK293T transfectadas com mRNA LinKAP foram incubados com PNGase F e analisados por Western blot. Como controle positivo, foi utilizada a proteína Spike do SARS-CoV-2, expressa em células de mamífero, cuja glicosilação é bem descrita na literatura.

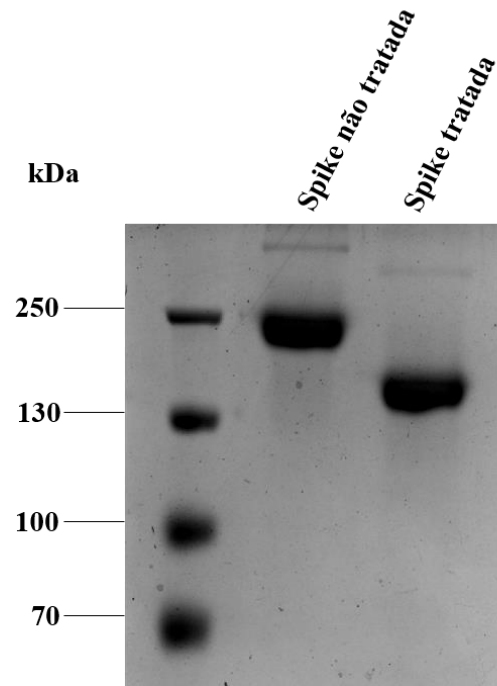
Na análise por western blot, a proteína LinKAP expressa a partir do mRNA manteve-se inalterada após o tratamento, migrando em ambas as condições (com e sem PNGase F) com peso molecular de aproximadamente 40 kDa (Figura 14a). Na análise por eletroforese de SDS-Page, observamos que o controle, a proteína Spike, apresentou uma mudança na mobilidade eletroforética após o tratamento com PNGase F, migrando de aproximadamente 200 kDa (forma glicosilada) para cerca de 130 kDa (forma deglicosilada), confirmando a presença de N-glicanos (Figura 14b). Esses resultados indicam que a proteína LinKAP não apresenta modificações pós-traducionais do tipo N-glicosilação detectáveis, ao contrário da proteína Spike, que foi eficientemente deglicosilada pela PNGase F.

Análises por MALDI-TOF foram utilizadas para avaliar a presença e a massa molecular da proteína LinKAP nas diferentes amostras (Figura 14c). Enquanto que no imunoprecipitado a partir de extrato de células não transfectadas (controle negativo), foi detectado apenas sinais de baixa intensidade provavelmente correspondente a contaminantes presentes na amostra, no imunoprecipitado obtido do extrato transfectado com mRNA LinKAP, foi identificado um pico em m/z 21,752, sugerindo a expressão de uma proteína com massa molecular compatível com LinKAP. A proteína recombinante purificada (rLinKAP) apresentou um pico em m/z 23,009, compatível com a massa molecular teórica da forma recombinante, que é 22,206 kDa. Apesar da massa detectada por MALDI-TOF ter sido 21,7 kDa, o Western blot da mesma amostra revelou uma banda com mobilidade aparente próxima a 40 kDa. Essa diferença pode ser atribuída a fatores que afetam a migração da proteína durante a eletroforese em gel de SDS-PAGE, em decorrência da sua composição de aminoácidos ou mesmo interação com proteínas das células transfectadas. Portanto, os dados obtidos por MALDI-TOF indicam a massa molecular real da proteína LinKAP, enquanto os resultados de Western blot corroboram sua presença, ainda que com mobilidade eletroforética superior ao valor teórico.

a)



b)



c)

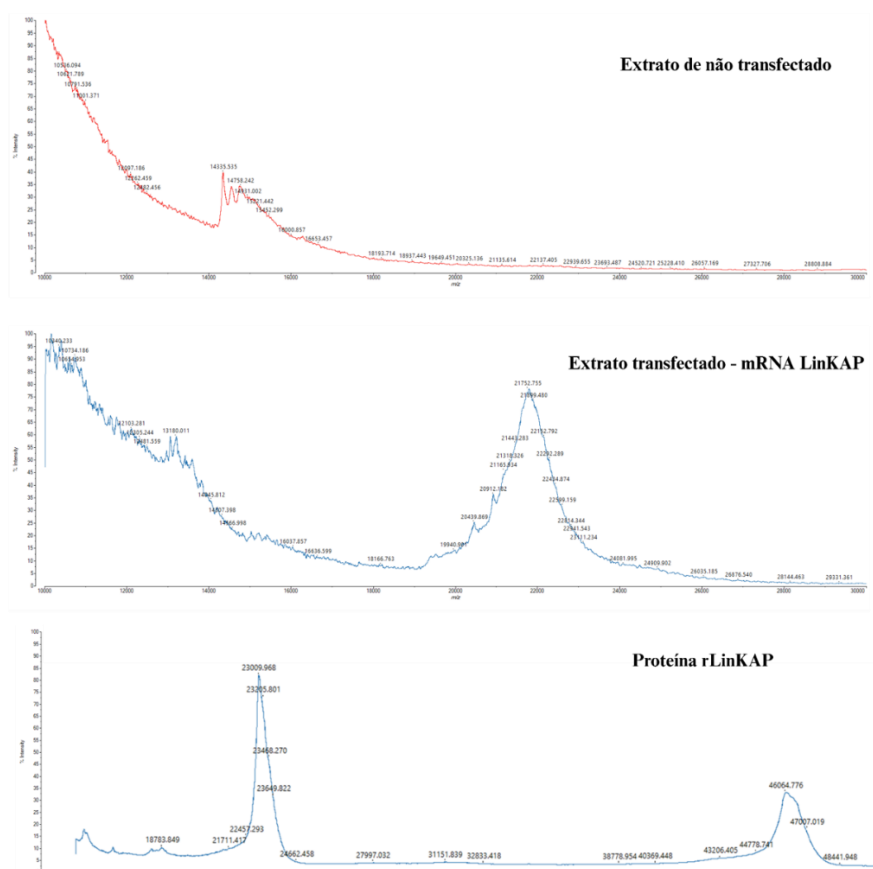


Figura 14. Análise de deglicosilação por PNGase F e perfil de massa por MALDI-TOF da proteína LinKAP expressa em eucarioto. (a) Western blot de extratos de células HEK293T transfectadas com mRNA LinKAP, tratados ou não com a enzima PNGase F. A proteína LinKAP apresentou uma banda com peso molecular de ~40 kDa em ambas as condições, sem alteração de mobilidade após o tratamento, sugerindo ausência de N-glicosilação. (b) Eletroforese em gel de SDS-PAGE da proteína Spike do SARS-CoV-2, expressa em células de mamífero, tratada ou não com PNGase F. Após o tratamento, observou-se uma redução da mobilidade eletroforética, com a banda migrando de ~200 kDa para ~130 kDa, confirmando a presença de N-glicosilação. (c) Os espectros obtidos por MALDI-TOF mostram os perfis de massa das três amostras analisadas. No extrato celular não transfectado (controle negativo), não se observam picos compatíveis com a massa molecular esperada da proteína LinKAP. No extrato celular transfectado com mRNA LinKAP, é possível identificar um pico em 21,752 m/z. O espectro da rLinKAP apresenta um pico majoritário definido, com m/z compatível com a massa molecular teórica, confirmando a identidade da proteína.

4.6 Comparação entre protocolos homólogos de vacinação com três doses utilizando proteína recombinante ou mRNA

4.6.1 Análise da resposta imune humoral e celular

O protocolo vacinal com três doses foi adotado para a imunização com os mRNAs encapsulados em LNPs com base no esquema previamente estabelecido para a vacina de proteína recombinante, que já demonstrava eficácia nesse regime. Assim, a adoção do mesmo número de doses permite uma comparação direta entre as duas estratégias vacinais. Para análise da imunogenicidade dos candidatos vacinais, camundongos C57BL/6 de idade entre 6 e 8 semanas, foram imunizados, a cada 21 dias, com 10 µg de LNP mRNA LinKAP ou LNP mRNA secLinKAP, ou 10 µg da proteína rLinKAP associada a 50 µg de Hiltonol. O sangue dos camundongos imunizados foi coletado no intervalo entre as imunizações e o soro foi separado para quantificação do título de anticorpos através de ELISA (Figura 15a).

Após a dose inicial (prime), o grupo imunizado com mRNA secLinKAP não apresentou resposta detectável de anticorpos IgG totais específicos para LinKAP, enquanto o grupo mRNA LinKAP induziu a produção de anticorpos específicos em apenas dois animais, ambos com níveis baixos. Por outro lado, a proteína recombinante rLinKAP foi capaz de induzir anticorpos específicos em todos os animais imunizados já após a primeira dose. Após a primeira dose de reforço (boost), o mRNA secLinKAP induziu resposta humoral detectável em apenas um animal, enquanto o grupo mRNA LinKAP apresentou um aumento expressivo na resposta, alcançando níveis comparáveis aos do grupo proteína recombinante. Com a administração do segundo reforço (2º boost), a produção de anticorpos dos grupos mRNA LinKAP e proteína recombinante rLinKAP se igualaram. Esses resultados indicam que mRNA LinKAP é melhor em induzir a resposta imune humoral do que secLinKAP e se compara à imunização com proteína rLinKAP (Figura 15b).

Após o 2º boost, foram quantificados os níveis de anticorpos IgG específicos para LinKAP das subclasses IgG1 e IgG2c. Para IgG1, o grupo imunizado com mRNA LinKAP apresentou níveis relativamente baixos, enquanto o grupo imunizado com a proteína recombinante rLinKAP apresentou níveis significativamente mais elevados. Em contraste, para a subclasse IgG2c, observou-se o padrão oposto: a imunização com mRNA LinKAP resultou em uma alta produção, indicando uma resposta mais robusta, enquanto o grupo imunizado com a proteína rLinKAP exibiu níveis bastante reduzidos. O grupo mRNA secLinKAP não induziu resposta humoral detectável de IgG1, e apenas um animal apresentou resposta para IgG2c, com níveis baixos (Figura 15c). Sabemos que o padrão de produção de anticorpos das subclasses

IgG1 e IgG2c está diretamente relacionado à polarização da resposta imune adaptativa do tipo Th2 ou Th1, respectivamente. Portanto, esses resultados podem sugerir a indução de uma resposta Th2 pela proteína rLinKAP e a indução de uma resposta Th1 pelo mRNA LinKAP.

Além da resposta humoral, avaliamos também a resposta celular induzida pela vacina nos camundongos imunizados. Trinta dias após a última dose, os baços dos animais foram coletados para análise da produção de IFN- γ por ELISA. Para estimular os esplenócitos *in vitro*, utilizou-se a proteína recombinante rLinKAP ou a concavalina A (ConA). O meio RPMI foi utilizado como controle negativo. A análise foi restrita ao IFN- γ por se tratar de um estudo de prova de conceito. Observou-se uma alta produção de IFN- γ nos grupos imunizado com os mRNAs LinKAP e secLinKAP, e especialmente no grupo imunizado com proteína rLinKAP, quando comparados aos controles. O grupo imunizado com LNP vazia, diferente do esperado, também apresentou níveis relevantes de IFN- γ (Figura 15d). A incubação com meio (controle negativo) resultou em baixos níveis dessa citocina, como esperado, enquanto todos os grupos responderam à concavalina A (ConA), controle positivo, confirmando a viabilidade dos esplenócitos. Esses resultados indicam que a LNP é responsável pela maior parte da produção de IFN- γ proveniente das formulações de mRNA, enquanto a vacinação com a proteína rLinKAP também é capaz de induzir altos níveis dessa citocina.

