

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

Isabela Vieira da Costa

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE RNA PARA LEISHMANIOSE E
COMPARAÇÃO COM UMA VACINA BASEADA EM ANTÍGENO
RECOMBINANTE**

Belo Horizonte

2023

Isabela Vieira da Costa

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE RNA PARA LEISHMANIOSE E
COMPARAÇÃO COM UMA VACINA BASEADA EM ANTÍGENO
RECOMBINANTE**

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 Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Santuza Maria Ribeiro
Teixeira

Coorientadora: Dr^a. Gabriela Burle

Belo Horizonte

2023

043

Costa, Isabela Vieira da.

Desenvolvimento de uma vacina de RNA para leishmaniose e comparação com uma vacina baseada em antígeno recombinante [manuscrito] / Isabela Vieira da Costa. – 2023.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Santuza Maria Ribeiro Teixeira. Coorientadora: Dr^a. Gabriela Burle.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Imunoterapia Ativa. 3. Leishmaniose. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Vacinas. I. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. II. Burle, Gabriela. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



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 ISABELA VIEIRA DA COSTA. Aos vinte dias do mês de outubro de 2023 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, 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 “Desenvolvimento de uma vacina de RNA para leishmaniose e comparação com uma vacina baseada em antígeno recombinante”, 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^a. 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: Dra. Claudia Ida Brodskyn (Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (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, 20 de outubro de 2023.


Dra. Claudia Ida Brodskyn (Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA)

Documento assinado digitalmente
 CLAUDIA IDA BRODSKYN
 Data: 23/10/2023 10:00:47-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Documento assinado digitalmente
 HELTON DA COSTA SANTIAGO
 Data: 23/10/2023 10:19:14-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 GABRIELA DE ASSIS BURLE CALDAS
 Data: 23/10/2023 11:38:19-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)

Documento assinado digitalmente
 SANTUZA MARIA RIBEIRO TEIXEIRA
 Data: 23/10/2023 10:28:31-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Santuza Teixeira por confiar em mim para realização deste projeto, pelo constante incentivo e pelos diversos ensinamentos! À minha coorientadora Dra. Gabriela Burle por toda ajuda na realização deste trabalho, pelo apoio e pelos diversos ensinamentos! Aos coordenadores do CT Vacinas Profa. Dra. Ana Paula Fernandes, Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli e Prof. Dr. Flávio Guimarães pelas importantes contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do CT Vacinas por todos os momentos compartilhados ao longo desses anos e por todo o suporte, apoio e incentivo! Aos colegas Wellington, Júlia Castro, Dra. Renata Salgado, Ana Flávia e Dra. Bianca por me ajudarem nos experimentos com animais. Ao Dr. Alex pela ajuda na realização da qPCR. À Dra. Flávia Fonseca pela ajuda nos ELISAS. À Dra Ludmila por me acompanhar na expressão e purificação da proteína recombinante. À Tânia pela ajuda na manutenção das culturas de células de mamífero.

Ao Dr. Frederico Crepaldi por me ajudar nos experimentos com *Leishmania*. Aos colegas do Laboratório da profa. Ana Paula na Faculdade de Farmácia, Tiago, Dra. Liliane, Itaciara e Daniela pela ajuda.

Ao Prof. Dr. Diego Ferreira e a Dra. Renata Salgado por suas contribuições no desenvolvimento das nanopartículas lipídicas.

Aos colegas do Laboratório da professora Santuza no ICB Carlos, Marina, Dra. Nailma e Renata pela paciência e toda a ajuda.

Ao Dr. Rodrigo Soares do CpqRR-Fiocruz pela doação das *L. amazonensis* expressando luciferase. Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira da USP pela doação do plasmídeo para síntese do RNA expressando luciferase. Ao Prof. Dr. João Trindade Marques do ICB pelas discussões e contribuições científicas para esse trabalho e pela doação de anticorpo.

Ao CNPq pelo fomento que possibilitou a realização desse trabalho.

À minha família, a minha mãe Maria de Fátima e o meu pai Josué, por sempre apoiarem minhas escolhas. Aos meus irmãos Acácio, Arlete, Regina e Raquel pelo companheirismo e por terem sido minha fonte de inspiração. Aos meus cunhados Leonácio, Keoma, Joelma e Ricardo pelo apoio e amizade. Aos meus sobrinhos, Inácio, José e Catarina por todo amor e carinho. E, agradeço a minha avó Albertina (*in memoriam*) por ser meu exemplo de sabedoria e força!

Às minhas colegas de república Laís, Jéssica e Bianca pela amizade e companhia.

A todos meus familiares e amigos que me apoiaram e de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui!

Agradeço a Deus por me dar força e determinação para chegar até aqui!

RESUMO

As leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas e constituem um problema de saúde pública em diversos locais do mundo, atingindo cerca de 700.000 novos casos a cada ano. Embora a vacinação seja uma estratégia promissora para combater estas doenças, ainda não existe uma vacina disponível para humanos. Vacinas de RNA ganharam importante destaque durante a pandemia da Covid-19, emergindo como uma nova plataforma para o desenvolvimento de vacinas contra outras doenças. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a vacina de proteína recombinante baseada em um novo antígeno de *Leishmania* identificado em um estudo de imunoproteômica, denominado como DTL8, resultou em uma proteção parcial em camundongos BALB/c desafiados com *L. infantum*. Com o objetivo de melhorar a resposta protetora induzida por esse antígeno, propusemos avaliar sua eficácia em outra plataforma vacinal. Neste trabalho, foi desenvolvida uma vacina de RNA expressando o antígeno DTL8. Para isso, o mRNA DTL8 foi encapsulado em nanopartículas lipídicas (LNPs) desenvolvidas pelo CTVacinas. Comparando a imunização com o mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs, em relação a imunização com o RNA encapsulado em LNPs similares às da vacina para Covid-19 da Moderna, observamos que não houve diferença na resposta humoral e celular induzidas por ambas formulações. Para avaliar a resposta imune e a proteção induzidas pela vacina de RNA e comparar com a resposta imune e proteção induzidas pela vacina de proteína recombinante (rDLT8), camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses da proteína rDLT8 e Poly (ICLC) como adjuvante, e desafiados com *L. infantum*. Observamos que houve uma maior produção de anticorpos IgG total nos animais imunizados com a proteína recombinante, em relação aos animais imunizados com o mRNA DTL8. Além disso, após desafio com *L. infantum*, houve uma redução parcial na carga parasitária apenas no baço dos animais imunizados com a proteína recombinante DTL8. Para avaliar a resposta imune e a proteção induzidas pela vacina de RNA e comparar com a resposta imune e proteção induzida pela vacina de proteína recombinante contra leishmaniose tegumentar, camundongos C57BL/6 foram imunizados com 3 doses das vacinas e desafiados com *L. amazonensis* expressando luciferase. Observamos que houve uma produção semelhante de anticorpos IgG total nos animais imunizados, tanto com a proteína recombinante, como com a o mRNA DTL8. Além disso, após desafio foi observada uma redução parcial na carga parasitária na pata dos animais de forma semelhante entre os imunizados com o mRNA DTL8 e com a proteína recombinante DTL8. Com base nesses resultados, podemos concluir que a imunização com o mRNA DTL8 induziu uma resposta protetora equivalente a imunização com rDLT8, quando avaliadas em um modelo de leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: vacina de RNA, antígeno DTL8, leishmanioses, vacina de proteína recombinante.

ABSTRACT

Leishmaniasis are classified as neglected tropical diseases and constitute a public health issue in various regions of the world with approximately 700,000 new cases each year. Although vaccination holds promise as an effective strategy against these diseases, there is currently no available vaccine for humans. During the Covid-19 Pandemic the RNA vaccines have emerged as lead candidates due to their speed of development and high degree of efficacy. In a previous work of our research group, the recombinant protein vaccine based on a novel leishmania antigen identified in an immunoproteomic study, designated as DTL8, yielded partial protection in BALB/c mice challenged with *L. infantum*. With the aim of enhancing the protective response induced by this antigen, we decided to evaluate its efficacy using an alternative vaccine platform. In this study, an RNA vaccine expressing the DTL8 antigen was developed. To achieve this, the mRNA DTL8 was encapsulated in lipid nanoparticles (LNPs) developed by CTVacinas. Comparing immunization with mRNA DTL8 encapsulated in the LNPs developed by CTVacinas to immunization with RNA encapsulated in LNPs similar to those used in the Moderna COVID-19 vaccine, we observed no significant difference in the humoral and cellular responses induced by both formulations. To evaluate the immune response and protection induced by the RNA vaccine and compare it to the immune response and protection induced by the recombinant protein (rDTL8), BALB/c mice were immunized with three doses of rDTL8 protein and Poly (ICLC) as an adjuvant, and then challenged with *L. infantum*. It was observed a higher production of total IgG antibodies in animals immunized with the recombinant protein as compared to those immunized with mRNA DTL8. Furthermore, after challenge with *L. infantum*, there was a partial reduction in parasitic load only in the spleens of animals immunized with the recombinant DTL8 protein. To evaluate the immune response and protection induced by the RNA vaccine and compare it to the immune response and protection induced by the recombinant protein vaccine against tegumentary leishmaniasis, C57BL/6 mice were immunized with three doses of the vaccines and challenged with *L. amazonensis* expressing luciferase. It was found that there was a similar production of total IgG antibodies in animals immunized with both the recombinant protein and mRNA DTL8. Moreover, following challenge with *L. amazonensis*, a partial reduction in parasitic load in the mice footpad was observed, with similar results for mice immunized with mRNA DTL8 and those receiving the recombinant DTL8 protein. Based on these results, we can conclude that immunization with mRNA DTL8 induces a protective response equivalent to that of immunization with recombinant DTL8 protein when tested in a model of tegumentary leishmaniasis.

Keywords: RNA vaccine, DTL8 antigen, leishmaniasis, recombinant protein vaccine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Leishmanioses	9
1.1.1 <i>Leishmania</i> – o parasito e seu ciclo biológico	11
1.1.2 Resposta imune do hospedeiro vertebrado na infecção por <i>Leishmania</i>	12
1.1.3 Tratamentos e vacinas contra Leishmanioses	14
1.2 Vacinas de RNA mensageiro (mRNA)	16
1.2.1 <i>Delivery</i> do mRNA	17
1.2.2 Resposta imune induzida pelas vacinas de RNA	19
1.3 Antígeno DTL8	21
OBJETIVOS	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
2 METODOLOGIA	25
2.1 Síntese do RNA Mensageiro	25
2.2 Transfecção de células HEK293T com o mRNA DTL8	26
2.3 <i>Western blot</i> para avaliar expressão do antígeno DTL8	26
2.4 Formulação do mRNA DTL8 em nanopartículas lipídicas	27
2.5 Expressão da proteína rDTL8 em células procariotas	27
2.6 Purificação da proteína DTL8 recombinante por cromatografia	28
2.7 Animais	28
2.8 Parasitos	28
2.9 Imunização e desafio de camundongos	29
2.10 Cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas	29
2.11 Testes imunoenzimáticos	30
2.12 Avaliação da carga parasitária por meio de diluição limitante e qPCR	31
2.13 Medida do tamanho da lesão	31
2.14 Extração do DNA para qPCR	32
2.15 Avaliação da carga parasitária pela atividade de luciferase	32
2.16 Análises estatísticas	33
3 RESULTADOS	34
3.1 Obtenção da proteína DTL8 recombinante	34
3.2 Obtenção do mRNA contendo a sequência do antígeno DTL8	35
3.2.1 Síntese <i>in vitro</i> e purificação do mRNA DTL8	35
3.2.2 Análise da expressão do antígeno DTL8 após transfecção de células com mRNA	37
3.3 Potencial vacinal do mRNA codificando o antígeno DTL8	38
3.3.1 Resposta humoral induzida pela imunização de camundongos C57BL/6 com a LNP_RNA DTL8	38
3.3.2 Comparação entre a resposta imune gerada pela imunização de C57BL/6 com a LNP_RNA DTL8 e pela imunização com a proteína DTL8 recombinante	42
3.3.3 Comparação entre a resposta imune gerada pela imunização de BALB/c com a LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante	45
3.3.4 Comparação da resposta humoral em camundongos BALB/c imunizados com LNP_RNA DTL8 purificado em coluna de celulose e por extração com fenol	47
3.3.5 Avaliação da proteção conferida pela imunização com a LNP_RNA DTL8 e comparação com a proteção conferida pela imunização com a proteína DTL8 recombinante em BALB/c infectados com <i>L. infantum</i>	48
3.3.6 Testes de bioluminescência na infecção com <i>L. amazonensis</i> expressando luciferase	50

3.3.7 Avaliação da resposta imune e da proteção conferida pela imunização com a LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante em C57BL/6 infectados com <i>L. amazonensis</i> expressando luciferase	52
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

Leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e sua transmissão para o hospedeiro ocorre durante o repasto sanguíneo de insetos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (ANDRADE-NARVÁEZ *et al.*, 2001; KUMAR e NYLÉN, 2014; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). As manifestações clínicas dessas enfermidades variam de acordo com a espécie causadora da infecção, sendo algumas das principais formas: Leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (CLABORN, 2010; GASPARI *et al.*, 2022).

Na leishmaniose visceral, os principais agentes causadores são as espécies de *L. donovani* e a *L. infantum* (KUMAR e NYLÉN, 2014). Após ser introduzido no organismo do hospedeiro, o parasito atinge as células do sistema reticuloendotelial e se infiltra em órgãos internos como o baço, o fígado, a medula óssea e os linfonodos (VAN GRIENSVEN E DIRO, 2012). Uma vez estabelecida, essa doença pode provocar sintomas como febre, perda de peso, palidez, anorexia, tosse, dor abdominal e diarreia (QUEIROZ *et al.*, 2004). Além disso, um aspecto clínico característico da LV é o aumento do baço e do fígado, conhecido como hepatoesplenomegalia, o qual está mostrado na **Figura 1A** (COSTA *et al.*, 2023). Estima-se que ocorram de 50.000 a 90.000 novos casos de LV por ano no mundo todo e, caso não tratada, essa enfermidade pode levar a óbito (WHO, 2023; FORRESTER *et al.*, 2022).

A leishmaniose tegumentar é a forma clínica com maior prevalência no mundo, atingindo de 600.000 a 1 milhão de novos casos anualmente (DE VRIES e SCHALLIG, 2022). A LT se manifesta como lesões expostas na pele e é causada, principalmente, por *Leishmania amazonensis* (BRUSTOLIN *et al.*, 2022), *L. major* (TAWFEEQ e ALI, 2022), *L. braziliensis*, *L. tropica* (ROBLEDO *et al.*, 2022) e *L. mexicana* (VOLPEDO *et al.*, 2022). A LT pode ser subdividida em diferentes formas clínicas, sendo elas a leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (GASPARI *et al.*, 2022). Na LC ocorre a formação de uma lesão ulcerativa local, conforme mostrado na **Figura 1B**, ou pode ocorrer uma disseminação das lesões na pele para diversas regiões do corpo, conforme mostrado na **Figura 1C** (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). A leishmaniose mucocutânea é causada, principalmente, por *L. braziliensis* e leva ao desenvolvimento de lesões nas mucosas nasal e oral, como demonstrado na **Figura 1D** (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leishmanioses como doenças tropicais negligenciadas e estima que ocorram mais de 700.000 novos casos dessa doença a cada ano em regiões da África, América, Ásia e Europa (WHO, 2023). O status de endemidade de leishmaniose tegumentar (mapa do lado esquerdo) e leishmaniose visceral (mapa do lado direito), foi estimado pela OMS no ano de 2021 (**Figura 1E**) (WHO, 2023). De acordo com boletim epidemiológico, no Brasil foram registrados 2.529 novos casos de leishmaniose visceral e 15.484 novos casos de leishmaniose cutânea, no ano de 2019 (BRASIL, 2021).

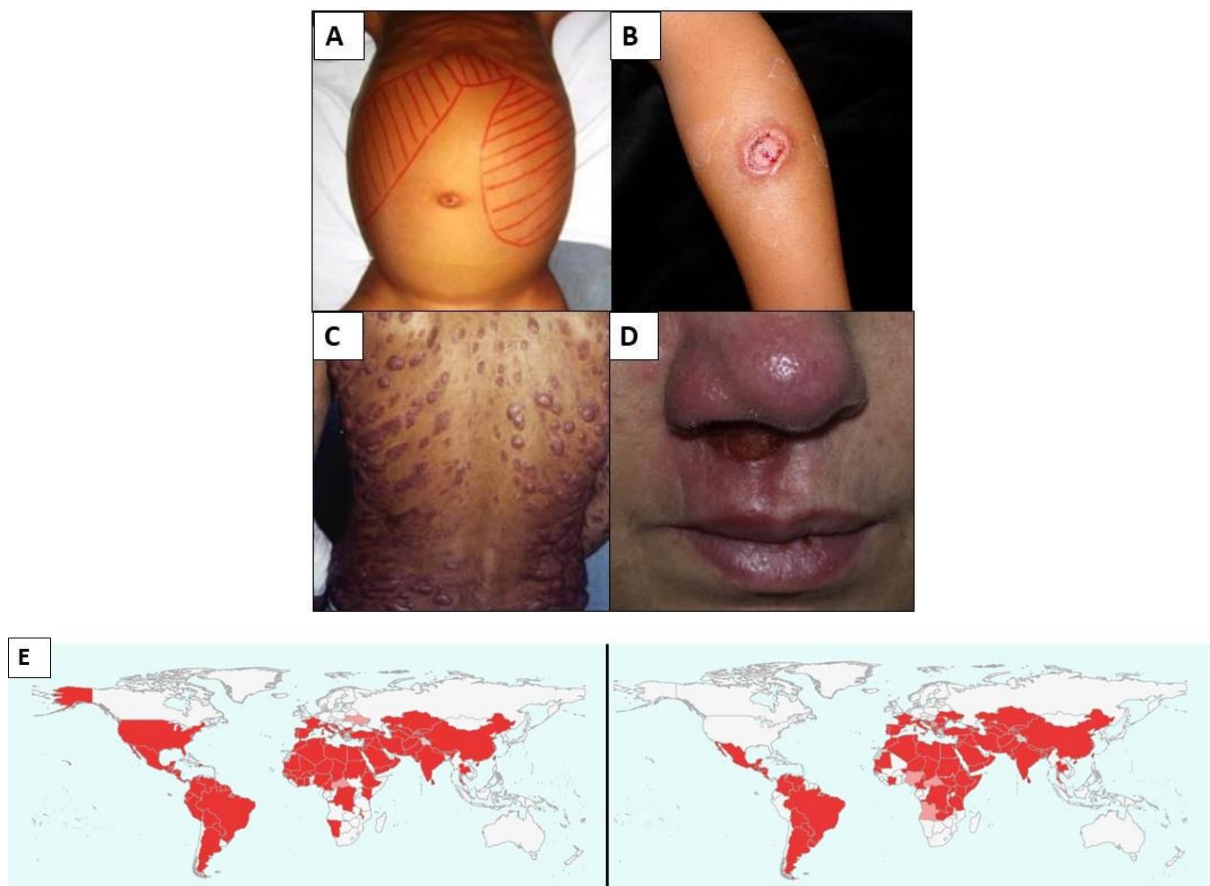
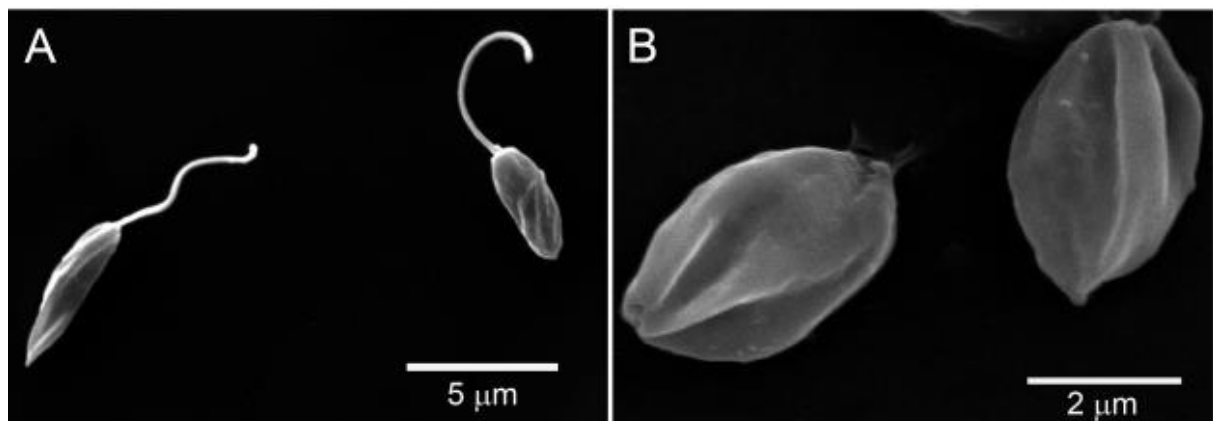


Figura 1 - Leishmanioses: Manifestações clínicas e status de endemidade. A leishmaniose visceral pode causar hepatoesplenomegalia (A). Adaptado de COSTA *et al.* (2023). A leishmaniose cutânea (B e C), provoca lesões locais e disseminadas na pele. Adaptado de TORRES-GUERRERO *et al.* (2017). A leishmaniose mucocutânea provoca lesões na mucosa nasal e oral (D). Adaptado de ABADÍAS-GRANADO *et al.* (2021). O mapa mostra o status de endemidade das leishmanioses tegumentar (mapa do lado esquerdo) e visceral (mapa do lado direito), os países representados em vermelho escuro foram classificados como endêmicos e os países em vermelho claro tiveram casos da doença reportados anteriormente (E). Adaptado de WHO (2023).

1.1.1 *Leishmania* – o parasito e seu ciclo biológico

Protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à família *Trypanosomatidae* e a ordem *Kinetoplastida* (BANETH e SOLANO-GALLEGO, 2022). Dentre as espécies já identificadas de *Leishmania*, cerca de 20 delas são patogênicas para os seres humanos (RODRIGUES *et al.*, 2016). Durante o seu ciclo biológico, estes parasitos possuem dois estágios de desenvolvimento: o de promastigota, no qual o parasito se prolifera no hospedeiro invertebrado (inseto flebotomíneo) e o de amastigota cuja proliferação ocorre nas células do hospedeiro vertebrado (mamíferos, por exemplo humanos, cães e roedores) (TEIXEIRA *et al.*, 2013). As formas promastigotas (**Figura 2A**) são alongadas, com comprimento entre 6 a 8 μm e possuem um longo flagelo que confere mobilidade ao protozoário (TEIXEIRA *et al.*, 2013). As formas amastigotas (**Figura 2B**) são organismos celulares com formato oval, medindo aproximadamente 3 μm de comprimento e não têm um flagelo visível (BATES, 1994).

Assim que os flebotomíneos fêmea injetam promastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, esses parasitos são capturados por células fagocíticas, se transformam em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo dos fagócitos e se multiplicam. Ao picar um mamífero infectado com *Leishmania*, os flebotomíneos fêmea adquirem as formas amastigotas que se tornam promastigotas procíclicas no intestino médio desses insetos e, ao migrarem para a probóscide, esses parasitos se transformam novamente na sua forma infectiva de promastigotas metacíclicas (TEIXEIRA *et al.*, 2013; ESCH e PETERSEN, 2013). O ciclo biológico das *Leishmanias* está esquematizado na **Figura 2C**.



