



UnB

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

**Protótipos de vacinas de DNA para doença de Chagas: prova de conceito e
imunogenicidade de proteases do *Trypanosoma cruzi***

Karen Stephanie de Souza Mangabeira

Brasília

2021

Karen Stephanie de Souza Mangabeira

Protótipos de vacinas de DNA para doença de Chagas: prova de conceito e imunogenicidade de proteases do *Trypanosoma cruzi*

Orientadora: **Prof^a. Dra. Izabela Marques
Dourado Bastos**

Co-orientadora: **Prof^a. Carla Nunes de
Araújo**

Brasília

2023

Karen Stephanie de Souza Mangabeira

BANCA EXAMINADORA

Vicente de Paulo Martins, Doutor (UNB) – Membro 1

Lívia Pimentel de Sant’Ana Dourado, Doutora – Membro 2

Andréa Queiroz Maranhão, Doutora (UNB) – Suplente

"In nature, nothing exists alone".

- Rachel Carson (1962).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas e instituições que estiveram ao meu lado e me apoiaram ao longo desta jornada desafiadora.

Agradeço imensamente às minhas orientadoras, Dra. Izabela e Dra. Carla, meu agradecimento por todo o ensino, compreensão e pelas oportunidades que me proporcionaram, desde a Iniciação Científica até o Mestrado.

Agradeço à minha mãe e amiga, Lucivânia, por ser a minha pessoa. E ao meu protetor e pai, Wesley, por seu apoio incondicional, carinho e compreensão. Vocês abriram mão de momentos preciosos para que eu pudesse perseguir meus objetivos, e por isso serei eternamente grata.

À toda minha família, meu irmão Eric, minha irmãzinha Sophi, meus avós, Terezinha, Alaor, Antônio e Orlanda, todos os tios e primos, meu sincero agradecimento por todo o apoio e amor que me ofereceram. Amo todos vocês.

Ao meu namorado, Gabriel, expresso minha profunda gratidão por sua paciência, amor, carinho e cumplicidade. Por me apoiar nos momentos mais difíceis e ser um companheiro de vida, e por isso sou imensamente grata. Te amo.

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde o ensino fundamental e médio, Patrícia, Caroline, Rafaela, Giulia, Anderson, Lucas Mata e Jennifer, que me trazem muitas alegrias e estão sempre dispostos a apoiar todas as minhas versões ao longo de nossas vidas. Um agradecimento especial ao meu amigo parceiro Haguihara, o qual esteve ao meu lado em nosso primeiro passo em direção à Iniciação Científica, e aos tantos outros passos que demos em nossa jornada.

Também aos amigos "Rolezeiros" que a vida me presenteou, Julliana, Gabi, Lara, Suzane, Roberta, Matheus, Bruno, Adriel, Gustavo, Pirex, Chris, Miguel. Vocês são uma segunda grande família, que estão sempre me ajudando a lembrar que a vida é para ser vivida. Amo vocês, e já estou morrendo de saudades.

Aos meus amigos do laboratório, que tornaram o dia a dia de trabalho não apenas produtivo, mas também muito mais leve. Renan, Nath, Gilberto, Tatiana, Andrey, Beatriz, Kaio, Verônica, Juliana, Guilherme, Paula, Tarcila e Giulia. Em especial, às minhas amigas e parceiras de projeto, Alexandra e Dani, que estiveram ao meu lado diariamente nos experimentos, compartilhando tanto as tristezas dos contratemplos diários quanto as alegrias dos experimentos bem-sucedidos. Vocês são incríveis!

Agradeço aos egressos do Laboratório de Interação Patógeno Hospedeiro, dos quais sou muito grata por ter conhecido e aprendido com vocês: Natalia Gil, Alan, Alessandro, Yanna, Carol, Arthur, Isabela, Amanda, Camila e Clênia. Assim como aos professores Jaime, Flávia e Gabriel, todos vocês tiveram algo importante a me ensinar.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Morfologia, Luana e o Professor João Paulo, meu agradecimento pelo apoio técnico e disponibilidade dos equipamentos. Também agradeço ao pessoal dos Biotérios, o Prof. Jivago, Jheimes, Juliana, Fernanda e Mariana.

Agradeço à Universidade de Brasília e a tudo que ela me proporcionou. Durante tantos anos, foi praticamente a minha segunda casa.

Por fim, aos órgãos financiadores, CAPES, CNPq e FAPDF, agradeço pelo investimento no projeto que tornou possível a realização deste projeto.

Sei que esta conquista não seria possível sem o apoio e suporte de cada um de vocês, e estou verdadeiramente grata por ter compartilhado este caminho com pessoas tão especiais.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) representa um grave desafio de saúde pública, principalmente em regiões endêmicas da América Latina e outras áreas afetadas. Esta doença, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, é transmitida principalmente por insetos vetores popularmente conhecidos como barbeiros, mas também pode ocorrer por via oral, transfusões sanguíneas, transplante de órgão e transmissão congênita. A DC é caracterizada por uma fase aguda, que pode ser assintomática ou apresentar sintomas leves e inespecíficos, seguida de uma fase crônica, que afeta principalmente o coração e o sistema digestivo. O tratamento eficaz para a doença de Chagas é um desafio, já que as opções disponíveis são limitadas e frequentemente associadas a efeitos colaterais. Além disso, o diagnóstico precoce é fundamental, pois muitos pacientes não apresentam sintomas na fase inicial. A falta de tratamentos eficazes e a necessidade de prevenção têm estimulado esforços para o desenvolvimento de vacinas capazes de proteger contra o parasito. Neste estudo, concentramos nossos esforços na investigação de duas proteases do *T. cruzi*, Prolyl Oligopeptidase (POPTc80) e Thimet Oligopeptidase (TOP), que desempenham um papel no ciclo de vida do parasito e representam alvos potenciais para vacinas. Exploramos três abordagens distintas para o desenvolvimento dos protótipos vacinais: proteínas recombinantes, vacinas de DNA e vacinas de mRNA. As proteínas recombinantes foram produzidas em *Escherichia coli*, e desenvolvemos um vetor otimizado para a produção de mRNA, que se mostrou eficaz na expressão de antígenos em camundongos. Além disso, avaliamos diferentes vias de inoculação, destacando a via intramuscular como a mais adequada devido à sua capacidade de manter a expressão do antígeno por um período prolongado. No entanto, nossos esforços para desenvolver formulações de imunização oral com alginato de sódio não obtiveram sucesso, destacando os desafios específicos associados a essa via de administração. Em resumo, a DC é uma enfermidade desafiadora que carece de tratamentos eficazes e diagnóstico precoce. Nossos esforços de pesquisa buscam abordagens inovadoras para o desenvolvimento de vacinas visando prevenir a infecção por *Trypanosoma cruzi*. A compreensão dos mecanismos de resposta imune desencadeados pelas proteases estudadas é essencial para avançar em direção a vacinas mais eficazes contra essa doença negligenciada.

Palavras – chave: Doença de Chagas; Vacinas; mRNA; DNA; Proteases; Thimet Oligopeptidase; Prolyl Oligopeptidase.

ABSTRACT

Chagas Disease (CD) poses a significant public health challenge, primarily in endemic regions of Latin America and other affected areas. This disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is primarily transmitted by vector insects commonly known as "kissing bugs." However, transmission can also occur through oral ingestion, blood transfusions, organ transplantation, and congenital transmission. CD is characterized by an acute phase, which can be asymptomatic or present mild and nonspecific symptoms, followed by a chronic phase that primarily affects the heart and digestive system. Effective treatment for Chagas Disease is a challenge because available options are limited and often associated with side effects. Moreover, early diagnosis is crucial, as many patients do not exhibit symptoms in the initial phase. The lack of effective treatments and the need for prevention have spurred efforts to develop vaccines capable of protecting against the parasite. In this study, we focused our efforts on investigating two *T. cruzi* proteases, Prolyl Oligopeptidase (POPTc80) and Thimet Oligopeptidase (TOP), which play a role in the parasite's life cycle and represent potential vaccine targets. We explored three distinct approaches for developing vaccine prototypes: recombinant proteins, DNA vaccines, and mRNA vaccines. Recombinant proteins were produced in *Escherichia coli*, and we developed an optimized vector for mRNA production, which proved effective in expressing antigens in mice. Furthermore, we evaluated different routes of administration, with the intramuscular route being the most suitable due to its ability to maintain antigen expression over an extended period. However, our efforts to develop oral immunization formulations using sodium alginate were unsuccessful, highlighting the specific challenges associated with this administration route. In summary, CD is a challenging illness that lacks effective treatments and early diagnosis. Our research efforts seek innovative approaches to develop vaccines aimed at preventing *Trypanosoma cruzi* infection. Understanding the immune response mechanisms triggered by the studied proteases is essential to advance toward more effective vaccines against this neglected disease.

Keywords: Chagas Disease; Vaccines; mRNA; DNA; Proteases; Thimet Oligopeptidase; Prolyl Oligopeptidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado atual de imigrantes com infecção por <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos..	20
Figura 2. Distribuição dos subíndices e índice de vulnerabilidade para doença de Chagas Crônica, por Unidade Federativa e Distrito Federal.	21
Figura 3. Formas morfológicas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	22
Figura 4. Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i> no hospedeiro vertebrado e invertebrado.	24
Figura 5. Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> .	31
Figura 6. Visão geral dos principais mecanismos na fase inicial da infecção por <i>T. cruzi</i> .	33
Figura 7. Esquema da estratégia de imunização com vacinas de nanopartículas de ácido nucleico..	40
Figura 8. Possíveis efeitos da atividade da POP de tripanossoma no hospedeiro. A degradação do colágeno por POPTc80 pode facilitar a migração do <i>T. cruzi</i> através da matriz extracelular.	45
Figura 9. Análise da purificação da POPTc80 recombinante expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel.	64
Figura 10. Análise da purificação da TOPTc recombinante expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel..	65
Figura 11. Confirmação da expressão das proteínas rPOPTc80 e rTOPTc.	66
Figura 12. Fluxograma de imunização com as proteínas recombinantes TOP e POPTc80.	67
Figura 13. Análise da produção de soro anti-POPTc80 em extratos proteicos de epimastigotas e POP recombinante..	68
Figura 14. Análise da produção de soro anti-TOPTc em extratos proteicos de epimastigotas e TOP recombinante.	68
Figura 15. Análise da digestão dos insertos e pcDNA3/vazio.	70
Figura 16. Análise das colônias positivas para POPTc80.	71

Figura 17. Análise das colônias para a presença do gene da TOPTc. Gel de agarose 1% da PCR das colônias obtidas a partir da transformação com a reação da clonagem do inserto da TOP no pcDNA3	71
Figura 18. Confirmação da clonagem pcDNA3/POPtc80 por análise de restrição.....	72
Figura 19. Transcrição <i>in vitro</i> pcDNA3_POP.	73
Figura 20. Análise purificação TIV com kit <i>MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit</i>	74
Figura 21. Análise do processo de nanoencapsulação.	75
Figura 22. Representação do vetor de expressão eucariótica pcDNA3.1_Neon/Luc sequenciado	76
Figura 23. Digestão pcDNA_Neon_Luc e insetos TOP e POP.....	79
Figura 24. PCR para a verificação da clonagem do gene TOP no pcDNA3.1..	80
Figura 25. PCR para a verificação da clonagem do gene POP no pcDNA3.1..	80
Figura 26. Confirmação da integridade dos plasmídeos.....	81
Figura 27. Controle de qualidade das vacinas.....	82
Figura 29. Verificação da funcionalidade do plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc. Resultado da transfecção das células HEK293 com o plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc.....	83
Figura 30. Transcrição <i>in vitro</i> pcDNA3.1_Neon_Luc.....	85
Figura 31. Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brenner red-shifted luciferase	86
Figura 32. Camundongo infectado com <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brenner red-shifted luciferase.	87
Figura 33. Cinética de atividade da D-luciferina em camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brenner red-shifted luciferase.....	87
Figura 34. Análise da biodistribuição do camundongo infectado com <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brenner red-shifted luciferase.	88
Figura 35. Camundongos Balb/c imunizados com pcDNA3.1/Neon_Luc i.m. 24 hrs.	89
Figura 36. Dias após a imunização de camundongos Balb/c imunizados com pcDNA3.1/Neon_Luc i.m.....	90

Figura 37. Teste de vias 24 horas e 7 dias pós imunização.....	91
Figura 38. Formulação de esferas de alginato de sódio com DNA vacinal...	92
Figura 39. Imunização oral com formulações de alginato de sódio..	93
Figura 40. Fluxograma imunizações com plasmídeos pcDNA_vazio e pcDNA_Neon_Luc.).	94
Figura 41. Análise da produção de anticorpos específicos para <i>Red-shifted luciferase</i> em extratos proteicos de epimastigotas CL Brener-LUC..	95
Figura 42. Esquema sistematizando as principais realizações e conclusões do trabalho.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequências dos primers utilizados para PCR.....	58
Tabela 2 Desenho de sequências pcDNA3.1_Neon/Luc.....	77
Tabela 3 Controle de qualidade das doses de vacinas produzidas.....	82

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APC	Antigen Presenting Cells
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
DO	Densidade óptica
DAPI	4'6-diamidino-2-phenilyndole
DCs	Células Dendriticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G	Força Gravitacional
GIPL	Fosfolipídio Glicoinositol
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HCl	Ácido clorídrico
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LNP	Nanopartícula lipídica
mA	Miliampere
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio

NK	Natural killer
OD	Densidade óptica
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Receptor de reconhecimento de padrão
qPCR	PCR quantitativa
rdEpi	Epimastigotas recentemente diferenciados
rPOPTc80	Prolil oligopeptidase recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
rTOP	Thimet oligopeptidase recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
Th1	Resposta auxiliadora do tipo 1
Th2	Resposta auxiliadora do tipo 2
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
UTR	Untranslated region
v/v	volume/volume
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	18
1.2	EPIDEMIOLOGIA	19
1.3	O CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i>	22
1.4	ASPECTOS CLÍNICOS E DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA	25
1.4.1	Fase Aguda	25
1.4.2	Fase Crônica	26
1.4.3	Diagnóstico	27
1.5	RESPOSTA IMUNE DESENCADEADA PELA INFECÇÃO	28
1.5.1	Resposta imune inata	28
1.5.2	Resposta adquirida	30
1.6	PERSISTÊNCIA DO <i>T. cruzi</i> NO ORGANISMO	33
1.7	TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA A DOENÇA	35
1.8	VACINA COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA DC	36
1.9	VACINAS DE DNA E MRNA	39
1.10	PROTEASES COMO ANTÍGENOS VACINAIS	43
1.11	PROLIL OLIGOPEPTÍDE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (POPTC80)	44
1.12	THIMET OLIGOPEPTÍDE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (TOP)	46
2	JUSTIFICATIVA	48
3	OBJETIVO	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	METODOLOGIA	50
4.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	50
4.2	CULTIVO CELULAR	50
4.3	CULTURA DE PARASITOS	51
4.3.1	Epimastigotas	51
4.3.2	Obtenção de tripomastigotas e tripomastigotas infectivos	51
4.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	52
4.4.1	Expressão da POPTc80 em sistema de expressão procarioto	52

4.4.2	Expressão da TOPTc em sistema de expressão procarioto	52
4.4.3	Purificação das proteínas recombinantes.	53
4.5	QUANTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNA PURIFICADAS	54
4.6	ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM SDS-PAGE	54
4.7	PRODUÇÃO DE SORO ANTI-RPOPTC80 E ANTI-RTOP	54
4.8	ANÁLISES POR WESTERN BLOT.	55
4.8.1	Análise expressão de anticorpos específicos.	55
4.9	DESENHO DO PLASMÍDEO PCDNA3.1_NEON/LUC	56
4.10	TRANSFEÇÃO CELULAR	56
4.11	CLONAGEM DAS PROTEÍNAS NO VETOR DE EXPRESSÃO	57
4.11.1	Amplificação dos genes de interesse	57
4.11.2	Clonagem dos genes de interesse nos vetores de expressão	58
4.11.3	Transformação de células competentes	58
4.12	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> E PURIFICAÇÃO DO MRNA	59
4.13	FORMULAÇÃO DOS RNAM EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNPS)	60
4.14	PRODUÇÃO DAS VACINAS DE DNA	60
4.14.1	Purificação do DNA	60
4.14.2	Formulação das doses oral	61
4.15	PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO	61
4.15.1	Teste de vias	61
4.15.2	Imunização com vacinas de DNA	62
4.16	ANÁLISE DE BIOLUMINESCÊNCIA <i>IN VIVO</i>	62
5	RESULTADOS	64
5.1	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	64
5.2	IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGO COM AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	67
5.3	CLONAGEM DO GENE DA POPTC80 NO VETOR PCDNA3	69
5.4	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	73
5.5	NANOECAPSULAMENTO MRNA PURIFICADOS	74
5.6	OTIMIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE MRNA	76
5.7	CLONAGEM DOS GENES NO VETOR PCDNA3.1_NEON/LUC	78
5.8	PRODUÇÃO DAS VACINAS DE DNA	81
5.9	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293 COM PCDNA3.1_NEON/LUC	83
5.10	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PLASMÍDEO PCDNA3.1_NEON/LUC	84

5.11	ENSAIOS DE INFECÇÃO CL-BRENER-LUC	85
5.12	VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO VETOR PCDNA3.1_NEON/LUC	89
5.13	TESTE DE VIAS	91
5.13.1	Formulação oral com alginato de sódio	92
5.14	IMUNIZAÇÕES COM PCDNA3.1_NEON/LUC	94
6	DISCUSSÃO	96
7	CONCLUSÕES	103
8	PERSPECTIVAS	104
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) foi nomeada em homenagem ao médico e cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, que em 1909 descobriu e caracterizou o agente etiológico além de descrever os diferentes estágios da doença e suas manifestações (Chagas, 1909). Também conhecida como Tripanossomíase Americana, a doença é causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. O protozoário possui um táxon altamente diverso e um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados e insetos vetores hematófagos pertencentes à subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), popularmente conhecidos como barbeiros (Coura 2014).

Atualmente, sabe-se que a DC é uma zoonose complexa que pode ser transmitida por mais de 100 espécies de triatomíneos à mais de 150 espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos (Cães, gatos, porcos) e selvagens (Marsupiais, morcegos, macacos, tatus). A transmissão vetorial ocorre quando o inseto triatomíneo elimina as formas infectivas do parasito em suas fezes durante o repasto sanguíneo, e essas fezes contaminadas entram em contato com a ferida na pele ou mucosas do hospedeiro (Rassi et al. 2010).

Apesar da transmissão vetorial ainda ser considerada uma das formas de transmissão de maior importância aos humanos, existem outras vias de contaminação, como a transmissão congênita (de mãe para filho durante a gravidez ou parto), transfusões de sangue com sangue contaminado, transplantes de órgãos de doadores infectados, acidentes de laboratório envolvendo o parasito e por meio da ingestão de alimentos, bebidas e leite materno contaminados (via oral) (Wendel 1998, Herwaldt 2001, Bern et al. 2011, Hughes et al. 2012, Nunes et al. 2013).

Nas últimas décadas a transmissão pela via oral vem ampliando a sua relevância epidemiológica como uma importante forma de transmissão da doença aos seres humanos, sendo responsável por surtos regionais de infecção aguda registrados em áreas rurais e periurbanas não endêmicas na América do Sul (Hughes et al. 2012, Coura 2014). Nos anos entre 2005 e 2013 o Ministério da Saúde do Brasil contabilizou 112 surtos no território que se focam principalmente na região Amazônica. No Brasil, esses surtos geralmente envolvem alimentos e bebidas como

caldo de cana, água, ou frutas regionais (açaí; bacaba) contaminada com triatomíneos infectados e/ou suas fezes ou contaminados com secreções infectadas das glândulas anais de marsupiais (Consenso, 2016).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Tem ocorrido uma redução nos casos de DC desde a década de 90, devido ao sucesso dos programas de controle vetorial e a triagem obrigatória em bancos de sangue (Teixeira et al. 2006, Nunes et al. 2013). Entretanto, estima-se que a doença continua afetando cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo, resultando em aproximadamente 12.000 mortes a cada ano e deixando por volta de 75 milhões de pessoas em risco de infecção. Possui uma incidência anual de 30,000 - 40,000 casos, e ainda é uma enfermidade subdiagnosticada em muitos países (menos de 10% e frequentemente menos de 1%) sendo assim, considerada um dos problemas de saúde pública mais prevalentes na América Latina (WHO 2023).

Desse modo, a DC continua a se destacar como doença parasitária mais importante no Hemisfério Ocidental, sendo sua carga, medida em anos de vida ajustados para a incapacidade (DALYs), 7,5 vezes maior do que a da malária (Bern 2015). Isso coloca a doença de Chagas como uma das principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), um grupo diversificado de 20 condições que afetam, principalmente áreas tropicais, e impacta de forma desproporcional comunidades empobrecidas, mulheres e crianças. Essas doenças causam consequências sanitárias, sociais e econômicas devastadoras para mais de um bilhão de pessoas (WHO 2017).

Apesar de ser endêmica na América Latina, o perfil epidemiológico da doença tem mudado nos últimos anos devido aos movimentos migratórios, o que aumentou os casos nos centros urbanos e contribuiu para a globalização da doença. Embora relativamente limitados, os dados apontam que esse fenômeno em outras partes do mundo, como na Europa, onde estima-se que aproximadamente 59.000-108.000 casos de doença de Chagas, com uma maior incidência na Espanha e Itália (Angheben et al. 2011). O país com mais pessoas infectadas fora da América Latina é os EUA com cerca de 300.000 casos, incluindo 30 a 40 mil casos de cardiopatia chagásica (Coura and Viñas 2010, Andrade et al. 2014) **(Figura 1)**.

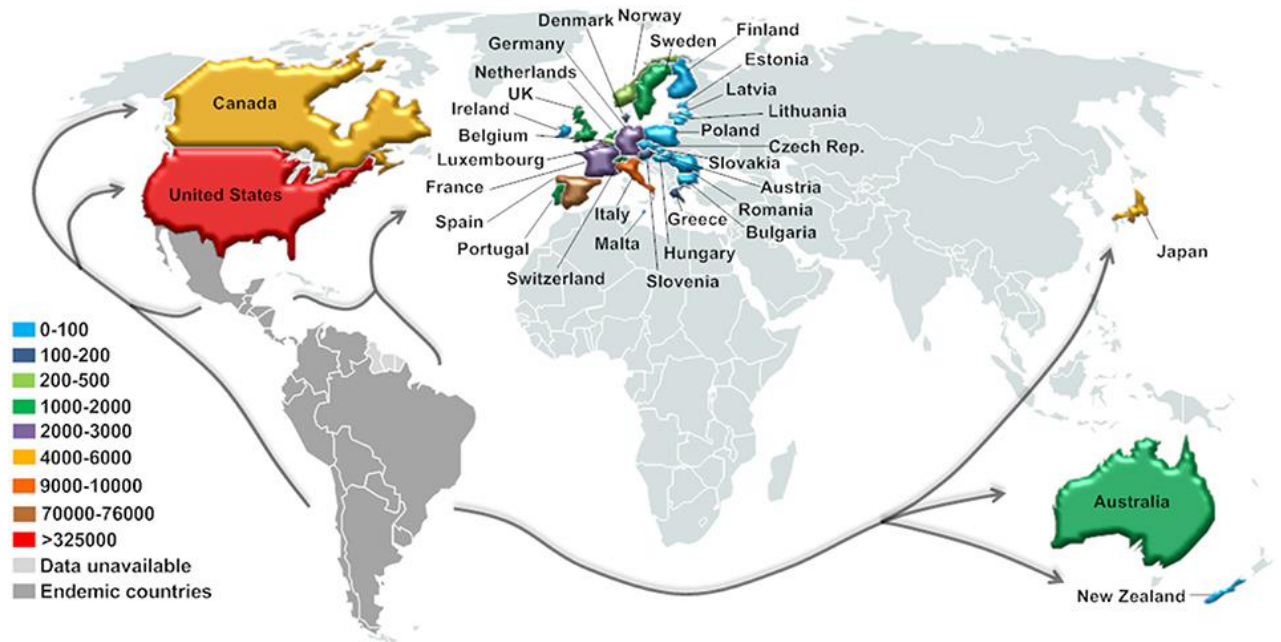


Figura 1. Número estimado atual de imigrantes com infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos. Estimativa baseada em dados para os Estados Unidos (2007) e Canadá (2006), Europa (2008–2011), Japão (2007), Austrália (20) e Nova Zelândia (2006). Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00166/full>. (Acessado em 16/09/2023).

No Brasil, o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) de 2022 revelou a ocorrência de em média 4.000 óbitos a cada ano no País tendo como causa básica a DC nos últimos 10 anos, colocando-a como uma das quatro principais causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias no país (Secretaria de Vigilância em Saúde; 2022). Durante o período de 2007 a 2017, o estado de Minas Gerais registrou o maior número de óbitos pela doença, enquanto os maiores coeficientes médios de mortalidade foram em Goiás e Distrito Federal (Secretaria de Vigilância em Saúde; 2020). Esses três estados também apresentam os maiores valores de índice de vulnerabilidade (0-1) (**Figura 2**) para a doença de Chagas Crônica, sendo ele 0,739 para o estado do Goiás, 0,494 para o Distrito Federal e 0,523 para Minas Gerais (Secretaria de Vigilância em Saúde; 2022).

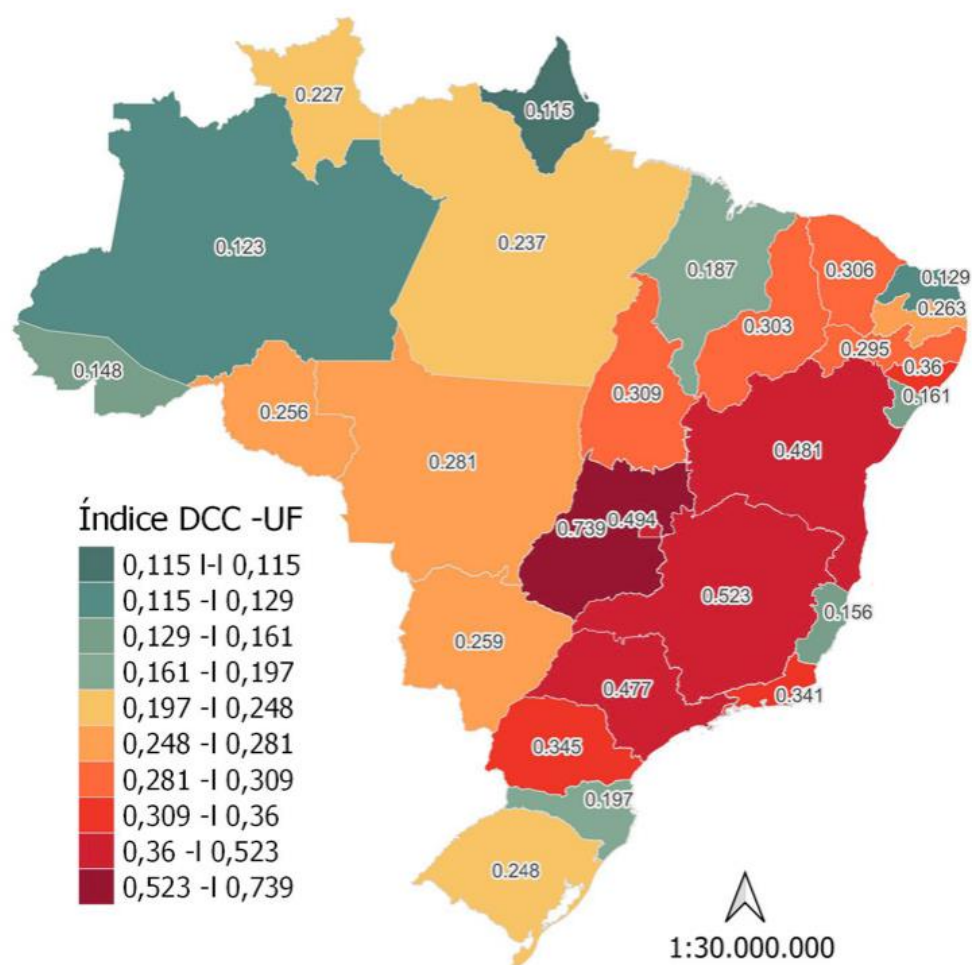


Figura 2. Distribuição dos subíndices e índice de vulnerabilidade para doença de Chagas Crônica, por Unidade Federativa e Distrito Federal. Modificado de (Secretaria de Vigilância em Saúde; 2022). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022/view>. (Acessado em 16/09/2023).

Esses dados destacam a importância de abordagens integradas para enfrentar a doença de Chagas, visando a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento adequado, para reduzir seu impacto devastador nas populações afetadas em toda a América Latina e em outras regiões onde a doença também representa um desafio de saúde pública.

1.3 O CICLO DE VIDA DO *T. CRUZI*

A versão clássica do ciclo de vida do *T. cruzi* envolve o hospedeiro mamífero e o invertebrado e quatro estágios bem elucidados, os quais são divididos em formas replicativas e infectivas que possuem variações morfológicas e funcionais. Sendo elas as formas Tripomatigota Metacíclico (TM), Tripomastigota Sanguíneo (TS) consideradas infectivas e as formas Epimastigota e Amastigota são tradicionalmente consideradas replicativas (**Figura 3**).

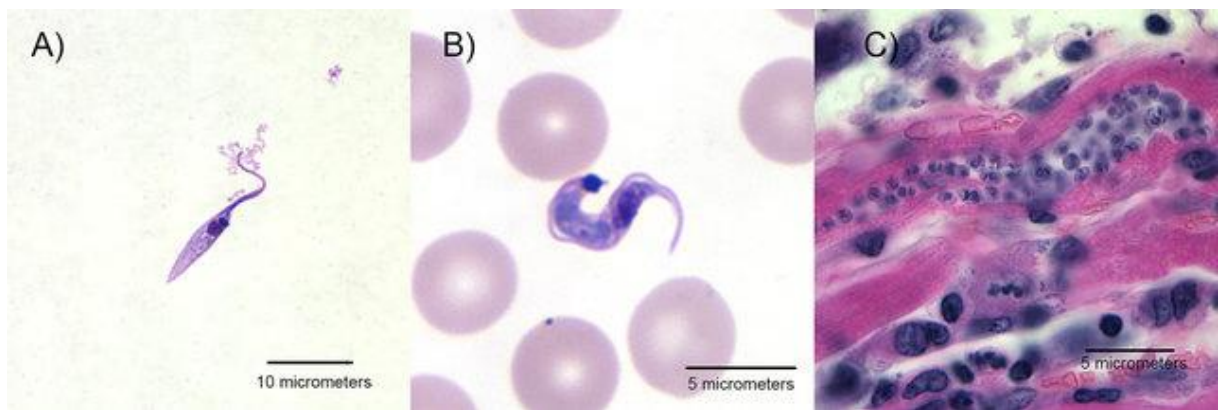


Figura 3. Formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigota, formas replicantes em cultura (coloração de Giemsa). (B) Forma infectiva Tripomastigota Sanguíneo em esfregaço de sangue periférico de paciente com doença de Chagas aguda (coloração do Giemsa). (C) Ninho das formas replicativas amastigotas dentro de um miócito cardíaco em um paciente com doença de Chagas crônica (coloração de hematoxilina e eosina). Cortesia da Divisão de Doenças Parasitárias e Malária, Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00023-19>

Contudo, vários estudos têm indicado que essa concepção convencional do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* não compreende toda a complexidade desse processo, tanto nos hospedeiros mamíferos quanto nos vetores triatomíneos. A partir dos cuidadosos desenhos encontrados nos manuscritos de Carlos Chagas, já é possível observar uma vasta gama de formas intermediárias e populações pleomórficas no ciclo do parasito. Descobertas recentes fortalecem essas evidências e proporcionam novas perspectivas para a compreensão da biologia do *T. cruzi* e da patogênese da doença (Almeida-de-Faria et al. 1999, Tyler and Engman 2001, De Souza and Barrias 2020, Martín-Escolano et al. 2022).

Para fins didáticos, podemos dizer que a infecção no hospedeiro invertebrado se inicia com as formas os Tripomastigotas Sanguíneos, formas intermediárias e amastigotas (em menor quantidade) que circulam na corrente sanguínea do

hospedeiro mamífero e podem ser ingeridos pelo barbeiro. No Intestino Anterior (estômago) do inseto parte dessas formas, que sobreviverem a esse ambiente inóspito, vão passar por um processo de epimastigogênese e se diferenciarem em uma forma intermediária semelhante a amastigota e subsequentemente nas formas epimastigotas, que se replicam por fissão binária, quando atingem o Intestino Médio (Intestino) do inseto. Esses epimastigotas continuam a se multiplicar e migrar pelo Intestino Médio à medida que os nutrientes do repasto sanguíneo se esgotam (De Souza 1984, Souza et al. 2020, De Souza and Barrias 2020).

Ao chegar na porção final do intestino, denominado de Intestino Anterior (Reto), a privação nutricional e estresse metabólico induzem uma porção dos epimastigotas a se atracarem a cutícula cerosa do intestino com seus flagelos e convertem-se novamente para a forma infectiva, agora designadas de tripomastigotas metacíclicas (TM), na qual o posicionamento do flagelo, do cinetoplasto e do núcleo são rearranjados. Curiosamente, de acordo com um minucioso estudo realizado por Kessler e colaboradores (2017) foi observado que nessa etapa os parasitos podem transitar entre uma forma e outra, o que significa que formas secundárias de epimastigotas podem se desenvolver no reto do inseto dependendo do estado nutricional que se encontra o ambiente, processo denominado de epimastigogênese secundária (Kessler et al. 2017).

Outra descoberta intrigante foi que esses epimastigotas recentemente diferenciados (rdEpi) (até pelo menos 4 ciclos de divisão) possuem capacidade infectiva tanto *in vitro* (cultura celular) quanto *in vivo* (camundongo), mesmo com esses rdEpi possuindo o mesmo padrão antigênico e proteômico global intimamente relacionado aos epimastigotas cultivados a longo prazo, que não são infectivos. Além disso, foi observado que esses rdEpi são resistentes à lise mediada pelo complemento, ao adentrarem o organismo do hospedeiro vertebrado. Esses dados desafiam o paradigma de que os epimastigotas não são infecciosos para o hospedeiro mamífero e reforçam a ideia de que tanto TMs quanto epimastigotas e rdEpi estão presentes no barbeiro e/ou em suas fezes, podendo invadir o organismo do hospedeiro através de feridas abertas geradas durante o repasto sanguíneo ou através de várias membranas de mucosas, como a conjuntiva e a mucosa bucal (Coura 2014, Kessler et al. 2017, De Souza and Barrias 2020).