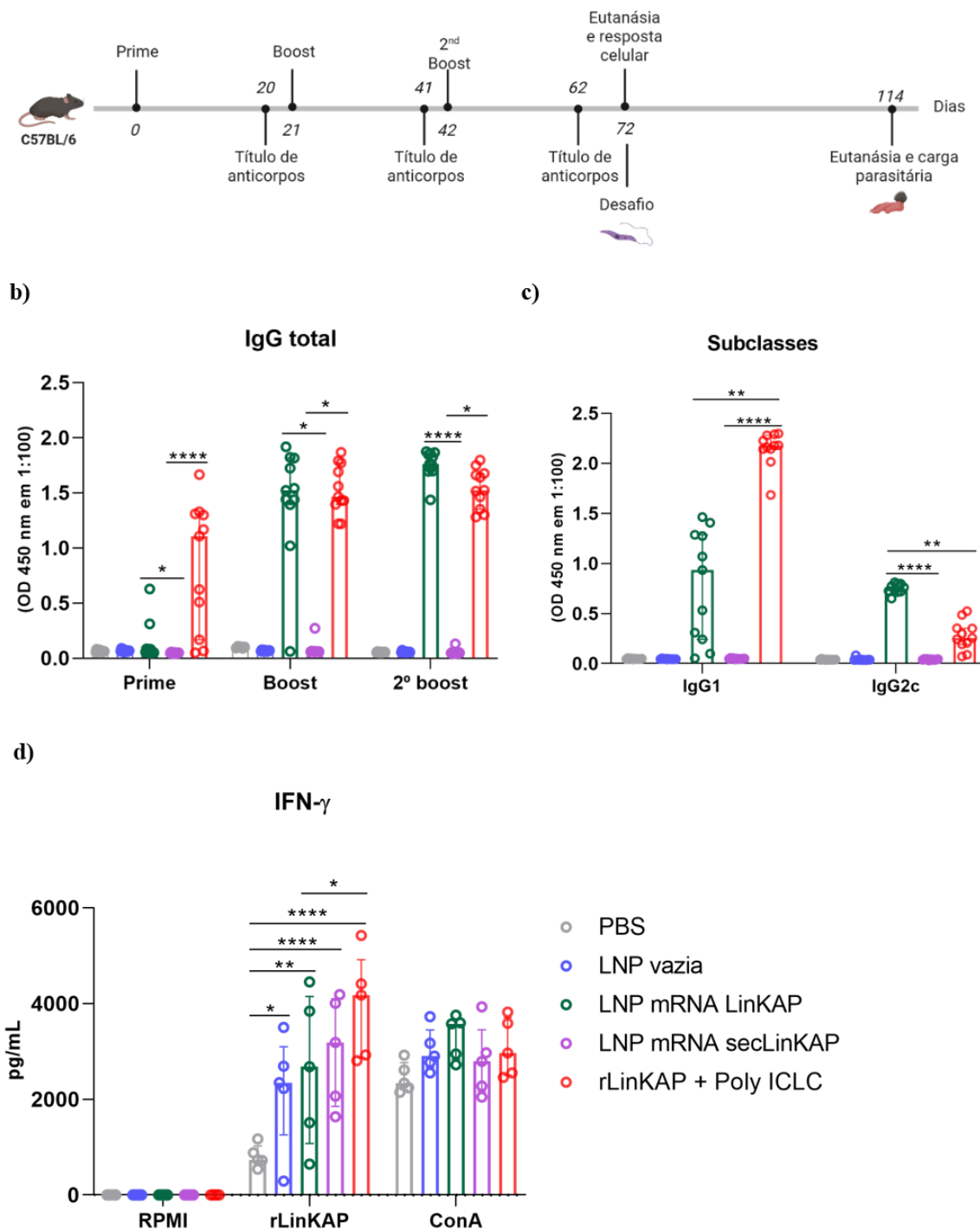


Figura 15. Avaliação da resposta imune induzida pelo protocolo homólogo de três doses. (a) Descrição esquemática do modelo murino e esquema de imunização utilizado para avaliação da resposta imune e da proteção contra *Leishmania amazonensis*. Os níveis de anticorpos específicos para LinKAP foram avaliados por ELISA, 21 dias após cada dose. Amostras de soro diluídas a 1:100 foram utilizadas para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2c. (b) Níveis de IgG total específicos para LinKAP após prime, boost e 2º boost, expressos em valores de absorbância medida em 450 nm. (c) Detecção das subclasses IgG1 e IgG2c específicas para LinKAP após o esquema vacinal completo. (d) Quantificação por ELISA da produção de IFN-

γ por esplenócitos estimulados com a proteína rLinKAP por 72 h. O meio RPMI foi utilizado como controle negativo e a ConA como controle positivo. Os dados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada por teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p < 0,05$ e indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.6.2 Desafio com *L.amazonensis* em camundongos C57BL/6 imunizados com o protocolo homólogo de três doses

A eficácia protetora das formulações de LNPs contendo mRNA foi comparada à da proteína recombinante rLinKAP associada ao adjuvante Hiltonol, em um modelo de infecção por *L. amazonensis* após a imunização de camundongos C57BL6. O desenvolvimento das lesões foi monitorado por seis ou oito semanas. Ao término do desafio, as patas infectadas foram coletadas para avaliação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. Em uma das replicatas experimentais foi visto que as formulações de mRNA LinKAP e de proteína rLinKAP foram capazes de proteger parcialmente camundongos desafiados com *L.amazonensis*, apesar da espessura da lesão não se relacionar com essa proteção. (Figura 16a-b), enquanto uma segunda replicata mostrou que ambas formulações e a formulação de mRNA secLinKAP não foram eficazes na proteção dos animais infectados (Figura 16c-d). Isso torna os resultados de proteção inconclusivos e ressalta a necessidade de uma otimização do ensaio de diluição limitante e do estabelecimento de novos métodos de quantificação da carga parasitária.

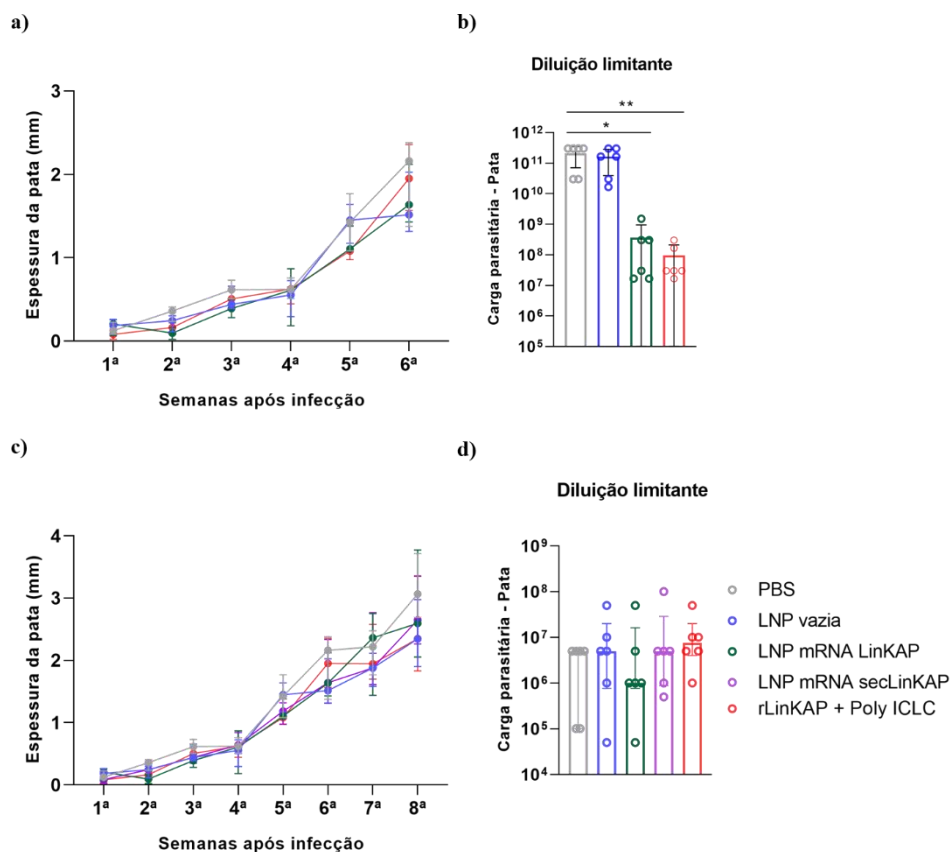


Figura 16. Avaliação da eficácia protetiva em camundongos imunizados com esquema homólogo de três doses e desafiados com *Leishmania amazonensis*. (a) Desenvolvimento da lesão na pata traseira esquerda de camundongos infectados com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na primeira replicata experimental. O tamanho da lesão foi determinado pela diferença entre as medidas das patas traseiras infectada e não infectada. (b) Quantificação da carga parasitária por diluição limitante da primeira replicata experimental realizada. O ensaio foi feito com o macerado das patas infectadas após seis semanas de desafio. Os resultados foram expressos em escala logarítmica na base 10 (\log_{10}). (c) Desenvolvimento da lesão na pata traseira esquerda de camundongos infectados com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na segunda replicata experimental. (d) Quantificação da carga parasitária por diluição limitante nas patas infectadas após oito semanas de desafio. $n = 6$ animais por grupo. Os dados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada por teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7 Comparação entre protocolos heterólogos de vacinação com três doses

4.7.1 Resposta imune humoral e celular

Com o objetivo de avaliar se a combinação de mRNA LinKAP com a proteína rLinKAP poderia potencializar a resposta imune e a proteção, empregamos um protocolo heterólogo de três doses. Camundongos C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, foram imunizados a cada 21 dias com os seguintes esquemas: mRNA-mRNA-proteína ou mRNA-proteína-proteína. O protocolo proteína-proteína-proteína foi utilizado como controle comparativo, enquanto o grupo controle negativo foi imunizado com PBS. Em cada dose, foram administrados 10 µg de mRNA LinKAP ou 10 µg de proteína rLinKAP associada a 50 µg de Hiltonol como adjuvante (Figura 17a). O soro dos camundongos foi coletado entre as três imunizações e foi utilizado para a quantificação de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c específicos para LinKAP.

Nossos resultados mostraram que, após o prime, todos os grupos vacinados apresentaram níveis detectáveis de anticorpos IgG totais específicos para LinKAP. No entanto, o grupo mRNA-mRNA-proteína apresentou uma produção mais baixa em comparação aos grupos mRNA-proteína-proteína e proteína-proteína-proteína, cujos níveis foram equivalentes. Após o boost, todos os grupos atingiram níveis semelhantes, mantendo-se estáveis após o 2º boost (Figura 17b).

Análises das subclasses IgG1 e IgG2c realizadas após o 2º boost mostraram que o grupo que recebeu duas doses de mRNA (mRNA-mRNA-proteína) apresentou níveis reduzidos de IgG1 em relação aos grupos que receberam duas ou mais doses de proteína (mRNA-proteína-proteína e proteína-proteína-proteína). Por outro lado, todos os grupos imunizados exibiram níveis baixos de IgG2c (Figura 17c).

Trinta dias após a última dose, os baços dos camundongos imunizados foram coletados para avaliação da resposta imune celular, por meio da quantificação da produção de citocinas em cultivo *in vitro* de esplenócitos estimulados com a proteína rLinKAP. Os dados mostram que os grupos imunizados com duas ou mais doses da proteína recombinante (mRNA-proteína-proteína e proteína-proteína-proteína) apresentaram uma produção significativamente elevada de IFN- γ . Em contraste, o protocolo contendo duas doses de mRNA e somente 1 dose de proteína (mRNA-mRNA-proteína) resultou em níveis reduzidos dessa citocina. A estimulação com ConA mostra ainda que os esplenócitos apresentavam boa viabilidade (Figura 17d).

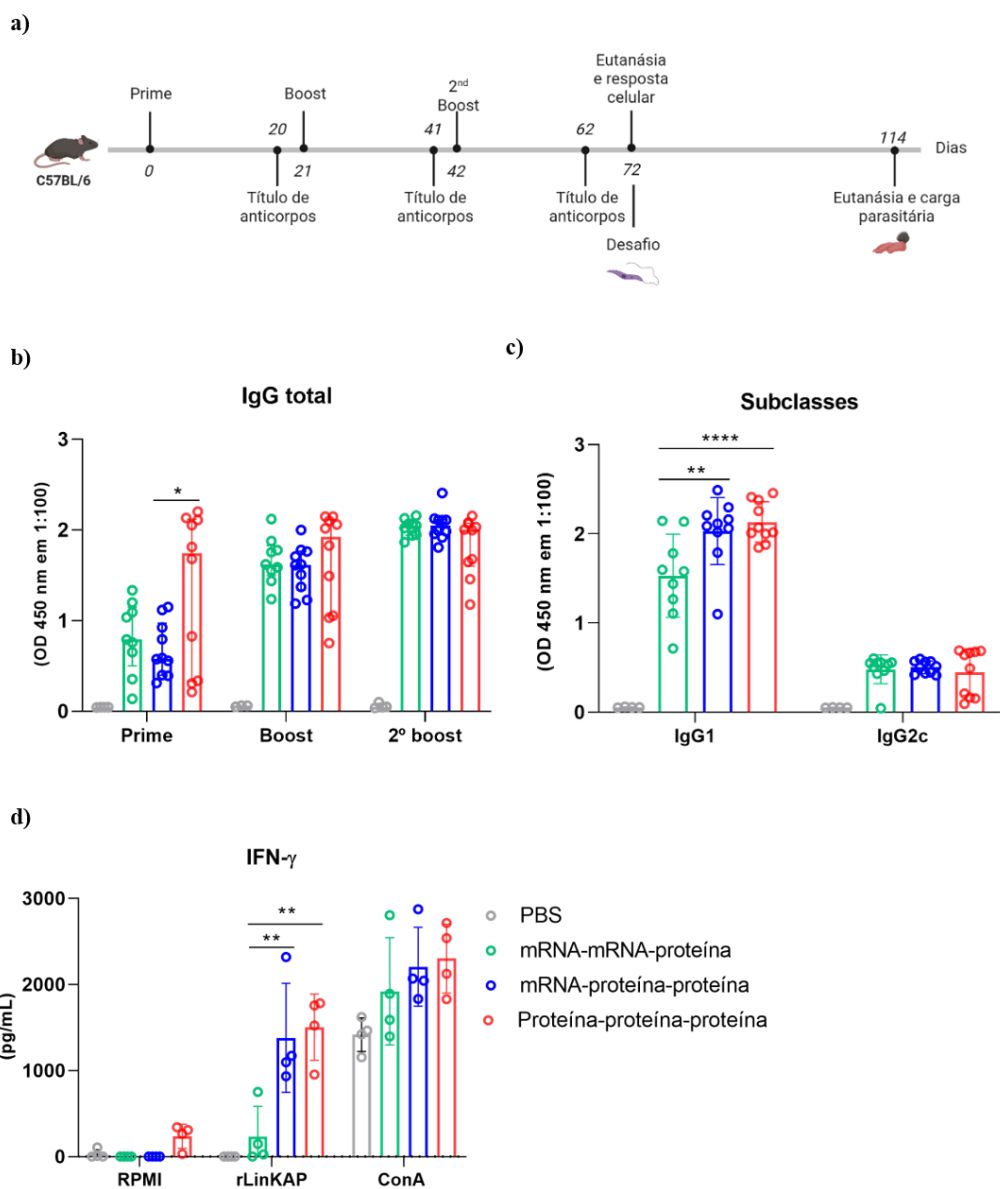


Figura 17. Avaliação da resposta imune induzida pelo protocolo heterólogo de três doses.