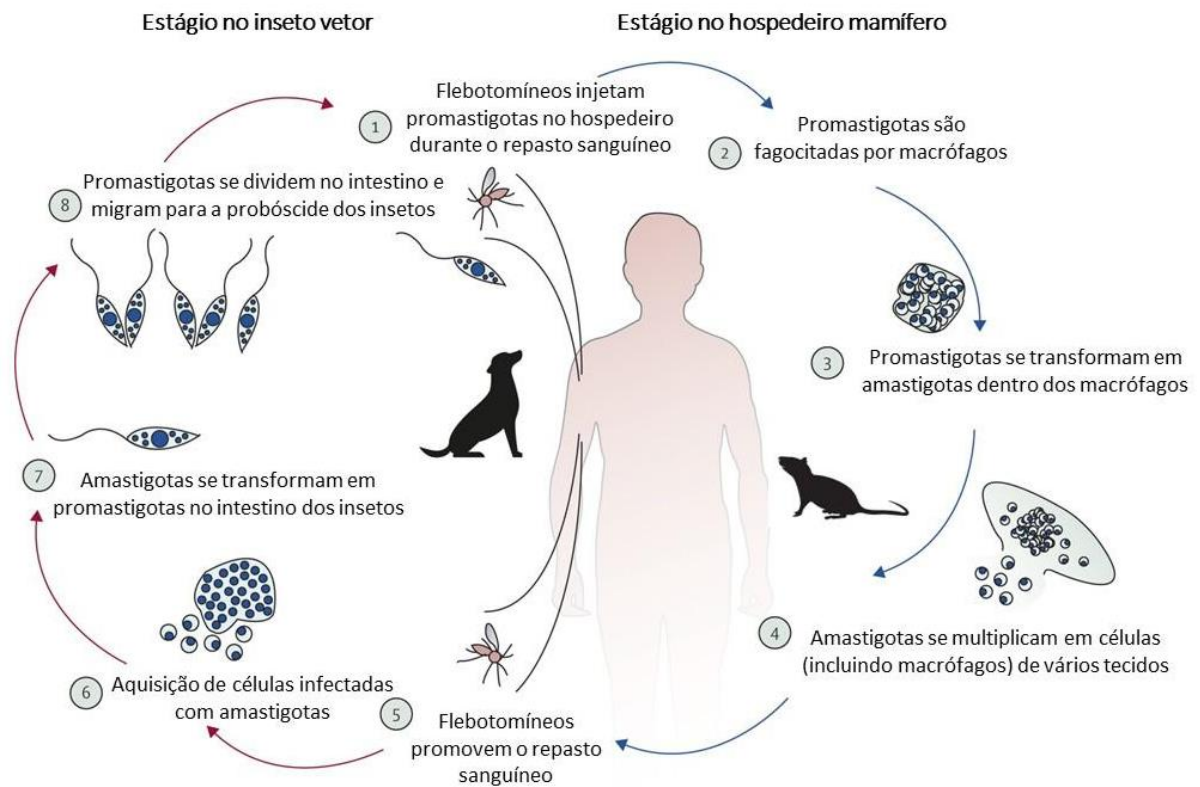


Figura 2 - O parasita *Leishmania* e seu ciclo biológico. As formas promastigotas são flageladas, móveis e possuem morfologia alongada (A). As formas amastigotas não apresentam um flagelo visível e possuem uma morfologia oval (B). Adaptado de GOMES *et al.* (2017). Em seu ciclo biológico, as *Leishmanias* possuem dois estágios de desenvolvimento: o de promastigota, que sobrevive no inseto flebotomíneo, e o de amastigota, que sobrevive nas células do hospedeiro mamífero (C). Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos infectados regurgitam as formas promastigotas na pele do seu hospedeiro mamífero (1). Esses parasitas invadem ou são fagocitados por células hospedeiras locais ou recrutadas, principalmente macrófagos (2). Dentro dos fagolisossomos de macrófagos residentes, as promastigotas se transformam em amastigotas (3). Amastigotas se replicam e podem então infectar outros macrófagos, localmente ou em tecidos distantes após a disseminação (4). Quando o repasto sanguíneo é feito em um hospedeiro infectado (5), flebotomíneos adquirem células contendo *Leishmanias* amastigotas (6). Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino dos insetos (7). Os parasitas migram para a probóscide dos flebotomíneos (8). Adaptado de REITHINGER *et al.* (2007).

1.1.2 Resposta imune do hospedeiro vertebrado na infecção por *Leishmania*

Logo após ser introduzida no organismo do hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* precisa entrar em uma célula, uma vez que no meio extracelular ela pode ser rapidamente eliminada pelo sistema do complemento o qual promove a lise do parasito por meio da formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (GURUNG e KANNEGANTI, 2015). No entanto, a *Leishmania* pode tanto bloquear a ação do complemento como entrar facilmente em monócitos e neutrófilos devido a ligação com receptores de superfície celular, possibilitando com que o parasito consiga escapar do sistema complemento (OLIVIER *et al.*, 2005). O recrutamento

destas células da imunidade inata para o local da infecção ocorre também em decorrência da picada do inseto flebotomíneo (PETERS *et al.*, 2008). Apesar da entrada da *Leishmania* nessas células permitirem sua evasão de uma das vias da resposta imune, outras vias podem atuar contra ela, como a dos monócitos que têm a função de liberar espécies reativas de oxigênio (ROS) para destruir os parasitos livres e a dos neutrófilos que atraem células dendríticas (DC) para o local da infecção (DE FREITAS E SILVA e VON STEBUT, 2021).

Além do estabelecimento de uma resposta imune inata eficaz, o controle das leishmanioses depende, fundamentalmente, da imunidade adaptativa mediada por linfócitos T e pelas citocinas secretadas por essas células (BELKAID *et al.*, 2002; KAUSHAL *et al.*, 2014). Para que ocorra a ativação da resposta imune adaptativa, as células dendríticas atraídas para o local da infecção migram para os linfonodos de drenagem e apresentam os antígenos de *Leishmania* para células T (DE FREITAS E SILVA e VON STEBUT, 2021). Além disso, as DCs secretam a interleucina IL-12 que induz os linfócitos T auxiliares a se diferenciarem no tipo Th1 (VON STEBUT *et al.*, 2000). Esta resposta Th1 é muito importante para o controle da infecção, pois induz uma alta produção de IFN- γ o qual se liga os macrófagos infectados com *Leishmania* e ativa-os a produzirem óxido nítrico (NO) para destruir os parasitos intracelulares (IKEOGU *et al.*, 2021). No entanto, a resolução ou progressão da doença varia de acordo com a diferenciação das células T auxiliares (SCOTT e NOVAIS, 2016). A proteção contra as leishmanioses está relacionada a uma forte resposta do tipo Th1 com liberação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-2 e TNF- α (DARRAH *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2021), enquanto a patogênese é determinada pela predominância de uma resposta do tipo Th2 com alta produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (CASTELLANO *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2001).

Para contornar o sistema imune e o ambiente hostil do organismo hospedeiro, a *Leishmania* desenvolveu diversos mecanismos de sobrevivência, um deles é o processo de diferenciação de suas formas promastigotas metacíclicas em amastigotas dentro dos macrófagos, as quais são capazes de resistir à acidez e as enzimas hidrolíticas do vacúolo parasitóforo (BURCHMORE e BARRETT, 2001). Outra ação desses parasitos, é regular o metabolismo dos macrófagos infectados afetando suas atividades antiparasitárias como a liberação de moléculas microbicidas, por exemplo, NO, a apresentação de antígenos e a produção de citocinas (OLIVER *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2021).

1.1.3 Tratamentos e vacinas contra Leishmanioses

Existem poucos quimioterápicos empregados no tratamento das leishmanioses, como os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina, além disso eles apresentam elevada toxicidade (ULIANA *et al.*, 2018). Anteriormente, foi descrito que a administração de antimoniato de meglumina em pacientes humanos diagnosticados com leishmaniose visceral levou ao surgimento de efeitos colaterais graves como febre persistente, icterícia, exantema, sangramento e cianose (SILVEIRA *et al.*, 2015). A falta de eficácia dessas drogas também é um problema, pois já foi demonstrado que cães tratados com miltefosina não foram capazes de eliminar completamente os parasitos (MANNA *et al.*, 2009). Outro desafio, é o surgimento de resistência a esses medicamentos, como no ensaio em que *L. infantum* isolada de cães tratados com miltefosina e alopurinol se tornou resistente a miltefosina e anfotericina B (GONÇALVES *et al.*, 2021).

Tendo em vista as dificuldades em encontrar tratamentos efetivos para as leishmanioses, destaca-se a necessidade em se desenvolver vacinas profiláticas e terapêuticas para essas doenças (RAWAT *et al.*, 2016). Para isso, uma das primeiras etapas é a seleção do antígeno de interesse. Alguns antígenos que já foram avaliados como potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses constituem fatores de virulência, como: a proteína A2, as cisteína proteinases (CPs), a proteína amastina, o lipofosfoglicano (LPG), a glicoproteína GP63, a proteína de membrana cinetoplastídica de 11 kDa (KMP-11) e as proteínas de choque térmico (HSPs) (KAUR *et al.*, 2011; MAZUMDER *et al.*, 2011; SALJOUGHIAN *et al.*, 2013; RIEDE *et al.*, 2015; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2020; AUNGULDEE *et al.*, 2021). Embora já tenha sido demonstrado que a imunização com esses antígenos promoveu uma redução da carga parasitária em animais infectados por *Leishmania*, nenhum dos trabalhos mencionados demonstrou a indução de uma proteção estéril.

Uma das estratégias iniciais para combater as leishmanioses foram as vacinas de primeira geração contendo o parasito inteiro vivo ou inativado (NOAZIN *et al.*, 2008). Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que a imunização com os antígenos totais de *L. amazonensis*, utilizando diferentes vias de administração (intranasal, oral e subcutânea), foi capaz de proteger parcialmente camundongos contra uma infecção com o parasito (PINTO *et al.*, 2003; PRATTI *et al.*, 2016; GERMANO *et al.*, 2022). Mais recentemente, Bezerra *et al.* (2019), demonstraram que a vacinação intranasal com antígeno total de promastigotas de *L. amazonensis* (LaAg) associado ao ácido retinóico encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas foi capaz de reduzir 96% da carga parasitária nos animais imunizados. Além disso,

Helou *et al.* (2021), demonstraram que a imunização de camundongos por via intrasnal utilizando os antígenos totais de promastigotas de *L. donovani* (LdAg), foi capaz de induzir uma proteção parcial contra leishmaniose visceral.

As vacinas de segunda geração baseadas em proteínas recombinantes também têm se mostrado bastante eficazes (JOSHI e KAUR, 2014). Um exemplo, é a vacina Leish-Tec® composta pelo antígeno recombinante A2 de *L. donovani* junto com o adjuvante saponina e utilizada para prevenção contra leishmaniose visceral canina (FERNANDES *et al.*, 2008; SILVA, 2015). Em outro trabalho, foi observado que camundongos BALB/c imunizados com a proteína amastina recombinante associada a um lipossoma e desafiados com *L. infantum*, obtiveram uma redução de, aproximadamente, 3 logs no número de parasitos presentes nos baço, fígado, linfonodos drenantes e medula óssea (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Outra plataforma bastante promissora são as vacinas de terceira geração baseadas em ácidos nucleicos, como as vacinas de DNA e RNA. Já foi reportado que animais imunizados com um plasmídeo contendo o gene da nuclease P4 foram parcialmente protegidos quando desafiados com *L. amazonensis* (CAMPBELL *et al.*, 2003). Saljoughian *et al.*, 2013 demonstraram que a imunização com um DNA plasmidial codificando o antígeno A2 combinado com cisteína proteinases foi capaz de proteger parcialmente contra um desafio com *L. infantum*, devido a indução de uma resposta humoral robusta e uma forte resposta do tipo Th1 com produção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10. Além do clássico plasmídeo, já foi demonstrado que a imunização com um DNA linear de fita dupla, denominado como vetor de expressão gênica minimalista e imunogenicamente definido (MIDGE), codificando o antígeno LACK, foi capaz de conferir proteção parcial em camundongos infectados com *L. major* (LÓPEZ-FUERTES *et al.*, 2002). A imunização de camundongos com uma vacina utilizando cinco vetores MIDGE, cada um deles codificando diferentes antígenos de *Leishmania*: a KMP-11, a cisteína proteinase A (CPA), a cisteína proteinase B (CPB), o fator de alongação P74 e a proteína antioxidante específica de tiol (TSA), foi capaz de gerar uma resposta imune específica e induzir uma alta proteção contra uma infecção causada por *L. donovani* (DAS *et al.*, 2014). Durante a pandemia da Covid-19, as vacinas de RNA tiveram um grande destaque e mostraram alta eficácia no combate a doenças virais como as vacinas BNT162b2 fabricada pela Pfizer/BioNTech e a mRNA-1273 desenvolvida pela Moderna (POLACK *et al.*, 2020; BADEN *et al.*, 2021). Ainda não foram publicados estudos que utilizassem um esquema vacinal com duas ou mais doses de RNA para leishmaniose, porém uma imunização heteróloga com a primeira dose de RNA e a segunda de subunidade, levou a

uma redução da carga parasitária de camundongos infectados com *Leishmania donovani* (DUTHIE *et al.*, 2018).

1.2 Vacinas de RNA mensageiro (mRNA)

Após a descoberta da molécula de RNA mensageiro em 1961, uma série de avanços científicos contribuíram para o desenvolvimento das vacinas de mRNA e possibilitaram com que elas pudessem ser amplamente utilizadas (DOLGIN, 2021). Esta plataforma vacinal parte do princípio de que um mRNA produzido *in vitro* permite com que as células do indivíduo vacinado expressem o antígeno que induzirá a resposta imune contra um microrganismo específico (PETSCH *et al.*, 2012). Conforme mostrado na **Figura 3**, a estrutura do mRNA transcrito *in vitro* deve ser semelhante à do mRNA endógeno, contendo o cap 5', a região 5' UTR, a sequência que codifica o antígeno de interesse (ORF), a região 3' UTR e, por fim, a cauda poli A (CHAUDHARY *et al.*, 2021). O cap 5' consiste em um nucleosídeo modificado 7-metilguanósina ligado ao ribonucleotídeo 2'-O-metilado da extremidade 5' por meio de uma ponte trifosfato (DECROLY *et al.*, 2012) e é responsável por desempenhar importantes funções como garantir a estabilidade e aumentar a taxa de tradução do mRNA (JANI e FUCHS, 2012). A adição do cap pode ser feita após a transcrição *in vitro* por meio da atividade da enzima de capeamento do *Vaccinia virus* (JANI e FUCHS, 2012) ou de forma co-transcricional utilizando análogos de cap que são incorporados pela RNA polimerase durante a síntese do RNA (HENDERSON *et al.*, 2021). Para obtenção de um antígeno específico, o RNA mensageiro deve possuir uma janela aberta de leitura ou ORF (*open reading frame*) contendo uma determinada combinação dos códons que codificam os aminoácidos que compõem a estrutura proteica (CHAUDHARY *et al.*, 2021). As regiões 5' e 3' UTR (*Untranslated Regions*) são sequências nucleotídicas não traduzidas que flanqueiam a sequência codificadora e também estão envolvidas na regulação da tradução do mRNA (GU *et al.*, 2014; MAYYA e DUCHAINE, 2019). Outra característica fundamental dessa vacina, é a utilização de nucleotídeos modificados para mimetizar o RNA endógeno e impedir que ele seja reconhecido e eliminado pelo sistema imunológico como um RNA exógeno (KARIKÓ *et al.*, 2005). Por exemplo, a substituição da uridina pela N1-metilpseudouridina possibilitou um aumento nos títulos de anticorpos em animais imunizados com a formulação vacinal composta por um RNA modificado (BERNARD *et al.*, 2023).

As vacinas de RNA apresentam diversas vantagens, sendo uma delas a possibilidade de RNAs codificando diferentes antígenos serem obtidos por processos semelhantes de síntese e

purificação, ao contrário do processo de produção de proteínas recombinantes (LACZKO *et al.*, 2020; HAJNIK *et al.*, 2022; HAYASHI *et al.*, 2022). É necessário apenas conhecer o genoma do patógeno alvo para se obter a sequência gênica da proteína de interesse (JACKSON *et al.*, 2020). Além disso, devido ao RNA ser produzido a partir de transcrição *in vitro*, elimina-se o uso de cultivos celulares (DUTHIE *et al.*, 2022). Esses fatores permitem com que vacinas para diversas doenças sejam desenvolvidas em larga escala, necessitando de um menor tempo e custo de produção (PARDI *et al.*, 2018a; KIS *et al.*, 2020). Outro ponto importante é a sua segurança, pois o RNA não tem a capacidade de causar infecção ou de ser integrado no genoma das células, diferentemente das plataformas vacinais que utilizam microrganismos atenuados ou inativados, vetores virais e DNA (PARDI *et al.*, 2018a; LEE *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Apesar de serem mais instáveis, as vacinas de RNA favorecem a obtenção mais rápida do antígeno em comparação aquelas baseadas em DNA, uma vez que o RNA mensageiro transcrito *in vitro* pode ser traduzido assim que atinge o citoplasma da célula, já o DNA precisa entrar no núcleo celular para produzir o RNA (SAHIN *et al.*, 2014; SHERIDAN, 2021).

Atualmente, existem poucos trabalhos que avaliam a vacina de RNA contra doenças causadas por protozoários. Em um desses estudos, Mallory *et al.* (2021) desenvolveram uma vacina para malária utilizando um RNA que expressa um antígeno de *Plasmodium falciparum* (PfCSP) e mostraram que a vacinação foi capaz de promover uma proteção estéril em 88% dos animais imunizados. Em outro estudo recente, Duthie *et al.* (2018) demonstraram que a imunização heteróloga com o RNA expressando o antígeno LEISH-F2 e com a proteína recombinante LEISH-F2, foi capaz de aumentar a resposta de células T protetoras contra *Leishmania*. Além disso, ficou demonstrado que os animais infectados com *L. donovani* apresentaram uma redução parcial na carga parasitária quando foram imunizados com o regime de prime com RNA e boost com proteína recombinante (DUTHIE *et al.*, 2018).

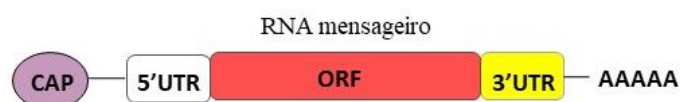


Figura 3 – Estrutura do RNA mensageiro. O mRNA transcrito *in vitro* possui o Cap5', as regiões 5' e 3' UTR, a região codificadora (ORF), e a cauda poliA.

1.2.1 Delivery do mRNA

Um dos requisitos mais importantes para se obter uma vacina de RNA bem sucedida, é o veículo de entrega. Isso porque para ser traduzido na proteína de interesse e atingir sua eficácia

em induzir uma resposta imune robusta, o RNA precisa entrar nas células (CI *et al.*, 2023; YAVUZ *et al.*, 2023). No entanto, o tamanho e a carga negativa dessa molécula impedem com que ela consiga atravessar facilmente a membrana celular, sendo sua entrada no citoplasma dependente de endocitose (DOWDY *et al.*, 2022). Além disso, o RNA mensageiro é altamente instável e suscetível à degradação por RNAses circulantes no sangue (MILIOTOU *et al.*, 2021). Diversos sistemas capazes de carrear o mRNA já estão em desenvolvimento, como eletroporação de células dendríticas (WILGENHOF *et al.*, 2013), nanoemulsões catiônicas (BRITO *et al.*, 2014), polímeros catiônicos (LI *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2023), peptídeos ligados a polietilenoglicol (QIU *et al.*, 2019) e as nanopartículas lipídicas (LNPs) (HOU *et al.*, 2021).

Dentre essas, as LNPs são as mais utilizadas para as vacinas de mRNA devido a sua alta eficiência de entrega *in vivo* (PARDI *et al.*, 2015). Isso ficou evidenciado pela aplicação dessas LNPs como carreadoras nas duas principais vacinas autorizadas para prevenção da Covid-19, a BNT162b2 fabricada pela Pfizer e BioNTech e a mRNA-1273 desenvolvida pela Moderna e Centro de Pesquisa de Vacinas do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (POLACK *et al.*, 2020; BADEN *et al.*, 2021). Além de proteger o mRNA, facilitar sua endocitose pela membrana celular e promover sua biodistribuição, a LNP também funciona como um adjuvante por potencializar a resposta imune contra o antígeno específico que foi produzido a partir do mRNA (REICHMUTH *et al.*, 2016; SWAMINATHAN *et al.*, 2016; BEVERS *et al.*, 2022). As LNPs são compostas por quatro lipídeos diferentes: o lipídio catiônico junto com mais três lipídeos auxiliares como o colesterol, o lipídio PEGuilado e outro tipo de lipídio, os quais se agrupam formando uma bicamada esférica envolta do mRNA (CHAUDHARY *et al.*, 2021; SCHOENMAKER *et al.*, 2021). O lipídio catiônico é uma molécula anfifílica e positivamente carregada, tais propriedades são essenciais para promover a interação entre a LNP e o grupo fosfato do RNA que possui carga negativa (HALD ALBERTSEN *et al.*, 2022). No entanto, a constante carga positiva desse lipídio o torna citotóxico e não seguro para o uso como veículo de entrega (CUI *et al.*, 2018). Para contornar esse problema, foi necessária sua substituição pelo lipídio catiônico ionizável, pois ele não induz citotoxicidade *in vivo* e mantém a capacidade de entregar o RNA (BROUDIC *et al.*, 2022). O colesterol tem a função de preencher os espaços entre os demais lipídeos e modular a fluidez da membrana da LNP (YANG *et al.*, 2016). O outro tipo de lipídio auxiliar, por exemplo o diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), interage com o colesterol para garantir a estabilidade da nanopartícula, auxiliar na fusão com a membrana do endossomo celular e aumentar a eficiência de entrega do mRNA (CHENG e LEE, 2016; PATTIPEILUHU *et al.*, 2022). O lipídio

PEGuilado influencia no diâmetro médio (tamanho) da nanopartícula, além de impedir sua rápida absorção por células do sistema reticuloendotelial e aumentar a entrega do mRNA (BAO *et al.*, 2013; RYALS *et al.*, 2020). A possibilidade de determinar o diâmetro médio da LNP é importante para o desenvolvimento de vacinas de RNA, uma vez que a resposta imune pode ser aumentada ou diminuída em função desta propriedade da nanopartícula (HASSETT *et al.*, 2021). Experimentos de imunização com RNA encapsulado em LNPs, empregam nanopartículas com diâmetro médio entre, aproximadamente, 80 nm (nanômetros) e 130 nm (PARDI *et al.*, 2015; BEVERS *et al.*, 2022).

1.2.2 Resposta imune induzida pelas vacinas de RNA

As vacinas de RNA são capazes de induzir resposta imune via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II (CHAUDHARY *et al.*, 2021). Assim que a vacina é administrada, células apresentadoras de antígeno (APCs) são recrutadas para o local da injeção e internalizam a formulação vacinal por endocitose (LIANG *et al.*, 2017). Ao escapar do endossomo, o RNA é liberado no citosol para ser traduzido no antígeno proteico pelos ribossomos celulares e gerar diversas respostas imunes (CHAUDHARY *et al.*, 2021). Já foi demonstrado que, embora várias APCs consigam internalizar as LNPs junto com o RNA, apenas os monócitos e células dendríticas promovem uma tradução eficiente e são capazes de produzir uma grande quantidade do antígeno (LIANG *et al.*, 2017). A proteína intracelular produzida a partir do RNA pode ser processada pelo proteossoma e os fragmentos apresentados por meio do MHC I para ativar as células T CD8+ a produzirem perforina e granzimas para destruir células infectadas com o antígeno (CHAUDHARY *et al.*, 2021). A secreção de perforina é essencial para a destruição de patógenos intracelulares pelas células T CD8+, uma vez que camundongos vacinados e deficiente de perforina foram incapazes de controlar a infecção (COLMENARES *et al.*, 2003). Além da apresentação intracelular direta, o antígeno obtido a partir do RNA também pode ser endereçado para o meio extracelular e, ao ser capturadas novamente por endocitose pelas APCs, são processados dentro dos endossomos e apresentados pelo MCH II para a célula T CD4+, a qual pode tanto produzir citocinas que irão ativar fagócitos como estimular as células B a produzirem anticorpos contra o patógeno (CHAUDHARY *et al.*, 2021; CAGIGI e LORÉ, 2021).

