

**FILIFE AUGUSTO BETTENCOURT HAOLLA**

**EFEITO DA IMUNIZAÇÃO GENÉTICA COM PLASMÍDEOS E  
ADENOVIRUS RECOMBINANTES EXPRESSANDO A PROTEÍNA 2  
DA SUPERFÍCIE DE AMASTIGOTAS E A *TRANS*-SIALIDASE NA  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS SUSCEPTÍVEIS  
A/Sn POR CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* ISOLADAS NA COLÔMBIA.**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FILIFE AUGUSTO BETTENCOURT HAOLLA**

**EFEITO DA IMUNIZAÇÃO GENÉTICA COM PLASMÍDEOS E  
ADENOVÍRUS RECOMBINANTES EXPRESSANDO A PROTEÍNA 2  
DA SUPERFÍCIE DE AMASTIGOTAS E A *TRANS*-SIALIDASE NA  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS SUSCEPTÍVEIS  
A/Sn POR CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* ISOLADAS NA COLÔMBIA.**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Martins  
Rodrigues

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

São Paulo

**2009**

HAOLLA, Filipe Augusto Bettencourt

Efeito da imunização genética com plasmídeos e adenovirus recombinantes expressando a proteína 2 da superfície de amastigotas e a *trans*-sialidase de na infecção experimental de camundongos susceptíveis A/Sn por cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas na Colômbia. / Filipe Augusto Bettencourt Haolla - São Paulo, 2009. 94p.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. *Trans*-sialidase. 4. ASP-2

**Trabalho realizado no Centro Interdisciplinar de  
Terapia Gênica (CINTERGEN) junto ao Departamento  
de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da  
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de  
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**

**À minha mãe Ana Rita Bettencourt e ao meu pai, Paulo Haolla,  
pelo carinho, paciência e por me dar todas as condições  
necessárias para que pudesse chegar até este caminho.**

**Às minhas irmãs, que dividem comigo os momentos de alegria e  
também as dificuldades.**

**Aos meus grandes amigos, pela força e companhia em diversos  
momentos desta jornada.**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues, que me proporcionou essa oportunidade de aprendizado e que esteve sempre presente quando necessitei. Durante estes três anos que convivemos, com certeza recebi uma sólida formação não somente acadêmica, mas também pessoal e crítica.

A todos meus colegas do laboratório que passaram este tempo comigo sempre me auxiliando quando era preciso – Bruna de Alencar, Dra. Carla Claser, Daniel Bargieri, Dra. Daniela Santoro, Dr. Eduardo Silveira, Dra. Fanny Tzelepis, Dr. José Roniie, Mariana Dominguez, Mirian Guirro, Luís Zanella Samanta Mello. Pelo convívio harmonioso, pela amizade, atenção e bons momentos.

Aos amigos do CINTERGEN: Priscilla Tânia, Helena Tomiyama, Marli Cursio Ricardo Russo, Maria Teresa Maidana, Issler, Zelinda, Cândida, Wagner Batista, Fernando, Roberta, Chester, Eduardo Yasumura, Vanessa Cantagali, pela ajuda sempre prestativa e agradável convivência. Em especial quero agradecer ao Dr. Hugo Monteiro, Dra. Karina C. Salmazi, Fernanda Bruno Romano, e Bianca Lisboa pelas longas conversas, ajuda sempre prestativa, e principalmente pela amizade e carinho adquiridos.

Aos funcionários do CINTERGEN: Ivonete, Magali, Ivone, Roseli, Elieser e Noé pelo respeito que sempre me foi dado.

A XXXIX turma de Biomedicina da UNESP, da qual tenho orgulho. Família sempre presente, com cada vez mais histórias para contar. E aos que mesmo longe, me fazem refletir que a saudade é a prova de realmente valeu a pena, sentimento este presente em todos os reencontros.

Aos muitos colegas que possuo, pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus verdadeiros amigos (especialmente aos que chamo de irmãos), que em muito me ajudaram e sempre estiveram presentes ao meu lado. Pela diversão, baladas, afeto, segredos compartilhados, enfim, pela alegria de viver.

E por último, mas não menos importante, a toda a minha família que sempre esteve ao meu lado me incentivando por toda a minha vida. Pela atenção prestada e principalmente ao carinho e paciência, que me deram forças para cumprir mais esta tarefa.

Muito obrigado!

"A verdadeira educação consiste em obter o melhor de si mesmo.  
Que outro livro se pode estudar melhor do que o da Humanidade?"

**Gandhi**



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>RESUMO</b> .....	XIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1. A Doença de Chagas.....	2
1.2. Diferentes cepas encontrados no <i>T. cruzi</i> .....	5
1.3. Resposta imune durante a infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i> .....	8
1.4. Mecanismos de resposta imune nas infecções experimentais crônicas pelo <i>T. cruzi</i> .....	13
1.5. Vacinação genética contra a Doença de Chagas experimental.....	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2. Objetivos.....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1. Camundongos e parasitas.....	20
3.2. Composição das soluções e tampões utilizados.....	20
3.3. Meios de cultura.....	22
3.3.1. Meios para cultura de bactérias.....	22
3.3.2. Meio para cultura de células.....	22
3.4. Extração do DNA do parasita em alíquota de sangue murino.....	23
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e purificação do DNA.....	24
3.6. Seqüenciamento dos mini exons.....	24
3.7. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep).....	25
3.8. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose para verificação da presença do inserto e sua orientação.....	26
3.9. Análise computacional das seqüências obtidas.....	26
3.10. Preparação de bactérias competentes.....	27
3.11. Transformação de bactérias competentes com produtos de ligação	27
3.12 Crescimento em larga escala de plasmídeos transformados em bactérias da cepa DH5α.....	28
3.13 Purificação de plasmídeo crescido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio (CsCl).....	29

3.14 Purificação de adenovirus crescido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl).....	30
3.15 Imunização.....	31
3.16. Desafio e quantificação.....	32
3.17. Análise da resposta imune humoral.....	32
3.17.1. ELISA.....	32
3.18. Análise da resposta imune celular.....	34
3.18.1. ELISPOT <i>ex vivo</i> para produção de IFN- $\gamma$ .....	34
3.18.2. Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i> .....	35
3.19. Eletrocardiograma.....	37
3.20. Análise Histopatológica.....	37
3.21. Análise estatística.....	38
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME	- 2-mercaptoetanol
AAs	- Aminoácidos
ADCC	- Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AMP	- Ampicilina
APC	- Célula Apresentadora de Antígeno
ASP	- Proteína de Superfície de Amastigotas (“Amastigote Surface Protein”)
BSA	- Albumina Sérica Bovina
CsCl	- Cloreto de Césio
cDNA	- DNA complementar
DAB	- Diaminobenzidina
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DNase	- Desoxirribonuclease
dNTP	- Deoxi-nucleotídeos
DO	- Densidade Óptica
DP	- Desvio Padrão
DTT	- 1,4-ditio-dl-treitól
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetraacético
ELISA	- “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	- “Enzyme Immunospot Assay”
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Água Oxigenada
HCl	- Ácido clorídrico
HEPES	- Ácido n-2-hidroxietilpiperazina n-2-etanosulfônico
His	- Histidina
Ig	- Imunoglobulina
IFN- $\gamma$	- Interferon-gama
IPTG	- Isopropil- $\beta$ -d-tiogalactopiranosídeo
Kb	- Quilo Pares de Bases
KCl	- Cloreto de Potássio
kDa	- Quilo Dalton
KO	- “Knock-out”
L	- Litro
LiCl	- Cloreto de Lítio
LIT	- “Liver infusion tryptose”
LLCMK <sub>2</sub>	- “Monkey Rhesus kidney cell”
M	- Molar
mA	- Miliampére
Mg	- Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de Magnésio
MHC	- Complexo Maior de Histocompatibilidade
mL	- Mililitro
ms	- Milisegundo
mM	- Milimolar
Mm	- Milímetro
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	- Carbonato de Sódio
NaCl	- Cloreto de Sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Fosfato de Sódio Bibásico
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Fosfato de Sódio Monobásico
NaHCO <sub>3</sub>	- Bicarbonato de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NaPyr	- Pirofosfato de sódio
NO	- Óxido nítrico

Ng	- Nanograma
nM	- Nanomol
OPD	- Ortofenilenodiamina
Pb	- Pares de Bases
ORF	- Fase aberta de leitura de um gene
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PEG	- Polietilenoglicol
Pmol	- Picomol
PMSF	- Fluoreto de Fenilmetil-sulfonila
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNase	- Ribonuclease
Rpm	- Rotações por Minuto
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	- Soro fetal bovino
TAE	- Tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	- Tampão tris-borato-EDTA
TE	- Tampão tris-EDTA
TEMED	- n, n, n', n' tetrametil etilenodiamida
TLR	- Receptor do tipo <i>Toll</i>
TS	- <i>Trans</i> -sialidase
U	- Unidade
V	- Volt
vol/vol	- Volume/volume
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ -d-galactopiranosídeo
$\mu$ F	Micro-Faraday
$\mu$ g	- Micrograma
$\mu$ l	- Microlitro
$\mu$ M	- Micromolar
X	- Vez

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Ciclo de vida do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Análise dos domínios divergentes D7 da subunidade maior do rRNA 24S $\alpha$ de <i>T. cruzi</i> nas cepas Colombiana e COL.....	41
<b>FIGURA 3.</b> Resposta imune em camundongos B10A mediada por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para o epítipo TEWETGQI após infecção com as cepas Colombiana ou COL de <i>T. cruzi</i> .....	42
<b>FIGURA 4.</b> Títulos de anticorpos após imunização com os genes da <i>asp-2</i> e <i>ts</i> .....	44
<b>FIGURA 5.</b> Resposta imune em camundongos A/Sn mediada por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para o epítipo TEWETGQI após imunização conjunta com os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> .....	46
<b>FIGURA 6.</b> Parasitemia dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> após o desafio com a cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> . ....	48
<b>FIGURA 7.</b> Sobrevivência dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> após o desafio com a cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> .....	49
<b>FIGURA 8.</b> Parasitemia dos camundongos A/Sn imunizados com plasmídeos contendo os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> após o desafio com a cepa COL de <i>T. cruzi</i> .....	50
<b>FIGURA 9.</b> Sobrevivência dos camundongos A/Sn imunizados com DNA plasmidial contendo os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> após o desafio com a cepa COL de <i>T. cruzi</i> .....	51
<b>FIGURA 10.</b> Parasitemia dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> após o desafio com a cepa COL de <i>T. cruzi</i> .....	53
<b>FIGURA 11.</b> Sobrevivência dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes <i>asp-2</i> e <i>ts</i> após o desafio com a cepa COL de <i>T. cruzi</i> .....	54
<b>FIGURA 12.</b> Representações de perfis eletrocardiográficos em animais imunizados e infectados pela cepa COL de <i>T. cruzi</i> durante a fase crônica da infecção.....	57
<b>FIGURA 13.</b> Análise de secções de corações de camundongos A/Sn imunizados e corados pelo método de Picrosirius durante a fase crônica de infecção após desafio frente à cepa COL.....	58
<b>Figura 14.</b> Fotografias de lâminas coradas pelo método de Picrosírius.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Sumário dos experimentos de vacinação em modelos experimentais utilizando genes/antígenos de <i>T. cruzi</i> .....	17
<b>TABELA 2.</b> Representações numéricas de anormalidades encontradas nos perfis eletrocardiológicos de camundongos imunizados infectados pela cepa COL de <i>T. cruzi</i> ..	56

## RESUMO

Em estudos anteriores foi demonstrado que imunizações com os genes que codificam a proteína 2 da superfície de amastigotas (ASP-2) e a porção catalítica da enzima *trans*-sialidase (TS) induziam imunidade protetora contra a infecção experimental de camundongos altamente susceptíveis A/Sn por parasitas da cepa Y de *T. cruzi*. Dada a possível variabilidade biológica encontrada nas diversas cepas isoladas de regiões distintas do continente americano, a proposta deste estudo foi o de verificar a possibilidade de generalização destes resultados frente a cepas isoladas de regiões endêmicas na Colômbia.