(a) Representação do esquema experimental de imunização utilizado para análise da resposta imune e proteção contra *Leishmania amazonensis*. A produção de anticorpos específicos para LinKAP foi quantificada por ELISA, 21 dias após cada imunização, utilizando amostras de soro diluídas a 1:100 para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2c. (b) Níveis de IgG total específicos para LinKAP após prime, boost e segundo boost, expressos como valores de absorbância medidos a 450 nm. (c) Níveis das subclasses IgG1 e IgG2c após o esquema vacinal completo. (d) Produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados com a proteína rLinKAP por 72 h. O meio RPMI foi utilizado como controle negativo e a ConA como controle positivo. As concentrações de IFN- γ foi determinada por ELISA. Os resultados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p < 0,05$ e indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.7.2 Desafio com *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolo heterólogo de três doses

Para avaliar a eficácia protetiva das diferentes combinações vacinais, os camundongos imunizados foram desafiados com *L. amazonensis*. O desenvolvimento das lesões foi monitorado ao longo de seis semanas, seguido pela quantificação da carga parasitária nas patas infectadas por meio da técnica de diluição limitante. A análise da progressão das lesões revelou que todos os grupos imunizados apresentaram redução significativa no tamanho das lesões em comparação ao grupo controle. Dentre os grupos vacinados, o protocolo mRNA-mRNA-proteína resultou nas menores lesões ao final do acompanhamento (Figura 18a). Os dados de diluição limitante obtidos após 6 semanas de infecção indicam que todas as formulações vacinais conferiram proteção parcial à infecção por *L. amazonensis*, com redução da carga parasitária em relação ao grupo controle, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados (Figura 18b).

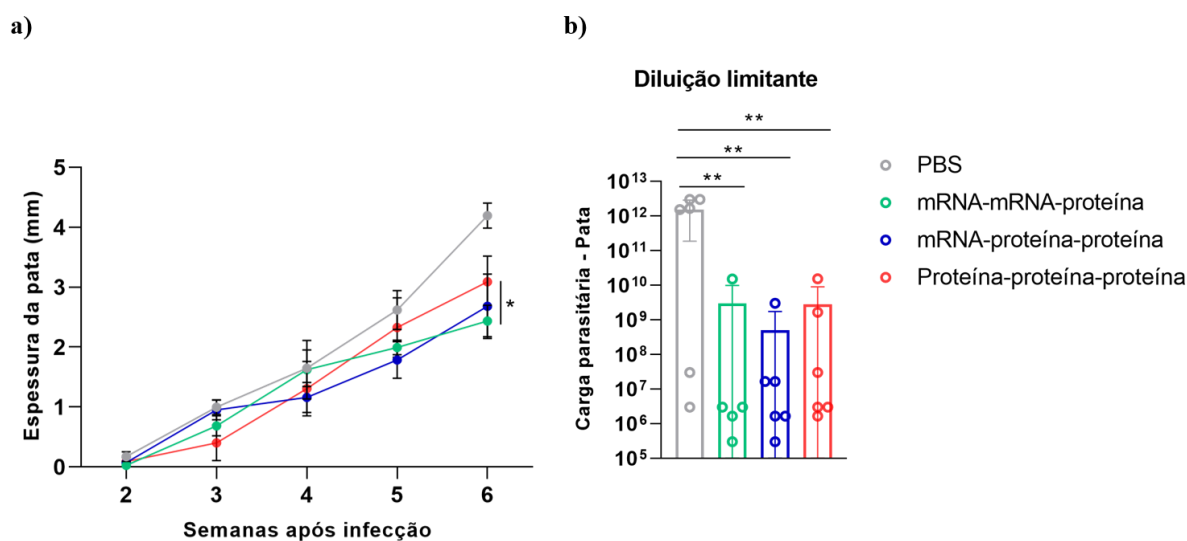


Figura 18. Avaliação da eficácia protetiva em camundongos imunizados com esquema heterólogo de três doses e desafiados com *Leishmania amazonensis*. (a) Progressão da lesão na pata traseira esquerda de camundongos infectados com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*, medida como a diferença entre as patas infectada e não infectada. (b) Carga parasitária nas patas infectadas quantificada por diluição limitante, seis semanas após o desafio, expressa em escala logarítmica (\log_{10}). $n = 6$ animais/grupo. Os dados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi feita por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Diferenças significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.8 Comparação entre protocolos de vacinação homólogo e heterólogo com duas doses

4.8.1 Análise da resposta imune humoral e celular

Buscando verificar se protocolos de imunização com apenas 2 doses seria capaz de conferir proteção à infecção, camundongos C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas, foram imunizados a cada 21 dias com o esquema mRNA-mRNA ou com mRNA-proteína. O grupo controle negativo foi imunizado com PBS. Em cada dose, foram administrados 10 µg de mRNA LinKAP ou 10 µg de proteína rLinKAP associada a 50 µg de Hiltonol como adjuvante. O soro dos camundongos foi coletado após a primeira e a segunda imunizações e foi utilizado para a quantificação de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c específicos para LinKAP (Figura 19a).

Nossos resultados demonstraram que, após o prime, a indução de anticorpos IgG totais específicos foi baixa em ambos os grupos vacinados. No entanto, após o boost, observou-se um aumento expressivo nos níveis de IgG total, com valores semelhantes entre os grupos imunizados com os esquemas mRNA-proteína e mRNA-mRNA (Figura 19b). Em relação às subclasses de IgG, embora as diferenças não tenham alcançado significância estatística, verificou-se uma tendência de maior produção de IgG1 no grupo mRNA-proteína, enquanto o grupo mRNA-mRNA apresentou níveis mais elevados de IgG2c, sugerindo perfis distintos de polarização da resposta imune humoral entre os esquemas vacinais avaliados (Figura 19c).

A produção de IFN- γ e IL-10 presente nos sobrenadantes da cultura de esplenócitos dos animais imunizados foi avaliada após estimulação com a proteína recombinante. Os resultados indicam que a imunização com os dois protocolos foi capaz de induzir uma resposta imune celular caracterizada por uma produção moderada de IFN- γ e baixos níveis de IL-10 após estímulo com a proteína rLinKAP, sugerindo uma resposta com perfil inflamatório (Figura 19d-e).

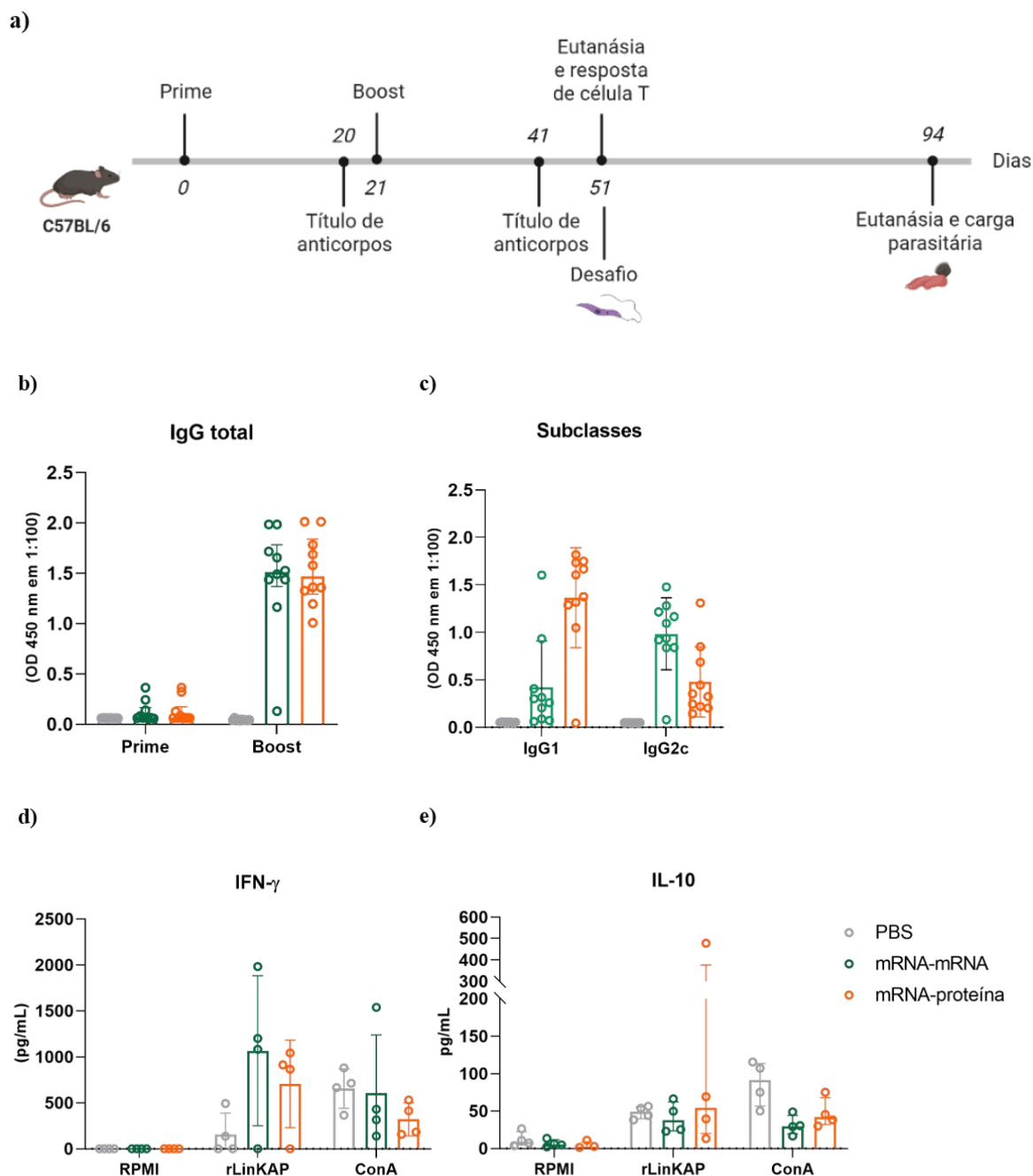


Figura 19. Avaliação da resposta imune induzida pelo protocolo heterólogo de duas doses.

(a) Esquema experimental de imunização adotado para análise da resposta imune contra *Leishmania amazonensis*. A produção de anticorpos específicos para LinKAP foi avaliada por ELISA, 21 dias após cada dose, utilizando amostras de soro diluídas 1:100 para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2c. (b) Níveis de IgG total após prime e boost, expressos em absorbância a 450 nm. (c) Níveis de IgG1 e IgG2c após o esquema vacinal completo. (d-e) Produção de citocinas por esplenócitos estimulados com a proteína rLinKAP por 72 h. O meio RPMI foi utilizado como controle negativo e a ConA como controle positivo. As concentrações de (d) IFN- γ e (e) IL-10 foram determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis, seguida

do teste de Dunn para comparações múltiplas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

4.8.2 Desafio com *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 imunizados com protocolo homólogo e heterólogo de duas doses

Para a avaliação da proteção após imunização, os camundongos imunizados foram desafiados com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e a progressão da infecção foi monitorada por meio da medição do tamanho das lesões e carga parasitária. Em uma das replicatas experimentais foi visto que os esquemas de vacinação não foram capazes de proteger os animais (Figura 20a), enquanto uma segunda replicata mostrou que as formulações foram eficazes na proteção dos animais infectados (Figura 20b-c). Isso novamente torna os resultados de proteção inconclusivos e ressalta a necessidade de uma otimização do ensaio de diluição limitante.