Vacinas contendo RNAs com nucleotídeos não modificados induzem uma menor resposta imunológica específica (PARDI *et al.*, 2018b). Isso ocorre porque esses RNAs são reconhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno e ativam as células do sistema

imune inato por meio dos receptores *Toll-like*, como o TLR3, TLR7 e TLR8 (KARIKÓ *et al.*, 2005). A ativação dessa resposta impede com que o RNA seja traduzido de forma robusta na proteína de interesse (KARIKÓ *et al.*, 2008). Já foi mostrado que vacinas baseadas em RNAs modificados podem melhorar a eficiência de tradução e aumentar a resposta imune específica do antígeno (PARDI *et al.*, 2018b).

RNAs que contenham a extremidade 5'-trifosfato ou não possuam o primeiro nucleotídeo metilado podem ser reconhecidos pelo receptor citosólico RIG-I ou pela IFIT1. Esse reconhecimento leva a uma ativação indesejada de vias do sistema imune inato, uma vez que elas promovem o bloqueio da tradução do RNA (DEVARKAR *et al.*, 2016; ABBAS *et al.*, 2017). Por isso, é de extrema importância que o RNA mensageiro administrado nas vacinas contenha a estrutura cap 5' semelhante à utilizada pelas células eucariotas para escapar das respostas mediadas pela imunidade inata (DAFFIS *et al.*, 2010; SCHUBERTH-WAGNER *et al.*, 2015).

Para a produção do RNA por meio de transcrição *in vitro* a partir de um plasmídeo, uma das enzimas mais utilizadas é a T7 RNA polimerase de bacteriófago, principalmente devido a sua capacidade de gerar altas quantidades do transcrito (TABOR, 1990). Com isso, o DNA utilizado como molde para a síntese do RNA requer a presença de um promotor que seja reconhecido por esta enzima (TABOR, 1990). No entanto, devido a uma atividade errônea, a T7 RNA polimerase pode iniciar a transcrição a partir de um molde de DNA contendo uma extremidade sem promotor (MU *et al.*, 2018). Isso tem como consequência a produção de RNAs de fita dupla que são reconhecidos por receptores da imunidade inata e estimulam o sistema imunológico de maneira indesejada (MU *et al.*, 2018; VERBEKE *et al.*, 2022). Em decorrência da ativação desta resposta contra o RNA, há uma redução na produção da proteína de interesse (KARIKÓ *et al.*, 2011). Por isso, as terapias baseadas em RNA transcrito *in vitro* utilizam métodos de purificação para remover os dsRNAs, como a celulose que permite a ligação de dsRNA (BAIERSDÖRFER *et al.*, 2019), a enzima RNase III que digere o dsRNA (FOSTER *et al.*, 2019) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (KARIKÓ *et al.*, 2011). Além disso, foi desenvolvida uma T7 RNA polimerase mutante capaz de produzir uma quantidade menor de dsRNA durante a transcrição *in vitro*, o que permite uma redução desses contaminantes para a etapa de purificação (DOUSIS *et al.*, 2023).

1.3 Antígeno DTL8

Proteínas recombinantes estão se tornando cada vez mais uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacinas contra Leishmanioses (DIAS *et al.*, 2018; LAGE *et al.*, 2020). Neste contexto, a proteômica se tornou uma ferramenta para caracterização de proteínas com potencial vacinal (GALASSIE e LINK, 2015). A imunoproteômica é uma técnica que combina a proteômica com a detecção das proteínas mais imunorreativas presentes no soro e, conseqüentemente, mais favoráveis a se tornarem antígenos promissores para promover a indução de uma resposta protetora contra o patógeno de interesse (DENNEHY e MCCLEAN, 2013).

Em um estudo anterior, pesquisadores utilizaram uma abordagem imunoproteômica a fim de identificarem antígenos vacinais para Leishmanioses (GERMANO *et al.*, 2022). Para isso, camundongos foram imunizados com os antígenos totais de *L. amazonensis* associado ao adjuvante Poly (I:C) e o soro desses animais foi coletado para análises de *immunoblotting*. As proteínas totais *L. amazonensis* foram separadas por eletroforese utilizando um gel bidimensional e transferidas para uma membrana de nitrocelulose a qual foi incubada com o soro dos camundongos imunizados (**Figura 4**).

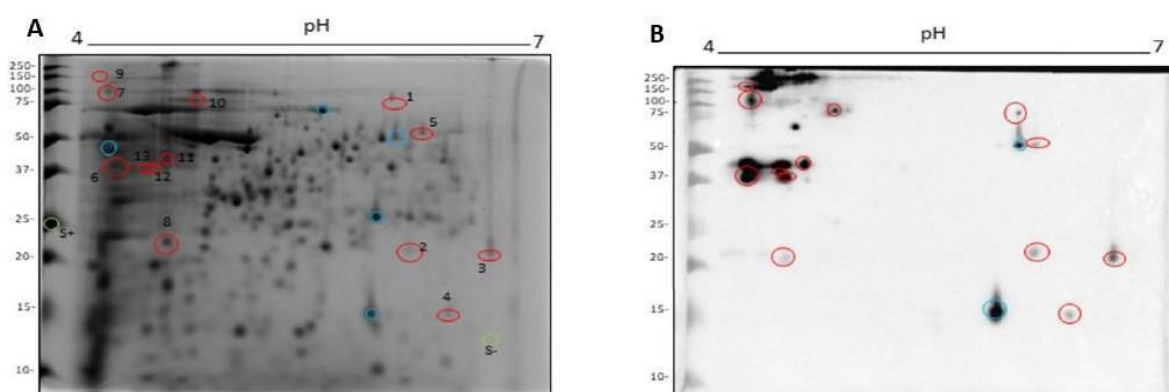


Figura 4 - Estudo imunoproteômico para descoberta de antígenos vacinais para Leishmanioses. (A) Gel 2D SDS-PAGE de proteínas totais de *L. amazonensis*. (B) Western blot incubado com o pool do soro de camundongos imunizados com antígenos totais de *L. amazonensis*. Adaptado de GERMANO *et al.* (2022). Os círculos azuis representam os spots reconhecidos pelo soro do grupo controle negativo. Os círculos vermelhos representam os spots analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

Os spots reativos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e por bioinformática para determinar sua sequência de aminoácidos e características bioquímicas. Quatro proteínas imunodominantes foram identificadas como potenciais alvos para novas vacinas.

Com base nisso, uma dessas proteínas foi selecionada pelo presente grupo de pesquisa para o desenvolvimento de um antígeno recombinante vacinal (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado). Atualmente, a sequência gênica que codifica essa proteína está anotada no banco de dados de tripanossomatídeos TriTrypDB (AMOS *et al*, 2022), sob número de identificação LINF_270007500, como um gene localizado no cromossomo 27 de *L. infantum* que tem como produto uma proteína associada ao cinetoplasto com peso molecular teórico de 72 kDa (kilodaltons).

Por possuir uma sequência longa e rica em repetições, essa proteína nativa (WT) foi submetida à análise de predição de epítomos com maior afinidade pelos Antígenos Leucocitários Humanos (HLAs - Human Leukocyte Antigen) utilizando ferramentas de bioinformática para se obter uma proteína menor e com regiões mais imunogênicas. A partir disso, construiu-se um antígeno proteico denominado DTL8 recombinante (rDTL8) contendo 54 aminoácidos na porção N-terminal e 15 repetições de 10 aminoácidos que foram mantidos da sequência WT. Por meio de programas de bioinformática, determinou-se que o peso molecular teórico da proteína DTL8 recombinante era de, aproximadamente, 23 kDa. O DNA codificando a rDTL8 foi clonado no vetor plasmidial pET-24a(+) que contém o sistema de indução por IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), o gene de resistência a canamicina e o promotor da T7 RNA polimerase para expressão em *E. coli* (DE3). Além disso, este plasmídeo possui a sequência de nucleotídeos que codifica uma tag de seis histidinas na porção C-terminal para posteriores etapas de purificação. Bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo de expressão, cultivadas em meio LB e lisadas para obter a proteína de rDTL8 que seria posteriormente purificada por cromatografia de afinidade. Após a padronização das condições de expressão e purificação, determinou-se que a proteína rDTL8 permanecia na fração solúvel. As frações mais puras obtidas foram reunidas, analisadas em gel SDS-Page e quantificadas (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado).

Para determinar o potencial vacinal do antígeno rDTL8 contra Leishmaniose, camundongos BALB/c foram imunizados utilizando três doses da vacina composta por 10 ug da rDTL8 junto com 50 ug do adjuvante Poly (I:C) e desafiados com *L. infantum*. Análises de imunogenicidade indicaram que a imunização resulta em uma resposta humoral com alta produção de anticorpos IgG Total, IgG1 e IgG2a. Além disso, houve indução da imunidade celular baseada na secreção de quantidades significativas de IFN- γ . Por fim, os animais imunizados com a rDTL8 + Poly (I:C) apresentaram uma redução parcial na carga parasitária no fígado e baço (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado).

De acordo com este estudo, o antígeno DTL8 se mostrou um candidato promissor para o desenvolvimento de uma vacina para leishmaniose visceral. Neste sentido, selecionamos este antígeno para avaliação da sua eficácia como uma vacina de RNA.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver uma vacina de RNA para Leishmaniose e comparar a sua eficácia à de uma vacina baseada no mesmo antígeno recombinante.

Objetivos específicos

- Produzir o mRNA DTL8 a partir de transcrição *in vitro*;
- Testar a funcionalidade do mRNA transcrito por meio de transfecção de células e análise da expressão da proteína DTL8.
- Produzir nanopartículas lipídicas (LNPs) contendo o mRNA de DTL8;
- Testar a funcionalidade do mRNA encapsulado por meio de transfecção de células e análise da expressão da proteína DTL8.
- Avaliar a resposta imune celular e humoral em camundongos imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs;
- Avaliar a capacidade protetora da vacina de LNP_RNA DTL8 em camundongos imunizados e desafiados com *L. infantum* ou *L. amazonensis*;
- Comparar a resposta imune e proteção geradas pela imunização de camundongos com LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante após imunização e desafio com *L. amazonensis*.

2 METODOLOGIA

2.1 Síntese do RNA Mensageiro

O plasmídeo pcDNA3.1 contendo o gene que codifica a proteína DTL8 (pcDNA3.1DTL8), o gene de resistência à ampicilina, o promotor da enzima T7 RNA Polimerase, uma sequência 5'UTR e 3'UTR de alfa globina humana, além da cauda PoliA com 110 adeninas, foi sintetizado pela empresa GenScript Biotech. Aproximadamente 25 ng do pcDNA3.1DTL8 foi adicionado em 100 uL de bactérias competentes *E. coli* XL-1 Blue preparadas com acordo com o protocolo de competência com cloreto de cálcio, como previamente descrito (SAMBROOK *et al.*, 1989). O tubo com as bactérias foi incubado em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetido a choque térmico, por 1 minuto a 42°C e por 2 minutos no gelo. Adicionou-se 400µL de meio LB (Lysogeny Broth - Triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e NaCl 1% (m/v)) e deixou-se incubando a 37°C por uma hora, sob agitação. Após recuperação bacteriana, 50 µL foram plaqueados em 25mL de meio sólido LB (meio LB e ágar 1,5% (m/v)) contendo 25µL de ampicilina (100mg/mL). A placa foi incubada por 16 horas a 37°C. Selecionou uma colônia da placa, inoculou-a em 5 mL de meio LB com 5 uL de ampicilina (100mg/mL) e incubou o inóculo a 37°C por 16 h, sob agitação. O plasmídeo foi extraído das bactérias utilizando o protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 27104) e quantificado por NanoDrop®. Linearizou 20 ug do plasmídeo por digestão com a enzima de restrição XhoI. O plasmídeo linearizado foi purificado utilizando o kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). A transcrição *in vitro* para a síntese do mRNA foi feita a partir do kit RibomAX™ Large Scale RNA Production Systems - T7® (Promega) utilizando 6 ug do plasmídeo linearizado como molde. Ao invés de uracila, foi utilizado o ribonucleotídeo modificado N1-Metilpseudouridina-5'-Trifosfato da TriLink BioTechnologies. O capeamento foi feito cotranscricionalmente utilizando o análogo de Cap 5', CleanCap® (TriLink BioTechnologies). Realizou-se a transcrição a 37°C durante 3h. O mRNA DTL8 sintetizado *in vitro* foi incubado com 6 uL de DNase livre RNase a 37°C por 15 minutos. O mRNA foi purificado com fenol e clorofórmio, conforme o protocolo do kit de transcrição *in vitro*. Brevemente, adicionou RNase livre de DNase na concentração 1u/µg do molde de DNA e incubou a 37°C por 15 minutos; Adicionou 1 volume de fenol (pH 4.7): clorofórmio: isoamil álcool (125:24:1), vortexou por 1 minuto e centrifugou a 15.000 rpm por 2 minutos; Transferiu a fase aquosa para outro tubo e adicionou 1 volume de clorofórmio: isoamil álcool (24:1), vortexou por 1 minuto e centrifugou a 15.000 rpm por 2 minutos;

Transferiu a fase aquosa para outro tubo e adicionou 1 volume de isopropanol e 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M (pH 5.2), misturou e congelou a -20°C por 20 minutos; Centrifugou a 4°C por 10 minutos a 15.000 rpm; Descartou o sobrenadante e lavou o pellet com 1 mL de etanol 70%; Centrifugou a 4°C por 10 minutos a 15.000 rpm e deixou o pellet secar; Ressuspendeu em H₂O livre de RNase. A purificação do mRNA utilizando coluna de celulose foi feita conforme descrito (BAIERSDÖRFER *et al.*, 2019). Após a purificação, os RNAs foram dosados utilizando o Qubit, analisados em gel de agarose 1% e congelados a -80°C até serem encapsulados em LNPs.

2.2 Transfecção de células HEK293T com o mRNA DTL8

A linhagem HEK293T foi transfectada com o mRNA DTL8. Resumidamente, as células mantidas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina e estreptomicina, foram plaqueadas na concentração 5×10^7 células/mL e incubadas a 37°C com 5% CO₂ até atingir 70% de confluência. A transfecção foi feita de acordo com o protocolo do TransIT®-mRNA (Mirus Bio MIR 2225) e aplicando três µg/poço de RNA. Cinco µg/poço do plasmídeo pcDNA3.1DTL8 também foi transfectado utilizando o protocolo da Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen L3000015). Incubou as células transfectadas a 37°C com 5% CO₂ por 24 horas.

2.3 Western blot para avaliar expressão do antígeno DTL8

O sobrenadante do meio de cultura das células HEK293T transfectadas foi removido e as células aderidas na placa foram lavadas com 1 mL de PBS 1X, transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 1.200 xG por 10 minutos a 4°C ; o sobrenadante foi descartado; adicionou 40 µL de RIPA Buffer 1X (Thermo Scientific 89901), vortexou brevemente, incubou no gelo por 10 minutos e centrifugou a 12.000 xG por 10 minutos a 4°C para lisar as células; transferiu o sobrenadante para um outro tubo, adicionou tampão de amostra e aqueceu a 96°C por 10 minutos. As proteínas totais obtidas dos extratos celulares e 250 ng da proteína DTL8 recombinante foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida 12,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (Tris Buffered Saline + 0,5% de Tween 20 e 5% de leite em pó) por uma hora, sob agitação. O anticorpo primário anti-DTL8 utilizado neste *western blot*, foi obtido, anteriormente, a partir da purificação do soro de coelhos da raça Nova Zelândia imunizados

com a proteína DTL8 recombinante (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado). Após descartar o bloqueio, adicionou-se o anticorpo primário anti-DTL8 na diluição 1:1.000 e incubou por uma hora, sob agitação; a membrana foi lavada por 3 vezes de 15 minutos com Tris Buffered Saline + 0,5% de Tween 20; adicionou o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com a peroxidase na diluição 1:10.000 e incubou por uma hora, sob agitação; a membrana foi lavada novamente e analisada por quimioluminescência utilizando o reagente de detecção ECL™ (Cytiva RPN2209).

2.4 Formulação do mRNA DTL8 em nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas (LNP) foram formadas por quatro lipídeos (lipídeo catiônico ionizável, DSPC, colesterol e lipídio peguado), na proporção 50:38,5:10:1,5, pelo método de nanoprecipitação. A fase orgânica (formada pela mistura etanólica dos lipídeos) e a fase aquosa (solução do mRNA DTL8 purificado em tampão citrato pH 3,0) foram misturadas em um sistema microfluídico, em uma proporção 1:3 (orgânica: aquosa), em uma velocidade de fluxo de 3,0 e 9,0 ml/min, respectivamente. A LNP contendo mRNA DTL8 (LNP_RNA DTL8), foi filtrada em coluna de Amicon 30 kDa por centrifugação a 10.000 x g, por 30 minutos, para remoção do etanol e tampão citrato, e concentração da formulação. Após sua produção, a formulação foi caracterizada quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão utilizando o equipamento Zetasizer Nano (Malvern Panalytical). A eficiência de encapsulação foi determinada por meio do kit de ensaio de RNA Quant-iT RiboGreen (Thermo Fisher Scientific). A LNP_RNA DTL8 foi armazenada de 4 a 8°C por no máximo um dia até ser administrada nos animais para os ensaios imunológicos.

2.5 Expressão da proteína rDTL8 em células procariotas

Um mL de bactérias *E. coli* BL21(DE3) resistentes a canamicina e contendo o plasmídeo pET-24a para a expressão da proteína DTL8 recombinante foi inoculado em 5 mL de meio líquido LB (Luria Bertani) com canamicina na concentração final de 100 µg/mL. Incubou-se a 37°C por 16 horas sob agitação de 180 rpm. Adicionou-se 2,5 mL dessa cultura em 250 mL de meio líquido LB com canamicina na concentração final de 100 µg/mL e incubou-se a 37°C sob agitação. Após atingir uma DO₆₀₀ (Densidade Óptica) de 0,4-0,7, foi adicionado IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ao meio de cultivo para uma concentração final de 0,5mM. Após a indução, as bactérias foram incubadas a 37°C sob agitação por três horas. O

meio foi transferido para um frasco e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. Descartou o sobrenadante e congelou o pellet no -20°C.

2.6 Purificação da proteína DTL8 recombinante por cromatografia

O frasco com o pellet foi mantido no gelo e adicionou-se uma solução com 20mM de TrisHCl; 100mM de NaCl e 30mM de Imidazol. Vortexou-se para dissolver o pellet. Adicionou-se DTT (Ditiotreitol), Benzamida e PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoreto) para uma concentração final de 5mM, 5mM e 1mM, respectivamente. As células foram lisadas no homogeneizador Emulsiflex. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 40.000 xG por 30 minutos a 4°C. Preparou-se o cromatógrafo Akta pure™ (Cytiva) e ambientou-o com as soluções A (20mM de TrisHCl; 100mM de NaCl e 30mM de Imidazol) e B (20mM de TrisHCl; 100mM de NaCl e 500mM de Imidazol). 25 mL do sobrenadante resultante da centrifugação foram injetados no cromatógrafo. Para a purificação, utilizou-se uma coluna de níquel (His Trap HP de 5 mL). Aplicou um fluxo de 2 mL/minuto pela coluna e um gradiente de eluição de 0 a 100%. Coletou-se as frações para as análises posteriores.

2.7 Animais

Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram adquiridos nos biotérios da Universidade Federal de Minas Gerais e do Instituto René Rachou (Fiocruz Minas). Os animais foram mantidos com água filtrada e ração peletizada. Para experimentos, foram utilizadas fêmeas com 4–8 semanas de idade. Todos os procedimentos seguiram os princípios para o uso de animais em laboratório e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (protocolo CEUA-UFMG 88/2022).

2.8 Parasitos

Para os experimentos de infecção, foram obtidas formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* (cepa PP75) e *L. amazonensis* (cepa PH8) expressando luciferase. Para obter as formas infectivas de promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, formas promastigotas foram transformadas em amastigotas-like e retornadas para promastigotas novamente, conforme descrito por Nascimento, 2016. Brevemente, no quinto dia de passagem, as formas promastigotas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado,

as *Leishmanias* foram ressuspensas em meio Schneider (Sigma-Aldrich S9895) pH 5,5 contendo 10% de soro fetal bovino inativado, 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina e mantidas a 37 °C por 96 horas. Na fase estacionária de crescimento, as *Leishmanias* transformadas em amastigostas-like foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, transferidas para meio Schneider (Sigma-Aldrich S9895) pH 7,2-7,4 contendo 10% de soro fetal bovino inativado e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina, e mantidas a 26°C. Para obter as formas infectivas de promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* expressando luciferase, os parasitos foram coletados a partir da lesão de camundongos infectados e mantidos a 26°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich S9895) pH 7,2-7,4 contendo 10% de soro fetal bovino inativado e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina, até o quinto dia de cultivo.

2.9 Imunização e desafio de camundongos

Camundongos foram imunizados com as seguintes formulações: (1) a LNP_RNA DTL8 composta por 10µg de mRNA DTL8 encapsulado em LNPs (KALNIN *et al.*, 2021); (2) o mRNA DTL8 Naked (não encapsulado em LNPs) composta por 10 ug de mRNA DTL8 misturado com PBS; (3) apenas a LNP (LNP vazia); (4) a proteína rDTL8+PolyICLC (Hiltonol) composta por 10 ug de proteína rDTL8 + 50 ug de adjuvante Poly ICLC. As formulações com o RNA encapsulado, o mRNA Naked, apenas a LNP e o PBS foram administradas por via intramuscular e a da proteína recombinante por via subcutânea. O volume máximo de 150 uL/camundongo foi adotado como dose, sendo 75 em cada pata. Nos experimentos somente de imunização foram administradas duas doses com intervalos de 21 dias. Nos experimentos em que os animais foram imunizados e desafiados, administraram-se três doses com intervalos de 21 dias. 30 dias após a última dose, os camundongos BALB/c foram infectados na pata esquerda com 1×10^7 *L. infantum* promastigotas metacíclicas, (OLIVEIRA-DA-SILVA *et al.*, 2020). E, três semanas após a última dose (CAMPBELL *et al.*, 2003) camundongos C57BL/6 foram infectados com 5×10^5 *L. amazonensis* promastigotas metacíclicas expressando luciferase.

2.10 Cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas

O baço dos camundongos foi coletado em condições estéreis. Cada baço foi lavado com 5 mL de meio RPMI 1640 e macerado em um *cell strainer* de 100 µm com auxílio de um êmbolo de seringa. Centrifugou-se a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o pellet foi ressuspensado agitando o tubo e adicionou 3 mL da solução ACK

(Cloreto de amônio-potássio) pH 7. Incubou-se no gelo por 5 minutos e depois adicionou-se 3 mL de RPMI para neutralizar o ACK. Centrifugou-se a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido agitando o tubo. Adicionou-se 1 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram novamente filtradas em um *cell strainer* de 100 μm e contadas na diluição 1:100. Após a contagem adicionou-se RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina, para obter uma concentração de 1×10^7 células/mL. Em cada poço de uma placa de 96 poços, foram adicionadas 1×10^6 células. Aplicou 2 μg da proteína rDTL8 por poço e a Concanavalina A (ConA) diluída 1:1000. Incubou as células a 37°C e 5% de CO₂. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante celular foi coletado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. A produção de IFN- γ foi mensurada a partir do sobrenadante da cultura de esplenócitos dos camundongos utilizando o kit Mouse IFN- γ DuoSet® ELISA (R&D Systems DY485), conforme as instruções do fabricante.