Os camundongos foram imunizados com diferentes regimes contendo sempre os genes *asp-2* e *ts* e posteriormente desafiados com formas sanguíneas da cepa Colombiana ou COL de *T. cruzi*. A presença de resposta imune antes do desafio experimental foi medida pela presença de anticorpos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos. No caso da cepa Colombiana, a vacinação genética não foi capaz de conferir imunidade protetora contra a infecção aguda com uma dose letal de parasitas. No caso da cepa COL, pudemos observar drástica redução da parasitemia e aumento da sobrevivência dos animais após infecção com uma dose letal de parasitas. Apesar de terem sobrevivido à infecção letal aguda, durante a fase crônica da doença, por meio de exame elétrico cardiológico (ECG), observamos alterações na condutividade elétrica na maioria dos animais. Destes, o grupo que recebeu duas doses contendo adenovírus recombinantes apresentou redução na porcentagem de animais com ECG alterados.

A análise histológica destes animais demonstrou fibrose cardíaca, sendo que o grupo que recebeu adenovírus recombinantes apresentou redução na porcentagem de área fibrótica quando comparado com os demais grupos.

Concluimos que imunidade protetora induzida pela vacinação com os genes *asp-2* e *ts* é dependente da cepa de *T. cruzi* utilizada para a infecção experimental. Estes resultados pedem uma revisão das atuais estratégias para que uma possível vacina seja obtida contra cepas de diferentes regiões endêmicas.

## ABSTRACT

In earlier studies it was demonstrated that immunizations with the genes encoding the Amastigote Surface Protein-2 (ASP-2) and the catalytic domain of the enzyme *trans*-sialidase (TS) induced protective immunity against experimental infection of highly susceptible A/Sn mice with parasites of the Y strain of *T. cruzi*. Due to the possible biological variability found in parasite strains isolated from distinct regions of the American continent, our goal was to determine the possible general validity of our results toward strains isolated in endemic regions of Colombia.

Mice were vaccinated with different regimens with genes *asp-2* and *ts*, and subsequently challenged with blood stages of *T. cruzi* belonging to the strains Colombian or Colombia (COL). The presence of immune response before challenge was measured by specific antibodies and CD8<sup>+</sup> T cells. In the case of the Colombian strain, the genetic vaccination was not able to confer protective immunity against the acute infection with a lethal dose of parasites. In the case of the COL strain, we observed a drastic reduction of parasitemia and a significant increase in survival following a challenge with an otherwise lethal dose of parasites. Although these mice survived the lethal acute infection, during the late chronic infection, using electrocardiogram (ECG), we observed alterations in the electric conductivity in most animals. The mice immunized with two doses of recombinant adenovirus displayed a reduction in the percentage of individuals with altered ECG.

Hystological analysis of these animals showed signs of cardiac fibroses. The group of mice immunized with the recombinant adenovirus presented a reduction in the percentage of fibrotic area when compared to the other groups.

We concluded that the immunity induced by vaccination with the genes *asp-2* and *ts* is dependent on the strain of *T. cruzi* used for the challenge. These results ask for a revision of the current strategies to develop a vaccine against parasite strains from different endemic regions.



# **INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas e tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). É transmitida ao homem pelo contato com as formas tripomastigostas presentes nas fezes do inseto triatomíneo (conhecido como “barbeiro” ou “kissing bug”), através de sangue contaminado de pacientes ou durante a relação materno-fetal.

No Brasil, existem pelo menos 44 espécies de triatomíneos identificados, a maioria delas silvestres. Destas, cinco espécies são consideradas domésticas e, portanto, de importância epidemiológica: o *Triatoma infestans*; *Panstrongylus megistus*; o *T. brasiliensis*; *T. pseudomaculata* e *T. sórdida* (Coura, 2003).

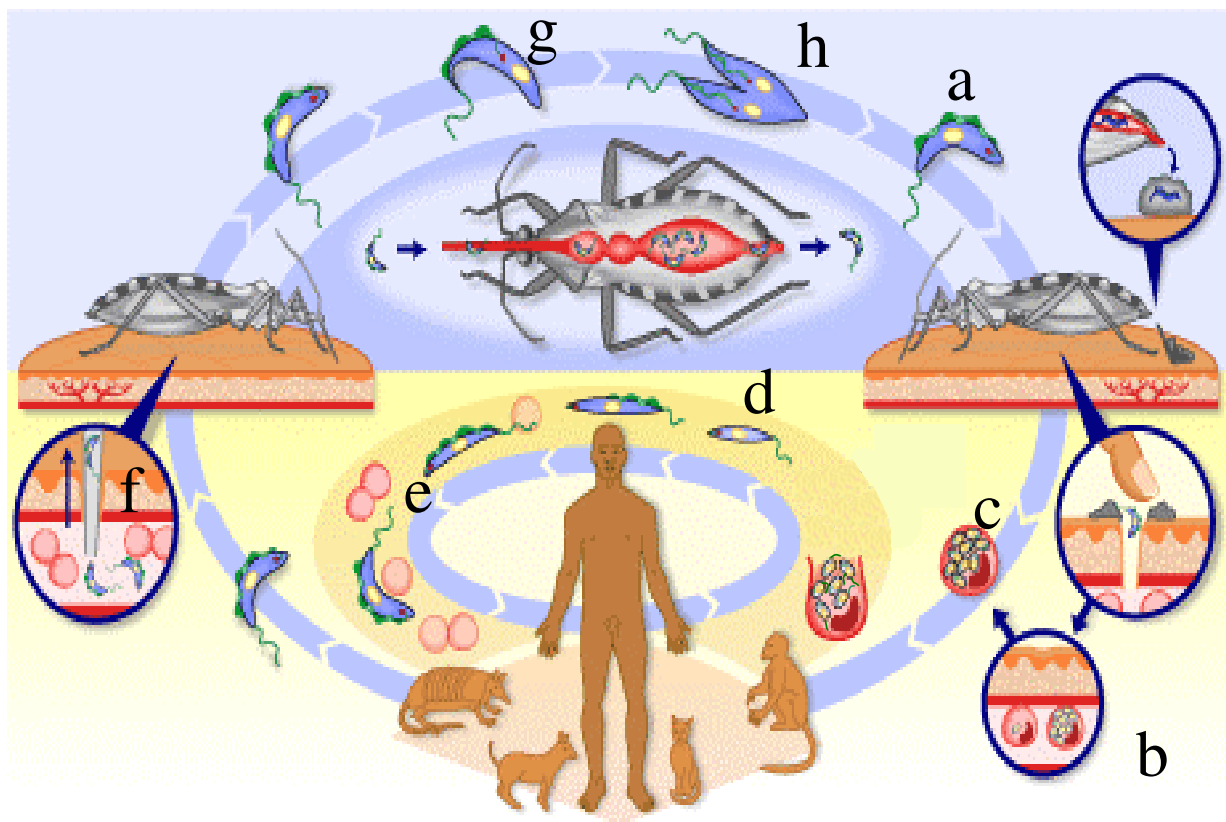
A infecção é geralmente transmitida pelo vetor triatomíneo hematófago que defeca próximo ao sítio da picada (figura 1). A infecção se inicia na camada dermal ou mucosa da conjuntiva pelas formas infectivas tripomastigostas metacíclicas (a), que estão presentes nas fezes e urina do inseto. A penetração desses parasitas no organismo vertebrado pode ocorrer diretamente nas mucosas ou quando o indivíduo coça o local da picada. Uma vez presente no hospedeiro vertebrado, esses tripomastigostas metacíclicos invadem as células das camadas subjacentes a pele (b) e, no citoplasma dessas células, diferenciam-se em amastigotas intracelulares que se multiplicam por divisão binária (c). Após vários ciclos de replicação, esses amastigotas se diferenciam em tripomastigostas (d). Alguns autores acreditam que formas intermediárias do tipo epimastigotas possam aparecer transientemente durante a diferenciação de amastigotas para tripomastigostas, compartilhando características de ambos os estágios, embora suas propriedades predominantes de morfologia sejam dos epimastigotas (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999). Com a lise das

células hospedeira, esses tripomastigotas são liberados na corrente sangüínea e serão distribuídos para os diferentes órgãos e tecidos (e). Caso o hospedeiro vertebrado seja novamente picado por um inseto triatomíneo, este irá ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas, reiniciando o ciclo (f).

Uma vez que o inseto triatomíneo ingeriu essas formas tripomastigotas juntamente com o sangue do hospedeiro, ocorrerá uma diferenciação dessas formas em epimastigotas (g) no tubo digestivo (intestino médio), que se multiplicam por fissão binária (h). Na porção terminal do tubo digestivo do inseto (intestino posterior), os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos que são as formas infectantes do hospedeiro vertebrado (a).

Apesar da redução significativa da transmissão vetorial observada nas últimas décadas, outras formas de transmissão ainda ocorrem como foi demonstrado pelo recente surto registrado no primeiro semestre de 2005 em Santa Catarina e no Amazonas em 2006 (Yoshida, 2008). Além disso, devido à inexistência de medicação adequada, pacientes com doença cardíaca severa apresentam uma piora progressiva até sua morte em geral decorrente de insuficiência cardíaca (WHO).

Dentre os métodos diagnósticos atualmente utilizados temos: exame de gota espessa (pesquisa de formas do parasita no sangue), xenodignóstico, detecção do DNA do parasita por reação de PCR ou ainda detecção de anticorpos específicos (exame sorológico).