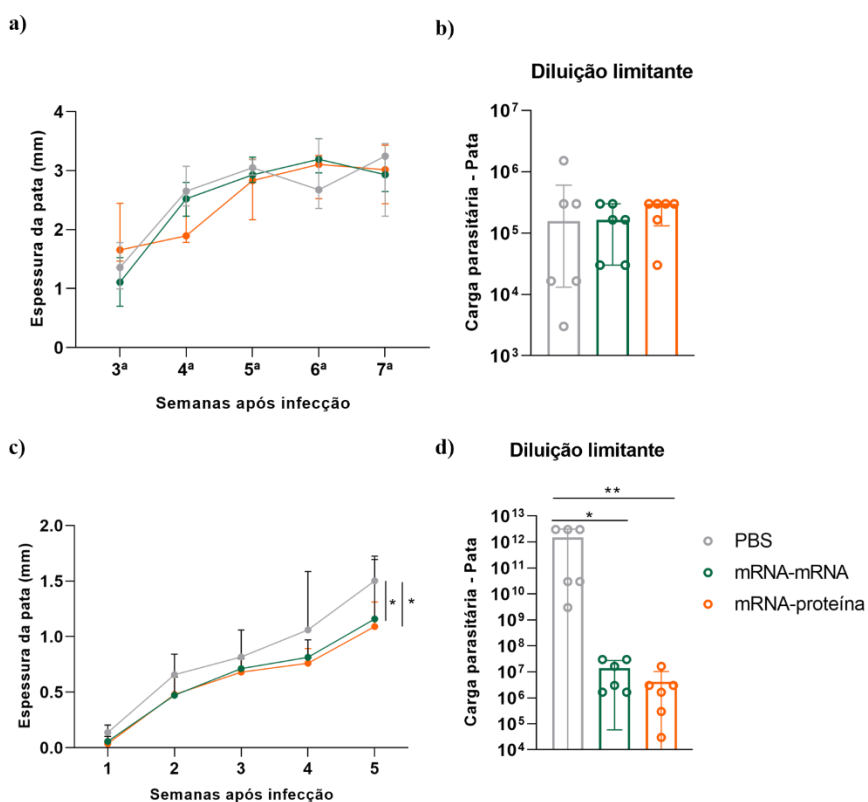


Figura 20. Avaliação da proteção em camundongos imunizados com protocolo de duas doses e desafiados com *Leishmania amazonensis*. (a) Desenvolvimento da lesão na pata traseira esquerda de camundongos infectados com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na primeira replicata experimental. O tamanho da lesão foi determinado pela

diferença entre as medidas das patas traseiras infectada e não infectada. (b) Quantificação da carga parasitária por diluição limitante da primeira replicata experimental realizada. O ensaio foi feito com o macerado das patas infectadas após sete semanas de desafio. Os resultados foram expressos em escala logarítmica na base 10 (\log_{10}). (c) Desenvolvimento da lesão na pata traseira esquerda de camundongos infectados com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na segunda replicata experimental. (d) Quantificação da carga parasitária por diluição limitante nas patas infectadas após cinco semanas de desafio. $n = 6$ animais/grupo. Os dados estão representados como mediana \pm intervalo interquartil. A significância estatística foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. A análise estatística foi feita por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Diferenças significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.9 Comparação entre protocolos homólogos de vacinação com três doses utilizando proteína recombinante ou mRNA em camundongos BALB/c

4.9.1 Análise da resposta imune humoral e celular

Após observar proteção parcial contra *Leishmania amazonensis* em camundongos C57BL/6 previamente imunizados, decidimos investigar o potencial protetor das vacinas frente a outra espécie de *Leishmania*, a *Leishmania infantum*. Considerando que a infecção experimental por *L. infantum* é mais bem estabelecida na linhagem BALB/c, utilizamos camundongos dessa linhagem, com idade entre 6 e 8 semanas, imunizados com um regime homólogo de três doses administradas em intervalos de 21 dias. Os animais receberam 10 μ g de LNP contendo mRNA LinKAP ou 10 μ g da proteína rLinKAP adjuvantada com 50 μ g de Hiltonol, além dos grupos controle que receberam LNP vazia ou PBS. Amostras de sangue foram coletadas ao longo do protocolo vacinal para separação do soro e quantificação dos títulos de anticorpos específicos por ELISA (Figura 21a).

Os resultados indicaram que, após o prime e o boost, apenas os camundongos imunizados com a proteína rLinKAP apresentaram produção detectável de anticorpos IgG totais específicos. Após o 2º boost, alguns animais vacinados com mRNA LinKAP passaram a exibir baixos títulos de IgG, enquanto os imunizados com rLinKAP mantiveram uma resposta robusta, com altos níveis de anticorpos ao final do protocolo (Figura 21b). A análise das subclasses de IgG revelou que a formulação com mRNA LinKAP induziu baixos níveis de IgG1 e IgG2a, ao passo que a proteína rLinKAP foi capaz de estimular uma resposta significativamente mais elevada para ambas as subclasses (Figura 21c).

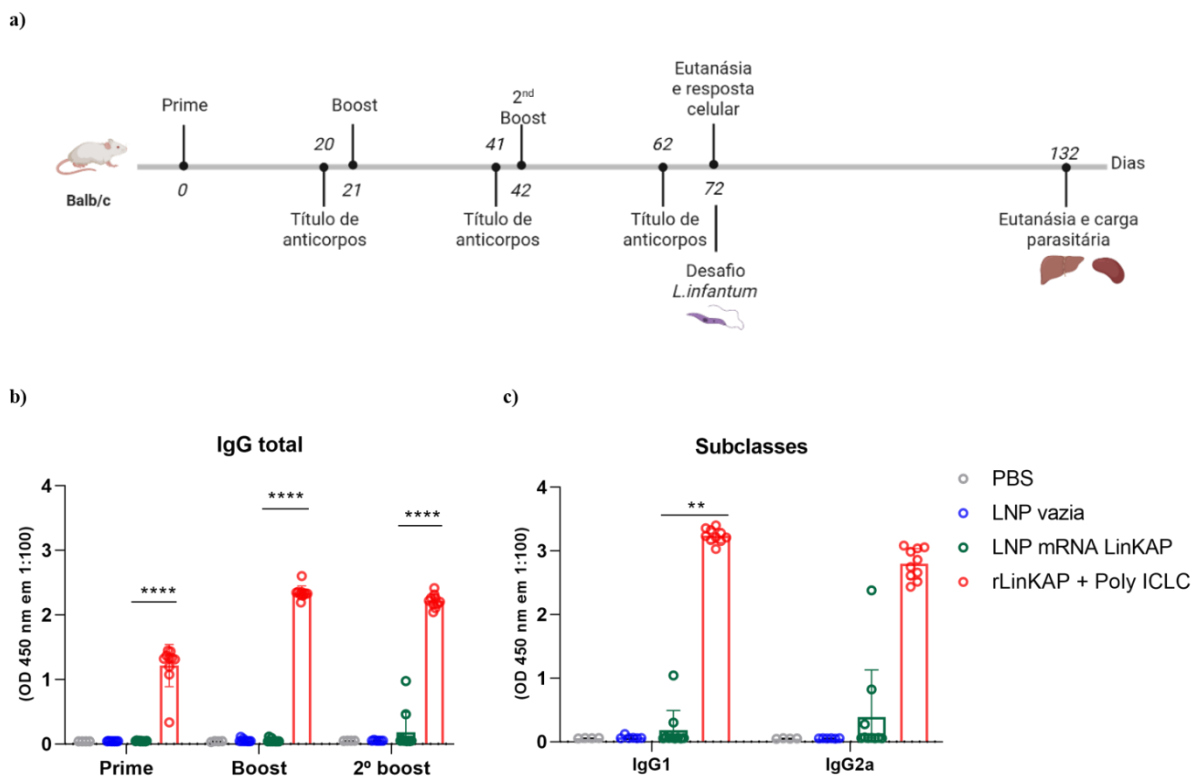


Figura 21. Avaliação da resposta humoral induzida pelo protocolo homólogo de três doses em BALB/c. (a) Representação esquemática do modelo murino e cronograma de imunização com três doses homólogas, utilizado para análise da resposta imune e proteção frente ao desafio com *Leishmania infantum*. A produção de anticorpos específicos contra LinKAP foi avaliada por ELISA. (b) Níveis de IgG total após prime, boost e 2º boost, medidos por absorvância a 450 nm. (c) Detecção das subclasses IgG1 e IgG2c após o esquema vacinal completo. Amostras de soro foram analisadas na diluição 1:100. $n = 10$ animais/grupo. Os dados são expressos como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p < 0,05$ e indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

A resposta imune celular gerada pela imunização foi quantificada por CBA. Trinta dias após a última dose, os baços dos camundongos foram coletados e os esplenócitos isolados foram cultivados *in vitro* na presença ou ausência de estímulos. A proteína recombinante rLinKAP foi utilizada como estímulo, a concanavalina A (ConA) e o meio RPMI como controles positivo e negativo, respectivamente. Não foi detectada produção significativa de citocinas pelos esplenócitos do grupo imunizado com mRNA LinKAP após estimulação com a proteína rLinKAP, indicando uma resposta celular mais fraca ou menos funcional. Em contraste, o grupo imunizado com a proteína rLinKAP induziu uma resposta imune celular predominantemente inflamatória, caracterizada por altos níveis de IFN- γ e TNF- α , além da detecção de outras

citocinas pró-inflamatórias como IL-6, e IL-2. A presença de baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e IL-17 sugere que o balanço da resposta imune gerada pela vacinação com a proteína rLinKAP está polarizado para um perfil do tipo Th1 (Figura 22). Esses resultados sugerem que a proteína rLinKAP é mais eficaz em promover uma ativação celular mais robusta do que o mRNA LinKAP em camundongos BALB/c.

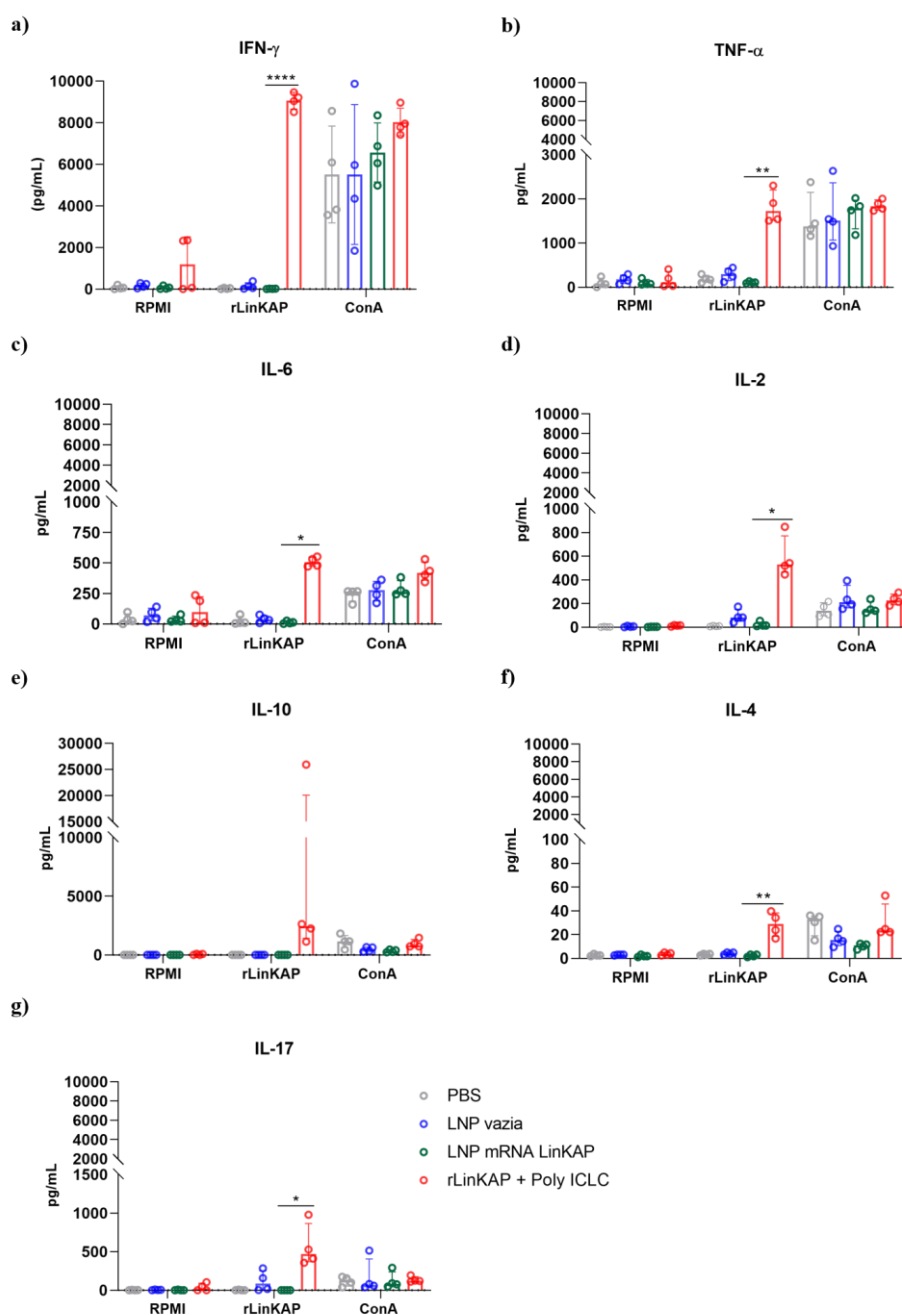


Figura 22. Produção de citocinas em resposta à estimulação com a proteína rLinKAP em camundongos BALB/c imunizados com protocolo homólogo de três doses. Esplenócitos foram cultivados por 72 horas na presença da proteína rLinKAP. O meio RPMI foi utilizado