2.11 Testes imunoenzimáticos

A quantificação de anticorpos foi feita por meio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). No dia anterior, 100ng/poço da proteína rDTL8 diluída em solução de sensibilização (Carbonato de sódio ($\geq 99,5\%$, granular) 105,99 mM; Bicarbonato de sódio (99,7-100,3%) 84,01 mM; pH $9,5 \pm 0,3$) foi adicionada em placa de 96 poços e incubada de 4-8°C durante a noite. No dia seguinte, o conteúdo foi descartado e a placa bloqueada com solução de bloqueio (Sacarose 10%p/v; Cloreto de sódio 150 mM; Albumina bovina 1%p/v; pH $7,4 \pm 0,3$) a 37°C por uma hora. O conteúdo foi descartado e as amostras diluídas em solução diluente (Fosfato de sódio dibásico anidro PA 100 mM; Fosfato de potássio monobásico anidro 17 mM; Cloreto de sódio 150 mM; Cloreto de potássio PA 28 mM; Albumina bovina 1%; Sacarose 2%; D-manitol 1%; Proclin 0,1%v/v; Tween 80 0,05 %v/v) foram adicionadas à placa que foi incubada a 37°C. Após uma hora, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem (Fosfato de sódio dibásico anidro PA 10 mM; Fosfato de potássio monobásico anidro 1,8 mM; Cloreto de sódio 150 mM; Cloreto de potássio PA 2,8 mM; Proclin 0,1%v/v; Tween 20 1%v/v; pH $7,4 \pm 0,3$), adicionou-se o anticorpo secundário específico para cada isotipo de interesse e incubou-se a 37°C. Após uma hora, a placa foi lavada novamente e o TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi adicionado. Incubou por 30 minutos em temperatura ambiente sob abrigo de luz. Por fim, a reação foi interrompida com solução de parada (Ácido sulfúrico (95 - 99%) 2 M). A leitura da placa foi feita na absorbância de 450 nm.

2.12 Avaliação da carga parasitária por meio de diluição limitante e qPCR.

A carga parasitária foi medida por Análise de Diluição Limitante (LDA), conforme descrito por Lima *et al.*, 1997. Brevemente, o baço e o fígado dos camundongos BALB/c foram adicionados em meio RPMI e, individualmente, macerados em um filtro *cell strainer*. A pata dos C57BL/6 foi adicionada em meio RPMI e, individualmente, macerados com beads magnéticas utilizando o TissueLyser LT (Qiagen 85600). 200 uL do homogeneizado foi adicionado nos poços da primeira strip da placa de 96 poços. O homogeneizado foi diluído 10 vezes e incubado em estufa de B.O.D (*Biochemical oxygen demand*) a 26°C por no máximo duas semanas. A leitura das placas foi feita no dia 14 para a diluição feita a partir do baço e do fígado e no dia 6 para a diluição feita a partir da pata. A leitura foi realizada por meio de um microscópio. O DNA total da pata dos camundongos C57BL/6 infectados foi extraído e empregado na PCR em tempo real (qPCR). O DNA de *L.amazonensis* foi detectado utilizando primers e sonda que se anelam no gene *HSP70*, sendo o forward:

5'-GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG-3'; o reverse: 5'- TCCTTCGTTGCCTCCTG GTTG-3' e sonda: /5'HEX/GAC ACC GAC /ZEN/ AAG TCG ACA CTG AAC/3'BHQ/.

O gene *GAPDH* de camundongo foi utilizado como controle endógeno. O número de parasitas por ng de DNA foi determinado comparando os valores de CT (ciclos de threshold) de cada amostra com os CTs de uma curva padrão gerada a partir de diluições seriadas de 10 vezes de número de parasitos (100.000 parasitos – 10 parasitos). Para quantificação do HSP70, foram utilizados 7,5 uL do master Mix 2X (CT Vacinas, Brasil), 0,33 uM de cada primers, 0,165 uM da sonda, 1 ng do DNA molde em um volume final de 15 uL. As condições da PCR foram: temperatura a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de temperatura a 95°C por 5 segundos e 60° C por 1 minuto. Para detecção do GAPDH, foram utilizados 7,5 uL do Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 0,2 uM de cada primers, sob as condições de temperatura de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de temperatura a 95°C por 15 segundos e 60° C por 60 segundos, sendo realizada a análise por curva de melt.

2.13 Medida do tamanho da lesão

O tamanho da lesão da pata dos camundongos C57BL/6 desafiados com *L.amazonensis* expressando luciferase, foi medido semanalmente, durante 9 semanas, utilizando um paquímetro.

2.14 Extração do DNA para qPCR

A pata dos animais infectados com *L. amazonensis* expressando luciferase foi macerada em meio RPMI. 600 uL do macerado foram centrifugados e removeu-se o sobrenadante. Adicionou 530 uL de tampão de lise (Tris 50 mM pH8; NaCl 50 mM; EDTA 10 mM; 1% de SDS; 0,4 ug/uL de Proteinase K) em cada amostra. Incubou a 56°C overnight. Centrifugou brevemente. Adicionou 240 uL de solução NaCl e vortexou por 10 segundos. Centrifugou por 30 minutos a 4°C. Coletou o sobrenadante e transferiu-o para tubo de 2 mL. Adicionou 800 uL de isopropanol e misturou por inversão. Incubou a -20°C overnight. Centrifugou a 16.000 xg por 30 minutos a 4°C. Descartou o sobrenadante e lavou o pellet com 1 mL de etanol 70%. Centrifugou a 16.000 xg por 30 minutos a 4°C. Descartou o sobrenadante e deixou o pellet secar no banho seco a 60°C. Ressuspendeu o pellet em 50 uL de tampão Low TE (0.1 mM EDTA). Vortexou por 10 segundos, centrifugou brevemente e incubou a 60°C por 10 minutos. Centrifugou brevemente e quantificou o DNA pelo Qubit utilizando o kit Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kits (Invitrogen™, Q32850).

2.15 Avaliação da carga parasitária pela atividade de luciferase

L. amazonensis (cepa PH8) expressando luciferase foi gentilmente cedida pelo pesquisador Dr. Rodrigo Soares, da Fiocruz Minas. Esse parasito foi gerado por meio de transfecção com o plasmídeo piR1SAT-LUC(a) DsRed2(b) B5947, conforme descrito por Rocha *et al.*, 2013. A atividade de luciferase foi avaliada *in vitro* e *in vivo* quanto a emissão de bioluminescência. As *L. amazonensis* expressando luciferase foram centrifugadas a 3.000 rpm e lavadas 1X com PBS. Em seguida, os parasitos foram ressuspensos em 200 uL de tampão de lise 1X (Reporter Lysis 5X buffer, Promega) e centrifugados por 3 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e 10 uL foi misturado com 100 uL de substrato luciferina (luciferase Assay System, Promega). A atividade de luciferase foi medida no Luminômetro de Microplacas (Luminoskan, Thermo Scientific). Camundongos BALB/c (n=5) foram inoculados com 2×10^5 *L. amazonensis* expressando luciferase. Dez semanas após a infecção, os animais receberam intraperitonealmente (i.p.) 100 µl de D-luciferina (VivoGlo™ Luciferin, Promega, Madison, WI, USA) a uma concentração de 150 mg/kg. Dez minutos após a administração, as imagens foram coletadas em modo de alta resolução, com 2 minutos de tempo de exposição, usando o sistema de imagem IVIS Spectrum (PerkinElmer, Caliper Life Sciences, Inc. MA/USA). Os

camundongos foram anestesiados em câmara de anestesia ventilada com 3% de isoflurano (Cristália Prod. Quím. Farm.) em oxigênio.

2.16 Análises estatísticas

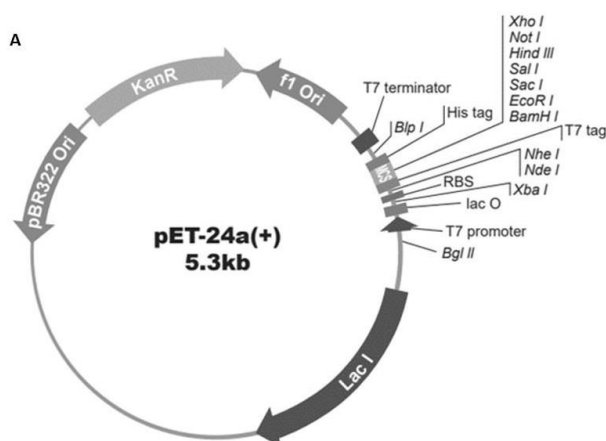
Os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 8 e a estatística foi determinada pelo método Two-way ANOVA e Ordinary one-way ANOVA, ambas com pós-teste em Tukey. A significância estatística foi estabelecida em * $p \leq 0,05$; ** = p valor $<0,005$, *** = p valor $<0,0005$ e **** = p valor $<0,0001$.

3 RESULTADOS

3.1 Obtenção da proteína DTL8 recombinante

O plasmídeo de expressão pET24a(+) contendo a sequência gênica da proteína DTL8 recombinante foi sintetizado pela empresa *GenScript* (**Figura 5A**). Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram previamente transformadas com este plasmídeo e a indução da expressão da proteína rDTL8 foi realizada à 37°C durante 3 horas. Para confirmar se houve a produção da proteína de interesse, a fração induzida do cultivo bacteriano foi retirada e comparada com a fração coletada antes da indução, como pode ser observado na **Figura 5B**. Foi avaliado também se a proteína rDTL8 produzida estava na forma solúvel ou insolúvel. Para isso, as células bacterianas foram lisadas por meio do Emulsiflex-C3 e a fração insolúvel (*pellet*) e a fração solúvel (sobrenadante) foram separadas por centrifugação. Um tampão desnaturante foi adicionado em todas essas frações e elas foram aquecidas a 96°C. Em seguida, uma alíquota dessas frações foi analisada em gel de acrilamida e foi possível observar uma banda evidente da proteína rDTL8 na fração solúvel (**Figura 5B**).

Depois de confirmada sua expressão, a proteína rDTL8 foi purificada utilizando o cromatógrafo Akta pure™ (Cytiva). Primeiro, as células bacterianas foram lisadas e centrifugadas. Então, o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi aplicado no Akta. A proteína rDTL8 possui resíduos de histidina na porção carboxi-terminal. Isso possibilita a sua purificação utilizando cromatografia de afinidade, uma vez que a histidina interage com o níquel presente na coluna cromatográfica. Após a purificação, algumas das frações obtidas foram separadas em gel acrilamida sob condições desnaturantes (**Figura 5C**). As frações 15, 16, 17 e 18 que estavam mais puras foram reunidas e a uma alíquota foi analisada em gel de acrilamida, como pode ser observado na **Figura 5D**.



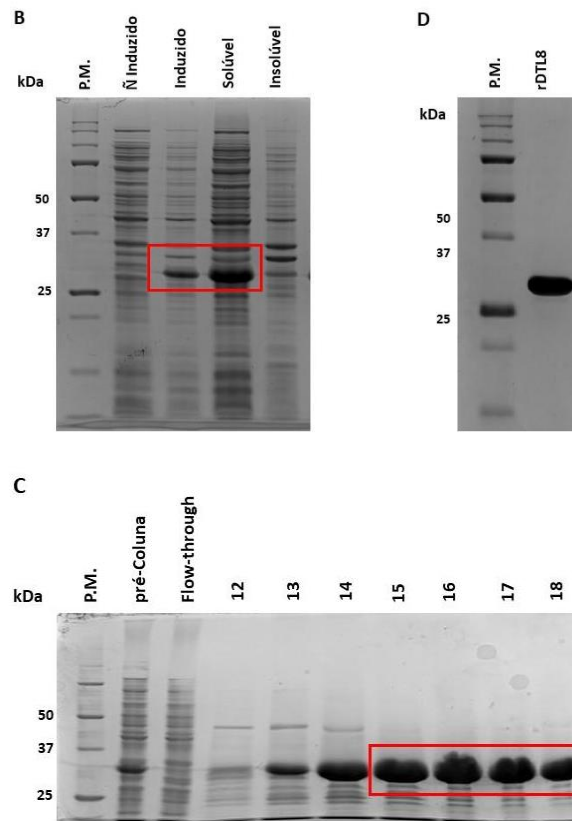


Figura 5 – Produção da proteína DTL8 recombinante em bactéria. O plasmídeo pET24a(+) contendo a sequência que codifica a proteína rDTL8, foi previamente transformado em *E. coli* BL21(DE3) (A). Para expressão da proteína rDTL8, as bactérias transformadas com este plasmídeo foram crescidas em meio LB com canamicina e a expressão da proteína induzida com IPTG por 3 horas. Para avaliar a indução da expressão da rDTL8, uma alíquota da cultura sem IPTG e uma alíquota da cultura na qual foi adicionada IPTG por 3 horas foi analisada em gel de acrilamida 12,5% (B). Além disso, para avaliar a solubilidade da proteína, uma alíquota da fração solúvel e insolúvel foi também analisada em gel de acrilamida 12,5% (B). A proteína rDTL8 foi purificada por cromatografia de afinidade e as frações obtidas analisadas por SDS-PAGE (C) As frações mais puras (15, 16, 17 e 18) foram reunidas e uma alíquota foi analisada em gel de acrilamida 12,5% (D). **P.M.** – Padrão de peso molecular, **Pré-coluna** – extrato proteico da bactéria antes de ser passado na coluna de purificação, **Flow-through** – fração do extrato proteico que não ligou na coluna.

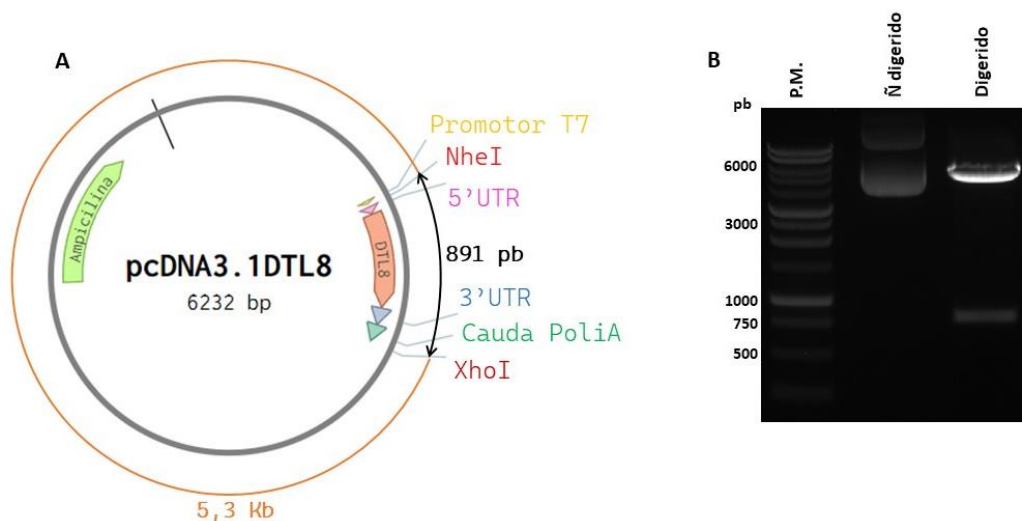
3.2 Obtenção do mRNA contendo a sequência do antígeno DTL8

3.2.1 Síntese *in vitro* e purificação do mRNA DTL8

O plasmídeo pcDNA3.1DTL8 utilizado para síntese do mRNA *in vitro* foi produzido pela empresa GeneScript. Para a produção deste plasmídeo, uma sequência gênica idêntica a utilizada para produzir a proteína DTL8 recombinante em bactérias (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado) foi clonada entre os sítios de clivagem das enzimas de restrição NheI e XhoI (Figura 6A). Para que possa ser utilizado como molde em uma reação de

transcrição *in vitro*, o plasmídeo pcDNA3.1DTL8 contém a sequência do promotor da T7 RNA polimerase acima da sequência que codificada a proteína DTL8. Além disso, o plasmídeo também possui uma sequência 5' UTR do gene de alfa globina humana, acima da sequência que codifica a DTL8, uma sequência 3' UTR também do gene de alfa globina humana, logo abaixo da sequência codificadora e uma sequência de 110 adeninas adjacente a sequência 3' UTR (**Figura 6A**). Para obter maiores quantidades desse plasmídeo, este foi transformado em bactérias *E. coli* XL-1 Blue e purificado em colunas de sílica. Após a purificação, o pcDNA3.1DTL8 foi digerido com as enzimas NheI e XhoI para confirmação de sua identidade. A análise em gel de agarose do produto da digestão permitiu observar fragmentos de DNA plasmidial com os tamanhos esperados de 5,3 kb (kilobases) e 891 pb (pares de bases) (**Figura 6B**). Para ser utilizado como molde na reação de transcrição *in vitro*, o pcDNA3.1DTL8, foi linearizado com a enzima *XhoI* e purificado em coluna de sílica (**Figura 6C**).

Para reação de transcrição *in vitro* o pcDNA3.1DTL8, foi incubado com tampão apropriado, com o análogo de Cap para adição do Cap 5' e com a enzima T7 RNA polimerase. Além disso, também foram adicionados os ribonucleotídeos, rATP, rGTP, rCTP e o análogo de rUTP (N1-Metilpseudouridina-5'-trifosfato). A reação foi incubada á 37°C por 3 horas e ao final foi adicionado DNase para degradação do plasmídeo usado como molde. Em seguida, o mRNA transcrito foi purificado com fenol e clorofórmio e analisado em gel de agarose em condições desnaturantes. Como pode ser observado na **Figura 6D**, uma banda íntegra e correspondente ao tamanho esperado do mRNA DTL8, de 909 bases, foi detectada. A **Figura 6E** mostra a estrutura final do mRNA DTL8 após a transcrição *in vitro* e adição do Cap5'.



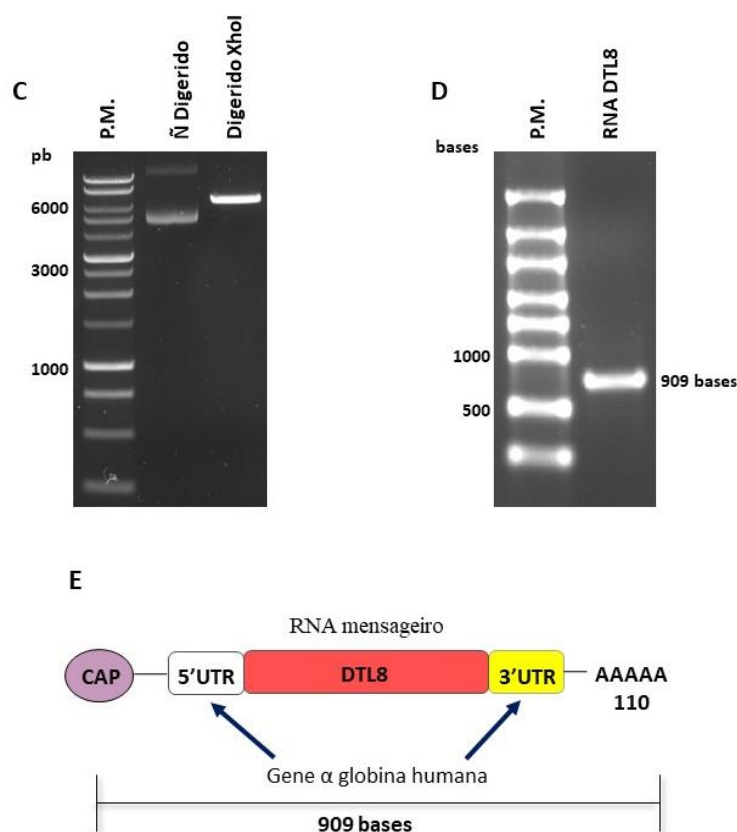


Figura 6 – Síntese *in vitro* do mRNA DTL8. O plasmídeo pcDNA3.1DTL8 utilizado como molde na transcrição *in vitro* contém a sequência promotora da enzima T7 RNA polimerase, sequências 5' e 3' UTRs, a sequência codificadora da proteína DTL8 e uma sequência de 110 adeninas (A). O pcDNA3.1DTL8 foi digerido com as enzimas NheI e XhoI para confirmação de sua identidade (B). Em seguida, o pcDNA3.1DTL8 foi linearizado com a enzima XhoI, purificado e analisado em gel de agarose 0,7%, corado com SyberSafe (C). Após a reação de transcrição *in vitro*, o mRNA DTL8 foi purificado e analisado em gel de agarose 1% em condições desnaturantes, corado com brometo de etídio (D). A **Figura E** mostra a estrutura final do mRNA, após a transcrição *in vitro*, com uma sequência Cap5', uma sequência 5' e 3' UTR, a sequência codificadora da proteína DTL8 e uma cauda de 110 adeninas. **P.M.** - Padrão de peso molecular.

3.2.2 Análise da expressão do antígeno DTL8 após transfecção de células com mRNA

Para avaliar se células de mamífero eram capazes de expressar o antígeno DTL8 a partir do mRNA sintetizado *in vitro*, células da linhagem HEK293T (Células Embrionárias de Rim Humano) foram transfectadas com o mRNA DTL8. Para isso, o mRNA foi administrado junto com reagentes de transfecção que possuem alta eficiência de entrega e baixa toxicidade para células *in vitro*. Além disso, células HEK 293T também foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1DTL8 associado com um reagente de transfecção. Vinte e quatro horas após a transfecção, os extratos celulares foram preparados para análise da expressão do antígeno DTL8

por *western blot* utilizando o anticorpo primário anti-DTL8. Para controle positivo do *western blot*, foi utilizada a proteína DTL8 recombinante e, para controle negativo, utilizou-se as proteínas obtidas das células incubadas apenas com os reagentes de transfecção. A análise por *western blot* do extrato de células HEK293T confirmou que, quando transfectadas com o mRNA DTL8 e com o pcDNA3.1DTL8, essas células são capazes de expressar o antígeno DTL8 (**Figura 7**).

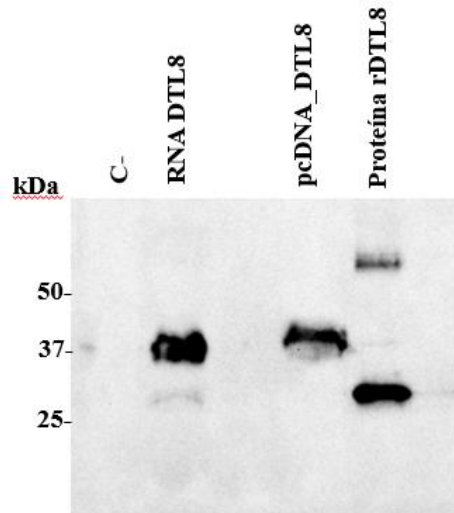


Figura 7 - Western blot para detecção da proteína DTL8. Células HEK293T foram transfectadas com 3ug de mRNA DTL8 ou 5 ug do pcDNA3.1DTL8. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram lisadas e as proteínas totais foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 12,5%. Para análise por *western blot*, as proteínas totais foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a membrana foi incubada com anticorpo anti-DTL8 diluído 1:1000 e com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído 1:10.000. Para controle positivo do *western blot*, foi utilizada a proteína DTL8 recombinante e, para controle negativo, foi utilizado o extrato das células tranfectadas apenas com os reagentes de transfecção (C-).

3.3 Potencial vacinal do mRNA codificando o antígeno DTL8

3.3.1 Resposta humoral induzida pela imunização de camundongos C57BL/6 com a LNP_RNA DTL8

Para avaliar a resposta humoral gerada a partir da imunização com o mRNA DTL8 transcrito *in vitro*, foi necessário encapsulá-lo em LNPs. Uma composição lipídica contendo colesterol, DSPC, lipídio peguilado e um lipídio catiônico ionizável, desenvolvida pela equipe do CT Vacinas, foi utilizada para gerar as LNPs contendo o mRNA DTL8. A formulação de LNPs contendo o mRNA DTL8 encapsulado foi denominada como LNP_RNA DTL8. Além disso, foram produzidas também LNPs vazias para serem utilizadas como controle negativo da imunização. As LNPs produzidas foram avaliadas quanto as seguintes características: diâmetro

médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e porcentagem de encapsulamento do mRNA. As LNPs utilizadas na primeira dose (prime), contendo o mRNA encapsulado possuíam diâmetro médio de 257 nm, IP de 0,286, potencial zeta de -8,9 mV (milivolt) e porcentagem de encapsulamento do mRNA de 16,4% (**Figura 8A**). Para a segunda dose (boost), algumas modificações na forma de preparo das nanopartículas permitiram obter LNPs com mRNA encapsulado contendo um menor diâmetro médio de 126,2 nm e um aumento na porcentagem de encapsulamento do mRNA para 33,3% (**Figura 8B**). Nas LNPs vazias, os parâmetros avaliados foram somente diâmetro médio e IP. Para avaliar a integridade do mRNA DTL8 após o processo de encapsulamento, ele foi extraído das LNPs utilizando fenol e clorofórmio. Por análise em gel de agarose sob condições desnaturantes, observou-se que as LNPs são capazes de manter o mRNA DTL8 íntegro (**Figura 8C**).