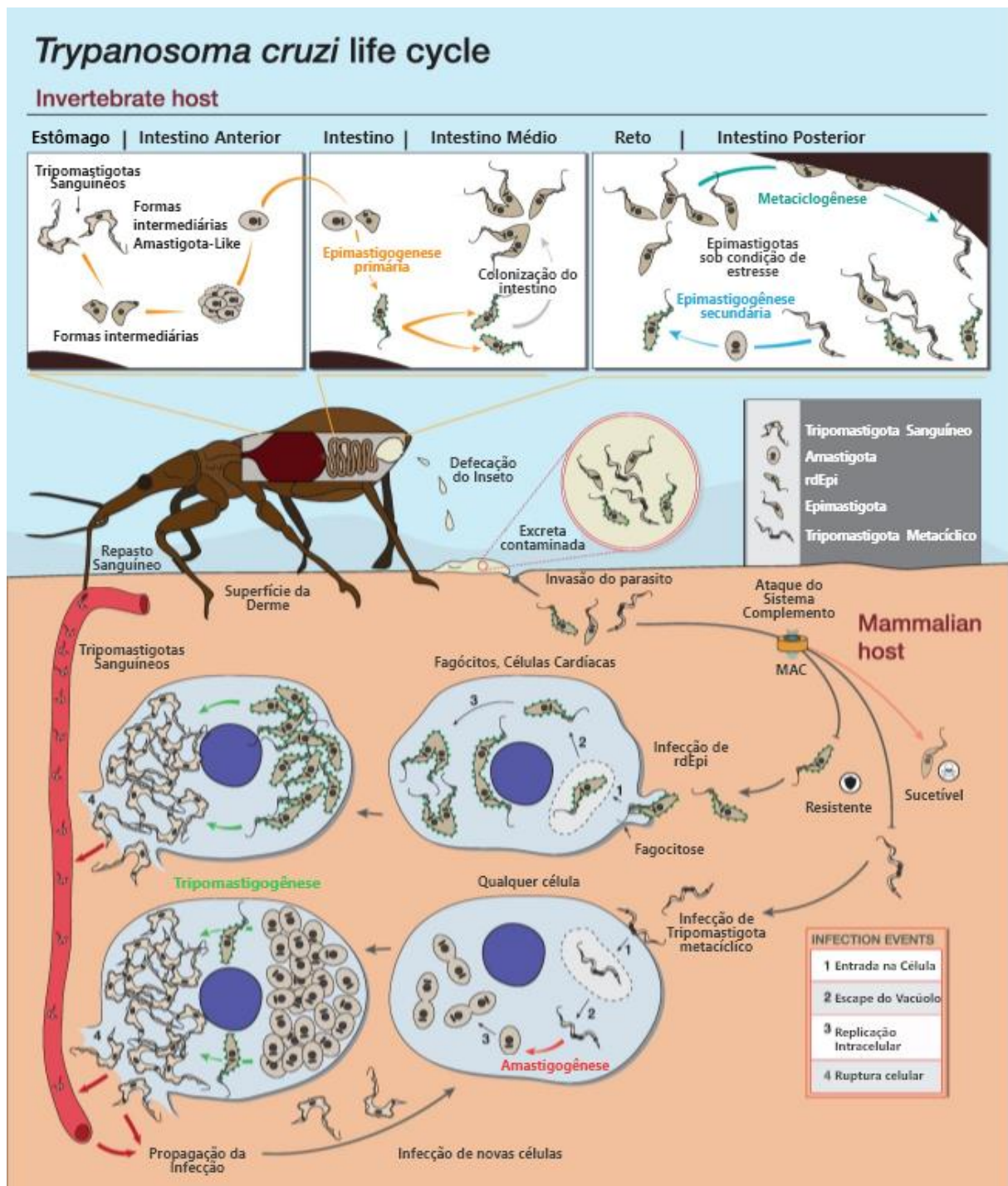


Figura 4. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Além da epimastigogenese primária no intestino médio do hospedeiro invertebrado após o repasto sanguíneo, sugerimos a possibilidade de ocorrer uma epimastigogenese secundária no reto do inseto vetor (intestino posterior), dependendo das condições nutricionais dessa parte intestinal. Também enfatizamos a resistência do rdEpi ao sistema complemento de mamíferos e sua capacidade de infectar células fagocíticas (possivelmente células cardíacas), revelando um padrão de replicação intracelular distinto. Os pontos verdes na superfície do rdEpi representam o padrão de expressão de proteínas, usados para distingui-los dos epimastigotas. MAC refere-se ao complexo de ataque à membrana. Modificado de (Kessler et al. 2017). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.13653>. (Acessado em 22/10/2023).

Após adentrar o organismo do hospedeiro vertebrado, as formas não suscetíveis ao complemento e sistema imune do hospedeiro podem infectar células hospedeiras, incluindo células fagocíticas e não fagocíticas mediante ligação com receptores de membrana e recrutamento lisossomal, formando o vacúolo parasitóforo (VP). Dentro do VP o TM recebe sinais moleculares que iniciam a sua transformação para amastigotas, formas pequenas e arredondadas que possuem o flagelo atrofiado e capacidade replicativa. Os parasitos são capazes destruir o VP e escapar para o citoplasma, onde completam a sua diferenciação em amastigotas e se replicam, preenchendo a célula hospedeira **(Figura 4)** (Martín-Escolano et al. 2022).

Posteriormente, os amastigotas se alongam e readquirem os flagelos, passam pela forma de rdEpi antes de completar a transformação em tripomastigotas sanguíneos (TS) que possuem alta mobilidade e são capazes de lisar a célula hospedeira e liberar na corrente sanguínea parasitos em diferentes estágios celulares, permitindo a disseminação e a infecção de novas células.

No que diz respeito a infecção por rdEpi, foi verificado que o rdEpi apresenta seletividade para infecção de células fagocíticas e cardíacas. Nessas células eles adentram de maneira semelhante aos tripomastigotas, entretanto, os rdEpi não descartam seus flagelos e passam pelo estágio de amastigota. Eles mantêm a sua estrutura flagelar após a invasão celular e se replica dentro da célula na forma de epimastigotas. Quando a célula hospedeira se encontra cheia de epimastigotas, eles se diferenciaram em tripomastigotas e eclodem da célula em tempo e em número semelhantes à infecção com tripomastigotas (Kessler et al. 2017).

Após a eclosão, uma população pleomórfica de parasitos é liberada na corrente sanguínea e podem ser ingeridos pelo barbeiro reiniciando o ciclo **(Figura 4)** (Tyler and Engman 2001, Bern 2015).

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS E DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA

1.4.1 Fase Aguda

A doença apresenta uma evolução clínica que se desdobra em duas fases distintas, a fase aguda e a crônica. A fase aguda, que é a fase inicial da doença, se estende de um a quatro meses após a infecção e se caracteriza por uma elevada

parasitemia no sangue, variando de quatro a dez dias quando a transmissão ocorre por meio de vetores (Andrade et al. 2014).

Nos casos sintomáticos, podem se fazer presentes sinais indicativos da entrada do parasito no organismo, como o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação (Carvalho et al. 2009), bem como o desenvolvimento da doença aguda grave que ocorre em <1% dos pacientes e as manifestações clínicas incluem miocardite aguda, derrame pericárdico, meningoencefalite, hepatomegalia, esplenomegalia, edema e comprometimento nervoso e cardíaco (Nunes et al. 2013, Bern 2015). No entanto, em grande parte dos indivíduos, os sintomas da fase aguda são inespecíficos, como febre, cefaleia e mal estar, ou até mesmo ausência de manifestações clínicas que ocorre em 95% dos pacientes, o que dificulta a detecção da doença nessa fase e a busca pelo tratamento (Teixeira et al. 1978, 2006).

Os sinais e sintomas clínicos da doença de Chagas aguda, quando transmitida por via oral, embora semelhantes aos da doença de Chagas aguda transmitida por vetores, tendem a apresentar um período de incubação mais prolongado, variando de 3 a 22 dias para a transmissão oral, em contraste com os 4 a 15 dias da transmissão vetorial. Além disso, frequentemente manifestam uma maior taxa de mortalidade ocasionada por sintomas mais graves, como febre elevada, eritema nodoso e complicações cardíacas, tais como derrame pericárdico, derrame pleural, icterícia, choque séptico e choque cardiogênico (Bern et al. 2011, Hughes et al. 2012, Souza et al. 2016, Franco-Paredes et al. 2020).

1.4.2 Fase Crônica

Se a infecção não for curada, o quadro dos indivíduos evolui para a fase crônica da doença, que se inicia aproximadamente de dois a quatro meses após o término da fase aguda. Nesse período, os níveis de parasitemia diminuem consideravelmente, devido a resposta humoral e celular produzida pelo organismo. Contudo, os parasitos deslocam-se para os tecidos onde permanecem latentes, o que os torna menos acessíveis à resposta imunológica. Desse modo, a doença progride para a fase crônica indeterminada que pode durar décadas ou mesmo a vida toda, sem desenvolver quaisquer sintomas ou sinais clínicos. A maior parte das pessoas infectadas em regiões endêmicas está neste estágio da doença, e cerca de 40% desses pacientes podem permanecer nessa condição clínica por vários anos (Teixeira et al. 2006, Nunes et al. 2013, Gómez et al. 2021).

No entanto, alguns casos progridem a ponto de haver destruição do coração e/ou do trato gastrointestinal. Cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a cardiomiopatia chagásica nessa fase, que é caracterizada por uma miocardite crônica que envolve todas as câmaras cardíacas e danos ao sistema de (Benvenuti et al. 2008, Ribeiro et al. 2012). Pacientes com comprometimento cardíaco podem manifestar uma variedade de sintomas, que incluem arritmias, síncope, palpitações, dor torácica decorrente de disfunção microvascular, bem como da insuficiência cardíaca (Healy et al. 2015). Tal comprometimento causam uma elevada morbidade nos indivíduos e em muitos casos pode levar a morte, estima-se que morte súbita cardíaca é umas das principais causas de morte, responsável por aproximadamente 55% a 65% dos óbitos na doença de Chagas, enquanto a insuficiência cardíaca representa de 25% a 30% e eventos tromboembólicos respondem pelos restantes 10% a 15% (Rassi Jr et al. 2001).

Além disso, aproximadamente 10% dos infectados apresentam a forma digestiva da doença, que podem resultar em megassíndromes, uma doença que envolve o esôfago (megaesôfago) e o cólon (megacólon) (Teixeira et al. 2006). Adicionalmente, pessoas acometidas com a DC com manifestações cardíacas ou gastrointestinais da doença também podem apresentar lesões generalizadas envolvendo os sistemas nervosos periféricos simpático e parassimpático. Essas lesões do sistema nervoso chagásico explicam especificamente o quadro fisiopatológico do coração e as megassíndromes observadas à beira do leito. (Teixeira et al. 2006, Hughes et al. 2012, Bern 2015, Rassi Jr et al. 2017).

1.4.3 Diagnóstico

Devido à natureza variável e complexa da doença, é essencial adotar uma abordagem ampla e meticulosa para obter um diagnóstico preciso. Durante a fase aguda da doença, quando a quantidade de parasitos no sangue é elevada, é possível realizar a detecção direta do parasito por meio de exames microscópicos (xenodiagnóstico) ou por meio de técnicas de biologia molecular, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em Tempo Real (qPCR), além do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) (Junqueira et al. 2010, Candia-Puma et al. 2022)

No entanto, à medida que a doença progride para a fase crônica, a parasitemia diminui, tornando a detecção direta do parasito no sangue menos

sensível. Nesse estágio, os métodos sorológicos desempenham um papel fundamental no diagnóstico. Ensaios como a Hemaglutinação Indireta (HAI), a Imunofluorescência Indireta (IFA) e o ensaio de ELISA são empregados para identificar a presença de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* no sangue do paciente (Camargo et al. 1911, Fife and Muschel 1959, Santos et al. 2009, Gómez et al. 2021). É importante destacar que o diagnóstico precoce e preciso é fundamental para direcionar o tratamento apropriado e para prevenir complicações graves associadas à doença de Chagas (Ribeiro et al. 2012).

1.5 RESPOSTA IMUNE DESENCADEADA PELA INFECÇÃO

A resposta imune contra patógenos intracelulares como *T. cruzi*, pode operar em diferentes níveis que visam o controle do parasito e da infecção, sendo eles: (1) a detecção e destruição direta de parasitos por células do sistema imune inato, em particular macrófagos, células dendríticas e sistema complemento (2) a ativação de células dendríticas (DCs) e macrófagos para se tornarem células apresentadoras de antígenos (APCs) que ativam a resposta imunes adaptativa e (3) a detecção e destruição de células infectadas, principalmente as células primárias alvos da invasão do *T. cruzi* (Gil-Jaramillo et al. 2016, Macaluso et al. 2023).

1.5.1 Resposta imune inata

Antes da imunidade adquirida entrar em ação, a imunidade inata apresenta um papel importante tanto no controle da propagação da parasitemia quanto na reação inflamatória dos tecidos infectados (Macaluso et al. 2023).

Ao entrar em contato com o patógeno, o reconhecimento imunológico inato de células do sistema imune, também conhecido como receptores de reconhecimento padrão (PRR) reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície do parasito, tais como proteínas trans-sialidases; glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) e âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI); e glicolipídios dominantes da superfície celular de tripomastigotas. Esses PAMPs são reconhecidos por vários receptores de células hospedeiras de mamíferos, principalmente por receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* (TLRs)) e por receptores do tipo NOD (*Nod-like receptors* (NLRs)). Esses PRR ativam o fator nuclear κ B (NF κ B) e o fator regulatório do interferon (IRF), sendo essa produção de interferon importante

na geração e direcionamento de respostas imunes adaptativas a jusante durante a infecção *in vivo* (Tarleton 2007).

Além disso, TLRs endossomais, também são capazes de reconhecer componentes do *T. cruzi*, tais como ilhas CpG não metilada presentes no DNA que é reconhecido pelo TLR9 e o RNA do parasito que é reconhecido pelo receptor TLR7. A ativação desses receptores, e também de outras vias independente de TLR, leva à produção de Óxido Nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias promovendo uma resposta antiparasitária polarizada para o tipo Th1 (Junqueira et al. 2010).

As células do sistema imunológico, como macrófagos, monócitos e células dendríticas, desempenham papéis cruciais no reconhecimento de antígenos e, posteriormente, na polarização da resposta linfocitária, principalmente através da produção de IL-12 para promover um ambiente pró-inflamatório que estimula a polarização de linfócitos T. Ademais, essas células têm a função de fagocitar e eliminar o parasito, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNI) no interior do vacúolo parasitóforo (Segura and Amigorena 2015, Gil-Jaramillo et al. 2016, Gutierrez et al. 2020).

As células dendríticas se destacam como as primeiras células a interagir com o parasito, devido à sua ampla distribuição em todos os tecidos. Elas são reconhecidas como células apresentadoras de antígenos profissionais devido à sua alta capacidade de detectar e internalizar antígenos no local da infecção. Essas células também podem migrar dos tecidos periféricos para os órgãos e tecidos linfoides, onde apresentam os antígenos processados através dos complexos de histocompatibilidade (MHC) para os linfócitos T (Neefjes et al. 2011, Segura and Amigorena 2015)

Outro componente importante da resposta inata na infecção pelo *T. cruzi* é o sistema complemento, um conjunto de mais de 35 proteínas plasmáticas do sangue que desempenham um papel importante na defesa do organismo contra patógenos (Cestari et al. 2013). Já nos primeiros estágios da infecção o complemento pode ser ativado pelas vias alternativas e das lectinas, tendo em vista que ambas as vias não dependem de uma resposta específica de anticorpos (Lidani et al. 2017). A partir disso o complemento vai ajudar na eliminação do *T. cruzi* por meio da lise direta do patógeno

e da opsonização do parasito, que facilita a fagocitose pelos macrófagos (Lidani et al. 2017, Macaluso et al. 2023).

Entretanto, vale ressaltar que o parasito coevoluiu de forma a conter vários mecanismos de evasão, os quais serão discutidos mais adiante, que permite a sua sobrevivência e escape do VP. Desse modo, as células fagocíticas começam a funcionar como receptáculo para o parasito completar o seu ciclo de vida. Para uma eliminação mais eficiente do parasito é necessário células fagocíticas especializadas, ativadas pela imunidade adquirida (Cardoso et al. 2016).

1.5.2 Resposta adquirida

Uma vez ativadas, os fagócitos migram via Receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) para órgãos/tecidos linfoides secundários, onde apresentam os antígenos às células T e produzem citocinas como IL-12, IL-10, TNF- α e IL-6, que contribuem para a ativação e diferenciação de linfócitos T antígeno-específicos (Lipscomb and Masten 2002).

A partir disso, a imunidade adquirida mediada pela resposta das células T auxiliares do tipo 1 (do inglês, *T-helper 1* - Th1) torna-se crucial no controle da parasitemia e na sobrevivência do hospedeiro (Martin and Tarleton 2004, Andrade et al. 2014). Resumidamente, a ativação das células dendríticas pelos PAMPs do *T. cruzi*, principalmente DNA e RNA, leva à maturação das células dendríticas e à produção de IL-12, o que favorece a diferenciação de células T precursoras para o fenótipo Th1 protetor e a consequente produção de IFN- γ . Isso leva à ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, que se dividem e se diferenciam em células T efetoras e células T de memória. As células T efetoras ajudam a eliminar o patógeno, enquanto as células T de memória permanecem no organismo para fornecer proteção imunológica a longo prazo (**Figura 5**) (Andrade et al. 2014).

As células T CD8⁺ efetoras podem detectar e destruir células hospedeiras infectadas pelo parasito enquanto as células T CD4⁺ desempenham um papel importante orquestrando a resposta imune através da produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) (Guedes et al. 2010, Dutra et al. 2014). A ausência de qualquer um destes mecanismos efetores, anticorpos, células T CD4⁺ ou células T CD8⁺ resulta em uma infecção aguda

descontrolada e letal. Assim como, uma resposta Th1 excessiva e/ou prolongada pode contribuir para a patogênese da doença (Martin and Tarleton 2004).

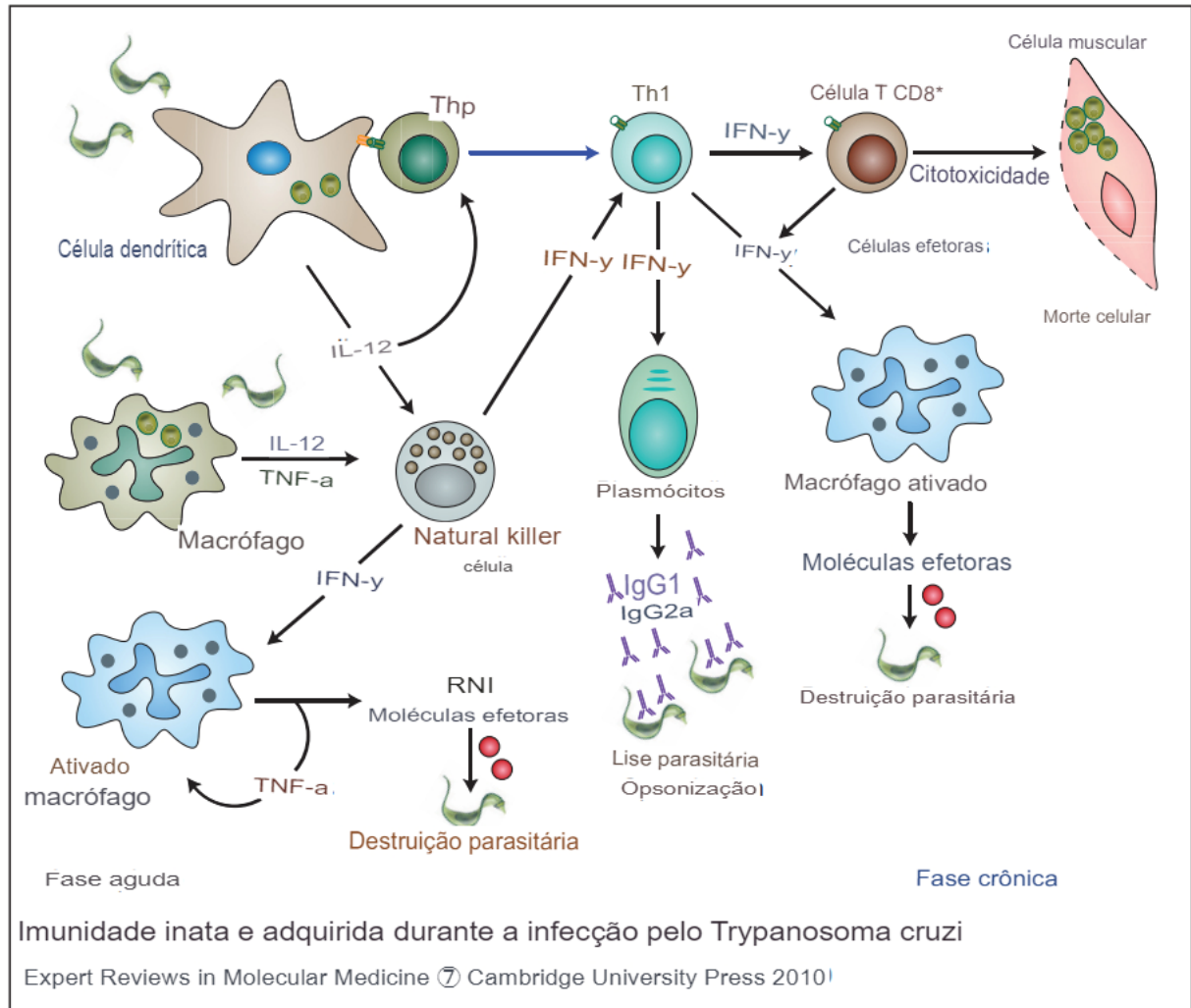


Figura 5. Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*. A imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção, com macrófagos, células NK e células dendríticas produzindo citocinas e moléculas efetoras que controlam o parasito. As células dendríticas conectam a imunidade inata e adquirida, estimulando células T Th1 e a produção de anticorpos. O IFN-γ ativa mecanismos para destruir o parasito, enquanto anticorpos produzidos pelas células B lisam formas do parasito ou facilitam a fagocitose. Abreviações: IFN, interferon; IL, interleucina; NK, células NK; Thp, célula Th precursora; TNF, fator de necrose tumoral. Adaptado de (Junqueira et al. 2010). Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/expert-reviews-in-molecular-medicine/article/abs/endless-race-between-trypanosoma-cruzi-and-host-immunity-lessons-for-and-beyond-chagas-disease/BA3C95388A7908FF5D9CE48C9C1916CA> (Acessado em 11/10/2023)

Entretanto, apesar da resposta desencadeada pelo sistema imune adaptativo contra o parasito *T. cruzi* ser uma resposta potente, ela ocorre de forma tardia, com o pico do nível de células T CD8⁺, específicas para o *T. cruzi*, podendo ocorrer cerca de 3 semanas após a infecção inicial, dependendo da cepa do parasito, dose e via de

infecção. Esse retardo da resposta das células T CD8⁺ contrasta fortemente com o tempo de indução em outras infecções, tais como virais, bacterianas e até protozoárias e sugere um mecanismo de evasão imune (Tarleton 1990, 2001, 2007, Martin and Tarleton 2004, Padilla et al. 2009).

Os linfócitos B também são fundamentais para o estabelecimento da resposta imune adaptativa, pois medeiam a imunidade humoral, caracterizada pela produção de anticorpos que podem reconhecer e neutralizar antígenos específicos. Os linfócitos B também são estimulados pelos linfócitos Th1 a produzir anticorpos específicos para o *T. cruzi*. A liberação de IFN- γ por células CD4⁺ induz a ativação de células fagocíticas que promove a morte do parasito e também auxiliam na produção adequada de anticorpos IgG e IgM, que também são responsáveis pela ativação do complemento pela via clássica nessa fase (Dutra et al. 2014, Lidani et al. 2017).

A transição da fase aguda para a crônica é acompanhada pela diminuição da parasitemia tecidual e sanguínea, bem como pelo controle da resposta inflamatória observada na fase aguda. Está bem estabelecido que as citocinas anti-inflamatórias desempenham um papel fundamental no controle da produção de citocinas inflamatórias tendo em vista que equilíbrio entre os mecanismos efetores e reguladores parecem ser determinantes na progressão dos sintomas clínicos da doença (Dutra et al. 2014, Gil-Jaramillo et al. 2016).

A resposta adaptativa é de crucial importância para o controle da parasitemia e sobrevivência do hospedeiro, como foi confirmado em vários estudos, a ausência genética, ou o bloqueio experimental, de qualquer uma dessas respostas adaptativas resulta em altos níveis de parasitemia e frequentemente a morte do hospedeiro (Rodrigues et al. 2012). Contudo, ela não é suficiente para não consegue eliminar completamente o parasito e a persistência de uma resposta inflamatória excessiva e/ou prolongada de qualquer pode contribuir para a patogênese da doença (Dutra et al. 2014).

1.6 PERSISTÊNCIA DO *T. CRUZI* NO ORGANISMO

O *Trypanosoma cruzi* tem coevoluído com humanos por pelo menos 9.000 anos, sendo encontrado presença do DNA do cinetoplasto do *T. cruzi* em múmias exumadas dos primeiros humanos que povoaram pela primeira vez a América Andina no Peru e no Chile (Aufderheide et al. 2004). Desse modo, esse parasito desenvolveu vários mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro ao mesmo tempo que reduz danos ao hospedeiro a fim de completar o seu ciclo de vida. Inativação do complemento, escape do fagolisossomo, anticorpos sem especificidade para *T. cruzi*, resposta imune retardada, e manipulação das funções de células do sistema imune são alguns exemplos dessas estratégias **Figura 6** (Revisado por Cardoso et al. 2016)

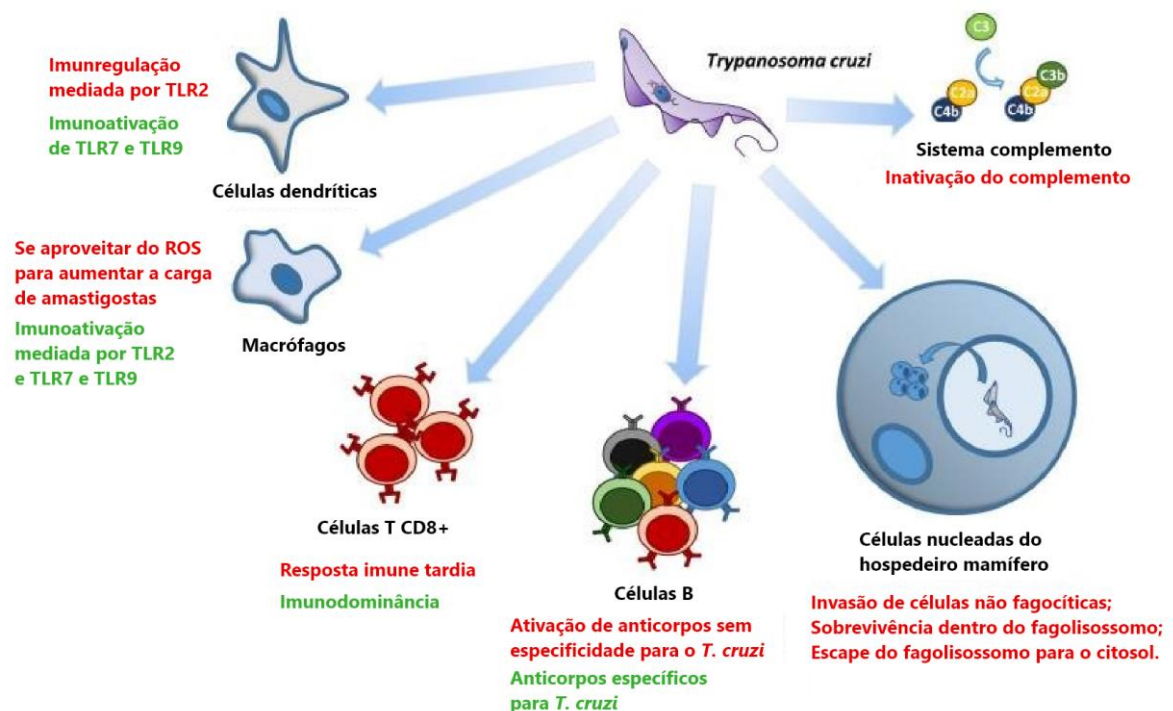


Figura 6. Visão geral dos principais mecanismos na fase inicial da infecção por *T. cruzi*. Destaques em verde representam mecanismos relacionados ao controle da carga parasitária, enquanto destaques em vermelho indicam mecanismos ligados à influência do parasito. Adaptado de (Cardoso et al. 2016). Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00659/full>. Acessado (23/10/2023)

Portanto, apesar de desencadear um potente controle imunológico, que reduz os níveis de parasito e previne a reinfecção na maioria dos tecidos, o protozoário

persiste no organismo em alguns tecidos-alvo, tais como tecido muscular cardíaco, muscular liso, tecido adiposo e sistema nervoso (Padilla et al. 2009, Ward et al. 2020).

Provavelmente essa persistência ocorre por conta da entrada furtiva do *T. cruzi* nos hospedeiros, além do consequente atraso na geração de respostas de células T que é um importante fator para o estabelecimento da infecção inicial e, mais importante, permite que os parasitos alcancem locais onde conseguem formar focos de parasitos persistentes, como no trato gastrointestinal (GI), particularmente o cólon e/ou estômago, antes de que uma forte resposta imune adaptativa seja montada (Padilla et al. 2009, Lewis et al. 2014).

Adicionalmente, o protozoário é capaz de modular a função das DCs interferindo no reconhecimento, migração, maturação e apresentação de antígenos dessas células (Gil-Jaramillo et al. 2016). Estudos recentes mostraram que a infecção por *T. cruzi* leva a uma redução na expressão de moléculas do MHC classe I e II (Alba Soto et al. 2003), bem como de moléculas coestimuladoras em células dendríticas murinas e humanas (CD80, CD86, CD83 e CD40). Além disso, o parasito pode induzir a expressão de moléculas co-inibitórias, como PD-L1 e seu ligante, PD-1. Essas moléculas podem desencadear sinais inibitórios para as células T, que culminam em menos ativação e mais apoptose dos linfócitos T (Gutierrez et al. 2011).

Em relação à produção de citocinas, há um aumento nas citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β e IL-4) e uma diminuição nas citocinas protetoras contra o parasito (IL-12 e TNF- α), tornando o hospedeiro mais suscetível à infecção (Van Overtvelt et al. 1999).

Com a persistência do parasito e o estabelecimento da infecção crônica, o *T. cruzi* pode persistir no organismo do hospedeiro por décadas, evadindo a resposta imune e causando danos teciduais que podem levar a complicações graves, como falência cardíaca progressiva que pode levar o paciente a óbito (Gomes et al. 2003, Tanowitz et al. 2015).

1.7 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA A DOENÇA

No que diz respeito ao tratamento desses indivíduos infectados, há apenas duas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da doença, que são o benzonidazol e o nifurtimox. Esses medicamentos foram desenvolvidos na década de 1960, sendo o benzonidazol o único medicamento atualmente utilizado no Brasil e aprovado pela *Food and Drug Administration*-EUA para tratar a infecção por *T. cruzi* (Losada Galván et al. 2021).

O benzonidazol age interferindo com as atividades metabólicas do *Trypanosoma cruzi*, o que leva à redução da carga parasitária no organismo do paciente, prevenindo o estabelecimento ou progressão de danos viscerais, principalmente cardíacos e/ou digestivos. O benzonidazol é um fármaco nitro-heterocíclico utilizado no tratamento da tripanossomíase americana e africana (Müller Kratz et al. 2018). Seu mecanismo de ação se baseia na ativação por enzimas nitro-redutases tipo 1 (NTR), as quais são encontradas em diversos protozoários e compartilham semelhanças com enzimas bacterianas, não possuindo homólogos em seres humanos (Patterson and Wyllie 2014). As enzimas NTR podem ser classificadas em tipo 1 (insensíveis ao oxigênio) e tipo 2 (sensíveis ao oxigênio). Através da ação das enzimas NTR tipo 1, o benzonidazol é reduzido a hidroxilamina, que posteriormente, por meio de reações não enzimáticas, se converte em di-hidro-diidroxí-imidazol. Essa substância coexiste em equilíbrio com o glioxal e um produto com uma guanidina adicionada (Patterson and Wyllie 2014). É importante ressaltar que o glioxal é conhecido por sua alta toxicidade e reatividade, podendo modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Hall and Wilkinson 2012). Sua capacidade mutagênica é aproximadamente 10 vezes maior em comparação a outros fármacos com propriedades antiparasitárias, como o nifurtimox (Buschini et al. 2009).

Entretanto, a eficácia do tratamento é mais evidente quanto mais cedo for administrado no curso da doença e preferencialmente em crianças, com drástica diminuição da sua eficácia na fase crônica, onde a maioria dos casos são diagnosticados. Quando administrado de forma tardia, além de não promover a cura definitiva, possui uma alta frequência de reações adversas, tais como anorexia e perda de peso; náuseas e vômitos; excitação nervosa; insônia; depressões e confusões mentais; convulsões; dor de cabeça; sonolência; mialgias; artralgias; perda de equilíbrio; intolerância hepática; manifestações cutâneas; dentre outros, que levam

à interrupção do tratamento em 5 a 31% dos casos (Castro and Diaz de Toranzo 1988, Buschini et al. 2009, Losada Galván et al. 2021).

Além disso, estudos apontam uma alta genotoxicidade desses medicamentos, eficácia variável e uma fraca atividade em pacientes imunocomprometidos, além de requerem longos tratamentos e alto custo nos sistema de saúde público, que gira em torno de US\$ 1.000 por ano por paciente (Castillo-Riquelme et al. 2008, Buschini et al. 2009, Crespillo-Andújar et al. 2018).

A falta de vacinas e tratamentos eficazes contra DTNs é um Objetivos de Desenvolvimento Sustentável do novo roteiro da Organização Mundial da Saúde para doenças tropicais negligenciadas (2021-2030) (OMS 2021). Existem diversos desafios no processo de desenvolvimento de novas vacinas, sendo algumas delas o baixo investimento em pesquisa, a falta de interesse da indústria e o complexo ciclo de vida de alguns dos patógenos (Vuitika et al. 2022). A doença de Chagas é uma doença infecciosa negligenciada e emergente que apesar de ter sido descoberta a mais de 100 anos ainda permanece sem tratamentos eficazes para a fase crônica e sem uma vacina profilática, eficaz e licenciada.

Tendo isso em vista, é evidente a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas, como novos medicamentos e vacinas. A produção de uma vacina que estimulasse o sistema imune inato e adaptativo, evitaria a o atraso na resposta das células do sistema imune, que poderia ser eficaz em controlar a infecção e impedir que os parasitos atinjam tecidos-alvo onde são capazes de formar focos de persistência do parasito.

1.8 VACINA COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA DC

Espera-se que as vacinas impeçam o estabelecimento de doença, estimulando o organismo vacinado no reconhecimento antigênico e induzindo resposta imune com produção de anticorpos e resposta celular, gerando memória imunológica, facilitando o reconhecimento do patógeno de forma específica e mais rápida em contatos futuros. Apesar de desafiador, vários estudos apontam que o desenvolvimento de uma vacina profilática para a doença de Chagas é um caminho promissor.

Diferentes abordagens vacinais, como proteínas recombinantes, DNA e vetores virais, assim como estratégias combinadas prime-boost, demonstraram imunogenicidade e eficácia protetora em modelos de camundongos. A primeira tentativa de imunização foi realizada pelo parasitologista francês, Emilé Brumpt (1913) (Brumpt 1913), apenas 4 anos após a descoberta da Doença por Carlos Chagas. Brumpt mostrou que uma imunização com cepas atenuadas protegia contra o desafio letal de uma cepa virulenta, mas não impedia a infecção, o que ele chamou de “imunidade parcial”.