**Figura 1. Ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi*.** A infecção é transmitida pelo inseto triatomíneo que pica o indivíduo, defecando próximo ao local da picada. Nas fezes e urina do inseto encontram-se formas tripomastigotas metacíclicas (a) que penetram pela lesão causada no momento da picada em que o indivíduo começa coçar a região. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células das camadas subjacentes à pele (b) e, no citoplasma dessas células, diferenciam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão binária (c). Os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos (d), os quais são liberados para a corrente sanguínea com a lise da célula hospedeira, o que facilita sua migração para diferentes órgãos e tecidos (e). Se o hospedeiro vertebrado for novamente picado por um inseto triatomíneo, este ingere as formas tripomastigotas sanguíneas, reiniciando o ciclo (f). No tubo digestório do inseto ocorre a diferenciação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas (g) que se multiplicam por fissão binária (h). Na porção terminal do tubo digestório do hospedeiro invertebrado ocorre a diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes do hospedeiro vertebrado (a) (WHO).

A doença de Chagas se caracteriza por uma fase aguda geralmente branda seguida de uma fase indeterminada longa e assintomática. As manifestações clínicas relevantes podem surgir até três décadas após a infecção, ocorrem em cerca de 30% dos infectados e consistem em cardiomiopatia chagásica crônica, mega-síndrome (cardíaca e/ou digestória) ou ainda degeneração do sistema nervoso periférico (Coura, 2007).

A Doença de Chagas é considerada um importante problema de saúde na América Latina e segundo a Organização Mundial da Saúde, afeta entre 16 e 18 milhões de pessoas e cerca de 100 milhões estão sob risco de infecção sendo que o Brasil é responsável por 4,6% das ocorrências das América do Sul e Central. Segundo relatório apresentado pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP), o prejuízo causado pela Doença de Chagas ao continente Latino-Americano chega a US\$ 8.156 milhões (WHO).

A severidade do problema e a necessidade de novas formas de tratamento ou prevenção da Doença de Chagas justificam a busca por uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos que atuam durante a infecção e por uma vacina.

## 1.2 DIFERENTES CEPAS ENCONTRADAS NO *T. CRUZI*

A partir da expansão colonizadora de áreas de mata fechada nas Américas, seres humanos passaram a ter contato com o ciclo silvestre e tornaram-se possíveis hospedeiros e reservatórios naturais deste parasita (Macedo *et al.*, 2004). Relatos científicos estabelecem o ciclo de infecção do *T. cruzi* no meio selvagem sendo que diferentes cepas foram isoladas em gambás e outros animais silvestres vertebrados.

Dada a diversidade regional e preferência na alimentação das diferentes espécies de insetos vetores desta doença, linhagens geneticamente distintas se estabeleceram (revisito por Higo *et al.*, 2004; Yeo *et al.*, 2005) Diferenças nas manifestações clínicas e a diversidade enzimática e biológica dos clones circulantes em laboratórios de pesquisa incentivaram pesquisadores a iniciar a tentativa de correlacionar marcadores moleculares com essas características. Através de eletroforese de proteínas celulares com atividade enzimática (isoenzimas), três grupos principais, ou zimodemas, foram propostos: de Z1, Z2 e Z3 (Miles *et al.*, 1978; Miles *et al.*, 1980). Estudos epidemiológicos mostraram a associação de Z1 e Z3 com o ciclo selvagem e Z2 ao ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1980).

A análise de marcadores moleculares como a análise do domínio divergente 24S $\alpha$  da subunidade maior do rRNA dividiu as linhagens principais como distintas filogeneticamente em dois grupos (Souto and Zingales, 1993; SATELLITE-MEETING, 1999): 1) *T.cruzi I* são pertencentes ao Z1 e associadas geralmente ao ciclo silvestre por serem encontradas em marsupiais. Essas cepas são predominantes em regiões como norte amazônico e Venezuela (Miles *et al.*, 1981); e 2) *T.cruzi II*, pertencentes ao Z2 e associada ao ciclo peridoméstico, isoladas a partir de seres humanos e primatas (Fernandes *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999a; Fernandes *et al.*, 1999b). Ainda, na cardiomiopatia e outras manifestações severas, esta foi a mais comumente encontrada. (Zingales *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1999). Estas cepas são encontradas principalmente nos países ao sul da América do Sul: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (Chapman *et al.*, 1984).

A associação entre essas distintas linhagens e manifestações clínicas encontradas em seres humanos ainda é muito controversa. (Anez *et al.*, 2004) mostraram que pacientes venezuelanos infectados com *T. cruzi* I apresentaram falência cardíaca três vezes maior que os pacientes infectados com *T. cruzi* II, e que a porcentagem de pacientes assintomáticos infectados com *T. cruzi* II foi duas vezes maior que a porcentagem de pacientes infectados com *T. cruzi* I. Juntamente com outros artigos, esses resultados mostram que a circulação das linhagens ultrapassa a barreira geográfica, estando ambas presentes em populações de diferentes locais e com diferentes manifestações clínicas (Botero *et al.*, 2007; Manoel-Caetano Fda and Silva, 2007).

Faz parte do grupo *T. cruzi* I as cepas G, Dm28c, Sylvio X10/clone4, Tulahuén, Colombiana, dentre outras, e do grupo *T. cruzi* II as cepas Y, CL, Brazil, Esmeraldo, dentre outras (Zingales *et al.*, 1999). Já a cepa CL-Brener é considerada uma cepa híbrida, porque apresenta características das duas principais linhagens (Brisse *et al.*, 2001; Pedroso *et al.*, 2003). Existem especulações de que a cepa Tulahuén seja também uma cepa híbrida (Brisse *et al.*, 2001).

### 1.3 RESPOSTA IMUNE DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*.

A descoberta da importância de cada componente do sistema imunológico durante a fase aguda ou crônica da infecção pelo parasita foi possível graças à utilização de anticorpos monoclonais específicos ou utilização de várias linhagens de camundongos geneticamente modificados (*knock-out*, KO), os quais não expressam diferentes genes.

O controle da infecção pelo *T. cruzi* requer as ações de múltiplos mecanismos imunológicos inatos e adaptativos, incluindo, uma potente resposta inflamatória, assim como anticorpos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> específicos e seus mediadores solúveis.

Quanto aos mecanismos da imunidade inata desencadeados pelo parasita, já foi descrito que alguns padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) derivados de *T. cruzi* são reconhecidos por receptores específicos, conhecidos como reconhecimento de padrão (PRRs), levando à ativação de diversos tipos celulares. Âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), presentes em grandes quantidades nas membranas dos parasitas, são reconhecidas pelo receptor trans-membrânico *Toll-like* 2 (TLR2) (Campos *et al.*, 2001). No entanto, este receptor parece não ter um papel imprescindível na resposta anti-parasitária, pois camundongos TLR2 KO apresentam uma produção de citocinas pró-inflamatórias e de reativos intermediários de nitrogênio normais, além de níveis de parasitemia e sobrevivência similares a de camundongos selvagens infectados (Campos and Gazzinelli, 2004). Os glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs), também presentes em grandes quantidades na superfície do *T. cruzi* nas formas livres ou como âncora GPI para glicoproteínas e polissacarídeos, são reconhecidos via receptor trans-membrânico *Toll-like* 4 (TLR4), gerando recrutamento principalmente de neutrófilos. A importância para a resposta induzida pelo GIPL está



no fato que camundongos TLR4 KO têm maiores níveis de parasitemia, além de mortalidade antecipada em relação aos animais selvagens (Oliveira *et al.*, 2004). Já o DNA parasitário que possui muitas repetições dos nucleotídeos citosina e guanina (CpG) induzem ativação do sistema imune inato via receptor intracelular *Toll-like 9* (TLR9). Camundongos TLR9 KO apresentam altos níveis de parasitemia e de mortalidade comparados aos selvagens. Apesar da importância do TLR2 frente à infecção não ser vital, camundongos TLR2 e TLR9 KO apresentam índices mais elevados de parasitemia e de mortalidade que os próprios TLR9 KO. Neste caso, o principal fator bloqueado nestes animais foi a produção de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$  (Bafica *et al.*, 2006).

A maioria dos TLRs, após interação com o seu ligante, gera uma sinalização intracelular dependente de uma molécula adaptadora chamada fator funcional de diferenciação mielóide 88 (MyD88). Esta molécula mostrou-se importantíssima para o controle do parasitismo, devido à observação que camundongos MyD88 KO apresentaram-se altamente suscetíveis, com um alto nível de parasitemia e rápida mortalidade após o desafio experimental comparados aos animais selvagens (Campos and Gazzinelli, 2004). Além disso, a síntese de citocinas desencadeada pela sinalização gerada com a interação do DNA do parasita com TLR9 é dependente desta molécula adaptadora (Bafica *et al.*, 2006).

Em relação à resposta humoral, já foi descrito que a transferência passiva de anticorpos monoclonais específicos para aceptores de ácido siálico para camundongos naïve é capaz de induzir diminuição da parasitemia e aumento da sobrevivência após o desafio experimental. No entanto, o mecanismo indutor de imunidade ainda é obscuro, pois estes anticorpos não lisam as formas tripomastigotas quando associados à proteínas do sistema complemento ou esplenócitos (Franchin *et*

*al.*, 1997). É interessante ressaltar que animais incapazes de produzir anticorpos apresentaram maior sobrevivência que animais que não possuem linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Kumar and Tarleton, 1998) ou linfócitos CD4<sup>+</sup> (Tarleton *et al.*, 1996). Assim, as células T são muito importantes no controle inicial da infecção, mas para o aumento do tempo de sobrevivência, uma resposta efetiva mediada por anticorpos é também crítica. Uma hipótese para a relevância dos anticorpos na imunidade protetora é que eles seriam capazes de remover as formas tripomastigotas sanguíneas da circulação (Umekita and Mota, 2000).

Tanto células T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> ( $\alpha\beta$ ) parecem ser importantes mediadores da imunidade protetora (Tarleton *et al.*, 1992; Nickell *et al.*, 1993; Rottenberg *et al.*, 1993; Abrahamsohn and Coffman, 1996; Tarleton *et al.*, 1996; Wizel *et al.*, 1997; Kumar and Tarleton, 1998; Tzelepis *et al.*, 2006). Células do tipo 1 (Th1 ou Tc1) parecem estar envolvidas nesta resposta, em parte por sua habilidade de secretar interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Reis *et al.*, 1997; Tarleton *et al.*, 1997; Tarleton *et al.*, 2000). Outros linfócitos que também são capazes de produzir esta citocina são os gama-delta ( $\gamma\delta$ ), auxiliando na resposta protetora demonstrada no fígado de camundongos infectados (Sardinha *et al.*, 2006) e as células *natural killer* (NK) (Cardillo *et al.*, 1996; revisto por Golgher and Gazzinelli, 2004).