Com o objetivo de avaliar se a formulação de LNP conseguiria fazer o *delivery* do mRNA DTL8 para dentro das células *in vitro*, células HEK293T foram transfectadas com 3 ug e 6 ug do mRNA DTL8 encapsulado em LNPs e 24 horas após a transfecção, os extratos celulares foram preparados para análise da expressão do antígeno DTL8 por *western blot* utilizando o anticorpo primário anti-DTL8. Como controle negativo do *western blot*, utilizou-se as proteínas obtidas das células incubadas apenas com o mRNA não encapsulado (RNA DTL8 puro) ou incubadas apenas com o meio de cultura. A análise por *western blot* do extrato de células HEK293T confirmou que, quando transfectadas com a LNP_ RNA DTL8, essas células são capazes de expressar o antígeno DTL8 (**Figura 8D**).

Parâmetros	LNPs		Parâmetros	LNPs	
	LNP vazia	LNP+RNA DTL8		LNP vazia	LNP+RNA DTL8
Diâmetro médio	216 nm	257 nm	Diâmetro médio	146,8 nm	126,2 nm
IP	0,28	0,286	IP	0,167	0,255
Potencial Zeta		-8,9 mV	Potencial Zeta		-9,69 mV
% encapsulamento		16,4 %	% encapsulamento		33,3 %

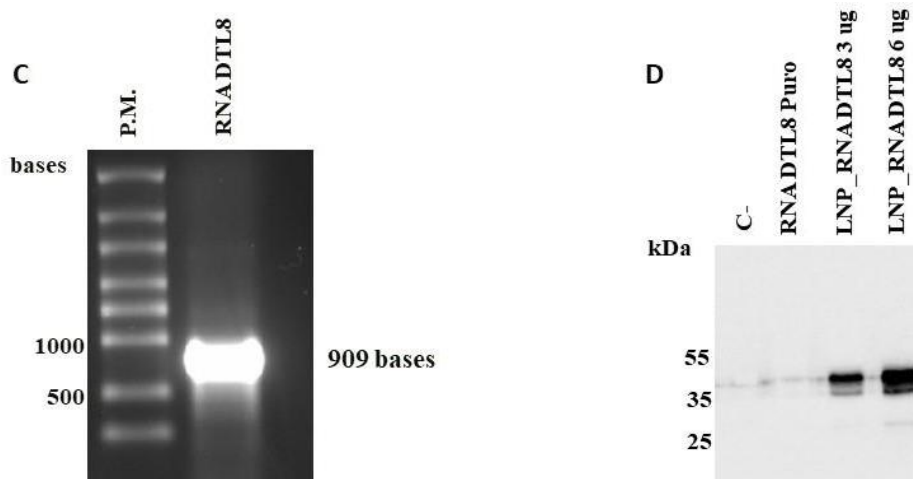


Figura 8 – Encapsulamento do mRNA DTL8 em LNPs. O mRNA DTL8 foi encapsulado em LNPs formadas por quatro lipídeos, sendo eles lipídeo catiônico ionizável, DSPC, colesterol e lipídio peguado. Após sua produção, a formulação de LNP_RNA DTL8 foi caracterizada quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação do mRNA. As LNPs sem RNA encapsulado foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio e índice de polidispersão. Estas LNPs, com e sem RNA, foram utilizadas para imunizar camundongos C57BL/6, tanto no prime (A) como no boost (B). O mRNA DTL8 encapsulado em LNPs foi extraído e analisado em gel de agarose 1%, sob condições desnaturantes (C). Células HEK293T foram transfectadas com 3ug e 6 ug de mRNA DTL8 encapsulado em LNPs. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram lisadas e as proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12,5%. Para o *western blot*, as proteínas totais foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-DTL8 diluído 1:1000 e com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído 1:10.000 (D). Para controle negativo do *western blot*, utilizou o extrato das células transfectadas apenas com o mRNA DTL8 não encapsulado (RNA DTL8 puro) ou com o meio de cultura (C-).

Uma vez demonstrada que a formulação de LNP era capaz de promover a *delivery* do mRNA para dentro das células, a resposta humoral induzida pela imunização com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs foi avaliada utilizando o protocolo esquematizado na **Figura 9A**. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com: (1) a formulação LNP_RNA DTL8; (2) o mRNA DTL8 não encapsulado (RNA Naked) e (3) a LNP vazia. O sangue desses animais foi coletado 20 dias após a primeira (prime) e segunda (boost) imunização. A partir do soro, foi feito um ELISA para avaliar a produção de anticorpos IgG anti-DTL8 nos animais imunizados. Observou-se a produção de anticorpos IgG Total (**Figura 9B**), IgG1 (**Figura 9C**) e IgG2c (**Figura 9D**) nos animais imunizados com mRNA DTL8 encapsulado em LNPs. Destacando que desde o prime houve produção de IgG Total e após o boost ocorreu um aumento no título, o que indica que as LNPs são capazes de entregar o mRNA de forma eficiente também *in vivo* (**Figura 9B**). Em contraste, não foi observada produção de anticorpos IgG anti-DTL8 nos animais imunizados com o RNA Naked ou com as LNPs vazias.

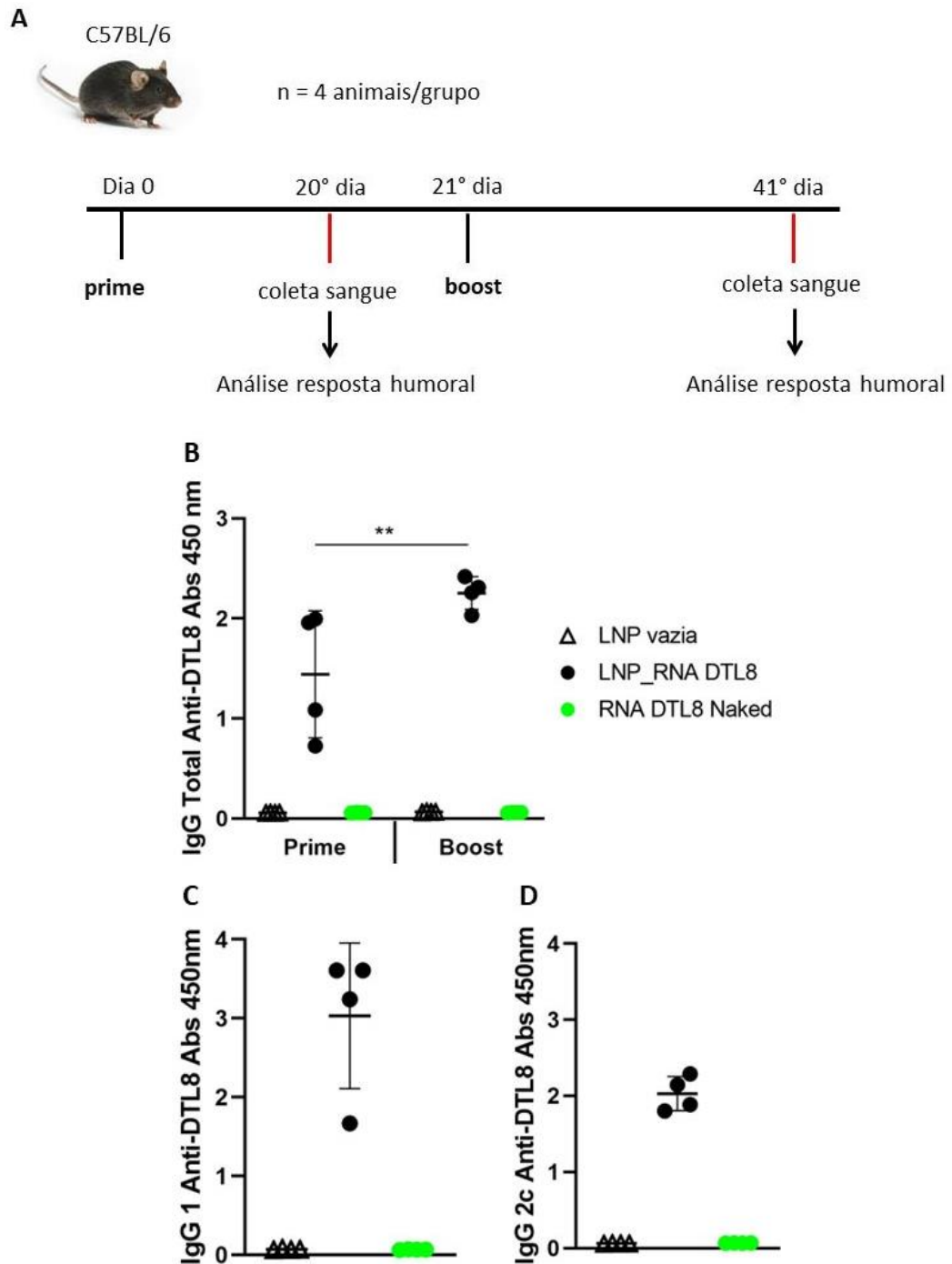


Figura 9 - Produção de anticorpos IgG Total, IgG1 e IgG2c em camundongos C57BL/6 imunizados com a LNP_RNA DTL8. Camundongos C57BL/6 (n=4 animais/grupo) foram imunizados com 10 ug de mRNA DTL8 encapsulado em LNPs, com 10 ug de RNA Naked em PBS e com a LNP vazia. Para as imunizações foram administradas duas doses com intervalo de 21 dias, conforme protocolo esquematizado (A). Vinte dias após o prime e o boost, o sangue dos animais foi coletado e o soro foi utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a produção de anticorpos IgG anti-DTL8. O soro foi diluído 1:10. Avaliou-se a produção de IgG Total (B), IgG1 (C) e IgG2c (D). Cada círculo ou triângulo representa um animal. ** = p valor <0,005. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey.

3.3.2 Comparação entre a resposta imune gerada pela imunização de C57BL/6 com a LNP_RNA DTL8 e pela imunização com a proteína DTL8 recombinante

Após os primeiros experimentos de encapsulamento do mRNA DTL8 em LNPs, foram realizadas modificações nos parâmetros de síntese da formulação de LNPs. Essas modificações resultaram em uma melhora significativa nas características da LNP, como o diâmetro médio e a porcentagem de RNA encapsulamento. Conforme mostrado na **Figura 10A**, foi possível obter uma formulação contendo LNPs com um diâmetro médio menor entre 100 a 130 nm e uma porcentagem de encapsulamento do RNA maior que 80%. Com base nos resultados obtidos após as modificações nos parâmetros de síntese das LNPs, todos os experimentos que serão descritos a seguir foram feitos utilizando esses novos parâmetros.

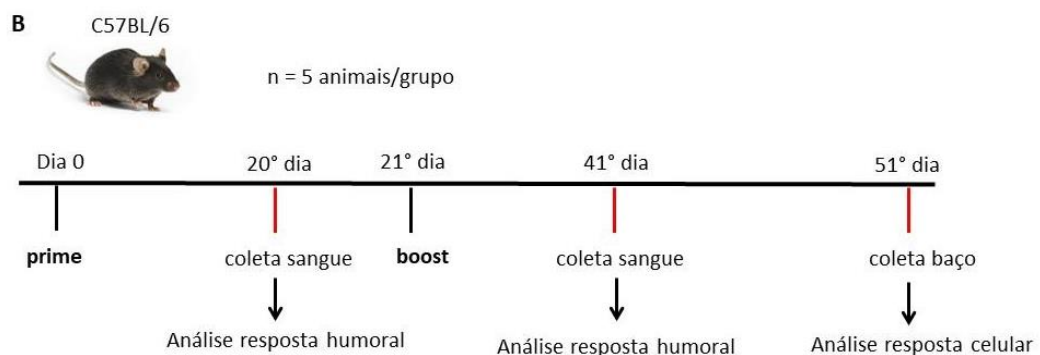
Com objetivo de comparar a resposta humoral induzida pela imunização com o LNP_RNA DTL8 com a resposta induzida pela imunização com a proteína DTL8 recombinante, camundongos C57BL/6 foram imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs desenvolvidas pelo CT vacinas (LNP_RNA DTL8 CT Vacinas) ou com a proteína DTL8 recombinante + o adjuvante Poly (ICLC). Além disso, para comparar a formulação de LNP desenvolvida no CT Vacinas com uma formulação que já tivesse eficácia comprovada, um grupo de animais também foi imunizado com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs formadas por lipídios semelhantes aos utilizados na vacina Moderna para Covid-19, sendo denominada como LNP_RNA DTL8 Moderna. Para o controle negativo da imunização, foi administrado apenas solução salina (PBS). Foram aplicadas duas doses das vacinas em um intervalo de 21 dias, conforme protocolo esquematizado (**Figura 10B**). Vinte dias após o prime e o boost, o sangue dos animais foi coletado e o soro foi utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a resposta humoral por meio da produção de anticorpos IgG anti-DTL8. Observou-se uma menor produção de anticorpos IgG Total após a imunização com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC) em comparação a produção de anticorpos nos animais imunizados com as formulações LNP_RNA DTL8 CT Vacinas e LNP_RNA DTL8 Moderna (**Figura 10C**). Além disso, observou-se uma produção semelhante de anticorpos IgG Total nos animais imunizados com as formulações LNP_RNA DTL8 CT Vacinas e LNP_RNA DTL8 Moderna (**Figura 10C**). A produção de IgG1 (**Figura 10D**) e IgG2c (**Figura 10E**) após o boost foi maior nos camundongos imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em ambas as formulações quando comparada com a produção desses anticorpos nos animais imunizados com a proteína DTL8 recombinante + Poly ICLC. Não houve diferença na produção de IgG1 e IgG2c entre os animais

imunizados com a vacina de RNA encapsulado com as LNPs do CT Vacinas ou com as da Moderna.

Para avaliar a resposta celular induzida pela imunização com a LNP_RNA DTL8 CT Vacinas e comparar com a resposta gerada a partir da imunização com a proteína DTL8 recombinante+Poly(ICLC) e da imunização com a LNP_RNA DTL8 Moderna, o baço dos camundongos C57BL/6 foi coletado 30 dias após o boost, conforme esquematizado na **Figura 10B**. Em seguida, os esplenócitos foram processados, estimulados com a proteína DTL8 recombinante e o sobrenadante da cultura de esplenócitos foi utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a produção de IFN- γ nos animais imunizados. As células incubadas apenas em meio RPMI foram utilizadas como controle negativo e as incubadas com Concanavalina A foram utilizadas como controle positivo. Os resultados mostraram que houve uma produção significativa de IFN- γ apenas no grupo imunizado com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC) quando comparado ao grupo PBS (**Figura 10F**).

A

Parâmetros	LNP
	LNP+RNA DTL8
Diâmetro médio	126,1 nm
IP	0,223
Potencial Zeta	-3,05 mV
% encapsulamento	87,9 %



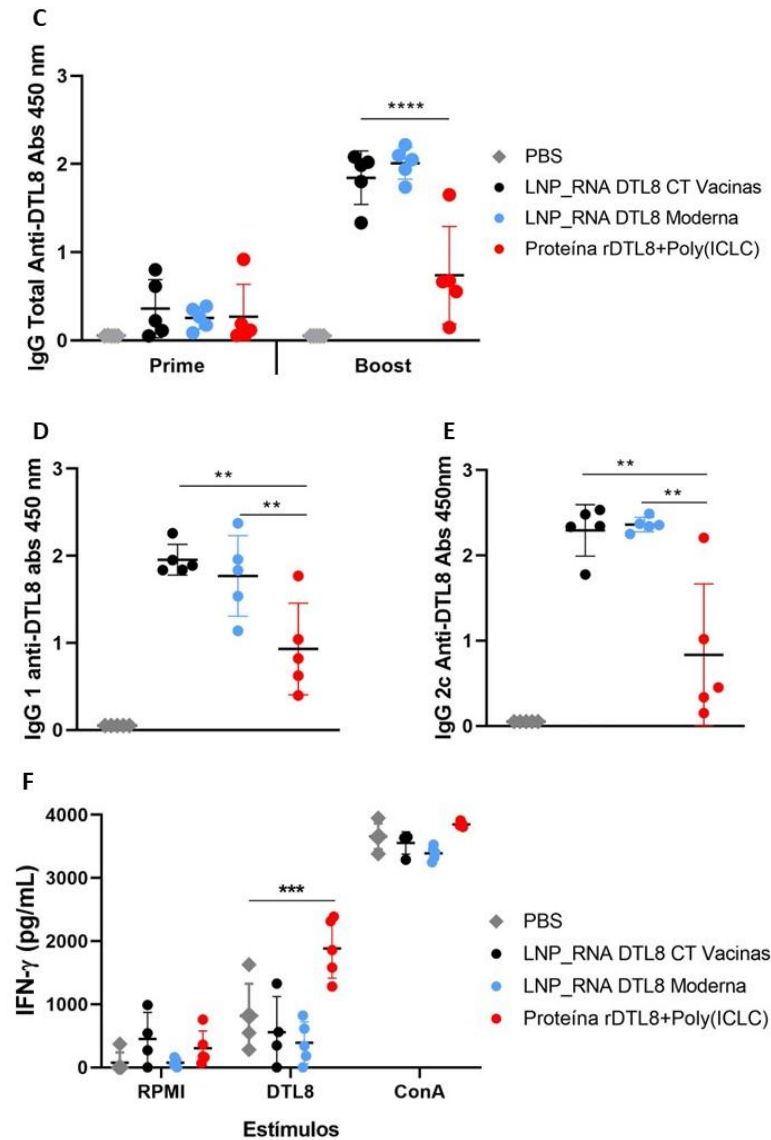


Figura 10- Avaliação da resposta humoral e celular induzida pela imunização de camundongos C57BL/6 com o mRNA DTL8 encapsulado em dois tipos de LNPs e com a proteína rDTL8+Poly (ICLC). O mRNA DTL8 foi encapsulado nas LNPs formadas por quatro lipídeos: lipídeo catiônico ionizável, DSPC, colesterol e lipídio peguado. Após sua produção, a formulação foi caracterizada quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação do mRNA. Obteve-se a formulação final de LNPs contendo o mRNA DTL8 (A). Camundongos C57BL/6 (n=5) foram imunizados com 10 ug do mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs do CT Vacinas, com 10 ug do mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs da Moderna, com 10 ug da proteína DTL8 recombinante + 50 ug de Poly(ICLC) e com PBS. Foram administradas duas doses em um intervalo de 21 dias (B). O sangue dos animais foi coletado 20 dias após o prime e o boost. O soro foi diluído 1:100 e utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a resposta humoral por meio da detecção de anticorpos IgG anti-DTL8. Determinou-se a produção de IgG Total (C), IgG1 (D) e IgG2c (E). Para determinar a resposta celular, o baço dos animais imunizados foi coletado e processado 30 dias após o boost. Os esplenócitos foram mantidos em cultura sob o estímulo da proteína DTL8 recombinante. O sobrenadante da cultura de esplenócitos foi utilizado em um ensaio de ELISA para detecção da citocina IFN- γ (F). Cada círculo ou losango representa um animal. ** = p valor <0,005, *** = p valor <0,0005 e **** = p valor <0,0001. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey.

3.3.3 Comparação entre a resposta imune gerada pela imunização de BALB/c com a LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar se a imunização com o mRNA DTL8 iria conferir proteção contra leishmaniose visceral causada pela infecção com *L. infantum*. Por isso, primeiro, foi necessário verificar se a imunização com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs seria capaz de induzir resposta imune em uma linhagem de camundongos susceptíveis a essa espécie de *Leishmania*. Então, com base em artigos científicos, o modelo animal escolhido para este experimento foi o de camundongos BALB/c (FERNANDES et al., 2008; PÉREZ-CABEZAS et al., 2019). Para avaliar a resposta humoral induzida pela imunização com LNP_RNA DTL8 e comparar com a resposta induzida pela imunização com a proteína DTL8 recombinante, camundongos BALB/c foram imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs desenvolvidas pelo CT Vacinas e com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC). Assim como no experimento anterior, foi comparada a formulação das LNPs desenvolvidas pelo CT Vacinas com uma formulação similar à da vacina de Covid-19 da Moderna. Para isso, os animais também foram imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs similares às da vacina da Moderna. Para controle negativo da imunização, foi administrado PBS em um grupo de animais. Neste experimento, foi utilizado um protocolo de prime seguido de dois boosts, com o objetivo de mimetizar os primeiros experimentos realizados pela Doutora Bianca Oliveira (dados não publicados). O sangue dos animais foi coletado 20 dias após o prime e após cada boost, conforme esquematizado na **Figura 11A**. O soro foi utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a produção de anticorpos IgG anti-DTL8. Observou-se que, assim como em C57BL/6, desde o prime houve a produção de anticorpos IgG Total nos camundongos BALB/c imunizados com a proteína DTL8 recombinante + Poly ICLC (**Figura 11B**). No entanto, a indução de anticorpos IgG Total ocorreu somente após o primeiro boost nos camundongos BALB/c imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado tanto nas LNPs do CT Vacinas como nas LNPs da Moderna (**Figura 11B**). Administrando um segundo boost, observou-se um aumento na produção de IgG Total para todos os grupos imunizados (**Figura 11B**). Após o segundo boost, observou-se uma quantidade alta de IgG1 (**Figura 11C**) e baixa de IgG2a (**Figura 11D**) em camundongos imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em ambas as LNPs ou com a proteína rDTL8 + Poly(ICLC).

