

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Lipossomos como um sistema de liberação de proteínas
antigênicas de *Trypanosoma cruzi* e seu efeito na indução da
imunidade experimental em camundongos**

Vanessa Migliaccio

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VANESSA MIGLIACCIO

Lipossomos como um sistema de liberação de proteínas antigênicas de *Trypanosoma cruzi* e seu efeito na indução da imunidade em camundongos

Tese Apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Doutor em Ciências, Área: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto

Co-Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Migliaccio, Vanessa

LIPOSSOMOS COMO UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E SEU EFEITO NA INDUÇÃO DA IMUNIDADE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Ribeirão Preto, 2007.

86 p. 15 il., 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Área de concentração em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto

Co-Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

1. *Trypanosoma cruzi* - 2. Lipossomos - 3. Vacinação

Dedicatória

Ao meu marido Fabrício Calvo, pelo amor, paciência, compreensão, por todas as privações e esforços dispendidos e principalmente por todos os planos compartilhados ...

Ao meu filho Lucca Migliaccio Calvo, que me trouxe a esperança e a vontade de iniciar um novo ciclo.

Ao meu pai que infelizmente não pôde fazer parte desta minha nova caminhada.

A todos da minha família que sempre compartilharam e incentivaram meus projetos e sonhos...

Agradecimentos

Ao meu professor e orientador Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto, por me acolher em seu laboratório e contribuir para a minha formação profissional. Obrigada pela disponibilidade, acessibilidade e principalmente, pela sua compreensão.

Ao Professor Dr. Pietro Ciancaglini, pela amizade e pela excelente co-orientação desse trabalho, pela disponibilidade com que me recebeu em seu laboratório, pelas valiosas sugestões e prontidão em me ajudar nos momentos de dificuldade.

A Professora Dr^a. Vânia Luíza Deperon Bonato, pela atenção e sugestões nos experimentos que enriqueceram este trabalho.

Ao professor Dr. João Santana por permitir a utilização do espaço físico de seu laboratório, bem como a utilização dos equipamentos.

Ao Professor Dr. Célio Lopes por ceder as citocinas utilizadas nos ensaios experimentais.

A técnica e amiga Denise Ferraz pela convivência diária e pelo apoio técnico nos meus experimentos, pelo exemplo de profissionalismo e competência dedicados a todos do laboratório.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia FMRP/USP pela convivência agradável durante esses quatro anos.

As amigas Marcelle, Viviane, Iza, Fernanda, Denise e Andressa, pela amizade, companheirismo, pelos momentos de alegria compartilhados e estímulos constantes e especialmente a Fabiana e pela valiosa participação na elaboração dessa dissertação. Obrigada pela prontidão em me ajudar e pela paciência nas leituras, correções e sugestões e críticas até a dissertação final.

Ao técnico de laboratório Wander C. R. Silva, pela disponibilidade e auxílio em todos os momentos.e funcionários do Biotério

A CAPES pela concessão da bolsa, que possibilitou a realização desse trabalho.

Agradeço a Deus, que pela força que age em nós, pode fazer muito mais que pedimos e imaginamos.

Aos meus pais pelo carinho, dedicação e sacrifício oferecidos em pró da minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço à todos aqueles que contribuíram de alguma forma com a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1-INTRODUÇÃO	1
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	2
1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3 Fatores de resistência e suscetibilidade do hospedeiro na Doença de Chagas.....	6
1.4 Moléculas antigênicas que conferem resistência à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	8
1.5 Vacinação.....	10
1.6 Lipossomos	12
2-OBJETIVOS	15
2.1 - Objetivos gerais	16
2.2 - Objetivos específicos	16
3-MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 - Meio de cultura	18
3.2 - Animais de experimentação.....	18
3.3 - Parasitas e células LLCMK ₂	18
3.4 - Manutenção das formas tripomastigotas e amastigotas em células LLCMK ₂	19
3.5 - Purificação das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> para infecção in vitro	19
3.6- Preparação do extrato bruto de <i>T. cruzi</i>	20
3.7- Parasitemia e sobrevivência	20
3.8- Solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	20
3.9- Efeito da temperatura e do tempo de incubação da proteína com detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	21
3.10- Preparação do antisoro contendo anticorpos contra determinantes antigênicos de <i>T. cruzi</i>	21

3.11- Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	21
3.12- <i>Western blotting</i>	22
3.13- Coloração do gel pela prata	23
3.14- Preparação dos proteolipossomos e lipossomos	23
3.15- Medidas da distribuição de tamanho dos proteolipossomos por espalhamento de luz dinâmico.....	24
3.16- Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.....	25
3.17- Estimativa da concentração de lipídeos nos proteolipossomos	25
3.18 - Dosagem de proteínas.....	26
3.19 - Dosagem de fosfato inorgânico	26
3.20 - Dosagem de colesterol.....	27
3.21 - Obtenção de macrófagos peritoneais murinos.....	27
3.22 - Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	28
3.23 - Avaliação da atividade microbicida dos macrófagos	28
3.24 - Imunização de camundongos com os proteolipossomos	29
3.25 - Obtenção das células do baço e linfonodos	30
3.26- Avaliação da produção de citocinas <i>in vitro</i> pelas células do baço e linfonodos de camundongos BALB/c imunizados com os proteolipossomos	31
3.27- Detecção de citocinas	31
3.28- Análise estatística	33
4 – RESULTADOS	34
4.1 - Identificação das proteínas de membrana das formas amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
4.2 - Solubilização das proteínas de membrana de <i>T. cruzi</i>	37
4.3 - Análise do perfil das proteínas de membrana de tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> após solubilização nas diversas concentrações do detergente.....	39

4.4- O efeito da temperatura e tempo de incubação com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	41
4.5 - Preparação e caracterização do proteolipossomo	43
4.6 - Avaliação da ativação de macrófagos murinos <i>in vitro</i>	51
4.7 - Avaliação da parasitemia e sobrevivência em camundongos BALB/c após imunização com proteolipossomo	53
4.8 - Avaliação da proteção contra a infecção com <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c após a variação no número de imunizações e nos intervalos entre o desafio	53
4.9- Detecção de citocinas no lavado intraperitoneal de camundongos BALB/c imunizados	57
4.10 - Avaliação da resposta imune adaptativa <i>in vitro</i>	59
5 – DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 2 - Visualização do perfil protéico de formas amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	36
Figura 3 - Solubilização de proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 4 - Análise do perfil protéico de formas amastigotas e tripomastigotas nas diferentes concentrações do detergente.	40
Figura 5 - Efeito da temperatura e do tempo de incubação na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	42
Figura 6 – Gradiente de densidade de sacarose	44
Figura 7 - Visualização do perfil antigênico das proteínas incorporadas no proteolipossomo.....	46
Figura 8 – Análise da distribuição de tamanho dos proteolipossomos preparados com DPPC, DPPS e colesterol.....	47
Figura 9 – Cromatografia em camada delgada (TLC).....	49
Figura 10 – Inibição da replicação de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c imunizados com 20 µg de proteolipossomo	52
Figura 11 – Avaliação da parasitemia e sobrevida de camundongos BALB/c imunizados com as concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg de proteolipossomo	55
Figura 12 – Avaliação da parasitemia e sobrevida de camundongos BALB/c após uma ou duas imunizações com 20 µg de proteolipossomo	56
Figura 13 – Detecção de citocinas no sobrenadante de células peritoneais de murinos imunizados.....	58
Figura 14 – Detecção de citocinas no sobrenadante de células do baço de murinos imunizados.....	61
Figura 15 - Detecção de citocinas no sobrenadante de células dos linfonodos de murinos imunizados.....	62
Tabela I – Composição lipídica dos lipossomos e proteolipossomos determinada por TLC	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA: soro albumina bovina

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)

DAB: 3,3' diaminobenzidina

DNA: ácido desoxirribonucléico

DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina

DPPS: dipalmitoil fosfatidilserina

E-64: *trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane*

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GPI: glicosil fosfatidil inositol

IFN- γ : interferon- γ

IgG: imunoglobulina G

IL-: interleucina

i.p.: intraperitoneal

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

NO: óxido nítrico

p.i.: pós infecção

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

Ponceau S: *3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalenedisulfonic acid*

RPMI-1640: Meio de cultura (Roswell P. Mem. Inst.)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SFB: soro fetal bovino

TGF- β : Fator β de crescimento e transformação

Th1: *T helper 1*

Th2: *T helper 2*

TLC: cromatografia em camada delgada

TNF- α : Fator crescimento e transformação-beta

VSG: glicoproteína variável de superfície

WHO: World Health Organization

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

A reconstituição de proteínas de membrana em lipossomos é uma abordagem utilizada para aumentar as propriedades antigênicas dessas moléculas. No presente estudo, foram gerados proteolipossomos carreadores de proteínas de *T. cruzi* para usá-los como imunógenos em camundongos BALB/c. Formas tripomastigotas e amastigotas foram primeiramente sonicadas e misturadas com o detergente SDS. A solubilização máxima foi alcançada instantaneamente usando 0.5 mg/mL de proteína e 0.5 % de SDS, com uma recuperação de 94% de proteínas solúveis. A incorporação de proteínas presentes no extrato solubilizado no sistema de lipossomo preparado com este protocolo, apresentou 80% de reconstituição. Para preparar os proteolipossomos, foram utilizados dipalmitoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilserina e colesterol incubados com proteínas solúveis do parasita. Camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal com 20 µg de proteolipossomo foram capazes de gerar anticorpos que em *Western blotting* reagiram com as proteínas do *T. cruzi*. Foi investigado a capacidade de células peritoneais de camundongos imunizados impedir a replicação intracelular do parasita *in vitro*. Após 72 h de cultura, o número de parasitas intracelulares em macrófagos imunizados diminuiu significativamente quando comparados aos controles. Embora o tratamento com proteínas de membrana das formas tripomastigotas e amastigotas incorporadas em lipossomos estimulem a produção de IL-12 pelas células do baço, gerem anticorpos e ativem macrófagos, os camundongos imunizados com os proteolipossomos não foram protegidos contra o desafio com tripomastigotas de *T. cruzi*.

ABSTRACT

The reconstruction of membrane proteins into liposome is a useful tool to enhance the antigenic properties of these molecules. In the present study, was generated proteoliposome carrying proteins of *T. cruzi* for use as immunogens in BALB/c mice. Parasite trypomastigote and amastigote forms were first sonicated and mixed with SDS. The maximum of solubilized proteins was achieved instantaneously using 0.5 mg/mL of protein and 0.5% SDS with 94% recovery of soluble proteins. The incorporation of the proteins present in solubilized extract into liposomes system prepared in that protocol, presented 80% of reconstitution. To prepare proteoliposome, was used a protocol in which dipalmitoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylserine and cholesterol were incubated with the parasite proteins. BALB/c mice immunized with 20 µg of proteoliposomes were able to generate antibodies which, in *Western blotting*, reacted with the proteins of *T. cruzi*. We further investigated the ability of peritoneal cells from immunized mice to arrest the intracellular replication of trypomastigotes, *in vitro*. After 72 h of culture, the number of intracellular parasites in immunized macrophages decreased significantly, as compared to control. Despite the fact that exposure of mice to proteins of trypomastigotes plus amastigotes incorporated into liposomes stimulated IL-12 production by spleen and lymph node cells of the immunized mice, generated antibodies and activated macrophages, the immunized mice with proteoliposomes were not protected against *T. cruzi* intraperitoneal challenge.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Descoberta em 1909, por Carlos Chagas, a tripanossomíase americana, ou Doença de Chagas, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário parasita hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Tripanosomatidae (Hoare & Wallace, 1996).

Sob condições naturais, o *T. cruzi* infecta mamíferos silvestres e humanos através da picada do inseto hematófago da família Reduviidae, quando tripomastigotas metacíclicas são depositadas na pele do hospedeiro (De Souza, 2000). Apesar desta ser a principal via de transmissão nas áreas endêmicas, o *T. cruzi* pode ser transmitido para o homem por mecanismos alternativos como: transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidente de laboratório, transmissão oral e congênita (Gomes, 1997). Aproximadamente 20 milhões de pessoas na América Latina estão infectadas e 30% da população vive em áreas endêmicas estando expostas ao risco de infecção (De Souza, 2000).

Os insetos vetores do *T. cruzi* são encontrados em toda América, desde o Sul dos Estados Unidos até o Sudoeste da Argentina (WHO, 2002). A disseminação dos vetores ocorre principalmente nas regiões rurais onde as instalações precárias de moradia se apresentam como um habitat ideal para os vetores, devido à proximidade com o ciclo natural. A transmissão da doença pelo invertebrado estaria controlada em países como Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (Moncayo, 2003), porém surtos localizados podem ocorrer (Schmunis & Cruz, 2005).

Na fase aguda, a doença de Chagas se caracteriza pela presença de parasitas circulantes e por um processo inflamatório inespecífico no sítio de entrada, que pode ser o olho (sinal de Romanã) ou a pele (chagoma). Embora grande parte dos indivíduos infectados apresente uma fase aguda assintomática, crianças infectadas muitas vezes desenvolvem febre,

hepatoesplenomegalia, adenopatia e miocardite (Andrade, 1990). Após um ou dois meses, a parasitemia regride e desenvolve-se, concomitante com o estabelecimento da imunidade adquirida, um estágio crônico que pode se estender por anos, sem sinais ou sintomas. Além disso, 20 a 30% dos pacientes evoluem para um quadro de morbidade subsequente aos danos patológicos irreversíveis ocorridos, como inflamação do tecido cardíaco, dilatação do esôfago e cólon (Dias, 1995; Soares et al., 2001).

O diagnóstico sorológico tem pouca importância na fase aguda da doença, uma vez que métodos laboratoriais para pesquisa de IgM, como fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência indireta, apresentam baixa sensibilidade nesta fase (Camargo & Amato-Neto, 1974). Em contraposição, os métodos parasitológicos indiretos, como hemocultura e xenodiagnóstico, apresentam uma sensibilidade que se aproxima de 100%. Na fase aguda da doença é possível a pesquisa do parasita ao microscópio, no sangue retirado do paciente. Com o desenvolvimento de técnicas de engenharia genética, conseguiu-se isolar vários fragmentos de DNA que codificam antígenos específicos de fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Os anticorpos IgG e IgM anti-SAPA (Shed Acute Phase Antigen), pesquisados pelo método de ELISA, podem estar presentes em 90% dos casos na fase aguda da doença (Umezawa *et al.*, 1996).

Durante a fase crônica, várias técnicas imunológicas para detecção dos anticorpos anti-*T. cruzi* tais como imunofluorescência indireta, hemaglutinação e ELISA são bastante sensíveis, com eficiência entre 95 e 100%, quando se empregam pelo menos duas técnicas diferentes (Schattschneider *et al.*, 1992).

1.2 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* no invertebrado, inicia-se quando o inseto vetor, durante o repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado infectado ingere formas tripomastigotas sangüíneas (delgada e flagelada), formas essas que colonizam o intestino médio do inseto, diferenciando-se em formas epimastigotas. Após a replicação, as formas epimastigotas migram para o intestino posterior onde se ligam à cutícula deste órgão por interações hidrofóbicas, antes de se diferenciarem em formas tripomastigotas metacíclicas (Burleigh & Andrews, 1995; Tyler & Engman, 2001). Este processo de diferenciação, denominado de metaciclogênese, parece ser disparado pela interação entre o flagelo e a cera da cutícula do intestino do vetor, e é mediado por AMP cíclico (Bonaldo et al., 1988, Gonzales-Perdomo, et al., 1988). Após a metaciclogênese, as tripomastigotas metacíclicas soltam-se da cutícula e são eliminadas juntamente com as fezes do inseto. Durante o novo repasto sangüíneo, o inseto vetor defeca na pele do hospedeiro vertebrado e as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes penetram na pele através da solução de continuidade causada pela picada do vetor. Quando as tripomastigotas metacíclicas entram no hospederio vertebrado, elas invadem as células através de um mecanismo no qual há o recrutamento de lisossomos para o ponto de ligação do parasita (Andrews, 1993). Esses lisossomos fundem-se com a membrana plasmática formando um compartimento vacuolar, permitindo a entrada do parasita. Inicia-se, assim, o ciclo intracelular que pode durar de 4 a 5 dias. O primeiro passo do ciclo intracelular é o rompimento da membrana vacuolar que ocorre de 1 a 2 horas após a invasão. Chegando ao citoplasma, o parasita diferencia-se em formas amastigotas (arredondada, sem flagelo aparente e imóvel) que proliferam por divisão binária. Após o período de replicação, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas,

seguinte-se a ruptura da célula hospedeira com a liberação dos parasitas na corrente sanguínea, podendo, então, serem ingeridos pelo inseto vetor, completando, assim, o seu ciclo de vida (Burleigh & Andrews, 1995; Tyler & Engman, 2001) (**Figura 1**).

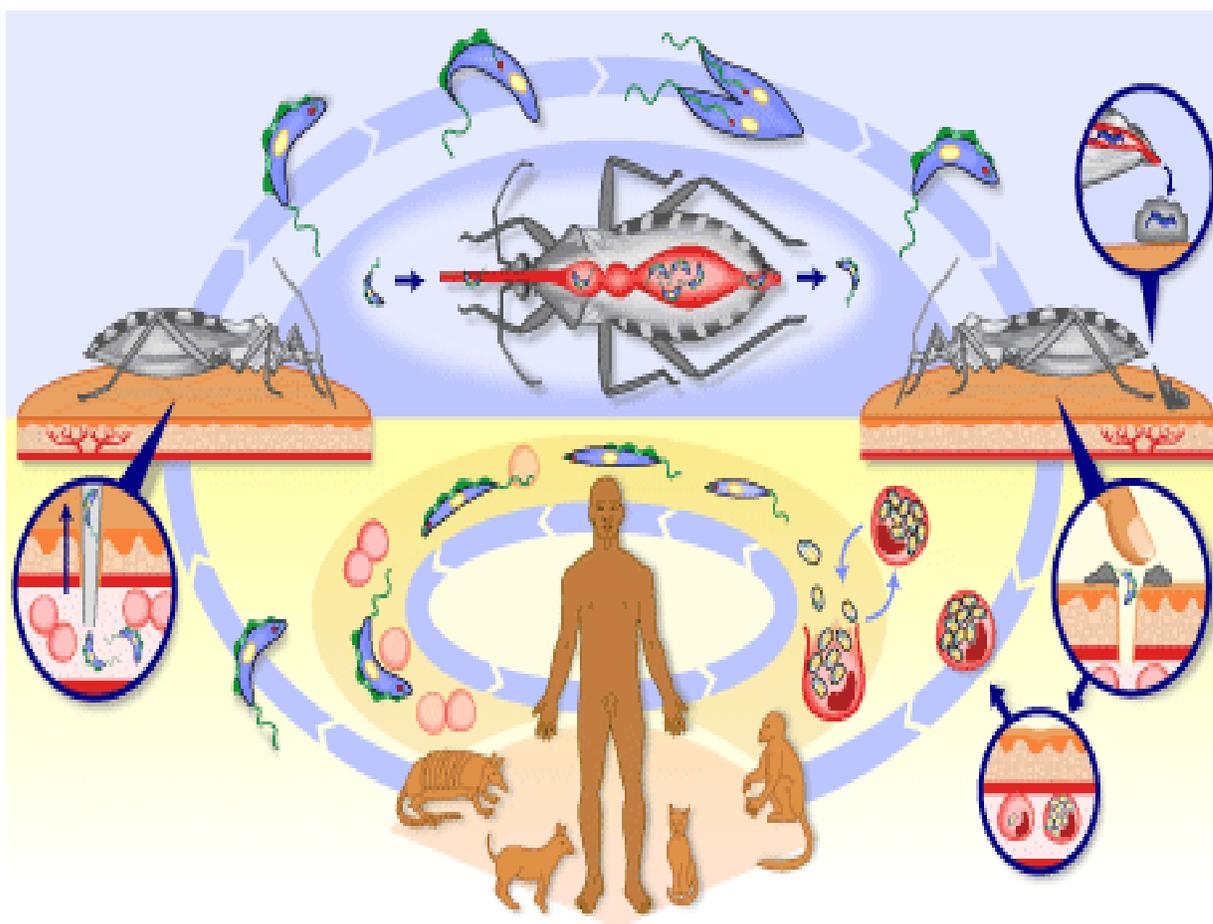


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2007).

1.3 Fatores de resistência e susceptibilidade do hospedeiro na Doença de Chagas.

A imunidade protetora contra a infecção por *T. cruzi* que contrapõem os mecanismos pelos quais o parasita escapa da resposta imune do hospedeiro não foram ainda totalmente esclarecidos, embora muitas evidências indiquem a participação da resposta imune celular (Tarleton, 1990) e humoral (Krettli & Brener, 1982; Takehara et al., 1981) nesse processo.