No entanto, a participação efetiva dos  $\gamma\delta$  na resposta contra o *T. cruzi* ainda é um pouco controversa. Já foi descrito que estas células exerceriam um papel deletério no hospedeiro, pois camundongos  $\gamma\delta$ -KO apresentaram menores taxas de mortalidade e pequenas áreas com lesões inflamatórias nos músculos esquelético e cardíaco (Santos Lima and Minoprio, 1996). Por outro lado, foi observado um aumento na susceptibilidade de camundongos depletados de linfócitos  $\gamma\delta$  após infecção

experimental, fato este concomitante com a diminuição da produção de IFN- $\gamma$  (Nomizo *et al.*, 2006).

No caso das células NK, a produção de IFN- $\gamma$  pode favorecer o desenvolvimento de células Th1. A atuação destas células do sistema imune inato durante a fase aguda da infecção contra parasitas extracelulares ocorre independentemente de perforina. Ainda, sua importância na resistência a esta infecção foi demonstrada quando camundongos normais tratados com anticorpos anti-asialo GM, os quais depletam esta população de células, acarretaram em um aumento significativo na parasitemia e mortalidade (Rottenberg *et al.*, 1988; Cardillo *et al.*, 1996; Lieke *et al.*, 2004). A produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK seria uma consequência principalmente da expressão de citocinas como a IL-12 e TNF- $\alpha$  por células dendríticas, macrófagos e até mesmo por células B após a endocitose do parasita (revisado por Golgher and Gazzinelli, 2004; Cardillo *et al.*, 2007)

Outras células do sistema imune inato e adaptativo que também influenciam a resposta imunológica contra o parasita são as células NK T. Estas células são ativadas por glicolípidos apresentados via molécula CD1d e atuam limitando a parasitemia por mecanismo ainda indeterminado, além de induzirem maior produção de anticorpos anti-GPI (glicofosfoinositol) (Duthie *et al.*, 2002). A ativação destas células é dependente não só de CD1d, mas também de IL-12 e ocorre independente de MyD88 (Duthie *et al.*, 2005).

A importância do IFN- $\gamma$  frente a esta infecção já havia sido evidenciada após a demonstração que esta citocina é capaz de ativar macrófagos peritoniais de camundongos, induzindo a destruição dos parasitas (Reed *et al.*, 1987). O tratamento de animais infectados com IFN- $\gamma$  recombinante induziu a ativação de macrófagos, prevenindo a fase aguda, a imunossupressão e a morte causada pela infecção com o

*T. cruzi* (Reed, 1988). Outra evidência da relevância desta citocina é o aumento significativo da parasitemia em camundongos normais tratados com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  (Abrahamsohn and Coffman, 1996) e em camundongos IFN- $\gamma$  KO, culminando com um aumento de infiltrado celular no coração e músculos estriados, diminuindo assim a sobrevivência em relação a camundongos normais (Tzelepis *et al.*, 2006; Marinho *et al.*, 2007). Além disso, já foi descrito que há uma diminuição de expressão de receptores para esta citocina (IFN- $\gamma$ R) principalmente em linfócitos humanos B ou T ativados ou não após co-cultura *in vitro* com este parasita (Kierszenbaum *et al.*, 1995). Vários mecanismos imunológicos poderiam ser disparados pelo IFN- $\gamma$ , como ativação de macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs).

Com relação à ação junto a macrófagos infectados, aparentemente esta citocina não induz geração de formas reativas de oxigênio (Nathan *et al.*, 1979; McCabe and Mullins, 1990; Vray *et al.*, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1992), mas sim de óxido nítrico (NO). Neste caso, camundongos NOS2 KO, enzima produtora do NO, apresentaram altos níveis de parasitemia na fase aguda e rápida mortalidade em relação aos animais controles (Holscher *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Michailowsky *et al.*, 2001).

Quanto à importância da IL-12 na infecção com o *T. cruzi*, já foi observado que ela é imprescindível, pois camundongos IL-12 KO também apresentaram maior parasitemia e mortalidade que animais controles (Aliberti *et al.*, 1996; Michailowsky *et al.*, 2001; Galvao Da Silva *et al.*, 2003)

Já o papel do TNF- $\alpha$  também se mostra um pouco controverso. Alguns trabalhos mostram que sua presença é de suma importância para conter a replicação dos parasitas e para manutenção da sobrevivência em modelos murinos (Abrahamsohn and Coffman, 1996; Castanos-Velez *et al.*, 1998). No entanto, Kroll-

Palhares *et al.*, 2008 demonstraram que camundongos TNFR1 KO, que não expressam o receptor para TNF- $\alpha$ , não apresentam diferença nos níveis de parasitemia ou de sobrevivência após o desafio experimental em relação aos animais selvagens.

#### 1.4 MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE NAS INFECÇÕES EXPERIMENTAIS CRÔNICAS PELO *T. cruzi*

Já durante a fase crônica da doença, a maioria dos indivíduos apresenta potente resposta imune celular e humoral (Morato *et al.*, 1986; Dutra *et al.*, 1996; de Barros-Mazon *et al.*, 1997). Esta resposta imune é importante para o controle do parasitismo, pois eventos que causam sua depressão, como tratamento imunossupressivo ou infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), conduzem a um desenvolvimento relativamente rápido de formas sintomáticas da doença em uma maior proporção em pacientes chagásicos (Rocha *et al.*, 1994). Em alguns casos observa-se, durante a fase crônica, o reaparecimento de parasitemia patente que é característica da fase aguda da infecção (Sartori *et al.*, 1998).

A importância dos anticorpos no controle da infecção crônica foi demonstrado com a transferência de soros de pacientes chagásicos ou de camundongos cronicamente infectados para camundongos naive, induzindo redução drástica da parasitemia e maior sobrevivência após desafio com *T. cruzi* (Krettli and Brener, 1976; Kierszenbaum and Hayes, 1980). Ainda, foi observado que anticorpos protetores eram capazes de aglutinar tripomastigotas *in vitro* (Krettli and Brener, 1976), causar lise mediada por complemento (Krettli *et al.*, 1979), facilitar a fagocitose e opsonização (Lages-Silva *et al.*, 1987) e atuar na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (Okabe *et al.*, 1980; Lima-Martins *et al.*, 1985).

No caso da resposta celular, o papel dos linfócitos T foi evidenciado a partir da transferência adotiva de linfócitos T específicos de animais cronicamente infectados para camundongos naïve, protegendo-os posteriormente do desafio experimental com o *T. cruzi* (Rottenberg *et al.*, 1992).

Uma das formas mais graves da doença crônica é a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Suas características principais são os processos inflamatórios e o de remodelamento do miocárdio, com participação principalmente de células T e macrófagos. Os indivíduos acometidos com a CCC normalmente apresentam hipertrofia cardíaca, além de fibrose (Cunha-Neto *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que estas células T do infiltrado produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Reis *et al.*, 1997). Pacientes acometidos pela CCC apresentam também altos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  (Kroll-Palhares *et al.*, 2008). Nesta doença, já foi evidenciado que células T CD4<sup>+</sup> específicas são capazes de reconhecer antígenos parasitários, os quais apresentam reatividade cruzada com células cardíacas (dos Santos *et al.*, 1992). Neste caso, se encaixa a teoria da auto-imunidade, a qual sugere que os sintomas apresentados pelos indivíduos infectados são consequência não da persistência do parasita no organismo, mas sim da resposta imune disparada para eliminar a infecção. Clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> derivados de biópsia de endomiocárdio de pacientes chagásicos foram capazes de reconhecer tanto a miosina cardíaca quanto o antígeno B13 de *T. cruzi* (Cunha-Neto *et al.*, 1995; Cunha-Neto *et al.*, 1996; Abel *et al.*, 1997; Cunha-Neto *et al.*, 1998; Iwai *et al.*, 2005). Há indícios da participação de anticorpos auto-reativos na CCC, devido ao fato que soros derivados de pacientes com CCC foram capazes de reconhecer, ao mesmo tempo, proteína ribossomal P0 de *T. cruzi* e os receptores humanos  $\beta$ -adrenérgicos (Elies *et al.*, 1996).

## 1.5 VACINAÇÃO GENÉTICA CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Nos últimos anos, estudos de vacinação genética contra a doença de Chagas experimental utilizaram genes codificando antígenos expressos nas formas tripomastigotas ou amastigotas do *T. cruzi*. Dentre os antígenos expressos nas formas tripomastigotas foram utilizados a *trans*-sialidases (TS), o antígeno de superfície de tripomastigotas (TSA) e a proteína regulatória do complemento (CRP). Estes genes foram utilizados na forma de DNA plasmidial (Costa *et al.*, 1998; Wizel *et al.*, 1998; Sepulveda *et al.*, 2000; Fujimura *et al.*, 2001; Planelles *et al.*, 2001; Katae *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2004) ou mais recentemente adenovirus recombinantes (Machado *et al.*, 2006).

No caso de proteínas expressas somente nas formas amastigotas do *T. cruzi* foram utilizados os genes que codificam para as proteínas 1, 2, 3 e 4 de superfície (ASP). Da mesma forma que os genes expressos em tripomastigotas foram utilizados como vetor DNA plasmidial (Garg and Tarleton, 2002; Boscardin *et al.*, 2003; Fralish and Tarleton, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2008) e mais recentemente vírus recombinantes (Machado *et al.*, 2006).

Outros antígenos denominados TcG1, TcG2, ou TcG4 foram identificados *in sílica* e caracterizados como sendo indutores de resposta imune contra os estágios infectivos e replicativos do parasita *T. cruzi* e expressos em diferentes cepas. Em estudos recentes, DNA plasmidial contendo estes genes foram utilizados com sucesso na vacinação genética (Bhatia and Garg, 2008). Um resumo destes experimentos está disposto na Tabela I a seguir.

Em geral, a vacinação genética foi utilizada de maneira profilática, mas o grupo de pesquisas do Dr. Dumoteil, utilizou também vacinação terapêutica contra a

infecção experimental pelo *T. cruzi* com DNA plasmidial contendo o gene *tc24* (Dumonteil *et al.*, 2004; Sanchez-Burgos *et al.*, 2007).