como controle negativo e a Concanavalina A (ConA) como controle positivo. As concentrações das citocinas (a) IFN- γ , (b) TNF- α , (c) IL-6, (d) IL-2, (e) IL-10, (f) IL-4 e (g) IL-17 nos sobrenadantes foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o ensaio Cytometric Bead Array (CBA). $n = 4$ animais/grupo. Os dados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p < 0,05$ e indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.9.3 Desafio com *L. infantum* em camundongos BALB/c imunizados com o protocolo homólogo de três doses

A proteção conferida pelo protocolo de imunização com a formulação de LNP contendo mRNA foi comparada à da proteína rLinKAP associada ao adjuvante Hiltonol frente à infecção por *L. infantum*. Para isso, grupos de seis camundongos BALB/c previamente imunizados foram desafiados com promastigotas metacíclicas da *L. infantum*. Ao término dos 60 dias de desafio, o baço e o fígado dos animais foram coletadas para avaliação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. Os resultados mostraram uma redução parcial da carga parasitária em ambos os órgãos no grupo imunizado com a proteína rLinKAP em comparação aos grupos controles. O grupo imunizado com mRNA LinKAP apresentou uma grande dispersão dos resultados o que resultou em ausência de diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle e ao grupo imunizado com a proteína recombinante (Figura 23).

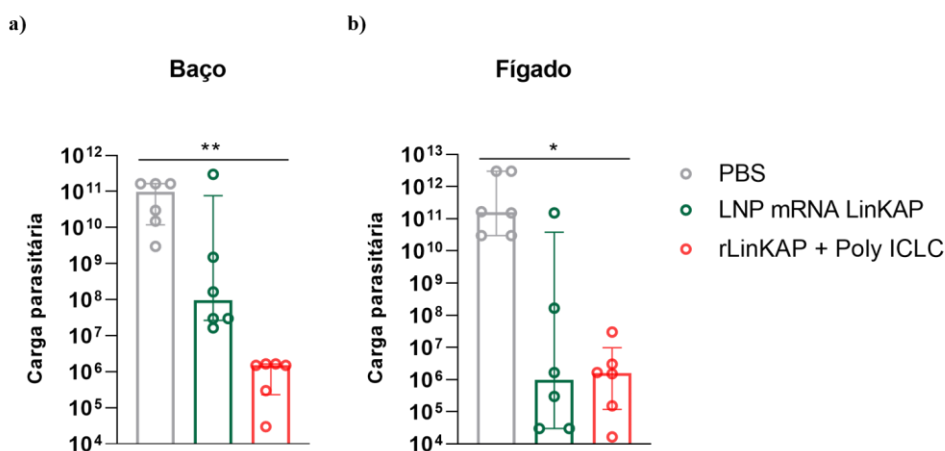


Figura 23. Avaliação da proteção conferida por protocolo homólogo de três doses contra *Leishmania infantum* em camundongos. Camundongos foram imunizados com três doses do

esquema homólogo e desafiados por via intraperitoneal com 1×10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum*. Sessenta dias após o desafio, a carga parasitária foi determinada por diluição limitante (a) no baço e (b) no fígado. Os resultados foram expressos em escala logarítmica (\log_{10}). $n = 6$ animais/grupo. Os dados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p < 0,05$ e indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

Diversos esforços para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose humana têm sido feitos atualmente e, apesar dos avanços e do número de candidatos em estudos pré-clínicos e clínicos terem aumentado, ainda não há uma vacina aprovada para uso em humanos (Kaye et al., 2023). No presente trabalho, buscamos desenvolver e testar uma vacina contra leishmaniose utilizando as plataformas vacinais baseadas em proteínas recombinantes e de mRNA. As vacinas de mRNA se tornam promissoras por sua capacidade de induzir respostas tanto de células T CD4⁺ quanto de células CD8⁺, uma vez que o mRNA codificante do antígeno de interesse é traduzido no citoplasma das APCs e é processado e apresentado principalmente via MHC de classe I e, em menor escala, via MHC de classe II (Gote et al., 2023). Como a *Leishmania* se instala e se replica no interior de macrófagos, a indução da resposta celular através da ativação de linfócitos T, especialmente os CD4⁺ do subtipo Th1 e os CD8⁺, é fundamental para conter a infecção. A produção de citocinas como o IFN- γ estimula os macrófagos a produzirem óxido nítrico e outras espécies reativas capazes de eliminar os parasitas (Ayala et al., 2024).

O alvo antigênico utilizado neste trabalho foi a proteína LinKAP, identificada por meio de análises de imunoproteômica e classificada como uma proteína hipotética, sem função definida. Essa proteína apresenta sequências repetitivas de aminoácidos que variam entre as espécies de *Leishmania*, resultando em proteínas com massas moleculares entre 72 e 150 kDa. (Germanó et al., 2022). As análises de alinhamentos de sequência mostraram uma baixa homologia com proteínas do hospedeiro e a proteína se mostrou conservada entre várias espécies de *Leishmania*, o que gerou um interesse em seu uso como alvo para o desenvolvimento de uma vacina. Foi gerada uma proteína recombinante LinKAP truncada, sendo composta por 54 aminoácidos na posição N-terminal e por 15 repetições de 10 aminoácidos que foram mantidos da sequência original.

Nessa proteína, os epítomos de células T se concentram na porção não repetitiva e os epítomos de células B na porção repetitiva. A proteína rLinKAP truncada associada ao adjuvante Poly ICLC (Hiltonol®), quando testada em camundongos BALB/c e hamsters, induziu forte resposta imune humoral e celular. Além disso, a vacina protegeu parcialmente camundongos infectados com *L.infantum* (De Oliveira et al., 2025).

No presente trabalho, utilizamos a sequência de aminoácidos de rLinKAP para gerar uma sequência de DNA correspondente para ser utilizada como molde para síntese do mRNA. Os mRNAs utilizados são do tipo não-replicativo, ou seja, codificam apenas o antígeno de interesse, o que pode demandar quantidades mais elevadas para indução de uma resposta imune robusta em comparação aos mRNAs autorreplicativos, onde até 10 ng já se mostraram eficazes em modelos animais (Geall et al., 2012). Apesar dessa vantagem em termos de potência e economia de dose, as vacinas baseadas em RNA autorreplicativo enfrentam maiores desafios regulatórios. Apenas em 2023, a primeira vacina de mRNA autorreplicativo contra Sars-CoV-2 foi aprovada para uso humano no Japão, marcando um avanço importante, mas que ainda necessita de ampla validação e adoção internacional (Oda et al., 2024). Por essa razão, optou-se neste trabalho pelo uso da plataforma de mRNA não replicativo, já consolidada e com maior respaldo regulatório até o momento.

Os mRNAs empregados nesse trabalho, LinKAP e secLinKAP, possuem algumas diferenças com relação ao mRNA da proteína original como as sequências 5' e 3' UTR e a presença de peptídeo sinal no caso de secLinKAP, que permite a secreção da proteína pelas células. Embora essas diferenças possam influenciar na expressão dessa proteína, a proteína LinKAP foi expressa em níveis semelhantes por células eucariotas transfectadas com ambos mRNAs. Ainda que as bandas detectadas por Western blot não correspondam exatamente ao peso molecular previsto para a proteína LinKAP, a análise por imunofluorescência revelou a presença da proteína distribuída pelo citoplasma das células, reforçando sua expressão nas células transfectadas. Essa divergência no tamanho das proteínas oriundas do extrato ou sobrenadante de células eucariotas, poderia refletir modificações pós-traducionais, como glicosilação ou fosforilação, frequentemente observadas em proteínas expressas em sistemas eucarióticos (Tokmakov et al., 2012).

A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum em proteínas expressas em células eucariotas, podendo ser uma das causas da migração anômala observada no gel de SDS-PAGE. No entanto, os ensaios enzimáticos de deglicosilação não indicaram a presença de N-glicanos nas proteínas analisadas. Esse resultado sugere que o aumento no peso molecular aparente detectado no gel não está relacionado à N-glicosilação, levantando a possibilidade de outras causas, como O-glicosilação, conformações atípicas, agregação com outras proteínas ou outras modificações pós-traducionais. Entretanto, a massa intacta determinada por espectrometria de massa mostrou um valor próximo da massa teórica esperada, indicando que

não há grandes modificações pós-traducionais. Esses dados sugerem que a migração anômala no gel está provavelmente associada a características estruturais da proteína, possivelmente relacionadas à presença de uma região com elevado número de repetições de aminoácidos, uma característica observada na proteína LinKAP. Ao ser expressa em células eucariotas, a proteína LinKAP pode adquirir uma conformação distinta da esperada, o que pode favorecer a formação de agregados. Já foi demonstrado que proteínas com alta capacidade de ligação ao SDS formam complexos proteína-detergente com grande volume hidrodinâmico, o que reduz sua mobilidade no gel (Rath et al., 2009). Dessa forma, a migração anômala observada para LinKAP expressa em células eucariotas poderia ser atribuída a essa alteração conformacional e ainda ao aumento da interação com o SDS.

A LNP empregada neste estudo foi desenvolvida e caracterizada pelo nosso grupo, tendo demonstrado propriedades adjuvantes relevantes ao ativar a resposta imune inata. Ensaio anteriores também evidenciaram sua capacidade de promover respostas humorais e celulares robustas quando formulada com antígenos de dengue e *Leishmania* (Fernandes et al., 2025). As formulações de LNP contendo os mRNAs LinKAP e secLinKAP foram caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas, apresentando tamanhos compatíveis com a captação eficiente por APCs, um passo essencial para a indução de imunidade antígeno-específica em vacinas de mRNA. (Hassett et al., 2021). O potencial zeta levemente negativo observado em nossas LNPs é condizente com os parâmetros recomendados na literatura para vacinas de mRNA, os quais indicam que cargas neutras ou levemente negativas conferem maior estabilidade coloidal, geram menos toxicidade e reatividade física, além de contribuírem para uma maior meia-vida da LNP na circulação (Carrasco et al., 2021). A análise morfológica por Cryo-TEM das LNPs mRNA LinKAP revelou partículas esféricas bem definidas, com uma bicamada lipídica e um interior eletrondenso e irregular, indicando a presença de compartimentos internos onde as moléculas de mRNA se organizam. Já as LNPs vazias, apresentam uma estrutura esférica mais homogênea, amorfa, sem a presença de regiões densas em seu interior. Esses achados apoiam a hipótese de que a presença do mRNA modifica a arquitetura interna das partículas ao organizar os lipídios em estruturas mais compactas (Kulkarni et al., 2018). A combinação desses dados sugere que as LNPs utilizadas possuem características físico-químicas ideais para proteger o mRNA e realizar sua entrega às células.