Nas décadas de 1950 e 1960, foram exploradas estratégias para criar vacinas usando parasitos não virulentos tratados com agentes químicos, radiação ou passagens em cultivo. O objetivo era preservar a capacidade da vacina de induzir uma resposta imune, eficácia e segurança. No entanto, as vacinas com parasitos atenuados ou mortos não ofereceram uma proteção significativamente melhor do que as formas vivas do parasito (Basombrío et al. 1982, Basombrío and Arredes 1987, Paiva et al. 1999b).

Nos anos 1990, a linhagem não patogênica, CL-14 do *T. cruzi* (clone da cepa CL Brener), foi utilizada para estudar a resposta imune do hospedeiro. Descobriu-se que essa linhagem prevenia a esplenomegalia e a ativação excessiva de células T, que são características da infecção pelo *T. cruzi* associadas à doença. Além disso, a exposição ao CL-14 induziu uma resposta imune protetora, com redução da parasitemia e aumento da sobrevivência dos animais, especialmente dependente das células T CD8+. A vacinação com CL-14 também reduziu a ativação excessiva das células T CD4+ e CD8+ após o desafio. Os resultados sugerem que uma resposta imune regulada e dependente de células T CD8+ está associada à proteção contra a doença na infecção pelo *T. cruzi* (Paiva et al. 1999a, 1999b). No entanto, ainda é uma preocupação o fato de uma vacina viva atenuada poder desencadear uma infecção e doença completas em indivíduos imunocomprometidos, sendo mais recomendado para o uso veterinário (Sánchez-Valdéz et al. 2015).

Avanços em técnicas bioquímicas e moleculares permitiram a seleção de proteínas e epítomos imunogênicos do *Trypanosoma cruzi* para testar sua capacidade de induzir resposta imune protetora (Cazorla et al. 2009). Nas últimas décadas, muitos estudos têm explorado o uso de proteínas recombinantes, vacinas de DNA e vírus recombinantes como vetores para expressar proteínas do *T. cruzi*, visando obter uma resposta imune protetora contra a infecção (Garg and Tarleton 2002, Boscardin et al.

2003, Vasconcelos et al. 2004, Machado et al. 2006, Cazorla et al. 2009, de Alencar et al. 2009, Rios et al. 2019).

Adicionalmente, estudos de modelagem computacional reforçam que o desenvolvimento de uma vacina contra o *T. cruzi* seria economicamente viável e traria consigo vantagens significativas em termos de custos. Conforme evidenciado por Lee et al. em 2010, mesmo sob parâmetros rigorosos de simulação, incluindo um risco de infecção de apenas 1%, uma eficácia de tratamento de 25% e um custo de \$20 por dose, a viabilidade econômica da vacina é relevante (Lee et al., 2010; Lee et al., 2013).

Esses resultados fortalecem a perspectiva de que uma vacina preventiva ou terapêutica poderia possibilitar o controle da infecção e a prevenção da progressão da doença para sua forma sintomática. Além disso, indicam que o investimento em uma vacina contra o *T. cruzi* poderia acarretar vantagens econômicas e sociais consideráveis a longo prazo (Vázquez-Chagoyán et al. 2011, Quijano-Hernandez and Dumonteil 2011, Rios et al. 2019, Ramponi et al. 2023b).

No contexto do desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas, um candidato ideal de vacina deveria ser capaz de estimular a resposta dos linfócitos CD4⁺ Th1, um fator crucial na resposta imunológica contra o *T. cruzi*. Esse tipo de resposta, desempenha um papel importante na promoção da produção de anticorpos protetores, como as subclasses IgG1 e IgG3 em humanos. Somado a isso, a vacina também deve ser capaz de ativar as células T citotóxicas T CD8⁺, que têm a capacidade de eliminar células infectadas. Paralelamente, seria interessante que a vacina seja capaz de induzir uma memória imunológica duradoura. Isso não somente é crucial para a proteção contínua do hospedeiro, mas também reduz a necessidade de doses múltiplas da vacina (Rios et al. 2019, Camargo et al. 2022, Vuitika et al. 2022).

1.9 VACINAS DE DNA E mRNA

As vacinas de ácidos nucleicos são uma modalidade promissora de vacinas que utilizam material genético, como RNA (ácido ribonucleico) ou DNA (ácido desoxirribonucleico), para estimular uma resposta imunológica no corpo humano. Essas vacinas foram desenvolvidas para combater doenças infecciosas e, mais recentemente, ganharam destaque devido à sua rápida aplicação no combate à pandemia de COVID-19 (Wang et al. 2021). O mecanismo de ação das abordagens das vacinas convencionais constitui em inserir conjuntos de antígenos naturais ou recombinantes isolados para induzir uma resposta imune. Por outro lado, as vacinas de ácidos nucleicos são simplesmente sequências de DNAs plasmidiais ou mRNAs que codificam o antígeno de interesse sob o controle de um promotor de mamíferos e programam as células para expressar um fragmento ou uma proteína para desencadear a resposta imunológica (Liu et al. 2008, Wang et al. 2021, Gote et al. 2023).

A ideia inovadora de utilizar DNA como agente imunizante ganhou destaque em 1990, quando pela primeira vez, foi demonstrado de que o "DNA nu", ou seja, DNA plasmidial desprovido de agentes transfectantes, era capaz de induzir a expressão de proteínas ao ser injetado no músculo de camundongos (Wolff et al. 1990). Já em 1993, demonstrou-se que a imunização com um DNA plasmidial codificando uma proteína da gripe poderia proporcionar proteção em um modelo pré-clínico de camundongo contra o desafio da gripe (Ulmer et al. 1993). Com base nisso, diversos grupos começaram a desenvolver o uso de DNA plasmidial para vacinas, imunoterapias contra o câncer e intervenções imunológicas em doenças autoimunes e alérgicas (Revisado por Liu 2019).

A partir disso, os estudos com vacinas de DNA demonstraram segurança e eficácia convincentes em estudos pré-clínicos. Atualmente, nos Estados Unidos, várias vacinas de DNA estão licenciadas para uso veterinário em animais de grande porte, como cavalos, bem como em animais menores, como gatos e galinhas. Essas vacinas não apenas contribuem para a redução dos custos relacionados à vacinação de animais, mas também simplificam o transporte e a administração em comparação com as vacinas e tratamentos convencionais (Redding and Weiner 2009).

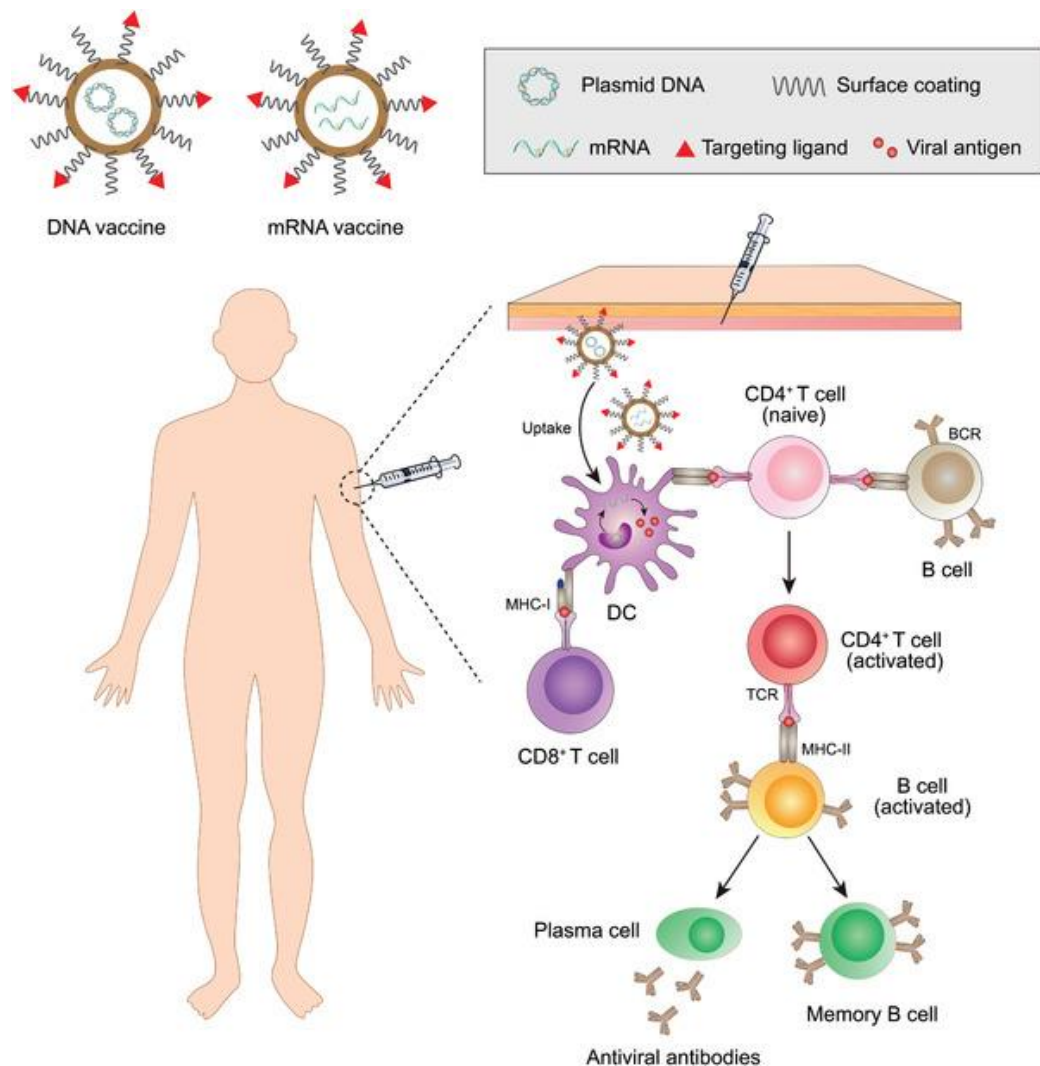


Figura 7. Esquema da estratégia de imunização com vacinas de nanopartículas de ácido nucleico. Após a administração das nanopartículas contendo pDNA/mRNA, elas são absorvidas por células locais ou células apresentadoras de antígenos (APCs). O ácido nucleico é liberado e processado para criar antígenos, que são apresentados por meio do sistema de complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e classe II (MHC-II). Isso leva à ativação de células T citotóxicas CD8+ e células T auxiliares CD4+, promovendo a imunidade mediada por células. Além disso, ocorre a ativação de células B, contribuindo para a imunidade humoral. DC refere-se a células dendríticas, e TCR a receptores de célula T. Retirado de (Ho et al. 2021). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adhm.202001812>. Acessado em (23/10/2023).

Além disso já existem várias vacinas baseada em DNA em estudos clínicos de fase II e III em humanos para várias doenças, tais como: zika (NCT03110770); HIV (NCT04826094); hepatite B (NCT01487876); hantavírose e febre hemorrágica (NCT02116205); covid-19 (NCT05102643), (NCT04655625); gripe (NCT01498718); herpes simplex (NCT02837575); alergias (NCT00346086); e vários tipos de cânceres (NCT04090528), (NCT01304524), (NCT00807781).

As vacinas de DNA são veículos de DNA, como plasmídeos bacterianos ou DNA de minicírculo, que podem ou não estarem associados a um carreador lipídico, e que contêm pelo menos um cassete de expressão eucariótica que codifica o antígeno de interesse. Os cassetes de expressão geralmente consistem em um promotor eucariótico, o gene do antígeno e uma sequência sinal poli (A), que são essenciais para a expressão do antígeno em células eucarióticas (por exemplo, células musculares) (Shafaati et al. 2022).

Diferentemente das vacinas de DNA, nas vacinas de mRNA as sequências não precisam entrar no núcleo para produzir proteína de antígeno, sendo a introdução de mRNA no citoplasma celular suficiente para submetê-lo à tradução ribossomal e produção de antígenos. Desse modo, as vacinas de mRNA possuem uma barreira de imunidade a menos para atravessar, o que aumenta a eficácia por dose (Liu et al. 2021). Apesar da molécula de mRNA ser mais instável que a molécula de DNA, as tecnologias recentes, como as nanopartículas lipídicas e adição da cauda poly(A) são responsáveis pelo sucesso das vacinas de mRNA recentemente aprovadas (Liu 2019, Liu et al. 2021).

Os avanços recentes na tecnologia, juntamente com a disseminação global do coronavírus pandêmico, desempenharam um papel crucial no desenvolvimento da tecnologia de vacinas de mRNA. Essa abordagem inovadora permitiu a aprovação e uso de imunizantes estáveis e altamente eficazes. Um exemplo notável são as vacinas de mRNA desenvolvidas para combater a pandemia da COVID-19, as quais utilizam sequências de mRNA para codificar epítomos imunogênicos da proteína spike (S) do vírus SARS-CoV-2 (Chu et al. 2021).

Ademais, o grande investimento em vacinas de mRNA na pandemia do coronavírus resultou em diversos estudos clínicos de phase II e III que estão em andamento. Contudo, outros estudos também estão sendo realizados em humanos para outros vírus e doenças, incluindo: influenza (NCT05624606); vírus nipah (NiV)

(NCT05398796); raiva (NCT03713086); cânceres (NCT06019702), (NCT04163094), (NCT00831467); varicela zoster (NCT05703607); resfriado, causado pelo vírus sincicial respiratório (RSV) (NCT05330975); zika (NCT04917861); doenças causadas por citomegalovírus (CMV) (NCT05575492) e tuberculose (NCT01669096).

Nessa plataforma de vacina o material genético de mRNA é transportado para as células por meio de veículos como nanopartículas à base de polímeros ou lipídios, que são responsáveis por proteger o material da degradação. Uma vez dentro das células, o mRNA é liberado no citoplasma celular onde irá instruir a produção da proteína (Chu et al. 2021). Os estudos mostram que as vacinas para COVID-19 têm a capacidade de estimular tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular. Resultando em uma resposta robusta do tipo Th1 mediada por linfócitos CD4+ e uma resposta citotóxica mediada por linfócitos T CD8+ (Sahin et al. 2020). A produção elevada de interferon-gama e interleucina-2 é observada como resultado desse processo (Sahin et al. 2020, Ganneru et al. 2021).

Esses sucessos abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas, inclusive para outras doenças infecciosas. No caso da doença de Chagas, por exemplo, novos caminhos estão sendo explorados, incluindo o uso de métodos promissores como as vacinas de DNA e mRNA (Versteeg et al. 2019, Maldonado et al. 2022). Tendo em vista que estas abordagens têm o potencial de estimular uma resposta imune celular eficaz.

Além disso, as vacinas baseadas em ácido nucleico apresentam diversas vantagens em relação às vacinas de proteínas ou organismos vivos. Por exemplo, elas contornam questões associadas às vacinas de proteínas recombinantes, como problemas de dobramento incorreto das proteínas ou altos custos de purificação e não apresentam os riscos inerentes de infecção associados a vacinas atenuadas ou inativadas que são produzidas a partir de microrganismos patogênicos vivos (Ho et al. 2021).

Adicionalmente, as vacinas de ácido nucleico, em alguns casos, dispensam adjuvantes tendo em vista que ácidos nucleicos exógenos têm a capacidade de estimular tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular e elicitar uma resposta Th1 (Acharya et al. 2020, Polack et al. 2020, Szabó et al. 2022). Outra vantagem adicional dessa categoria de vacinas é que modificações químicas podem ser feitas mais facilmente no DNA e no mRNA para melhorar a transfecção e a estabilidade, incluindo otimização do códon e/ou mutações pontuais (Ho et al. 2021).

1.10 PROTEASES COMO ANTÍGENOS VACINAIS

Nas últimas duas décadas, um melhor conhecimento da biologia e da bioquímica do *T. cruzi* permitiu a identificação de múltiplos alvos quimioterápicos para doença de Chagas. Dentre eles estão as proteases constituem os principais alvos promissores para agentes antiparasitários. As proteases desempenham múltiplos papéis tanto na biologia do parasito quanto na patogênese da doença, incluindo regulando as interações com o hospedeiro, tornando-as alvos potenciais atraentes para o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas contra a DC (Duschak and Couto 2009). Algumas proteínas, como a cruzipaina, proteína de superfície de amastigota (ASP)-2, trans-sialidase e proteína rod paraflagelar, mucinas, GP90 (90 kDa) e GP82 (82 kDa), proteína reguladora do complemento (CRP), proteína flagelar de ligação ao cálcio (FCaBP) e proteína de membrana cinetoplastídica (KMP) têm se destacado nesse contexto (Garg and Tarleton 2002, Boscardin et al. 2003, Vasconcelos et al. 2004, Machado et al. 2006, Cazorla et al. 2009, de Alencar et al. 2009, Rios et al. 2019).

A administração profilática de preparações vacinais contendo ASP2 e trans-sialidase suscitou resposta imune humoral e celular, além de reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevivência dos camundongos vacinados e desafiados com a cepa Y – do *T. cruzi*, com redução no percentual de animais com alterações elétricas em fase crônica de infecção (Machado et al. 2006, Haolla et al. 2009, de Alencar et al. 2009, Barbosa et al. 2013). Além disso, a vacinação com a estratégia do protocolo homólogo prime-boost com o rAd5 carreando sequências codificadoras de ASP2 e trans-sialidase do *T. cruzi* (rAdVax) reverteu as alterações elétricas, reduziu as alterações histopatológicas, como a fibrose cardíaca, e aumentou a sobrevivência dos animais infectados por diferentes cepas do *T. cruzi* (Pereira et al. 2015).

Nesse contexto, as proteases se evidenciam como moléculas de grande interesse na busca por novos medicamentos e vacinas para a DC. A caracterização funcional e molecular das proteases, bem como a investigação de sua capacidade de elicitar uma resposta imune protetora, as validam como alvos moleculares importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, com implicações significativas no combate à doença.

1.11 PROLIL OLIGOPEPTIDASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (POPTc80)

A Prolil oligopeptidase (POPTc80) é uma serino protease (família S9) que cliva peptídeos na região C-terminal após resíduos de prolina e de forma menos eficiente após alanina. O estudo dessa proteína, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou que essa protease cliva o substrato fluorogênico N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, o qual representa uma sequência conservada de colágeno, além de ser secretada principalmente por tripomastigotas, formas infectivas do parasito (SANTANA et al. 1997, Grellier et al. 2001b).

A partir de outro estudo foi demonstrado que inibidores específicos e seletivos da POPTc80 desenvolvidos pelo nosso grupo bloqueiam a entrada dos parasitos nas células não fagocíticas hospedeiras de mamíferos, sugerindo que a POPTc80 é um fator de virulência que facilita a entrada do parasito nas células hospedeiras, através da destruição de fibras colágenas presentes na matriz extracelular e na membrana basal (Santana et al. 1997, Vendeville et al. 1999, 2002, Grellier et al. 2001a, Bastos et al. 2005, de Almeida et al. 2016, Lasse et al. 2020). Adicionalmente, um estudo recente corroborou com esse achado a partir de um nocaute gênico no *T. cruzi*, onde observou-se uma redução drástica na capacidade infectiva dos parasitos mutantes (Lasse et al. 2020).

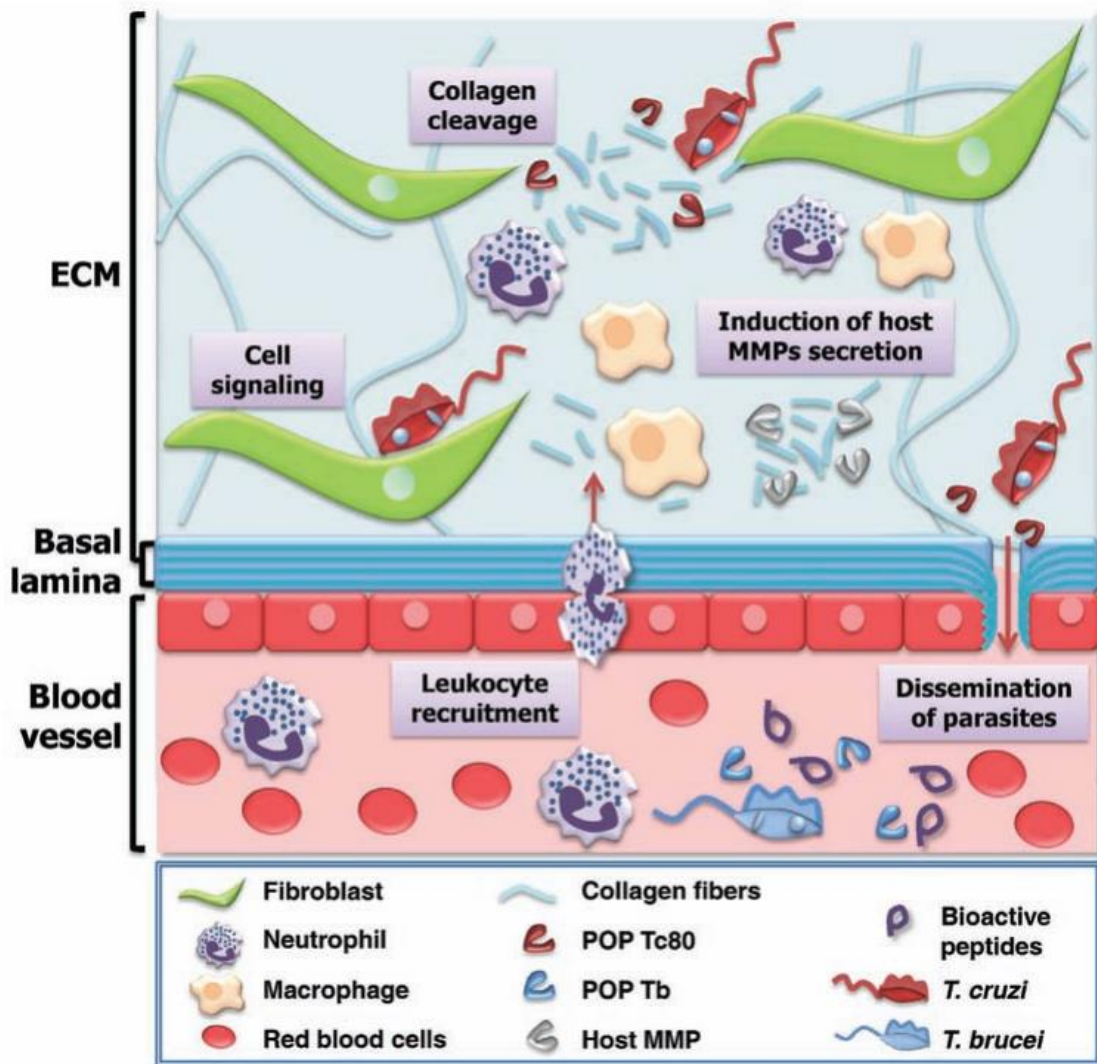


Figura 8. Possíveis efeitos da atividade da POP de tripanossoma no hospedeiro. A degradação do colágeno por POPTc80 pode facilitar a migração do *T. cruzi* através da matriz extracelular. Células imunes ativadas liberam MMPs que amplificam a degradação do colágeno e, juntamente com a POP, geram peptídeos quimiotáticos, aumentando o recrutamento de leucócitos. Além disso, POPTc80 pode hidrolisar o colágeno presente na lâmina basal, contribuindo para a disseminação dos tripomastigotas no sangue e no sistema linfático. Suspeita-se que POPTc80 também desempenhe um papel na sinalização celular que promove a invasão do *T. cruzi* nas células do hospedeiro. Retirado de (Bastos et al. 2013) Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3778648/>. Acessado em (23/10/2023).

Além disso, alguns estudos apontam que essa proteína tem uma alta homologia entre diferentes cepas, incluindo CL Brener, Tulahuen, SylvioX10/1 e Dm28c (Vendeville 2002, de Almeida et al. 2016, Bivona et al. 2018) um fator importante para o desenvolvimento de vacinas.

A literatura científica atual também demonstra que a vacinação com a POPTc80 recombinante é capaz de conferir uma resposta imune robusta e específica durante a fase aguda, com a proliferação de células T CD4+ polifuncionais específicas

para Tc80 e atividade linfocitária citotóxica contra um peptídeo Tc80 ligado a MHC-I, além da produção de citocinas Th1 (IL -2, IFN- γ e TNF- α) que são cruciais para o controle do parasito na fase crônica. Adicionalmente, todos os grupos imunizados com POPTc80 apresentaram menores taxas de parasitemia em comparação ao grupo controle e foram capazes de conferir proteção contra um desafio letal aos camundongos (Bivona et al. 2018). Todos esses achados apontam a POPTc80 como um bom candidato universal para uma vacina mono ou multicompetente. Entretanto, mais estudos são necessários para o desenvolvimento de uma vacina que forneça imunidade esterilizante contra o parasito.

1.12 THIMET OLIGOPEPTIDASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (TOP)

A Thimet oligopeptidase (TOP) é uma protease com aproximadamente 78.5 kDA, pertencente à classe das metalo-proteases por possuir um cátion bivalente no sítio ativo que direciona a clivagem da ligação peptídica como também estabiliza a própria proteína. Em alguns estudos já foi descrita a atividade de quebra de oligopeptídeos no citoplasma que vieram da degradação de proteínas no proteossoma (Silva et al. 1999). Vários estudos de proteômica têm mostrado que essa enzima se encontra sistematicamente em frações extracelulares do parasito, mesmo sem a presença de um peptídeo sinal, sugerindo que essa protease poderia estar envolvida em processos direto com a célula hospedeira (Cardoso 2021).

No que se refere a infecção causada pelo *T. cruzi*, as investigações sobre a função da TOP permanecem escassas, embora a sua caracterização bioquímica tenha sido realizada em um trabalho anterior (Cardoso 2021). Um aspecto conhecido, contudo, é que, durante a infecção pelo *T. cruzi*, as formas tripomastigotas liberam bradiginina, sendo principal substrato da TOP *in vivo*. Isso resulta na maturação de células dendríticas e no desencadeamento de uma resposta Th1 (Monteiro et al. 2007, Cardoso 2021). Adicionalmente, alguns estudos apontam a presença dessa proteína em secretomas ou na superfície do parasito, em várias fases distintas do seu ciclo de vida, mas principalmente na superfície de amastigotas (Bayer-Santos et al. 2013, Queiroz et al. 2014, Mandacaru et al. 2019). Sendo um candidato interessante para estudos de desenvolvimento de vacina, tendo em vista que é necessário a ativação de uma resposta específica para todas as morfologias do ciclo de vida do parasito. No

entanto, são necessárias pesquisas adicionais para aprofundar a compreensão das funções e propriedades dessa proteína.

2 JUSTIFICATIVA

Até o momento presente, as estratégias de controle da doença de Chagas se limitam ao controle do vetor e ao tratamento dos pacientes infectados. Embora essas abordagens tenham contribuído para reduzir a transmissão do patógeno, a presença de uma variedade de espécies relacionadas ao ciclo silvestre representa um risco constante para a transmissão da doença, tornando a eliminação completa da enfermidade praticamente impossível baseando-se somente nessas estratégias. Desse modo, novos medicamento e vacinas são necessários como estratégias alternativas que vise a cura e/ou prevenir a progressão dos sintomas.

Neste seguimento, essas informações somadas a falta de um tratamento eficaz para a doença de Chagas, justificam o objetivo central deste projeto. Nossa proposta é a criação de diferentes protótipos vacinais (Proteínas recombinantes, DNA e mRNA), usando as enzimas proteases Prolil oligopeptidase (POPTc80) e Thimet oligopeptidase (TOP) do *T. cruzi* como alvos. A escolha dessas enzimas se baseia na sólida experiência do nosso grupo de pesquisa no seu estudo. Além disso, entre o conjunto de moléculas com potencial para o desenvolvimento de vacinas para a doença de Chagas, essas proteases se destacam devido às características fundamentais que as tornam promissoras como alvos terapêuticos. Um entendimento mais aprofundado da resposta desencadeada por essas enzimas fortaleceria ainda mais sua validação como alvos de vacinas para a doença de Chagas, dado o papel crucial que desempenham no processo de infecção, na interação com o hospedeiro e na sobrevivência dos parasitos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir diferentes protótipos de vacinas profiláticas para a doença de Chagas, visando a realização de prova de conceito e avaliação das proteases Prolil Oligopeptidase (POPTc80) e Thimet Oligopeptidase (TOP) de *T. cruzi* como antígenos vacinais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir as proteases recombinantes da TOP e POP;
2. Imunizar camundongos e verificar a indução de anticorpos específicos para as proteínas;
3. Verificar a capacidade de produção de transcrição da POP a partir do plasmídeo pcDNA3_POP;
4. Nanoencapsular o mRNA transcrito, analisar as formulações e imunizar camundongos e verificar a indução de anticorpos específicos para as proteínas;
5. Otimizar o vetor para a transcrição *in vitro*;
6. Verificar a funcionalidade do plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc em células eucarióticas, *in vitro*, e em camundongos *in vivo*;
7. Clonar as proteínas de interesse no vetor pcDNA3.1_Neon/Luc para a transcrição da vacina de mRNA;
8. Verificar a capacidade de produção de proteína a partir do vetor pcDNA1.1_Neon_Luc *in vivo* em diferentes vias de administração;
9. Aumentar a infectividade da cepa infectante de CL Brener-LUC e analisar *in vivo*;
10. Imunizar os camundongos com os plasmídeos e verificar a indução de anticorpos específicos para as proteínas;

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas (2-3 meses de idade) foram adquiridas do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (UNB) e foram mantidos sob condições específicas em gaiolas contendo maravalha, ração e água fornecidas *ad libitum*. Os animais permaneceram acondicionados de forma a manter no máximo 5 animais por gaiolas de dimensão 300 x 200 x 130mm ou 10 animais em gaiolas de 414 x 344 x 174 mm. Eles foram mantidos em condições laboratoriais padrão em um ciclo claro/escuro de 12 horas de luz constante com a temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Para o enriquecimento ambiental, as gaiolas foram abastecidas com materiais limpos, como rolos de papelão ou PVC; algodão; papel picado; ou caixinhas de papel cartão; os materiais eram trocados e alternados a cada semana. Os procedimentos experimentais e de eutanásia foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e os camundongos foram manuseados de acordo com as políticas locais, estaduais e federais para o uso de animais em pesquisas. O projeto consta com a aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (SEI n.º 23106.015294/2021-24).

4.2 CULTIVO CELULAR

As células de rim de embrião Humano (HEK 293) e células HeLa foram obtidas do banco de células do Laboratório de Interação Patógeno Hospedeiro (LIPH) e mantidas em frascos de cultura adequados para cada experimento. Para o cultivo de ambas as linhagens celulares, foi utilizado meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de SFB. Além disso, foi adicionado antibiótico penicilina/estreptomicina 1% (v/v) ao meio de cultivo para prevenir a contaminação bacteriana e fúngica. Quando necessário, as culturas de células que atingia confluência próximas de 100% eram subcultivadas. Para isso, era feito lavagens com PBS para retirada do meio contendo o SFB e seguida de adição de solução Trypsina-EDTA (0,25%) (Gibco) para o desprendimento das células. As células eram contadas e plaqueadas novamente.

4.3 CULTURA DE PARASITOS

4.3.1 Epimastigotas

Para o cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* das cepas CL-Brener, Tulahuen e CL-Brener-LUC (Taylor and Kelly 2014) foi utilizado meio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado com Soro Fetal Bovino inativado (SFB) e antibiótico penicilina/estreptomicina 1% (v/v) em uma temperatura de cultivo de 28°C. Para o descongelamento dos epimastigotas, a concentração de SFB na cultura do parasito foi inicialmente mantida em soro suplementado com 20% (v/v) de SFB e, à medida que a cultura se estabelecia, essa concentração foi gradualmente reduzida para 5%. Além da penicilina e estreptomicina, para as cepas mutantes de CL-Brenner expressando a *red shifted luciferase*, foi adicionado o antibiótico de seleção G418 a uma concentração de 200 µg/mL.

4.3.2 Obtenção de tripomastigotas e tripomastigotas infectivos

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir da incubação de células HeLa com cultura de epimastigotas na proporção de 10-100 parasitos para 1 célula. Após aproximadamente cinco a sete dias de incubação em 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂, os primeiros tripomastigotas eclodiram das células hospedeiras e estes eram recolhidos, centrifugados a 2.000 g por 10 min e congelados em soro fetal bovino contendo 10% (v/v) de DMSO a -80°C. Uma parte dos tripomastigotas era utilizada para reinfetar novas células, enquanto outra parte era destinada à infecção de camundongos e às passagens subsequentes em camundongos não infectados. As passagens eram realizadas por meio da inoculação subcutânea de 100-200 µL de sangue contaminado na região dorsal dos animais. Após 14 dias, correspondendo ao pico da parasitemia, o sangue era analisado quanto à presença de tripomastigotas, e em seguida, retirado por punção cardíaca para dar continuidade às passagens e obtenção de parasitos infectivos. Esse processo era repetido até obtermos o número total de parasitos necessário para a execução dos experimentos.

4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.4.1 Expressão da POPTc80 em sistema de expressão procarioto

A proteína POPTc80 (GeneID:3552984) recombinante foi obtida a partir de expressão e purificação, seguindo um protocolo previamente estabelecido em um estudo anterior (BASTOS et al. 2005). Uma colônia derivada da transformação de *E. coli* da cepa BL21 DE3™ com o vetor pET15b/POPTc80 foi cultivada inicialmente em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) a 37°C, contendo ampicilina a uma concentração de 100 µg/mL, por aproximadamente 1 hr sob rotação de 220 rpm. Após o crescimento da colônia, 5 mL do pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer de 500-1000 mL até atingir uma densidade óptica (O.D) de 0,4 - 0.6 no comprimento de onda de 600nm. Em seguida, a cultura foi induzida com 0,5 mM de IPTG durante a noite a uma temperatura de 18°C. Após a indução, a cultura foi coletada por centrifugação a 2.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado e o pellet congelado.

4.4.2 Expressão da TOPTc em sistema de expressão procarioto

Em um estudo prévio, a sequência da TOPTc (BCY84_06545) foi sintetizada e clonada no vetor pET100/DTOPO, além de que foi feito uma padronização da expressão e purificação dessa proteína. De forma análoga à purificação da POPTc80, três colônias de *E. coli* da cepa BL21-AI™ transformadas com o plasmídeo derivado da midipreparação foram cultivadas em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina, a 37°C, com agitação a 220 rpm, por 1 hora. O pré-inóculo foi então transferido para um Erlenmeyer contendo 500 mL de meio LB e cultivado nas mesmas condições mencionadas anteriormente até atingir uma densidade óptica (OD) de 0,4 - 0,6 a 600 nm. Em seguida, a cultura foi induzida com 0,5 mM de IPTG e 0,2% (v/v) de arabinose, por 16 horas, a uma temperatura de 20°C. Após os respectivos tempos de indução da expressão, as bactérias foram centrifugadas a 2.000 x g em centrífuga 5810 (Eppendorf) por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado a -20°C.

4.4.3 Purificação das proteínas recombinantes.

Os precipitados resultantes da centrifugação da indução foram ressuspensos em um tampão de ligação (Tris 50 mM e NaCl 400 mM, pH 8,0) e lisados usando 6 mL reagente BugBuster Protein Extraction Reagent® (Novagen), ao qual foi adicionado o coquetel de inibidores de protease Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 1X e Benzonase (Sigma) a uma concentração de 25 unidades/ μ L, agitando a amostra por 20 minutos. Os lisados obtidos foram centrifugados a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C para a separação das frações solúvel e insolúvel.