Nos hospedeiros infectados, tanto as formas amastigotas como as tripomastigotas induzem a produção de uma complexa resposta imunológica, envolvendo tanto a produção de anticorpos como uma resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Tarleton, 1996). Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ participam como mediadores da proteção, uma vez que a depleção de qualquer dessas subpopulações tornam os animais menos capazes de controlar a replicação do parasita, resultando em aumento da suscetibilidade à infecção (Tarleton, 1990).

Na resposta imune mediada por células T, dependendo das citocinas produzidas, as células T CD4⁺ podem ser divididas em dois subgrupos, *T helper 1* (Th1) e *T helper 2* (Th2) (Mosmann et al., 1986). As células com característica Th1 produzem várias citocinas, entre elas a interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e o interferon- γ (IFN- γ) que induzem preferencialmente a ativação de macrófagos e uma resposta imune mediada por células. Já as células com fenótipo Th2, produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10), influenciando a resposta imune humoral na mudança de isotipos das imunoglobulinas (Coffman et al., 1988).

Em infecções com patógenos intracelulares, como *Leishmania major* (Chatelain et al, 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (Kobayashi, 1997), e *Listeria monocytogenes* (Geginat et al, 1998), uma resposta Th1 forte e polarizada está associada à resistência, enquanto uma resposta Th2 está associada com suscetibilidade. Entretanto, com relação à infecção com o

T. cruzi, a ligação entre resposta Th1 e resistência não está suficientemente estabelecida. Há evidências de que a produção de IFN- γ e IL-12 na fase aguda da infecção esteja associada à resistência ao *T. cruzi* (Nabors & Tarleton, 1991; Minoprio & Murphy, 1993; Silva *et al.*, 1998). No entanto, o resultado de alguns estudos sugere a necessidade de um balanço entre a resposta Th1 e Th2 para o controle da infecção com *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994, Soares *et al.*, 2003).

Resultados obtidos *in vitro* indicam que os macrófagos e células dendríticas infectadas com *T. cruzi* possivelmente secretam citocinas como IL-12, TGF- β , IL-10 e TNF- α tanto no local da infecção como nos linfonodos e no baço, (Silva *et al.*, 1998). Outras citocinas, como IL-6, e IL-1 também seriam produzidas por macrófagos e célula endoteliais durante a infestação com o parasita (Tanowitz *et al.*, 1992; Truyens *et al.*, 1994).

Durante a imunidade inata, o IFN- γ atua de maneira inespecífica como mecanismo de defesa contra infecções, induzindo uma atividade tripanocida (Silva *et al.*, 1995) pela produção de óxido nítrico (NO), um dos principais intermediários reativos do nitrogênio (RNI) (Cardillo *et al.*, 1996; Vespa *et al.*, 1994). O óxido nítrico produzido pelos macrófagos ativados é citotóxico para o *T. cruzi*, matando o parasita que está dentro da célula (Silva *et al.*, 1995).

Estudos sugerem a importância do IFN- γ na resistência e suscetibilidade à infecção experimental em camundongos pelo *T. cruzi*, pois a administração de INF- γ recombinante em camundongos aumenta a resistência à infecção por este parasita levando à diminuição da parasitemia e o aumento da sobrevivência (Reed., 1988). Além disso, a suscetibilidade a este patógeno intracelular, observada quando há deficiência na produção de NO por macrófagos murinos, pode ser revertida pelo tratamento dessas células com IFN- γ (Dalton *et al.*, 1993).

Dados da literatura ressaltam o papel do TNF- α no metabolismo da produção de NO. Esta citocina atua de maneira autócrina, promovendo o metabolismo da L-arginina, que leva a produção de NO, que desempenha um papel importante no controle da quantidade de parasitas circulantes em animais infectados pelo *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1995).

Com relação a produção de TGF- β , um dos efeitos durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* em camundongos é permitir a replicação do parasita dentro da célula, devido à diminuição do metabolismo oxidativo (Ding *et al.*, 1990; Gazzinelli *et al.*, 1992) e bloqueio da função do INF- γ (Silva *et al.*, 1991).

1.4 Moléculas antigênicas que conferem resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

A existência de múltiplos estágios durante o ciclo de vida do *T. cruzi* faz com que o parasita sofra adaptações morfológicas, ocorrendo mudanças na composição da membrana plasmática em cada estágio do seu ciclo evolutivo. Em todas as formas do parasita, existem moléculas de superfície que estão envolvidas no estabelecimento e manutenção da infecção em humanos e camundongos (Colli & Alves, 1999) e que disparam ou servem como alvo para a resposta imunológica (Kalil e Cunha-Neto, 1996). Para entender melhor a interação do *T. cruzi* e a resposta imunológica, grupos de pesquisadores focalizaram o estudo na identificação e caracterização de moléculas antigênicas presentes durante todos os estágios do parasita. A classe mais importante dessas moléculas de superfície do *T. cruzi* são as mucinas. Os membros da super família das sialidases ou trans-sialidases, são glicoproteínas de superfície O-glicosiladas, que estão ancoradas à membrana do parasita pela âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Acosta-Serrano *et al.*, 1995). As âncoras de GPI das mucinas são importantes indutores da produção de óxido nítrico e de citocinas pró-

inflamatórias produzidas pelos macrófagos (Ameida *et al.*, 2000). Entre as mucinas alvo para linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no homem e no camundongo durante a infecção, estão a proteína 1 da superfície de amastigotas (ASP-1), a proteína 2 da superfície de amastigotas (ASP-2) e a TSA-1 presente em tripomastigotas intracelulares (Wizel *et al.*, 1997; Low *et al.*, 1998). Em formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, as mucinas são os principais aceptores de ácido siálico, transferindo o ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para a superfície do parasita (Schenkman *et al.*, 1994).

Outra classe de proteínas de superfície do *T. cruzi* são as cisteíno proteinases. A cruzipaina é uma cisteíno protease de 57 kDa, expressa principalmente em amastigotas, altamente homóloga com outros membros da família das papaíno proteases (Campetella *et al.*, 1990) que quando bloqueadas por inibidores de cisteíno-proteinases e anticorpos específicos para a cruzipaina, inibem a replicação intracelular do parasita *in vitro* (Meirelles *et al.*, 1992). Camundongos C57BL/6 imunizados com a cruzipaina disparam uma forte resposta imune, caracterizada por células Th1 e elevados níveis de IFN- γ (Guinazu *et al.*, 2004). Schnapp e colaboradores (2002) demonstraram que na imunização com a proteína recombinante, alguns dos epítomos responsáveis pela imunogenicidade da cruzipaina estão preservados, ativando tanto as células B como as células T CD4⁺ levando ao reconhecimento e lise da célula infectada com *T. cruzi*.

Existe, ainda, uma terceira classe de antígenos alvo, descrita por Saborio e colaboradores em 1989, que são proteínas denominada *paraflagelar rod protein* (PFR). Presentes no flagelo do *T. cruzi*, essas proteínas são altamente conservadas entre as diferentes cepas. Estudos de imunização utilizando uma preparação composta por quatro distintas seqüências dessa proteínas, designadas PFR 1-4, mostraram induzir uma resposta

celular Th1 associada a uma alta produção de INF- γ , capaz de reduzir os níveis de parasita circulante no sangue e proteger 100% o camundongo contra o inóculo letal de tripomastigotas de *T. cruzi* (Wrightsmann *et al.*, 1995, Miller *et al.*, 1996).

Em resumo, há evidência que todas essas moléculas são alvos capazes de estimular uma resposta imune específica e conferir certo grau de resistência à infecção pelo *T. cruzi*, com algum potencial imunoprolático.

1.5 Vacinação

Drogas para o tratamento da Doença de Chagas, como o Nifurtimox, não mais utilizado, e o Benznidazol, são eficientes somente na fase aguda da infecção e são extremamente tóxicas para o homem (Filardi & Brener, 1987). Além disso, parasitas naturalmente resistentes a essas drogas foram detectados em várias regiões da América Latina (Camandaroba *et al.*, 2003). Sendo assim, a principal estratégia utilizada na prevenção da doença de Chagas é a eliminação do inseto vetor doméstico e o controle da transmissão por transfusão sanguínea e congênita (Dias *et al.*, 2002).

As tentativas para se desenvolver vacinas contra infecções parasitárias que levem, a longo prazo, a um controle mais efetivo da doença foram inúmeras. No entanto o sucesso da aplicação dessas vacinas depende principalmente de uma melhor compreensão da resposta imune protetora, que possibilite a eliminação do parasita.

Atualmente estudos com células T CD8⁺ demonstraram um papel importante destes linfócitos no controle imune da infecção por *T. cruzi*. O efeito protetor da vacinação de animais com uma cepa avirulenta de *T. cruzi*, foi abolido após o tratamento com anticorpos

anti-CD8 (Tarleton *et al.*, 1990). Além disso, a ausência de células T CD8⁺ em camundongos mutantes para o gene da β 2-microglobulina determina um aumento na suscetibilidade à infecção (Tarleton *et al.*, 1992).

Em modelos murinos a transferência de IFN- γ produzidos pelas células T CD8⁺ específicas para epítomos do parasita, reduziram de maneira significativa a infecção e promoveram a sobrevivência dos camundongos contra a infecção letal ao *T. cruzi* (Wizel *et al.*, 1997). Apesar dessas evidências da participação das células T CD8⁺ na imunidade protetora experimental contra o *T. cruzi*, o mecanismo de eliminação do parasita ainda não foi esclarecido.

No que se refere à imunidade humoral, Krettli & Brener (1976) demonstraram que a transferência de soros de indivíduos chagásicos ou de camundongos infectados na fase crônica reduz de maneira significativa a parasitemia e protege camundongos contra o desafio letal à infecção com *T. cruzi*. Ensaios *in vitro* demonstraram que anticorpos protetores são capazes de agir aglutinando tripomastigotas, mediando a lise por complemento (Krettli *et al.*, 1979), facilitando a fagocitose e a opsonização (Lages-Silva *et al.*, 1987) e participando na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Okabe *et al.*, 1980; Lima-Martins *et al.*, 1985).

Recentemente novas estratégias de imunização utilizando vacinas de DNA com proteínas recombinantes e purificadas de *T. cruzi* estão sendo empregadas. Entre essas proteínas podemos destacar as transialidases (Costa *et al.*, 1998; Pereira-Chiccola *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 1999), TSA-1 (Garg & Tarleton., 2002; Wizel *et al.*, 1998), ASP-1 e ASP-2 (Garg & Tarleton., 2002). Esses antígenos mostraram serem capazes de induzir linfócitos T citotóxico e a ativação de células Th1, aumentando a resistência contra infecções experimentais pelo *T.*

cruzi. Vasconcelos *et al* (2004) compararam a eficácia protetora e a resposta imune de camundongos BALB/c e C57BL/6 após a vacinação genética simples ou combinada com plasmídeos contendo genes que codificam trans-sialidases (TS) e ASP-2. Os resultados mostraram que após serem desafiados, uma proporção significativa dos animais suscetíveis imunizados com o gene ASP-2 ou simultaneamente com ASP-2 e TS sobreviveram à infecção. Em contraste, a maioria dos camundongos imunizados com o gene TS ou o vetor sozinho, morreram. Este modelo foi usado também para um estudo da proteção *in vitro* e foi encontrado que a imunidade protetora está relacionada com a alta secreção de IFN- γ pelas células esplênicas na re-estimulação *in vitro* com ASP-2 e na presença de células T CD8⁺ ASP-2 específicas. Embora existam excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* em modelos experimentais de imunização, nenhuma vacina foi capaz de proteger 100% os animais da infecção letal, evitando o subsequente desenvolvimento de uma doença crônica contra a infecção por *T. cruzi*.

Assim, novas estratégias de vacinação devem ser testadas, otimizando as respostas imunes, utilizando inclusive, adjuvantes como forma de aumentar a imunogenicidade das proteínas candidatas à vacinas.

1.6 Lipossomos

Descritos por Bangham na década de 60, os lipossomos foram definidos como vesículas esféricas ocas, formadas espontaneamente quando fosfolípidos são dispersos em meio aquoso, onde a interação hidrofóbica resulta na formação de sistemas vesiculares unilamelares ou multilamelares mimetizando uma membrana biológica.

Atualmente os lipossomos são uma ferramenta usada como: (i) um sistema que

permite estudar forças entre sistemas anfífilicos; (ii) um modelo de membrana no qual podem ser inseridas proteínas de membrana de protozoários parasitas, bactérias, para serem estudadas e (iii) potenciais carreadores de drogas.

Existem vários tipos de lipossomos que podem ser classificados pelo método de preparação: evaporação da fase reversa (REV), obtidos por prensa francesa (FPV) e ainda por injeção (EIV), ou pelo número de bicamadas presentes nas vesículas: unilamelar (ULV), multilamelar (MLV). Quanto ao seu tamanho, eles são denominados por vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) (New., 1990; Vermuri & Rhodes., 1995). Os lipossomos podem ainda ser classificados de acordo com sua composição: (i) lipossomos convencionais; (ii) lipossomos pH-seletivos; (iii) lipossomos catiônicos; (iv) imunolipossomos; (v) lipossomos de longa duração e/ou circulação (Sharma & Sharma, 1997).

A eficiência dos lipossomos depende de vários parâmetros físicos, incluindo tamanho, carga de superfície do lipossomos, composição e estabilidade (Brewer, 1998; Ignatus 2000).

A escolha do melhor fosfolípídios sintético para a preparação de lipossomos, depende da natureza e carga do antígeno a ser encapsulado como, por exemplo, uma formulação de fosfolípídeos de carga negativa será vantajosa uma vez que irá atrair e encapsular mais antígenos positivos. Frequentemente o colesterol é adicionado para aumentar a estabilidade rígida da bicamada (Kersten, G.F.A & Crommelin, D.J.A 1995).

Uma ampla variedade de peptídeos e proteínas pode ser encapsulada ou inserida nessa membrana mimética. Dependendo da hidrofobicidade das proteínas antigênicas, elas podem ser completamente encapsuladas no lipossomo, parcialmente inseridas na bicamada lipídica ou parcialmente expressas na superfície da bicamada (Wassef *et al.*, 1994).

Pelo fato de serem biodegradáveis, fáceis de preparar e de baixa citotoxicidade, os lipossomos podem também ser utilizados como adjuvantes (Gregoriadis, 1990; Chikh e Schutze-Redelmeier, 2002), um efetivo veículo carreador de peptídeos e proteínas antigênicas para a geração de resposta celular e humoral *in vivo* aumentando sua imunogenicidade (Alison, 1974).

Protocolos de vacinação experimental em leishmaniose utilizando lipossomos como adjuvantes vem sendo aprimorados e mostram ser fortes candidatos a modelo de vacinação contra leishmaniose. Santos *et al.*, (2006) demonstraram que proteínas da membrana de amastigotas de *L. amazonensis* reconstituídas em lipossomos carregados negativamente, induzem um importante nível de proteção contra a infecção em camundongos BALB/c. Recentemente Badiee *et al.*, 2007 obtiveram uma proteção significativa em camundongos BALB/c imunizados com o antígeno LmSTI1 recombinante encapsulado em lipossomos, quando desafiados com *L. major*.

Estudos demonstrando a utilização de lipossomos em animais infectados pelo *T. cruzi* são praticamente inexistentes, destacando-se a utilização deste sistema na liberação controlada de drogas (Morilla *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi a construção de um sistema de lipossomos com proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* que fosse capaz de estimular uma resposta imunológica contra o parasita. E foi, ainda, o de verificar se a eventual imunogenicidade desta preparação se traduziria em uma eficiente imunidade protetora à infecção com tripomastigotas de *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema carreador de proteínas antigênicas das formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, empregando-se lipossomos, na perspectiva de ser usado como um imunógeno.

2.2 - Objetivos específicos

1. Obter um extrato bruto da forma amastigota e tripomastigota de *T. cruzi* e verificar a imunogenicidade das proteínas presentes neste extrato.
2. Definir a melhor concentração do detergente no processo de solubilização das proteínas de membrana presentes no extrato bruto e otimizar as condições de solubilização com relação à temperatura e tempo
3. Reconstituir em lipossomos as proteínas solubilizadas presentes no extrato bruto e caracterizar bioquimicamente os proteolipossomos.
4. Avaliar a capacidade de proteção de camundongos das linhagens BALB/c contra a Doença de Chagas experimental após a imunização com os proteolipossomos.
5. Verificar *in vitro* o perfil das citocinas produzidas pelas células do Baço e linfonodos dos camundongos BALB/c imunizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), preparado segundo instruções do fabricante, acrescido de sulfato de gentamicina (Ducto, Brasil) na concentração final de 50 mg/mL e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum Characterized, HyClone, Logan, Utah, USA) previamente inativado a 56°C por 30 minutos. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm (Sartorius, Göttingern, Alemanha).

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, com idade entre 8 a 12 semanas, provenientes do Biotério de Criação de Camundongos Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP).

3.3 Parasitas e células LLCMK₂

No presente trabalho foram utilizadas formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y. As formas tripomastigotas foram mantidas em camundongos Swiss no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP e coletadas através de punção cardíaca com seringa de 1,0 mL, contendo heparina. O sangue heparinizado, contendo as formas parasitárias, foi utilizado para a infecção de células epiteliais de rim de macaco (LLCMK₂) e as mesmas foram mantidas em meio RPMI-1640 completo. As formas amastigotas também foram mantidas em células LLCMK₂ como descrito no item 3.4

3.4 Manutenção das formas tripomastigotas e amastigotas em células LLCMK₂

As formas tripomastigotas obtidas do sangue de animais infectados foram mantidas em cultura de células LLCMK₂ em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ cujo meio de cultura era substituído a cada 48 horas. Após cinco dias de infecção, as formas tripomastigotas e amastigotas liberadas das células para o sobrenadante foram então coletadas e contadas em câmara hemocitométrica tipo Neubauer espelhada (Neubauer Improved, Labor Optik) em microscópio óptico (Olympus Optical Co., LTD, BX50F-3, Japão) com aumento de 400x e congeladas para serem utilizadas posteriormente na preparação do proteolipossomo. Antes do congelamento, o número de parasitas por mL era calculado utilizando-se a seguinte fórmula: Número de parasitas = média dos 4 quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10⁴

3.5 Purificação das formas tripomastigotas de *T. cruzi* para infecção *in vitro*

Para a purificação das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o sobrenadante das culturas de células LLCMK₂ infectadas foi coletado e centrifugado à temperatura ambiente por 10 min a 350 x g. Nessas condições, as formas tripomastigotas móveis permaneciam no sobrenadante, enquanto as células e restos celulares sedimentaram no *pellet*. Para concentrar as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante, este foi coletado e centrifugado a 1060 x g por 30 min a 4°C. Após essa centrifugação, o tubo contendo o *pellet* de parasitas foi mantido por 2 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante contendo predominantemente formas tripomastigotas foi coletado, rejeitando-se os 5 mL finais para evitar a contaminação com formas amastigotas, que tendiam a se depositar no fundo do tubo. Então, o número de tripomastigotas presente na preparação era quantificado em câmara hemocitométrica do tipo Neubauer espelhada (Neubauer Improved, Labor Optik)

em microscópio óptico (Olympus Optical Co, Japão) com um aumento de 400x para posterior utilização na infecção de macrófagos murinos.

3.6 Preparação do extrato bruto de *T. cruzi*

O *pellet* congelado das formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção 1:1 eram ressuspensos em Tris-HCl na concentração de 5 mM, pH 7.5, contendo 1.6 mM PMSF, 0.1 mM E-64 e 1 mM 1,10-fenantrolina. A suspensão foi sonicada a 4°C com um sonicador de ponta com 3 pulsos de 30 segundos a 60 W.

3.7 Parasitemia e sobrevida

A parasitemia foi determinada após o sétimo dia de infecção, em todos os animais infectados durante 30 dias ou até que os animais morressem. Para tal foi retirado 5µL de sangue periférico através de um pequeno corte na cauda e colocado sobre uma lâmina e recoberta com lamínula de 22x22 mm. A contagem do número de parasitas foi feita em 100 campos ao microscópio óptico com contraste de fase, com aumento de 400 vezes como previamente descrito por Melo & Brener 1978. A sobrevida foi acompanhada diariamente.

3.8 Solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*

Para solubilizar as proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto preparado como descrito no item 3.6 foram primeiramente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com diferentes concentrações do detergente SDS (dodecil sulfato de sódio). As concentrações de SDS variaram entre 0,1 a 1 % (p/v). As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por

1 hora e a porcentagem de proteína solúvel foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante conforme descrito no item 3.18.

3.9 Efeito da temperatura e do tempo de incubação da proteína com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas com SDS 0,5% por 0, 30 e 60 minutos, tanto a temperatura ambiente (25° C) como a 4° C. Após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora, a porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante conforme descrito no item 3.18.

3.10 Preparação do antisoro contendo anticorpos contra determinantes antigênicos de *T. cruzi*

Camundongos BALB/c foram infectados por via intraperitoneal com 3×10^2 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Dois meses após a infecção, o sangue dos animais foi coletado por via retrorbital para a obtenção do soro contendo os anticorpos contra os determinantes antigênicos do parasita.