Tabela I

Sumário dos experimentos de vacinação genética em modelos experimentais utilizando genes/antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

Antígeno	Vetor	Linhagem de cam.	Cepa de parasita	Resposta imune	Imunidade protetora	Referência
TS	DNA	BALB/c	Y	CD4 e CD8	Alta	(Fujimura <i>et al.</i> , 2001)
ASP-2	DNA	BALB/c	Y	CD4	Alta	(Boscardin <i>et al.</i> , 2003)
TS	DNA	A/Sn	Y	CD4	Baixa	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2004)
ASP-2	DNA	A/Sn	Y	CD4 e CD8	Moderada	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2004)
TS e ASP-2	DNA	A/Sn	Y	CD4 e CD8	Alta	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2004)
TS	Adenovírus	BALB/c	Y	CD4 e CD8	Moderada	(Machado <i>et al.</i> , 2006)
ASP-2	Adenovírus	BALB/c	Y	CD4	Moderada	(Machado <i>et al.</i> , 2006)
TS e ASP-2	Adenovírus	BALB/c	Y	CD4 e CD8	Alta	(Machado <i>et al.</i> , 2006)
TS	DNA	BALB/c	Tulahuen	CD4 e CD8	Alta	(Hoft <i>et al.</i> , 2007)
KMP11	DNA	BALB/c	Y	?	Moderada	(Planelles <i>et al.</i> , 2001)
CRP	DNA	BALB/c	Y	?	Alta	(Sepulveda <i>et al.</i> , 2000)
TSSA	DNA	C57BL/6	Tulahuen	?	Alta	(Katae <i>et al.</i> , 2002)
ASP-1	DNA	C57BL/6	Brazil	?	Moderada	(Garg & Tarleton, 2002)
ASP-2	DNA	C57BL/6	Brazil	?	Alta	(Garg & Tarleton, 2002, Fralish & Tarleton, 2003)
ASP-3	DNA	A/Sn	Y, COL	?	Moderada	(Silveira <i>et al.</i> 2008)
ASP-4	DNA	A/Sn	Y, COL	?	Moderada	(Silveira <i>et al.</i> 2008)
Tc24	DNA	CD1	H4	?	Alta	(Dumonteil <i>et al.</i> , 2004, Sanchez-Burgos <i>et al.</i> 2008)

## **OBJETIVOS**

---

Em estudos anteriores demonstramos que imunizações com os genes *asp-2* e *ts* induziam imunidade protetora contra a infecção experimental de camundongos altamente suscetíveis A/Sn por parasitas da cepa Y de *T. cruzi*. Dada a possível variabilidade biológica encontrada nas diversas cepas isoladas de regiões distintas do continente americano, a proposta deste estudo foi o de verificar a possibilidade de generalização destes resultados frente a cepas isoladas de regiões endêmicas na Colômbia.

Nosso delineamento experimental consistiu na imunização de camundongos A/Sn com diferentes protocolos contendo os genes da *asp-2* e da *ts* que já haviam sido testados com sucesso na vacinação experimental contra parasitas da cepa Y de *T. cruzi*. Estes animais foram então desafiados com doses letais de tripomastigotas da cepa Colombiana ou COL de *T. cruzi*.

Os objetivos específicos consistiram em:

- 1) determinar inicialmente se camundongos que expressam o H-2 K<sup>k</sup> (B10.A) responde, ao epítipo reconhecido por linfócitos T CD8<sup>+</sup> após a infecção experimental com parasitas destas duas cepas;
- 2) após a vacinação experimental de camundongos A/Sn, determinar a presença de resposta imune medida pela presença de anticorpos específicos para a ASP-2 e TS e linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para a epítipo TEWETGQI da ASP-2.
- 3) após a infecção experimental, avaliar a parasitemia, mortalidade, e alterações histológicas e eletro-cardiológicas dos animais sobreviventes.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3.1. Camundongos e parasitas**

Foram utilizados camundongos fêmeas A/Sn, de aproximadamente 8 semanas de idade provenientes do CEDEME/UNIFESP ou camundongos B10.A nas mesmas condições provenientes do biotério do ICB/USP-SP. Os parasitas para o desafio dos animais foram tripomastigotas da cepa Colombiana gentilmente cedidas pela Dra. Milena B. Soares do Instituto de Pesquisa Gonçalo Muniz (FioCruz, Bahia) primeiramente mantidas em cultura e posteriormente em repiques em camundongos da linhagem A/Sn; ou Colômbia (COL), cedidas gentilmente pelo Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Medicina de Riberão Preto, mantidos em camundongos BALB/c.

### **3.2. Composição das soluções e tampões utilizados**

-Gel de agarose: agarose 1% (Life Technologies), TAE (1X), brometo de etídio (0,5µg/ml, Sigma).

-Gel de poliacrilamida para eletroforese de proteínas (SDS – PAGE) – pequenos (2 géis): Gel de separação 10%: acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0,8% (ambas Sigma) – 3mL; Tris - HCl 0,75M / SDS 0,2% pH 8,8 – 4,5 mL; Persulfato de amônio 10% - 100µL, água bidestilada – 1mL; Gel de empilhamento 3%: acrilamida 12%/Bis-acrilamida 1,2% - 1,25mL, Tris – HCl 0,75M / SDS 0,2%, pH 6,8 – 2,5mL, Persulfato de amônio 10% - 100µL; TEMED 10µL; água bidestilada – 1,25mL.

-Gel de poliacrilamida grande (1 gel): Gel de separação 10%: Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0,8% - 5mL; Tris – HCl 1M pH 8,8 – 5,6mL; SDS 10% - 200µL; Glicerol - 500µL (Synth), Persulfato de amônio 10% - 160µL; TEMED - 15µL; água bidestilada – 4,4mL; Gel de empilhamento 5%: Acrilamida 30% / Bis-Acrilamida 0,8% - 1,6mL; Tris - HCl 1M pH 6,8 – 11,25mL, SDS 10% - 200µL; Persulfato de amônio 10% - 80µL; TEMED - 15µL; água bidestilada – 7mL.

- Glicerina Tamponada:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M em glicerol (vol/vol).
- PBS:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.
- PBS/Leite-BSA: PBS acrescido de 5% de leite desnatado (Molico) e 2,5% de BSA (Sigma).
- PBS-T20 (PBS-Tween): PBS acrescido de Tween 20 na concentração de 0,05%.
- Solução A: Tris-HCl 25mM, pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0.
- Solução B: NaOH 200mM, SDS 1%.
- Solução C: acetato de potássio 3M, ácido acético 5M.
- Solução corante (Coomassie blue): Coomassie blue R250 0,05% (Life Technologies), metanol 45% (Merck), ácido acético 10%.
- Solução descorante: etanol 45%, ácido acético 10%.
- TAE (1X): Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8,0.
- Tampão ACK:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15M,  $\text{KHCO}_3$  1mM, EDTA 0,1mM, pH 7,0.
- Tampão de amostra para eletroforese de DNA (6X): azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%, glicerol 30%.
- TE (Tris-HCl pH8,0, 10mM e EDTA 1mM).
- Tampão de amostra para SDS – PAGE (4X): Glicerol 20%, SDS 4%, 2-Mercaptoetanol, Tris – HCl 60mM (pH 6,8), azul de bromofenol 0,3%.
- Tampão carbonato 0,05M:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,015M,  $\text{NaHCO}_3$  0,035M, pH 9,6.
- Tampão de corrida para SDS-PAGE: SDS 0,1%, glicina 192mM, Trizma base 25mM, pH 8,3.
- Tris – HCl: Trizma Base 1M, correção do pH com HCl.

### **3.3. Meios de cultura**

#### **3.3.1. Meios de cultura para bactérias**

-LB (Luria Bertani): triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, pH 7,0.

-LB sólido: LB, ágar (Difco) 1,5%.

-LB/AMP: LB acrescido de ampicilina 100µg/ml (Sigma).

-SOC: bactotriptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 0,5g/L e 10mL de KCl 250mM, pH 7,0 acrescido de glicose 20mM e MgCl<sub>2</sub> 10mM.

-TB: bactotriptona 12g, extrato de levedura 24g e glicerol 4mL em 900mL, acrescido posteriormente com 100mL de uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17M e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,72M.

-TB/AMP: TB acrescido de ampicilina 100µg/mL.

-FB: glicerol 10%, KCl 100mM, CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O 50mM, acetato de potássio 10mM, pH 6,2.

#### **3.3.2. Meio para cultura de células**

-RPMI simples: Meio RPMI-1640 (Life Technologies) suplementado com L-glutamina 2M (Sigma), HEPES 10mM (Sigma), bicarbonato de sódio 24mM (Life Technologies), penicilina G (Sigma) 59mg/L e estreptomicina (Sigma) 130mg/L, pH 7,2.

-RPMI 5%: RPMI simples suplementado com 5% de soro fetal bovino (INVITROGEN).

-RPMI 10%: RPMI simples suplementado com 10% de soro fetal bovino (INVITROGEN).

- Meio completo: RPMI simples suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone), 1% de NEAS, L-glutamina, vitaminas e piruvato, 0.1% 2-ME, e 30 U/mL de interleucina-2 humana recombinante (cedida por Hoffman-La Roche); posteriormente filtrado em seringas adaptadas a filtros de 45µm.

### **3.4 Extração do DNA do parasita em alíquota de sangue murino**

Camundongos infectados com as diferentes cepas foram sangrados e o sangue total foi utilizado para a extração de material genético do parasita utilizando-se o kit de extração FX Genomic Blood DNA purification Kit seguindo-se o protocolo do fabricante (Amersham Biosciences). Trezentos microlitros de sangue provenientes de camundongos infectados foram dispostos em tubos Eppendorf® 1,5 mL e em seguida adicionados novecentos microlitros da solução “RBC lysis”. O conteúdo foi então misturado por inversão dos tubos, seguidos de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugação a 12000rpm por 20 segundos em microcentrífuga Eppendorf modelo 5415R. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas e adicionadas de 500 microlitros de “extraction solution”, a seguir a solução foi homogeneizada com ajuda de um “vortex”. Após a incubação por 5 m a RT, o conteúdo dos tubos foi disposto e centrifugado na rotação de 8000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o conteúdo dos tubos coletores, 500 microlitros da solução de extração na coluna GFX foram adicionados e uma nova centrifugação foi realizada na velocidade de 8000 rpm por mais um minuto. Após esta etapa, foram adicionados 500 microlitros de “wash solution” na coluna e uma nova centrifugação foi realizada, a 12000rpm por 3 minutos. Para a eluição do material, foram utilizados 100 microlitros de água destilada a 70°C, que após a incubação por 1 minuto a temperatura ambiente na coluna foi submetida a centrifugação a 8000rpm por mais um minuto.

O material foi amplificado por PCR convencional utilizando-se os oligonucleotídeos fornecidos pelo Prof. Briones e a enzima *Pfx*. O vetor de clonagem TA Clone da Invitrogen foi escolhido e os primers deste fora utilizados para o sequenciamento do mini-exon.