A análise dos protocolos vacinais em camundongos C57BL/6 mostrou que as formulações modularam a resposta imune humoral de formas diferentes. Quando LNP mRNA

LinKAP ou a proteína rLinKAP + Poly ICLC (Hiltonol®) são administrados sozinhas, os níveis de IgG totais são semelhantes, mas que o perfil das subclasses é diferente: a imunização com LNP mRNA LinKAP induz predominantemente IgG2c e a imunização com a proteína predominantemente IgG1. Nos protocolos heterólogos de duas ou três doses, observa-se maiores níveis de IgG total e IgG1 em animais que receberam mais doses de proteína. Esses achados são consistentes com o tipo de apresentação de antígenos induzida por cada plataforma vacinal. Proteínas recombinantes geralmente são apresentadas via MHC de classe II, ativando células T CD4⁺ do tipo Th2, levando à secreção de IL-4 e subsequente troca de classe para IgG1. Enquanto nas vacinas de mRNA, os antígenos são traduzidos de forma endógena e são, preferencialmente, apresentados via MHC de classe I e, em menor grau, via MHC de classe II. Essa apresentação leva à ativação de células T CD8⁺ e CD4⁺ Th1 produtoras de IFN- γ e IL-12, que coordenam a troca de classe para IgG2c (Park et al., 2023; Poveda et al., 2023; Roche; Furuta, 2015). A proteína rLinKAP já foi relatada como indutora de altos níveis tanto de IgG1 quanto de IgG2a em BALB/c, entretanto isso pode ser atribuído à linhagem de camundongos utilizada (De Oliveira et al., 2025). Essa equivalência nos níveis de IgG1 e IgG2c/IgG2a é frequentemente vista em vacinas que utilizam proteína recombinante, podendo ser explicada pelo uso de adjuvantes indutores de resposta Th1 (De Mello et al., 2025; Martins et al., 2017). Embora essa análise não tenha sido realizada nesse trabalho, foi visto também que em protocolos heterólogos de vacinação combinando mRNA e proteína, a ordem de aplicação das formulações interfere na polarização da resposta imune obtida (Kunkeaw et al., 2023b; Poveda et al., 2023). Por fim, a predominância de IgG1 sobre IgG2c, ou vice-versa, não é suficiente, por si só, para caracterizar o perfil da resposta imune como Th1 ou Th2.

Buscando avaliar a imunização com mRNA codificando a proteína LinKAP com sinal para secreção, foi gerada uma sequência contendo os códons para um peptídeo sinal de um gene humano, tPA. Embora a proteína tenha sido expressa *in vitro*, a ausência de resposta imune *in vivo* sugere que as alterações feitas na estrutura do mRNA podem ter influenciado a tradução do antígeno. As UTRs têm papel fundamental na regulação da tradução, estabilidade e localização do mRNA, e sua substituição pode ter afetado a cinética de tradução ou diminuído a estabilidade do transcrito *in vivo*, mesmo que esses efeitos não tenham sido aparentes *in vitro*. Estudos mostram que combinações de UTRs bem escolhidas aumentam a tradução e a produção proteica em modelo murino (Li et al., 2025). O fato de a proteína passar a ser secretada pode

ter redirecionado a via de apresentação para o MHC II, que, nesse modelo, pode ter sido menos eficiente.

O perfil de produção de citocinas induzido pelos protocolos vacinais em camundongos C57BL/6 revelou maior produção de IFN- γ nos grupos imunizados com a proteína rLinKAP ou com esquemas vacinais que incluíam essa proteína, em comparação com os que receberam apenas o mRNA LinKAP. Embora vacinas de mRNA sejam associadas à indução de uma resposta Th1 robusta, diversos fatores podem justificar esse resultado. O antígeno por si só pode favorecer uma resposta humoral ao invés de uma resposta celular. A proteína rLinKAP possui muitas regiões repetitivas justamente onde se localizam os epítomos de células B, mas possui poucos epítomos de células T, o que pode não ser o suficiente para ativar células T CD4⁺ Th1 ou CD8⁺ citotóxicas, mas pode gerar uma resposta robusta de anticorpos.

Vacinas baseadas em proteínas recombinantes geralmente são administradas com adjuvantes indutores da resposta Th1, como é o caso da rLinKAP, que é adjuvantada com Poly ICLC (Hiltonol®). Por outro lado, vacinas de mRNA com nucleosídeos modificados, como a utilizada neste estudo, são projetadas para reduzir a ativação de TLRs e a inflamação, o que pode atenuar a resposta Th1 (Raman et al., 2012). A quantidade e a qualidade do antígeno produzido pelas duas plataformas vacinais também podem divergir. Proteínas recombinantes já são injetadas prontas, corretamente dobradas e em doses controladas, já o mRNA depende de uma entrega eficiente, estabilidade e tradução eficaz, o que pode comprometer a produção do antígeno. Ainda, a proteína expressa a partir do mRNA pode apresentar dobras incorretas ou formar agregados, o que dificulta seu processamento e apresentação pelas APCs (Leong; Tham; Poh, 2025).

Nos protocolos heterólogos testados, foram observados baixos níveis de IL-10, o que pode estar relacionado à presença da proteína recombinante no esquema vacinal. A apresentação de antígenos via MHC classe II, característica da imunização com proteínas, favorece essa resposta mista, com produção de IFN- γ e de IL-10. Estudos prévios com vacinas baseadas em proteína recombinante mostram que, embora seja induzida uma resposta Th1 robusta, evidenciada por altos níveis de IFN- γ , frequentemente ocorre produção moderada de IL-10 como parte de mecanismos regulatórios, mesmo quando os adjuvantes favorecem o perfil Th1. Isso foi descrito na imunização com a proteína recombinante piridoxal quinase (PK) adjuvantada com saponina, e em proteínas ribossomais com CpG, que evidenciou equilíbrio entre citocinas inflamatórias e regulatórias em diferentes linhagens murinas (Garde et al., 2018;

Oliveira-da-Silva et al., 2020). Também nos protocolos heterólogos, foi visto que os níveis de IFN- γ aumentam juntamente com a quantidade de doses de proteína administrada. Esse achado corrobora com os dados da única vacina de mRNA testada, onde a combinação de mRNA e proteína induziu a produção de maiores níveis de IFN- γ (Duthie et al., 2018). Uma vacina de mRNA contra *Trypanosoma cruzi* ao ser combinada com a proteína recombinante também mostrou um aumento na produção de citocinas inflamatórias. Esses estudos também evidenciaram que a ordem de administração das formulações interfere nos níveis de citocinas (Poveda et al., 2023). Esses achados reforçam que a plataforma vacinal não apenas modula a magnitude da resposta imune, mas também sua qualidade.

Um importante ponto de discussão tem sido o tipo do desafio empregado. Estudos comparativos mostraram que candidatos vacinais que induziam um perfil de resposta Th1 e apresentavam proteção em desafio feito por injeção de parasitas cultivados passaram a não proteger quando o desafio era feito através da picada do flebotomíneo (Hohman; Peters, 2019). Isso demonstra a importância de proteínas presentes na saliva dos flebotomíneos para uma resposta Th1 protetora e duradoura e questiona a eficácia de vacinas que protegem contra o desafio feito por injeções (Belkaid et al., 1998). Entretanto, por questões de viabilidade, avaliamos a proteção conferida por cada protocolo vacinal frente ao desafio feito com injeções de promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou de *L. infantum*.

Os resultados obtidos com o protocolo homólogo de três doses e o protocolo de duas doses apresentaram inconsistências entre as replicatas: enquanto uma delas indicou proteção contra *L. amazonensis*, a outra não demonstrou efeito protetivo. Esses dados nos levam a questionar se o modelo de desafio adotado é, de fato, o mais apropriado, e ressaltam a necessidade de otimizações metodológicas para alcançar resultados mais consistentes e reprodutíveis. Neste estudo, o desafio foi realizado na almofada plantar da pata traseira dos camundongos, uma escolha adotada pela facilidade no acompanhamento da progressão da lesão. No entanto, a orelha ou a base da cauda, também podem ser utilizadas. A orelha tem sido apontada como um local que melhor mimetiza a infecção natural, por apresentar características imunológicas e estruturais mais próximas da pele exposta à picada do vetor. Já a cauda, embora permita fácil mensuração da lesão, apresenta como limitação a dificuldade de obtenção de tecido lesional suficiente para a quantificação posterior da carga parasitária (Sacks; Melby, 2001).

Outro ponto de incerteza foi a duração do desafio. Neste trabalho, inicialmente optamos por nove semanas, mas posteriormente reduzimos o período para seis semanas. Observamos que, a partir da sexta semana, as lesões atingiram seu pico, com início de ulceração e aumento acentuado de tamanho. Ao final das nove semanas, era evidente a presença de necrose tecidual extensa, o que poderia comprometer a diluição limitante, devido à degradação do tecido e à possível perda de viabilidade parasitária. O método de quantificação empregado, no caso, a diluição limitante, também é alvo de dúvidas. Há um consenso na literatura sobre as limitações dessa técnica na quantificação da *Leishmania*, principalmente por sua falta de precisão e viés humano, visto isso, buscamos técnicas mais modernas que oferecessem uma maior sensibilidade (Ghotloo et al., 2015). Em experimentos não apresentados neste trabalho, utilizamos uma cepa de *L. amazonensis* expressando luciferase com o objetivo de quantificar a carga parasitária por meio de ensaios de bioluminescência *in vitro* e *in vivo* (Reimão et al., 2013). No entanto, essas abordagens demonstraram baixa sensibilidade, limitando sua aplicabilidade no modelo adotado. Também realizamos a quantificação parasitária por qPCR utilizando *primers* direcionados a uma região degenerada do kDNA de minicírculos de *Leishmania* (Moura et al., 2024). Embora a amplificação do DNA tenha sido detectada, não observamos diferenças significativas entre os grupos imunizados e não imunizados, sugerindo a necessidade de otimização da reação para melhorar sua sensibilidade e especificidade.

A falha do protocolo homólogo de três doses e o protocolo de duas doses em conferir proteção em uma das replicatas experimentais pode ter se dado devido aos baixos níveis de citocinas inflamatórias como o IFN- γ que, como se sabe, é fundamental na ativação de macrófagos, sendo considerado o marcador clássico de indução de resposta Th1 protetora em modelos de leishmaniose. Ainda, a *Leishmania* é capaz de subverter a resposta imune adaptativa ao impedir a reativação de células de memória, prejudicando a eficácia de respostas protetoras mesmo após imunizações que induzem memória imunológica. Diante disso, torna-se ainda mais preocupante a situação em que a resposta vacinal é incapaz de gerar memória robusta, pois a subversão imunológica promovida pelo parasita tende a ser ainda mais eficiente, favorecendo a persistência e disseminação da infecção (Soong, 2012). Observou-se que a proteção parcial obtida nos protocolos heterólogos de três doses está relacionada, como esperado, ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1, coordenada por IFN- γ .

A fim de entender a abrangência da vacina de mRNA codificando o antígeno LinKAP, decidimos testá-la contra a leishmaniose visceral. Para isso, necessitamos mudar o modelo,

agora usando camundongos BALB/c. A análise da resposta imune humoral revelou que a produção de anticorpos específicos do tipo IgG total, bem como das subclasses IgG1 e IgG2a, induzida pela imunização com a proteína rLinKAP, apresentou concordância com os resultados descritos por De Oliveira et al. (2025). Entretanto, a imunização com o mesmo mRNA LinKAP não induziu respostas imunes no modelo de BALB/c. Sabe-se que cada linhagem expressa diferentes alelos de MHC, o que determina quais epítomos são apresentados às células T. Um estudo analisou peptídeos ligados ao MHC de classe II de camundongos BALB/c e C57BL/6 e identificou motivos de ligação diferentes entre as linhagens, confirmando que cada uma possui distintos epítomos entre si (Sofron et al., 2016). É possível que o produto de nosso mRNA LinKAP não seja apresentado de forma eficaz pelo MHC de camundongos BALB/c, afetando a ativação de células T CD4⁺ e, conseqüentemente, a resposta de anticorpos. Essa observação está em concordância com outros estudos, onde a falha da resposta imune e a ativação desigual de células T CD4⁺ em linhagens murinas diferentes se deu pela restrição de epítomos pelos respectivos MHCs (Herath et al., 2016; Misharin; Rapoport; Mclachlan, 2009).

O perfil de produção de citocinas induzidas pela imunização com a proteína rLinKAP mostrou uma resposta mista, evidenciada por altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pelos níveis moderados de citocinas anti-inflamatórias. A presença das citocinas anti-inflamatórias é um achado novo, que não foi descrito nos ensaios realizados por De Oliveira et al. (2025) com a proteína rLinKAP.