3.11 Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE)

O perfil protéico foi determinado pelo método descrito por Laemmli (1970), utilizando equipamento BioRad, constando de fonte modelo Power Pac 300 e cubas modelo Mini-Protean® II Cell. Alíquotas do extrato protéico eram misturadas com tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 contendo 2,5% SDS, 20% glicerol, 5% de β -mercaptoetanol e 0,01% azul de bromofenol), desnaturadas por 5 minutos em banho-maria a 100°C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito a seguir.

Utilizando-se 5 % (p/v) de poliacrilamida no gel de empilhamento e 10 % (p/v) no gel de separação, a corrida era feita sob voltagem constante de 100 V por 45 minutos a 4°C, utilizando-se tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3, contendo 0,1% SDS. Padrão de peso molecular entre 10 a 205 kDa da Sigma (USA) ou da Fermentas (USA) foram utilizados em cada gel para determinar a mobilidade relativa das proteínas.

3.12 Western blotting

As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em condição desnaturante como descrito no item 3.11 e transferidas por corrente elétrica para membranas de nitrocelulose (Nitrocellulose-1, Gibco) utilizando o equipamento da BioRad (Mini Trans-Blot[®]). Após a transferência feita sob voltagem constante de 100 V a 4°C por 1 hora, a membrana foi corada com Ponceau S 0,5 % (p/v) em ácido acético 1 % (v/v) para a visualização das bandas protéicas e marcação do padrão de peso molecular. O corante foi retirado por lavagens sucessivas com água deionizada e a membrana bloqueada com tampão de bloqueio [PBS/Tween 20 0,05 % (v/v) contendo 5 % de leite em pó desnatado (p/v) (Molico, Nestlé, Brasil)] por 1 hora a temperatura ambiente). Posteriormente, a membrana foi lavada com tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,05 % v/v) e incubada durante 1 hora com o soro preparado como descrito no item 3.10 diluído 1:75 em tampão de bloqueio. A membrana foi lavada com tampão de lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 em tampão de lavagem. Após várias etapas de lavagem, a membrana foi revelada com 3,3' diaminobenzidina (DAB) na concentração de 0,5 mg/mL. Assim, as bandas protéicas imunogênicas foram visualizadas e as suas massas moleculares determinadas por correlação com o padrão revelado previamente com Ponceau S.

3.13 Coloração do gel pela prata

Para a visualização das proteínas fracionadas no SDS-PAGE, o gel foi corado pela prata segundo o método descrito por Blum *et al.* (1987). Após a corrida, o gel foi fixado por 24 horas com 100 mL de uma solução composta de metanol 50 % (v/v), ácido acético 12 % (v/v) e 50 µL de formaldeído. Em seguida à fixação, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50 % (v/v), com duração de 20 minutos cada lavagem. Posteriormente, o gel foi tratado com tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v) por 2 minutos e lavado 3 vezes com água deionizada, o gel foi então incubado durante 20 minutos em 100 mL de uma solução de prata [AgNO_3 0,1 % (p/v) e 75 µL de formaldeído]. O gel foi lavado novamente com água deionizada e incubado com 100 mL da solução reveladora [carbonato de sódio 3 % (p/v), tiosulfato de sódio 0,0002 % (p/v) e 75 µL de formaldeído]. Após a visualização das bandas a reação foi parada com a solução inativadora (metanol 50 % v/v, ácido acético 12% v/v) e o gel era embebido em solução de metanol 50% durante 20 minutos e fotografado.

3.14 Preparação dos proteolipossomos e lipossomos

Os proteolipossomos foram preparados pelo método de co-solubilização de lipídeos, proteínas e detergente. Na preparação do filme lipídico, 10 mg de lipídeos foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio, o qual foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução até sua completa evaporação. Posteriormente o filme lipídico foi mantido a vácuo por 1 hora para garantir a completa secagem do meio e então, ressuspenso em 2 mL de tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, contendo 25 mg/mL de SDS e mantidos por 1 hora a 60°C com agitações em intervalos de aproximadamente 10 minutos.

Os lipídeos solubilizados foram sonicados por 2 minutos a 240 W com um sonificador de ponta e em seguida foram mantidos em repouso por 45 minutos. Após esse período, a solução de lipídeos foi incubada durante 45 minutos a temperatura ambiente com 0,5 mg do sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,5 %.

Para realizar a remoção do detergente da suspensão foi utilizada resina hidrofóbica Calbiosorb[®] na proporção de 200 mg para cada mililitro de amostra com três trocas, duas a cada 2 horas e uma *overnight*. As duas primeiras incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação constante e a última foi realizada a 4°C. Após a decantação da resina, a suspensão foi coletada e centrifugada a 140.000 x g por 1 hora a 4°C. O *pellet*, constituído dos proteolipossomos, foi ressuspenso em 1 mL de tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,5.

A preparação dos lipossomos foi realizada empregando-se a mesma metodologia, porém ao invés da adição de 0,5 mg de proteína, foi acrescentado à suspensão o tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,5 contendo 0,5% de SDS para manter a mesma relação lipídeo:detergente.

Os lipídeos utilizados na preparação do proteolipossomo e lipossomo foram: dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS) e colesterol nas seguintes razões em massa: 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol.

3.15 Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico

As medidas de distribuição de tamanho dos proteolipossomos foram realizadas empregando-se o equipamento da Malvern Instruments Ltda (Zetasizer 3000HS_A).

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, o diâmetro médio é determinado a partir do coeficiente de difusão das vesículas quando estas se movem ao acaso devido ao movimento Brawniano.

3.16 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Um contínuo gradiente de sacarose foi preparado como descrito por Daghastanli *et al.* (2004). Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra (sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,5%, proteolipossomos ou lipossomos) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose de 1 a 15% (p/v) em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, com uma densidade variando de 0.996 a 1.062) usando um Gradient Maker (Hoefer Scientific Instruments, USA). As amostras foram centrifugadas a 180.000 x g usando um rotor vertical (Mod. P65VT3) de uma ultracentrífuga Hitachi (Mod. 55PT-72) por 4 horas a 25°C. Frações de 0,5 mL foram coletadas e posteriormente foram analisadas quanto à concentração de proteína pelo método de Read e Northcote (1981) e a concentração de fosfato inorgânico oriundo da hidrólise dos fosfolídeos, conforme descrito por Chen *et al* (1956).

3.17 Estimativa da concentração de lipídeos nos proteolipossomos

A constituição lipídica dos proteolipossomos e lipossomos foi determinada por cromatografia em camada delgada (TLC) depois do tratamento das amostras com clorofórmio:metanol 1:1 (v/v). A placa de sílica para TLC (Sigma, USA) foi previamente ativada a 100°C por 2 horas e posteriormente as amostras foram aplicadas. Após a secagem das amostras, a placa foi submetida a dois solventes, na mesma direção. O solvente

primário foi preparado com clorofórmio:metanol:amônia nas proporções 65:35:5 (v/v) e o secundário com clorofórmio:metanol:acetona:ácido acético:água nas proporções 10:2:4:2:1 (v/v). Após a cromatografia, os lipídeos foram detectados com vapores de iodo. As manchas, correspondentes a cada lipídeo, foram marcadas e a placa ficou descoberta até a descoloração total. A sílica, correspondente a cada mancha, foi raspada e o lipídeo foi extraído utilizando-se clorofórmio. Os fosfolipídeos e o colesterol foram quantificados pelos métodos descritos nos itens 3.19 e 3.20 respectivamente.

3.18 Dosagem de proteínas

A concentração protéica das amostras foi determinada pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2 % (p/v) utilizando-se como padrão o BSA.

Para a determinação da concentração de proteínas no sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,5 % ou dos proteolipossomos coletados após a centrifugação em gradiente de sacarose foi empregado o método descrito por Read e Northcote (1981), utilizando-se também BSA como padrão.

3.19 Dosagem de fosfato inorgânico

O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise dos fosfolipídeos foi quantificado utilizando-se o procedimento descrito por Chen *et al.* (1956). Aliquotas de 200 µL da amostra foram digeridas com 0,5 mL de ácido nítrico 65% (v/v) a temperatura de 120°C, até a completa secagem. Em seguida, as alíquotas foram ressuspensas em 0,5 mL de água destilada e misturadas com 1,0 mL do reagente (1 parte de ácido ascórbico 10% (p/v) para

6 partes da solução de molibdato de amônio 3,4 mM e ácido sulfúrico 0,45 mM). As amostras foram mantidas por 20 minutos em banho-maria a 45°C e submetidas à análise espectrofotométrica utilizando-se um comprimento de onda de 820 nm. As determinações da concentração de fosfato inorgânico foram estimadas a partir da regressão linear dos valores obtidos.

Para a obtenção da curva padrão foram utilizadas concentrações de 5 a 80 nM de fosfato preparado a partir de uma solução estoque de dihidrogênio fosfato de sódio 1,0 mM.

3.20 Dosagem de colesterol

As concentrações de colesterol foram determinadas pelo método descrito por Higgins (1987) utilizando-se como padrão uma solução de colesterol 0,01% em ácido acético glacial. Após a completa secagem das alíquotas através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução foi adicionado 1,5 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de uma solução constituída de cloreto de ferro hexa-hidratado 2,5% (p/v) em ácido ortofosfórico 85% (p/v) diluído 12,5 vezes em ácido sulfúrico concentrado. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica utilizando-se um comprimento de onda de 550 nm.

3.21 Obtenção de macrófagos peritoneais de murinos.

Para a obtenção de macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos BALB/c com idade entre 8-12 semanas, previamente imunizados com 20 µg de proteolipossomo. Após uma semana da imunização, foram injetados 5 mL de meio RPMI-1640 incompleto

gelado na cavidade intraperitoneal (i.p.) desses animais e em seguida esse volume foi aspirado. O líquido peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 25°C (Beckman Instruments, J2-HS Centrifuge, USA) e o precipitado contendo as células foi lavado duas vezes com 10 mL de meio incompleto a 1500 rpm por 10 min a 25° C e ressuspenso em 5 mL de meio RPMI-1640 completo. As células obtidas no precipitado foram contadas em câmara hemocitométrica tipo Neubauer espelhada. 1,0 mL de meio RPMI-1640 contendo 1×10^6 células foi distribuído em cada poço de uma placa de 24 poços (Nalge Nunc International Naperville, IL, USA), recoberta por lamínula de 13 mm. Em seguida, as células foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, Inc., USA).

3.22 Infecção de macrófagos *in vitro*

Os macrófagos obtidos conforme descrito no item anterior foram infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y na proporção de 1 parasita: 1 macrófago. Após 4 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, os parasitas extracelulares foram removidos por lavagem com meio RPMI-1640 e as lamínulas eram coradas como descrito a seguir.

3.23 Avaliação da atividade microbicida dos macrófagos

Para estimar a porcentagem de macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi*, as lamínulas eram coradas pela técnica May Grünwald-Giemsa (MGG) (Giannis *et al.*, 1992) e 100 macrófagos eram contados entre infectados e não infectados em microscópio óptico

em imersão. Os valores foram representados pela média \pm SE. Para essa coloração, o material sobre as lamínulas foi inicialmente fixado através da adição de uma pequena quantidade de SFB. O excesso de SFB foi retirado e após a secagem das lamínulas, o corante May Grünwald-Giemsa foi adicionado aos poços e depois de 1-3 minutos, o mesmo volume de água destilada foi adicionado junto ao corante. Todo o volume foi retirado e o corante Giemsa foi adicionado, após 15 minutos as lamínulas foram retiradas e lavadas com água deionizada, colocadas para secar e montadas sobre lâmina.

3.24 Imunização de camundongos com os proteolipossomos.

Grupos de seis animais foram imunizados, com tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, lipossomo; EBS (sobrenadante do extrato bruto solubilizado com SDS 0,5 %) ou proteolipossomos. Após 3 ou 4 semanas, os animais foram desafiados com 300 formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* cepa Y, com a concentração tendo sido determinada em experimentos prévios. A taxa de sobrevivência foi avaliada diariamente e a parasitemia periodicamente durante 30 dias após a infecção, como descrito por Krettli e Brener (1976). Alguns parâmetros foram variados durante o experimento de imunização:

1. Concentração dos proteolipossomos: 5, 10, 20, 40 μ g.
2. Número de imunizações: 1 e 2 imunizações

Para que o sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,5 % fosse utilizado nesse ensaio, a retirada do detergente se fez necessário. Para tal, cada mililitro da suspensão foi incubado duas vezes com 62 mg da resina Calbiosorb[®] por 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação constante.

3.25 Obtenção das células do baço e linfonodos

A cultura das células de baço foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bonato e colaboradores (2001). Resumidamente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os baços foram coletados em 2 mL de meio RPMI-1640 incompleto (Sigma) e mantidos em gelo. Em câmara de fluxo laminar os baços foram difulssionados e as células obtidas foram incubadas por 3 minutos em tampão de lise na proporção de células para tampão de 2:5 (v:v). Após adicionar o tampão no material contendo as hemácias, as células não lisadas foram lavadas duas vezes, diluídas em meio RPMI-1640 completo (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA). As células recuperadas foram então contadas em câmara de Neubauer e um volume de 1 mL da suspensão do baço contendo 1×10^6 células foi distribuído em cada poço da placa de 24 poços, mantidas por 2 horas a 37°C em estufa com atmosfera 5% de CO_2 (Nalge Nunc International Naperville, IL, USA).

As células dos tecidos linfóides foram obtidas por rompimento mecânico da cápsula dos linfonodos e as células liberadas foram centrifugadas a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em meio RPMI 1640-incompleto. Uma nova lavagem das células com meio RPMI foi realizada, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI-completo. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/mL.

3.26 Avaliação da produção de citocinas *in vitro* pelas células do baço e linfonodos induzida pela imunização com os proteolipossomo

Camundongos da linhagem BALB/c foram divididos em 4 grupos:

Grupo	Desafio
Grupo I Imunizado- 20 µg EBS	Desafiado
Grupo II Imunizado- 20 µg proteolipossomo	Desafiado
Grupo III Controle - PBS	Desafiado
Grupo IV Controle - PBS	Não Desafiado

Para a avaliação *in vitro* da resposta imune adaptativa produzida por esses quatro grupos experimentais, placas de cultura de macrófagos obtido de camundongos naive, foram cultivados e infectados como descrito nos item 3.21 e 3.22. Após 4 horas de infecção, os parasitas extracelulares foram removidos e as células do baço e linfonodos de cada grupo experimentais obtidas com descrito no item 3.25, foram incubadas na proporção 1 macrófago: 1célula baço ou 1macrófago: 1célula do linfonodo por 48 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Depois de 48 horas os sobrenadantes foram coletados e armazenados a - 20°C para dosagem de citocinas por ELISA como descrito a seguir.

3.27 Detecção de citocinas

A detecção de citocinas foi realizada utilizando o método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Placas de 24 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates) foram sensibilizadas com 100 µL da solução de anticorpo monoclonal purificado para as citocinas de interesse (PharMigen, San Diego,CA, USA- citados na tabela abaixo),

diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1 , pH 9,0) numa concentração final de $1\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas a 4°C *overnight* e posteriormente lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec Química Fina Ltda) e bloqueadas com $200\mu\text{L/poço}$ com uma solução de PBS contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco BRL) (PBS/SFB 10%). Após a incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas. As amostras foram adicionadas, $100\mu\text{L/poço}$, juntamente com a curva padrão de citocina recombinante, diluída na base 2 em PBS / SFB 10% / Tween 0,05%, e incubadas *overnight*, a 4°C . Após lavagem, foi feita incubação por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal conjugado com biotina específico para a citocina de interesse (PharMigen, San Diego, CA, USA), adicionando-se $100\mu\text{L/poço}$ do anticorpo diluído em PBS / SFB 10% / Tween 0,05%, em uma concentração final de $0,5\mu\text{g/mL}$. Decorrido o período de incubação, procedeu-se mais uma etapa de lavagem e adicionou-se $100\mu\text{L/poço}$ de solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kitTM, diluída 100 vezes (Dako, Carpinteira, CA, USA) e incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do substrato OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) após procedimento de lavagem. A reação foi finalizada pela adição de $50\mu\text{L/poço}$ de ácido sulfúrico 16% (Merck & Co. Inc). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (Quant Bio-Tek Instruments Inc.) em 490nm. A determinação das concentrações das citocinas foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras, em relação aos da curva padrão. Todos os anticorpos e citocinas recombinantes foram adquiridos da PharMigen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de detecção das citocinas foram: 6.8 pg/mL para IFN- γ , 9.6 pg/mL para IL-12 e 43 pg/mL para IL-10. E o ponto mais concentrado da curva para IL-10 e IFN- γ foi de 10000 pg/mL e para IL-12 foi de 5000 pg/mL .

	Anticorpo Purificado	<i>Anticorpo Biotinilado</i>
IFN-γ	Clone: R4-6A2 Isotipo: IgG1 de rato	<i>Clone: XGM1.2</i> <i>Isotipo: IgG1 de rato</i>
IL 10	Clone: JES5-2A5 Isotipo: IgG1 de rato	<i>Clone: SXC-1</i> <i>Isotipo: IgM de rato</i>
IL 12	<i>Clone: 9A5</i> <i>Isotipo: IgG2 de rato</i>	<i>Clone: C17.8</i> <i>Isotipo: IgG2a de rato</i>

3.28 Análise estatística

Para realização da análise estatística utilizou-se o programa Prisma 4.0. Foi feita a análise de variância (ANOVA) seguida do teste t não pareado para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação das proteínas antigênicas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Para verificarmos a presença de proteínas antigênicas na membrana de formas amastigotas e tripomastigota de *T. cruzi*, ambas as formas do parasita foram isoladas conforme descrito no item 3.4 e 3.5 de Material e Métodos. O material após sonificado foi ultracentrifugado e no sobrenadante obtido foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Hartree (1972). Pela dosagem de proteínas foi verificado que cerca de 45 % das proteínas já se apresentavam na forma solúvel.

Para visualizar as proteínas presentes no *pellet* e no sobrenadante após a centrifugação, foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE. Como mostra a **Figura 2A**, foram visualizadas bandas na faixa de 14 a 66 kDa de peso molecular, sendo algumas bandas mais intensas na faixa de 40 a 70 kDa, em 14 kDa e 24 kDa.

Para avaliar a antigênicidade dessas proteínas de tripomastigotas e amastigotas, foi realizado um *Western blotting* utilizando soro de camundongos infectados. Como mostra a **Figura 2B**, as proteínas solúveis presentes na membrana de ambas as formas do parasita reagem com o soro contendo anticorpos contra determinantes imunogênicos de *T. cruzi*.

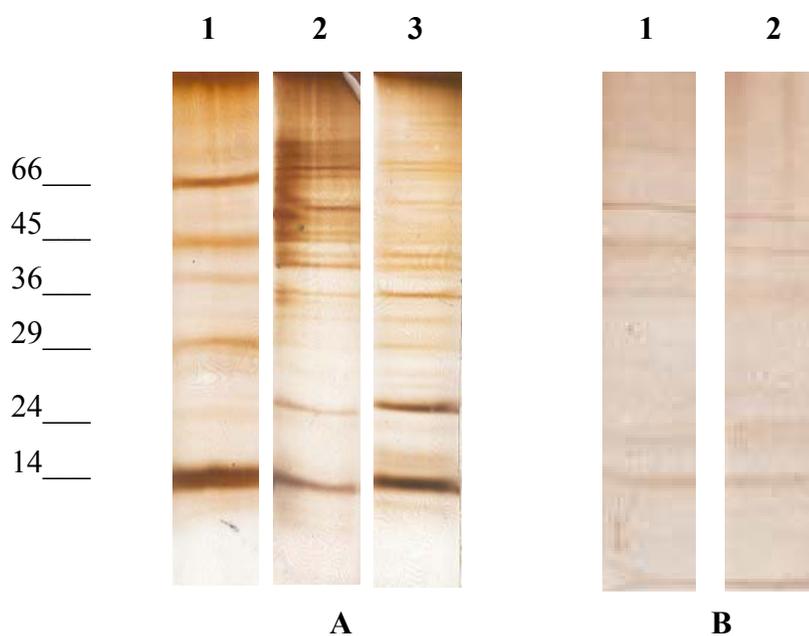


Figura 2. Visualização do perfil protéico das frações de membrana de formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. (A) Eletroforese em condições desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata. (1) Padrão de massa molecular em kDa (2) extrato bruto de tripomastigota; (3) extrato bruto de amastigota. (B) *Western blotting*. Análise do sobrenadante do extrato bruto de proteínas. (1) tripomastigota e (2) amastigota de *T. cruzi*, com o soro preparado como descrito no item 3.10 de Material e Métodos.