Após a lise, os sobrenadantes contendo as frações solúvel foram coletados e aplicados em colunas contendo matrizes de níquel-agarose Ni Sepharose™ High Performance (GE Healthcare Life Sciences), que possuem a capacidade de seletivamente reter proteínas marcadas com histidina através da cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC). As colunas foram previamente equilibradas com 3 volumes de tampões de ligação (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, pH 7.9), e a taxa de fluxo foi ajustada para 0,4 mL/min. Após a passagem das amostras, os extratos foram submetidos a lavagens utilizando 6 volumes de tampões de lavagem sem imidazol (0,5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9), seguidos por 10 volumes de tampões de lavagem contendo 5 mM de imidazol e 6 volumes de tampões de lavagem com 15 mM de imidazol.

Por fim, as proteínas foram eluídas utilizando os mesmos tampões de ligação, porém com duas diferentes concentrações de imidazol: 80 mM e 250 mM. As eluições foram coletadas em volumes de 500 μ L, resultando na obtenção das proteínas purificadas, as quais foram posteriormente submetidas à diálise e concentração utilizando unidades de filtro centrífugo Amicon® Ultra-4 (Millipore) em centrífuga refrigerada Sorvall ST40 R (Thermo Scientific), operando a 4000 rpm, 4°C, até que o volume da amostra reduzisse para 200-500 μ L.

Este processo foi repetido até a obtenção da quantidade total de proteína necessária para a execução dos experimentos subsequentes.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNA PURIFICADAS

A concentração das frações purificadas de TOPTc e POPTc80 foram quantificadas com o uso do equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer Quantitation* (Invitrogen) e do o kit *Qubit™ Protein and Protein Broad Range (BR) Assay Kits* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Esse método emprega um fluoróforo específico para proteínas, que se liga aos aminoácidos e emite fluorescência. Essa fluorescência é detectada pelo aparelho e calculada automaticamente com base em curvas padrão pré-programadas no Qubit, determinando assim a concentração da amostra.

4.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM SDS-PAGE

A fim de analisar a expressão das proteínas e os extratos proteicos do lisado de parasitos, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE).

Inicialmente, as amostras são aquecidas a 95 °C por 5 minutos em tampão de amostra *Laemmli buffer* 5X (2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0,002% (w/v) azul de bromofenol, 125mM Tris HCl, pH 6,8) na proporção 4:1. Em seguida, as amostras foram carregadas nos poços dos géis de poliacrilamida 10-12% e a eletroforese foi realizada em células de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis) (Bio-Rad), aplicando uma corrente de 120-140 V. Um gel foi produzido para análise por *Western Blot* (ver Secção 4.8) e o outro gel é corados com uma solução de coloração Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% (w/v), metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por 1h e descorado com solução contendo metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), até a visualização das bandas proteicas. O peso molecular das proteínas analisada foram estimadas por comparação com o padrão de massas moleculares *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen™) ou *BlueClassic Prestained Protein Marker* (Jena Bioscience).

4.7 PRODUÇÃO DE SORO ANTI-RPOPTC80 E ANTI-RTOP

Três camundongos da linhagem BALB/C foram submetidos a um processo de imunização intraperitoneal, recebendo quatro doses de 10 µg da proteína purificada e

concentrada, respeitando um intervalo de 15 dias entre cada aplicação. A primeira imunização foi realizada utilizando o adjuvante completo de Freund (Sigma), enquanto as duas imunizações subsequentes foram administradas com o adjuvante incompleto de Freund (Sigma), e por fim, foi inoculado 10 µg da proteína sem adjuvante. Sete dias após a última imunização, o soro dos camundongos foi coletado por punção cardíaca e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 3000 g por 15 minutos para separar o soro do restante dos componentes. Para preservação adequada, foi adicionado um volume igual de glicerol ao soro, que foi armazenado a -20°C.

4.8 ANÁLISES POR WESTERN BLOT.

4.8.1 Análise expressão de anticorpos específicos.

Para avaliar a produção de anticorpos específicos nos soros dos camundongos imunizados com proteína ou DNA plasmidial, foram obtidos extratos proteicos solúveis e insolúveis de epimastigotas em uma concentração de 1×10^8 células/mL. Esses extratos foram adquiridos após três ciclos de congelamento/descongelamento, na presença de um comprimido de coquetel de inibidor de protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). Em seguida, os extratos foram centrifugados a $16.000 \times g$ por 30 minutos em microcentrífuga Heraeus Fresco (Thermo Fisher) para separar as frações solúvel e insolúvel. Ambas as frações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% conforme descrito acima (ver Secção 4.6.)

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, foi realizado uma transferência das bandas para membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0,45 µm, GE Healthcare) utilizando um Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) e tampão de transferência Townbin (contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20% (v/v) de metanol e 0,1% (w/v) de SDS). A membrana foi previamente umedecida no tampão durante 5 minutos e a transferência foi realizada com uma corrente constante de 14 mA por 30 minutos.

Consecutivamente, a membrana foi corada com solução Ponceau (Ponceau-S 0,2% w/v; ácido acético 1%) por 1 min para a visualização das bandas transferidas. Após a certificação da transferência, a membrana foi bloqueada com *Tris Buffered Saline* (TBS – Tris 50 mM pH 7.5; e NaCl 150 mM) contendo 5% (w/v) de leite

desnatado por 1h temperatura ambiente ou 16h a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS brevemente para retirada do excesso de leite e incubada com o soro dos camundongos na diluição de 1:100 em TBS contendo 0,1% de Tween 20 (v/v) (TBS-T) e 1% de leite desnatado (w/v) por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve. Em seguida, realizou-se a lavagem da membrana com TBS-T, 7 vezes por 1 minuto cada lavagem. E por fim, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti-mouse/peroxidase (Goat Anti-Mouse IgG horseradish peroxidase conjugated – GAM) (Thermo Fisher Scientific) na diluição de 1:10.000 em TBS-T e leite desnatado 1% (w/v) por 1 h, sob agitação leve. A membrana foi novamente lavada nas mesmas condições descritas anteriormente e incorporou-se o substrato peroxidase Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, com a revelação por quimioluminescência no fotodocumentador ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences).

4.9 DESENHO DO PLASMÍDEO pCDNA3.1_NEON/LUC

O desenho do plasmídeo pCDNA3.1_Neon/Luc foi cuidadosamente planejado, com o objetivo de criar um vetor de expressão eficiente tanto para a produção da proteína desejada em células eucarióticas e modelos *in vivo* quanto para a produção do mRNA *in vitro*. Primeiramente, o plasmídeo pCDNA3.1 foi selecionado como o esqueleto básico e foi desenhado para conter as sequências de duas proteínas repórteres, PpyRE9h (*red-shifted humanised luciferase*) e mNeonGreen ([GenBank: AGG56535.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AGG56535.1)), interligadas por um linker.

Por fim, o desenho final da sequência de interesse foi enviado para a síntese *in vitro* na empresa especializada GenScript Biotech e após confirmação de todos os elementos por sequenciamento, o plasmídeo foi entregue liofilizado pela distribuidora de serviços FastBio.

4.10 TRANSFEÇÃO CELULAR

A transfecção das células HEK 293 foi realizada para introduzir DNA plasmidial exógeno a fim de verificar se a proteínas estava sendo expressa corretamente. Para esse experimento os plasmídeos (plasmídeo tati), que já é usado rotineiramente no laboratório, foi utilizado como controle positivo. As células foram mantidas em placas

de cultura de 96 poços até alcançarem uma confluência de aproximadamente 70-80%. A Lipofectamina 3000 *Transfection Reagent* (Invitrogen™) foi utilizada como reagente lipídico para a transfecção das células HEK 293, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, em um tubo de microcentrífuga, 720 ng de plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc ou do plasmídeo controle foi misturado com reagente diluído em meio de cultura sem SFB. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 5-10 minutos para permitir a formação do complexo lipídico-plasmídeo e em seguida foi adicionada suavemente nos respectivos poços contendo as células plaqueadas. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48 hrs e após o período de incubação, a eficiência de transfecção foi avaliada por meio de microscopia de fluorescência em um microscópio de confocal (nome).

4.11 CLONAGEM DAS PROTEÍNAS NO VETOR DE EXPRESSÃO

4.11.1 Amplificação dos genes de interesse

As amplificações, por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), dos fragmentos de DNA de aproximadamente 2000 pb, contendo as sequências codificadora dos genes da POP e TOP, foram realizadas a partir do DNA genômico de parasito da cepa CL-Bener de *T. cruzi* extraído utilizando o Kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Para isto, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados de forma complementar a sequência codificadora dos genes, contendo ainda um sítio artificial de restrição em cada extremidade (*HindIII* e *XhoI*) conforme apresentado na **Tabela 1**. As reações de PCR foram realizadas utilizando o reagente *Phusion™ Plus PCR Master Mix* (Thermo Scientific) seguindo as concentrações recomendadas pelo fabricante e foram realizadas sob as seguintes condições: primeira fase desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; fase de anelamento dos primers a 62°C por 30 segundos; fase de extensão a 68°C durante 1 minuto; e extensão final por 7 minutos a 68°C em um aparelho termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad).

Para confirmar a se a amplificação dos fragmentos foi bem sucedida, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH ~8.3) contendo 500 mg/mL de brometo de etídio. Ao término da eletroforese, as bandas de DNA correspondentes ao padrão de

migração dos insertos da POPTc80 (2094 bp) e TOPTc (2061 bp), foram purificados com o Kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA purificado foi então estimada através do Espectrofotômetro *NanoDrop® 2000* (Thermo Scientific) e em gel de agarose a 0.8% (w/v).

Tabela 1 Sequências dos primers utilizados para PCR

Genes	Primer	Sequência
POPTc80	Foward	5'-ccaaca <u>AAGCTT</u> <u>ATG</u> CGCAGCGTTTACCCGTT-3'
	Reverse	5-ctatgaa <u>CTCGAG</u> <u>TTA</u> CTCTTTCCACGAAGCATTG-3'
TOPTc	Foward	5'-attcta <u>AAGCTT</u> <u>ATG</u> AGGATGGCCCTGCGTATC-3'
	Reverse	5'-attcta <u>CTCGAG</u> <u>CTA</u> GACACCAATAGTTTTCAAGA-3'

4.11.2 Clonagem dos genes de interesse nos vetores de expressão

O inserto resultante da PCR foi digerido overnight com as enzimas de digestão Hind III e XhoI para a formação dos *overhangs* e purificado com o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega®). O plasmídeo pcDNA3/vazio ou pcDNA3.1_Neon/Luc também foi digerido com as mesmas enzimas ON e no dia seguinte todo o conteúdo da digestão foi corrido em gel de agarose 0,8% (w/v) para a separação da sequência contendo as proteínas e o plasmídeo. A banda correspondente ao plasmídeo foi purificada do gel usando o *Kit QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante. Por fim, o plasmídeo purificado foi incubado com o inserto na proporção de 3 insertos pra cada plasmídeo na presença da T4 ligase (Promega) a 37°C durante a noite.

4.11.3 Transformação de células competentes

Para a produção de proteínas recombinantes as bactérias competentes *E. coli* das linhagens BL21(DE3) ou BL21-AI foram incubadas com 20 ng/μL do vetor pet15b/POP e pET100/D-TOPO/TOP respectivamente. Enquanto para a obtenção de DNA plasmidial foram utilizadas as linhagens DH5alpha e/ou TOP10. Sucintamente, as bactérias competentes foram descongeladas no gelo por 30 min. Em seguida,

foram submetidas a um choque térmico a 42°C, por 45 s e imediatamente incubadas no gelo por 2 min. Em sequência, as bactérias cresceram em 900 µL de meio SOC a 37°C por 1h sob agitação constante de 250 rpm. As culturas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina. Depois de finalizadas placas foram identificadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 16 h.

4.12 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* E PURIFICAÇÃO DO MRNA

Inicialmente o plasmídeo pcDNA3/POPTc80 foi utilizado para a transcrição *in vitro* do mRNA. Posteriormente foi utilizado o pcDNA3.1_Neon/Luc que contém 5' e 3'UTRs e regiões de caudas poliA otimizadas para tradução da proteína de interesse. Para o processo de TIV, o plasmídeo foi linearizado com a enzima de restrição *Xho*I para o pcDNA3/POP e *Xba*I para o plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc. A reação foi incubada a 37° C durante a noite. No dia seguinte, a reação da digestão foi purificada para a remoção das enzimas de digestão com o kit ReliaPrep™ *DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega®) e analisada em gel de agarose 1%, a fim de analisar se o DNA havia sido digerido por completo. Essa etapa é importante tendo em vista que uma digestão incompleta pode gerar produtos de extensão desproporcional.

O mRNA foi transcrito a partir dos plasmídeos linearizados utilizando o kit *MEGAscript™ T7 Transcription Kit* (Invitrogen™). O kit fornece um plasmídeo modelo, pTRI-Xef, que além de ser um plasmídeo TRIPLEscript, ou seja, permite a transcrição de uma fita de DNA por qualquer uma das três RNA polimerases), vem linearizado e contém o gene de 1,85 kb do fator de alongação 1α de *Xenopus*. Tendo isso vista, o plasmídeo molde foi usado como controle da reação.

Os mRNAs foram purificados usando o Kit *MEGAClear* (Sigma-Aldrich) para remover contaminantes e RNAs de fita dupla, conforme as instruções do fabricante. Para análise dos mRNAs, toda água utilizada foi tratada com 0.1% (v/v) de Dicarbonato de dietila (*Diethyl pyrocarbonate* - DEPC) (Sigma) durante 40 minutos sob rotação e posteriormente foi autoclavada. Além disso, todo o local e material utilizados foram previamente descontaminados com a solução *RNaseZap™ RNase Decontamination Solution* (Invitrogen) e lavados com água tratada. Vale ressaltar que também foram utilizadas ponteiras com filtro e microtubos RNases free. Por fim, todos

os mRNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (w/v) e foram armazenados em freezer a -20 °C.

4.13 FORMULAÇÃO DOS MRNA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNPS)

As LNPs são compostas por combinação de lipídeos estruturais e catiônicos (colesterol, DPPC, DOTAP, polietilenoglicol), de acordo a preparação previamente descritas (Jayaraman et al. 2012, Maier et al. 2013). Os RNAm foram encapsulados usando um processo de automontagem no qual uma solução aquosa do mRNA proveniente da transcrição do pcDNA3/POP e do plasmídeo molde controle pTRI-Xef, em pH ácido, foi misturada com a solução lipídica dissolvida em etanol. As partículas carregadas com RNAm foram caracterizadas por tamanho, carga e potencial zeta e, subsequentemente, armazenadas a -80 °C. O processo de análise do encapsulamento foi realizado no laboratório de Genética e Morfologia em parceria com o professor João Paulo Longo, colaborador do projeto.

4.14 PRODUÇÃO DAS VACINAS DE DNA

4.14.1 Purificação do DNA

Para a produção das vacinas de DNA os plasmídeos pcDNA3.1_Neon/Luc, pcDNA3.1/POP e pcDNA3/vazio foram transformados em bactérias competente de *E. coli* da linhagem *One Shot Top10* (Invitrogen) e purificados pela técnica de midipreparação utilizando *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN). Após o processo de purificação, os DNAs foram quantificados no espectrofotometro *NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis* (Thermo Scientific™) e a doses foram ajustadas para conter 100 µg/dose em diferentes eppendorfs. Os eppendorfs contendo as doses foram secados a vácuo no *Thermo Speedvac Concentrator* (Savant) por aproximadamente 1 hora ou até estarem completamente secos. Ao final do processo de secagem, as doses foram identificadas e armazenadas em local seco e a temperatura ambiente.

4.14.2 Formulação das doses oral

Neste estudo, foram realizados testes para avaliar a formulação de doses de vacina oral. Três formulações diferentes foram investigadas, cada uma delas utilizando abordagens distintas na tentativa de aprimorar a entrega e a eficácia da vacina de DNA. Foi realizada uma emulsão de 100 µg do pcDNA3.1_Neon/Luc ou do plasmídeo controle, pcDNA3/vazio, com o agente de entrega lipídico Lipofectamina 3000 *Transfection Reagent* (Invitrogen™).

Outras abordagens testadas foram baseadas conforme as metodologias descritas na literatura (de las Heras et al. 2009, Ballesteros et al. 2015). Resumidamente, foi realizada uma emulsão de 50 µL da vacina (100 µg) com 50 µL da suspensão oral 100 mg/mL alginato de sódio e 20 mg/mL bicarbonato de potássio Lufta Gastropro (Reckitt Benckiser Healthcare). Na terceira formulação, a vacina foi encapsulada em microesferas feitas de alginato de sódio. Sucintamente, uma dose de 100 µg de DNA foram ressuspensos em 20 µL de água ultrapura autoclavada, em seguida misturadas em 70 µL de solução de alginato de sódio 2% (w/v). Com uma micropipeta microesferas de aproximadamente 0,5 µL foram dispostas na parede de um eppendorf de 1,5 mL. Ao final da montagem das microesferas, foi adicionado 500 µL de solução gelada CaCl 3% (w/v), previamente filtrada em membrana 0,22 µm, para a solidificação das esferas. As microesferas foram precipitadas por centrifugação a 3000 x g em centrífuga Z 326 K (Hermle Labortechnik) e lavadas em PBS. Ao final da lavagem as microesferas foram ressuspensas em 100 µL de PBS estéril, testadas para a cânula de gavagem e armazenadas em geladeira a 4° C.

4.15 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO

4.15.1 Teste de vias

Para analisar qual seria a melhor via de expressão da vacina foi realizado um teste de vias, o qual os camundongos foram imunizados com 100 µg de DNA purificado em diferentes vias de inoculação sendo elas: Intramuscular (i.m.), Intraperitoneal (i.p.), Intradérmica (i.d.), subcutânea (s.c.) e oral. Para os camundongos imunizados via intramuscular (i.m.) foram aplicados 100 µL do plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc no músculo tibial anterior em um volume de 50 µL

por pata. Enquanto para a via oral as vacinas foram inoculadas por meia gavagem para evitar a expectoração da formulação. A inoculação intradérmica consistiu na aplicação de 100 µL rente a pele do abdômen dos camundongos. Enquanto para a via intraperitoneal, a agulha foi inserida no quadrante inferior direito do abdômen do animal, com um ângulo de aproximadamente 30 graus em relação ao corpo do animal, até sentir que a agulha ultrapassou a parede abdominal. Por fim, a aplicação subcutânea foi aplicada na região dorsal do pescoço, com ângulo de aproximadamente 45 graus em relação ao corpo do animal;

4.15.2 Imunização com vacinas de DNA

Os camundongos foram imunizados com três a quatro doses de 100 µg dos plasmídeos pcDNA3.1/POP ou pcDNA3.1/TOP que codificam as proteínas. O DNA foi diluído em um total de 100 µl de PBS e inoculados por via intramuscular (i.m.) conforme descrito no item 4.15.1. Camundongos do grupo piloto foram inoculados de igual modo com os plasmídeos pcDNA3.1_Neon/Luc ou pcDNA3/vazio (controle negativo). Os grupos controles foram analisados quanto a bioluminescência emitida 24hr, 7 dias e 14 dias após cada imunização. Por volta de 24h antes das análises, aproximadamente 100-200 µl de sangue de cada camundongo foi coletado pela veia submandibular. Basicamente, um pequeno furo é feito na bochecha do animal com a agulha hipodérmica 21G e o sangue é puncionado. Ao final da coleta, a hemostasia foi realizada aplicando pressão com algodão no local da coleta.

Terminada as imunizações, os animais foram anestesiados com de 15 mg/kg Xilasina e 150 mg/kg Ketamina e eutanasiados por punção cardíaca, onde aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado de cada animal. Todos os sangues foram incubados a temperatura ambiente por 1 hora e centrifugado a 2000 x g por 10 minutos para a separação do competentes sanguíneos e coleta do soro. O soro coletado foi congelado a -80 até a sua utilização.

4.16 ANÁLISE DE BIOLUMINESCÊNCIA *IN VIVO*

Os camundongos inoculados com 1×10^5 de tripomastigotas da cepa Cl Brener-LUC obtidos conforme descrito no item 4.3.2 ou com o plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc (100 µg/camundongo) para os ensaios de expressão de Luc *in*

vivo, foram avaliados quanto a emissão de bioluminescência *in vivo*. Para isso, os animais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 200 μ L de D-luciferina (Thermo Scientific) a uma concentração de 150 mg/kg, e a bioluminescência foi avaliada usando o sistema de imagem *IVIS Spectrum* (Caliper Life Sciences). Os camundongos foram anestesiados em câmara de anestesia ventilada com 3% de isoflurano em oxigênio, e as imagens foram adquiridas 5 min após a injeção de D-luciferina ou durante 20 minutos após a injeção. A bioluminescência foi quantificada na região de interesse para obter os valores de fluxo total expressos em fótons por segundo (f/s) usando o software Living IMAGE (Caliper Life Sciences) (<https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/resources/in-vivo-imaging-software-downloads.html#LivingImage>). Os dados foram analisados por meio do software Prism GraphPad 8 (<https://www.graphpad.com/features>).

5 RESULTADOS

5.1 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os genes responsáveis pela codificação das proteínas Prolil oligopeptidase (POPTc80) e Thimet oligopeptidase (TOPTc) do *Trypanosoma cruzi* foram clonados previamente em vetores pET100 D-TOPO (Silva 2018, Cardoso 2021). Neste estudo, seguimos os protocolos previamente estabelecidos para expressão e purificação dessas proteínas. Após obter os plasmídeos POPTc80/pET100/D-TOPO e TOPTc/pET100 D-TOPO por meio da técnica de midipreparação. A partir disso, a proteína recombinante POP foi expressa na fração solúvel da linhagem bacteriana *E. coli* BL21(DE3), enquanto a proteína rTOP foi expressa na linhagem BL21-AI (DE3).

Ambas as proteínas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel, sendo eluídas com concentrações de imidazol entre 20 mM e 250 mM, a fim de obter uma purificação otimizada. As eluições foram coletadas em frações de aproximadamente 250 µl, e um total de 10 µL de cada fração foram coletados e aquecidos a 95° C com tampão de amostra Laemmli por 5 minutos e separados em gel de poliacrilamida. A partir da análise do gel obteve-se bandas no padrão de migração aproximada de 80 kDa e 77 kDa, confirmado que ambas as proteínas foram purificadas de maneira satisfatória (**Figura 9 e Figura 10**).

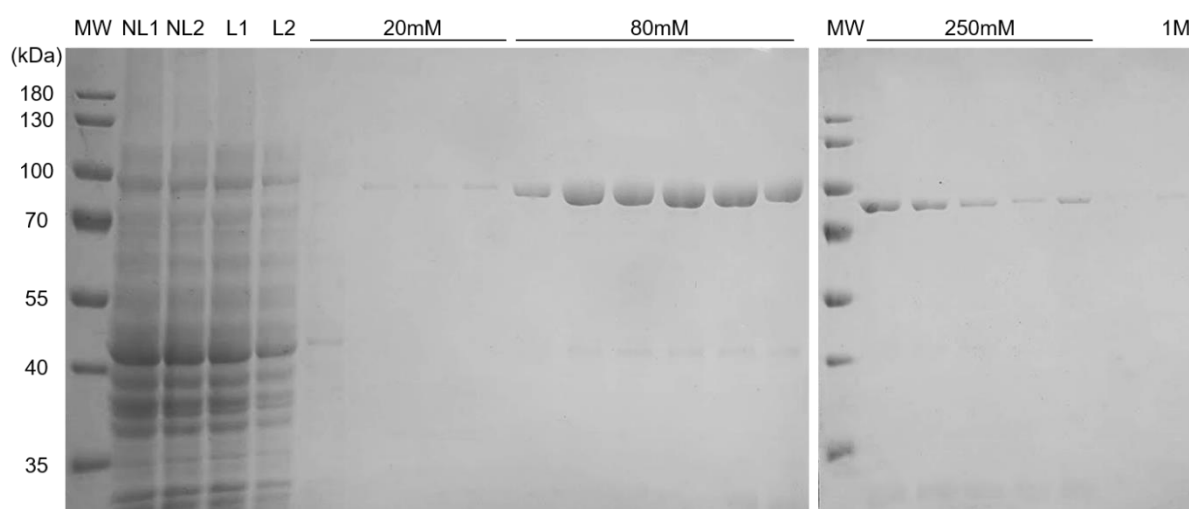


Figura 9. Análise da purificação da POPTc80 recombinante expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel. SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. NL1 – Não ligado primeira coleta; NL2 – Não ligado coleta final; L1 – Primeira lavagem 5 mM; L2 – Lavagem 5 mM final; 20 mM – Eluição: imidazol 20 mM; 80 mM – Eluição: imidazol 80 mM; 250 mM – Eluição: imidazol 250 mM; 1M – Lavagem coluna imidazol 1M; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa).

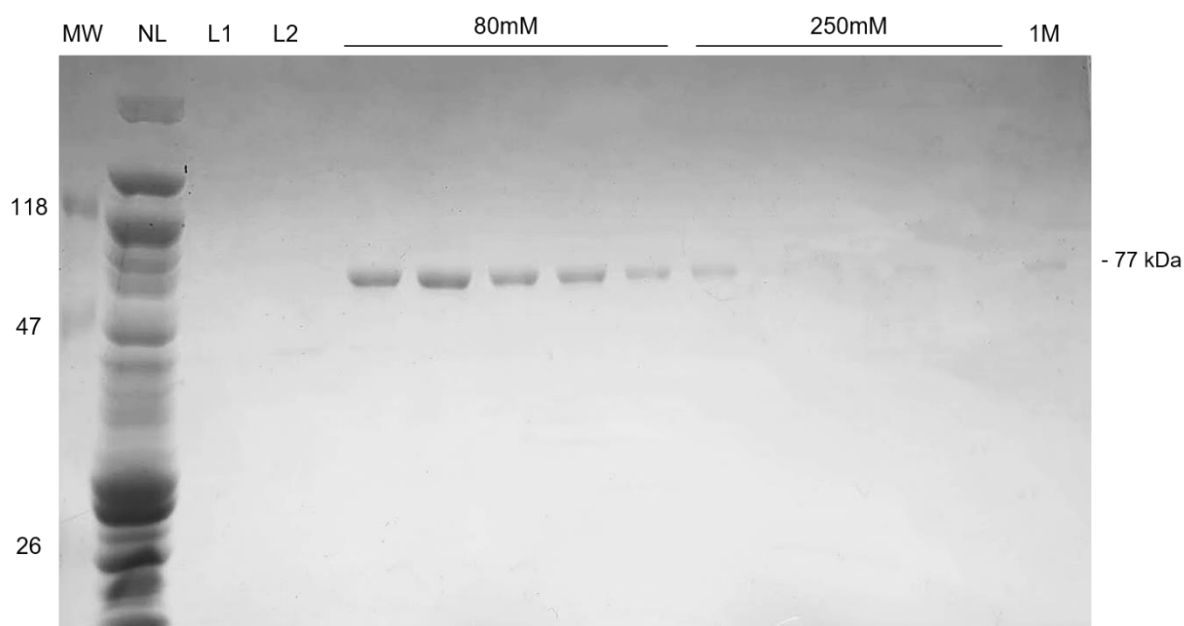


Figura 10. Análise da purificação da TOPTc recombinante expressa na fração solúvel por cromatografia de afinidade em níquel. SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. NL1 – Não ligado coleta final; L1 – Primeira lavagem 5 mM; L2 – Lavagem 5 mM final; 80 mM – Eluição: imidazol 80 mM; 250 mM – Eluição: imidazol 250 mM; 1M – Lavagem coluna imidazol 1M; MW – Marcador de peso molecular EZ-Run Prestained Protein Ladder, Fisher BioReagents™ (kDa).

Para confirmar que as bandas purificadas correspondiam realmente às proteínas de interesse, 10 µL da eluição foram analisados por *Western Blot* utilizando um anticorpo Anti-His específico para as caudas de histidinas presentes nas proteínas. A partir da análise, confirmou-se que as proteínas foram expressas corretamente (**Figura 11**). No entanto, é possível notar algumas bandas relativas à degradação da rPOPTc80 (**Figura 11A**) na faixa de tamanho entre 25-10 kDa. Vale ressaltar que todas as frações contendo a proteína purificada foram submetidas a diálise e concentração utilizando unidades de filtro centrífugo Amicon® Ultra-4, que removem produtos com peso molecular inferior a 30 kDa, resultando em uma fração mais pura da amostra.

No que diz respeito ao rendimento das proteínas, foi feita uma quantificação do concentrado fazendo o uso do *QUBIT* e obteve-se um total de 332 µg de POP purificada e 120 µg de TOP, as proteínas foram armazenadas em 4 °C até as subseqüentes imunizações.

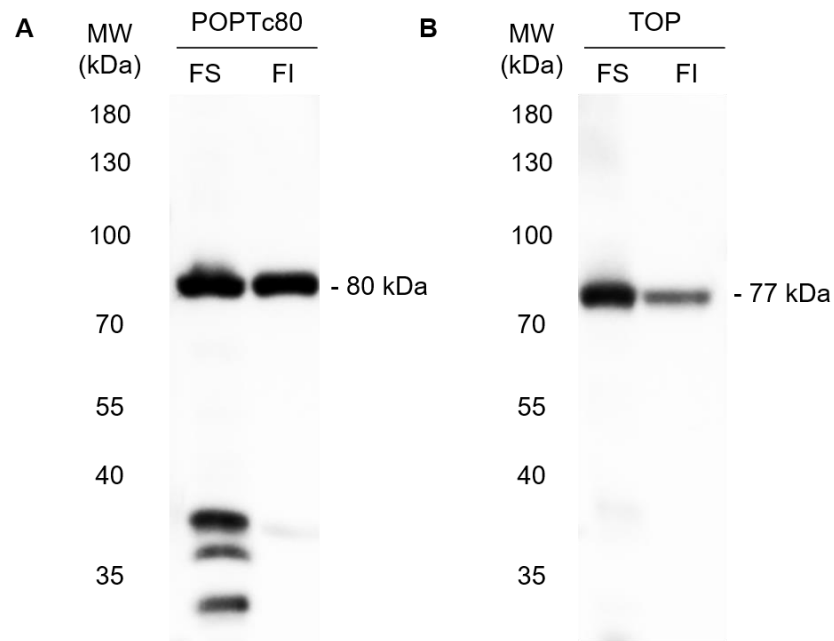


Figura 11. Confirmação da expressão das proteínas rPOPTc80 e rTOPTc. (A) Western blot da expressão da POPTc80 utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. Indução com IPTG 0,5 mM, 18°C por 16h em *E. coli* BL21(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa). (B) Western blot da expressão da TOPTc utilizando o anticorpo anti-His na diluição 1:2.000. Indução com IPTG 0,5 mM, 0,2% (v/v) de arabinose, 20°C por 16h em *E. coli* BL21-AI(DE3). FS – Fração solúvel; FI – Fração insolúvel; MW – Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen™ (kDa).

5.2 IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGO COM AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

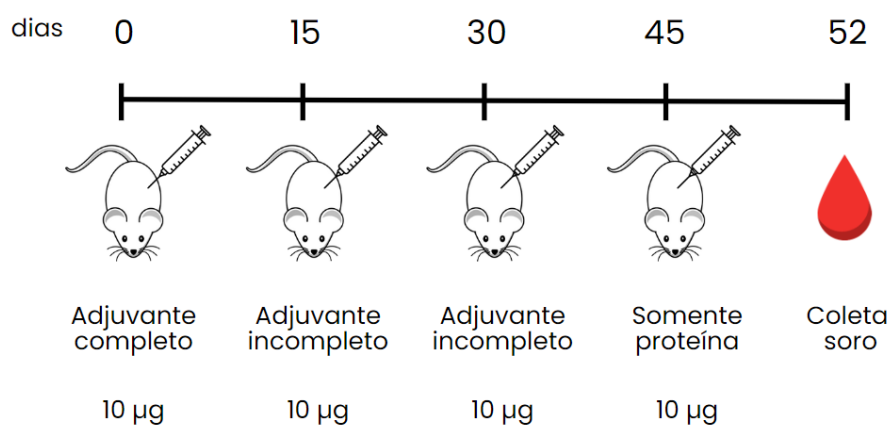


Figura 12. Fluxograma de imunização com as proteínas recombinantes TOP e POPTc80.

Grupos de 6 e 3 camundongos BALB/C foram imunizados com quatro doses de 10 µg da proteína POP e TOP, respectivamente, com intervalos de 15 dias entre cada dose. A primeira dose utilizou o adjuvante completo de Freund, seguido por duas doses com o adjuvante incompleto de Freund, e a última dose foi apenas a proteína, sem adjuvante. Sete dias após a última dose, o soro dos camundongos foi coletado e analisado. Os sangues dos camundongos imunizados foram coletados por meio de punção cardíaca, sete dias após a última dose de imunização. Os soros obtidos foram testados para verificar a presença de anticorpos que reconhecem as proteínas utilizadas nas imunizações. Para isso, realizamos um Western Blot após separação das amostras de proteína recombinante e frações solúveis e insolúveis do extrato de parasito da cepa CL Brener.

Um total de 6 soros foram obtidos das imunizações com a rPOP dentre eles, dois soros apresentaram expressão satisfatória de anticorpos específicos, sendo eles o soro 4 e o 6 (**Figura 13 D e E**).

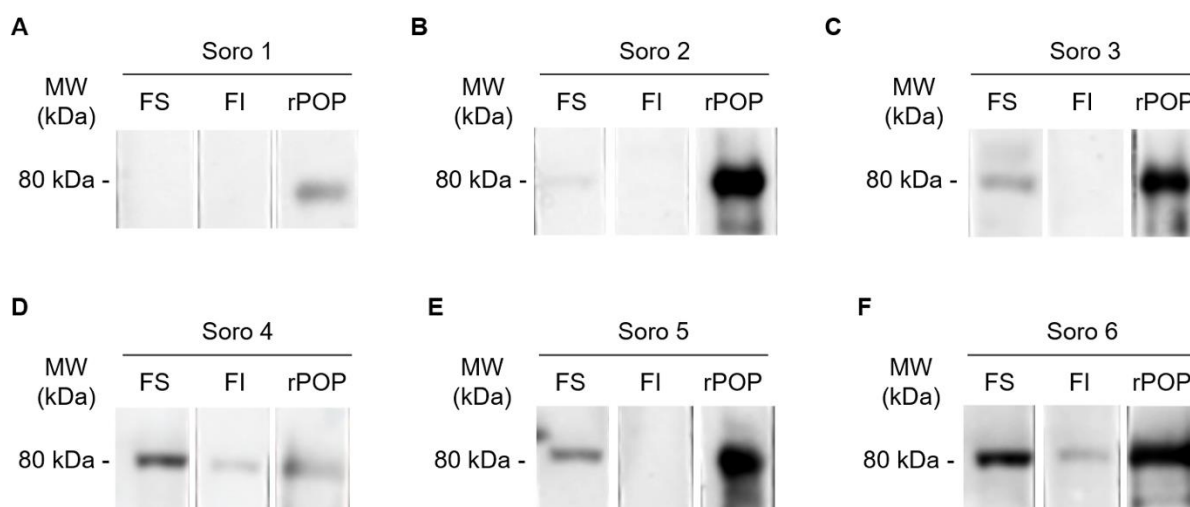


Figura 13. Análise da produção de soro anti-POPTc80 em extratos proteicos de epimastigotas e POP recombinante. Western blot soros dos camundongos imunizados com rPOP; FS – Fração solúvel extrato epimastigota CI Brener; FI – Fração insolúvel extrato epimastigota CI Brener; rPOP – POPTc80 recombinante purificada; (A) Soro camundongo 1; (B) Soro camundongo 2; (C) Soro camundongo 3; (D) Soro camundongo 4; (E) Soro camundongo 5 ; (F) Soro camundongo 6.