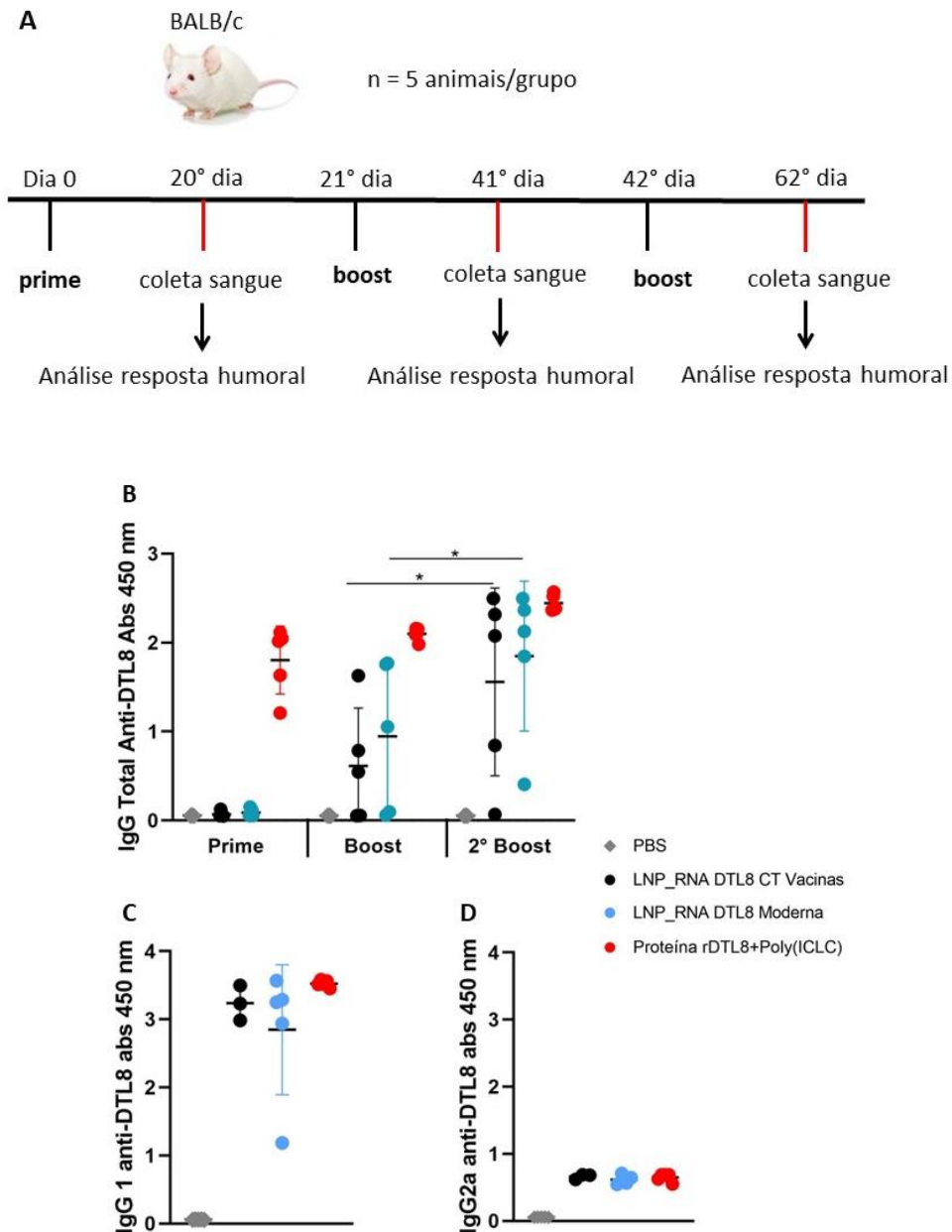
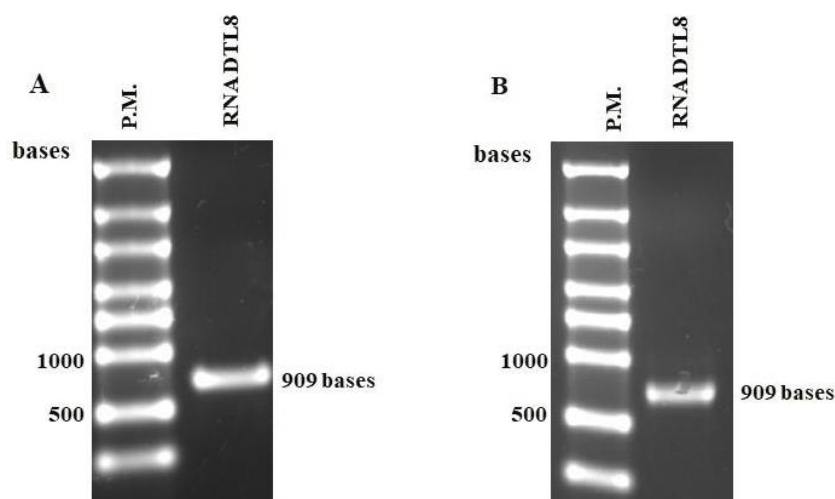


Figura 11 - Avaliação da resposta humoral e celular em camundongos BALB/c imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em diferentes LNPs e com a Proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC). Camundongos BALB/c (n=5) foram imunizados com o 10 ug do mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs do CT vacinas, com 10 ug do mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs similares a da vacina da Moderna, com 10 ug proteína DTL8 recombinante + 50 ug de Poly(ICLC) ou receberam apenas PBS (controle negativo). Foram administradas três doses em intervalos de 21 dias, seguindo o protocolo esquematizado (A). O sangue dos animais foi coletado 20 dias após cada imunização para avaliar a resposta humoral. O soro foi diluído 1:10 e utilizado no ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-DTL8. Avaliou-se a produção de IgG Total (B), IgG1 (C), IgG2a (D). Cada círculo ou losango representa um animal. * $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey.

3.3.4 Comparação da resposta humoral em camundongos BALB/c imunizados com LNP_RNA DTL8 purificado em coluna de celulose e por extração com fenol

Buscando entender a diferença na produção de anticorpos em camundongos C57BL/6 e BALB/c imunizados com o LNP_RNA DTL8, decidiu-se avaliar se essa diferença poderia ser proveniente da presença de RNA dupla fita (dsRNA) no mRNA transcrito *in vitro*. Para isso, o mRNA DTL8 foi purificado utilizando o protocolo de purificação por coluna de celulose, que é um método capaz de remover dsRNA. Além disso, foi obtido também o mRNA DTL8 purificado por meio do protocolo de fenol e clorofórmio. Por análise em gel de agarose sob condições desnaturantes, observou-se que tanto na purificação por coluna de celulose (**Figura 12A**) como na purificação por fenol e clorofórmio (**Figura 12B**), obteve-se um mRNA íntegro e com o tamanho esperado. Os RNAs obtidos em ambas as purificações foram encapsulados em LNPs com lipídeos do CT vacinas e as formulações foram administradas em camundongos BALB/c. Para servir como um controle positivo, foi incluído também um grupo imunizado com a proteína rDTL8+Poly(ICLC). Para controle negativo da imunização, os animais receberam apenas PBS. Foram administradas duas doses com 21 dias de intervalo entre elas. O sangue dos animais foi coletado e o soro utilizado no ELISA para avaliar a produção de anticorpos IgG anti-DTL8. Ao contrário do que se esperava, não houve a produção de anticorpos IgG Total nos animais imunizados com mRNA DTL8 purificado com celulose, mesmo após o boost. Assim como obtido em experimento anterior, houve a produção de IgG Total após o boost em camundongos BALB/c imunizados com mRNA DTL8 purificado por meio do protocolo de fenol e clorofórmio. Como já esperado, os animais imunizados com a proteína rDTL8+Poly(ICLC) produziram anticorpos desde o prime. Esses resultados estão mostrados na **Figura 12C**.



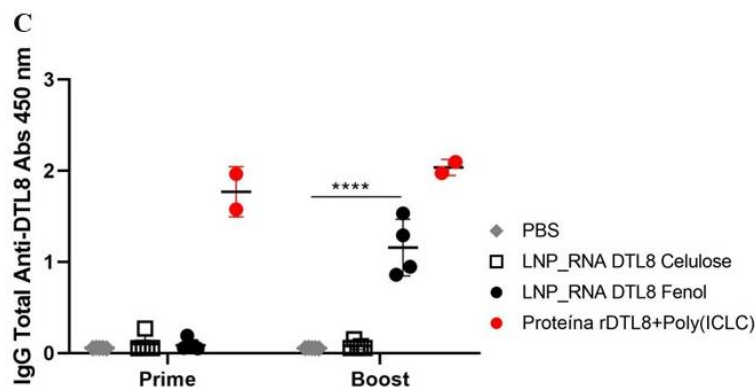


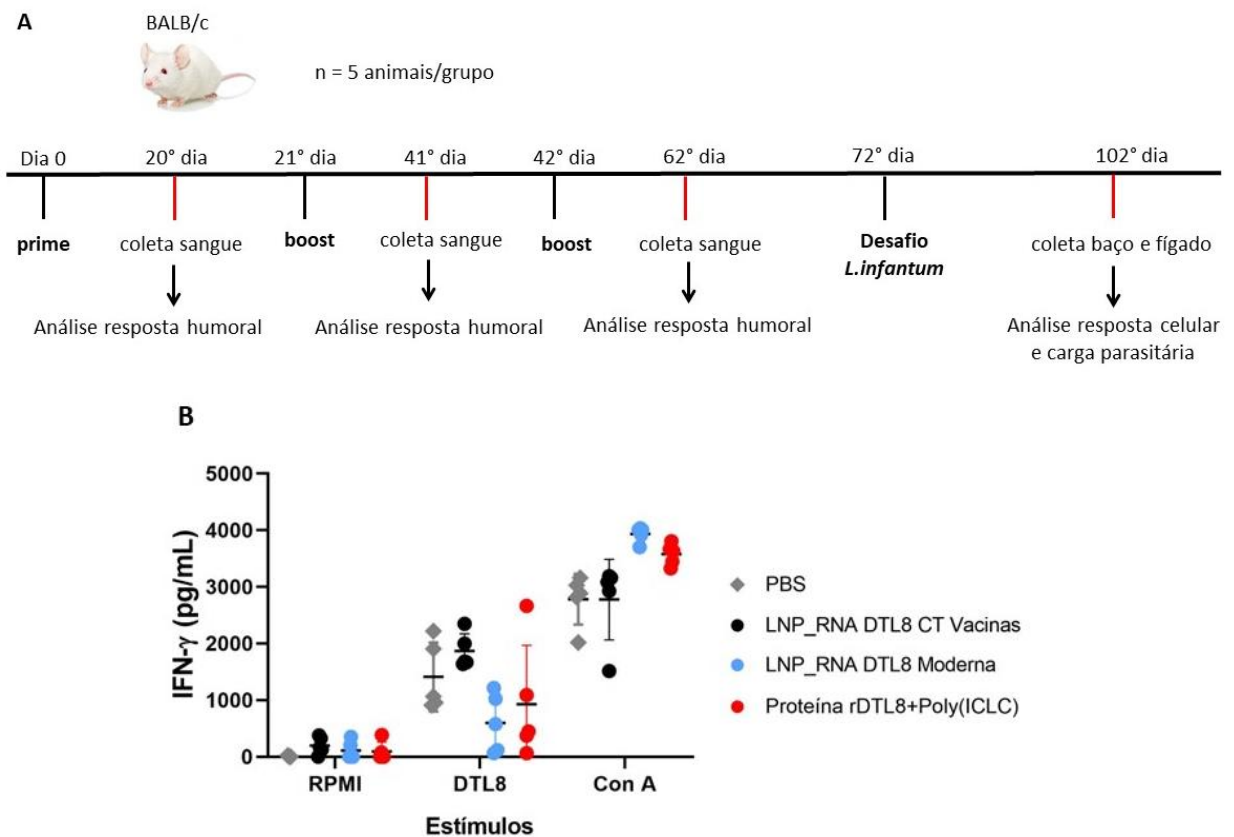
Figura 12 - Avaliação da resposta humoral em camundongos BALB/c imunizados com mRNA DTL8 purificado ou não com coluna de celulose. O mRNA DTL8 foi purificado utilizando protocolos distintos. Análise em gel agarose sob condições desnaturantes do mRNA DTL8 submetido a purificação com coluna de celulose (A) ou com fenol e clorofórmio (B). Camundongos BALB/c (n=5) foram imunizados com 10 ug do mRNA DTL8 purificado com coluna de celulose e encapsulado em LNPs; com 10 ug do mRNA DTL8 purificado com fenol e clorofórmio e encapsulado em LNPs e com a 10 ug da proteína DTL8 recombinante + 50 ug de Poly(ICLC). Três animais do grupo imunizado com a proteína morreram durante o experimento. Foram administradas duas doses em um intervalo de 21 dias. O sangue dos animais foi coletado 20 após o prime e o boost. O soro obtido foi diluído 1:10 e utilizado em um ELISA para avaliar a resposta humoral por meio da produção de anticorpos IgG Total anti-DTL8 (C). **P.M.** - Padrão de peso molecular. Cada círculo, quadrado ou losango representa um animal. **** = p valor < 0,0001. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey.

3.3.5 Avaliação da proteção conferida pela imunização com a LNP_RNA DTL8 e comparação com a proteção conferida pela imunização com a proteína DTL8 recombinante em BALB/c infectados com *L. infantum*

Como observado no experimento anterior, a purificação do RNA com coluna de celulose diminuiu a resposta humoral induzida pela imunização com a formulação de LNP_RNA DTL8 em camundongos BALB/c. Com isso, para este e o próximo experimento, decidiu-se continuar testando a imunização com o RNA purificado por meio do protocolo de fenol e clorofórmio. Com objetivo de avaliar a proteção conferida pela imunização com o mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs do CT Vacinas ou da Moderna e comparar com a proteção induzida pela imunização com a proteína DTL8 recombinante + PolyICLC, os camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses das vacinas e, 30 dias após o segundo boost, os animais foram infectados na pata, por via subcutânea, com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, de acordo o esquema da **Figura 13A**. Além de avaliar a proteção, outro objetivo foi determinar a resposta celular nos animais imunizados após o desafio com *L. infantum*. Para isso, o baço dos camundongos foi coletado, processado e os esplenócitos obtidos foram estimulados com a proteína DTL8 recombinante. Após estimulação, o sobrenadante da cultura de esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados com *L. infantum* foi coletado e

utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a resposta celular por meio da quantificação de IFN- γ . Diferente do esperado, não houve uma produção significativa de IFN- γ em nenhum dos grupos imunizados quando comparados ao controle negativo (**Figura 13B**).

Para avaliar a proteção induzida pela imunização de camundongos BALB/c com o mRNA DTL8 encapsulado em diferentes LNPs ou com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC), a carga parasitária foi determinada por análise de diluição limitante (LDA) utilizando o fígado e o baço dos camundongos desafiados com *L. infantum*. Os resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa da carga parasitária no baço dos animais imunizados com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC) em comparação ao controle negativo (**Figura 13C**). Porém, não houve uma redução significativa na carga parasitária no baço dos camundongos imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs do CT Vacinas ou da Moderna quando comparado ao controle negativo (**Figura 13C**). Além disso, não houve redução significativa da carga parasitária no fígado dos animais em nenhum dos grupos imunizados em relação ao grupo controle (**Figura 13D**).



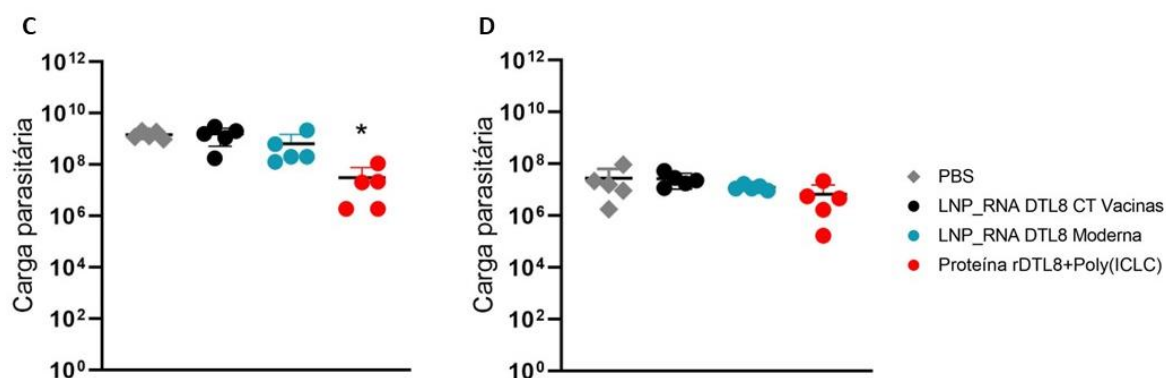


Figura 13 - Avaliação da proteção contra *L. infantum* em camundongos BALB/c imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em diferentes LNPs e com a Proteína DTL8 recombinante + Poly(I:CLC). Camundongos BALB/c foram imunizados utilizando um protocolo de prime, seguido de 2 boosts com mRNA DTL8 encapsulado na formulação do CTVacinas ou na formulação similar a da vacina de Covid-19 da Moderna. Os camundongos também foram imunizados com a proteína DTL8 recombinante + Poly(I:CLC) ou injetados com PBS. Trinta dias após o segundo boost os animais foram desafiados com formas promastigotas de *L. infantum* (A). Trinta dias após o desafio os baços dos animais foram retirados e utilizados em experimento de cultura de esplenócitos para dosagem de IFN- γ por meio de ELISA (B). Parte dos baços também foram utilizados em ensaio de diluição limitante para determinação da carga parasitária (C). Os fígados dos animais também foram retirados para ensaio de diluição limitante (D). Cada círculo, quadrado ou losango representa um animal. * $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey.

3.3.6 Testes de bioluminescência na infecção com *L. amazonensis* expressando luciferase

Com o objetivo de avaliar se a imunização com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs ou com a proteína DTL8 recombinante era capaz de induzir proteção contra leishmaniose cutânea, uma linhagem de *L. amazonensis* expressando luciferase (Leish_Luc), gentilmente cedida pelo Dr. Rodrigo Soares (CpqRR-Fiocruz), foi testada. Para avaliar se seria possível utilizar esses parasitos expressando luciferase para desafiar os animais imunizados, inicialmente foi avaliada a atividade de luciferase nos parasitos *in vitro*. Para isso, diferentes quantidades de *L. amazonensis* expressando luciferase e de *L. amazonensis* WT (controle negativo) foram cultivadas, lisadas e o sobrenadante obtido foi utilizado em ensaio de luciferase. Por análise da bioluminescência no Luminômetro de Microplacas, observou-se que com o aumento no número de parasitos expressando luciferase, aumentava-se também a bioluminescência (Figura 14A).

Para avaliar a atividade de luciferase nos parasitos *in vivo*, camundongos BALB/c foram inoculados na pata e na orelha, por via subcutânea, com 2×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* expressando luciferase. Após 10 semanas de infecção, a carga parasitária dos animais foi avaliada por meio da emissão de bioluminescência. Observou-se que

os camundongos infectados com Leish_Luc apresentaram uma alta bioluminescência (**Figura 14B**).

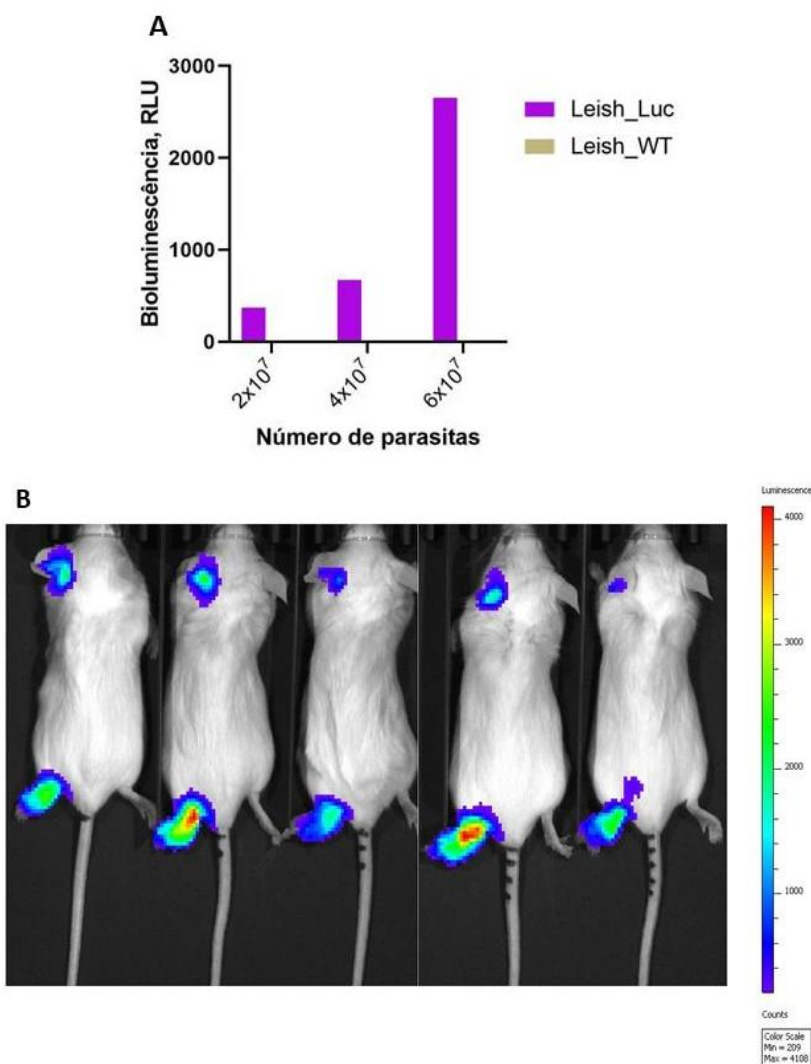


Figura 14 - Detecção de bioluminescência em *L. amazonensis* expressando luciferase *in vitro* e *in vivo*. Diferentes quantidades de *L. amazonensis* expressando luciferase e de *L. amazonensis* WT foram cultivadas e lisadas. O sobrenadante foi incubado com luciferina e analisado no Luminômetro de Microplacas (Luminoskan, Thermo Scientific). A bioluminescência foi determinada nos parasitos *in vitro* (**A**). Camundongos BALB/c (n=5) foram inoculados na pata e na orelha, por via subcutânea, com 2×10^5 *L. amazonensis* expressando luciferase promastigotas metacíclicas. Dez semanas após a infecção, os animais receberam intraperitonealmente (i.p.) 100 μ l de D-luciferina. Dez minutos após a administração, as imagens foram coletadas usando o sistema de imagem IVIS (sistema de imagem *in vivo*) Spectrum. A bioluminescência foi determinada nos parasitos *in vivo* (**B**).

3.3.7 Avaliação da resposta imune e da proteção conferida pela imunização com a LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante em C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* expressando luciferase

Já está bem descrito na literatura que camundongos C57BL/6 são suscetíveis a infecção por *L. amazonensis* (PINTO *et al.*, 2003; PRATTI *et al.*, 2016). Além disso, tendo em vista os resultados anteriores, que demonstraram que a imunização com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs induziu uma resposta humoral robusta em camundongos C57BL/6, decidiu-se utilizar essa linhagem de animais para avaliar se a proteção conferida com imunização com o mRNA DTL8 contra leishmaniose cutânea causada pela infecção com *L. amazonensis* expressando luciferase. Inicialmente, para verificar se a proteína DTL8 possuía uma alta identidade entre *L. infantum* e *L. amazonensis*, a sequência de aminoácidos da proteína em ambas as espécies foi alinhada utilizando o programa MultiAlin. Com isso, verificou-se um alinhamento com 86.56% de identidade (**Figura 15A**). Em seguida, camundongos C57BL/6 foram imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs desenvolvidas pelo CT Vacinas ou com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC). Como controle, os animais foram imunizados com mRNA DTL8 não encapsulado em LNPs (RNA Naked), ou com as LNPs vazias, ou apenas com PBS. Para seguir o esquema já estabelecido de imunização com a proteína DTL8 recombinante (Tese de doutorado Bianca Oliveira, dados não publicados), foi utilizado um protocolo de prime seguido de dois boosts. Para avaliar a resposta humoral induzida pela imunização com LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante, o sangue dos animais foi coletado 20 dias após o prime e após cada boost, conforme esquematizado na **Figura 15B**. O soro foi utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a produção de anticorpos IgG anti-DTL8. Observou-se que, após o prime, houve uma maior produção de anticorpos IgG total nos camundongos imunizados com o LNP_RNA DTL8 em comparação com aqueles imunizados com a proteína DTL8 recombinante + Poly ICLC (**Figura 15C**). No entanto, observou-se que após cada boost a produção de anticorpos IgG total foi semelhante nos camundongos imunizados com o LNP_RNA DTL8 ou com a proteína rDTL8 + Poly(ICLC) (**Figura 15C**). Após o segundo boost, observou-se uma quantidade alta de IgG1 (**Figura 15D**) e baixa de IgG2c (**Figura 15E**) em camundongos imunizados com o LNP_RNA DTL8 ou com a proteína rDTL8 + Poly(ICLC). Destacando que a produção de IgG2c foi maior para os animais que receberam o LNP_RNA DTL8 quando comparados com aqueles que receberam a proteína rDTL8 + Poly(ICLC) (**Figura 15E**). Conforme esperado, os animais imunizados com a LNP vazia ou com o mRNA

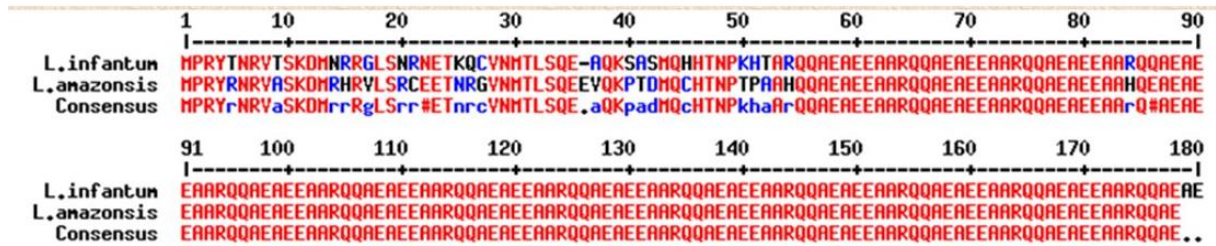
DTL8 Naked não produziram quantidades significativas de anticorpos em relação ao grupo que recebeu apenas PBS.