4.2 Solubilização das proteínas de membrana de *T. cruzi*.

Como observado na **Figura 2B**, existem proteínas antigênicas tanto na membrana de formas amastigotas como na membrana de tripomastigotas. Com base neste achado, decidimos preparar um extrato bruto de proteínas de ambas as formas, como descrito no item 3.6 de Material e Métodos. Para solubilização, alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 1 hora a temperatura de 25° C com concentrações de 0,1% (w/v), 0,5% (w/v) ou 1% (w/v) do detergente SDS.

Os resultados apresentados na **Figura 3** indicam que, para uma quantidade fixa de proteína (0,5 mg/mL) de extrato bruto, a concentração mais eficiente do detergente na solubilização de proteínas de membrana de *T. cruzi* foi 0,5% (w/v). A dosagem de proteínas feita pelo método de Hartree (1972), mostrou uma recuperação de 94% de proteínas solúveis após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora. Na concentração de 1% de SDS não houve aumento na recuperação de proteínas solúveis do extrato bruto (**Figura 3**).

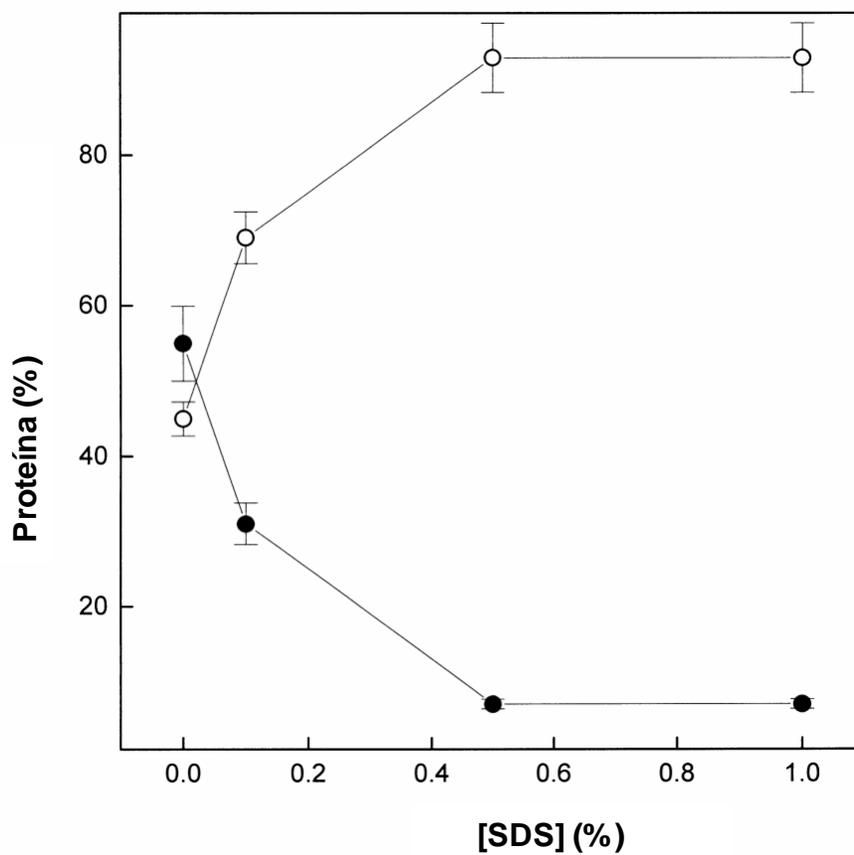


Figura 3. Eficiência na solubilização de proteínas nas frações de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi* utilizando-se o detergente SDS. Aliquotas de 0.5 mg/mL de extrato bruto foram incubadas a 25°C com SDS nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% de SDS. Após 1h, as proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100,000 x g por 1 h. Porcentagem de proteínas: (○) solubilizadas; (●) não solubilizadas.

4.3 Análise do perfil das proteínas de membrana de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* após solubilização nas diversas concentrações do detergente

Com o objetivo de visualizar o perfil protéico do extrato bruto após o tratamento com as diversas concentrações do detergente SDS, foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE. Os resultados da **Figura 4** evidenciam que o perfil eletoforético do sobrenadante e do *pellet* são muito similares quando as concentrações de SDS de 0,1% e 0,5% (w/v) são utilizadas (**Figura 4A, linha 3 e 4, a e b**). No entanto, o extrato de proteínas solubilizadas com 0,5% (w/v), como determinado nas dosagens de proteínas, permitiu uma maior recuperação de proteínas solúveis (**Figura 4A linha 4A**). Consistente com esses dados, o *pellet* exibiu discretas bandas protéicas (**Figura 4A linha 4b**), indicando a concentração de 0,5% de SDS como a mais adequada para nossa preparação antigênica.

Como o SDS é um detergente considerado altamente desnaturante, foi realizado um *Western blotting* destas proteínas solubilizadas para verificar se o tratamento com o detergente alterava de maneira considerável a atividade antigênica dessas proteínas. Como mostra a **Figura 4B**, tanto o extrato bruto de proteínas de *T. cruzi* sem SDS e das proteínas solubilizadas com SDS 0,5% (**linha 1 e 2, respectivamente**) são capazes de reagir com soro contendo anticorpos produzido contra proteínas de *T. cruzi*.

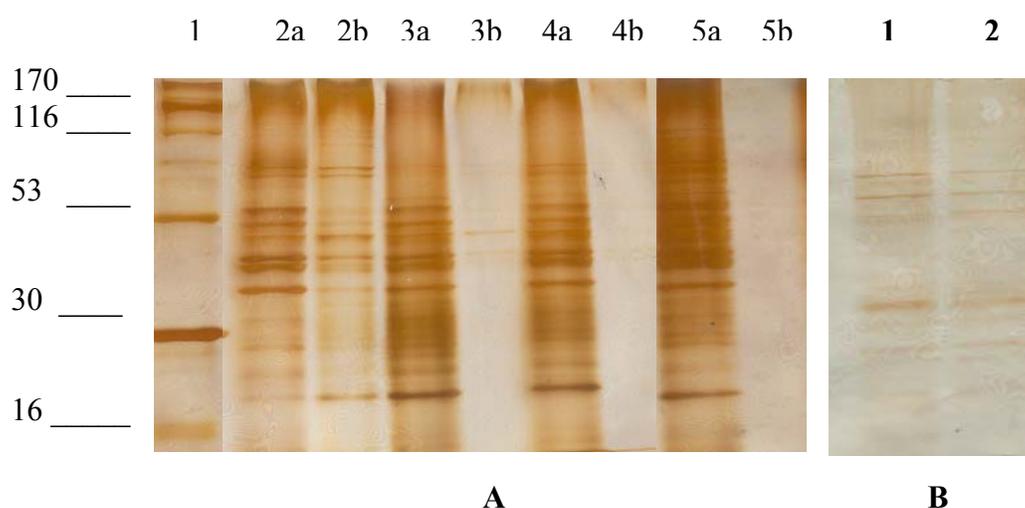


Figura 4. Análise do perfil protéico das frações de membrana das formas amastigotas e tripomastigotas após a solubilização nas diferentes concentrações do detergente SDS. (A) Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e coloração pela prata. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 1 hora à 25°C com diferentes concentrações do detergente, como descrito em Material e Métodos. **(a)** sobrenadante de proteínas solubilizadas de *T. cruzi*, e **(b)** pellet de proteínas de *T. cruzi* ressuspendido após centrifugação a 100.000 x g. Linha: **(1)** padrão de massa molecular de proteínas em kDa **(2)** proteínas recuperadas sem SDS, **(3)** 0,1% (w/v) SDS, **(4)** 0,5% (w/v) SDS, **(5)** 1% (w/v) SDS. **(B) Western blotting.** Análise do **(1)** extrato bruto e **(2)** extrato de proteínas solubilizadas com SDS 0,5% com soro preparado como descrito no item 3.10 e 3.12 de Material e Métodos.

4.4 O efeito da temperatura e tempo de incubação com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*.

Uma vez definido que a maior solubilização das proteínas de membrana podia ser obtida com 0,5% SDS e com extrato bruto a 0,5 mg/mL, foi então investigado o efeito da temperatura e do tempo de incubação no processo de solubilização das proteínas. Para isso, o extrato bruto foi incubado a 4°C ou a 25°C, por até 1 hora. Foi observado que a 4° C, e em concentrações acima de 0,5%, havia precipitação do detergente em solução. Como mostra a **Figura 5**, a solubilização das proteínas de membrana parece ocorrer instantaneamente, sendo que, tempos maiores de incubação não melhoravam o rendimento de proteínas solúveis. Este rendimento foi de 94% a 25°C como detectado na dosagem de proteínas. Assim, para obter um extrato bruto de proteínas de membrana solubilizadas (EBS), decidimos que a condição mais favorável seria 0,5 mg/mL de extrato bruto com 0,5% SDS à 25°C.

Uma vez determinadas as condições adequadas para a solubilização das proteínas de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, passamos a realizar experimentos sistemáticos para definir a melhor condição para a reconstituição do EBS em lipossomos.

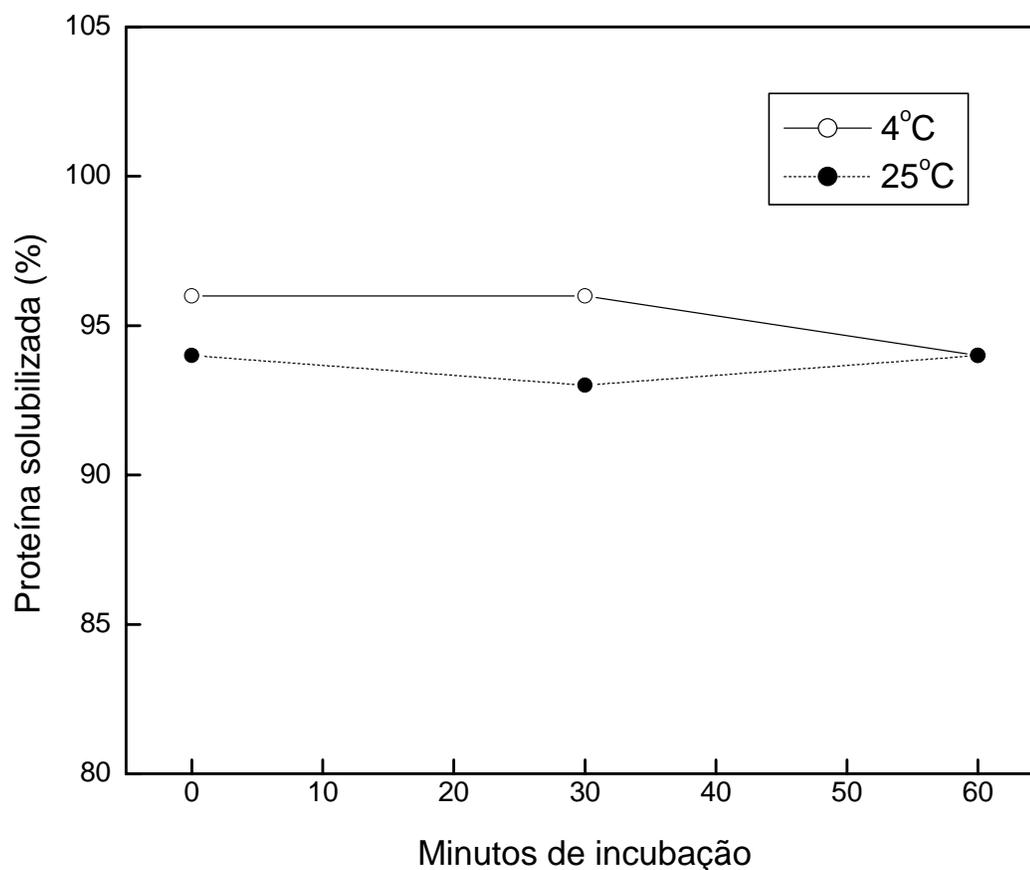


Figura 5. Efeito da temperatura e do tempo de incubação na solubilização das proteínas presentes nas frações de membrana de amastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas com SDS 0,5% durante 0, 30 e 60 minutos, tanto à temperatura ambiente (25°C) como a 4°C. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora a 4°C. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no pellet e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.18 de Material e Métodos.

4.5 Preparação e caracterização do proteolipossomo

Com o objetivo de se construir um sistema vesicular que mimetizasse a membrana do *T. cruzi*, iniciamos os estudos de padronização de uma metodologia para a incorporação dessas proteínas antigênicas de *T. cruzi* em lipossomos.

Os proteolipossomos foram obtidos pelo método de co-solubilização, utilizando uma mistura de 0,5 mg das proteínas presentes no extrato bruto solubilizado com 5 mg DPPC: 1 mg DPPS: 4 mg colesterol.

A incorporação de proteínas em lipossomos pelo método de co-solubilização requer a completa remoção do detergente para a obtenção de um bom rendimento na construção dos proteolipossomos. Nesta etapa, a remoção do detergente foi alcançada pela adsorção do detergente pela resina hidrofóbica Calbiosorb®, gerando proteolipossomos livres de SDS, com um grau de incorporação do EBS ao redor de 80%.

Para caracterizar o grau de incorporação das proteínas de *T. cruzi* nesse proteolipossomo, foi feita uma centrifugação em gradiente de sacarose. Como podemos observar na **Figura 6A** um pico de fosfato inorgânico originado da hidrólise dos fosfolípidos foi encontrado na faixa de 5.5 a 6.75% (w/v) de sacarose, densidade 1.017-1.023 g/cm³, correspondente a fração do lipossomo. A análise do EBS revelou a presença de proteínas no meio do gradiente, na faixa de 8 a 10% de sacarose, densidade 1.004-1.038 g/cm³ (**Figura 6B**). Finalmente, com os proteolipossomos, foi observado um único pico em concentrações de sacarose ao redor de 6 a 8%, densidade 1.019-1.028 g/cm³, tanto para o fosfato inorgânico como para as proteínas, indicando uma incorporação eficiente, ao redor de 80%, durante o processo de reconstituição das proteínas presentes no EBS nos sistemas de lipossomo (**Figura 6C**).

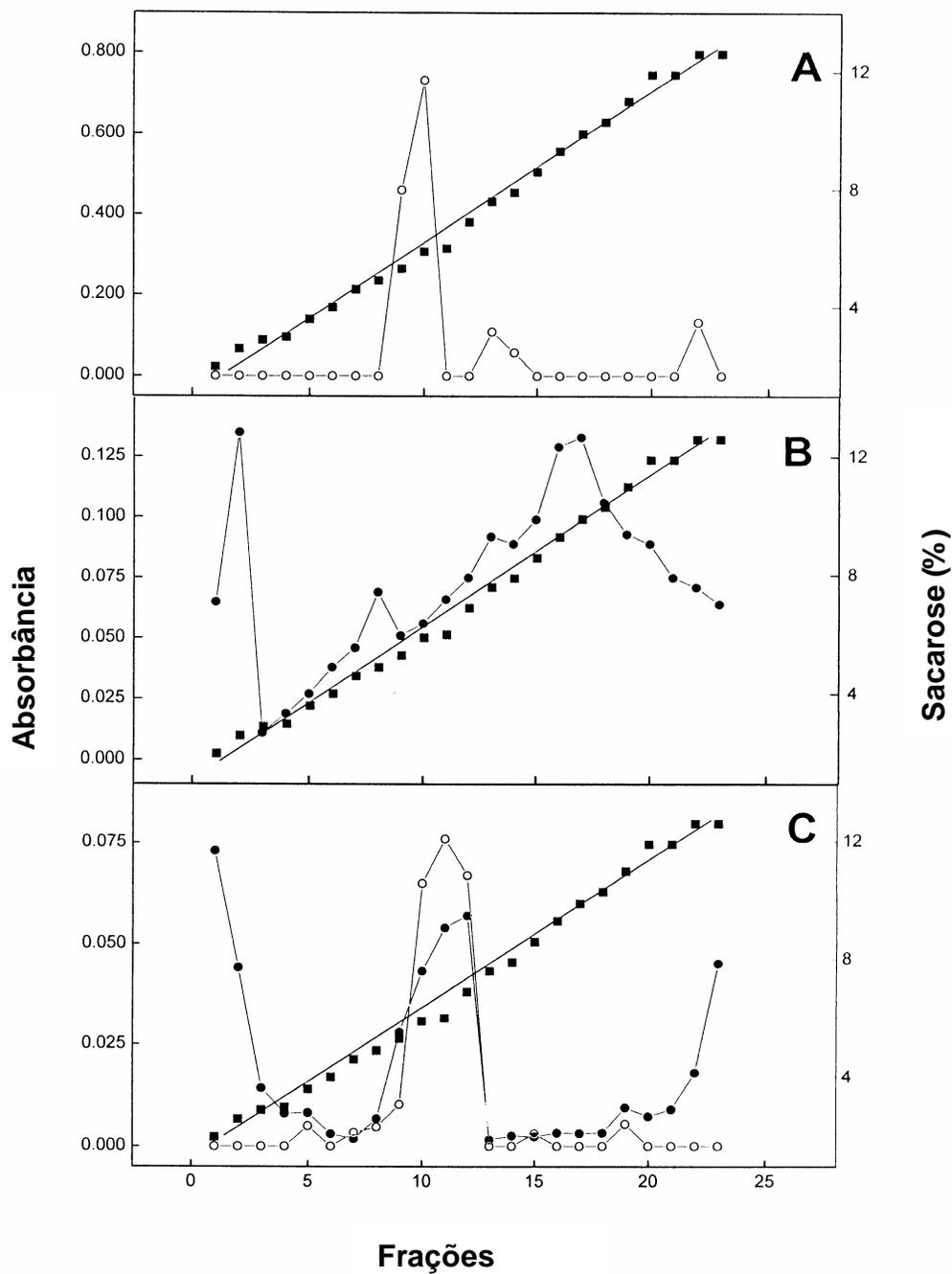


Figura 6. Caracterização da incorporação de proteínas nos lipossomos por gradiente de densidade de sacarose. (A) lipossomo, (B) EBS e (C) proteolipossomo. (●) Proteínas: absorbância à 595 nm, (○) lipídeos: absorbância à 820 nm e (■) % sacarose.

Para detectar as proteínas presentes nos proteolipossomos foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE. Esta técnica permitiu observar no proteolipossomo uma variedade de proteínas, às quais apresentavam distribuição diferente da observada no EBS de *T. cruzi* (**Figura 7A, linha 1 e 2**), indicando incorporação seletiva de algumas proteínas do parasita nesses lipossomos.

Para verificar o potencial antigênico desses proteolipossomos contra as proteínas de *T. cruzi*, camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados pela via i.p. com 40 µg de proteolipossomo preparados com DPPC, DPPS e colesterol na razão em massa de 5:1:4. A **Figura 7B linha 4 e 5**) mostra o *Western blotting* do EBS e proteolipossomo respectivamente, previamente separado por SDS-PAGE. Como podemos observar na **Figura 7B**, o soro do camundongo imunizado reconheceu várias proteínas do EBS e algumas proteínas do proteolipossomo na faixa de peso molecular de 66-97 kDa e abaixo de 45 Kda.

Para verificar a estabilidade dos proteolipossomos, e o tamanho do proteolipossomo, foi feito um ensaio de espalhamento de luz dinâmico. Este experimento o diâmetro médio do proteolipossomo é determinado a partir do coeficiente de difusão das vesículas quando estas se movem ao acaso devido ao movimento Browniano.

Como observado na **Figura 8A**, logo após a preparação dos proteolipossomos, apenas uma população foi formada, com diâmetro médio de 199 nm. Após 30 dias um novo ensaio de espalhamento de luz foi realizado e esses proteolipossomos se mostraram muito estáveis, apresentando uma única população com diâmetro de 181nm (**Figura 8B**).