### **3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e purificação do DNA**

Os mini-exons da subunidade ribossomal 24s dos parasitas, (Briones 1999) foram amplificados pela técnica de PCR utilizando-se da enzima *Pfx* Platinum DNA Polimerase, 50mM MgSO<sub>4</sub>, 10x *Pfx* buffer (Invitrogen) e dNTP mix 10mM. O DNA alvo (1 µg por reação) foi obtido do genoma de epimastigotas das cepa Y, COL e Colombiana de *T. cruzi* como descrito no item anterior.

Após a realização da PCR, seus produtos foram analisados em gel de agarose 1% e, posteriormente, as bandas correspondentes aos tamanhos dos genes, em pb, foram cortadas, sob luz UV de ondas largas, para se fazer a eluição do DNA.

O DNA foi eluído utilizando do Kit Qiaex (Qiagen) adicionando-se Buffer Qiaex II numa quantidade de 3 vezes o volume do gel contido no eppendorf de 1500µL. Esta solução foi ressuspendida com ajuda de um “vortex” e depois foi adicionada sílica. Incubou-se a solução a 50°C por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 10000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi removido com uma pipeta. Lavou-se o “*pellet*” com 500µL de “Buffer Qiaex II” e, mais uma vez, a amostra foi centrifugada. O DNA foi eluído com 12µL de água bidestilada autoclavada e, por fim, centrifugado por mais 30 segundos a 10000 rpm sendo, posteriormente, o sobrenadante coletado. Ao se utilizar 1µL da amostra fez-se a quantificação por eletroforese em gel de agarose 1%.

### **3.6 Seqüenciamento dos mini exons**

Foram feitas as reações de seqüenciamento através de PCRs de 25 ciclos sob as seguintes condições: 96°C – 5 minutos; 96°C – 20 segundos; 50°C – 15 segundos; 60°C – 4 minutos; 4°C - ∞. Para cada tubo, foram utilizados 1µL da

amostra de DNA (cerca de 200ng), 2 $\mu$ L de Big Dye (Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit – Applied Biosystems), 3 $\mu$ L de Primer (1 $\mu$ M), 1 $\mu$ L de Tampão “Save money” e 10 $\mu$ L de água bidestilada autoclavada.

Após o término da reação, o DNA passou por um processo de precipitação seguindo os seguintes passos: aos produtos da PCR foram adicionados 40 $\mu$ L de isopropanol 65% (MERCK), em placa de 96 poços, com incubação de 15 minutos protegido da luz à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a placa por 45 minutos sob 2250g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet* de DNA, foram adicionados 150 $\mu$ L de etanol 60% (MERCK). Após nova centrifugação de 5 minutos sob 2250g à temperatura ambiente, a amostra foi concentrada em *speed-vac* por 15 minutos. Finalmente a amostra foi estocada a –20°C e enviadas para seqüenciamento no CINTERGEN – Universidade Federal de São Paulo (laboratório do Prof. Dr. Sang Won Han)

### **3.7 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep)**

Foram inoculadas colônias de bactérias que continham o inserto em 5ml de meio LB líquido contendo 100 $\mu$ g/mL de ampicilina num tubo “Falcon”. Essas bactérias cresceram “overnight” a 37°C sob agitação de 200rpm no “shaker”. Foram coletados 1,5mL da cultura num tubo “eppendorf” e centrifugado, por 2 minutos, sob rotação de 10000 rpm. Repetiu-se esta etapa. Colocou-se 100 $\mu$ L de solução A e homogeneizou-se a amostra com a ajuda de um “vortex”. Adicionou-se 200 $\mu$ L de solução B, incubou-se por 2 minutos para posterior acréscimo de 200 $\mu$ L da solução C ficando sob incubação em gelo por 30 minutos.

Após este tempo, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos sob rotação de 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo

300µL de isopropanol. Após homogeneização por inversão, os tubos foram armazenados a -20°C por 3 horas para que o DNA precipitasse. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, sob 13000 rpm e a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500µL de etanol 70% gelado. Os tubos passam por mais uma centrifugação a 4°C e durante 5 minutos sob 13000 rpm para lavar o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado aos *pellets* 30µL de água bidestilada contendo RNAase (60µg/mL). Por fim, estes materiais foram incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora para que a enzima pudesse agir.

### **3.8 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose para verificação da presença do inserto e sua orientação**

Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI para que houvesse a liberação do inserto. Os constituintes da digestão foram: DNA a ser analisado, tampão específico, enzima de restrição e água bidestilada autoclavada, totalizando um volume de 10µL. As amostras ficaram em banho-maria durante 3 horas e, depois, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a corrida eletroforética, foi adicionado às amostras tampão TAE 6x. A corrida aconteceu durante 30 minutos e sob 80V. Como padrão de peso molecular, foram utilizados fragmentos do bacteriófago λ digeridos com *Hind III*.

### **3.9. Análise computacional das seqüências obtidas**

Todos os clones obtidos e seqüenciados foram analisados utilizando-se o pacote DNASTAR versão 5.00 (DNASTAR Inc.).

### **3.10. Preparação de bactérias competentes**

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* foi inoculada em 3mL de meio de cultura LB (Sigma), seguindo-se incubação por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio LB na proporção de 1:50 e incubado a 37°C sob agitação constante até que a DO<sub>600</sub> estivesse em torno de 0,6. Posteriormente, o recipiente contendo as bactérias foi incubado em gelo por 60 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.000 X g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as bactérias, ressuspendidas em 1/3 do volume inicial em meio FB e incubadas em gelo por 60 minutos. Foi feita uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e, após desprezar-se o sobrenadante, o precipitado bacteriano foi ressuspendido em 1/12,5 do volume inicial em meio FB. As bactérias foram, então, dispensadas em alíquotas de 100µL e guardadas no freezer a – 70 °C até o uso.

### **3.11 Transformação de bactérias competentes com produtos de ligação**

Alíquotas de 100µL de bactérias competentes foram descongeladas e a cada uma foi acrescentado cerca de 5µL dos produtos de ligação (plasmídeo e inserto), seguindo-se com incubação por 30 minutos no gelo. Após esse período, os tubos foram incubados a 42°C por exatamente 2 minutos e recolocados no gelo por mais 5 minutos. A cada tubo acrescentou-se 416µL de meio SOC e os mesmos foram incubados a 37°C sob agitação constante por 1 hora a 200 rpm. O volume total da suspensão bacteriana foi então semeado em placas de LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina, as quais foram mantidas em estufa a 37 °C por período “overnight” para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

### **3.12 Crescimento em larga escala de plasmídeos transformados em bactérias da cepa DH5 $\alpha$**

Os plasmídeos plgSPClone9 e p154/13 foram utilizados neste estudo (Costa *et al.*, 1998 e Boscardin *et al.*, 2003).

Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo a partir de uma colônia inoculada em 100mL de SOC acrescido de 100 $\mu$ g/mL de ampicilina (AMP), incubando-se, a seguir, por 16 horas a 37°C sob agitação constante. No dia seguinte, a partir de 50mL do pré-inóculo, foram feitos dois inóculos separados em 450mL de meio TB, cada qual continha (bactotripton 6g, extrato de levedura 12g e glicerol 2mL). Posteriormente, foram acrescidos, a cada um, 50mL de uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17M e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,72M e incubadas novamente a 37°C, sob agitação por mais 16 horas.

As bactérias foram centrifugadas em centrífuga Sorvall a 5000 rpm 15 minutos a 4°C. O precipitado resultante de 250mL de cultura foi ressuspenso em 21mL de solução A (Tris 25mM pH 8,0, glicose 50mM e EDTA 10mM) com auxílio do vortex e agitação manual até que a solução ficasse completamente solúvel. A seguir, adicionou-se 19,5mL de uma solução B (NaOH 200mM e SDS 1%) e o material foi homogeneizado levemente. Posteriormente, acrescentou-se, ainda à suspensão bacteriana, mais 15mL de uma solução de acetato de potássio 3M e ácido acético 5M, seguindo-se incubação em gelo por 25 minutos. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C e filtrou-se o sobrenadante caso houvesse restos sólidos. Adicionou-se 1 volume de isopropanol e incubou-se por período *overnight* a 4°C em geladeira.

No dia seguinte, a solução contendo DNA precipitado foi centrifugada a 12500 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de cada tubo foi

ressuspendido em 2mL de tampão TE (Tris-HCl pH8,0, 10mM e EDTA mM). Em seguida, foi adicionado a cada tubo 1 volume de solução gelada de LiCl 5M para precipitação de moléculas de RNA. Após uma breve homogeneização por inversão, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido a outro tubo e precipitado novamente com 1 volume de isopropanol, *overnight* a 4°C em geladeira.

No dia seguinte, o “*pellet*” de DNA foi ressuspendido em 1mL de tampão TE. Logo, este material foi incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos. Foi acrescentado 10µL de RNase (10mg/mL) e o ele foi incubado por 15 minutos a 37°C. Após esta etapa, cerca de 500µL do material foram transferidos para tubos Eppendorf® de 1,7mL. Em seguida, cada tubo recebeu 1 volume de uma solução de PEG 6000/NaCl 1,6M para nova precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente.

O “*pellet*” de DNA de cada tubo foi finalmente ressuspendido em 500µL de tampão TE e armazenado em geladeira a 4°C.

### **3.13 Purificação de plasmídeo crescido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl)**

Antes do uso de plasmídeos, crescidos em larga escala, nas imunizações, é necessário que eles sejam purificados. Para isso, cerca de 6-7mg do plasmídeo foram adicionados a uma solução de CsCl 1g/mL mais 200µL de uma solução de brometo de etídio (10mg/mL). O material foi homogeneizado, transferido para tubos de ultracentrifugação de 5,1mL (Beckman) e centrifugado por 12 horas a 70000 rpm em ultracentrífuga L8-M (Beckman) a 20°C (aceleração máxima e sem desaceleração). No dia seguinte, o DNA plasmidial foi coletado com auxílio de

seringas e agulhas e transferido para tubo de 50mL (Falcon). Para que brometo de etídeo fosse completamente retirado da solução de DNA plasmidial, esta foi lavada diversas vezes com solução de butanol-1 saturado em água por centrifugação de 1 minuto a 2000 rpm. Logo, foi acrescentada água bidestilada autoclavada obedecendo a seguinte regra: para cada 1,5mL de DNA retirados dos tubos após ultracentrifugação, acrescentou-se água bidestilada autoclavada de modo a se obter um volume final de 4mL. Em seguida, este DNA plasmidial foi precipitado utilizando-se 2,5 volumes de etanol absoluto. O material foi armazenado em geladeira a 4°C por período overnight. No dia seguinte, este foi centrifugado a 3750 rcf por 30 minutos a 4°C para formação de *pellet*. Posteriormente, o "*pellet*" de DNA foi lavado com aproximadamente 10mL de etanol 70% e submetido novamente à centrifugação a 3750 rcf por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e ressuspensionado em 1mL de água bidestilada autoclavada.