Para avaliar a resposta celular, o baço dos camundongos C57BL/6 foi coletado 30 dias após o segundo boost, conforme esquematizado na **Figura 15B**. Em seguida, os esplenócitos foram processados e estimulados com a proteína DTL8 recombinante. O sobrenadante da cultura de esplenócitos foi utilizado em um ensaio de ELISA para avaliar a produção de IFN- γ nos animais imunizados. As células incubadas apenas em meio RPMI foram utilizadas como controle negativo e as incubadas com Concanavalina A foram utilizadas como controle positivo. Os resultados mostraram que não houve uma produção significativa de IFN- γ em nenhum dos grupos imunizados quando comparado ao grupo PBS (**Figura 15F**).

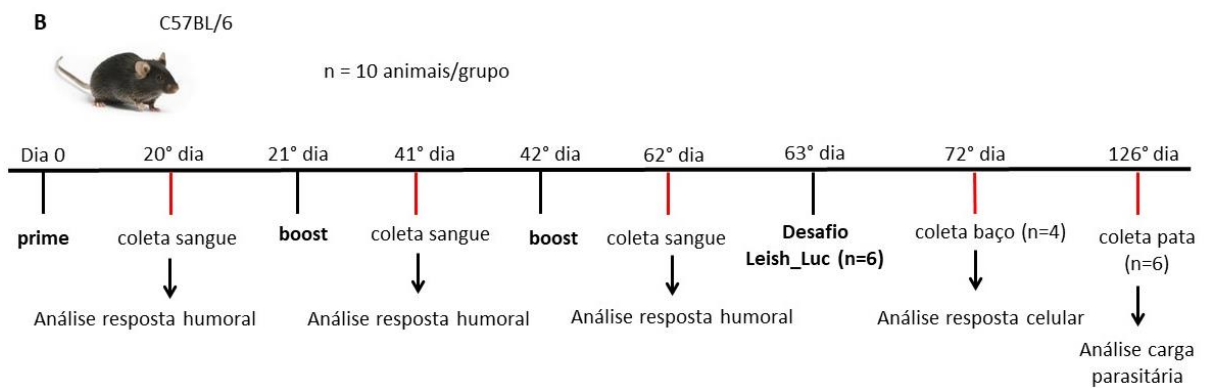
Para avaliar a proteção induzida pela imunização com o LNP_RNA DTL8 ou com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC), camundongos C57BL/6 foram infectados com 5×10^5 formas promastigotas de *L. amazonensis* expressando luciferase. Nove semanas após a infecção, a pata dos animais foi coletada para determinação da carga parasitária por três métodos diferentes: Análise de Diluição Limitante (LDA), qPCR e atividade de luciferase. Além disso, para avaliar o tamanho da lesão causada pela infecção, a pata dos animais foi medida semanalmente. Na Análise de Diluição Limitante, foi realizada a leitura das placas utilizando o microscópio e o título de parasitos foi determinado considerando o último poço positivo para a presença de *Leishmanias* viáveis. A leitura feita no sexto dia após o preparo das diluições, mostrou que houve uma diminuição significativa da carga parasitária na pata dos animais imunizados com o LNP_RNA DTL8 ou com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC) em comparação ao controle negativo (**Figura 15G**). Para a qPCR, primeiro foi feita a extração do DNA total da pata dos camundongos infectados. Na reação utilizou-se primers e sonda específicos para o gene *HSP70* de *L. amazonensis*. Como controle endógeno, utilizou-se primers específicos para o gene *GAPDH* de camundongo. Por meio da qPCR, observou-se que para todos os animais desafiados, foi possível detectar o DNA de *L. amazonensis*. No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo imunizado com o LNP_RNA DTL8 ou com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC) em relação ao grupo que recebeu apenas PBS (**Figura 15H**). O desenvolvimento da lesão foi monitorado pela medida da espessura da pata e foi expresso como a diferença média entre a pata infectada e não infectada para cada grupo. Observou-se que a partir da quarta semana de infecção houve um aumento contínuo no tamanho da lesão, porém não houve diferenças significativas entre o grupo imunizado com o LNP_RNA DTL8 ou com a proteína DTL8 recombinante + Poly(ICLC) em relação ao grupo que recebeu

apenas PBS (**Figura 15I**). O experimento para avaliar a carga parasitária por meio da atividade de luciferase ainda está em andamento.

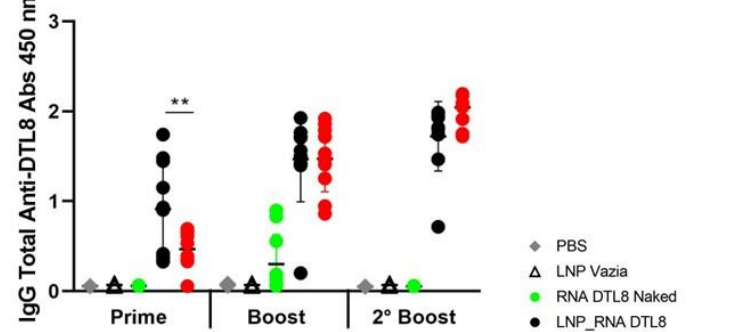
A



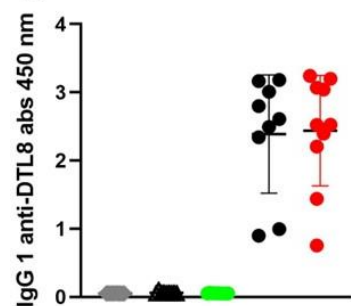
B



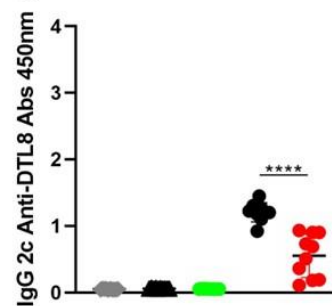
C



D



E



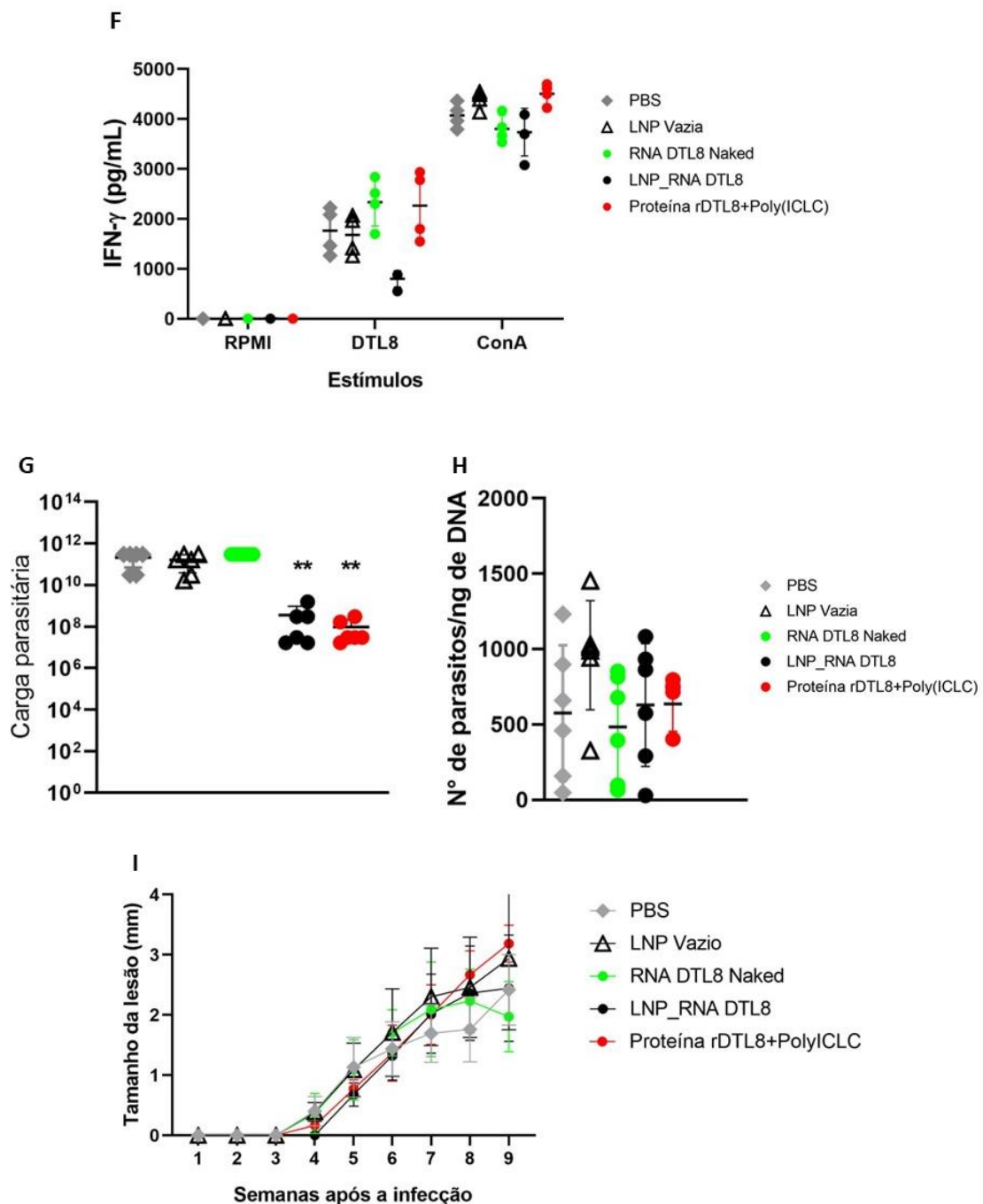


Figura 15 - Avaliação da resposta imune e da proteção contra *L.amazonensis* expressando luciferase em camundongos C57BL/6 imunizados com a LNP_RNA DTL8 e com a proteína DTL8 recombinante. A sequência de aminoácidos da proteína DTL8 das espécies de *L. infantum* e *L. amazonenses* foi alinhada utilizando o programa MultiAlin (A). Camundongos C57BL/6 (n=10) foram imunizados com o 10 ug do mRNA DTL8 encapsulado nas LNPs do CT vacinas, com 10 ug proteína DTL8 recombinante + 50 ug de Poly(ICLC), com a LNP vazia, com 10 ug do mRNA DTL8 Naked em solução PBS ou receberam apenas PBS (controle negativo). Foram administradas três doses em intervalos de 21 dias, seguindo o protocolo esquematizado (B). O sangue dos animais foi coletado 20 dias após cada imunização para avaliar a resposta humoral. O soro foi diluído 1:10 e utilizado no ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-DTL8. Avaliou-se a produção de IgG Total (C), IgG1 (D), IgG2c (E). Para determinar a resposta celular após a imunização, o baço dos camundongos C57BL/6 (n=4) foi coletado e processado 30 dias após o segundo boost. Os esplenócitos foram mantidos 72 horas em cultura sob o estímulo da proteína DTL8 recombinante. O sobrenadante da cultura de esplenócitos

foi utilizado em um ensaio de ELISA para detecção da citocina IFN- γ (**F**). Para avaliar se as imunizações eram capazes de induzir proteção contra um desafio com *L. amazonensis* expressando luciferase, camundongos C57BL/6 (n=6) desafiados com 5×10^5 Leishmanias, três semanas após a última imunização. Com 9 semanas após a infecção, a pata dos animais foi coletada, processada e utilizada em diferentes métodos para avaliar a carga parasitária, sendo eles: Análise de Diluição Limitante (LDA), qPCR e atividade de luciferase. Na LDA, a leitura das placas para determinar a carga parasitária (Número de parasitos/ pata) foi feita 6 dias após o preparo das diluições (**G**). O DNA total da pata foi extraído e 1 ng foi utilizado para quantificação do número de parasitos por qPCR (**H**). As patas dos animais foram mensuradas semanalmente e o tamanho da lesão foi obtido como a diferença média entre a pata infectada e não infectada para cada grupo (**I**). Cada círculo, triângulo ou losango representa um animal. ** = p valor <0,005 e **** = p valor <0,0001. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses ainda é um desafio, pois existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de provocar esta enfermidade (RODRIGUES *et al.*, 2016). Além disso, o parasita possui um ciclo de vida dimórfico e induz uma resposta imune bastante complexa no hospedeiro (DINC, 2022). Com isso, é necessário a busca por plataformas e antígenos vacinais que possam gerar imunidade protetora contra as diversas espécies de *Leishmania*.

Germano e colaboradores (2022) utilizaram a imunoproteômica para identificar novas proteínas antigênicas com potencial para se tornarem alvos vacinais na prevenção da leishmaniose. Nesta abordagem, foi identificado um antígeno de *L. infantum* anotado como uma proteína associada ao cinetoplasto (GERMANO *et al.*, 2022). Com o objetivo de testar esta proteína de *L. infantum* como candidato vacinal, em um trabalho anterior, nosso grupo utilizou parte desta proteína, que foi denominada DTL8, para imunização de camundongos (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado). Como resultado, foi observado produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2, além de produção de IFN- γ . Além disso, a imunização com a proteína DTL8 foi capaz de proteger parcialmente os animais do desafio com *L. infantum*. Ao avaliar a eficácia dessa vacina em outro modelo animal, ficou demonstrado que a imunização de hamsters com a proteína DTL8 recombinante também induziu produção de IgG total, IgG1 e Ig2/3, além de promover uma proteção parcial contra infecção com *L. infantum* (Bianca Oliveira, dados não publicados, Tese de doutorado).

Baseado nesses dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, o objetivo deste trabalho foi comparar a resposta imune e proteção conferida utilizando duas plataformas vacinais diferentes: imunização com proteína recombinante e imunização com RNA encapsulado em LNPs. Considerando que os dados anteriores mostraram que a imunização com a proteína DTL8 recombinante protegeu os camundongos de forma parcial, decidiu-se avaliar se a imunização de camundongos com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs seria capaz de induzir maior proteção. A imunidade mediada por células T secretoras de citocinas é muito importante para promover o controle da infecção por *Leishmania* (RODRIGUES *et al.*, 2021). Uma das vantagens da vacina de mRNA em comparação com a de proteína recombinante é a capacidade de induzir uma resposta celular robusta, uma vez que o antígeno produzido dentro das células pode tanto ativar os linfócitos T CD8⁺, por meio da apresentação via MHC I, como podem ser processados e ativar os linfócitos T CD4⁺ via MHC II (DUTHIE *et al.*, 2022). No presente

trabalho, observamos que apenas a imunização com a proteína recombinante foi capaz de gerar uma resposta com produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6. Importante salientar que, a via de administração para imunização com a proteína recombinante foi subcutânea, enquanto a via de administração utilizada para imunização com RNA foi intramuscular. Considerando que a via de administração do antígeno pode influenciar no tipo de resposta imune que é montada, como perspectivas futuras, pretendemos testar a imunização com mRNA DTL8 pela via subcutânea (FRIEDENSOHN *et al.*, 2021; YAVUZ *et al.*, 2023). Além disso, é importante destacar que a proteína recombinante DTL8 foi produzida em bactérias, já a proteína obtida a partir do mRNA foi produzida por células eucariotas. Isso pode ter levado a algumas diferenças na estrutura proteica devido as modificações pós-traducionais realizadas pelas células eucariotas. O resultado observado na Figura 7 também sugere essa hipótese, pois mostra uma diferença nos tamanhos dos pesos moleculares entre a proteína recombinante DTL8 e a proteína expressa pelas células HEK293T transfectadas com o mRNA DTL8. Essa diferença das proteínas pode ter influenciado no tipo de resposta celular induzida pela imunização com RNA ou com a proteína.

Em ensaio pré-clínico anterior, ficou demonstrado que a imunização de camundongos BALB/c com a proteína DTL8 recombinante foi capaz de induzir uma alta produção de IFN- γ (Tese de doutorado Bianca Oliveira, dados não publicados). No presente estudo, a avaliação da resposta celular por meio da produção de IFN- γ nos animais BALB/c imunizados com a proteína DTL8 ou com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs, foi realizada somente após um desafio com *L. infantum*. Diferente do esperado, não houve a produção significativa de IFN- γ em camundongos BALB/c imunizados com a proteína rDTL8 ou com o mRNA DTL8, após a infecção por *L. infantum*. Considerando o fato de que o IFN- γ desempenha um papel crucial no controle da infecção causada por espécies de *Leishmania* (CARVALHO *et al.*, 1985; COLMENARES *et al.*, 2003; IKEOGU *et al.*, 2021), uma menor produção desta citocina pode ter influenciado tanto na baixa redução da carga parasitária nos animais BALB/c imunizados com a proteína DTL8 recombinante, como na incapacidade em induzir uma resposta protetora após imunização com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs. Embora essa redução da carga parasitária induzida pela imunização com a proteína rDTL8 tenha sido baixa, é importante destacar que para haver alguma proteção contra *Leishmania* é essencial que haja a produção de IFN- γ , uma vez que Colmenares *et al.* (2003) relataram que animais deficientes de IFN- γ foram incapazes de adquirir proteção mesmo após imunizados. Comparando nossos dados com a literatura científica, pretendemos repetir esses experimentos para avaliar a produção de IFN- γ

nos animais BALB/c imunizados e desafiados com *L. infantum*, a fim de confirmar esses resultados.

A indução de altas quantidades da imunoglobulina IgG1 está relacionada com um perfil de resposta do tipo Th2, enquanto uma elevada produção de IgG2 é indicativo de uma resposta do tipo Th1 e as células T CD4⁺ diferenciadas em Th1 são responsáveis por produzirem a citocina IFN- γ (CAMPOS-NETO, 2005; ALEXANDER e BROMBACHER, 2012; IKEOGU *et al.*, 2021). Neste trabalho, analisando a resposta humoral nos camundongos BALB/c imunizados com a proteína rDTL8 ou com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs, foi observado uma maior produção de IgG1 em comparação com a produção de IgG2c (Figuras 10C e 10D, respectivamente). Além disso, no experimento no qual os camundongos C57BL/6 foram imunizados e desafiados também foi observado uma maior produção IgG1 comparada a produção de IgG2c (Figuras 13 D e E, respectivamente). Esses dados, podem indicar que a vacinação com o mRNA DTL8 pode ter induzido uma resposta do tipo Th2, o que explicaria a baixa produção de IFN- γ nos camundongos imunizados.

Apesar da resposta de células T ser fundamental na resolução da infecção por *Leishmania*, já ficou demonstrado que as células B e os anticorpos também desempenham um papel importante na resposta contra esse patógeno, uma vez que eles são requeridos para a ativação das células T (SACKS, 1988). Pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de vacinas para leishmaniose, investigam também a resposta humoral desencadeada pela imunização, principalmente a de anticorpos IgG e suas subclasses, como marcadores indiretos da indução de respostas de células T (FERNANDES *et al.*, 2008; AUNGULDEE *et al.*, 2021). A imunização com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs foi eficaz em induzir uma resposta humoral com alta produção de anticorpos ligantes da classe IgG. Em camundongos C57BL/6, foi observado em um dos experimentos um título de IgG total maior comparado a vacinação com a proteína (Figura 9C). Observamos também que em camundongos BALB/c a produção de anticorpos foi menor em comparação com camundongos C57BL/6 imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs. Uma das hipóteses para tal diferença seria a presença de RNA dupla fita no mRNA DTL8 que poderia estar ativando a produção de IFN do tipo 1 de forma diferenciada entre as duas linhagens de camundongos, por meio do reconhecimento do dsRNA por receptores Toll- Like, culminando na degradação do mRNA (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001; KARIKÓ *et al.*, 2011).

A síntese de mRNA *in vitro* sabidamente gera dsRNA devido a um erro na RNA polimerase (MU *et al.*, 2018). A purificação do RNA para retirada de dsRNA pode ser feita por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) ou por um método mais simples utilizando coluna

de celulose (KARIKÓ *et al.*, 2011; BAIERSDÖRFER *et al.*, 2019). A degradação do mRNA de forma diferenciada entre as linhagens de camundongo, citada acima, pode estar resultando em diferentes níveis de proteína no camundongo BALB/c comparado com C57BL/6. Para avaliar essa hipótese, utilizamos o protocolo de purificação de dsRNA no qual o mRNA sintetizado *in vitro* é passado em uma coluna de celulose. Como o dsRNA tem afinidade pela celulose, este fica retido na coluna enquanto o RNA fita simples passa pela coluna (BAIERSDÖRFER *et al.*, 2019). Surpreendentemente, observamos que a imunização de camundongos BALB/c com mRNA DTL8 purificado com celulose não induziu uma resposta de anticorpos em contraste com a imunização com mRNA DTL8 não purificado. Isso pode ter ocorrido devido a redução da imunogenicidade do RNA após purificação com celulose, uma vez que já foi demonstrado que os dsRNAs atuam como adjuvantes para as vacinas pela capacidade de serem detectados por receptores imunológicos (JIN *et al.*, 2010). Com base nesse resultado, nossa hipótese é a de que outros fatores possam estar influenciando na resposta humoral mais fraca observada no BALB/c, após a imunização com mRNA DTL8.

Um desses fatores são as sequências 5' e 3' UTRs utilizadas. Essas sequências são sabidamente importantes para estabilidade do mRNA e eficiência de tradução (GU *et al.*, 2014; MAYYA e DUCHAINE, 2019). Além disso, considerando que o Cap5' é essencial para tradução do mRNA pelo ribossomo de forma eficiente, outra possibilidade é que a metodologia utilizada para adição do Cap5' não seja a estratégia que resulte em uma porcentagem ideal de RNA capeado (JANI e FUCHS, 2012). Somados, os fatores que foram expostos, podem estar influenciando de forma diferente nas duas linhagens de camundongos na quantidade de proteína produzida a partir do mRNA e dessa forma modulando de forma diferenciada a resposta imune no camundongo BALB/c em comparação com C57BL/6.

É importante ressaltar que foram realizados dois experimentos independentes para avaliar a produção de IFN- γ em C57BL/6 após imunização com a proteína rDTL8+PolyICLC ou com o mRNA DTL8 encapsulado em LNPs. Em ambos os experimentos a imunização com o mRNA DTL8 não induziu produção de IFN- γ . No entanto, a imunização com a proteína rDTL8 induziu uma produção significativa de IFN- γ apenas em um dos experimentos (Figura 10F). Como a imunização de camundongos C57BL/6 com a proteína rDTL8 não foi avaliada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, supomos que essa diferença pode ter ocorrido devido a condições experimentais e precisará ser avaliada novamente em uma replicata experimental.