No que diz respeito aos soros provenientes dos camundongos imunizados com a proteína rTOP, todos eles apresentaram anticorpos específicos anti-TOP capazes de detectar a proteína de interesse. No entanto, os soros 2 e 3 demonstraram uma maior afinidade com a proteína recombinante e a proteína nativa dos extratos de parasito, conforme pode ser deduzido a partir da análise (**Figura 14**).

Curiosamente, na fração solúvel, observamos a presença de duas bandas evidentes, o que pode indicar a existência de diferentes isótipos da proteína expressa no parasito. Entretanto, é importante ressaltar que são necessárias investigações adicionais para obter um melhor entendimento desses resultados (**Figura 14**).

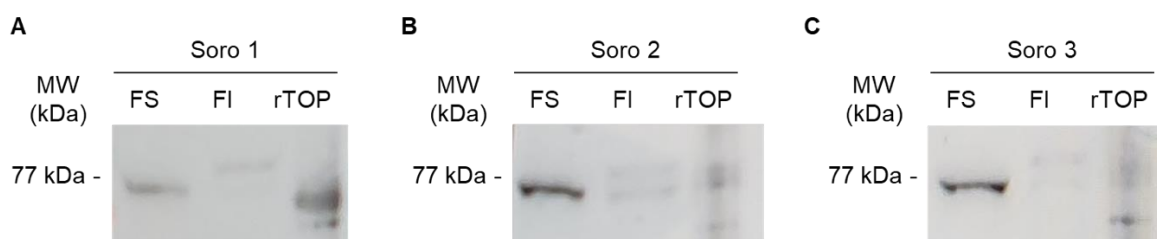


Figura 14. Análise da produção de soro anti-TOPTc em extratos proteicos de epimastigotas e TOP recombinante. Western blot soros dos camundongos imunizados com rTOP; FS – Fração solúvel

extrato epimastigota CI Brener; FI – Fração insolúvel extrato epimastigota CI Brener; rTOP – TOPTc80 recombinante purificada; (A) Soro camundongo 1; (B) Soro camundongo 2; (C) Soro camundongo 3.

Em conjunto esses resultados apontam que as proteínas de interesse são capazes de induzir uma resposta adaptativa e anticorpos específicos para as proteases. Entretanto mais estudos devem ser conduzidos a fim de investigar mais a fundo o tipo de resposta induzida e a sua capacidade de fornecer proteção contra uma infecção contra o *T. cruzi*.

5.3 CLONAGEM DO GENE DA POPTC80 NO VETOR PCDNA3

Inicialmente, o vetor de expressão pcDNA3 foi utilizado para avaliar a capacidade de transcrição do mRNA da proteína. Foi empregada uma estratégia de clonagem direta, na qual foram utilizados primers contendo, em suas extremidades, as sequências de enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI*. Os fragmentos de inserção foram gerados por PCR utilizando a DNA Polimerase Phusion Plus o qual possui uma taxa de fidelidade por volta de 100X maior que a enzima Taq convencional.

Tanto o produto da PCR quanto o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI* durante a noite. A digestão e purificação foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose (**Figura 15**). Posteriormente, ambos os produtos foram incubados na presença da T4 ligase a 4°C durante a noite. No dia seguinte 5 µL do produto da reação foi utilizado para transformar ambas as linhagens de *E. coli*, Dh5α e TOP10.

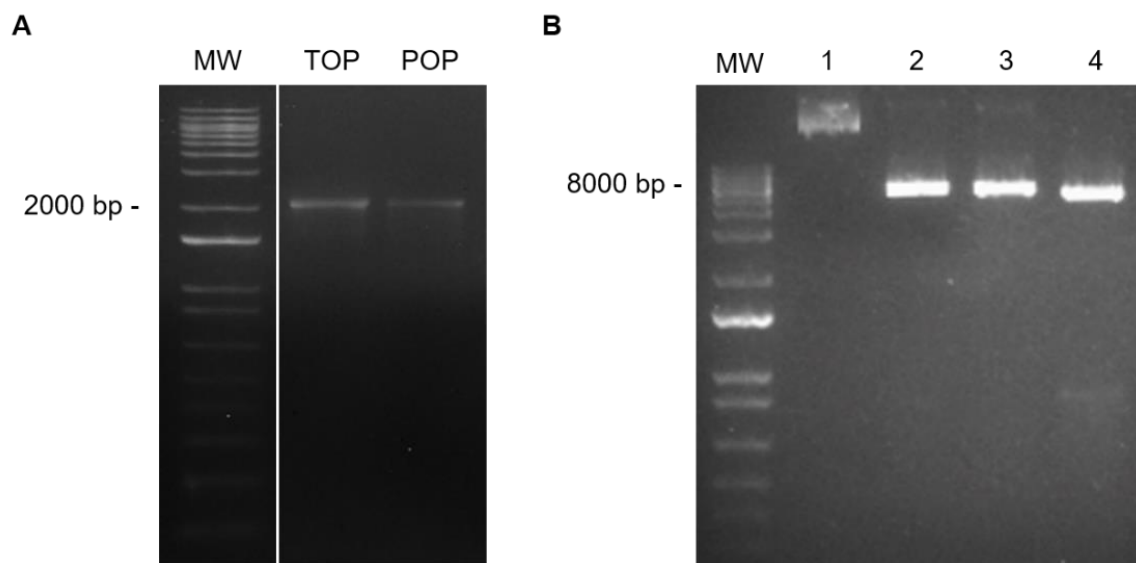


Figura 15. Análise da digestão dos insertos e pcDNA3/vazio. Gel de agarose 0,8% (A) produto da PCR do DNA genômico de *Cl. Brener* com os primers da TOPTc e POPTc80 após digestão com enzimas *Hind*III e *Xho*I, 37°C, 16h (B) Digestão pcDNA3/vazio; 1 – pcDNA3 não digerido; 2 – digestão com enzima *Hind*III; 3 – digestão com *Xho*I; 4 – digestão com enzimas *Hind*III e *Xho*I; MW – Marcador de Peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™ (bp).

Um total de 8 colônias da linhagem TOP10 resultaram desse processo de transformação com o produto da reação pcDNA3/POP, todas as 8 colônias foram subplaqueadas em uma nova placa e testadas para a presença do gene da POP por PCR. A partir das análises da PCR em gel de agarose todas as colônias se revelaram positivas para o gene de interesse (**Figura 16**). Contudo, a placa da linhagem DH5alpha transformadas com o produto da reação TOP/pcDNA3/vazio apresentou 6 colônias no total, porém nenhuma se apresentou positiva (**Figura 17**). Esses dados revelam uma clonagem bem sucedida para o gene da POPTc80 no vetor de expressão eucariótica, pcDNA3, entretanto depois de várias tentativas para a clonagem do gene da TOP no mesmo vetor, não foi possível obter uma clonagem bem sucedida deste gene.

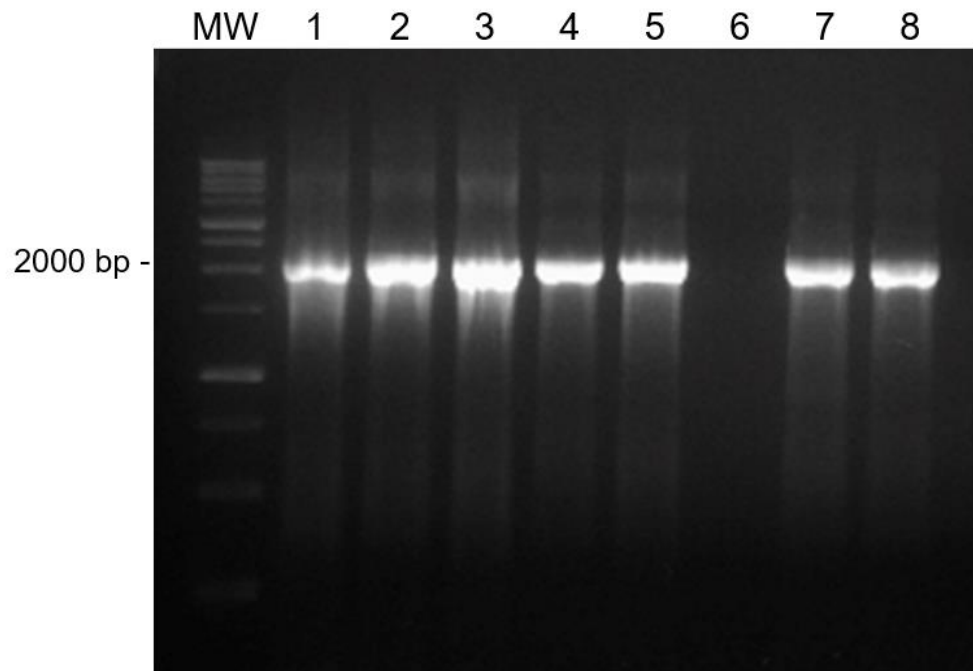


Figura 16. Análise das colônias positivas para POPTc80. Gel de agarose 1% da PCR das colônias obtidas a partir da transformação com a reação da clonagem do inserto da POPTc80 no pcDNA3; 1 – 8: colônias enumeradas; MW – Marcador De Peso Molecular 1 kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

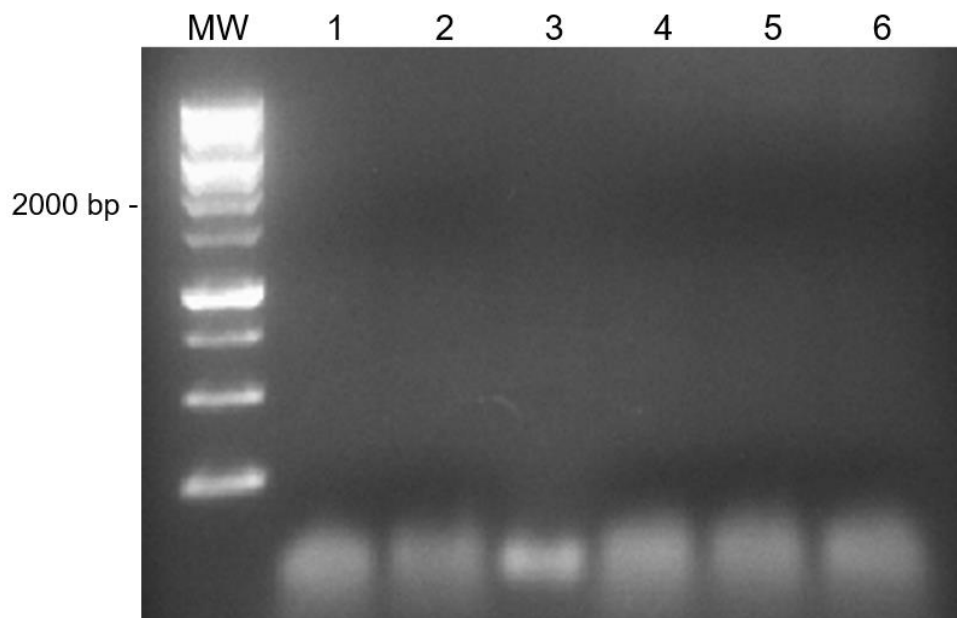
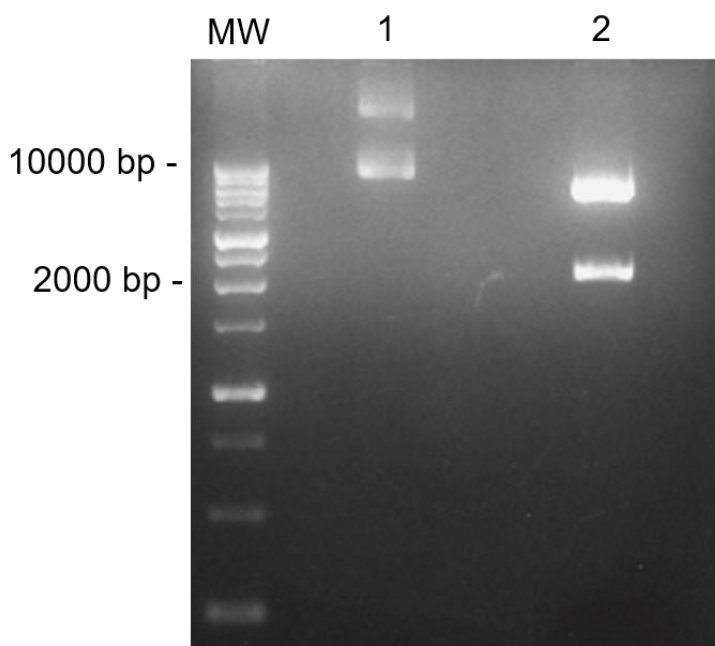


Figura 17. Análise das colônias para a presença do gene da TOPTc. Gel de agarose 1% da PCR das colônias obtidas a partir da transformação com a reação da clonagem do inserto da TOP no pcDNA3; 1 – 6: colônias enumeradas; MW – Marcador De Peso Molecular 1 kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

Desse modo foi utilizado a clonagem bem sucedida do gene da POPTc80 para a continuidade dos experimentos. Na data posterior a colônia 4 (**Figura 16**) da placa subplaqueada com as colônias positivas para pcDNA3/POP foi selecionada e cultivada em meio LB contendo o antibiótico de seleção. No dia seguinte as bactérias foram coletadas por centrifugação e foi feita uma extração do DNA plasmidial por midipreparação.

Para a confirmação da clonagem, foi feita uma análise de restrição utilizando as enzimas *Hind*III e *Xho*I. Como pode ser visto na **Figura 18**, a clonagem foi bem sucedida tendo em vista que a análise de restrição liberou o inserto no padrão de migração de 2000 bp que equivale ao tamanho esperando do inserto (2094 bp). Tendo isso em vista, o plasmídeo foi quantificado e armazenado em -20 °C até as futuras aplicações. Outras tentativas de clonagem foram realizadas para o inserto da TOP no pcDNA3, entretanto nenhuma obteve colônias positivas para a amplificação do inserto.



5.4 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

Em todas as etapas de produção e manipulação de RNA foi tomado o cuidado para evitar contaminação com RNases conforme descrito no item **4.12**. Para a produção dos RNAs mensageiros a transcrição *in vitro* foi realizada a partir do DNA linearizado após o final da sequência de interesse. O pcDNA3/POP foi linearizado com a enzima *Xho*I logo após a terminação da sequência da proteína. A TIV foi performada utilizando o kit *MEGAscript™ T7 Transcription Kit* seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi incubada em banho maria a 37 °C por 18 horas.

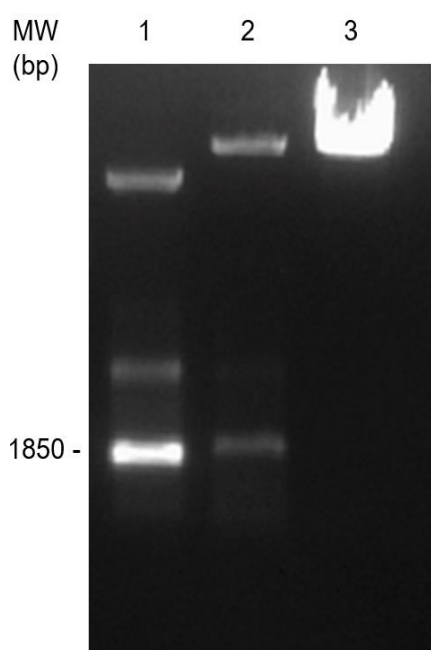


Figura 19. Transcrição *in vitro* pcDNA3_POP. Gel de agarose 0,8% (m/v) da TIV, ON, 37 °C; 1 – pTri-Xef (controle positivo fornecido no KIT); 2 – TIV pcDNA3_POP; 3 – confirmação da linearização do pcDNA3_POP com a enzima *Xho*I; MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, KASVI™ (bp).

Após a produção, os RNAs foram analisados em gel de agarose 0,8% (w/v). Embora tenha sido utilizado marcador de peso molecular (MW) para DNA, para averiguar o padrão de migração dos mRNAs transcritos, também se utilizou o padrão de migração do transcrito controle fornecido no KIT, que contém 1850 bp. Conforme nota-se nas análises a transcrição resultou em uma banda o padrão de migração aproximado de >1850 bp o que era esperado tendo em vista que a transcrição do gene da POP resultaria em um transcrito de um tamanho aproximado de 2000bp (**Figura 19**).

Após a transcrição do mRNA foi realizado uma purificação com kit *MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit*. Essa purificação consiste na retirada de proteínas, DNAs e de RNA de fita dupla (dsRNA) que são comuns em processos de TIV. A partir da análise do gel pode se ver uma diminuição expressiva da banda intermediária correspondente a RNA de fita dupla o padrão de migração maiores que 1850 bp (**Figura 21**).

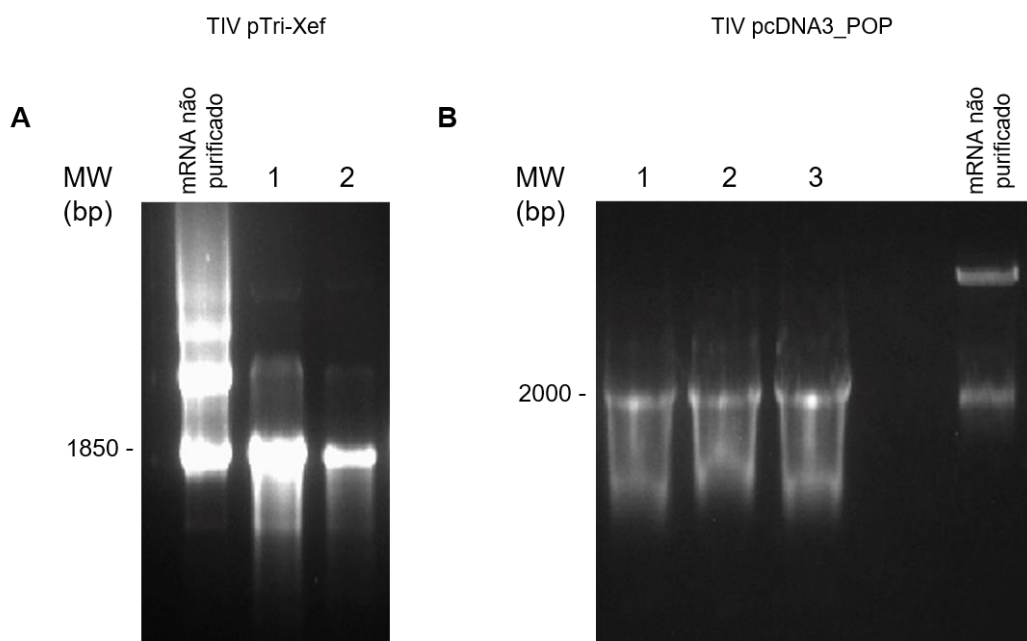


Figura 20. Análise purificação TIV com kit *MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit*. (A) Purificação TIV pTri-Xef. 1 – Eluição 1; 2 – Eluição 2. (B) Purificação TIV pcDNA3_POP, 1 – Eluição coluna 1; 2 – Eluição coluna 2; 3 – Eluição coluna 3.

5.5 NANOECAPSULAMENTO MRNA PURIFICADOS

Os mRNAs transcritos foram encapsulados em um processo de automontagem, no qual uma combinação de lipídeos estruturais e catiônicos (colesterol, DPPC, DOTAP, polietilenoglicol) e o mRNAs foram misturados em eilenmeyers de 20 mL enquanto rotacionavam com micros barras magnéticas.

Com as nanopartículas em nossa posse, a etapa de análise foi iniciada. O potencial zeta é uma medida que indica a carga elétrica e tamanho de partículas em suspensões coloidais, como nanocápsulas lipídicas. Ele é crucial para compreender a estabilidade das partículas na solução, sendo uma medida da interação elétrica entre elas. Um alto potencial zeta positivo ou negativo resulta em repulsão entre as partículas, evitando aglomeração e sedimentação. No caso das nanocápsulas lipídicas, o potencial zeta influencia sua dispersão e estabilidade, sendo fundamental

na otimização de formulações para aplicações como entrega de medicamentos e nanotecnologia farmacêutica.

As análises do potencial zeta das nanopartículas mostram que o processo de confecção das nanocápsulas resultou em partículas com tamanhos maiores que o esperado (100 nm), com tamanho aproximado de 200 nm quando dissolvidas em frações etanol/água, o que pode ser resultado de uma não evaporação adequada do álcool (**Figura 21**). Em relação à carga das nanocápsulas, estas apresentaram cargas entre 40 a 100 mV que condizem com os resultados encontrados na literatura, sendo o suficiente para manter a repulsão interpartículas e suspensões de partículas estáveis (Tenchov et al. 2021) (**Figura 21**).

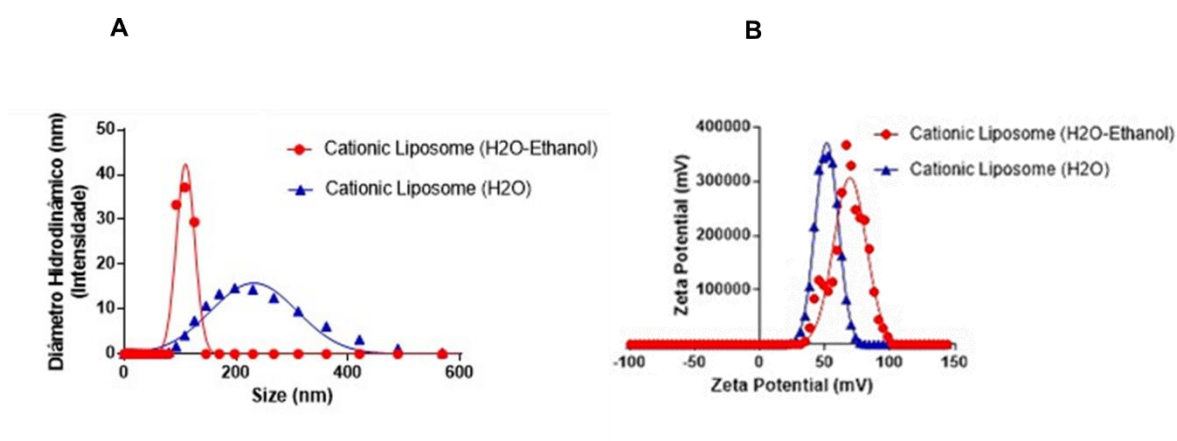


Figura 21. Análise do processo de nanoencapsulação. A) Diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas lipídicas. B) Potencial zeta das nanocápsulas lipídicas. Análises realizadas como técnica de Espalhamento dinâmico de luz ou (*Dynamic light scattering*) (Malvern Zeta Sizer).

5.6 OTIMIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE MRNA

Tendo em vista que as vacinas de mRNA, possuem algumas estruturas que são necessárias para garantir que o mRNA funcione como uma plataforma de vacinas (Yilmaz 2021), analisamos vetores e desenhamos uma sequência própria para funcionar como vacinas de DNA e mRNA. Para garantir a correta transcrição e estabilidade das sequências transcritas, a sequência das proteínas foram flanqueadas com UTRs (*Untranslated Regions*) de acordo com a sequência da vacina BNT162b2/BioNTech disponibilizada publicamente (WHO 2020). Sumariamente, um seguimento de RNA de alfa-globina humana com uma sequência de Kozak otimizada foi colocada a montante das sequências das proteínas, enquanto na região 5'UTR foi colocada uma sequência heterogênea dos genes intensificador amino-terminal da divisão (AES) e dos genes mitocondriais 12S RNA (**Tabela 2**).

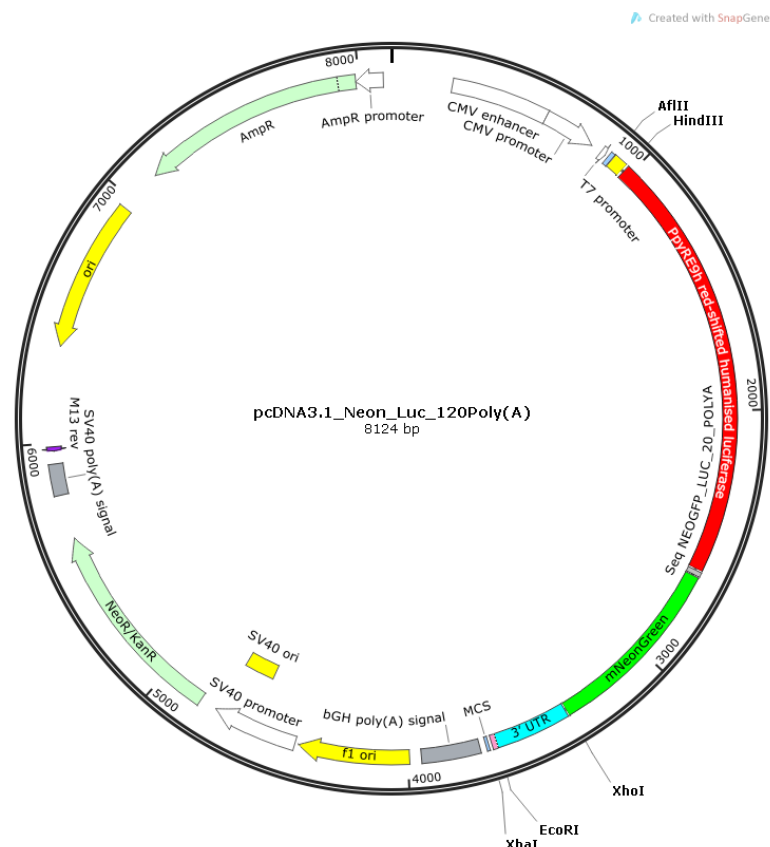


Figura 22. Representação do vetor de expressão eucariótica pcDNA3.1_Neon/Luc sequenciado – Os principais sítios de restrição estão indicados. CMV: promotor do citomegalovírus; bGH priming site e T7 priming site: primer para amplificação e/ou sequenciamento do inserto; polyA site: sequência sinal de poliadenilação; Ori: origem de replicação procariótica; AmpR: gene de resistência a ampicilina; NeoR/KanR: gene de resistência a Neomicina e Kanamicina. Mapa plasmídeo gerado por SnapGene.

Por fim, uma cauda de terminação poliadenilada (polyA) de 120A foi adicionada após a região 5'UTR a fim de auxiliar na estabilização do RNA mensageiro e aumenta a eficiência da tradução do gene em proteína. Conforme descrito anteriormente, para uma melhor visualização das funcionalidades do plasmídeo, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, duas proteínas repórteres conectadas por um linker, foram acrescentadas ao sítio de transcrição, a mNeonGreen e *redshifted luciferase*. Além disso, sítios de restrição convenientes foram inseridos nas regiões flangeadoras de cada sequência, conforme apresentado na

Figura 22, permitindo a clonagem das proteínas de interesse e manipulação adequada da sequência.

Ao final do estudo, o desenho final da sequência de interesse foi enviado para a síntese *in vitro* na empresa especializada *GenScript Biotech* e após confirmação de todos os elementos por sequenciamento, o plasmídeo foi entregue liofilizado pela distribuidora de serviços *FastBio*.

Tabela 2 Desenho de sequências pcDNA3.1_Neon/Luc.

Sítio	Sequência
5' UTR: RNA de alfa-globina humana com uma sequência de Kozak otimizada	^a 5' GAATAAACTAGTATTTCTTCTGGTCCCCA CAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC 3' ^{b c}
Linker	^d 5' ACCGCGGGCCCCGGGCAGCGCGACC 3'
3' UTR: O intensificador amino-terminal da divisão (AES) mRNA e o RNA ribossômico 12S codificado mitocondrial	^e 5' CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCT GCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCT CCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCA CCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTA GTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATG CAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCC CACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCA ATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACC CCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACAC CCTGGAGCTAGC 3' ^d

PolyA 120	^d 5' AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA 3' ^{d f}
-----------	--

^a A letra minúscula indica a sequência do sítio de restrição de *AflI*.

^b A letra minúscula indica a sequência do sítio de restrição de *BamHI*.

^c A letra minúscula indica a sequência do sítio de restrição de *HindIII*.

^d A letra minúscula indica a sequência do sítio de restrição de *XhoI*.

^e A letra minúscula indica a sequência do sítio de restrição de *EcoRI*.

^f A letra minúscula indica a sequência do sítio de restrição de *XbaI*.

5.7 CLONAGEM DOS GENES NO VETOR pCDNA3.1_NEON/LUC

O mesmo processo foi realizado para a clonagem das proteínas POP e TOP no vetor de expressão pcDNA3.1, que contém as sequências 3' e 5' UTR e os genes codificadores das proteínas repórteres, mNeonGreen e *redshifted luciferase*.

Primeiramente o DNA foi digerido com as enzimas *HindIII* e *XhoI*, corrido em gel de agarose 0,8% (w/v) para a separação das bandas no padrão de migração de 8000 bp e 2000 bp contendo o vetor digerido e o inserto respectivamente. Após

aproximadamente 1 hora de corrida a banda correspondente ao vetor pcDNA3.1 sem as proteínas repórteres foi cortado do gel e purificada.

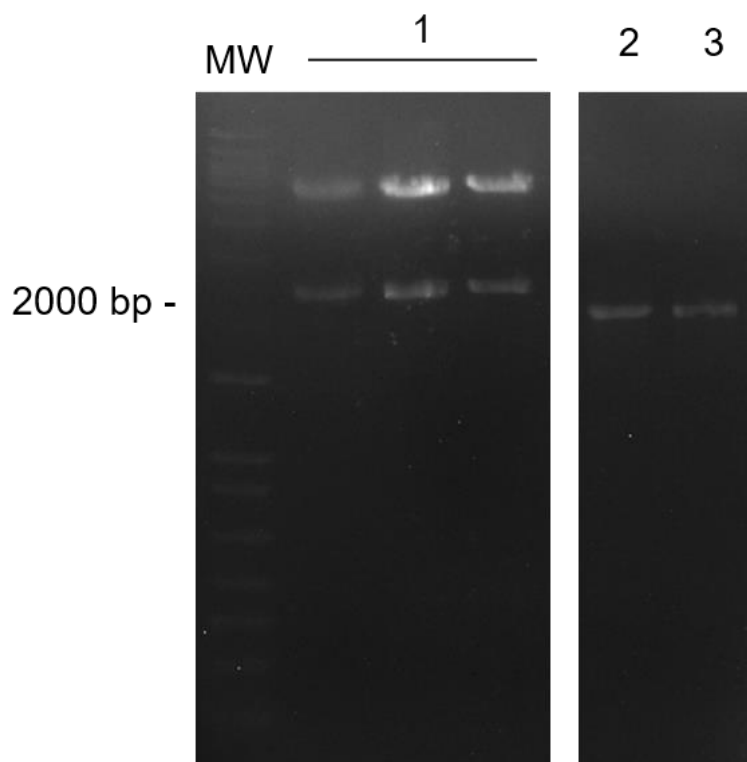


Figura 23. Digestão pcDNA_Neon_Luc e insetos TOP e POP. 1 – pcDNA_Neon_Luc digerido com enzimas de restrição *Hind*III e *Xho*I, ON a 37 °C. 2 – Inseto TOP; 3 – Inseto POP. MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

Foi realizado a incubação com os produtos de PCR, que foi realizado com a DNA Polimerase *Phusion Plus*, de cada proteína digeridos e realizada a transformação em bactérias *E. coli* da linhagem NovaBlue Singles™ (Novagem) ou One Shot Top10 (Invitrogen). Várias colônias resultaram da transformação, 10 colônias de cada placa foram subplaqueadas e analisadas. Conforme pode ser visto nas figuras abaixo um total de 5 colônias se apresentaram positivas para o plasmídeo pcDNA3.1/TOP e 10 colônias para pcDNA3.1/POP. As colônias 3 (TOP) e 4 (POP) foram selecionadas e cultivadas, o plasmídeo foi purificado e armazenado a -20°C. Por fim, foi feita a confirmação da clonagem dos genes de interesses por sequenciamento.

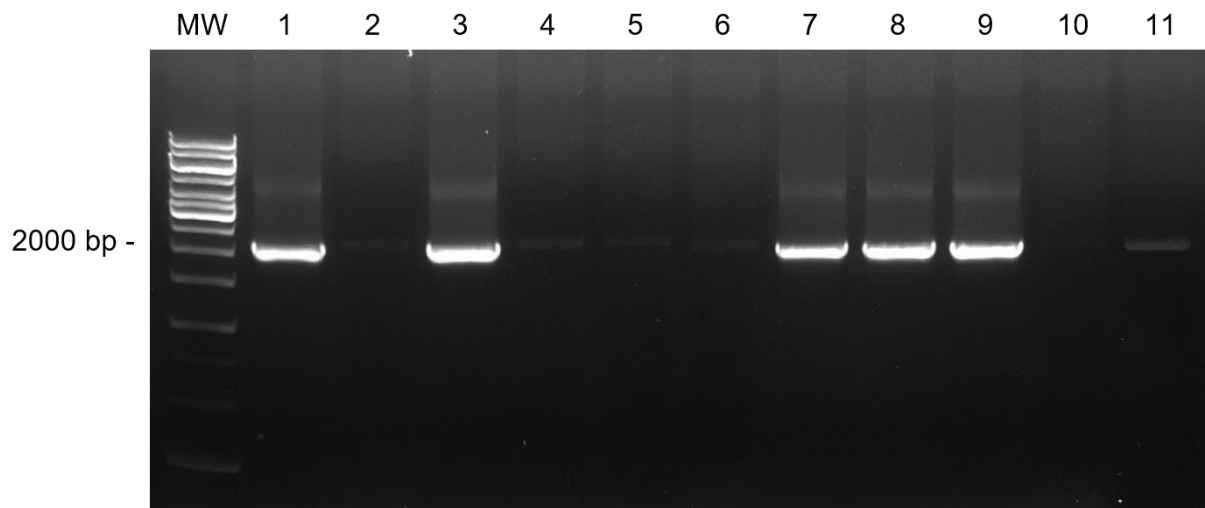


Figura 24. PCR para a verificação da clonagem do gene TOP no pcDNA3.1. Gel de agarose 1% da PCR das colônias obtidas a partir da transformação com a reação da clonagem do inserto da TOP no pcDNA3.1 otimizado para a TIV; 1 – 11: colônias enumeradas; MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

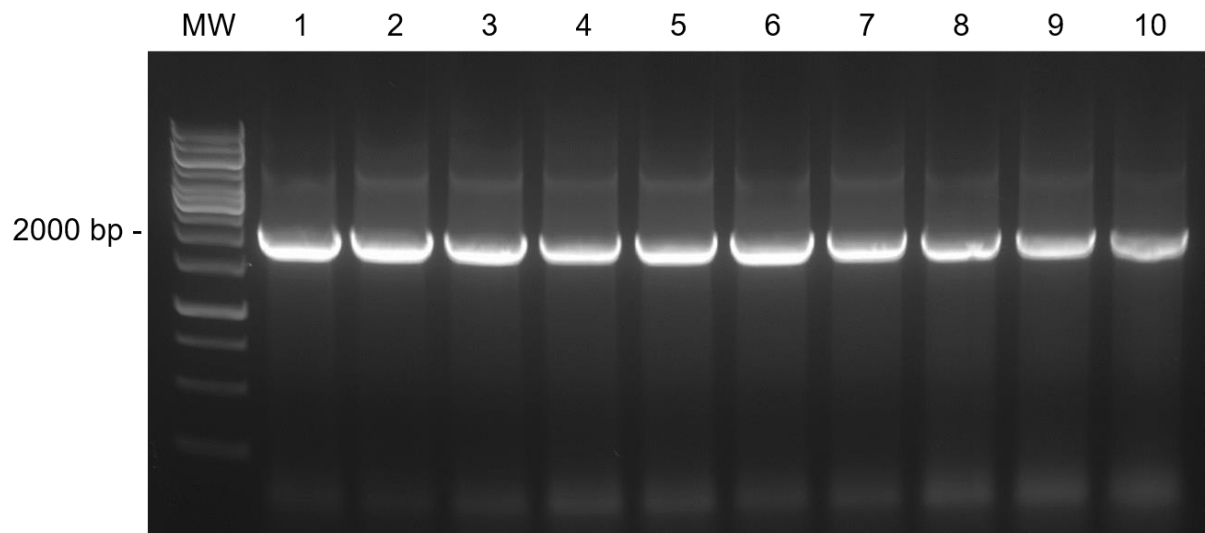


Figura 25. PCR para a verificação da clonagem do gene POP no pcDNA3.1. Gel de agarose 1% da PCR das colônias obtidas a partir da transformação com a reação da clonagem do inserto da POP no pcDNA3.1 otimizado para a TIV; 1 – 10: colônias enumeradas; MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

5.8 PRODUÇÃO DAS VACINAS DE DNA

A purificação do DNA das as vacinas foram realizadas de acordo com o descrito no item **4.14.1**. Inicialmente, apenas as doses de pcDNA3.1_Neon/Luc foram utilizadas a fim de verificar o se o DNA é capaz de produzir as proteínas repórteres que foram incluídas na sua sequência, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A integridade dos plasmídeos foi analisada por gel de agarose (**Figura 27**) e sua pureza foi determinada a partir de espectrofotometria, a partir da razão entre as leituras A260/A280 (Sambrook and Russell 2001). Todas as doses obtiveram uma razão A260/A280 satisfatória tendo em vista que todos as doses ficaram acima de 1.90 (**Tabela 3**).