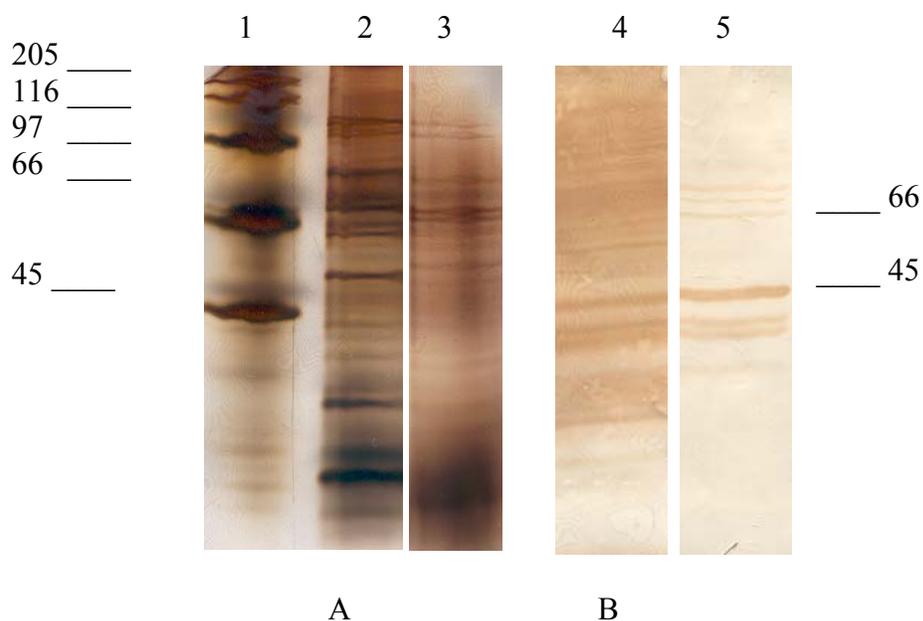


Figura 7. Análise por SDS-PAGE e *Western blotting* do perfil de proteínas no proteolipossomo. (A) eletroforese em condições desnaturantes, alíquotas de 3 μ g das amostras. (Linha 1), padrão de massa molecular em kDa; (linha 2), EBS (linha 3), proteínas presentes no proteolipossomo. (B) *Western blotting*. (Linha 4) Análise do perfil protéico das frações de membrana de amastigotas + tripomastigotas de *T. cruzi* solubilizadas em SDS, com o soro preparado como descrito no item 3.10 de Material e Métodos e (Linha 5), análise do perfil protéico incorporado no proteolipossomo com antisoro de camundongo BALB/c imunizados com 40 μ g de proteolipossomo

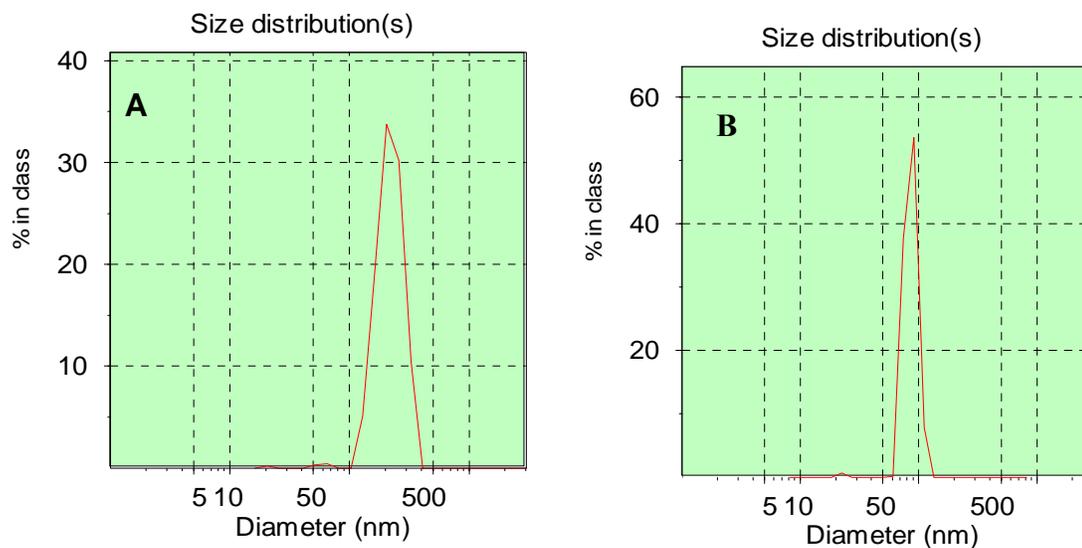


Figura 8. Análise da distribuição por tamanho dos proteolipossomos preparados com DPPC, DPPS e colesterol nas seguintes razões em massa: 5:1:4. Proteolipossomos preparados conforme descrito no item 3.15 de Material e Métodos submetidos ao ensaio de espalhamento de luz. **(A)** no dia do preparo **(B)** após 30 dias.

Uma vez padronizada a preparação do proteolipossomo com a concentração lipídica de 5mg DPPC: 1mg DPPS: 4 mg colesterol e 0,5 mg de EBS, os proteolipossomos foram submetidos à cromatografia em placa delgada (TLC), com sílica como suporte para verificar se esse sistema permanecia nas mesmas proporções em massa após a incorporação das proteínas. Na **Figura 9**, as manchas observadas correspondem aos lipídeos presentes nos lipossomos, proteolipossomo e EBS, visualizados através de vapores de iodo. Após o delineamento das manchas com grafite e sua descoloração total por evaporação, a sílica foi raspada e os lipídeos extraídos para a quantificação de fosfolípido e colesterol.

Os dados apresentados na **Tabela I** mostram a razão em massa e em molaridade dos lipossomos e proteolipossomos antes e depois da preparação. Para a preparação inicial dos lipossomos e proteolipossomos foi utilizada uma proporção de 5mg DPPC: 1mg DPPS e 4 mg de colesterol. Nos lipossomos a composição lipídica final em massa passou para 5:2:4 indicando uma considerável perda na quantidade de DPPC e colesterol quando comparado à proporção lipídica inicial presente na solução. Também durante a formação do proteolipossomo, a razão em massa passou de 5:1:4 para 5:2:15. Uma considerável perda de DPPC e DDPS ocorreu quando comparado ao colesterol. Provavelmente, este processo ocorreu para incorporar e estabilizar as proteínas de *T. cruzi* no proteolipossomo, além de poder ter ocorrido a formação de lipossomos livres de proteínas, além da adsorção desses fosfolídeos com a resina Calbiosorb®.

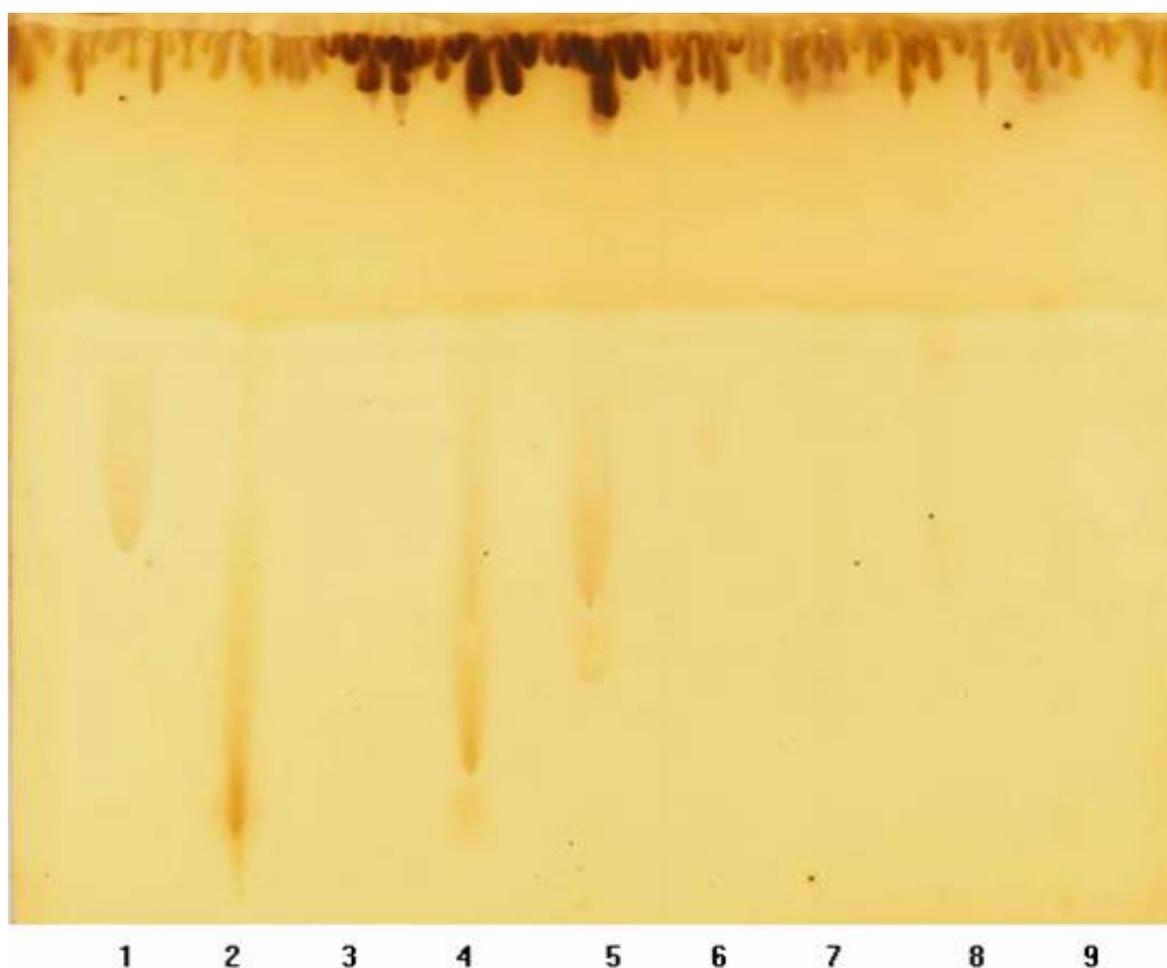


Figura 9. Cromatografia em camada delgada (TLC). A placa de sílica foi submetida a dois solventes, na mesma direção. O solvente primário era composto por clorofórmio:metanol:amônia (65:35:5 v/v) e o secundário por clorofórmio:metanol:acetona:ácido acético:água (10:2:4:2:1 v/v). Após a cromatografia, os lipídios foram detectados com vapores de iodo. As frações correspondem a: **(1)** DPPC, **(2)** DPPS, **(3)** colesterol, **(4)** DPPC, DPPS e colesterol, **(5)** proteolipossomos, **(6)** lipossomos, **(7)** extrato bruto, **(8)** EBS com SDS, **(9)** EBS sem SDS.

Tabela I: Composição lipídica dos lipossomos e proteolipossomos determinada pela placa de sílica TLC como descrito no item 3.17 de Material e Métodos.

	DPPC:DPPS:Coolesterol	DPPC:DPPS:Coolesterol
Amostra	(w/w) razão em mass	(moles/moles) razão em moles
Mistura Inicial	5 : 1 : 4	5 : 1 : 7
Lipossomo	5 : 2 : 4	5 : 2 : 8
Proteolipossomo	5 : 2 : 15	3 : 1 : 15

4.6 Avaliação da ativação de macrófagos murinos *in vitro*

Para avaliar a resposta imune, camundongos BALB/c foram imunizados via i.p. com 20 µg de proteolipossomo. Uma semana após a imunização foram retirados os macrófagos peritoneais e infectados *in vitro* com 300 formas de tripomastigotas cepa Y. Após 24 horas de infecção a porcentagem de macrófagos infectados (**Figura 10A**) e o número de parasitas intracelulares desses camundongos foram similares ao grupo controle (não imunizado) (**Figura 10B**). No entanto, após 72 horas, a porcentagem de macrófagos infectados foi 50% menor (**Figura 10A**) e o número de parasitas intracelulares diminuíram significativamente em 82%, quando comparado ao grupo controle. (**Figura 10B**). Esses resultados indicam que a exposição dos camundongos às proteínas de tripomastigotas e amastigotas incorporadas no proteolipossomo foram capazes de ativar macrófagos a matar o *T. cruzi* de forma mais eficientemente que os macrófagos não estimulados.

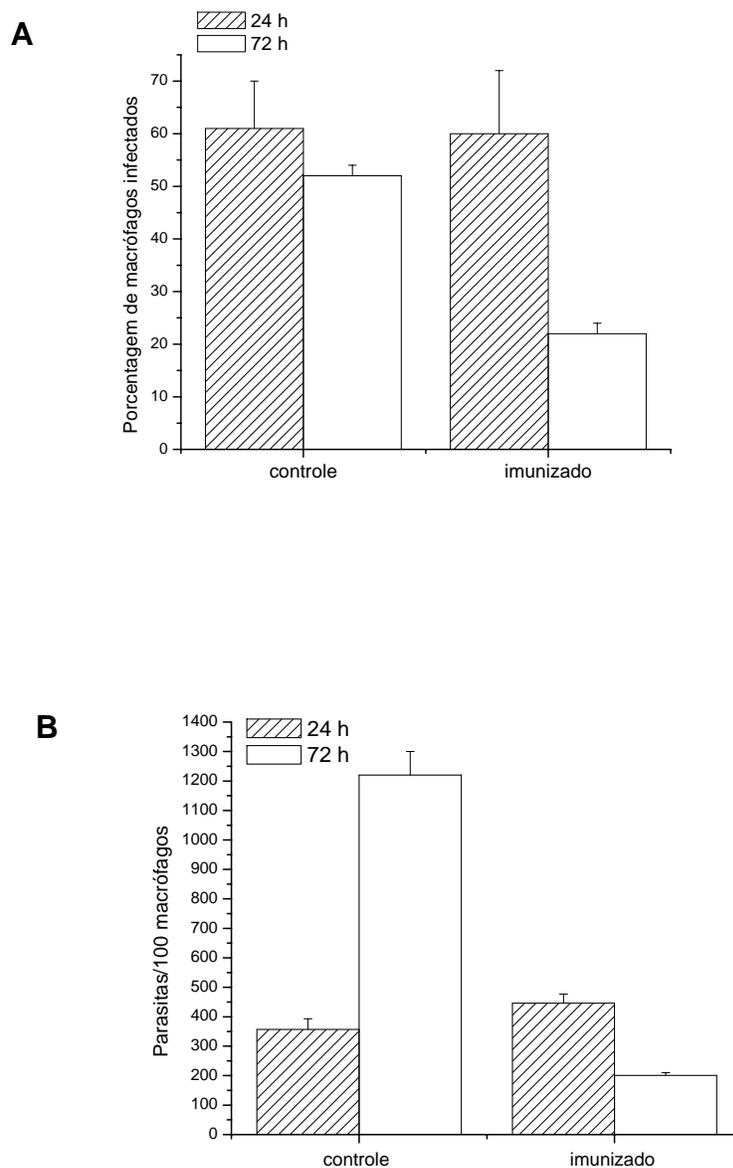


Figura 10. Avaliação da ativação de macrófagos peritoneais murinos após imunização com proteolipossomo. Camundongos BALB/c foram imunizados com 20 μ g de proteolipossomo; controle recebeu 200 μ l PBS. Os macrófagos peritoneais foram plaqueados e infectados com 300 formas de tripomastigotas metacíclicas, de *T. cruzi* cepa Y. A cultura foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por 24h e 72h. **(A)** porcentagem de macrófagos infectados e **(B)** número de parasitas intracelulares.

4.7 Avaliação da parasitemia e sobrevivência em camundongos BALB/c após imunização com proteolipossomos.

Após verificarmos que os proteolipossomos foram capazes de ativar macrófagos murinos, avaliamos a atividade protetora desses proteolipossomos *in vivo*. Para isso camundongos BALB/c foram inoculados via i.p com tampão Tris-HCL (5mM, pH 7,5) e proteolipossomo nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg. Após quatro semanas de imunização os camundongos foram desafiados com 300 formas de tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, cepa Y.

Como podemos observar na **Figura 11A**, camundongos que receberam o tampão Tris-HCL apresentaram os maiores picos de parasitemia quando comparados aos camundongos imunizados com as diversas concentrações do proteolipossomo. Analisando a taxa de sobrevivência dos diferentes grupos imunizados, observamos que os animais imunizados com 20 µg do proteolipossomo tiveram uma taxa de mortalidade de 50% aos 30 dias p.i., enquanto os animais do grupo controle que receberam Tris-HCL apresentaram uma taxa de mortalidade de 100% no mesmo período. Os animais imunizados com as concentrações de 5 e 10 µg do proteolipossomo começaram a morrer por volta do vigésimo dia p.i embora apresentassem a menor parasitemia (**Figura 11B**). Concentrações de 40 µg do proteolipossomo não aumentaram a sobrevivência dos camundongos BALB/c frente à infecção ao *T. cruzi*.

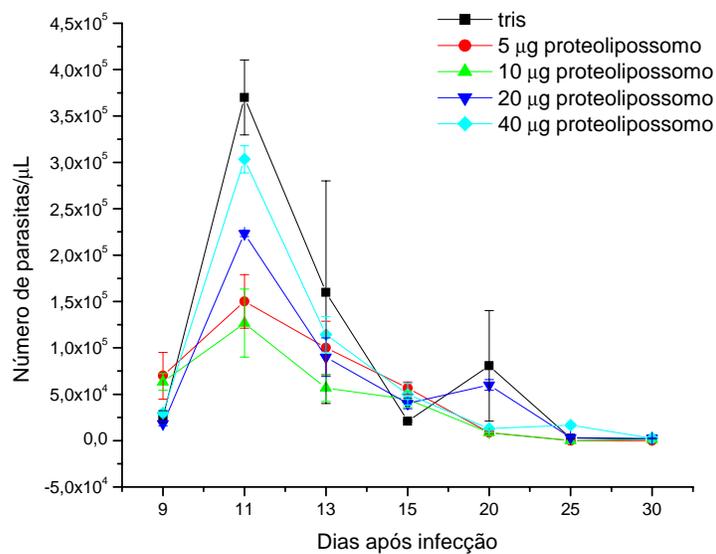
4.8 Avaliação da proteção contra a infecção com *T. cruzi* em camundongos BALB/c após a variação no número de imunizações e nos intervalos entre o desafio.

Depois de verificar que não houve diferença na sobrevivência dos camundongos imunizados com 20 e 40 µg de proteolipossomo, optamos por utilizar em nossas

imunizações 20 µg de proteolipossomo (a menor quantidade de antígeno) e variar alguns parâmetros, como a quantidade de imunizações e o intervalo de desafio. Para isso camundongos BALB/c receberam uma ou duas imunizações com 20 µg de proteolipossomo e foram desafiados 3 semanas após a última imunização. Um terceiro grupo recebeu apenas uma imunização com 20 µg de proteolipossomo e foram desafiados 4 semanas após a imunização.

Os resultados da parasitemia (**Figura 12A**), mostram que em todos os grupos experimentais os parasitas sanguíneos começaram a ser detectados 7 dias após a infecção, com um pico de parasitemia no décimo dia e ausência total de parasitas ao trigésimo dia. Os grupos de animais imunizados uma única vez, independente do intervalo de desafio, apresentaram uma menor parasitemia quando comparados ao grupo de animais que receberam duas imunizações. Com relação à sobrevivência, (**Figura 12B**), os animais imunizados uma única vez e desafiados após 4 semanas resistiram até o vigésimo quinto dia p.i, com uma taxa de sobrevivência de 100%, sendo que os animais do grupo controle que receberam somente EBS apresentaram uma sobrevivência de 33% no mesmo período. Os animais que receberam duas imunizações começam a morrer a partir do décimo quinto dia e com uma taxa de sobrevivência de 50% no mesmo período e apresentando uma maior parasitemia em relação ao grupo imunizado uma única vez. Apesar dos animais imunizados uma única vez prolongarem a sobrevivência até o vigésimo quinto dia, os animais de todos os grupos experimentais sucubiram à infecção aos 30 dias p.i. Dessa forma optamos por imunizar nossos animais uma única vez e desafiá-los após 4 semanas de imunização.

A



B

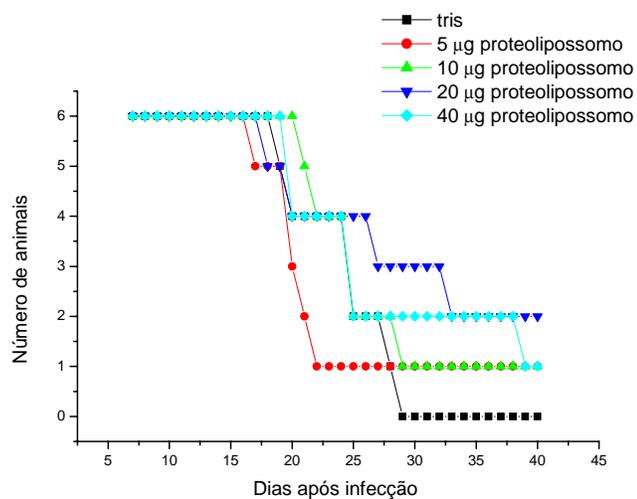


Figura 11. Parasitemia e sobrevida de camundongos BALB/c imunizados com proteolipossomo. Concentrações de 5, 10, 20 e 40 μg de proteolipossomo foram injetados intraperitonealmente. **(A)** Parasitemia medida através da contagem dos parasitas no sangue periférico **(B)** Sobrevida.