No experimento de imunização de camundongos C57BL/6 e desafio com *L. amazonensis*, foi observada uma proteção parcial nos animais imunizados com o mRNA DTL8

encapsulado em LNPs e nos animais imunizados com a proteína, em comparação com o grupo não vacinado. A carga parasitária foi medida por meio de diluição limitante e essa diferença foi observada quando a placa contendo os parasitos foi lida 6 dias após a diluição das *Leishmanias*. Os dados de PCR quantitativo indicam que não houve proteção nos animais imunizados com mRNA DTL8 encapsulado ou com proteína, no entanto, é importante ressaltar que é possível que o DNA genômico que está sendo amplificado na qPCR possa ser de parasitos mortos (FINAMORE-ARAUJO *et al.*, 2022). Embora os resultados de medida das patas durante as nove semanas de infecção também não indiquem uma diferença entre os grupos vacinados com proteína ou mRNA DTL8 em comparação com os grupos controle (grupo PBS, RNA Naked e LNP vazio), ressaltamos que algum tipo de proteção está ocorrendo, devido a diferença observada na leitura da placa com 6 dias após a diluição limitante com macerado das patas. Apesar da imunização de C57BL/6 com o mRNA DTL8 encapsulado ou com proteína recombinante não induzir a produção significativa de IFN- γ , foi observado uma proteção parcial contra o desafio com *L. amazonensis*. Considerando a importância dessa citocina na resposta protetora contra *Leishmania*, pretendemos repetir esses experimentos para avaliar a produção de IFN- γ nos animais C57BL/6 imunizados com o mRNA DTL8 encapsulado ou com proteína recombinante. Além disso, é preciso considerar também que a imunização e o estímulo dos esplenócitos dos camundongos imunizados foram feitos com a proteína contendo LPS (Lipopolissacarídeo), que é um padrão molecular associado ao patógeno e ativa a resposta imune (MORIYAMA e NISHIDA, 2021). Isso pode ter influenciado nos resultados obtidos neste estudo e para os próximos experimentos será necessário remover o LPS.

Como perspectivas deste trabalho, pretendemos fazer algumas modificações na sequência do DNA utilizado como molde para síntese de mRNA. Essas mudanças incluem troca das sequências 5' e 3' UTR, além de códon otimização da sequência da DTL8. Importante ressaltar que neste trabalho, a sequência de DTL8 utilizada para síntese de RNA está códon otimizada para expressão em bactéria e este pode ser mais um fator que está influenciando em uma menor quantidade de proteína sendo traduzida *in vivo* (TOKUOKA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2023). Experimentos recentes feitos pelo nosso grupo de pesquisa no qual células HEK293T foram transfectadas com mRNA de luciferase, após modificações nas sequências 5' e 3' UTR, na sequência kozak e na otimização de códons, mostraram maiores níveis de proteína em comparação com a construção antiga sem essas modificações (dados não mostrados).

Em outros testes recentes do nosso grupo de pesquisa utilizando mRNA de luciferase, foram comparadas duas estratégias diferentes de adição do Cap 5': uma em que um análogo de Cap5' foi adicionado durante a transcrição (co-transcricional) e uma em que a adição do Cap5'

pode ser feita após a transcrição *in vitro* por meio da atividade de enzimas específicas para a edição do Cap5' (pós-transcricional) (JANI e FUCHS, 2012; HENDERSON *et al.*, 2021). Os resultados desse experimento mostraram que houve uma maior bioluminescência nos camundongos injetados com mRNA de luciferase no qual a adição do Cap5' foi feita de forma pós-transcricional (dados não mostrados). Por isso, outra perspectiva para este trabalho, é avaliar a imunização a partir de um RNA que foi sintetizado utilizando o protocolo para a adição de Cap5' de forma pós-transcricional.

Além de modificações na sequência do mRNA e em sua síntese *in vitro*, outro aspecto que deve ser considerado para aumentar a eficácia desta vacina, é a nanopartícula lipídica (SWETHA *et al.*, 2023). Importante ressaltar que a formulação de LNPs desenvolvida por nosso grupo de pesquisa exibiu características semelhantes aos das formulações de LNPs publicadas em artigos de vacina de RNA como uma porcentagem de encapsulamento do RNA maior que 80% e diâmetro médio de até 130 nm (BEVERS *et al.*, 2022). Além disso, testes utilizando mRNA de luciferase encapsulado na formulação de LNP do CTVacinas mostrou o mesmo padrão de distribuição em camundongos BALB/c comparada com uma formulação de LNP similar à da vacina de Covid-19 da Moderna (dados não mostrados). Uma perspectiva futura para testar se modificações na formulação poderiam influenciar na resposta humoral e celular é realizar testes utilizando diferentes lipídeos catiônicos. Hassett e colaboradores (2019), avaliaram várias formulações de LNP, variando apenas o lipídeo ionizável e dessa forma identificaram qual formulação era capaz de induzir uma resposta imunológica mais robusta. Além disso, como perspectivas, planejamos avaliar se a junção de vacinas de RNA codificando diferentes antígenos de *Leishmania*, poderia contribuir para a indução de um aumento na resposta imunológica e, conseqüentemente, conferir uma capacidade protetora contra as leishmanioses. Anteriormente, Hajnik *et al.* (2022) demonstraram que a imunização de camundongos e hamsters com dois mRNAs diferentes codificando, cada um, a proteína Spike (S) e a nucleocapsídeo (N), contribuiu para uma maior redução da carga viral durante a infecção causada pelo SARS-CoV-2 em comparação a imunização com o mRNA codificando apenas o antígeno S.

Está em andamento um experimento de imunização com a vacina de LNP_RNA DTL8 administrada por via subcutânea, buscando aumentar a produção de IFN- γ . Além disso, está sendo sintetizado um RNA contendo um outro antígeno de *Leishmania*, a amastina. Como perspectivas, pretendemos testar um protocolo de imunização heterólogo com o RNA expressando a DTL8 e com a proteína recombinante DTL8. Em um trabalho recente, Poveda *et al.* (2023) desenvolveram uma vacina utilizando o antígeno Tc24 de *Trypanosoma cruzi* e

demonstraram que a imunização heteróloga com mRNA e proteína induziu uma maior resposta celular e humoral comparada a imunização apenas com proteína (prime e boost) ou apenas com mRNA (prime e boost).

Avaliaremos também um protocolo de imunização com RNA/RNA, porém utilizando antígenos diferentes no prime e no boost. Além disso, pretendemos avaliar se a imunização com diferentes quantidades de RNA pode influenciar na resposta imune. Outra perspectiva do nosso grupo de pesquisa, é produzir uma cepa de *L. infantum* expressando luciferase para ser utilizada nos experimentos de desafio e avaliação da proteção em animais imunizados com as vacinas que estamos desenvolvendo para leishmaniose visceral. Sabendo que uma vacina ideal para leishmaniose deve favorecer um balanço entre as respostas Th1 e Th2, nossos próximos experimentos de imunização de animais e desafio com *Leishmania* terão como objetivo dosar citocinas que indicam a ativação de ambas essas respostas, por exemplo a dosagem de IFN- γ , IL-2 e TNF- α como indicativos de uma resposta do tipo Th1 e a dosagem de IL-10 e IL-4 como indicativo de uma resposta Th2.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nestes estudos demonstram um potencial promissor de vacinas de RNA para indução de proteção contra a leishmaniose face a indução de resposta imune humoral e redução de carga parasitária na infecção contra a infecção por *L. amazonensis*. A otimização de parâmetros relacionados ao RNA e LNPs podem resultar em níveis mais expressivos de resposta imune protetora.

REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. *et al.* Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **ACTAS Dermo-Sifiliogr**, v. p. 601-618, 2021.
- ABBAS, Y. M. *et al.* Structure of human IFIT1 with capped RNA reveals adaptable mRNA binding and mechanisms for sensing N1 and N2 ribose 2'-O methylations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 11, p. E2106–E2115, 2017.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to Leishmania infection: Is this paradigm still relevant?. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.
- ALEXOPOULOU, L. *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, p. 732–738, 2001.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. *et al.* A new approach for development of vaccine against visceral leishmaniasis: Lipophosphoglycan and polyacrylic acid conjugates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 9, p. 877–886, 2017.
- AMOS, B. *et al.* VEuPathDB: The eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D898–D911, 2022.
- ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. *et al.* Clinical Picture of Cutaneous Leishmaniasis Due to Leishmania (Leishmania) Mexicana in the Yucatan Peninsula, Mexico. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 163–167, 2001.
- AUNGULDEE, T. *et al.* Immunogenicity and potential protection of DNA vaccine of Leishmania martiniquensis against Leishmania infection in mice. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 15, n. 9, p. 328–338, 2021.
- BADEN, L. R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 403–416, 2021.
- BAIERSDÖRFER, M. *et al.* A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 15, p. 26–35, 2019.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. **Vet Clin Small Anim**, v. 52, n. 6, p. 1359-1375, 2022.
- BAO, Y. *et al.* Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of siRNA/lipid nanoparticle complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 2, p. 342–351, 2013.
- BATES, P. A. Complete developmental cycle of Leishmania mexicana in axenic culture. **Parasitology**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 1994.

BELKAID, Y. *et al.* CD8⁺ T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 8, p. 3992–4000, 2002.

BERNARD, M. C. *et al.* The impact of nucleoside base modification in mRNA vaccine is influenced by the chemistry of its lipid nanoparticle delivery system. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**. v. 32, p. 794–806, 2023.

BEVERS, S. *et al.* mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells. **Molecular Therapy**, v. 30, n. 9, p. 3078–3094, 2022.

BEZERRA, I. P. S. *et al.* Nanoencapsulated retinoic acid as a safe tolerogenic adjuvant for intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 37, n. 28, p. 3660–3667, 2019.

BRASIL. **Doenças tropicais negligenciadas**. Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde e do Ministério da Saúde. Número Especial, 2021. ISSN 9352-7864.

BRITO, L. A. *et al.* A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. **Molecular Therapy**, v. 22, n. 12, p. 2118–2129, 2014.

BROUDIC, K. *et al.* Nonclinical safety evaluation of a novel ionizable lipid for mRNA delivery. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 451, 2022.

BRUSTOLIN, A. Á. *et al.* A standardized intraperitoneal Glucantime™ for experimental treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 236–237, 2022.

BURCHMORE, R. J.S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles - Nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1311-1320, 2001.

CAGIGI, A.; LORÉ, K. Immune responses induced by mRNA vaccination in mice, monkeys and humans. **Vaccines**, v. 9, n. 1, p. 61, 2021.

CAMPBELL, K. *et al.* DNA Immunization with the Gene Encoding P4 Nuclease of *Leishmania amazonensis* Protects Mice against Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6270–6278, 2003.

CAMPOS-NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery?. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 7, p. 979-984, 2005.

CARGNELUTTI, D. E. *et al.* Immunization with antigenic extracts of *Leishmania* associated with Montanide ISA 763 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 2016.

- CARVALHO, E. M. *et al.* Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 6, p. 2066–2069, 1985.
- CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.
- CHAUDHARY, N. *et al.* mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 817–838, 2021.
- CHENG, X.; LEE, R.J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 129–137, 2016.
- CI, L. *et al.* Biodistribution of Lipid 5, mRNA, and Its Translated Protein Following Intravenous Administration of mRNA-Encapsulated Lipid Nanoparticles in Rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 51, n. 7, p. 813–823, 2023.
- CLABORN, D. M. The biology and control of leishmaniasis vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 127, 2010.
- COLMENARES, M. *et al.* Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3172–3182, 2003.
- COSTA, C. H. N. *et al.* From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 7, 2023.
- CUI, S. *et al.* Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. **Toxicology Research**, v. 7, n. 3, p. 473–479, 2018.
- DAFFIS, S. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 452–456, 2010.
- DARRAH, P. A. *et al.* Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, p. 843–850, 2007.
- DAS, S. *et al.* Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 234, 2014.
- DE FREITAS E SILVA, Rafael; VON STEBUT, Esther. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 12, 2021.
- DE VRIES, H. J.C.; SCHALLIG, H.D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. **Am J Clin Dermatol**, v. 23, n. 6, p. 823–840, 2022.
- DECROLY, E. *et al.* Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, p. 51–65, 2012.

- DENNEHY, R.; MCCLEAN, S. Immunoproteomics: The Key to Discovery of New Vaccine Antigens Against Bacterial Respiratory Infections. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 807–815, 2013.
- DEVARKAR, S. C. *et al.* Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 3, p. 596–601, 2016.
- DIAS, D. S. *et al.* Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 323, p. 59–69, 2018.
- DINC, R. *Leishmania* Vaccines: the Current Situation with Its Promising Aspect for the Future. **Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine**, v.60, n. 6, p. 379-391, 2022.
- DOLGIN, E. The tangled history of mRNA vaccines. **Nature**, v. 597, n. 7876, p. 318–324, 2021.
- DOUSIS, A. *et al.* An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts. **Nature Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 560–568, 2023.
- DOWDY, S. F. *et al.* Delivery of RNA Therapeutics: The Great Endosomal Escape!. **Nucleic Acid Ther**, v. 32, n. 5, p. 361-368, 2022.
- DUTHIE, M. 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, 2018.
- DUTHIE, M. S. *et al.* Leishmaniasis Vaccines: Applications of RNA Technology and Targeted Clinical Trial Designs. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1259, 2022.
- ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.
- FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.
- FERREIRA, C. *et al.* Immune-metabolic interactions between *Leishmania* and macrophage host. **Current Opinion in Microbiology**, v. 63, p. 231-237, 2021.
- FINAMORE-ARAUJO, P. *et al.* RNA as a feasible marker of *Trypanosoma cruzi* viability during the parasite interaction with the triatomine vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 7, 2022.

FORRESTER, S. *et al.* Tissue Specific Dual RNA-Seq Defines Host–Parasite Interplay in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 2022.

FOSTER, J. B. *et al.* Purification of mRNA Encoding Chimeric Antigen Receptor Is Critical for Generation of a Robust T-Cell Response. **Human Gene Therapy**, v. 30, n. 2, p. 168–178, 2019.

FRIEDENSOHN, L. *et al.* Sub-cutaneous Pfizer/BioNTech COVID-19 vaccine administration results in seroconversion among young adults. **Vaccine**, v. 39, n. 42, p. 6210–6212, 2021.

GALASSIE, A. C.; LINK, A. J. Proteomic contributions to our understanding of vaccine and immune responses. **Proteomics Clin Appl**, v. 9, n. 11-12, p. 972-989, 2015.

GASPARI V. *et al.* Tegumentary Leishmaniasis in Northeastern Italy from 2017 to 2020: A Neglected Public Health Issue. **Int J Environ Res Public Health**, v. 19, n. 23, 2022.

GERMANO, M. J. *et al.* Identification of Immunodominant Antigens From a First-Generation Vaccine Against Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

GOMES, C. B. *et al.* Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition. **Biochimie**, v. 133, p. 28–36, 2017.

GONÇALVES, G. *et al.* Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, 2021.

GU, W. *et al.* The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. **RNA**, v. 20, n. 9, p. 1369–1375, 2014.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cell Microbiol**, v. 17, n. 9, p. 1286-94, 2015.

HAJNIK, R. L. *et al.* Dual spike and nucleocapsid mRNA vaccination confer protection against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in preclinical models. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 662, 2022.

HALD ALBERTSEN, C. *et al.* The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 188, 2022.

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

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

HAYASHI, C. T. H. *et al.* mRNA-LNP expressing PfCSP and Pfs25 vaccine candidates targeting infection and transmission of Plasmodium falciparum. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, 2022.

HELOU, D. G. *et al.* Intranasal vaccine from whole leishmania donovani antigens provides protection and induces specific immune response against visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, 2021.

HENDERSON, J. M. *et al.* Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap® Analog by In Vitro Transcription. **Current Protocols**, v. 1, n. 2, 2021.

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

HUANG, P. *et al.* The roles of polymers in mRNA delivery. **Cell Press**, v. 5, n. 6, p. 1670–1699, 2022.

IKEOGU, N. M. *et al.* Semaphorin 3E Promotes Susceptibility to Leishmania major Infection in Mice by Suppressing CD4+ Th1 Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 3, p. 588–598, 2021.

JACKSON, N. A. C. *et al.* The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. **npj Vaccines**, v. 5, n. 11, 2020.

JANI, B.; FUCHS, R. In vitro transcription and capping of Gaussia luciferase mRNA followed by HeLa cell transfection. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 61, 2012.

JIN B. *et al.* Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. **J Biomed Biotechnol**, 2010.

JOSHI, J.; KAUR, S. Studies on the protective efficacy of second-generation vaccine along with standard antileishmanial drug in Leishmania donovani infected BALB/c mice. **Parasitology**, v. 141, p. 554-562, 2014.

KALNIN, K. V. *et al.* Immunogenicity and efficacy of mRNA COVID-19 vaccine MRT5500 in preclinical animal models. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, 2021.

KARIKÓ, K. *et al.* Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 21, 2011.

KARIKÓ, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 11, p. 1833–1840, 2008.

KARIKÓ, K. *et al.* Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. **Immunity**, v. 23, n. 2, p. 165–175, 2005.

- KAUR, J. *et al.* Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 50–56, 2011.
- KAUSHAL, H. *et al.* Role of CD8⁺ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014.
- KIS, Z. *et al.* Rapid development and deployment of high-volume vaccines for pandemic response. **Journal of Advanced Manufacturing and Processing**, v. 2, n. 3, 2020.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 3, 2012.
- LACZKO, D. *et al.* A Single Immunization with Nucleoside-Modified mRNA Vaccines Elicits Strong Cellular and Humoral Immune Responses against SARS-CoV-2 in Mice. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 724-732.e7, 2020.
- LAGE, D. P. *et al.* A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against *Leishmania infantum* infection. **npj Vaccines**, v. 5, n. 1, 2020.
- LEE, J. *et al.* Engineering DNA vaccines against infectious diseases. **Acta Biomaterialia**, v. 80, p. 31-47, 2018.
- LI, M. *et al.* Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- A nd paracellular pathways. **Journal of Controlled Release**, v. 228, p. 9–19, 2016.
- LIANG, F. *et al.* Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells *In Vivo* after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 12, p. 2635–2647, 2017.
- LIMA, H. C. *et al.* A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitol Today**. 1997.
- LÓPEZ-FUERTES, L. *et al.* DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against *Leishmania major* infection in mice. **Vaccine**, v. 21, n. 3–4, p. 247–257, 2002.
- MALLORY, K. L. *et al.* Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, 2021.
- MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 441–445, 2009.
- MAYYA, V. K.; DUCHAINE, T. F. Ciphers and executioners: How 3'-untranslated regions determine the fate of messenger RNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.

- MAZUMDER, S. *et al.* Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/ protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.
- MILIOTOU, A. N. *et al.* Development of a novel PTD-mediated IVT-mRNA delivery platform for potential protein replacement therapy of metabolic/genetic disorders. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 26, p. 694–710, 2021.
- MORIYAMA K.; NISHIDA O. Targeting Cytokines, Pathogen-Associated Molecular Patterns, and Damage-Associated Molecular Patterns in Sepsis via Blood Purification. **Int J Mol Sci.**, v.22, n. 16, 2021.
- MU, X. *et al.* An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 10, p. 5239–5249, 2018.
- MURPHY, M. L. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2848–2856, 2001.
- NASCIMENTO, F. C. **Análise metabolômica aplicada ao processo de atenuação de virulência de uma cepa de *Leishmania amazonensis* por sucessivas passagens *in vitro*.** 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2016
- NOAZIN, S. *et al.* First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6759-6767, 2008.
- OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A. *et al.* A *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 356, 2020.
- OLIVIER, M. *et al.* Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.
- PARDI, N. *et al.* Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. **Journal of Controlled Release**, v. 217, p. 345–351, 2015.
- PARDI, N. *et al.* mRNA vaccines-a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.17, p. 261–279, 2018a.
- PARDI, N. *et al.* Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 6, p. 1571–1588, 2018b.
- PATTIPEILUHU, R. *et al.* Anionic Lipid Nanoparticles Preferentially Deliver mRNA to the Hepatic Reticuloendothelial System. **Advanced Materials**, v. 34, n. 16, 2022.

- PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* Understanding resistance vs. susceptibility in visceral leishmaniasis using mouse models of *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.
- PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.
- PETSCH, B. *et al.* Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 1210–1216, 2012.
- PINTO, E. F. *et al.* Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, n. 25–26, p. 3534–3541, 2003.
- POLACK, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 2020.
- POVEDA, C. *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, 2023.
- PRATTI, J. E. S. *et al.* Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania amazonensis* infection in partially resistant C57Bl/6 mice. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.
- QIU, Y. *et al.* Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide. **Journal of Controlled Release**, v. 314, p. 102–115, 2019.
- QUEIROZ, M. J. A. *et al.* Visceral leishmaniasis: Clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141–146, 2004.
- RAWAT, K. *et al.* Management of visceral leishmaniasis with therapeutic vaccines. **Vaccine: Development and Therapy**, v. 6, p. 33-45, 2016.
- REICHMUTH, A. M. *et al.* mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. **Therapeutic Delivery**, v. 7, n. 5, p. 319–334, 2016.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- RIBEIRO, P. A. F. *et al.* *Leishmania infantum* amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 129, 2020.
- RIEDE, O. *et al.* Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine. **Gene Therapy**, v. 22, n. 8, p. 628–635, 2015.
- ROBLEDO, S. M. *et al.* Therapeutic Efficacy of Arnica in Hamsters with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* and *L. tropica*. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 7, 2022.

- ROCHA, M.N. *et al.* An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 75, n. 3, p. 282-291, 2013.
- RODRIGUES, L. S. *et al.* Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8^{High} T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasit Vectors**, v. 9, 2016.
- RYALS, R. C. *et al.* The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, 2020.
- SACKS, D. L. B cell dependent T lymphocyte responses in leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 506–513, 1988.
- SAHIN, U. *et al.* mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 759–780, 2014.
- SALJOUGHIAN, N. *et al.* Cationic solid-lipid nanoparticles are as efficient as electroporation in DNA vaccination against visceral leishmaniasis in mice. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 12, p. 397–408, 2013.
- SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: A Laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SCHOENMAKER, L. *et al.* mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, 2021.
- SCHUBERTH-WAGNER, C. *et al.* A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'-O-Methylated Self RNA. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 41–51, 2015.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v.16, p. 581–592, 2016.
- SHERIDAN, C. First COVID-19 DNA vaccine approved, others in hot pursuit. **Nature Biotechnology**, v. 39, p. 1479–1485, 2021.
- SILVA, S. R. **Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae).** 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. 2015.
- SILVEIRA, L. J. D. *et al.* Historical series of patients with visceral leishmaniasis treated with meglumine antimoniate in a hospital for tropical diseases, Maceió-al, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 1, p. 33–38, 2015.

SWETHA, K. *et al.* Recent Advances in the Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of mRNA Vaccines. **Vaccines**, v. 11, n. 3, 2023.

SWAMINATHAN, G. *et al.* A novel lipid nanoparticle adjuvant significantly enhances B cell and T cell responses to sub-unit vaccine antigens. **Vaccine**, v 34, n. 1, p. 110-119, 2016.

TABOR, S. Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. **Current Protocols in Molecular Biology**, Unidade 16.2.1-16.2.11, 1990.

TAWFEEQ, H. M.; ALI, S. A. K. Molecular-based assay for genotyping *Leishmania* spp. from clinically suspected cutaneous leishmaniasis lesions in the Garmian area, Kurdistan Region of Iraq. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 17, 2022.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* **Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania***. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013

TOKUOKA, M. *et al.* Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6538–6546, 2008.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, 2017.

ULIANA, S. R. B. *et al.* Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VERBEKE, R. *et al.* Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. **Immunity**, v. 55, n. 11, p. 1993-2005, 2022.

VOLPEDO, G. *et al.* Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, 2022.

VON STEBUT, E. *et al.* *Leishmania* major-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 12, p. 3498–3506, 2000.

WILGENHOF, S. *et al.* A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 10, p. 2686–2693, 2013.

WHO. Leishmaniasis. **World Health Organization**. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 15 set. 2023.

YANG, W. *et al.* Polymer-Based mRNA Delivery Strategies for Advanced Therapies. **Adv Healthc Mater**, v. 12, n. 15, 2023.

YANG, S. T. *et al.* The role of cholesterol in membrane fusion. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 199, p. 136–143, 2016.

YAVUZ, A. *et al.* DLin-MC3-Containing mRNA Lipid Nanoparticles Induce an Antibody Th2-Biased Immune Response Polarization in a Delivery Route-Dependent Manner in Mice. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, 2023.

ZHANG, C. *et al.* Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. **Front Immunol**, v. 10, 2019.

ZHANG, H. *et al.* Algorithm for Optimized mRNA Design Improves Stability and Immunogenicity. **Nature**, v. 621, p. 396–403, 2023.