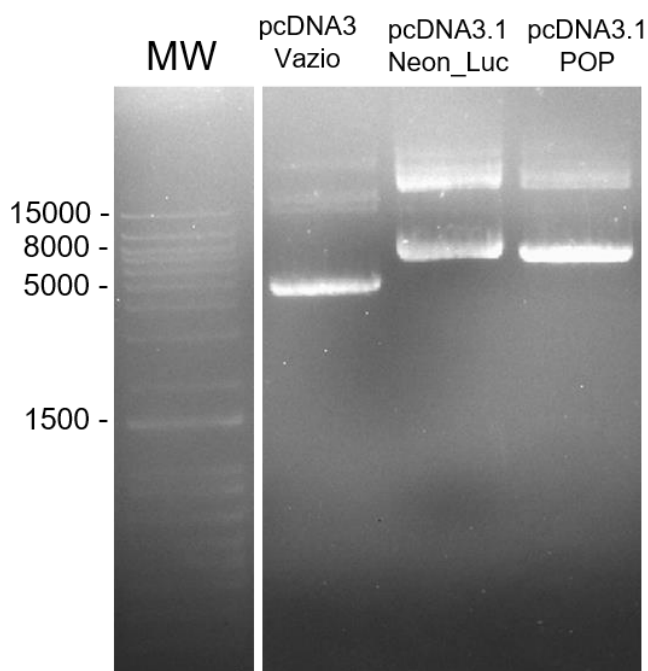


Figura 26. Confirmação da integridade dos plasmídeos. Gel de agarose 1% de 200ng dos DNAs purificados. MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

Além disso, três doses de cada DNA foram selecionadas aleatoriamente para realizar um controle de qualidade com o intuito de verificar se haveria algum tipo de contaminação cruzada entre as doses. Foi realizado uma PCR das doses selecionadas com os primers da POP, e como pode ser visto na **Figura 27** não teve

amplificação de DNA contaminante em nenhuma dose da vacina de pcDNA_Neon_Luc e pcDNA_vazio, apenas no controle positivo, pcDNA3.1/POP.

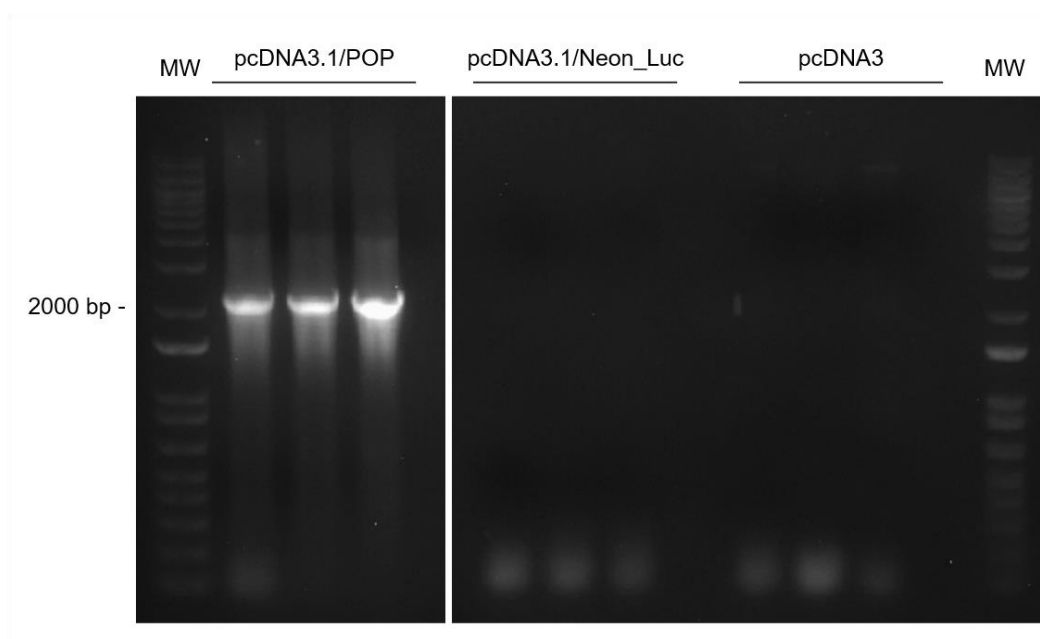


Figura 27. Controle de qualidade das vacinas. Gel de agarose 1% da PCR dos DNAs purificados utilizando os primers da POP a fim de verificar se haveria algum tipo de contaminação cruzada entre as doses. MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, K9-1000L, KASVI™ (bp).

Tabela 3 Controle de qualidade das doses de vacinas produzidas. Análise de 1 µL das doses por espectrofotometria no *Espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop™ One/One* do rendimento e pureza das doses.

Data	DNA	Reações	Rendimento Total	Rendimento/ Midi	A260/ A280	A260/ A230
08/03	Neon/Luc	4 midis	464 µg	116 µg	1.95	2.38
13/03	Neon/Luc	3 midis	350 µg	116 µg	1.90	2.29
15/03	Neon/Luc	5 midis	560 µg	112 µg	1.91	2.31
16/03	Vazio	5 midis	618 µg	123 µg	1.94	2.43
20/03	Neon/Luc	2 midis	212 µg	106 µg	1.91	2.31
21/03	Neon/Luc	4 midis	240 µg	120 µg	1.91	2.29
23/03	Neon/Luc	4 midis	598 µg	149,5 µg	1.90	2.31
24/03	Neon/Luc	2 midis	266 µg	133 µg	1.91	2.31
22/03	Vazio	4 midis	679 µg	169 µg	1.93	2.40
24/03	Vazio	2 midis	398 µg	199 µg	1.94	2.44
24/03	Vazio	2 midis	289 µg	144.5 µg	1.92	2.38

5.9 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293 COM PCDNA3.1_NEON/LUC

A transfecção do vetor pcDNA3.1_Neon/Luc em células HEK293 foi realizada, com o objetivo de introduzir o vetor construído contendo proteína repórter mNeonGreen e analisar sua expressão por meio da luminescência. O agente lisossomal *Lipofectamina 3000* foi empregado como agente transfectador que permeabiliza a membrana celular e nuclear e permite uma eficiente entrega do vetor às células. Após a transfecção, as células transfectadas devem ser incubadas em condições ideais, permitindo que o vetor seja assimilado e processado pelas células. A partir das análises de microscopia, nota-se que a mNeonGreen presente no vetor pcDNA3.1_Neon/Luc foi transcrito e traduzido pelas maquinarias celulares, resultando na produção de proteínas luminescentes.

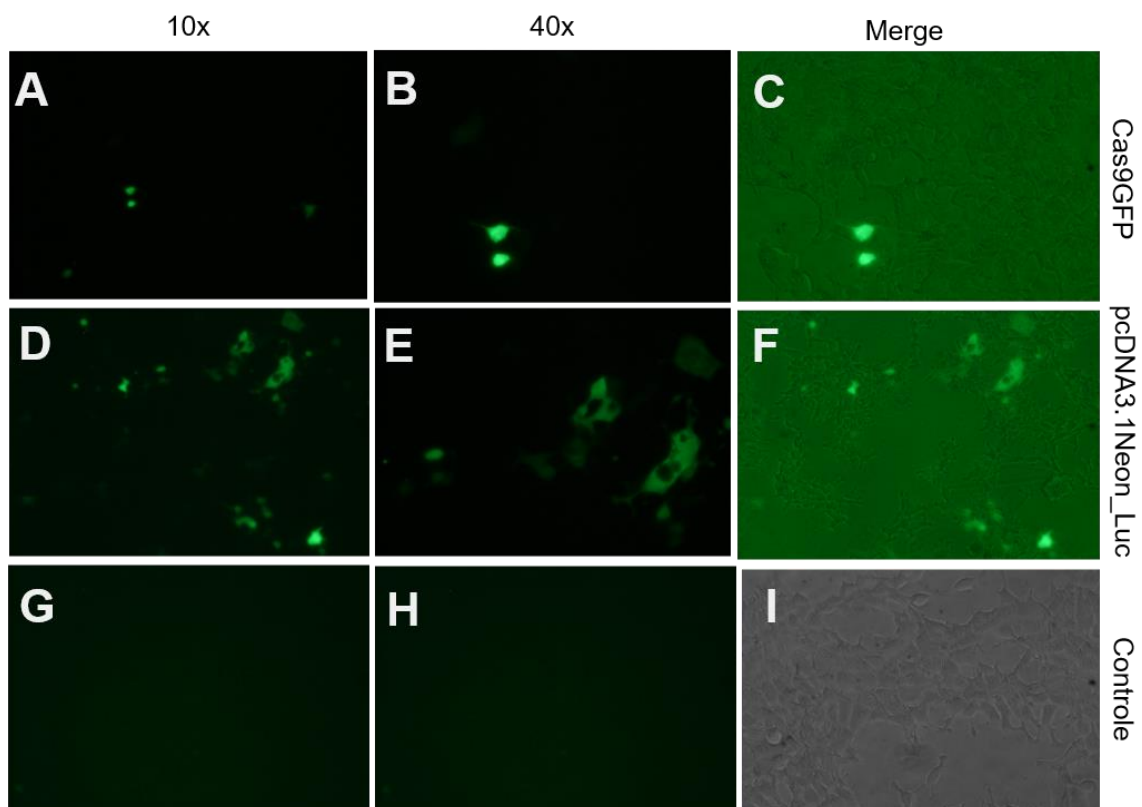


Figura 28. Verificação da funcionalidade do plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc. Resultado da transfecção das células HEK293 com o plasmídeo pcDNA3.1_Neon/Luc. (A) Campo claro de células transfectadas com pHR-scFv-GCN4-sfGFP-GB1-dWPPE (Addgene #60907) como controle positivo; B) Células transfectadas, com 48h; C) Células transfectadas na proporção de DNA (μ g):Lipofectamine (μ L) de 1:3, após 24 horas da transfecção; D). Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 0X e filtro azul (exceto campo claro) em microscópio de fluorescência invertido

Ao comparar as células transfectadas com o grupo controle, foi observado um aumento significativo na intensidade da luminescência emitida pelas células que receberam o vetor pcDNA3.1_Neon/Luc. Essa diferença permitiu concluir que a transfecção ocorreu de maneira satisfatória, tendo em vista que a expressão do gene alvo foi mais efetiva nesse grupo em particular.

Esses resultados promissores indicam a viabilidade e eficácia da técnica de transfecção e confirmam a funcionalidade do vetor pcDNA3.1_Neon/Luc em células, o que abre portas para futuras investigações e estudos relacionados à função e regulação do gene alvo.

5.10 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* DO PLASMÍDEO PCDNA3.1_NEON/LUC

Com o plasmídeo otimizado em mãos, foi realizado uma linearização do pcDNA3.1_Neon/Luc ao final da sequência da cauda de poli(A) com a enzima *Xba*I e realizado a transcrição com o KIT de transcrição *in vitro* utilizado anteriormente na transcrição do pcDNA3_POP. É possível ver uma banda de transcrição próxima ao padrão de migração do controle, entretanto é notável o decaimento da eficiência do KIT a partir do baixo rendimento da reação controle (**Figura 29**). Tendo isso em vista, não foi possível completar as próximas etapas de nanoencapsulação e transcrição dos demais vetores. Contudo, outras ferramentas já estão sendo estudadas para a continuidade do desenvolvimento dessa plataforma de vacina.

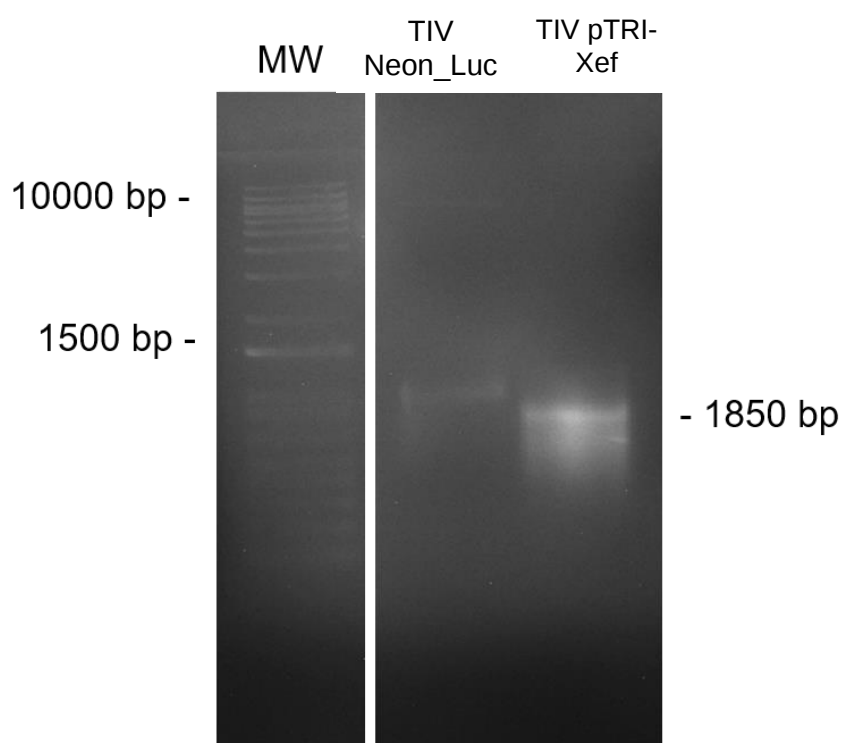


Figura 29. Transcrição *in vitro* pcDNA3.1_Neon_Luc Gel de agarose 0,8% (m/V) da TIV, ON, 37 °C; TIV pTRI-Xef – pTri-Xef (controle positivo fornecido no KIT); pcDNA Neon_Luc – TIV pcDNA3.1_Neon_Luc Linearizado com enzima XbaI; MW – Marcador De Peso Molecular 1 Kb, KASVI™ (bp)

5.11 ENSAIOS DE INFECÇÃO CL-BRENER-LUC

Concomitante a realização dos experimentos *in vitro*, foi realizada a padronização da bioluminescência *in vivo* com *Trypanosoma cruzi* conforme descrito no item 4.3.2. Para obter uma cepa altamente infetante dos parasitos CL-Brener LUC, foram realizadas passagens de parasitos em células HeLa até a obtenção necessária de tripomastigotas infectivos. Após esse processo foi realizadas passagens em camundongos com sangue contaminado, para uma garantia de infectividade em modelos *in vivo*. A infecção foi realizada por via subcutânea com a adição do substrato na região dorsal. A análise foi performed no Sistema de imagem *in vivo* IVIS Lumina XRMS durante 20 minutos após a aplicação do substrato.

Inicialmente, foi possível observar uma concentração significativa de parasitos em áreas que incluíam os linfonodos das articulações inferiores, na região anal e no coração. A infecção foi realizada por via subcutânea até a terceira passagem (conforme demonstrado na **Figura 32A**). A partir da 4ª passagem, os camundongos

foram infectados via injeção intraperitoneal (IP). Observou-se que a administração de luciferina diretamente no peritônio dos camundongos causava um rápido consumo do substrato, o que pode ser atribuído à alta concentração de parasitos (conforme ilustrado na Figura 7B). Portanto, as demais avaliações de bioluminescência *in vivo* foram realizadas com a administração do substrato por via subcutânea na região dorsal, permitindo uma visualização completa da distribuição do parasito no corpo do animal (conforme representado na **Figura 32C**).

Além das análises visuais da parasitemia *in vivo*, realizou-se a cinética da D-luciferina na décima terceira passagem onde atingimos uma alta capacidade infectiva dos camundongos. Os animais foram administrados via subcutânea com o substrato D-luciferina, e a bioluminescência foi analisada por 20 minutos (conforme mostrado na Figura 8). Foi observado um platô de atividade, seguido de um declínio após 20 minutos da administração.

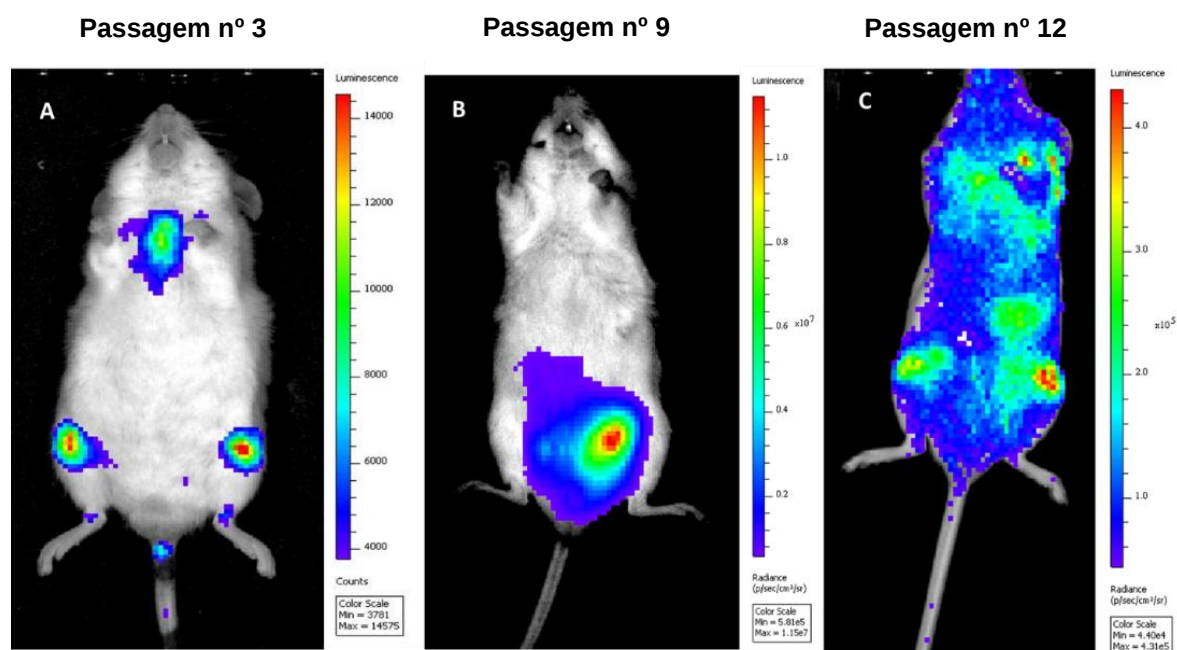


Figura 30. Infecção com *Trypanosoma cruzi* CL Brenner red-shifted luciferase. A – Infecção por via subcutânea na região dorsal Passagem nº 3. B – Infecção por via intraperitoneal 9ª Passagem. C - Infecção por via intraperitoneal 12ª Passagem, 7 dias pós infecção. D-luciferina (150 mg/kg) via intraperitoneal ou subcutânea.

Quando analisado em mesma escala (**Figura 31A**) não é possível verificar a concentração de parasito devido a essa alta taxa de bioluminescência. Entretanto, regulando a escala é possível verificar que há uma concentração de parasitos na região no abdômen/região genital e na região torácica do animal (**Figura 31B**). Esses

dados eram esperados tendo em vista que o *T. cruzi* apresenta um tropismo por tecidos encontrados nessa região, isso também ocorre devido ao intenso fluxo sanguíneo nessas regiões.

A partir das análises podemos notar que houve um grande aumento na taxa de parasitos, atingindo um pico de parasitemia no décimo quarto dia. Esses dados corroboram com os modelos experimentais de parasitos infectivos.

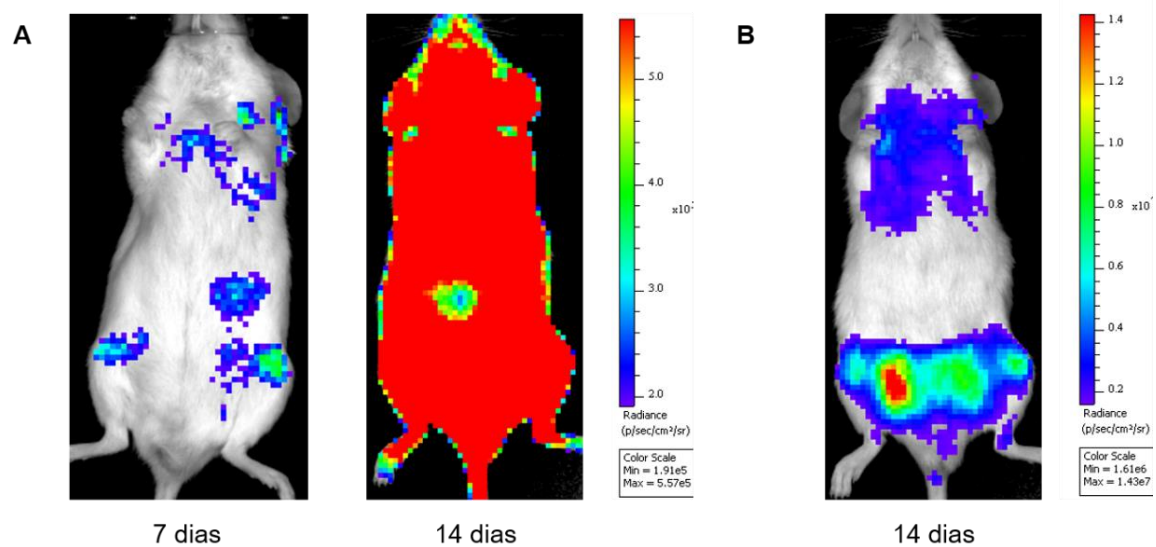


Figura 31. Camundongo infectado com *Trypanosoma cruzi* CL Brenner red-shifted luciferase. (A) camundongo 7 e 14 dias após a infecção na mesma escala de visualização. (B) camundongo após 14 dias de infecção em uma escala menor de visualização para a localização dos focos de infecção. 13ª passagem. D-luciferina (150 mg/kg) via subcutânea.

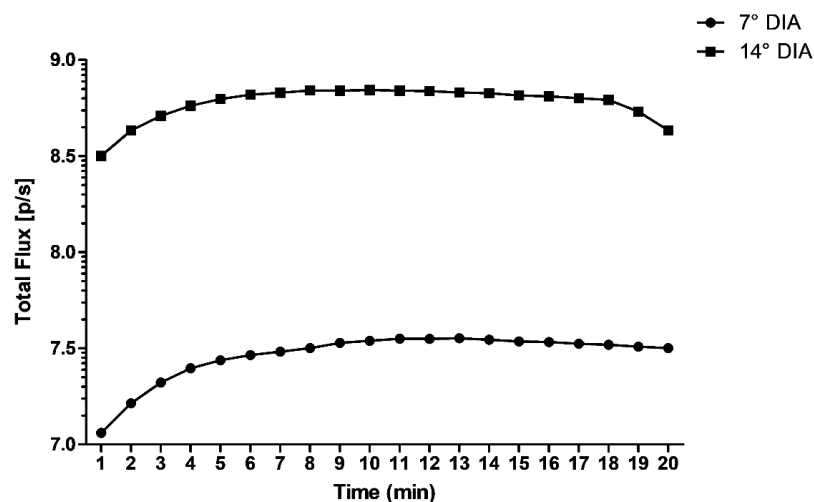


Figura 32. Cinética de atividade da D-luciferina em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* CL Brenner red-shifted luciferase. 13ª passagem. D-luciferina (150 mg/kg) via subcutânea.

A partir da análise da cinética da leitura dos animais infectados é possível ver que a luminescência se estabiliza após aproximadamente 5 minutos de leitura e não há picos consideráveis durante toda a leitura. O que serve de padronização das futuras leituras para os testes de proteção das vacinas.

Uma análise mais detalhada da biodistribuição do parasito no organismo do animal confirma que no pico da parasitemia da cepa CL Brenner (14 dias) é possível verificar uma concentração de parasitemia na região abdominal e torácica, que deve ser analisado nas análises futuras, para os demais ensaios de desafio letal com animais imunizados, a fim de analisar se esse padrão se altera com a imunização dos animais (**Figura 35**).

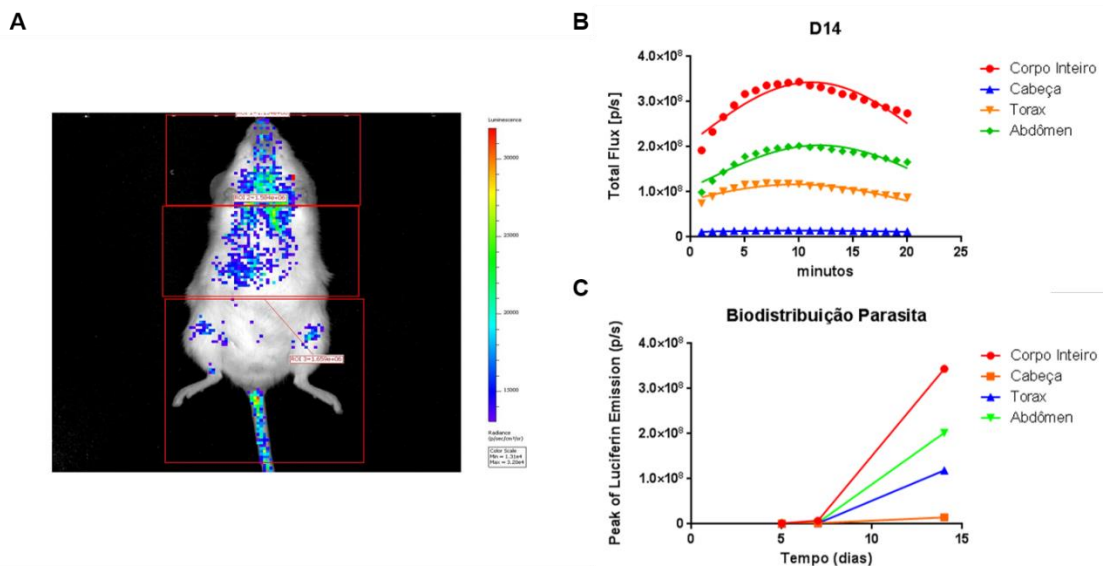


Figura 33. Análise da biodistribuição do camundongo infectado com *Trypanosoma cruzi* CL Brenner *red-shifted luciferase*. (A) camundongo 14 dias após a infecção. O quadro vermelho mostra a seleção de cada região - Corpo inteiro; Cabeça; Tórax; Abdômen (B) Gráfico mostrando a cinética de cada região durante 20 min de leitura. (C) gráfico mostrando o pico de fluorescência de cada região analisada.

5.12 VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO VETOR PCDNA3.1_NEON/LUC

Para averiguar se o vetor pcDNA3.1_Neon/Luc seria capaz de induzir a expressão da proteína repórter Luciferase *in vivo*, foi feito um piloto utilizando 2 camundongos Balb/c, fêmeas. Inicialmente os animais foram imunizados via i.m. As análises da bioluminescência *in vivo* demonstraram que a vacina foi capaz de ter uma expressão significativa da luciferase em comparação com o controle (**Figura 34**). Outro dado obtido das análises foi que o pico de emissão da luciferina é por volta de 4 a 5 minutos após a aplicação da luciferina (**Figura 34B**).

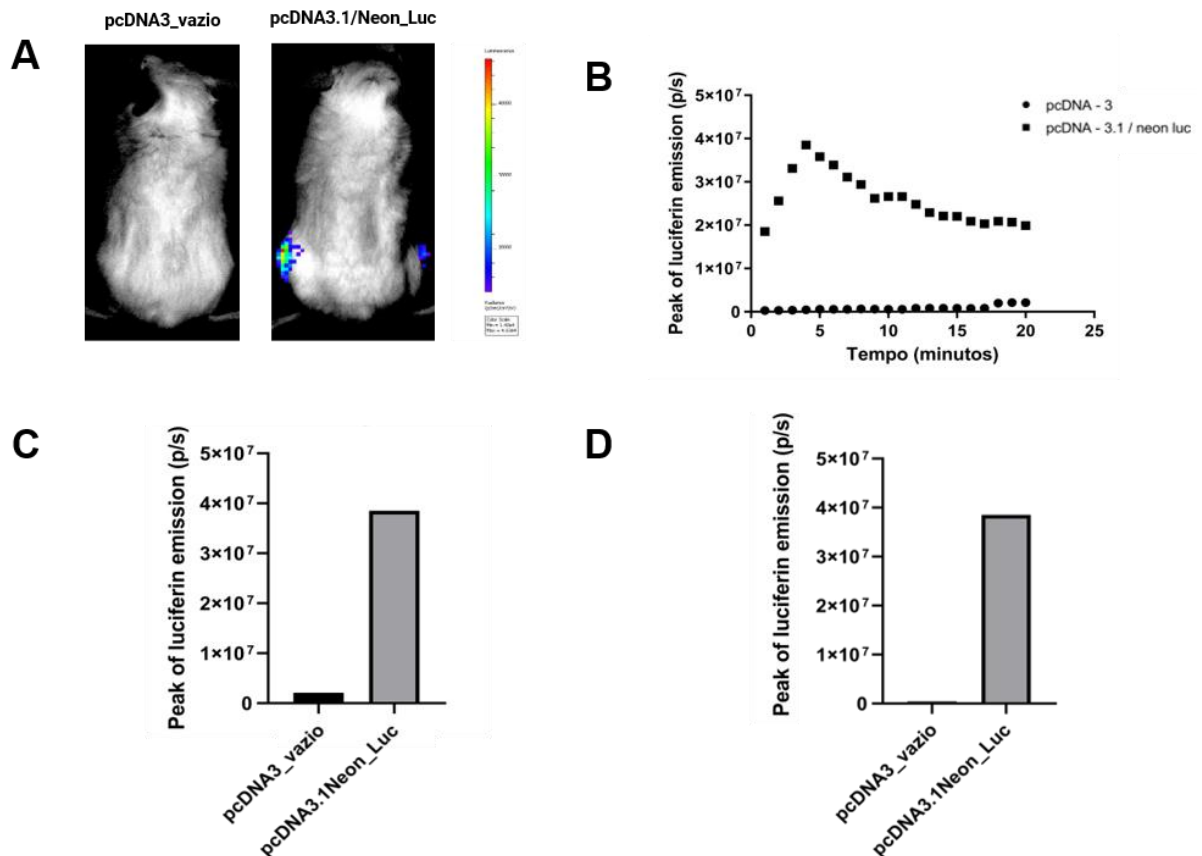


Figura 34. Camundongos Balb/c imunizados com pdDNA3.1/Neon_Luc i.m. 24 hrs. (A) Camundongos Balb/c fêmeas imunizados i.m com 100 µg de pcDNA3_vazio (controle) ou pcDNA3.1_Neon/Luc. (B) Cinética da leitura da bioluminescência; 20 minutos de leitura. (C) comparação da taxa de emissão de luminescência ao longo de 20 minutos. (D) Comparação do pico de emissão em 5 minutos.

Infelizmente as taxas de emissão dos dias 7 e 14 após a imunização não puderam ser computados devido a problemas técnicos com o equipamento de leitura. Entretanto foram obtidas imagens das leituras que podemos verificar que as análises

a longo prazo mostraram que a proteína continua a ser expressa em pelo menos 7 dias após imunização. Contudo, com 14 dias após a imunização não havia mais a expressão da bioluminescência (**Figura 35**).

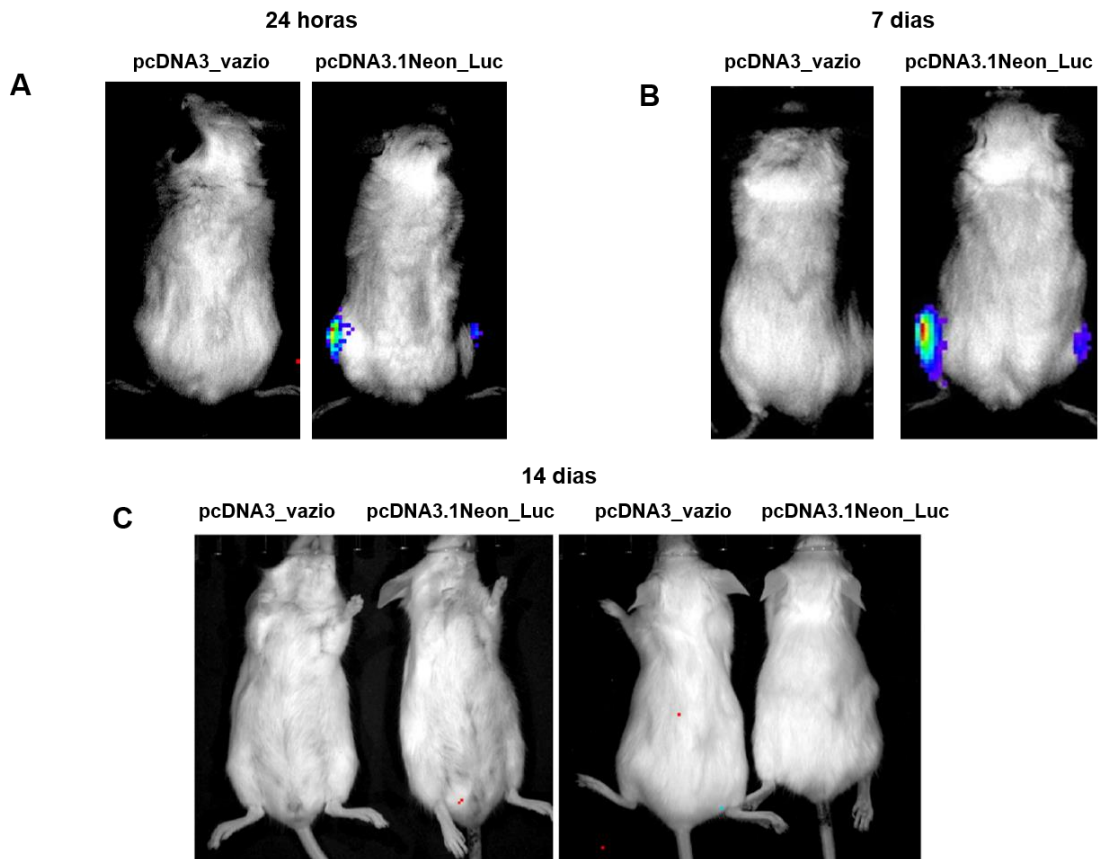


Figura 35. Dias após a imunização de camundongos Balb/c imunizados com pcDNA3.1/Neon_Luc i.m. (A) Camundongos Balb/c fêmeas imunizados i.m com 100 μ g de pcDNA3_vazio (controle) ou pcDNA3.1_Neon/Luc 24 horas após a imunização. (B) 7 dias após a imunização. (C) 14 dias após a imunização (dorsal e ventral).