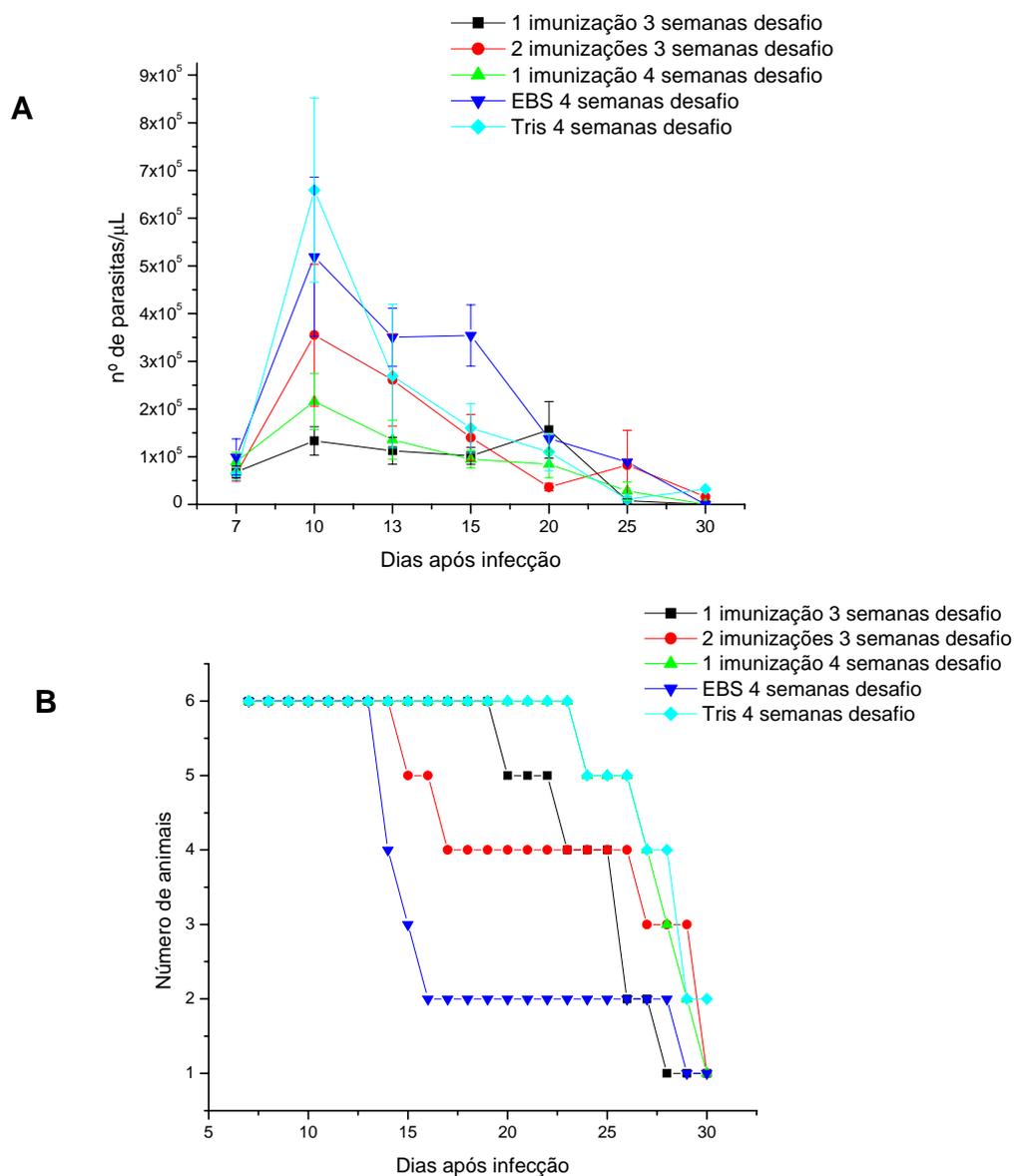


Figura 12. Avaliação da parasitemia e sobrevida de camundongos BALB/c imunizados com 20 µg de proteolipossomo via i.p. com relação ao número de imunizações e intervalos de desafio. Os camundongos receberam uma ou duas imunizações com três semanas de intervalo entre o desafio e uma imunização com quatro semanas de intervalo entre o desafio (**A**) Parasitemia, (**B**) Sobrevida.

4.9 Detecção de citocinas no lavado intraperitoneal de camundongos BALB/c imunizados.

Para avaliar o perfil de citocinas produzidas no local da infecção, camundongos BALB/c foram imunizados com: grupo I (20 µg EBS), grupo II (20 µg proteolipossomo), grupo III (PBS) e grupo IV (PBS). Todos os animais após 4 semanas de imunização foram desafiados com *T. cruzi* exceto os animais do grupo IV. Uma semana após serem imunizados, os animais de todos os grupos experimentais receberam uma injeção i.p. com 5 mL de meio RPMI-Completo e posteriormente foram retiradas as células do peritônio desses animais. Essas células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o precipitado foi descartado e no sobrenadante foram feitas as análises da produção de citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ de todos os quatro grupos experimentais.

Os dados apresentados na **Figura 13** mostram os níveis de secreção das citocinas IL-10, IL-12 e INF- γ pelos macrófagos imunizados e desafiados. Com relação à produção de IL-10, verificamos que não houve diferença estatística entre os quatro grupos experimentais. No entanto as células dos animais imunizados com o proteolipossomo secretaram menores níveis de IL-10, porém não significativos com relação aos demais grupos. Em relação à produção de IL-12, verificamos que as células dos animais imunizados com EBS e proteolipossomo secretaram níveis significativos de IL-12 em relação ao grupo IV. A comparação dos níveis de IFN- γ , detectados nos diferentes grupos experimentais não mostrou diferença estatisticamente significativa. Em síntese, esses resultados mostraram que a imunização com proteínas do parasita, tanto solubilizadas (EBS), quanto inseridas no proteolipossomo, estimulou a produção de IL-12, porém estatisticamente as concentrações foram iguais ao grupo controle positivo estimulado com *T. cruzi* (grupo III).

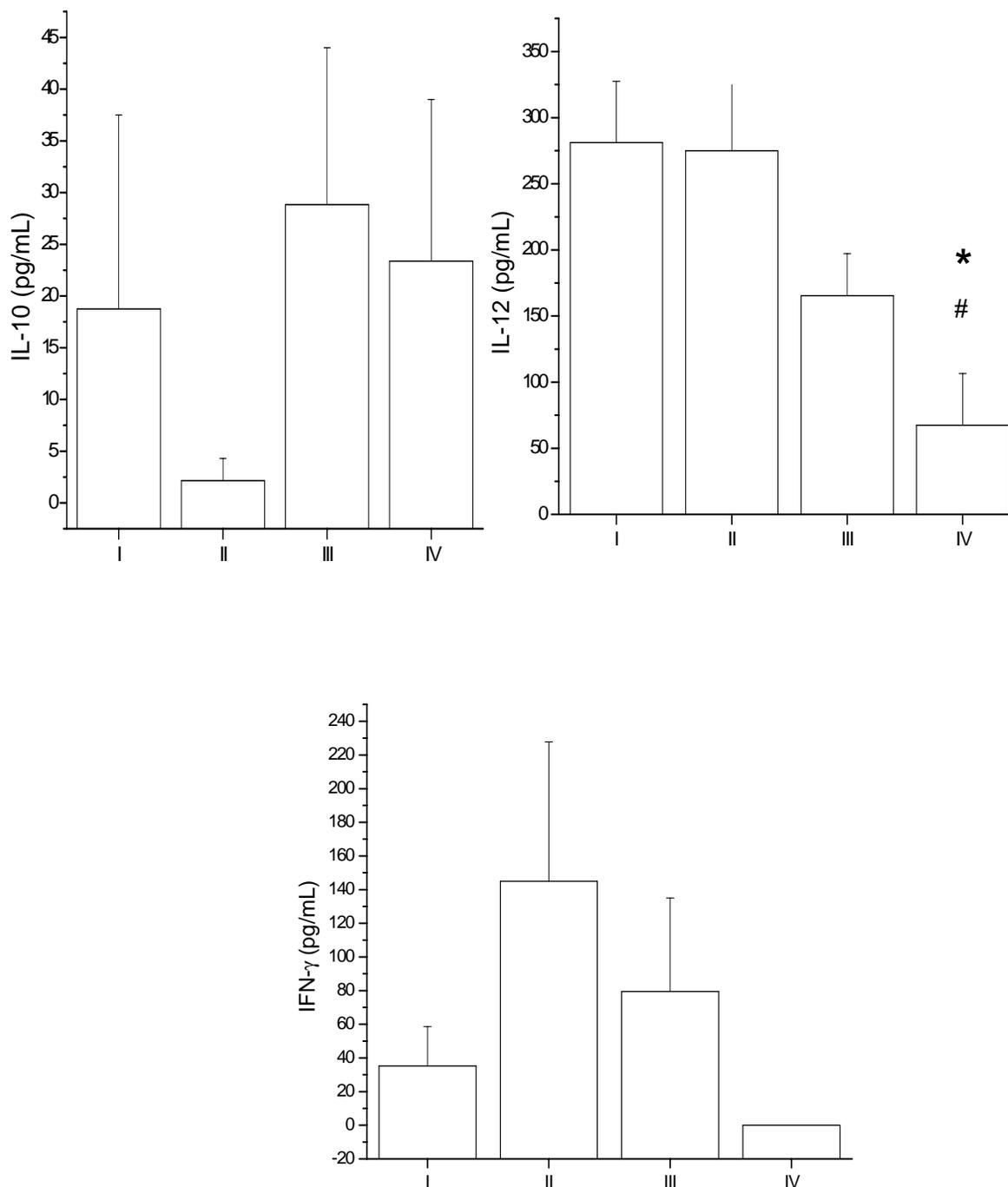


Figura 13. Detecção de IL-10, IL-12 e IFN- γ em sobrenadante de células peritoneais de murinos imunizados. Camundongos BALB/c (n=9) foram imunizados intraperitonealmente com: **Grupo I** EBS, **grupo II** proteolipossomo, **grupo III** PBS e **grupo IV** PBS. Quatro semanas após a imunização os camundongos foram desafiados com *T.cruzi*, exceto o **grupo IV** e uma semana após o desafio foram sacrificados e o lavado intraperitoneal retirado. As citocinas foram dosadas pelo método de ELISA usando anticorpos monoclonais. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da concentração da citocina em pg/mL. * $p < 0,05$ em relação ao grupo I, # $p < 0,05$ em relação ao grupo II.

4.10 Avaliação da resposta imune adaptativa *in vitro*.

A indução da resposta imune adaptativa foi avaliada pelo perfil das citocinas produzidas pelas células do baço e linfonodos. Experimentos de imunização *in vitro* foram feitos utilizando os mesmos grupos experimentais descritos no item anterior.

Todos os animais foram sacrificados para a retirada do baço e dos linfonodo como descrito no item 3.25 em Material e Métodos. Células do baço e linfonodo desses animais foram centrifugadas a 1500 rpm, e o precipitado foi lavado. As células foram contadas e incubadas à cultura de macrófagos na proporção de 1 macrófago: 1 célula baço ou 1 macrófago: 1 célula do linfonodo por 48 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Estes macrófagos haviam sido previamente estimulados ou não com *T. cruzi*. Depois de 48 horas os sobrenadantes foram coletados e feitas as dosagens de citocinas pelo método de ELISA.

A análise da produção das citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ no sobrenadante das células do baço, mostrou um aumento significativo na produção de IL-10 e IL-12 nos quatro grupos experimentais estimulados com o parasita, quando comparados ao controle (meio). Com relação à produção de IFN- γ , somente os animais imunizados com proteolipossomo apresentaram diferenças significativas com relação ao controle (**Figura 14**).

Analisando a produção de citocinas entre os grupos estimulados com o parasita, houve uma diferença significativa na produção de IL-12 nos animais imunizados com EBS e com proteolipossomo quando comparados com o controle (grupo IV) e um aumento na produção de IFN- γ pelas células dos animais imunizados com o proteolipossomos em relação aos demais grupos experimentais, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (**Figura 14**).

A dosagem de citocinas produzidas pelas células dos linfonodos, (**Figura 15**), mostrou não haver diferença na produção de IL-10, IL-12 e INF- γ entre sobrenadante das células dos animais estimulados e não estimulados.

Com relação aos grupos estimulados com o *T. cruzi*, houve uma redução significativa na produção de IL-10 no grupo imunizado com EBS quando comparados ao PBS (grupo III). No entanto há um aumento significativo de IL-10 nos animais imunizados com proteolipossomo em relação aos grupos EBS, controle desafiado (grupo III) e controle não desafiado (grupo IV).

Na produção de IL-12, resultados estatisticamente significativos ocorreram somente entre os grupos controles (III e IV), onde houve um aumento da produção de IL-12 no grupo III quando comparado ao grupo IV. Esses resultados mostram que o grupo de animais desafiados (grupo III) produz mais IL-12 quando comparados ao grupo não desafiado, no entanto entre nos grupos imunizados não há diferenças estatisticamente significativas na produção de IL-12 (**Figura 15**).

Com relação à produção de IFN- γ pelas células dos linfonodos, não foi possível realizar a análise estatística por falta de amostras suficientes do sobrenadante.

Nossos resultados mostraram que macrófagos peritoneais de animais imunizados, após a estimulação *in vitro* com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, são capazes de ativar células T imune específica, aumentando consideravelmente a produção de IL-10 no sobrenadante das células do baço e linfodos, e que não houve diferença no padrão de citocinas produzido por essa células. Esses dados confirmam que há um padrão de resposta Th2 responsável pela suscetibilidade dos nossos animais à infecção por *T. cruzi*.

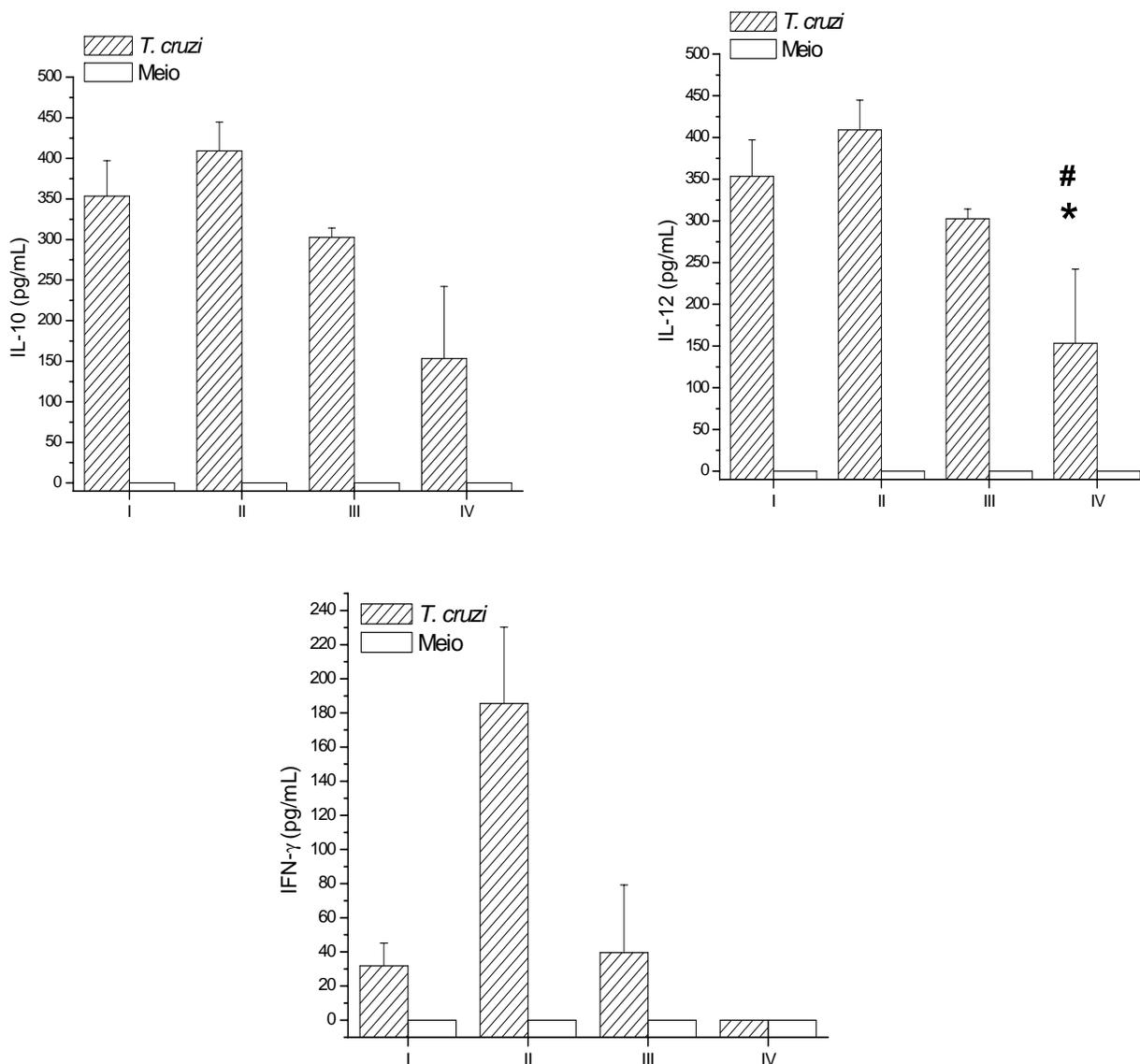


Figura 14. Detecção de IL-10, IL-12 e IFN- γ pelo método de ELISA em sobrenadante de cultura de células do baço de murinos imunizados. Camundongos BALB/c (n= 9) foram imunizados via intraperitonealmente com: **Grupo I** 20 μ g de EBS, **grupo II** 20 μ g proteolipossomo, **grupo III** PBS e **grupo IV** PBS. Quatro semanas após a imunização os camundongos foram desafiados com *T. cruzi*, exceto o **grupo IV** e uma semana após o desafio foram sacrificados, retiradas as células do baço e incubadas em cultura de macrófagos. Após 48 horas os sobrenadantes das culturas foram coletados para detecção de citocinas por ELISA. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da concentração da citocina em pg/mL. * p<0,05 em relação ao grupo I, # p<0,05 em relação ao grupo II.

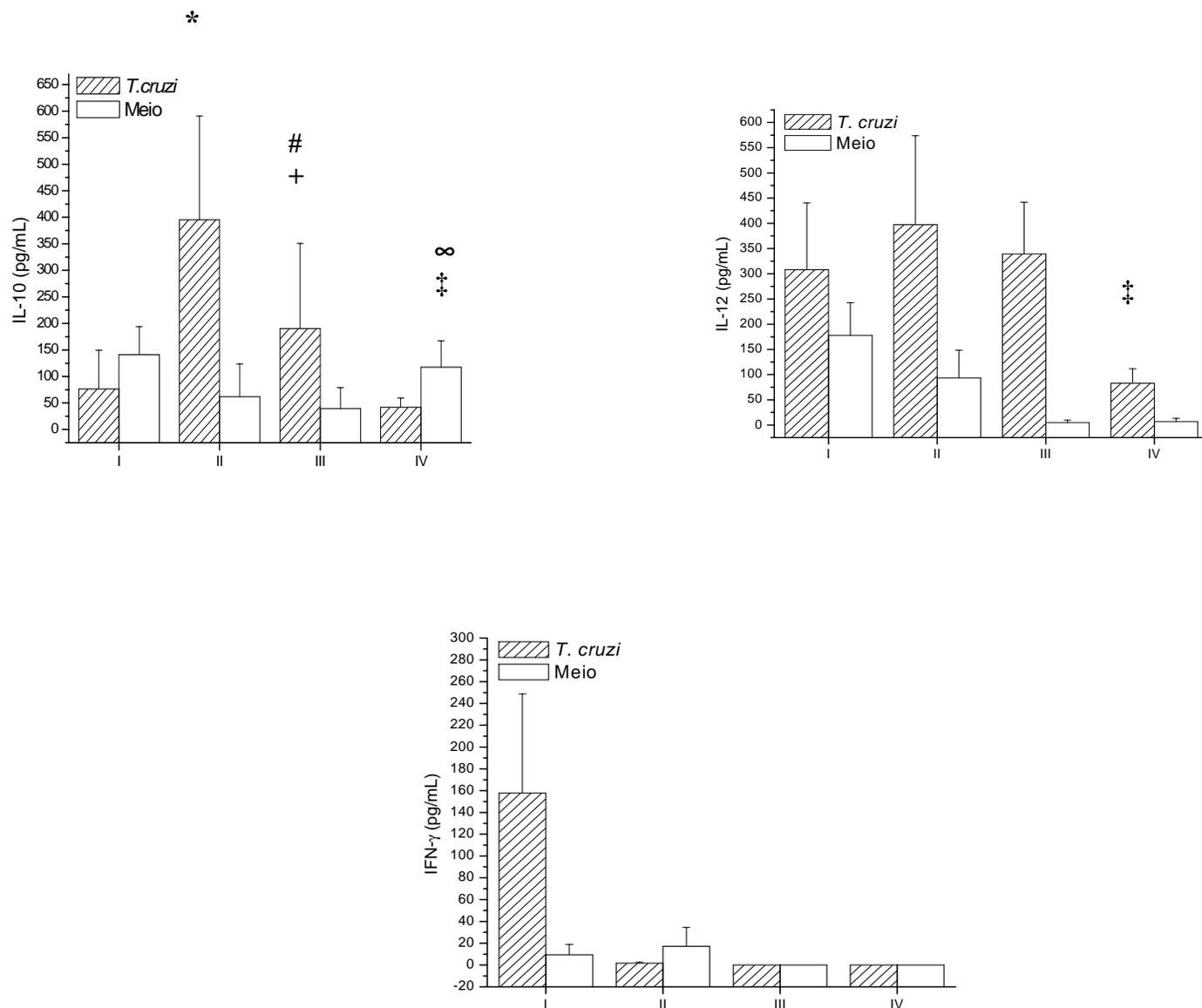


Figura 15. Detecção de IL10, IL-12 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de células do linfonodo de animais imunizados. Camundongos BALB/c (n= 9) foram imunizados via intraperitonealmente com: **Grupo I** 20 μ g de EBS, **grupo II** 20 μ g proteolipossomo, **grupo III** PBS e **grupo IV** PBS. Quatro semanas após a imunização, os camundongos foram desafiados com *T. cruzi*, exceto o **grupo IV** e uma semana após o desafio foram sacrificados, retiradas as células dos linfonodos e incubadas em cultura de macrófagosestimulados ou não com o parasita. Após 48 horas os sobrenadantes das culturas foram coletados para detecção de citocinas por ELISA. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da concentração da citocina em pg/mL. * p<0,05 em relação ao grupo I, # p<0,05 em relação ao grupo I, + p<0,05 em relação ao grupo II, ∞ p<0,05 em relação ao grupo II, ‡ p<0,05 em relação ao grupo III.