É sabido que proteínas recombinantes que apresentam predominância de epítomos de células B, principalmente aqueles organizados de forma repetitiva, tendem a induzir uma resposta humoral mais robusta, com menor ativação de respostas celulares do tipo Th1. Já foi demonstrado que antígenos com muitos epítomos de células B e poucos de células T induzem uma resposta Th2, com níveis mais altos de IL-4 e IgG1 e baixos níveis de IFN- γ e IgG2a/2c (Yang et al., 2016a). Como a eficácia vacinal contra *Leishmania* é fortemente dependente da ativação por respostas Th1 mediadas por células T CD4⁺ e CD8⁺, não é uma surpresa que uma vacina baseada em um antígeno que possui muitos epítomos de B, como a LinKAP, não promova uma ativação adequada de células T.

Os resultados deste trabalho abrem importantes perspectivas para o desenvolvimento e aprimoramento de estratégias vacinais utilizando mRNA contra *Leishmania*. Estudos adicionais devem ser feitos para esclarecer a resposta imune e a proteção geradas pelo protocolo homólogo de três doses e pelo de duas doses, bem como a avaliação do perfil de memória imunológica

gerada por cada plataforma vacinal. Outra abordagem promissora consiste no aprimoramento da formulação de vacina de mRNA, por meio da troca de lipídios ionizáveis ou pela adição de adjuvantes imunomodulatórios que favoreçam a indução de uma resposta Th1. Como perspectivas, um mRNA codificante para IL-12 será encapsulado juntamente com o antígeno vacinal, com o objetivo de potencializar a indução de células T CD4⁺ do subtipo Th1, bem como de células T CD8⁺ citotóxicas efetoras (Aunins et al., 2025).

Ainda, serão encapsulados o mRNA codificante de outros dois antígenos, a proteína KAPA2 e a Amastina. A proteína KAPA2 recombinante é uma quimera formada por LinKAP e A2, que tem demonstrado potencial como vacina terapêutica (dados não publicados). No entanto, considerando que se trata da fusão de duas proteínas altamente repetitivas, existe o risco de que esse antígeno, assim como o LinKAP isolado, induza predominantemente uma resposta imune humoral. Já a Amastina é uma proteína de membrana expressa na forma amastigota de *Leishmania*, sendo essencial para a sobrevivência do parasita no ambiente intracelular do fagolisossomo (Rochette et al., 2005). Por estar envolvida em mecanismos de adaptação e por sua alta expressão durante a fase infectiva, ela representa um alvo promissor para a indução de respostas imunes do tipo Th1 e citotóxicas. Apenas uma alça extracelular da Amastina será codificada pelo mRNA, com o objetivo de evitar potenciais efeitos adversos associados aos domínios transmembranares. Outra perspectiva relevante é o redesenho do antígeno vacinal, com foco na otimização de epítomos que sejam reconhecidos por células T CD4⁺ e CD8⁺ para uma melhora da resposta celular induzida.

6. CONCLUSÃO

- Células de mamífero transfectadas com as formulações de mRNA expressam a proteína LinKAP, entretanto, com uma massa molecular aparente que sugere a formação de agregados;
- Imunização com protocolo de três doses de mRNA LinKAP ou proteína direcionam a resposta humoral para perfis distintos de produção de anticorpos, com níveis distintos de produção de IFN- γ ;
- Imunização com protocolo heterólogo de três doses combinando mRNA LinKAP e proteína indica que o número de doses de proteína influencia no perfil de produção de anticorpos e na produção de IFN- γ , e resultam em proteção similar ao desafio com *L. amazonensis*;
- Imunização com protocolo de duas doses de mRNA LinKAP e proteína resulta em um perfil distinto de produção de anticorpos e níveis similares de IFN- γ ;
- Imunização de BALB/c com protocolo homólogo de três doses de mRNA LinKAP ou proteína resultou na produção de anticorpos e de citocinas pró-inflamatórias somente no grupo imunizado com proteína, grupo que apresentou proteção parcial ao desafio com *L. infantum*.

7. PERSPECTIVAS

- Repetição dos experimentos de imunização e desafio realizados com o protocolo homólogo de três doses, bem como com os protocolos de duas doses;
- Otimização dos protocolos de quantificação de carga parasitária usando *L.amazonensis* expressando luciferase, e do protocolo de qPCR;
- Associação de mRNA codificante para IL-12 com o antígeno vacinal, com o objetivo de potencializar a indução de células T CD4⁺ do subtipo Th1, bem como de células T CD8⁺ citotóxicas efectoras (Aunins et al., 2025);
- Redesenho do antígeno vacinal, com foco na otimização de epítomos que sejam reconhecidos por células T CD4⁺ e CD8⁺ para uma melhora da resposta celular induzida;
- Teste de novos candidatos vacinais: mRNA de KAPA2 (uma quimera de LinKAP + A2) e Amastina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DAYYEH, Issa *et al.* Leishmania-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 12, 2008.

ABU-DAYYEH, Issa *et al.* Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2438–2445, jun. 2010.

ALVAR, Jorge *et al.* **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** **PLoS ONE**, 31 maio 2012.

ARENAS, Roberto *et al.* **Leishmaniasis: A review.** **F1000Research** Faculty of 1000 Ltd, , 2017.

ARONSON, Naomi *et al.* **Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH).** **Clinical Infectious Diseases** Oxford University Press, , 15 dez. 2016.

ARRUDA, Hiam R. S. *et al.* Conformational stability of SARS-CoV-2 glycoprotein spike variants. **iScience**, v. 26, n. 1, 20 jan. 2023.

AUNINS, Emily A. *et al.* **An Il12 mRNA-LNP adjuvant enhances mRNA vaccine-induced CD8 T cell responses** **Sci. Immunol.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

AYALA, Andreina *et al.* **Advances in Leishmania Vaccines: Current Development and Future Prospects.** **Pathogens** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2024.

BACALLAR, Olívia *et al.* Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 1 jul. 2009.

BACELLAR, Olívia *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, dez. 2002.

BALASEGARAM, Manica *et al.* **Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. Expert Opinion on Emerging Drugs**, dez. 2012.

BELKAID, Yasmine *et al.* **Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of Leishmania major Infection in the Mouse Ear Dermis**The **Journal of Experimental Medicine** •. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.jem.org>>.

BHATTACHARYA, Pradyot *et al.* Induction of IL-10 and TGF β from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with Leishmania donovani. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2016.

BHATTACHARYYA, Sandip *et al.* **Selective impairment of protein kinase C isoforms in murine macrophage by Leishmania donovani**Molecular and Cellular Biochemistry. [S.l.: S.n.].

BLANCHETTE, Julie *et al.* Regulation of macrophage nitric oxide production by the protein tyrosine phosphatase Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1 (SHP-1). **Immunology**, v. 127, n. 1, p. 123–133, maio 2009.

BRYCESON, Anthony. **A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance.** [S.l.: S.n.].

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. **Leishmaniasis. The Lancet**Lancet Publishing Group, , 15 set. 2018.

CANNARROZZI, Gina *et al.* A role for codon order in translation dynamics. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 355–367, 2010.

CARDOSO, Thiago Marconi *et al.* Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.

CARRASCO, Manuel J. *et al.* Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2021.

CARVALHO VIVARINI, Áislan *et al.* Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 12, p. 4162–4173, dez. 2011.

CAVALCANTE, R. R.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. **Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 87–93, 1 jul. 2003.

CECÍLIO, Pedro; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; OLIVEIRA, Fabiano. **Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites.** **Communications Biology** Nature Research, , 1 dez. 2022.

CHAKRABORTY, Debabani *et al.* ***Leishmania donovani* Affects Antigen Presentation of Macrophage by Disrupting Lipid Rafts 1** **The Journal of Immunology**. [S.l.: S.n.].

CHAUDHARY, Namit; WEISSMAN, Drew; WHITEHEAD, Kathryn A. **mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation.** **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Research, , 1 nov. 2021.

COLEMAN, Michael *et al.* DDT-based indoor residual spraying suboptimal for visceral leishmaniasis elimination in India. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 28, p. 8573–8578, 14 jul. 2015.

CORBETT, Cep *et al.* **The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with Leishmania (Leishmania) chagasi** *Int. J. Exp. Path.* [S.l.: S.n.].

CORBETT, Kizzmekia S. *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 567–571, 22 out. 2020.

COURRET, Nathalie *et al.* **Presentation of the Leishmania antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites.** [S.l.: S.n.].

DE MELLO, Mirian França *et al.* Efficacy of LaAg Vaccine Associated with Saponin Against *Leishmania amazonensis* Infection. **Vaccines**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2025.

DE OLIVEIRA, Bianca *et al.* Characterization of a novel *Leishmania* antigen containing a repetitive domain and its potential use as a prophylactic and therapeutic vaccine . **mSphere**, v. 10, n. 5, 27 maio 2025.

DE VEER, Michael J. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 10, p. 2822–2831, out. 2003.

DELGADO-DOMÍNGUEZ, J. *et al.* *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 6, p. 440–449, jun. 2010.

DOMÍNGUEZ, Mercedes *et al.* **Complement Interaction with Trypanosomatid Promastigotes in Normal Human Serum.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/content/full/195/4/451>>.

DUTHIE, Malcolm S. *et al.* Heterologous immunization with defined RNA and subunit vaccines enhances T cell responses that protect against *Leishmania donovani*. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, 17 out. 2018.

DUTHIE, Malcolm S. *et al.* **Leishmaniasis Vaccines: Applications of RNA Technology and Targeted Clinical Trial Designs.** **Pathogens** MDPI, , 1 nov. 2022.

ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430–442, 1 abr. 2018.

FARIA, Marília S. *et al.* *Leishmania* Inhibitor of Serine Peptidase 2 Prevents TLR4 Activation by Neutrophil Elastase Promoting Parasite Survival in Murine Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 411–422, 1 jan. 2011.

FERNANDES, Renata S. *et al.* The immunogenic potential of an optimized mRNA lipid nanoparticle formulation carrying sequences from virus and protozoan antigens. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2025.

FERREIRA, Viviana P. *et al.* SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Scientific Reports**, v. 6, 13 jan. 2016.

GAKIDOU, Emmanuela *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1345–1422, 2017.

GARDE, Esther *et al.* Analysis of the antigenic and prophylactic properties of the Leishmania translation initiation factors eIF2 and eIF2B in natural and experimental leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. APR, 5 abr. 2018.

GE, Ningning *et al.* An mRNA vaccine encoding Chikungunya virus E2-E1 protein elicits robust neutralizing antibody responses and CTL immune responses. **Virologica Sinica**, v. 37, n. 2, p. 266–276, 1 abr. 2022.

GEALL, Andrew J. *et al.* Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 36, p. 14604–14609, 4 set. 2012.

GERMANÓ, María José *et al.* Identification of Immunodominant Antigens From a First-Generation Vaccine Against Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 12 maio 2022.

GHOSH, June *et al.* Liposomal cholesterol delivery activates the macrophage innate immune arm to facilitate intracellular leishmania donovani killing. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 607–617, fev. 2014.

GHOTLOO, Somayeh *et al.* **Comparison of Parasite Burden Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay and Limiting Dilution Assay in Leishmania major Infected Mouse.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://ijpa.tums.ac.ir>>.

GONZALEZ-LOMBANA, Claudia *et al.* IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following Leishmania major Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

GOTE, Vrinda *et al.* **A Comprehensive Review of mRNA Vaccines.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 fev. 2023.

GUERIN, Philippe J. *et al.* **Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda.** *Lancet Infectious Diseases* Lancet Publishing Group, , 2002.

GUIMARÃES-COSTA, Anderson B.; NASCIMENTO, Michelle T. C.; FROMENT, Giselle S.; SOARES, Rodrigo P. P.; MORGADO, Fernanda N.; CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; SARAIVA, Elvira M. **Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, Washington, v. 106, n. 16, p. 6748-6753, Apr. 2009.

HASSETT, Kimberly J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 15, p. 1–11, 15 abr. 2019.

HASSETT, Kimberly J. *et al.* Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. **Journal of Controlled Release**, v. 335, p. 237–246, 10 jul. 2021.

HEKELE, Armin *et al.* Rapidly produced SAM[®] vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. **Emerging Microbes and Infections**, v. 2, 2013.

HERATH, S. *et al.* Strain-dependent and distinctive T-cell responses to HIV antigens following immunisation of mice with differing chimpanzee adenovirus vaccine vectors. **Vaccine**, v. 34, n. 37, p. 4378–4385, 17 ago. 2016.

HOHMAN, Leah S.; PETERS, Nathan C. **CD4+ T Cell-Mediated Immunity against the Phagosomal Pathogen Leishmania: Implications for Vaccination.** *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2019.

HOLM, A. Ê. *et al.* **Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCa and defective phagosome maturation** *Cellular Microbiology*. [S.l.: S.n.].

KAYE, Paul M. *et al.* Vaccine value profile for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 41, p. S153–S175, 3 nov. 2023.

KIM, Dae Hyun *et al.* Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, 2009.

KROPF, Pascale *et al.* Toll-Like Receptor 4 Contributes to Efficient Control of Infection with the Protozoan Parasite *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1920–1928, 2004.