### **3.14 Purificação de adenovírus crescido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl)**

As purificações dos adenovírus recombinantes foram feitas a partir de 12 garrafas de cultivo grandes (175cm<sup>3</sup>) contendo células HEK293 (90% de confluência) infectadas com cada adenovírus. Quando as células infectadas se desprenderam (48 horas pós-infecção), o conteúdo das garrafas foi coletado, centrifugado, e as células ressuspensas em 3-5 mL de tampão Tris 0,1M pH=8. A suspensão de células foi misturada a uma solução de deoxicolato sódico 5%. O volume de deoxicolato usado correspondeu a 1/10 do volume de suspensão de células. Após incubação por no gelo por 30 minutos, as células foram maceradas

com ajuda de um aparelho homogeneizador de vidro até que a consistência da suspensão mudasse de gelatinosa para líquida. O volume de solução foi completo para 16,4 mL com Tris 0,1M pH=8. A esta foi adicionado 9,6 mL de solução saturada de cloreto de cézio, mantida a temperatura ambiente (a proporção foi de 5,8ml de cloreto de cézio saturado para cada 10 mL de suspensão de células, ou 37% de solução de cloreto de cézio e 63% de suspensão de células). Após homogeneização com ajuda de um “vórtex”, a solução foi transferida para tubos de ultracentrifuga (PA, Ultracrimp 11,5 mL). Após centrifugação a 35.000rpm a 4°C por 16 horas (Rotor T880), a banda foi coletada contendo o adenovírus e dialisada contra Tris 0,01M pH=8, à 4°C durante 4 horas. Foi então adicionado 10% glicerol, e alíquotas de 50-100µl feitas e congeladas a -70°C. O estoque foi então titulado em cultura de células HEK293 para a determinação da concentração de Unidade formadora de placas (PFU).

### **3.15 Imunização**

Camundongos A/Sn fêmeas de 6-8 semanas de idade foram injetados com 50µg de cardiotoxina (Sigma) intramuscularmente (i.m.) no músculo *tibialis anterioris* das patas traseiras num volume total de 0.1 mL sendo 0.05 mL em cada. Os animais foram então imunizados com 3 doses de 300 µg de DNA plasmidial (pIgSPCl. 9 e P154/13), sendo a primeira dose no 5° dia, a segunda no 26° dia e a terceira no 40° dia a partir da data de injeção da cardiotoxina. Os animais injetados somente com adenovirus recombinantes receberam duas doses no músculo *tibialis anterioris* que consistiram na administração i.m. de  $2 \times 10^8$  PFU dos vírus (AdASP-2 + AdTS) por pata com um tempo entre cada dose de 8 semanas. Os animais vacinados com o esquema de imunização e reforço heterólogo foram injetados com cardiotoxina,



seguido de DNA plasmidial como descrito acima. Três semanas após, um reforço consistiu na administração i.m. de  $2 \times 10^8$  PFU dos vírus (AdASP-2 + AdTS) por pata.

Animais controles foram imunizados em paralelo nos mesmos dias e pelas mesmas vias de inoculação com o plasmídeo pcDNA3 ou o adenovírus recombinante Ad- $\beta$ gal.

### **3.16 Desafio e determinação da parasitemia**

Uma semana após a última dose, os camundongos foram sangrados, cerca de 200  $\mu$ l, através do plexo retro-orbital para obtenção do soro e posterior análise da resposta imune humoral destes animais. Duas semanas após a última dose, os animais foram desafiados, por via intraperitoneal (i.p.), com 250 formas de tripomastigotas sanguíneas das cepas Colombiana ou COL de *T. cruzi*. Os parasitas foram colhidos do sangue de camundongos infectados com uma alta parasitemia ( $>1 \times 10^6$ /mL), diluídos e injetados num volume de 0.2 mL. A quantidade de parasitas no sangue foi monitorada, por contagem do número de tripomastigotas presentes em quarenta campos em uma lâmina formada por 5 $\mu$ L de sangue coletados da cauda dos camundongos com a ajuda de uma pipeta e observados em lamínulas de 18x18 cm. A mortalidade destes animais foi seguida por observação diária.

### **3.17 Análise da resposta imune humoral**

#### **3.17.1 ELISA**

Para a realização do ELISA para a detecção dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados foi realizado inicialmente com o preparo dos soros: amostras de sangue dos animais foram obtidas uma semana após a última imunização. Foram então processadas deixando-as por 16 a 18 horas à temperatura

ambiente. Seguiu-se então com uma centrifugação a 2.200 X g por 5 minutos à temperatura ambiente. Os soros foram então separados e armazenados em tubos de 500 µL a -20 °C.

Foram utilizadas placas de ELISA (“Covalent binding surface”, Costar). Foram adsorvidos a cada poço, 250ng do antígeno recombinante (His 65 KDa ou TS) diluído em tampão carbonato. As proteínas recombinantes foram purificadas como anteriormente descrito (Ribeirao *et al.*, 1997; Boscardin *et al.*, 2003). As placas foram então deixadas à temperatura ambiente por 16 a 18 horas e posteriormente lavadas por três vezes com a solução de PBS tween 0,05% (PBS-T20). Cada poço foi então bloqueado com 100 µL da solução de PBS/leite 5% - BSA 2% durante 2 horas. Em seguida, incubava-se a placa por 1 hora com 100 µL dos soros (diluídos em PBS/leite-BSA) em diluições seriadas (fator de diluição 2). O conteúdo dos poços foi desprezado e as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T20. Cada poço foi incubado com 50 µL de uma solução de PBS/leite-BSA contendo anti-IgG de camundongo ligada a peroxidase (KPL) diluída na proporção de 1:4.000 por mais 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 6 vezes com uma solução de PBS-T20. A cada poço foram então acrescentados 100 µL do substrato preparado da seguinte maneira: 17,4 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de água, 5mL de tampão fosfato e 2,4mL de ácido cítrico 0,1 M (pH 4,7) acrescido de 17,4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. As placas foram lidas em A<sub>492nm</sub> em leitor StatFax 2100.

### **3.18. Análise da resposta imune celular**

#### **3.18.1. ELISPOT *ex vivo* para produção de IFN- $\gamma$**

Para o ensaio de ELISPOT, foram utilizadas placas de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA, Millipore) cobertas com 60 $\mu$ l por poço de PBS estéril contendo 10 $\mu$ g/ml do anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  de camundongo (R4-6A2, Pharmingen). Após incubação “*overnight*” à temperatura ambiente, a solução contendo o anticorpo monoclonal foi removida por aspiração em ambiente estéril e as placas foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura RPMI. As membranas das placas foram bloqueadas por incubação com 100 $\mu$ l do meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (R10%) (INVITROGEN) por, pelo menos, 2 horas a 37°C.

As células respondedoras foram obtidas do baço de camundongos imunizados ou infectados. Estas células foram lavadas 3 vezes em meio RPMI e ressuspendidas em meio RPMI completo na concentração de 5x10<sup>5</sup> células viáveis por mL. O meio completo consiste em 1% de NEAS, L-glutamina, vitaminas e piruvato, 0.1% 2-ME, 10% de soro fetal bovino (Hyclone) e 30 U/mL de interleucina-2 humana recombinante (cedida por Hoffman-La Roche).

As células apresentadoras de antígeno (APCs) foram obtidas do baço de camundongos A/Sn ou B10.A normais. O mesmo procedimento descrito acima foi feito, sendo que a concentração destas foi de 3 x10<sup>6</sup> células viáveis por mL.

Cem microlitros da suspensão contendo células respondedoras e 100 $\mu$ l da contendo APCs foram adicionadas em cada poço. Foram adicionados as culturas o peptídeo sintético TEWEGQI (Genescript Corp.) na concentração final de 10  $\mu$ M. A placa foi incubada em condições estáticas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram desprezadas. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com

PBS e 5 vezes com PBS-T20. Cada poço recebeu então 75 µl do anticorpo monoclonal anti-camundongo biotilado XMG1.2 (Pharmingen) diluído em PBS-T20 na concentração final de 2µg/ml. As placas foram incubadas “*overnight*” a 4°C. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem das placas por 6 vezes com PBS-T20. Adicionamos então, estreptoavidina-peroxidase (KPL) na proporção de 1:800 em PBS-T20 em volume final de 100 µl/poço. As placas foram incubadas por 1 a 3 horas a temperatura ambiente e, então, lavadas de 3 a 5 vezes com PBS-T20 e mais 3 vezes com PBS.

As placas foram reveladas adicionando-se 100µl por poço do substrato da peroxidase (50mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 1mg/ml de DAB e 1µl/ml de 30% de peróxido de hidrogênio, ambos da SIGMA). Depois de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente, a reação foi parada descartando-se a solução substrato e lavando-se as placas com água corrente. As placas foram secas a temperatura ambiente e os “spots” foram contados com a ajuda de uma lupa.

### **3.18.2. Ensaio de citotoxicidade *in vivo***

Suspensões de células foram preparadas do baço de camundongos A/Sn ou B10.A normais. Os eritrócitos foram lisados usando tampão de lise (0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 1mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1Mm Na EDTA, pH 7.2-7.3). Depois de duas lavagens com meio RPMI, as células foram ressuspensas em meio RPMI contendo 1% de soro fetal bovino (INVITROGEN). A viabilidade das células foi avaliada utilizando o corante Azul de Tripán (25%) como discriminante entre células vivas e mortas. A concentração das células foi estimada por contagem em câmara de Neubauer. Metade dos esplenócitos foram corados com 1µM (CFSE<sup>low</sup>) e a outra metade com 10µM (CFSE<sup>high</sup>) de CFSE (Molecular Probes) em PBS por 15 minutos a 37°C. Após centrifugação por 5 minutos

a 1700 rpm, as células foram ressuspensas em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (INVITROGEN) pré-aquecido. Depois da adição do peptídeo TEWETGQI na concentração final de 2.5  $\mu$ M no tubo contendo as células CFSE<sup>high</sup>, as células foram incubadas por 40 minutos a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas por 3 vezes com meio RPMI contendo 2 a 4% de soro fetal bovino (INVITROGEN), re-suspensas em meio RPMI contendo 2 a 4% de soro fetal bovino (INVITROGEN) e contadas novamente. Ambas as populações de CFSE foram misturadas na concentração de 1:1, centrifugadas, ressuspensas em 200 $\mu$ L de meio RPMI e injetadas intravenosamente (via retro-orbital) em camundongos normais ou imunizados ou infectados com a cepa COL de *T. cruzi* na concentração de 1 a 2  $\times 10^7$  células por camundongo. Depois de 20 a 24 horas, os baços dos camundongos que receberam as células marcadas foram retirados, e as suspensões de células únicas foram feitas como descrito acima. No final, as células foram fixadas em PBS contendo 3.7% de paraformaldeído por 5 minutos à temperatura ambiente e após uma lavagem com PBS, foram ressuspensas em tampão de FACS. Cada grupo experimental consistiu de três animais, e cada camundongo foi analisado individualmente. As populações de linfócitos CFSE<sup>low</sup> e CFSE<sup>high</sup> foram detectadas no baço via citometria de fluxo, usando o FACScallibur e analisadas com o software CellQuest (Becton Dickinson). A porcentagem de lise específica para o peptídeo foi determinada pela fórmula:

$$\frac{\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ infectado ou imunizado}}{\% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ infectado ou imunizado}} \times 100\%.$$

$$\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ naïve} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ naïve}$$

### **3.19. Eletrocardiograma**

Para obter os traçados eletrocardiográficos, os camundongos foram tranqüilizados com Diazepan (10mg/kg) por via intraperitoneal e os transdutores foram colocados sob a pele de acordo com a derivações desejada (DII). Obtivemos os traçados através de um sistema digital Power Lab 4/25 acoplado a um bioamplificador com captação de sinais em 2mV por 1 segundo. Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100Hz e os traçados foram visualizados e analisados no software *Scope for Windows v3.6.10*. Medimos então a frequência cardíaca e a variação dos intervalos de onda P-Q, QRS e Q-T em ms.