5. DISCUSSÃO

Uma resposta imune efetiva frente à infecção ao *T. cruzi* requer a ativação de múltiplos mecanismos, incluindo uma forte resposta imune humoral, produção de citocinas de padrão Th1 e a ativação de linfócitos T CD8⁺ que reconheçam células hospedeiras infectadas pelos parasitas (Tarleton, 1997). Na busca da identificação e caracterização de moléculas do protozoário parasita que disparem tais respostas, foram descritas várias proteínas de superfície presentes em amastigotas e tripomastigotas tais como: APS-1, ASP-2, CRF, PFR, cruzipaina, Tc52, TolA-like surface protein, *trans*-sialidase e TSA-1 (Costa *et al.*, 1998; Low *et al.*, 1998; Fujimura *et al.*, 2001; Garg & Tarleton., 2002; Miller *et al.*, 1997; Quanquin *et al.*, 1999; Ouaisi *et al.*, 2002; Schnapp *et al.*, 2002; Ribeirão *et al.*, 2000).

Alguns modelos experimentais de vacinação utilizando moléculas geneticamente modificadas, purificadas ou produzidas como proteínas recombinantes em vetores microbianos expressando antígenos de parasitas, conferem uma sobrevida significativa aos animais imunizados, com conseqüente diminuição da parasitemia (Santori *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2005). Em nosso laboratório, a preparação de proteolipossomos, como uma maneira de reconstituir proteínas integrais da membrana de parasitas e promover a apresentação dessas moléculas ao sistema imune, foi empregada com sucesso para *Leishmania* (Santos *et al.*, 2006). Sendo assim, a proposta desse trabalho foi desenvolver um sistema de lipossomos para carrear proteínas antigênicas de *T. cruzi*, verificando a capacidade do sistema imune de produzir uma resposta protetora frente à infecção ao *T. cruzi*.

O mecanismo de formação dos lipossomos é complexo, e para preservar a estrutura protéica e a função das proteínas de membrana, após a solubilização, são necessários cuidados no seu isolamento e purificação (le Maire *et al.*, 2000). Para serem incorporadas em lipossomos, as proteínas de membrana precisam ser primeiramente solubilizadas. Para

se obter as proteínas solúveis, alguns autores descrevem a utilização de diversos detergentes, podendo se destacar, dentre eles, o deoxicolato de sódio, o octyl glucopyranoside, o cholate/EmpigemBB, e ainda o SDS (Parmar *et al.*, 1999; Daghasanli *et al.*, 2004; Heffer-Lauc *et al.*, 2007).

Os detergentes zwitteriônicos aparentemente são mais efetivos na solubilização das proteínas e não provocam sua desnaturação, ao contrario dos outros tipos de detergentes (Hjelmeland, 1980).

A maioria dos detergentes, tanto iônicos (catiônicos ou aniônicos) quanto não iônicos, são substâncias anfífilas solúveis, que quando adicionados à água, forma uma monocamada na interface ar-água que está em equilíbrio com seus monômeros. Quando a concentração dos monômeros de detergente alcançam um nível crítico, e uma temperatura favorável, eles formam micelas, onde a parte hidrofóbica está direcionada para fora, na fase aquosa (Koepsell, 1986). Durante a solubilização, a ligação do detergente à proteína pode ocorrer pela carga da proteína, se ele for um detergente iônico ou através da região hidrofóbica da proteína, se ele for um detergente não iônico (Helenius e Simons, 1975; Riepl e Vidaver, 1978).

Recentemente, Santos *et al* (2006) demonstraram que, para a solubilização de proteínas de membrana da forma amastigota de *L. amazonensis*, uma concentração de 0,1% do detergente SDS seria a mais eficiente, promovendo uma recuperação de 93% de proteínas solúveis. Diferentemente, outros autores publicaram que, para a solubilização de proteínas de membrana de *Pasteurella multocida*, foi necessário uma concentração de 1% de SDS para alcançar a mesma porcentagem de solubilização (Daghasanli *et al.*, 2004). Sendo assim como optamos por utilizar o detergente SDS (um detergente da classe dos

iônicos) para solubilizar as proteínas de membrana de *T. cruzi*, a primeira etapa foi investigar a concentração mais eficiente desse detergente no processo de solubilização. Nossos resultados mostraram um máximo de solubilização na concentração de 0,5% de SDS, resultando em uma recuperação de 94% em proteínas solúveis. Concentrações maiores de SDS não melhoraram o rendimento da solubilização (**Figura 3**).

Determinada a concentração mais eficiente do detergente, procuramos otimizar as condições de solubilização diminuindo tanto o tempo de incubação como a temperatura neste processo. Como mostra a **Figura 5**, a solubilização das proteínas de membrana ocorre instantaneamente, tanto a 4°C como a 25°C. Como mostrou a dosagem de proteínas determinadas pelo método descrito por Hartree (1972), tempos maiores de incubação não melhoraram o rendimento de proteínas solúveis.

A melhor solubilização de proteínas de formas amastigotas e tripomastigotas do parasita foi obtida instantaneamente, usando uma proporção de 0,5 mg/mL de proteína para 0,5% (w/v) de detergente a 25°C. Nessas condições, o SDS mostrou ter elevada capacidade de solubilização, liberando uma grande quantidade de proteínas que foram detectadas em gel de eletroforese (**Figura 4A, linha 4a**). Esse detergente não interferiu na antigenicidade do material solubilizado, sendo que as proteínas liberadas foram capazes de se ligar a anticorpos contra determinantes antigênicos específicos de *T. cruzi* (**Figura 4B, linha 2**).

Após padronizarmos as condições mais adequadas para a solubilização das proteínas de membrana de *T. cruzi*, passamos a estudar o processo de inserção dessas proteínas em lipossomos. Para selecionar o material antigênico a ser incorporado nos lipossomos, nós hipotetizamos que moléculas reconhecidas pelo sistema imune presentes nos diversos estágios do curso natural da infecção deveriam ser biologicamente

importantes, provavelmente participando na sobrevivência intracelular do parasita. Como observamos pela análise do *Western blotting* (**Figura 2B**), as proteínas de membrana de formas amastigotas e tripomastigotas foram reativas ao antisoro gerado por camundongos contra os determinantes antigênicos de *T. cruzi*. O perfil de proteínas do extrato bruto e do EBS detectadas com o soro de animais infectados foi semelhante, demonstrando que mesmo após a solubilização, algumas proteínas antigênicas do *T. cruzi* foram preservadas. Desta forma, com o intuito de utilizar uma ampla gama de proteínas antigênicas, escolhemos solubilizar as proteínas de membrana das formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* para posteriormente incorporá-las em lipossomos.

O próximo passo foi inserir as proteínas solubilizadas dos dois estágios do *T. cruzi* em lipossomos. Nós optamos pelo método de co-solubilização, apesar de uma grande variedade de técnicas poderem ser usadas para este fim. Apresentaremos a seguir, resumidamente, suas principais vantagens e/ou desvantagens, como apresentado por Rigaud et al., 1998. A reconstituição mediada por solvente orgânico é uma das técnicas pouco utilizada porque pode levar à desnaturação das proteínas. Alternativamente, os proteolipossomos também podem ser formados por métodos mecânicos. A principal vantagem deste método é a rapidez. Por outro lado, as maiores desvantagens apresentadas são a não-reprodutibilidade do ensaio, a inativação de muitas proteínas devido ao longo processo de sonicação e também o pequeno diâmetro dos proteolipossomos resultantes (Rigaud et al., 1995). Outra opção é a incorporação direta da proteína de membrana em lipossomos pré-formados. A principal desvantagem desse método é exigência da remoção completa do detergente. O método de co-solubilização, por nós escolhido, é a estratégia de reconstituição de proteínas de membrana que apresenta os melhores resultados,

principalmente pelo fato de não exigir a retirada prévia do detergente presente na amostra de proteínas solubilizadas a ser reconstituída (Rigaud *et al.*, 1995; Daghastanli *et al.*, 2004). A vantagem deste método é a utilização de resinas específicas para a remoção do detergente, que resulta na obtenção de vesículas homogêneas. Já a sua principal desvantagem é a possível perda de proteínas devido às interações inespecíficas com a resina, bem como a obtenção de sistemas mistos em relação à orientação da proteína reinserta na bicamada lipídica (Rigaud *et al.*, 1995; Silvius, 1992; Knol *et al.*, 1998). Portanto foi escolhido por nós o método de co-solubilização para preparar os proteolipossomos contendo proteínas de *T. cruzi*.

Entre os métodos usuais para remoção do detergente, a resina hidrofóbica é a escolhida, por ser muito rápida e não diluir a amostra (Silvius, 1992; Rigaud *et al.*, 1998). Apesar de não termos avaliado a percentagem de remoção do detergente, os resultados de Daghastanli *et al.* (2004), usando a mesma resina hidrofóbica por nós usada, indicam que essa remoção pode chegar a 99%. Em nossos experimentos, o uso da resina Calbiosorb[®] permitiu uma incorporação de 80% das proteínas solubilizadas com SDS nestes sistemas vesiculares.

Na membrana plasmática das células de eucariotos existem microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídeos, denominados *lipids rafts*. Esses microdomínios podem incorporar ou excluir proteínas de maneira seletiva (Almeida *et al.*, 2005). As proteínas ancoradas a membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI) são preferencialmente inseridas nessas regiões da membrana. As proteínas VSG (glicoproteína variante de superfície) de *T. brucei*, que apresentam uma ancora de GPI, parecem estar ancoradas nestes microdomínios (Benting *et al.*, 1999). A análise, por eletroforese em SDS-PAGE, das

proteínas presentes nos nossos proteolipossomos revelou uma variedade de bandas protéicas com uma distribuição diferente das observadas no EBS, indicando um certo grau de seletividade na incorporação das proteínas solúveis (**Figura 7A, linha 3**). Essa seletividade pode estar relacionada com o aumento de colesterol verificada nos proteolipossomos formados (**Tabela I**).

O grau de reconstituição de proteínas de membrana em lipossomos pode ser influenciado pela natureza dos lipídeos escolhidos. Por isso, um passo importante para alcançar um rendimento elevado na incorporação das proteínas nesses sistemas vesiculares é a escolha de uma composição lipídica apropriada. Além do mais, a imunogenicidade dos lipossomos também pode ser influenciada pela carga desses lipídeos. Células da resposta inata do sistema imune, como os macrófagos e células dendríticas, por apresentarem receptores para moléculas carregadas negativamente capturam mais eficientemente lipossomos com carga aparente negativa (Afrin et al., 2000; Afrin & Ali, 1997)

Nossos resultados de incorporação mostraram que proteínas de membrana de *T. cruzi* são eficientemente incorporadas em proteolipossomos contendo ácido palmítico, presentes em ambos fosfolipídios, DPPC e DPPS. A incorporação obtida foi de 80%, muito similar aos resultados obtidos na incorporação de proteínas de *L. amazonensis* (Santos et al., 2006) e *Pasteurella multocida* (Daghastanli et al., 2004).

Com relação à caracterização da incorporação das proteínas na bicamada lipídica dos lipossomos, a análise do gradiente de densidade de sacarose mostrou a presença de EBS no meio do gradiente, na faixa de 8 a 10% de sacarose, com relação aos proteolipossomos, estes apresentam um perfil único e simétrico de eluição, correspondente ao conteúdo de fosfato e proteína na faixa de 6 a 8% (**Figura 6C**). O fato do

proteolipossomo aparecer em uma faixa de densidade menor que da proteína, se explicaria pela presença de grande quantidade de colesterol no proteolipossomo, como mostra a **Tabela I** e como descrito por outros autores (Cevc and March, 1987; Santos et al., 2006).

Após verificarmos, pela técnica de gradiente de densidade de sacarose, que as proteínas de membrana de *T.cruzi* estavam realmente inseridas no proteolipossomo, o próximo passo foi verificar se essas vesículas lipídicas apresentavam a capacidade de aumentar a atividade tripanocida dos macrófagos murinos.

A adição de fosfatidilserina à mistura lipídica para preparação das vesículas lipídicas gera lipossomos que, além de aumentar a capacidade de captura dos macrófagos devido aos seus receptores *scavenger* (Peiser *et al.*, 2002), favorece a produção de IL-12 e IFN- γ pelas células murinas do baço (Aramaki *et al.*, 1995; Yotsumoto *et al.*, 2007). Assim, na tentativa de aumentar a captura dos proteolipossomos pelas células do sistema imune que possuem receptores *scavenger* (Shakushiro *et al.*, 2004; Greaves and Gordon, 2005), como macrófagos e células dendríticas, optamos por adicionar DPPS à composição lipídica da nossa preparação.

Na infecção *in vitro* de macrófagos removidos da cavidade i.p. de camundongos BALB/c imunizados via i.p. com 20 μ g de proteolipossomo, a porcentagem de parasitas nos macrófagos após 24 horas de infecção (**Figura 10A**) e o número de parasitas intracelulares nessas células foram similares ao grupo controle (não imunizado) (**Figura 10B**). No entanto, após 72 horas, a porcentagem de macrófagos infectados foi 50% menor (**Figura 10A**) e o número de parasitas intracelulares diminuiu significativamente em 82%, quando comparado ao grupo controle (**Figura 10B**).

A infecção experimental com *T. cruzi* induz a produção de citocinas pelas células T

envolvidas na regulação da resposta imune. O perfil de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ confere resistência ou suscetibilidade à infecção dependendo da linhagem do camundongo infectado. O INF- γ participa na imunidade protetora contra o *T.cruzi*, pois macrófagos ativados por INF- γ liberam metabólitos reativos do oxigênio e óxido nítrico (Vespa et al., 1994) envolvidos na atividade tripanocida. Resultados obtidos posteriormente (**Figura 13**), indicam que a exposição dos camundongos às proteínas de tripomastigotas e amastigotas incorporadas nos proteolipossomos são capazes de gerar células imunes produtoras de IL-12 e INF- γ . Essas citocinas poderiam estar induzindo a atividade tripanocida dos macrófagos, observada em nossos experimentos.

Após verificarmos que os proteolipossomos eram capazes de ativar macrófagos murinos, passamos a avaliar a sua capacidade de promover imunidade protetora *in vivo*. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados uma única vez com 5, 10, 20 ou 40 μ g de proteolipossomos e, após quatro semanas, foram desafiados com 300 formas de tripomastigotas de *T.cruzi*. Os resultados apresentados na **Figura 11** mostraram que os animais imunizados com 20 μ g de proteolipossomo apresentaram uma taxa de sobrevivência de 50% ao trigésimo dias p.i. Entretanto os animais que receberam o tampão Tris apresentaram 100% de mortalidade no mesmo período. Concentrações de 5, 10 ou 40 μ g do proteolipossomo não aumentaram a sobrevivência dos camundongos BALB/c contra a infecção ao *T.cruzi*. Embora os resultados tenham demonstrado uma taxa de sobrevivência de 50% nos animais imunizados com 20 μ g de proteolipossomo, animais de todos os grupos experimentais sucumbiram após 2 meses de infecção ao *T. cruzi* (dados não apresentados).

Como não conseguimos obter proteção significativa nas diferentes concentrações testadas, decidimos variar o número de imunizações e o intervalo entre elas. Como

podemos observar na **Figura 12**, dentre os grupos de animais imunizados com o proteolipossomo, os que receberam apenas uma imunização com 20 µg de proteolipossomo e foram desafiados 4 semanas após a imunização, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100% até o vigésimo quinto dia p.i, enquanto os animais que receberam EBS apresentavam uma taxa de sobrevivência de 33% no mesmo período. Embora os animais imunizados com proteolipossomo morressem mais tardiamente, o proteolipossomo não conferiu proteção contra a infecção ao *T. cruzi* em camundongos BALB/c.

Dados da literatura mostram que um aumento da suscetibilidade murina à infecção pelo *T. cruzi* está relacionado ao aumento na produção de citocinas de padrão Th2 (IL10, IL4 e IL5) pelas células peritoneais e esplênicas (Hoft et al., 1993; Minoprio et al., 1993; Reed et al., 1994; Silva et al., 1992). Para quantificar as citocinas de padrão Th1 ou Th2, foi feita a dosagem de IL-10, IL-12 e INF- γ . Os resultados da análise do perfil de citocinas do lavado i.p. dos camundongos BALB/c imunizados, mostraram uma elevação somente de IL-12 (**Figura 13**), porém diferença significativa ocorreu quando comparados os grupos imunizados com EBS e proteolipossomo com o grupo controle (grupo IV).

Quanto ao perfil de citocinas produzidas *in vitro* pelas células do baço e linfonodos desses animais, podemos destacar o aumento na produção de IL-12 no sobrenadante das células do baço estimuladas com *T. cruzi*. Uma diferença significativa foi encontrada somente entre os grupos imunizados com EBS e proteolipossomo quando comparados ao grupo IV (**Figura 14**). De modo geral, com relação as citocinas produzidas pelas células dos linfonodos, podemos destacar um aumento na produção de IL-10 entre o grupo imunizado com proteolipossomo e o controle grupo III (**Figura 15**). Estes resultados mostraram que não há diferença no perfil de citocinas produzidas pelas células do baço e linfonodos.

O papel das citocinas na resistência e suscetibilidade à infecção por *T.cruzi* ainda não está devidamente estabelecido. Diferente do observado em infecções murinas com *Leishmania major*, onde as linhagens de camundongos resistente e suscetíveis exibem respectivamente uma resposta polarizada Th1 ou Th2 (Mosmann & Coffman, 1989), as infecções por *T.cruzi*, os camundongos suscetíveis e resistentes apresentam elevada produção de IFN- γ (Narbors & Tarleton., 1991). Com relação a produção de IL-10, tanto as linhagens resistentes como as suscetíveis produzem IL-10. O que parece definir o curso da infecção é a combinação entre a linhagem do camundongo e a cepa do parasita (Abrahamsohn & Coffman., 1995; Zang e Tarleton., 1996).

A análise da dosagem de citocinas nos camundongos imunizados com proteolipossomas, revela um aumento nos níveis de IL-10, cerca de 19 vezes, tanto no sobrenadante de cultura das células do baço quanto dos linfonodos quando comparado com a concentração dessas citocinas presente no lavado peritoneal, o que pode ter sido o suficiente para inibir a ação do INF- γ . Nossos resultados evidenciam que, no protocolo de vacinação utilizado, houve uma tendência à mudança no padrão de resposta de Th1 para Th2, observada após a estimulação *in vitro* pelo *T. cruzi*, o que explicaria a falta de proteção dos animais imunizados com o proteolipossomo.

A análise de distribuição de tamanho revelou que os nossos proteolipossomos possuem um diâmetro médio de 199 nm, isto poderia contribuir para a deficiência de proteção observada nos animais imunizados com os proteolipossomos. Dados da literatura sugerem que um parâmetro importante na indução de uma resposta Th1 ou Th2 seria o tamanho dos proteolipossomos. Vesículas lipossômicas com diâmetro médio maior que 225 nm induzem as células dos linfonodos de camundongos BALB/c a produzirem

preferencialmente um padrão de resposta Th1, enquanto que a mesma quantidade de antígenos inseridos em vesículas com diâmetro médio menor que 155 nm leva a uma resposta Th2 (Brewer *et al.*, 1998).

Outro dado importante foi descrito por Yotsumoto *et al* (2007). Esses autores observaram que um aumento na produção de IFN- γ pelas células do baço é dependente do conteúdo de fosfatidilserina na formulação lipídica dos lipossomas. Novas proporções lipídicas em nosso protocolo poderiam ser testadas, aumentando a concentração de fosfatidilserina na tentativa de induzir uma maior produção dessa citocina nos animais imunizados, tornando-os resistentes à infecção experimental por *T. cruzi*.