5.13 TESTE DE VIAS

Para analisar a expressão diferencial em diferentes vias, foi selecionada 5 camundongos e foram testados a expressão da proteína luciferase pra diferentes vias. A partir das análises pode se notar que a via i.m foi a de maior expressão e também a mais duradoura (**Figura 38**) tendo em vista que mesmo após 7 dias pós imunização os a expressão da proteína continuava em alta. Esses dados corroboram com dados da literatura e indicam a melhor via para a expressão da proteína para os futuros testes. O camundongo da via oral foi testado com uma emulsão de lipofectamina e DNA e além de não ter apresentado nenhuma emissão o camundongo morreu logo após a primeira análise por razões desconhecidas.

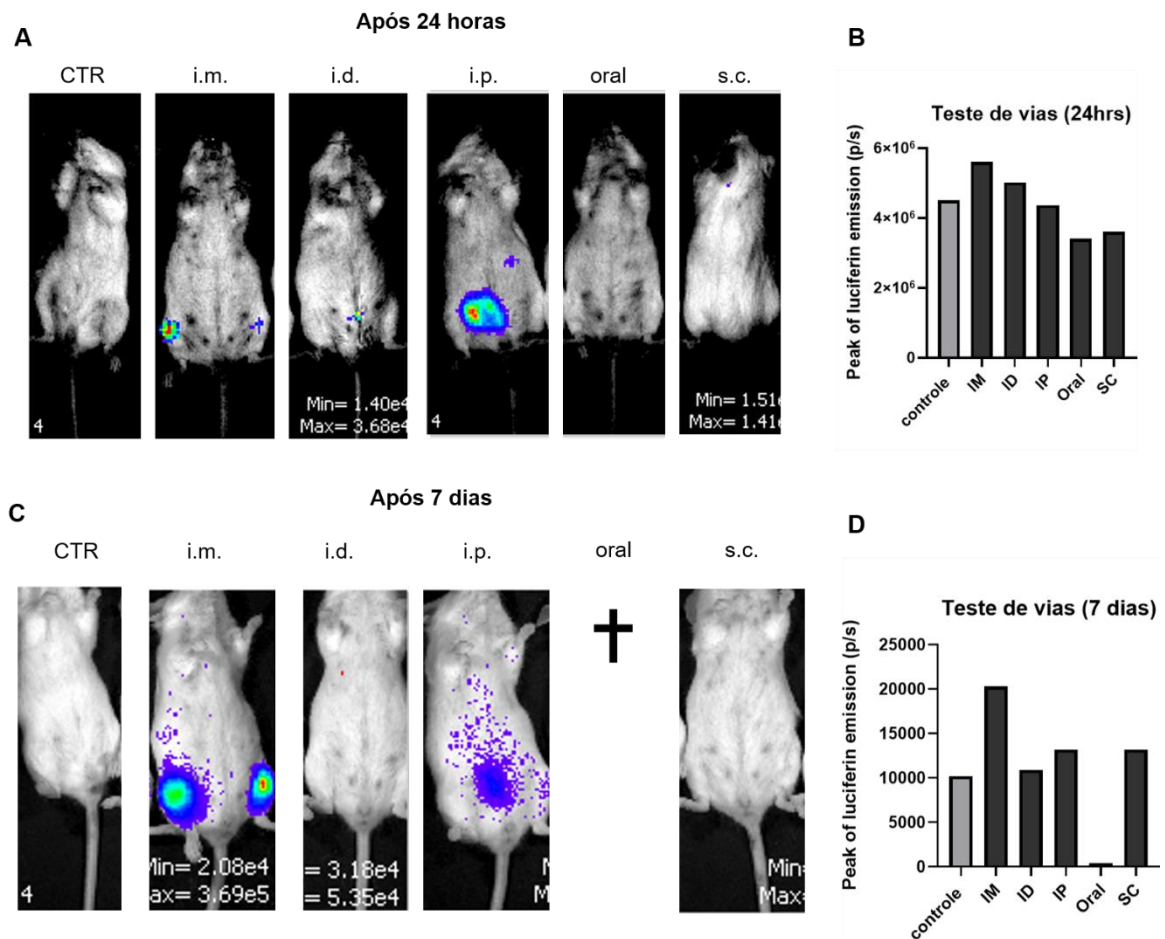


Figura 36. Teste de vias 24 horas e 7 dias pós imunização. Camundongos Balb/c imunizados com 100ug de pdDNA3.1/Neon_Luc por diferentes vias. (CTR) imunizados i.m com 100 µg de pcDNA3_vazio (controle) (i.m.) intramuscular; (i.d) intradérmico; (i.p) intraperitoneal (s.c.) subcutâneo.

5.13.1 Formulação oral com alginato de sódio

Tendo em vista que a leitura inicial da formulação oral não emitiu luminescência e as leituras seguintes não puderam ser realizadas, foram exploradas outras estratégias de formulações de DNA com alginato de sódio. O alginato de sódio é um polissacarídeo derivado de algas marinhas que possui propriedades gelificantes. A utilização do alginato de sódio na formulação da vacina oral tem como objetivo aumentar a estabilidade e prolongar a liberação da vacina no trato gastrointestinal do animal, melhorando assim sua absorção e eficácia.

Foram testadas duas diferentes estratégias, sendo a primeira uma emulsão do DNA com uma formulação comercial de alginato de sódio e bicarbonato de potássio. Enquanto a segunda estratégia, o DNA foi encapsulado em microesferas de alginato de sódio. Essas microesferas foram preparadas pela mistura do DNA da vacina com uma solução de alginato de sódio e CaCl 3%, seguida pela centrifugação e lavagem em PBS. As microesferas foram analisadas por microscopia de fluorescência utilizando o corante DAPI para verificar a presença do DNA após a sua preparação (**Figura 39**). Resumidamente, uma solução de alginato 2%, foi preparada utilizando água milliQ autoclavada. À solução de alginato adicionou-se o DNA plasmidial corado com DAPI. Em 100 µl de alginato 2% Adicionou-se 1 µg de DNA corado com DAPI. Em um microtubo de 2 mL, micro esferas de alginato/DNA-DAPI foram confeccionadas com o auxílio de uma ponteira de 10 µl acoplada a uma pipeta (0.1-10 µl) em seguida adicionou-se água milliQ autoclavada e as microesferas foram suspensas. Para a confecção das lâminas. As microesferas foram coletadas e depositadas em uma lâmina de vidro. Em seguida, as lâminas foram analisadas em um microscópio invertido.

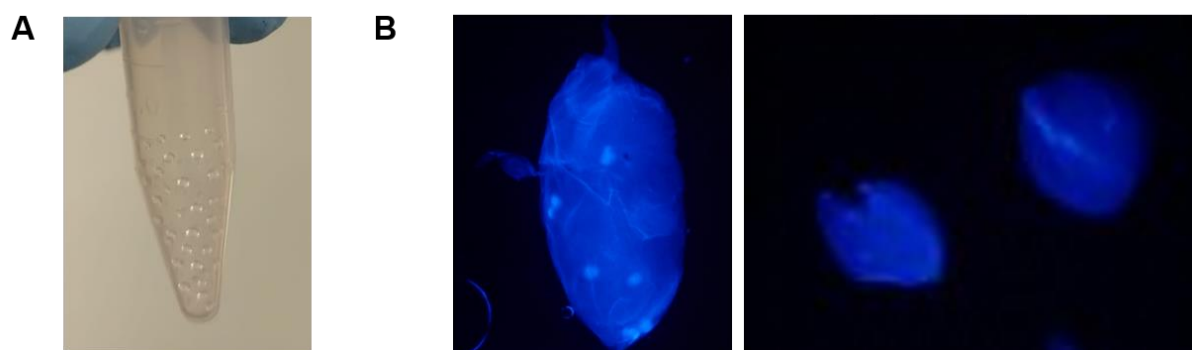


Figura 37. Formulação de esferas de alginato de sódio com DNA vacinal. (A) esferas no microcubo. (B) análise das esferas com DAPI em microscópio invertido.

Com as formulações prontas, 2 grupos de 2 camundongos foram imunizados via oral com cada uma das formulações (emulsão e esferas de alginato) com o plasmídeo expressando a Neon_Luc e outro com o plasmídeo controle pcDNA3_vazio, utilizando uma agulha de gavagem para evitar expectoração. No entanto, nenhuma das tentativas realizadas resultou na expressão da proteína *in vivo* quando administrada por essa via, seja no camundongo que recebeu a emulsão de alginato oral (**Figura 40A**) ou no que foi tratado com as esferas de alginato (**Figura 40B**).

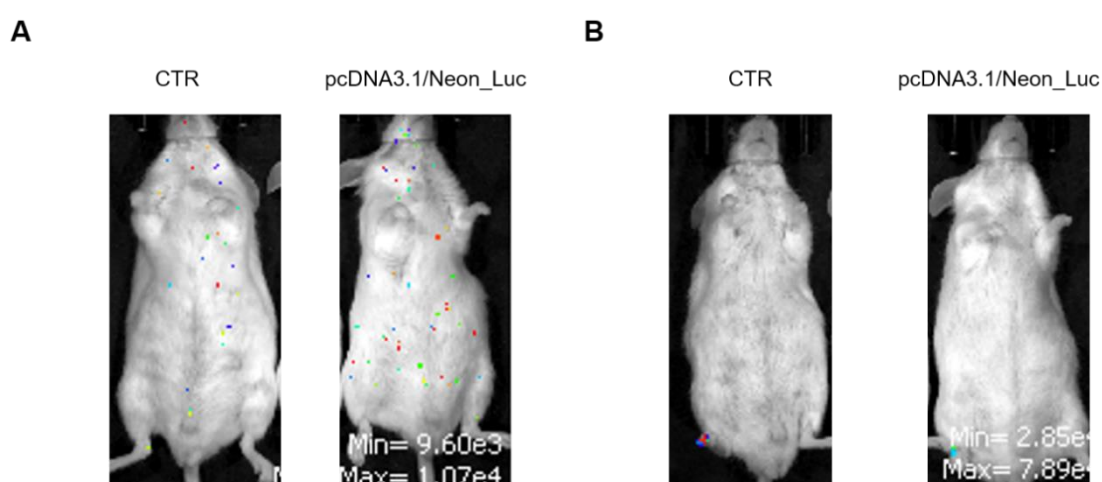


Figura 38. Imunização oral com formulações de alginato de sódio. (A) Camundongos Balb/c imunizados com 100 μ g de pcDNA3.1/Neon_Luc ou pcDNA3_vazio meia gavagem com formulação de emulsão de alginato de sódio; (B) Camundongos Balb/c imunizados com 100 μ g de pcDNA3.1/Neon_Luc ou pcDNA3_vazio meia gavagem com formulação de esferas de alginato de sódio.

5.14 IMUNIZAÇÕES COM PCDNA3.1_NEON/LUC

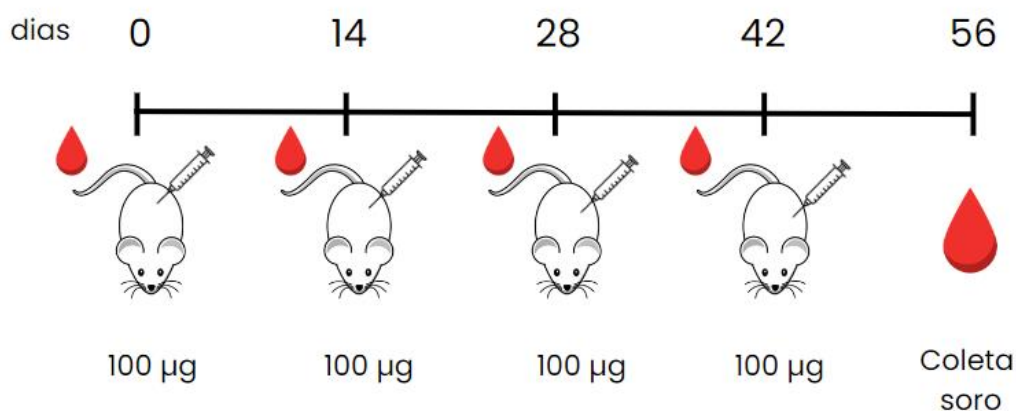


Figura 39. Fluxograma imunizações com plasmídeos pcDNA_vazio e pcDNA_Neon_Luc. O sangue pequeno representa a coleta de 100-200 μ L de sangue, para as análises dos soros. O sangue grande representa a coleta do sangue total por eutanásia (punção cardíaca).

Para verificar se as imunizações com o pcDNA3.1_Neon/Luc era capaz de induzir anticorpos específicos contra a protease repórter, luciferase, 2 grupos de 5 camundongos foram imunizados com 100 μ g de plasmídeo codificante da proteína ou 100 μ g de plasmídeo vazio (pcDNA3_vazio). Foram aplicadas 4 doses via intramuscular com intervalos de 15 dias entre as doses. A cada 14 dias após a aplicação das doses, por volta de 100-200 μ l de sangue eram coletados a partir da veia submandibular dos camundongos. Os soros eram coletados e armazenados a -80 °C. Um camundongo do grupo controle não pode ser imunizado pois não se apresentava em boas condições para os experimentos. Após as coletas dos soros, foi realizado um *Western Blot* do extrato de parasito CI Brener-LUC para detectar se havia a presença de anticorpos específicos para a *Red-shifted luciferase*.

Como pode ser visto a partir das análises, há um crescimento gradual na expressão de anticorpos específicos ao decorrer da aplicação das doses com os soros do grupo imunizado com pcDNA3.1_Neon/Luc (**Figura 40**), e conforme o esperado, não obtivemos nenhuma detecção de anticorpos específicos no grupo controle que foi imunizado com os plasmídeos sem a sequência da proteína. Esses dados indicam que o vetor pcDNA3.1_Neon/Luc pode ser utilizado como estratégia vacinal de DNA.

Entretanto mais estudos devem ser conduzidos a fim de analisar quantitativamente e qualitativamente a indução dessa resposta.

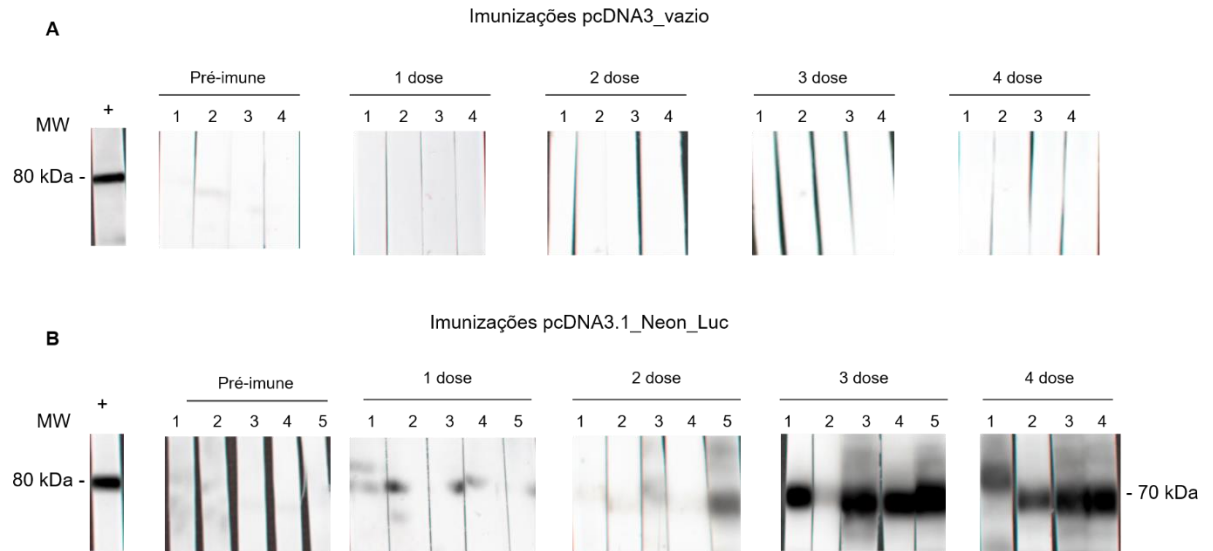


Figura 40. Análise da produção de anticorpos específicos para *Red-shifted luciferase* em extratos proteicos de epimastigotas CL Brener-LUC. Western blot soros dos camundongos imunizados com 100ug de pcDNA3.1_Neon_Luc ou pcDNA3_vazio; 1-5: soros dos camundongos; + controle positivos rPOP analisado com Anti-His.

6 DISCUSSÃO

Diversas plataformas de vacinas contra a doença de Chagas foram submetidas a testes em modelos animais ao longo dos anos. Essas plataformas abrangeram desde vacinas vivas atenuadas, até vacinas de DNA, vírus ou bactérias recombinantes, bem como proteínas recombinantes com diferentes formulações e adjuvantes (Cazorla et al. 2009). Recentemente, foi aprovado o primeiro estudo clínico destinado a seres humanos da vacina CRUZIVAX. O consórcio dessa vacina visa executar estudos de fase 1 com uma vacina sem agulha (via intranasal), tendo em vista que os resultados dos estudos pré-clínicos iniciais dos estudos laboratoriais são promissores (Ramponi et al. 2023). A vacina se baseia em um antígeno quimérico baseado em 3 moléculas parasitárias, sendo elas: (1) o domínio N-terminal da Cruzipaína (Cz) – a principal cisteína protease –, (2) a região central da proteína de superfície amastigota 2 (ASP2) – um antígeno expresso exclusivamente durante a fase intracelular – (3) e uma transialidase inativa (iTs). — Um importante antígeno e fator de virulência (Sanchez Alberti et al. 2017). Esse marco reforça que a pesquisa contínua no desenvolvimento de vacinas é vital para melhorar a saúde pública, enfrentar desafios emergentes, aprimorar a cobertura de imunização e garantir que as vacinas continuem sendo uma ferramenta eficaz na prevenção de doenças.

As proteases são enzimas que desempenham um papel crucial na biologia do parasito e no desenvolvimento da doença, tornando-as alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos e vacinas para a DC (Duschak and Couto 2009). O presente trabalho, visou o desenvolvimento de protótipos vacinais que expressassem os antígenos das proteases POPTc80 e TOP do *Trypanosoma cruzi*. Para isso, optamos por utilizar plataformas de proteínas recombinantes, DNA plasmidial purificado e mRNA transcrito *in vitro*. Todas essas abordagens apresentam um grande potencial para estimular a resposta imune e oferecer proteção contra patógenos. Para avaliar a eficácia dos protótipos, empregamos um método de imageamento *in vivo* robusto e sensível para analisar a expressão das proteínas *in vivo* e a progressão da infecção causada pelo protozoário. Além disso, tomamos precauções rigorosas ao produzir os parasitos, assegurando que sua capacidade de infectar fosse cuidadosamente avaliada, a fim de obter uma futura representação confiável da eficácia da vacina.

Com o intuito de avaliar a capacidade das proteínas em desencadear uma resposta imune em modelos de camundongos, obtivemos a forma recombinante das proteases POPTc80 e TOP de forma a preservar as propriedades da proteína nativa do *Trypanosoma cruzi*. As proteínas foram expressadas em sistema de expressão procarioto e purificada da fração solúvel. A subsequente imunização dos camundongos demonstrou a capacidade de gerar anticorpos específicos para as proteínas, indicando a presença de epítomos imunodominantes que podem provocar uma resposta imune específica. Esses dados reforçam os achados de Bivona et al. (2018) que observou que camundongos imunizados pelo menos duas vezes com a proteína recombinante (rTc80im) provocaram títulos de anticorpos consideravelmente superiores aos do grupo controle (Bivona et al. 2018). No entanto, é importante ressaltar que futuros estudos são necessários para uma análise mais aprofundada dos tipos de respostas celulares e humorais desencadeadas por essa imunização. Além disso, planejamos investigar a influência de diferentes veículos e adjuvantes em estudos futuros.

Conforme abordado anteriormente, as fases aguda e crônica da doença de Chagas requerem diferentes polarizações da resposta imune: o perfil Th1 é protetor no estado agudo e as respostas regulatórias são importantes na prevenção da fase crônica (Andrade et al. 2014, Dutra et al. 2014). Nessa fase, a resposta Th1, promove a ativação das células T CD8⁺ e desencadeia a produção de IFN- γ , ativando efetivamente os mecanismos microbicidas dos macrófagos, além de potencializar sua atividade citotóxica. Essa dinâmica é essencial para o controle da infecção nesse estágio inicial da doença (Junqueira et al. 2010). Contudo, geralmente, a imunização com subunidades de proteína não estimula linfócitos T citotóxicos CD8⁺, uma vez que os antígenos exógenos são absorvidos por endocitose pelas APCs, gerando epítomos que são processados e apresentados exclusivamente via MHC classe II, reconhecidos apenas por células T CD4⁺. No entanto, algumas APCs em especial as DCs, são capazes de executar um processo alternativo de apresentação cruzada de antígenos exógenos via MHC classe I (Segura and Amigorena 2015). Dominguez et al. (2011) sugeriram que em infecções parasitárias, como a doença de Chagas, a indução de uma resposta T CD8⁺ seria proveniente de peptídeos imunodominantes que podem ser favorecidos na apresentação cruzada em relação aos peptídeos subdominantes (Dominguez et al. 2011).

Por esta razão, as APCs são um grupo-chave de células na doença de Chagas, elas são responsáveis pela captação e apresentação de antígenos de forma a poder modular a resposta dependendo do tipo, nível de maturação, meio de citocinas e receptores envolvidos, tendo um papel fundamental no desenvolvimento das formas clínicas da doença, incluindo o estágio indeterminado. Dependendo de como essas células são moduladas, a resposta imune protetora do hospedeiro muda drasticamente (Gil-Jaramillo et al. 2016).

Tendo isso em vista, a escolha da via de imunização apresenta grande importância, especialmente no caso de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, que estão sujeitas à degradação, dependendo do local de administração. Diferentes vias de injeção são usadas na administração de vacinas, incluindo intradérmica (ID), subcutânea (SC), intramuscular (IM). A escolha da via de administração é crucial, uma vez que as propriedades anatômicas e fisiológicas dos locais de vacinação podem influenciar a eficácia e segurança das vacinas. A injeção intradérmica (ID) administra vacinas diretamente na derme, permitindo que células apresentadoras de antígenos do tecido da derme processem o mRNA ou DNA e ativem as células T e B nos gânglios linfáticos (Kashem et al. 2017).

A injeção subcutânea (SC) administra vacinas na camada subcutânea abaixo da epiderme e da derme. Esta região é composta principalmente por tecido adiposo e tem menos células imunológicas em comparação com a derme (Ibrahim 2010). Em comparação com a injeção intradérmica (ID), a injeção SC permite um volume de injeção maior, além de causar menos desconforto e efeitos adversos. No entanto, a absorção é mais lenta na área subcutânea devido à baixa drenagem nesse local, o que pode resultar na degradação da vacina de mRNA e consequentemente em uma baixa resposta imunológica (Zeng et al. 2020).

A injeção intramuscular (IM) administra a vacina nos músculos, uma camada mais profunda, abaixo da derme e da camada subcutânea. Os músculos são ricos em vasos sanguíneos, permitindo a recirculação de várias células imunológicas, incluindo as apresentadoras de antígenos (APCs) (Moyer et al. 2016, Zeng et al. 2020). Um estudo utilizando macacos rhesus demonstrou que o mRNA da vacina injetado por via IM e ID permanece no local de injeção e é detectado nos gânglios linfáticos por pelo menos 28 horas, onde as APCs e células B contêm o mRNA (Liang et al. 2017). Contudo outra vantagem da injeção IM é de oferece um maior volume de administração em comparação com as vias ID e SC, com efeitos colaterais locais mais

leves. Essa via é amplamente utilizada no desenvolvimento de vacinas de mRNA e DNA, uma vez que atinge eficazmente as células dendríticas estimulando uma imunidade inata direcionada pelo IFN polarizando uma resposta do tipo I e, quando combinadas com a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras, resultam em respostas vacinais altamente eficazes contra patógenos (Liang et al. 2017).

A fim de verificar qual a melhor via de inoculação para nosso vetor de expressão *in vivo*, realizamos um teste de vias em camundongos a fim de verificar qual local de inoculação iria produzir uma maior quantidade de proteína ao decorrer do tempo. A partir dos resultados foi possível verificar que a injeção IM foi a que resultou na expressão mais duradoura da proteína (até 7 dias) (**Figura 36**). Isso sugere que a injeção intramuscular (IM) é a via mais eficaz para nossa estratégia de vetor de expressão *in vivo*, proporcionando uma produção prolongada de proteína ao longo do tempo. Essa descoberta é fundamental para o desenvolvimento contínuo de nossa abordagem de imunização e demonstra a importância da escolha da via de inoculação para otimizar a expressão de antígenos em modelos animais.

Patógenos que penetram no corpo ou infectam o hospedeiro diretamente através das superfícies mucosas, como as vias oral e/ou nasal, representam um desafio no desenvolvimento de imunizantes eficazes. Para enfrentar essa questão, é de grande interesse desencadear uma resposta imunológica direcionada às superfícies mucosas. Tendo em vista que a administração intramuscular de vacinas frequentemente resulta em respostas imunológicas mucosas limitadas (Vujanic et al. 2012), uma das estratégias é a via oral e nasal de inoculação. Essas abordagens podem estimular respostas mediadas por células, como as células T auxiliares CD4 positivas e os linfócitos T citotóxicos CD8 positivos (Russell-Jones 2000).

Neste estudo, foram exploradas diferentes estratégias de imunização oral com o objetivo de desenvolver um método capaz de induzir uma resposta imune específica na mucosa dessa região. Contudo, a via de imunização oral apresenta complexidades específicas que demandam a implementação de estratégias adicionais para preservar a integridade do DNA e mRNA. A exposição ao ambiente digestivo e enzimas no trato gastrointestinal pode resultar na degradação do material genético, comprometendo a eficácia do imunizante. Desse modo, não foi possível detectar a produção do antígeno nos modelos analisados *in vivo* imunizados com formulações de alginato de sódio (**Figura 38**). Portanto, é essencial testar novos métodos que protejam o DNA da

degradação durante a imunização oral, visando assegurar o sucesso dessa via de administração, tais como estratégias aprimoradas de entrega por bactérias entéricas atenuadas, nanopartículas penetrantes de muco (NP), veículos de entrega e mucoadesivos (Zhang et al. 2021).

As vacinas de DNA plasmidial e mRNA têm despertado interesse devido à sua versatilidade e potencial em várias aplicações, desde profilaxia até terapia. Ambas as tecnologias permitem a produção ágil e direta de antígenos desejados, eliminando a necessidade de trabalhar com patógenos vivos. Essa rapidez de desenvolvimento torna essas tecnologias cruciais no combate a doenças epidêmicas ou emergentes. No contexto do câncer e doenças infecciosas, essas tecnologias possibilitam a criação de vacinas altamente personalizadas, direcionadas aos antígenos específicos. No entanto, para o progresso dessas estratégias vacinais é importante comparar ambas as tecnologias, considerando questões teóricas e dados experimentais.

No contexto das vacinas de DNA, estas consistem em DNA plasmidial que contém informações genéticas para o antígeno desejado, controlado por um promotor. São facilmente produzidas em bactérias e apresentam um processo de produção relativamente simples e econômico. Sua estabilidade a temperaturas de armazenamento e transporte as torna ideais para produção em larga escala e distribuição tanto em nações industrializadas quanto em nações em desenvolvimento. No entanto, é importante observar que, apesar da ausência de risco de infecção por patógenos, alguns estudos destacaram a preocupação potencial de integração genômica (Liu 2019).

As vacinas de mRNA, hoje amplamente adotadas em todo o mundo, representam uma importante alternativa para proteção contra infecções, uma vez que estimulam uma resposta imune celular altamente eficaz. Além disso, também oferecem flexibilidade para otimizar sequências e podem codificar múltiplos antígenos em uma única formulação, fortalecendo a resposta imune contra patógenos resistentes. Algumas pesquisas mostraram que a imunização com RNA foi capaz de induzir uma resposta imune e fornecer proteção contra patógenos intracelulares, como *Leishmania donovani* (Duthie et al. 2018) e *Plasmodium berghei* (Mallory et al. 2021), indicando seu potencial para doenças parasitárias.

No entanto, desenvolver uma vacina eficaz contra a doença de Chagas, é desafiador devido à diversidade genética do parasito e a variabilidade nos hospedeiros. Novas abordagens, como a identificação de antígenos conservados, são

necessárias para criar vacinas universais (Camargo et al. 2022). O antígeno alvo e a otimização dos métodos de construção, formulação e distribuição parecem ser elementos-chave na imunogenicidade das vacinas de mRNA. Neste estudo, produzimos um vetor otimizado especificamente para a transcrição de mRNA (pcDNA3.1_Neon/Luc), visando sua aplicação no desenvolvimento de vacinas **(Figura 20)**. Este vetor é altamente versátil, permitindo modulações e adaptações para diversas estratégias e antígenos. Inicialmente, identificamos a capacidade do vetor em transcrever o mRNA desejado **(Figura 20 e 21)**. Contudo, devido a uma diminuição na eficácia do kit adquirido, enfrentamos desafios em explorar a questão de forma mais abrangente e na obtenção da quantidade necessária de material para realizar as análises e repetir os testes relacionados com o mRNA, incluindo a nanoencapsulação. Clonamos os genes das proteases de interesse no vetor otimizado e futuramente pretendemos produzir formulações vacinais de DNA e mRNA com uma ou mais proteases e/ou epítomos específicos da POPTc80 e TOP.

Esta fase do processo de desenvolvimento de vacinas de RNA é uma das mais desafiadoras, sendo crucial para o sucesso da vacina. Pretendemos continuar com essas etapas, avaliando a imunogenicidade em animais imunizados com diferentes formulações lipídicas contendo o mRNA das proteases. Além disso, enfrentamos atrasos na aquisição de insumos devido à pandemia, e uma mudança nas normativas federais impediu análises mais aprofundadas das imunizações em modelos *in vivo* no biotério do Instituto de Biologia. Contudo, a partir das análises iniciais dos soros dos camundongos vimos que tanto as nossas proteínas recombinantes, quanto o vetor otimizado de expressão *in vivo* podem desencadear uma resposta imune em modelos de camundongo **(Figura 13 e**

Figura 28). Desse modo, planejamos avaliar a capacidade de proteção dessas formulações quando os animais forem desafiados com a cepa infectiva produzida neste estudo **(Figura 30)**. Nossos resultados preliminares sugerem que as proteases POPTc80 e TOP representam antígenos promissores no desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas.

Em suma, o entendimento da resposta desencadeada pelas proteases POPTc80 e TOP oferece uma perspectiva valiosa para o desenvolvimento e aprimoramento de vacinas eficazes. Ao compreendermos como essas proteínas interagem com o sistema imunológico e desencadeiam respostas específicas, podemos projetar estratégias de imunização mais direcionadas e eficazes. Essa

compreensão aprofundada pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra o *Trypanosoma cruzi* e outras doenças parasitárias, proporcionando uma abordagem mais precisa na busca por imunizações capazes de conferir proteção duradoura. Além disso, a investigação das proteases POPTc80 e TOP pode abrir caminho para novas terapias e estratégias de controle dessas infecções, oferecendo esperança na luta contra doenças parasitárias.

7 CONCLUSÕES

Este estudo abrangeu uma gama significativa de etapas cruciais no desenvolvimento de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, resumidas abaixo e na figura:

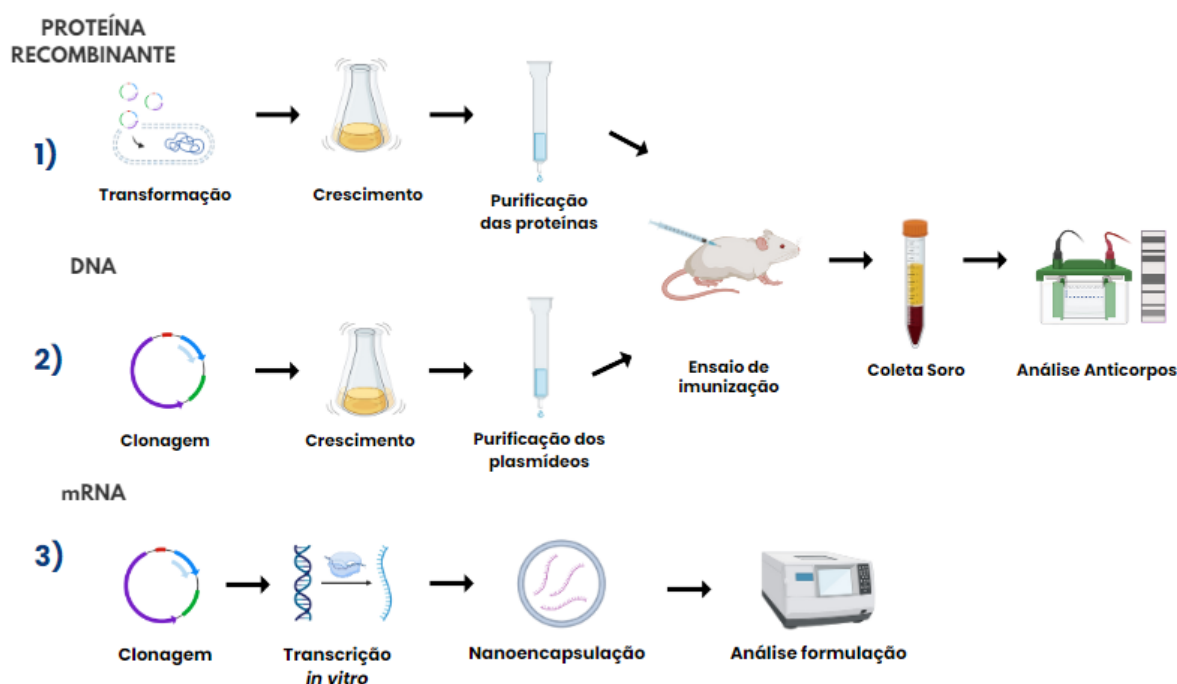


Figura 41. Esquema sistematizando as principais realizações e conclusões do trabalho.