KULKARNI, Jayesh A. *et al.* On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. **ACS Nano**, v. 12, n. 5, p. 4787–4795, 22 maio 2018.

KUNKEAW, Nawapol *et al.* A Pvs25 mRNA vaccine induces complete and durable transmission-blocking immunity to *Plasmodium vivax*. **npj Vaccines**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2023a.

KUNKEAW, Nawapol *et al.* A Pvs25 mRNA vaccine induces complete and durable transmission-blocking immunity to *Plasmodium vivax*. **npj Vaccines**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2023b.

LEONG, Kai Yuan; THAM, Seng Kong; POH, Chit Laa. **Revolutionizing immunization: a comprehensive review of mRNA vaccine technology and applications**. **Virology Journal** BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2025.

LI, Ting *et al.* Optimizing mRNA translation efficiency through rational 5'UTR and 3'UTR combinatorial design. **Gene**, v. 942, 20 mar. 2025.

LOPEZ KOSTKA, Susanna *et al.* IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 1 mar. 2009.

MALLORY, Katherine L. *et al.* Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

MANCINO, Chiara *et al.* Harnessing RNA Technology to Advance Therapeutic Vaccine Antigens against Chagas Disease. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 16, n. 13, p. 15832–15846, 3 abr. 2024.

MARSDEN, Philip Davis. **ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE Meeting Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911)**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article/80/6/859/1885181>>.

MARTINS, Vivian T. *et al.* A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Cellular Immunology**, v. 313, p. 32–42, 1 mar. 2017.

MELBY, Peter C. *et al.* **Increased Expression of Proinflammatory Cytokines in Chronic Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis**. **INFECTION AND IMMUNITY**. [S.l.: S.n.].

MENDES-SOUSA, Antonio Ferreira *et al.* Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 8 nov. 2013.

MISHARIN, Alexander V; RAPOPORT, Basil; MCLACHLAN, Sandra M. **Thyroid Antigens, Not Central Tolerance, Control Responses to Immunization in BALB=c Versus C57BL=6 Mice**. [S.l.: S.n.].

MOSIMANN, Vincent *et al.* **Miltefosine for mucosal and complicated cutaneous old world leishmaniasis: A case series and review of the literature.** **Open Forum Infectious Diseases** Oxford University Press, , 1 jan. 2016.

MOURA, Dênia Monteiro de *et al.* CD4+ and CD8+ T-cell multi-epitope chimeric protein associated with an MPLA adjuvant induce protective efficacy and long-term immunological memory for the immunoprophylaxis of American Tegumentary Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 42, n. 21, 30 ago. 2024.

NOVAIS, Fernanda O. *et al.* Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, jul. 2013.

ODA, Yoshiaki *et al.* Immunogenicity and safety of a booster dose of a self-amplifying RNA COVID-19 vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 351–360, 1 abr. 2024.

OLIVEIRA-DA-SILVA, João A. *et al.* Leishmania infantum pyridoxal kinase evaluated in a recombinant protein and DNA vaccine to protects against visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 124, p. 161–171, 1 ago. 2020.

OSMAN, Mohamed *et al.* A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, 12 maio 2017.

PACHECO-FERNANDEZ, Thalia *et al.* **Revival of Leishmanization and Leishmanin.** **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 17 mar. 2021.

PAGLIANO, Pasquale; ESPOSITO, Silvano. **Visceral leishmaniosis in immunocompromised host: an update and literature review.** **Journal of Chemotherapy** Taylor and Francis Ltd., , 3 set. 2017.

PARDI, Norbert *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. **Nature**, v. 543, n. 7644, p. 248–251, 9 mar. 2017.

PARK, Hyeong Jun *et al.* Analyzing immune responses to varied mRNA and protein vaccine sequences. **npj Vaccines**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2023.

PATTNAIK, Aryamav; SAHOO, Bikash R.; PATTNAIK, Asit K. **Current status of zika virus vaccines: Successes and challenges.** **Vaccines**MDPI AG, , 1 jun. 2020.

PETERS, Nathan C. *et al.* Chronic Parasitic Infection Maintains High Frequencies of Short-Lived Ly6C+CD4+ Effector T Cells That Are Required for Protection against Re-infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2014.

PETSCH, Benjamin *et al.* Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 1210–1216, dez. 2012.

PICADO, Albert *et al.* Longlasting insecticidal nets for prevention of Leishmania donovani infection in India and Nepal: Paired cluster randomised trial. **BMJ**, v. 342, n. 7788, p. 92, 8 jan. 2011.

POLACK, Fernando 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.

POVEDA, Cristina *et al.* Heterologous mRNA-protein vaccination with Tc24 induces a robust cellular immune response against Trypanosoma cruzi, characterized by an increased level of polyfunctional CD8+ T-cells. **Current Research in Immunology**, v. 4, 1 jan. 2023.

PRADHAN, Supratim *et al.* **Linking membrane fluidity with defective antigen presentation in leishmaniasis.** **Parasite Immunology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jul. 2021.

PRIVÉ, Charles; PRIVÉ, Privé; DESCOTEAUX, Albert. **Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages.** [S.l.: S.n.].

RAMAN, Vanitha S. *et al.* **Adjuvants for Leishmania vaccines: From models to clinical application.** *Frontiers in Immunology*, 2012.

RATH, Arianna *et al.* **Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/content/full/>.

REED, Steven G.; SCOTT, Phillip. **T-cell and cytokine responses in leishmaniasis.** [S.l.: S.n.].

REGUERA, Rosa M. *et al.* Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 48–56, maio 2009.

REIMÃO, Juliana Q. *et al.* Parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected mice: Validation of luciferase as a quantitative tool. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 2, p. 95–101, maio 2013.

REITHINGER, Richard *et al.* **Cutaneous leishmaniasis.** *Lancet Infectious Diseases*, set. 2007.

ROCHE, Paul A.; FURUTA, Kazuyuki. **The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation.** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 25 mar. 2015.

ROCHETTE, Annie *et al.* Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 205–220, 2005.

SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. Chapter 19, 2001.

SERAFIM, Tiago D. *et al.* Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548–555, 1 maio 2018.

SILVA-MOREIRA, Anna Luiza *et al.* **New insights into the life cycle, host cell tropism, and infection amplification of *Leishmania* spp.** **Infection and Immunity** American Society for Microbiology, , 1 jul. 2025.

SMELT, Sara C. *et al.* B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology . **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 1 abr. 2000.

SOFRON, Adriana *et al.* High-resolution analysis of the murine MHC class II immunopeptidome. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 2, p. 319–328, 1 fev. 2016.

SOLOMON, Michal *et al.* Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 2, p. 284–289, fev. 2013.

SOONG, Lynn. **Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*.** **Frontiers in Immunology**, 2012.

TAHTINEN, Siri *et al.* IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 532–542, 1 abr. 2022.

TOKMAKOV, Alexander A. *et al.* Multiple post-translational modifications affect heterologous protein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 32, p. 27106–27116, 3 ago. 2012.

VERBEKE, Rein *et al.* **Innate immune mechanisms of mRNA vaccines.** ImmunityCell Press, , 8 nov. 2022.

VERSTEEG, Leroy *et al.* Immunopeptidomic MHC-I profiling and immunogenicity testing identifies Tcj2 as a new Chagas disease mRNA vaccine candidate. **PLoS Pathogens**, v. 20, n. 12, 1 dez. 2024.

VINET, Adrien F. *et al.* The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, out. 2009.

WANASEN, Nanchaya; XIN, Lijun; SOONG, Lynn. **Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection** *Int J Parasitol.* [S.l.: S.n.].

WILSON, Jude *et al.* Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, out. 2008.

YANG, Hui Jie *et al.* Immunisation with immunodominant linear B cell epitopes vaccine of manganese transport protein c confers protection against staphylococcus aureus infection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2016.

YANG, Ziyang; MOSSER, David M.; ZHANG, Xia. **Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages 1.** [S.l.: S.n.].

9. ANEXOS

Anexo I

Licença LW-12/25 referente ao protocolo P-6./25.1 – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz).



LICENÇA

LW-15/25

Certificamos que o protocolo (P-6/25.1), intitulado "**Vacinas de mRNA contendo sequências de antígenos para Leishmania spp.**", sob a responsabilidade de **RICARDO TOSTES GAZZINELLI**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 12/05/2029 e inclui o uso total de:

Mus musculus

- 936 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 936 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 936 Machos de BALB/c, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).
- 936 Fêmeas de BALB/c, Idade: 6 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 12 de maio de 2025.

Etelcia Molinaro
Coordenadora da CEUA/Fiocruz

Anexo II

Depósito de patente: COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS DE mRNA CONTRA LEISHMANIOSE E USOS

Número do processo: BR 10 2025 003465 4

A presente tecnologia trata de composições imunogênicas compreendendo a sequência de mRNA definida pela SEQ ID N° 1, nanocarreadores lipídicos e excipientes farmacologicamente aceitáveis. Trata também do uso da sequência de mRNA e das composições imunogênicas para produção de vacinas contra leishmaniose. A sequência de mRNA codifica uma proteína recombinante associada ao cinetoplasto de *L. infantum*. As composições imunogênicas contendo o mRNA demonstraram capacidade de induzir resposta imune humoral e reduzir carga parasitária na infecção contra a infecção por *L. amazonensis*. A produção de IgG total foi superior com o uso do mRNA, quando comparado ao uso da proteína recombinante.

INVENTORES: SANTUZA MARIA RIBEIRO TEIXEIRA, RENATA SALGADO FERNANDES, GABRIELA DE ASSIS BURLE-CALDAS, DIEGO DOS SANTOS FERREIRA, RICARDO TOSTES GAZZINELLI, ANA FLÁVIA BRÁZ, MILTON CESAR DE ALMEIDA PEREIRA, TIAGO QUEIROGA NERY RICOTTA, NATÁLIA SATCHIKO HOJO-SOUZA, ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES.

Anexo III

Artigos resultantes do trabalho de dissertação:

Fernandes et al.
Journal of Nanobiotechnology (2025) 23:221
<https://doi.org/10.1186/s12951-025-03201-8>

Journal of Nanobiotechnology

RESEARCH

Open Access



The immunogenic potential of an optimized mRNA lipid nanoparticle formulation carrying sequences from virus and protozoan antigens

Renata S. Fernandes¹, Gabriela de Assis Burtle-Caldas^{1†}, Sarah Aparecida Rodrigues Sergio¹, Ana Flávia Bráz¹, Nathália Pereira da Silva Leite¹, Milton Pereira¹, Juliana de Oliveira Silva^{1,2}, Natália Satchiko Hojo-Souza^{1,3}, Bianca de Oliveira¹, Ana Paula S. Moura Fernandes^{1,6}, Flávio Guimarães da Fonseca^{1,4}, Ricardo Tostes Gazzinelli^{1,3,5}, Diego dos Santos Ferreira^{1,2} and Santuza M. Ribeiro Teixeira^{1,5*}

Abstract

Background Lipid nanoparticles (LNP) are a safe and effective messenger RNA (mRNA) delivery system for vaccine applications, as shown by the COVID-19 mRNA vaccines. One of the main challenges faced during the development of these vaccines is the production of new and versatile LNP formulations capable of efficient encapsulation and delivery to cells *in vivo*. This study aimed to develop a new mRNA vaccine formulation that could potentially be used against existing diseases as well as those caused by pathogens that emerge every year.

Results Using firefly luciferase (Luc) as a reporter mRNA, we evaluated the physical–chemical properties, stability, and biodistribution of an LNP-mRNA formulation produced using a novel lipid composition and a microfluidic organic-aqueous precipitation method. Using mRNAs encoding a dengue virus or a *Leishmania infantum* antigen, we evaluated the immunogenicity of LNP-mRNA formulations and compared them with the immunization with the corresponding recombinant protein or plasmid-encoded antigens. For all tested LNP-mRNAs, mRNA encapsulation efficiency was higher than 85%, their diameter was around 100 nm, and their polydispersity index was less than 0.3. Following an intramuscular injection of 10 µg of the LNP-Luc formulation in mice, we detected luciferase activity in the injection site, as well as in the liver and spleen, as early as 6 h post-administration. LNPs containing mRNA encoding virus and parasite antigens were highly immunogenic, as shown by levels of antigen-specific IgG antibody as well as IFN-γ production by splenocytes of immunized animals that were similar to the levels that resulted from immunization with the corresponding recombinant protein or plasmid DNA.

Conclusions Altogether, these results indicate that these novel LNP-mRNA formulations are highly immunogenic and may be used as novel vaccine candidates for different infectious diseases.

Keywords mRNA vaccine, Lipid nanoparticles, Dengue, Leishmaniasis, Biodistribution, IgG, IFNγ