Embora a utilização de proteolipossomos seja uma estratégia eficiente para a indução de uma resposta imune protetora a diversas infecções por patógenos (Parmar *et al.*, 1999, Santos *et al.*, 2006, Shimizu *et al.*, 2007), os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o protocolo de vacinação utilizado falhou em proteger os camundongos BALB/c imunizados com proteínas de *T. cruzi* inseridas em lipossomos. Entretanto, dados são pioneiros e necessitam de um aprimoramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsohn and Coffman, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol**, 155: 8, 3955–3963, 1995.
- Acosta-Serrano, A., Almeida, I.C, Freitas-Junior, L.H, Yoshida, N., Schenkman, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol Biochem Parasitol**, 114: 143-150, 2001.
- Afrin, F. and Ali, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. **Infect Immun**, 65: 2371-2377, 1997.
- Afrin, F., Anam, K. and Ali, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. **J Parasitol**, 86: 730-735, 2000.
- Almeida, I.C, Camargo, M.M, Procópio, D.O, Silva, L.S, Mehlert, A, Travassos, L.R, Gazzinelli, R.T, Ferguson, M.A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J**, 19:1476-1485, 2000.
- Almeida, P.F., Pokorny, A. and Hinderliter, A. Thermodynamics of membrane domains. **Biochim Biophys Acta**, 1720: 1-13, 2005.
- Allison, A G. and Gregoriadis, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, 252: 252, 1974
- Andrade, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 85:17-27, 1990.
- Andrews, N.W. Living dangerously: how *trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol res**, 26: 65-67, 1993.
- Aramaki, Y., Suda, H. and Tsuchiya, S. Interferon- γ inductive effect of liposomes as an immunoadjuvant. **Vaccine**, 13: 1809-1814, 1995.
- Araujo, A.F, de Alencar, B.C, Vasconcelos, J.R, Hiyane, M.I, Marinho, C.R, Penido, M.L, Boscardin, S.B, Hoft, D.F, Gazzinelli, R.T, Rodrigues, M.M. CD8⁺-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. **Infect Immun**, 73: 6017-25, 2005.
- Badiee, A., Jaafari, M.R, Khamesipour, A. *Leishmania major*: immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. **Exp Parasitol**, 115: 127-134, 2007.
- Bangham, A.D, Standish, M.M, Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J Mol Biol**, 13: 238-252, 1965.

- Benting, J., Rietveld, A., Ansorge, I., Simons, K. Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. **FEBS Lett**, 462: 47-50, 1999.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99, 1987.
- Bonaldo, M. C., Souto-Padron, T., De Souza, W., Goldenberg, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Boil**, 106: 1349-1358, 1988.
- Bonato, V.L, Medeiros, A.I, Lima, V.M, Dias, A.R, Faccioliti, L.H, Silva, C.L. Downmodulation of CD18 and CD86 on macrophages and VLA-4 on lymphocytes in experimental tuberculosis. **Scand J Immunol**, 54: 564-573, 2001.
- Brewer, J.M., Tetley, L., Richmond, J., Leiw, F.Y., Alexander, J. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. **J Immunol**, 161: 4000-4007, 1998.
- Burleigh, B. A., Andrews, N. W. The mechanisms of *trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu rev microbial**, 49: 175-200, 1995.
- Camandaroba, E.L, Reis, E.A., Goncalves, M.S., Reis, M.G., Andrade, S.G. Trypanosoma cruzi: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36: 201-209, 2003.
- Camargo, M. E., Amato-Neto, V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. **Rev. Inst Med Trop**, 16: 200-202, 1974.
- Campetella, O., Martinez, J., Cazzulo, J.J. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett**, 15;55: 145-149, 1990.
- Cardillo, F., Voltarelli, J. C., Reed, S. G., Silva, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, 64: 128-134, 1996.
- Cevc, G., March, D. Phospholipid Bilayers. In: Bittar, E.E. Physical Principles and Models. **Cell Biology: A Series of Monographs**, 347-368. Wiley, New York, 1987.
- Chatelain, R., Mauze, S., Coffman, R. L. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. **Parasite Immunol**, 21: 211-218, 1999.
- Chen, P. S. Jr., Toribara, T. Y., Warner, H. Microdetermination of Phosphorus. **Ana. Chem**, 28: 1756-1758, 1956.
- Chikh, G. and Schutze-Redelmeier, M. P. Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells. **Biosci Rep**, 22: 339-353, 2002.

Coffman, R.L., Seymour, B.W., Leberman, D.A., Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol Rev**, 102: 5-28, 1988.

Colli, W., Alves, M.J. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 Suppl 1:37-49, 1999.

Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chiocola, V. L., Ribeiro, M., Schenkman, S. and Rodrigues, M. M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**, 16: 8, 768–774, 1998.

Daghestanli, K. R., Ferreira, R. B., Thedei Jr, G., Maggio, B. and Ciancaglini, P. Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 36: 127-137, 2004.

Dalton, D.K., Pitts-Meeeks, S., Keshav., S., Frigari, I.S, Bradey, A., Stewart, T.A. Multiple defects of Immune cell function in mice with disrupted interferon- gama genes. *Science*, 259: 1739-1742, 1993.

De Souza, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In. Brener, z. Et al. *Trypanosoma cruzi* e doença de chagas, 2^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 48-74, 2000.

Dias, J.C., Machado, E.M., Borges, E.C., Moreira, E.F., Gontijo, C., Azeredo, B.V. Chagas' disease in Lassance, Minas Gerais State: Clinical-epidemiological re-evaluation ninety years after the discovery by Carlos Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop**, 35: 167-176, 2002.

Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., Srimal, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **J Immunol**, 1;145: 940-944, 1990.

Filardi, L.S., Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81: 755-759, 1987.

Frank, F.M., Petray, P. B., Cazorla, S. I., Muñoz, M. C., Corral, R. S., Malchiodi. E. L. Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. **Vaccine**, 22: 77-86, 2003.

Fujimura, A.E., Kinoshita, S.S., Pereira-Chiocola, V.L & Rodrigues, M. M. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect Immun**, 69: 5477–5486, 2001.

Garg, N & Tarleton, R. L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, 70: 5547–5555, 2002.

Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L. and Sher, A. The microbicidal activity of IFN- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . **Eur J Immunol**, 22: 2501-2506, 1992.

Geginat, G., Lalic, M., Kretschmar, M., Goebel, W., Hof, H., Palm, D., Bubert, A. Th1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. **J Immunol**, Jun, 15;160: 6046-6055, 1998.

Giaimis, J., Lombard, Y., Makaya-Kumba, M., Fonteneau, P., Poindron, P. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **J Immunol Methods**, 154: 185-193, 1992.

Gomes, Y. M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. **Appl Biochem Biotechnol**, 66:107-119, 1997.

Gonzales-Perdomo, M., Romero, P., Goldenberg, S. Cyclic amp and adenylate cyclase activators stimulate *trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp parasitol**, 66: 205-212, 1988

Greaves, D. R., Gordon, S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. **J. Lipid. Res**, 46: 11-20, 2005.

Gregoriadis, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. **Immunol Today**, 11: 89-97, 1990.

Guinazu, N., Pellegrini, A., Giordanengo, L., Aoki, M.P., Rivarola, H.W., Cano, R., Rodrigues, M.M., Gea, S. Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. **Microbes Infect**, 6: 1250-1258, 2004

Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, 48: 422-427, 1972.

Heffer-Lauc, M., Viljetic, B., Vajn, K., Schnaar, R. L., Lauc, G. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. **J Histochem Cytochem**, 55: 805-12, 2007.

Helenius, A. and Simons, K. Solubilization of membrane by detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, 415: 29-79, 1975.

Hjelmeland, L. M. A nonderaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: desing and synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 77: 6368-6370, 1980.

Higgins, G. Separation and analysis of membrane lipid components In: Findlay, J.B.C and Evans, W.H. Biological Membranes Practical approach series, IRL Press Oxford, 104-137, 1987.

Hoare, C.A. and Wallace, F.G. Developmental satage of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, 212:1385-1386, 1966.

Hoft, D.F., Lynch. R.G., Kirchhoff, L.V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, 15;151: 7038-7047, 1993.

Ignatius, R., Mahnke, K., Rivera, M., Hong, K., Isdell, F., Steinman, R.M., Pope, M., Stamatatos, L. Presentation of proteins encapsulated into liposomeby dendritica cells initiates CD8 T-cell response *in vivo*. **Blood**, 96: 3505-3513, 2000.

Kalil, J., Cunha-Neto, E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? **Parasitol Today**,12: 396-399, 1996.

Kersten, G.F.A & Crommelin D.J.A. Liposomes and ISCOMS as vacine formulotions. **Biochim Biophys Acta**, 1241: 117-138, 1995

Koepsell, H. Methodological aspects of purification and reconstitution of transport proteins from mammalian plasma membranes. **Ver. P Hysiol. Pharmacol**, 104: 65-137, 1986.

Krettli, A.U., Brener, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, 116: 755-760, 1976.

Krettli, A.U., Weisz-Carrington, P., Nussenzweig RS.Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. **Clin Exp Immunol**,37: 416-423, 1979.

Krettli, A.U., Brener, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J Immunol**, 128: 2009-2012, 1982.

Knol, J., Sjollema, K., Poolman, B. Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. **Biochemistry**. 17;37: 16410-16415, 1998

Kobayashi K. Towards new strategies to combat mycobacterial diseases. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi**, 66: 191-198, 1997.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

Lages-Silva, E., Ramirez, L.E., Krettli, A.U., Brener, Z. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Parasite Immunol**, 9: 21-30, 1987.

Le Maire, M., Champeil, P and Moller, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochim Biophys Acta**, 1508: 86-111, 2000.

Lima-Martins, M.V., Sanchez, G.A., Krettli, A.U., Brener, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol**, 7: 367-76, 1985.

Low, H. P, Santos, M. A. M., Wizek, B & Tarleton, R. L. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+CTL. **J Immunol**, 160: 1817–1823, 1998.

Meirelles, M.N., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S.G., Costa, E.M., Murta, A.C., Scharfstein, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Mol Biochem Parasitol**, 52: 175-184, 1992.

Melo, R.C., Brener, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol**, 64: 475-482, 1978.

Miller, M. J., Wrightsman, R. A and Manning, J. E. *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. **Exp Parasitol**, 84: 156-167, 1996.

Minoprio, P., el Cheikh, M.C., Murphy, E., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Coffman, R., Coutinho, A., O'Garra, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **J Immunol**, 15;151: 4200-4208, 1993.

Moncayo, A. Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission of Chagas disease in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 58: 577-91, 2003.

Morilla, M.J., Montanari, J., Frank, F., Malchiodi, E., Corral, R., Petray, P., Romero, E.L. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **J Control Release**, 18;103: 599-607, 2005.

Mosmann, T. R, Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, 1;136: 2348-2357, 1986.

Nabors, G. S., Tarleton, R. L. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, 146: 3591-3598, 1991.

New, R. R. C. Liposomes: a practical approach. **Oxford University Press**, NY, 1990.

Okabe, K., Kipnis, T.L., Calich, V.L., Dias da Silva, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. **Clin Immunol Immunopathol**, 16: 344-353, 1980.

Ouaissi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistrelli, G., Herbault, N., Thieblemont, N & Jeannin, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **J Immunol**, 168: 6366-6374, 2002.

Parmar, M. M., Edwards, K., Madden, T. D. Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution. **Biochim. Biophys. Acta**, 1421, 77-90, 1999.

Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr Opin Immunol**, 14: 123-128, 2002.

Pereira-Chioccola, V.L., Costa, F., Ribeirão, M., Soares, I.S, Arena, F., Schenkman, S., Rodrigues, M.M. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. **Parasite Immunol**, 21: 103-110, 1999.

Powell, M. R., Wassom, D. L. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. **Parasite Immunol**, 15: 215-21, 1993.

Quanquin, N. M., Galaviz, C., Fouts, D. L., Wrightsman, R. A and Manning, J.E. Immunization of mice with a TolA-like surface protein of *Trypanosoma cruzi* generates CD4⁺ T-cell-dependent parasiticidal activity. **Infect. Immun**, 67: 4603-4612, 1999.

Read, S. M. and Northcote, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Anal Biochem**, 116: 53-64, 1981.

Reed, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**. 15;140: 4342-4347, 1988.

Reed, S. G., Brownell, C. E., Russo, D. M., Silva, J. S., Grabstein, K. H., Morrissey, P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, 1;153: 3135-3140, 1994.

Ribeirão, M., Pereira-Chioccola, V. L., Renia, L., Filho, A. F., Schenkman, S and Rodrigues, M. M. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunol**, 22:49-53, 2000.

Riepl, R. G. and Vidaver, G. A. Effects of Triton X-100 treatments on the compositions and activities of membrane vesicles from pigeon erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, 507: 97-106, 1978.

Rodrigues, M. M., Ribeirao, M., Pereira-Chioccola, V., Renia, L & Costa, F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune

response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect Immun**, 67: 3855–3863, 1999.

Rigaud, J. L., Levy, D., Mosser, G and Lambert, O. Detergent removal by non-polar polystyrene beads: Applications to membrane protein reconstitution and two-dimensional crystallization. **Eur Biophys J**, 27: 305-319, 1998.

Rigaud, J. L., Pitard, B. and Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1231: 223-246, 1995.

Saborio, J.L., Manuel Hernandez, J., Narayanswami, S., Wrightsman, R., Palmer, E., Manning, J. Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, 5;264: 4071-5, 1989.

Santori, F. R., Paranhos Bacalla, G. S, Franco, D. A. S. J., Yamauchi, L. M., Araya, J. E & Yoshida, N. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. **Infect Immun**, 64: 1093-1099, 1996.

Santos, F. R., Ferraz, D. B, Daghasanli, K. R.P., Ramalho-Pinto, F. J., Ciancaglini, P. Mimetic membrane system to carry multiple antigenic proteins from *Leishmania amazonensis*. **J. Membr. Biol**, 210: 173-181, 2006.

Schattschneider, W., Lopes, E. R. Alencar, J. E. Bienzle, U., Feldmeier, H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. **Trop. Geogr.Med**, 44: 210–218, 1992.

Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E., Nussenzweig, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annu Rev Microbiol**, 48: 499-523, 1994.

Schmunis, G. A. and Cruz, J. R. Safety of the blood supply in Latin America. **Clin Microbiol Rev**, 18: 12-29, 2005.

Schnapp, A. R, Eickhoff, C. S, Sizemore, D., Curtiss, R. R. D and Hoft, D. F. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Infect Immun**, 70: 5065-5074, 2002.

Shakushiro, K., Yamasaki, Y., Nishikawa, M., Takakura, Y. Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells. **Immunology**, 112: 211-218, 2004.

Sharma, A. and Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **Int. J. Pharmac**, 154: 123-140, 1997

Shimizu, Y., Takagi, H., Nakayama, T., Yamakami, K., Tadakuma, T., Yokoyama, N., Kojima, N. Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped

soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type immune response in BALB/c mice through uptake by peritoneal macrophages. **Parasite Immunol**, 29: 229-239, 2007.

Silva, J. S., Aliberti, J. C., Martins, G. A., Souza, M. A., Souto, J. T., Padua, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res**, 31: 111-115, 1998.

Silva, J. S., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Mohler, K. M., Anderson, D and Reed, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med**, 175: 169–174, 1992.

Silva, J.S., Twardzik, D.R., Reed, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med**, 1;174: 539-545, 1991.

Silva, J. S., Vespa, G. N., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C & Cunha, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**, 63: 4862-4867, 1995.

Silvius, J. R. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. **Biophys. Biomol. Struct**, 21: 323-348, 1992.

Soares, M. B., Gonçalves, R., Pyrrho, A.S., Costa, D. A., Paiva, C. N., Gattass, C. R. Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc**, 75: 167-72, 2003.

Soares, M. B., Pontes-De-Carvalho, L., Ribeiro-Dos-Santos, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An Acad Bras Cienc**, 73: 547-59, 2001.

Soares, M.B.P., Silva-Mota, K. N., Lima, R. S, Bellintani, M. C., De Carvalho, L. C. P. and Ribeiro-Dos-Santos, R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am J Pathol**, 159: 703-709, 2001.

Tarleton, RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, 15;144: 717-724, 1990

Tarleton, R L. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. In: Kaufman S H E. editor. Host response to intracellular pathogens. R. G. Austin, Tex: Landes Co., pp. 227–247, 1997.

Tarleton, R.L, Grusby, M.J., Postan, M., Glimcher, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int Immunol**. 8: 13-22, 1996.

Tarleton, R.L., Koller, B.H., Latour, A., Postan, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**. 26;356: 338-340, 1992.

Takehara, H.A., Da Silva, A.M., Brodskyn, C.I., Mota, I. A comparative study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. **Immunol Lett**, 23: 81-85, 1989.

Takehara, H. A, Perini, A., Da Silva, M. H., Mota, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp Parasitol**, 52:137-146, 1981.

Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Simon, D., Morris, S.A, Weiss, L.M., Wittner, M. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, 5: 400-419, 1992.

Tyler, K. M., Engman, D. M. The life cycle of *trypanosoma cruzi* revisited. **Int J. Parasitol**, 31: 472- 481, 2001.

Truyens, C., Angelo-Barrios, A., Torrico, F., Van Damme, J., Heremans, H., Carlier, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses . **Infect immun**, 62: 692-696, 1994

Umezawa, E.S., Nascimento, M.S., Kesper, N. Jr., Coura, J.R., Borges-Pereira, J., Junqueira, A.C. and Camargo, M.E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **J Clin Microbiol**, Sep;34(9):2143-7, 1996.

Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Claser C, Machado AM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O, Alvarez JM, Boscardin SB, Rodrigues MM. 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. **Hum Gene Ther**. 2004 Sep;15(9):878-86

Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm Acta Helv**. 1995 Jul;70(2):95-111.

Vespa, G. N., Cunha, F. Q., Silva, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun**, 62: 5177-5182, 1994.

Wassef NM, Alving CR, Richards RL. Liposomes as carriers for vaccines. **Immunomethods**, 4:217-22, 1994.

Who- World Health Organization life-cycle of *trypanosoma cruzi*. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>>. Acesso em 05 agosto 2007.

WHO - World Health Organization Chagas. Burdens and trends. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>. Acesso em: 09 set. 2002.

Wizel, B., Garg, N & Tarleton, R. L. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, 66: 5073-5081, 1998.

Wizel B, Nunes M, Tarleton RL. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. **J Immunol**, 15;159: 6120-30, 1997.

Wrightsmann, R. A., Miller, M. J., Saborio, J. L. Manning JE. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, 63: 122-125, 1995.

Yotsumoto, S., Kakiuchi, T., Aramaki, Y. Enhancement of IFN-gamma production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine. **Vaccine**, 20; 25: 5256-5262, 2007.

Zhang, L., & Tarleton, R.L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur J Immunol**, 26: 102-109, 1996.

ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº **082/2005**, sobre o projeto intitulado “*Proteínas ancoradas por GPI de Trypanosoma cruzi como possíveis antígenos indutores de imunidade protetora à Doença de Ghagas*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **30 de janeiro de 2006**.

(We certify that the protocol nº **082/2005**, about “*T.cruzi GPI – anchored protein as putative antigens in protective immunity to Chagas’ disease*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **01/30/2006** meeting).

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2006.

Prof. Dr. EDUARDO MAGALHÃES REGO
Decano da Comissão
de Ética em Experimentação Animal

ANEXO II

ENC: A manuscript number has been assigned: CPL-D-07-00086

1 mensagem

Pietro Ciancaglini <pietro@ffclrp.usp.br>

20 de Agosto de 2007 11:13

Para: Fabiana Rodrigues dos Santos <fabiana.rodriguesdossantos@gmail.com>, Vanessa Migliaccio <vanessa_migliaccio@hotmail.com>, Juarez Ramalho <juarez.ramalho@gmail.com>

-----Mensagem original-----

De: Chemistry and Physics of Lipids

[mailto:esubmissionsupport@elsevier.com]

Enviada em: domingo, 19 de agosto de 2007 17:59

Para: pietro@ffclrp.usp.br

Assunto: A manuscript number has been assigned: CPL-D-07-00086

Ms. Ref. No.: CPL-D-07-00086

Title: The use of liposome system to deliver antigenic proteins from Trypanosoma cruzi: initial study showing, "in vitro", the killing capacity of macrophages but without, "in vivo", the ability to protect mice Chemistry and Physics of Lipids

Dear Dr Ciancaglini,

Your submission entitled "The use of liposome system to deliver antigenic proteins from Trypanosoma cruzi: initial study showing, "in vitro", the killing capacity of macrophages but without, "in vivo", the ability to protect mice" has been assigned the following manuscript number: CPL-D-07-00086.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

William Stillwell

Associate Editor

Chemistry and Physics of Lipids

No virus found in this incoming message.

Checked by AVG Free Edition.

Version: 7.5.484 / Virus Database: 269.12.0/961 - Release Date: 19/8/2007 07:27

No virus found in this outgoing message.

Checked by AVG Free Edition.

Version: 7.5.484 / Virus Database: 269.12.0/961 - Release Date: 19/8/2007 07:27

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)