- A prova de conceito do vetor pcDNA3.1_NeonLuc demonstrou sua aplicabilidade tanto como vetor imunizante para vacinas de DNA quanto para a transcrição *in vitro*, especificamente voltada à produção de imunizantes baseados em mRNA.
- Os antígenos POPTc80 e TOP revelaram-se promissores ao induzir respostas imunes específicas em modelos *in vivo*, consolidando-se como candidatos viáveis para o desenvolvimento de vacinas.
- O vetor otimizado para transcrição de mRNA foi elaborado com sucesso, permitindo a clonagem dos genes das proteases POPTc80 e TOP, que serão utilizados posteriormente para a formulação de vacinas.
- Os parasitos infectivos obtidos após várias passagens em camundongos, possibilitará ensaios de desafio letal, fundamentais para avaliar a eficácia dos antígenos em induzir uma resposta imune protetora.

- Adicionalmente, observamos que a via intramuscular é a mais adequada para a imunização com o vetor produzido.
- Em relação à expressão do antígeno *in vivo*, constatamos que o pico máximo não ultrapassa 14 dias após a inoculação, sendo o sétimo dia o período de maior expressão.

Esses resultados são essenciais para orientar futuras estratégias de desenvolvimento de vacinas, fornecendo informações cruciais para decisões posteriores neste campo promissor da imunização.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar detalhadamente os diversos tipos de respostas imune, celulares e humorais, desencadeadas pelos protótipos de imunização, aprofundando a compreensão sobre os mecanismos de defesa ativados.
- Desenvolver e avaliar novos métodos que visam proteger o DNA contra degradação durante a imunização oral, garantindo a integridade e eficácia do material genético.
- Aprimorar a transcrição *in vitro* e a nanoencapsulação dos mRNAs, incorporando a pseudouridina em substituição à uridina convencional, a fim de otimizar a estabilidade e eficácia das formulações.
- Realizar a imunização de camundongos com as formulações de vacinas de mRNA desenvolvidas, avaliando a resposta imunológica gerada e a segurança do processo.
- Conduzir estudos de imunoinformática por meio de ferramentas computacionais (*in silico*) para prever epítomos de células B e realizar a modelagem de anticorpos, visando desenvolver e aperfeiçoar uma vacina de múltiplos ou únicos epítomos.
- Avaliar a capacidade das formulações de DNA e mRNA em conferir proteção contra infecção pelos parasitos infectivos aqui desenvolvidos, utilizando técnicas de bioluminescência e desafio letal para uma análise abrangente dos resultados.

REFERÊNCIAS

- Acharya et al. (2020)** Dhiraj Acharya et al. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*. Nature Research. doi: 10.1038/s41577-020-0346-x.
- Alba Soto et al. (2003)** Catalina D. Alba Soto et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Modulates In Vivo Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules on Antigen-Presenting Cells and T-Cell Stimulatory Activity of Dendritic Cells in a Strain-Dependent Manner. *Infection and Immunity*. 71, 3 (Mar.-2003), 1194–1199. doi: 10.1128/IAI.71.3.1194-1199.2003.
- de Alencar et al. (2009)** Bruna C. G. de Alencar et al. Perforin and Gamma Interferon Expression Are Required for CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell-Dependent Protective Immunity against a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*, Elicited by Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Adenovirus 5 Boost Vaccination. *Infection and Immunity*. 77, 10 (Oct.-2009), 4383–4395. doi: 10.1128/IAI.01459-08.
- de Almeida et al. (2016a)** Hugo de Almeida et al. Identification of novel *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase inhibitors by structure-based virtual screening. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 30, 12 (Dec.-2016), 1165–1174. doi: 10.1007/s10822-016-9985-1.
- de Almeida et al. (2016b)** Hugo de Almeida et al. Identification of novel *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase inhibitors by structure-based virtual screening. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 30, 12 (Dec.-2016), 1165–1174. doi: 10.1007/s10822-016-9985-1.
- Almeida-de-Faria et al. (1999)** M. Almeida-de-Faria et al. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form. *Experimental Parasitology*. 92, 4 (Aug.-1999), 263–274. doi: 10.1006/EXPR.1999.4423.
- Andrade et al. (2014a)** Daniela V. Andrade et al. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8, 7 (Jul.-2014), e3010. doi: 10.1371/journal.pntd.0003010.
- Andrade et al. (2014b)** Daniela V. Andrade et al. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8, 7 (Jul.-2014), e3010. doi: 10.1371/journal.pntd.0003010.

- Angheben et al. (2011)** A. Angheben et al. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. *Eurosurveillance*. 16, 37 (Sep.-2011). doi: 10.2807/ese.16.37.19969-en.
- Aufderheide et al. (2004)** Arthur C. Aufderheide et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 7 (Feb.-2004), 2034–2039. doi: 10.1073/pnas.0307312101.
- Ballesteros et al. (2015)** Natalia A. Ballesteros et al. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 165, 3–4 (Jun.-2015), 127–137. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.04.001.
- Barbosa et al. (2013)** Rafael Polidoro Alves Barbosa et al. Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS ONE*. 8, 4 (Apr.-2013), e61795. doi: 10.1371/journal.pone.0061795.
- Basombrío et al. (1982)** M. A. Basombrío et al. Side effects of immunization with liver attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. *Infection and Immunity*. 36, 1 (Apr.-1982), 342–350. doi: 10.1128/iai.36.1.342-350.1982.
- Basombrío and Arredes (1987)** M. A. Basombrío and H. Arredes. Long-term immunological response induced by attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice. *The Journal of parasitology*. 73, 1 (Feb.-1987), 236–8.
- Bastos et al. (2013)** I. M. D. Bastos et al. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*. 999, 999 (Apr.-2013), 21–25. doi: 10.2174/09298673113209990121.
- Bastos et al. (2005)** Izabela M. D. Bastos et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochemical Journal*. 388, 1 (May.-2005), 29–38. doi: 10.1042/BJ20041049.
- BASTOS et al. (2005)** Izabela M. D. BASTOS et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochemical Journal*. 388, 1 (May.-2005), 29–38. doi: 10.1042/BJ20041049.

- Bayer-Santos et al. (2013)** Ethel Bayer-Santos et al. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasites & Vectors*. 6, 1 (Dec.-2013), 127. doi: 10.1186/1756-3305-6-127.
- Benvenuti et al. (2008)** L. A. Benvenuti et al. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 102, 6 (Sep.-2008), 481–487. doi: 10.1179/136485908X311740.
- Bern et al. (2011)** Caryn Bern et al. Acute and Congenital Chagas Disease. 19–47. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2.
- Bern (2015)** Caryn Bern. Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*. 373, 5 (2015), 456–466. doi: 10.1056/NEJMra1410150.
- Bivona et al. (2018)** Augusto E. Bivona et al. *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 12, 3 (Mar.-2018), e0006384. doi: 10.1371/journal.pntd.0006384.
- Boscardin et al. (2003)** Silvia B. Boscardin et al. Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experimental Infection. *Infection and Immunity*. 71, 5 (May.-2003), 2744–2757. doi: 10.1128/IAI.71.5.2744-2757.2003.
- Brumpt (1913)** Émile Brumpt. “Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Rôle régulateur des hotes intermédiaires. Passage à travers la peau.” *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*. 6, (1913), 172–176. Retrieved 24-Sep.-2023, from https://fr.wikisource.org/wiki/Fichier:Brumpt_E.1913_Bull_Soc_Pathol_Exot6_172-6.pdf.
- Buschini et al. (2009a)** Annamaria Buschini et al. Genotoxicity Revaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. *Journal of Parasitology Research*. 2009, (2009), 1–11. doi: 10.1155/2009/463575.
- Buschini et al. (2009b)** Annamaria Buschini et al. Genotoxicity Revaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. *Journal of Parasitology Research*. 2009, (2009), 1–11. doi: 10.1155/2009/463575.

- Camargo et al. (2022)** Erney Plessmann Camargo et al. Why do we still have not a vaccine against Chagas disease? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 117, (2022). doi: 10.1590/0074-02760200314.
- Camargo et al. (1911)** Mário E. Camargo et al. *HEMAGGLUTINATION TEST FOR CHAGAS' DISEASE WITH CHROMIUM CHLORIDE, FORMALIN-TREATED ERYTHROCYTES, SENSITIZED WITH TRYPANOSOMA CRUZI EXTRACTS*.
- Candia-Puma et al. (2022)** Mayron Antonio Candia-Puma et al. Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics*. 12, 11 (Nov.-2022), 2752. doi: 10.3390/diagnostics12112752.
- Cardoso (2021)** Isabela da Cunha Costa Cardoso. *Caracterização bioquímica e análise estrutural in silico de Thimet Oligopeptidase de Trypanosoma cruzi*. Universidade de Brasília.
- Cardoso et al. (2016)** Mariana S. Cardoso et al. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Frontiers in Immunology*. 6, (Jan.-2016). doi: 10.3389/fimmu.2015.00659.
- Carlos Pinto Dias et al. (2016)** João Carlos Pinto Dias et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 25, 21 (Jun.-2016), 1–10. doi: 10.5123/S1679-49742016000500002.
- Carvalho et al. (2009)** José da Rocha Carvalho et al. Cecilio Romaña - Acerca de um sintoma inicial de valor para o diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral: hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad. *Clássicos em Doença de Chagas: histórias e perspectivas no centenário da descoberta*. Editora FIOCRUZ. 205–230. doi: 10.7476/9786557081013.0011.
- Castillo-Riquelme et al. (2008)** Marianela Castillo-Riquelme et al. The Costs of Preventing and Treating Chagas Disease in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2, 11 (Nov.-2008), e336. doi: 10.1371/journal.pntd.0000336.
- Castro and Diaz de Toranzo (1988)** J. A. Castro and E. G. Diaz de Toranzo. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomedical and environmental sciences: BES*. 1, 1 (Jun.-1988), 19–33.

- Cazorla et al. (2009)** Silvia Inés Cazorla et al. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Review of Vaccines*. 8, 7 (Jul.-2009), 921–935. doi: 10.1586/erv.09.45.
- Cestari et al. (2013)** Igor Cestari et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Molecular Immunology*. 53, 4 (Apr.-2013), 328–334. doi: 10.1016/j.molimm.2012.08.015.
- Chagas (1909)** Carlos Chagas. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1, 2 (Aug.-1909), 159–218. doi: 10.1590/S0074-02761909000200008.
- Chu et al. (2021)** Laurence Chu et al. A preliminary report of a randomized controlled phase 2 trial of the safety and immunogenicity of mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Vaccine*. 39, 20 (May.-2021), 2791–2799. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.02.007.
- Coura (2014)** José Rodrigues Coura. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110, 3 (Dec.-2014), 277–282. doi: 10.1590/0074-0276140362.
- Coura and Viñas (2010)** José Rodrigues Coura and Pedro Albajar Viñas. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 465, S7301 (Jun.-2010), S6–S7. doi: 10.1038/nature09221.
- Crespillo-Andújar et al. (2018)** C. Crespillo-Andújar et al. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clinical Microbiology and Infection*. 24, 12 (Dec.-2018), 1344.e1–1344.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.006.
- Dominguez et al. (2011)** Mariana R. Dominguez et al. Subdominant/Cryptic CD8 T Cell Epitopes Contribute to Resistance against Experimental Infection with a Human Protozoan Parasite. *PLoS ONE*. 6, 7 (Jul.-2011), e22011. doi: 10.1371/journal.pone.0022011.
- Duschak and Couto (2009)** Vilma Duschak and Alicia Couto. Cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 16, 24 (2009). doi: 10.2174/092986709788802971.

- Duthie et al. (2018)** Malcolm S. Duthie et al. Heterologous Immunization With Defined RNA and Subunit Vaccines Enhances T Cell Responses That Protect Against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology*. 9, (Oct.-2018). doi: 10.3389/fimmu.2018.02420.
- Dutra et al. (2014)** W. O. Dutra et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology*. 36, 8 (Aug.-2014), 377–387. doi: 10.1111/pim.12107.
- Fife and Muschel (1959)** E. H. Fife and L. H. Muschel. Fluorescent-Antibody Technic for Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Experimental Biology and Medicine*. 101, 3 (Jul.-1959), 540–543. doi: 10.3181/00379727-101-25009.
- Franco-Paredes et al. (2020)** Carlos Franco-Paredes et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 36, (Jul.-2020), 101565. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101565.
- Ganneru et al. (2021)** Brunda Ganneru et al. Th1 skewed immune response of whole virion inactivated SARS CoV 2 vaccine and its safety evaluation. *iScience*. 24, 4 (Apr.-2021), 102298. doi: 10.1016/j.isci.2021.102298.
- Garg and Tarleton (2002)** Nisha Garg and Rick L. Tarleton. Genetic Immunization Elicits Antigen-Specific Protective Immune Responses and Decreases Disease Severity in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity*. 70, 10 (Oct.-2002), 5547–5555. doi: 10.1128/IAI.70.10.5547-5555.2002.
- Gil-Jaramillo et al. (2016)** Natalia Gil-Jaramillo et al. Dendritic Cells: A Double-Edged Sword in Immune Responses during Chagas Disease. *Frontiers in Microbiology*. 7, (Jul.-2016). doi: 10.3389/fmicb.2016.01076.
- Gomes et al. (2003)** J. A. S. Gomes et al. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infection and Immunity*. 71, 3 (Mar.-2003), 1185–1193. doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003.
- Gómez et al. (2021)** Inmaculada Gómez et al. Differential Expression of Immune Response Genes in Asymptomatic Chronic Chagas Disease Patients Versus Healthy Subjects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 11, (Sep.-2021). doi: 10.3389/fcimb.2021.722984.
- Gote et al. (2023)** Vrinda Gote et al. A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms24032700.

- Grellier et al. (2001a)** Philippe Grellier et al. Trypanosoma cruzi Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian Cell Invasion by Trypomastigotes. *Journal of Biological Chemistry*. (2001). doi: 10.1074/jbc.M106017200.
- Grellier et al. (2001b)** Philippe Grellier et al. Trypanosoma cruzi Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian Cell Invasion by Trypomastigotes. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 50 (Dec.-2001), 47078–47086. doi: 10.1074/jbc.M106017200.
- Guedes et al. (2010)** Paulo Marcos da Matta Guedes et al. IL-17 Produced during Trypanosoma cruzi Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4, 2 (Feb.-2010), e604. doi: 10.1371/journal.pntd.0000604.
- Gutierrez et al. (2020)** Brenda Celeste Gutierrez et al. Modulatory Effect of Trypanosoma cruzi Infective Stages in Different Dendritic Cell Populations in vitro. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10, February (2020), 1–8. doi: 10.3389/fcimb.2020.00020.
- Gutierrez et al. (2011)** Fredy R. S. Gutierrez et al. Regulation of Trypanosoma cruzi-Induced Myocarditis by Programmed Death Cell Receptor 1. *Infection and Immunity*. 79, 5 (May.-2011), 1873–1881. doi: 10.1128/IAI.01047-10.
- Hall and Wilkinson (2012)** Belinda S. Hall and Shane R. Wilkinson. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56, 1 (Jan.-2012), 115–123. doi: 10.1128/AAC.05135-11.
- Haolla et al. (2009)** Filipe A. Haolla et al. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental Trypanosoma cruzi infection. *Vaccine*. 27, 41 (Sep.-2009), 5644–53. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.013.
- Healy et al. (2015)** Chris Healy et al. Arrhythmias in Chagasic Cardiomyopathy. *Cardiac Electrophysiology Clinics*. 7, 2 (Jun.-2015), 251–268. doi: 10.1016/j.ccep.2015.03.016.
- Herwaldt (2001)** Barbara L. Herwaldt. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. *Clinical Microbiology Reviews*. 14, 4 (Oct.-2001), 659–688. doi: 10.1128/CMR.14.3.659-688.2001.
- Ho et al. (2021)** William Ho et al. Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Advanced Healthcare Materials*. John Wiley and Sons Inc. doi: 10.1002/adhm.202001812.

- Hughes et al. (2012)** James M. Hughes et al. Oral Transmission of Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 54, 6 (Mar.-2012), 845–852. doi: 10.1093/CID/CIR956.
- Ibrahim (2010)** M. Mohsen Ibrahim. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews*. 11, 1 (Jan.-2010), 11–18. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.
- Jayaraman et al. (2012)** Muthusamy Jayaraman et al. Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo**. *Angewandte Chemie International Edition*. 51, 34 (Aug.-2012), 8529–8533. doi: 10.1002/anie.201203263.
- Junqueira et al. (2010)** Caroline Junqueira et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 12, (Sep.-2010), e29. doi: 10.1017/S1462399410001560.
- Kashem et al. (2017)** Sakeen W. Kashem et al. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of Immunology*. 35, 1 (Apr.-2017), 469–499. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052215.
- Kessler et al. (2017)** Rafael Luis Kessler et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Molecular Microbiology*. 104, 5 (Jun.-2017), 712–736. doi: 10.1111/MMI.13653.
- de las Heras et al. (2009)** Ana I. de las Heras et al. In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 27, 2 (Aug.-2009), 120–129. doi: 10.1016/j.fsi.2008.11.021.
- Lasse et al. (2020a)** Camila Lasse et al. Prolyl Oligopeptidase From *Leishmania infantum*: Biochemical Characterization and Involvement in Macrophage Infection. *Frontiers in Microbiology*. 11, (May.-2020), 1060. doi: 10.3389/fmicb.2020.01060.
- Lasse et al. (2020b)** Camila Lasse et al. Prolyl Oligopeptidase From *Leishmania infantum*: Biochemical Characterization and Involvement in Macrophage Infection. *Frontiers in Microbiology*. 11, (May.-2020), 1060. doi: 10.3389/fmicb.2020.01060.
- Lewis et al. (2014)** Michael D. Lewis et al. Bioluminescence imaging of chronic *T. rypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cellular Microbiology*. 16, 9 (Sep.-2014), 1285–1300. doi: 10.1111/cmi.12297.

- Liang et al. (2017)** Frank Liang et al. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Molecular Therapy*. 25, 12 (Dec.-2017), 2635–2647. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.006.
- Lidani et al. (2017)** Kárita C. F. Lidani et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*. 8, (Apr.-2017). doi: 10.3389/fmicb.2017.00607.
- Lipscomb and Masten (2002)** Mary F. Lipscomb and Barbara J. Masten. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 82, 1 (Jan.-2002), 97–130. doi: 10.1152/physrev.00023.2001.
- Liu (2019)** Liu. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines*. 7, 2 (Apr.-2019), 37. doi: 10.3390/vaccines7020037.
- Liu et al. (2008)** Shin Wu Liu et al. Chapter 1 Analysis of mRNA Decapping. *Methods in Enzymology*. Academic Press. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02601-3.
- Liu et al. (2021)** Tiancai Liu et al. Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi: 10.3389/fbioe.2021.718753.
- Losada Galván et al. (2021)** Irene Losada Galván et al. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 19, 5 (May.-2021), 547–556. doi: 10.1080/14787210.2021.1834849.
- Macaluso et al. (2023)** Giusi Macaluso et al. A Review on the Immunological Response against *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens*. 12, 2 (Feb.-2023), 282. doi: 10.3390/pathogens12020282.
- Machado et al. (2006)** Alexandre V. Machado et al. Long-Term Protective Immunity Induced Against *Trypanosoma cruzi* Infection After Vaccination with Recombinant Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 and *Trans*- Sialidase. *Human Gene Therapy*. 17, 9 (Sep.-2006), 898–908. doi: 10.1089/hum.2006.17.898.
- Maier et al. (2013)** Martin A. Maier et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Molecular Therapy*. 21, 8 (Aug.-2013), 1570–1578. doi: 10.1038/mt.2013.124.
- Maldonado et al. (2022)** Edio Maldonado et al. Vaccine Design against Chagas Disease Focused on the Use of Nucleic Acids. *Vaccines*. 10, 4 (Apr.-2022), 587. doi: 10.3390/vaccines10040587.

- Mallory et al. (2021)** Katherine L. Mallory et al. Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice. *npj Vaccines*. 6, 1 (Jun.-2021), 84. doi: 10.1038/s41541-021-00345-0.
- Mandacaru et al. (2019)** Samuel C. Mandacaru et al. Exoproteome profiling of *Trypanosoma cruzi* during amastigogenesis early stages. *PLOS ONE*. 14, 11 (Nov.-2019), e0225386. doi: 10.1371/journal.pone.0225386.
- Martin and Tarleton (2004)** Diana Martin and Rick Tarleton. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews*. 201, 1 (Oct.-2004), 304–317. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00183.x.
- Martín-Escolano et al. (2022)** Javier Martín-Escolano et al. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infectious Diseases*. 8, 6 (Jun.-2022), 1107. doi: 10.1021/ACSINFECDIS.2C00123.
- Monteiro et al. (2007)** Ana Carolina Monteiro et al. Bradykinin B2 Receptors of Dendritic Cells, Acting as Sensors of Kinins Proteolytically Released by *Trypanosoma cruzi*, Are Critical for the Development of Protective Type-1 Responses. *PLoS Pathogens*. 3, 11 (Nov.-2007), e185. doi: 10.1371/journal.ppat.0030185.
- Moyer et al. (2016)** Tyson J. Moyer et al. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. 126, 3 (Mar.-2016), 799–808. doi: 10.1172/JCI81083.
- Müller Kratz et al. (2018)** Jadel Müller Kratz et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 11, 10 (Oct.-2018), 943–957. doi: 10.1080/17512433.2018.1509704.
- Neefjes et al. (2011)** Jacques Neefjes et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 11, 12 (Dec.-2011), 823–836. doi: 10.1038/nri3084.
- Nunes et al. (2013)** Maria Carmo Pereira Nunes et al. Chagas Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 62, 9 (Aug.-2013), 767–776. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.046.
- OMS (2021)** OMS. <https://brasil.un.org/pt-br/110612-oms-lan%C3%A7a-plano-de-10-anos-para-acabar-com-sofrimento-causado-por-doen%C3%A7as-tropicais>. Accessed: 22-Aug.-2023. Retrieved 22-Aug.-2023, from <https://brasil.un.org/pt->

br/110612-oms-lan%C3%A7a-plano-de-10-anos-para-acabar-com-sofrimento-causado-por-doen%C3%A7as-tropicais.

- Van Overtvelt et al. (1999)** Laurence Van Overtvelt et al. *Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation: Inhibition of Cytokines, HLA-DR, And Costimulatory Molecules. *Infection and Immunity*. 67, 8 (Aug.-1999), 4033–4040. doi: 10.1128/IAI.67.8.4033-4040.1999.
- Padilla et al. (2009a)** Angel M. Padilla et al. Insufficient TLR Activation Contributes to the Slow Development of CD8 + T Cell Responses in *Trypanosoma cruzi* Infection . *The Journal of Immunology*. 183, 2 (Jul.-2009), 1245–1252. doi: 10.4049/jimmunol.0901178.
- Padilla et al. (2009b)** Angel M. Padilla et al. Insufficient TLR Activation Contributes to the Slow Development of CD8+ T Cell Responses in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*. 183, 2 (Jul.-2009), 1245–1252. doi: 10.4049/jimmunol.0901178.
- Paiva et al. (1999a)** Cláudia N. Paiva et al. *Trypanosoma cruzi*: Protective Response of Vaccinated Mice Is Mediated by CD8+ Cells, Prevents Signs of Polyclonal T Lymphocyte Activation, and Allows Restoration of a Resting Immune State after Challenge. *Experimental Parasitology*. 91, 1 (Jan.-1999), 7–19. doi: 10.1006/expr.1999.4356.
- Paiva et al. (1999b)** Cláudia N. Paiva et al. *Trypanosoma cruzi* : lack of T cell abnormalities in mice vaccinated with live trypomastigotes. *Parasitology Research*. 85, 12 (Nov.-1999), 1012–1017. doi: 10.1007/s004360050674.
- Patterson and Wyllie (2014)** Stephen Patterson and Susan Wyllie. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*. 30, 6 (Jun.-2014), 289–298. doi: 10.1016/j.pt.2014.04.003.
- Pereira et al. (2015)** Isabela Resende Pereira et al. A Human Type 5 Adenovirus-Based *Trypanosoma cruzi* Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. *PLOS Pathogens*. 11, 1 (Jan.-2015), e1004594. doi: 10.1371/journal.ppat.1004594.
- Polack et al. (2020)** Fernando P. Polack et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 383, 27 (Dec.-2020), 2603–2615. doi: 10.1056/NEJMoa2034577.

- Queiroz et al. (2014)** Rayner M. L. Queiroz et al. Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted *Trypanosoma cruzi* Life Stages. *Journal of Proteome Research*. 13, 8 (Aug.-2014), 3530–3541. doi: 10.1021/pr401120y.
- Quijano-Hernandez and Dumonteil (2011)** Israel Quijano-Hernandez and Eric Dumonteil. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*. 7, 11 (Nov.-2011), 1184–1191. doi: 10.4161/hv.7.11.17016.
- Ramponi et al. (2023a)** Francesco Ramponi et al. Development of vaccines for Chagas disease (CRUZIVAX): stakeholders' preferences and potential impacts on healthcare. *Gaceta Sanitaria*. 37, (2023), 102275. doi: 10.1016/j.gaceta.2022.102275.
- Ramponi et al. (2023b)** Francesco Ramponi et al. Development of vaccines for Chagas disease (CRUZIVAX): stakeholders' preferences and potential impacts on healthcare. *Gaceta Sanitaria*. 37, (Jan.-2023), 102275. doi: 10.1016/J.GACETA.2022.102275.
- Rassi et al. (2010)** Anis Rassi et al. Chagas disease. *Lancet (London, England)*. 375, 9723 (2010), 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Rassi Jr et al. (2001)** Anis Rassi Jr et al. Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 76, 1 (Jan.-2001). doi: 10.1590/S0066-782X2001000100008.
- Rassi Jr et al. (2017)** Anis Rassi Jr et al. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 112, 3 (Feb.-2017), 224–235. doi: 10.1590/0074-02760160334.
- Redding and Weiner (2009)** Laurel Redding and David B. Weiner. DNA vaccines in veterinary use. *Expert Review of Vaccines*. 8, 9 (Sep.-2009), 1251–1276. doi: 10.1586/ERV.09.77.
- Ribeiro et al. (2012)** Antonio L. Ribeiro et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*. 9, 10 (Oct.-2012), 576–589. doi: 10.1038/nrcardio.2012.109.
- Rios et al. (2019)** Lizette E. Rios et al. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 200, (Dec.-2019), 105168. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105168.

- Rodrigues et al. (2012)** Mauricio M. Rodrigues et al. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *Journal of Parasitology Research*. 2012, (2012), 1–12. doi: 10.1155/2012/507874.
- Russell-Jones (2000)** G. J. Russell-Jones. Oral vaccine delivery. *Journal of Controlled Release*. 65, 1–2 (Mar.-2000), 49–54. doi: 10.1016/S0168-3659(99)00231-X.
- Sahin et al. (2020)** Ugur Sahin et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 586, 7830 (Oct.-2020), 594–599. doi: 10.1038/s41586-020-2814-7.
- Sambrook and Russell (2001)** Joseph Sambrook and David William Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1*.
- Sanchez Alberti et al. (2017)** Andrés Sanchez Alberti et al. Engineered trivalent immunogen adjuvanted with a STING agonist confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *npj Vaccines*. 2, 1 (Apr.-2017), 9. doi: 10.1038/s41541-017-0010-z.
- Sánchez-Valdéz et al. (2015)** Fernando J. Sánchez-Valdéz et al. Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. *Expert Review of Vaccines*. 14, 5 (May.-2015), 681–697. doi: 10.1586/14760584.2015.989989.
- Santana et al. (1997)** Jaime Martins Santana et al. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochemical Journal*. (1997). doi: 10.1042/bj3250129.
- SANTANA et al. (1997)** Jaime Martins SANTANA et al. A *Trypanosoma cruzi* -secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochemical Journal*. 325, 1 (Jul.-1997), 129–137. doi: 10.1042/bj3250129.
- Santos et al. (2009)** Daniela Maria dos Santos et al. *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Experimental Parasitology*. 121, 1 (Jan.-2009), 8–14. doi: 10.1016/j.exppara.2008.09.012.
- Secretaria de Vigilância em Saúde; (2020)** Secretaria de Vigilância em Saúde; <https://www.gov.br/saude/pt-br>. Accessed: 24-May.-2023. Retrieved 24-May.-2023, from <https://www.gov.br/saude/pt-br>.

- Secretaria de Vigilância em Saúde; (2022)** Secretaria de Vigilância em Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica. (2022). Retrieved 15-Sep.-2023, .
- Segura and Amigorena (2015)** Elodie Segura and Sebastian Amigorena. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. 1–31. doi: 10.1016/bs.ai.2015.03.002.
- Shafaati et al. (2022)** Maryam Shafaati et al. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virology*. 17, 1 (Jan.-2022), 49–66. doi: 10.2217/fvl-2021-0170.
- Silva (2018)** Camila Lasse Silva. *Estudo funcional da prolil oligopeptidase de Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum: nocaute gênico, inibição enzimática e processos infectivos*. Universidade de Brasília.
- Silva et al. (1999)** Celio L. Silva et al. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (1999). doi: 10.1006/bbrc.1999.0250.
- Souza et al. (2016)** Dilma do Socorro Moraes de Souza et al. Anatomopathological Aspects of Acute Chagas Myocarditis by Oral Transmission. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. (2016). doi: 10.5935/abc.20160110.
- Souza et al. (2020)** Rodolpho Ornitz Oliveira Souza et al. Glutamine Analogues Impair Cell Proliferation ,. *Molecules*. 2, (2020), 1–13.
- De Souza (1984)** Wanderley De Souza. Cell Biology of Trypanosoma cruzi. *International Review of Cytology*. 86, C (Jan.-1984), 197–283. doi: 10.1016/S0074-7696(08)60180-1.
- De Souza and Barrias (2020)** Wanderley De Souza and Emile S. Barrias. May the epimastigote form of Trypanosoma cruzi be infective? *Acta Tropica*. 212, (Dec.-2020), 105688. doi: 10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105688.
- Szabó et al. (2022)** Gábor Tamás Szabó et al. COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments. *Molecular Therapy*. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.016.
- Tanowitz et al. (2015)** Herbert B. Tanowitz et al. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 13, 12 (Dec.-2015), 1393–1409. doi: 10.1586/14779072.2015.1103648.
- Tarleton (1990)** R. L. Tarleton. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi.

- Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 144, 2 (Jan.-1990), 717–724. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2104903/>.
- Tarleton (2001)** Rick L. Tarleton. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International Journal for Parasitology*. 31, 5–6 (May.-2001), 550–554. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00158-8.
- Tarleton (2007)** Rick L. Tarleton. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*. 19, 4 (Aug.-2007), 430–434. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.003.
- Taylor and Kelly (2014)** Martin C. Taylor and John M. Kelly. Optimizing bioluminescence imaging to study protozoan parasite infections. *Trends in Parasitology*. 30, 4 (Apr.-2014), 161–162. doi: 10.1016/j.pt.2014.01.006.
- Teixeira et al. (2006)** A. R. L. Teixeira et al. Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*. 82, 974 (Dec.-2006), 788–798. doi: 10.1136/pgmj.2006.047357.
- Teixeira et al. (1978)** Antonio R. L. Teixeira et al. Acquired Cell-Mediated Immunodepression in Acute Chagas' Disease. *Journal of Clinical Investigation*. 62, 6 (Dec.-1978), 1132–1141. doi: 10.1172/JCI109232.
- Tenchov et al. (2021)** Rumiana Tenchov et al. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano*. 15, 11 (Nov.-2021), 16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996.
- Tyler and Engman (2001)** K. M. Tyler and D. M. Engman. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. 31, 5–6 (May.-2001), 472–481. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9.
- Ulmer et al. (1993)** Jeffrey B. Ulmer et al. Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science*. 259, 5102 (Mar.-1993), 1745–1749. doi: 10.1126/science.8456302.
- Vasconcelos et al. (2004)** José Ronnie Vasconcelos et al. Protective Immunity Against *Trypanosoma cruzi* Infection in a Highly Susceptible Mouse Strain After Vaccination with Genes Encoding the Amastigote Surface Protein-2 and Trans-Sialidase. *Human Gene Therapy*. 15, 9 (Sep.-2004), 878–886. doi: 10.1089/hum.2004.15.878.
- Vázquez-Chagoyán et al. (2011)** Juan C. Vázquez-Chagoyán et al. Vaccine Development Against *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. 121–146. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00006-X.

- Vendeville (2002)** S. Vendeville. Comparison of the Inhibition of Human and Trypanosoma cruzi Prolyl Endopeptidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10, 6 (Jun.-2002), 1719–1729. doi: 10.1016/S0968-0896(02)00035-4.
- Vendeville et al. (1999)** Sandrine Vendeville et al. Identification of inhibitors of an 80 kDa protease from Trypanosoma cruzi through the screening of a combinatorial peptide library. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 47, 2 (Feb.-1999), 194–198. doi: 10.1248/cpb.47.194.
- Vendeville et al. (2002)** Sandrine Vendeville et al. Comparison of the inhibition of human and Trypanosoma cruzi prolyl endopeptidases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 10, 6 (Jun.-2002), 1719–1729. doi: 10.1016/S0968-0896(02)00035-4.
- Versteeg et al. (2019)** Leroy Versteeg et al. Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections. *Vaccines*. 7, 4 (Sep.-2019), 122. doi: 10.3390/vaccines7040122.
- Vuitika et al. (2022)** Larissa Vuitika et al. Vaccines against Emerging and Neglected Infectious Diseases: An Overview. *Vaccines*. 10, 9 (Aug.-2022), 1385. doi: 10.3390/vaccines10091385.
- Vujanic et al. (2012)** Ana Vujanic et al. Mucosal vaccination: Lung versus nose. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148, 1–2 (Jul.-2012), 172–177. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.004.
- Wang et al. (2021)** Yang Wang et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer*. doi: 10.1186/s12943-021-01311-z.
- Ward et al. (2020)** Alexander I. Ward et al. In Vivo Analysis of Trypanosoma cruzi Persistence Foci at Single-Cell Resolution. *mBio*. 11, 4 (Aug.-2020). doi: 10.1128/mBio.01242-20.
- Wendel (1998)** Silvano Wendel. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Current Opinion in Hematology*. 5, 6 (Nov.-1998), 406–411. doi: 10.1097/00062752-199811000-00009.
- WHO (2017)** WHO. *Integrating neglected tropical diseases*.
- WHO (2020)** WHO. .
- WHO (2023)** WHO. <https://www.who.int/news/item/14-04-2023-world-chagas-disease-day-2023-to-focus-on-integrating-universal-care-and-surveillance-at-the-primary-care-level>. Accessed: 24-Jul.-2023. Retrieved 24-Jul.-2023, from <https://www.who.int/news/item/14-04-2023-world-chagas-disease-day-2023-to-focus-on-integrating-universal-care-and-surveillance-at-the-primary-care-level>.

- Wolff et al. (1990)** Jon A. Wolff et al. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*. 247, 4949 (Mar.-1990), 1465–1468. doi: 10.1126/science.1690918.
- Yilmaz (2021)** Engin Yilmaz. New hopes in vaccine technology: mRNA vaccines. *Mikrobiyoloji Bulteni*. doi: 10.5578/mb.20219912.
- Zeng et al. (2020)** Chunxi Zeng et al. Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. 71–110. doi: 10.1007/82_2020_217.
- Zhang et al. (2021)** Yuandong Zhang et al. Advanced oral vaccine delivery strategies for improving the immunity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 177, (Oct.-2021), 113928. doi: 10.1016/j.addr.2021.113928.