### **3.20. Análise Histopatológica**

Foram retirados o coração, baço e fígado de cada animal com a ajuda de material cirúrgico e foram fixados em Paraformaldeído (Sigma) 4% em PBS por 24 horas. Logo após, passaram pela etapa de desidratação com álcool absoluto (Synth) crescente gradualmente em 50, 70, 96 e 100%, Xilol absoluto (Synth) por 3 horas e parafina histológica (Sigma) por 3 horas. Foram então incluídos em blocos fixados em cassetes plásticos para a realização de cortes que variaram de 3-5 micras. A desparafinização destes tecidos ocorreu em estufa a 56C, bateria de hidratação com o álcool decrescente nas mesmas condições anteriores e finalmente em água destilada, foram realizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina convencionais ou ainda a coloração de Picrosírius-Hematoxilina (*Picrosirius Red Staining* - EasyPath<sup>®</sup> Erviagas) para análise quantitativa.

### **3.21. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando as diferenças entre as médias resultaram significantes foram realizadas comparações múltiplas pelo teste Tukey HSD, disponíveis na página <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>. O limite máximo pde significância adotado foi de 5%. Já as diferenças significantes observadas entre diferentes curvas de sobrevivência foram observadas após o teste LogRank (software Prisma).

# **RESULTADOS**

---



As cepas Colombiana e COL de *T. cruzi* foram geneticamente tipadas pela clonagem e seqüenciamento dos domínios divergentes D7 da subunidade maior do rRNA 24S $\alpha$  de *T. cruzi* (Briones et al., 1999). Camundongos A/Sn infectados com cada uma das cepas foram sangrados e o sangue utilizado para a extração de DNA das formas tripomastigostas. O DNA purificado foi amplificado por PCR convencional utilizando-se os “primers” descritos em Materiais e Métodos na presença da enzima polimerase *Pfx platinum*. Deste modo, os fragmentos de DNA obtidos foram inseridos no vetor de clonagem para seqüenciamento e as seqüências obtidas foram comparadas com as dispostas no GenBank das cepas Tulahuén ou Y, pertencentes as linhagem de *T. cruzi* I e II, respectivamente. Pudemos observar os diferentes padrões encontrados nas seqüências analisadas encaixando as cepas Colombiana ou COL como *T. cruzi* I ou II, respectivamente (figura 2).

Na segunda etapa do trabalho, determinamos se estas cepas apresentavam o epítipo imunodominante TEWETGQI reconhecido por linfócitos T CD8<sup>+</sup> restritos pelo H-2K<sup>k</sup> (Tzelepis et al., 2006; Tzelepis et al., 2008). Para tal infectamos camundongos B10.A com formas sangüíneas de cada uma das cepas de *T. cruzi*. Após 2 semanas a resposta imune foi medida através do ensaio de citotoxicidade *in vivo* e determinamos o número de células específicas produtoras de IFN- $\gamma$  por ELISPOT.

Observamos intensa resposta específica resultando em eliminação (citotoxicidade) da grande maioria das células recobertas com o peptídeo TEWETGQI em camundongos infectados com as cepas Colombiana ou COL (figura 3A). Pelo ensaio de ELISPOT, obtivemos um aumento no número de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$  após a re-estimulação com o peptídeo TEWETGQI também considerável (figura 3B).

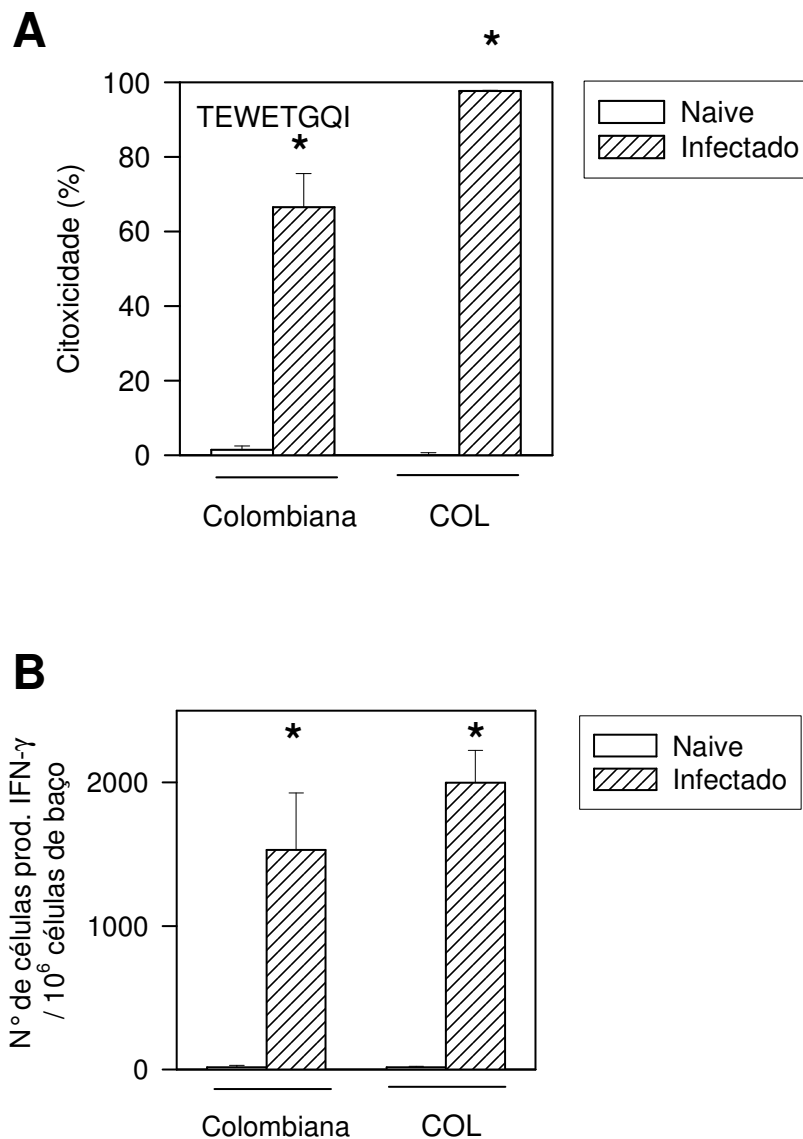
```

                *      20      *      40      *      60      *      80
Y      : AAGGTGCGTCGACAGTGTGGGAGTCTTTTTTTTTCTACCTCTCTTTCCTTCTCTTCACGGGGGGGTTATATAGAGGGTG : 83
Colombia : AAGGTGCGTCGACAGTGTGGGAGTCTTTTTTTTTCTACCTCTCTTTCCTTCTCTTCACGGGGGGGTTATATAGAGGGTG : 82
Tulahuén : AAGGTGCGTCGACAGTGTGGGAGTCTTCTTCTTTT---TCCCCCTCTCTCCTTTT-----GGTGTGCA-----GGGGTG : 67
Colombiana : AAGGTGCGTCGACAGTGTGGGAGTCTTCTTCTTTT---TCCCCCTCTCTCCTTTT-----GGTGTGCA-----GGGGTG : 67

                *      100      *      120
Y      : TAGGAAAAAAAAAAAGCCCCTACTGTTCGGCCATTCTGAAAA : 125
Colombia : TAGGAAAAAAAAAAAGCCCCTACTGTTCGGCCATTCTGAAAA : 125
Tulahuén : TGGGAGGAAGAA---GCCCCTACTGTTCGGCCATTCTGAAAA : 107
Colombiana : TGGGAGGAAGAA---GCCCCTACTGTTCGGCCATTCTGAAAA : 107

```

**Figura 2. Análise dos domínios divergentes D7 da subunidade maior do rRNA 24S $\alpha$  de *T.cruzi* nas cepas Colombiana e COL.** As seqüências referentes aos domínios divergentes D7 da subunidade maior do rRNA 24S $\alpha$  de *T. cruzi* foram obtidas pelo seqüenciamento de produtos de PCR de DNA genômico extraído de sangue total de camundongos infectados com a cepa COL ou Colombiana.



**Figura 3 – Resposta imune em camundongos B10A mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o epítipo TEWETGQI após infecção com as cepas Colombiana ou COL de *T. cruzi*.** Após 14 dias de infecção com formas tripomastigotas sanguíneas foram realizados os ensaios: **A.** Citotoxicidade *in vivo* dirigida contra células alvo incubadas com o peptídeo TEWETGQI. **B.** Detecção de células esplênicas produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para o peptídeo TEWETGQI estimadas através do ensaio ELISPOT *ex vivo* após re-estimulação *in vitro* com o peptídeo. Os valores foram subtraídos dos números de células esplênicas produtoras de IFN- $\gamma$  obtidos em culturas somente com o meio de cultura. Os resultados representam a médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Asteriscos denotam que a resposta imune de camundongos infectados foi significativamente maior que de animais naive ( $p < 0.001$ , Anova Unidirecional).

A partir do conhecimento de que estas cepas apresentavam o epítipo reconhecido por linfócitos T CD8<sup>+</sup> restritos pelo H-2 K<sup>k</sup>, iniciamos os experimentos de imunizações experimentais de camundongos altamente susceptíveis A/Sn com diferentes formulações contendo sempre os genes *asp-2* e *ts* de *T. cruzi*. Os animais foram imunizados de acordo com os seguintes protocolos:

Grupo I- Duas doses de DNA plasmidial controle pcDNA3;

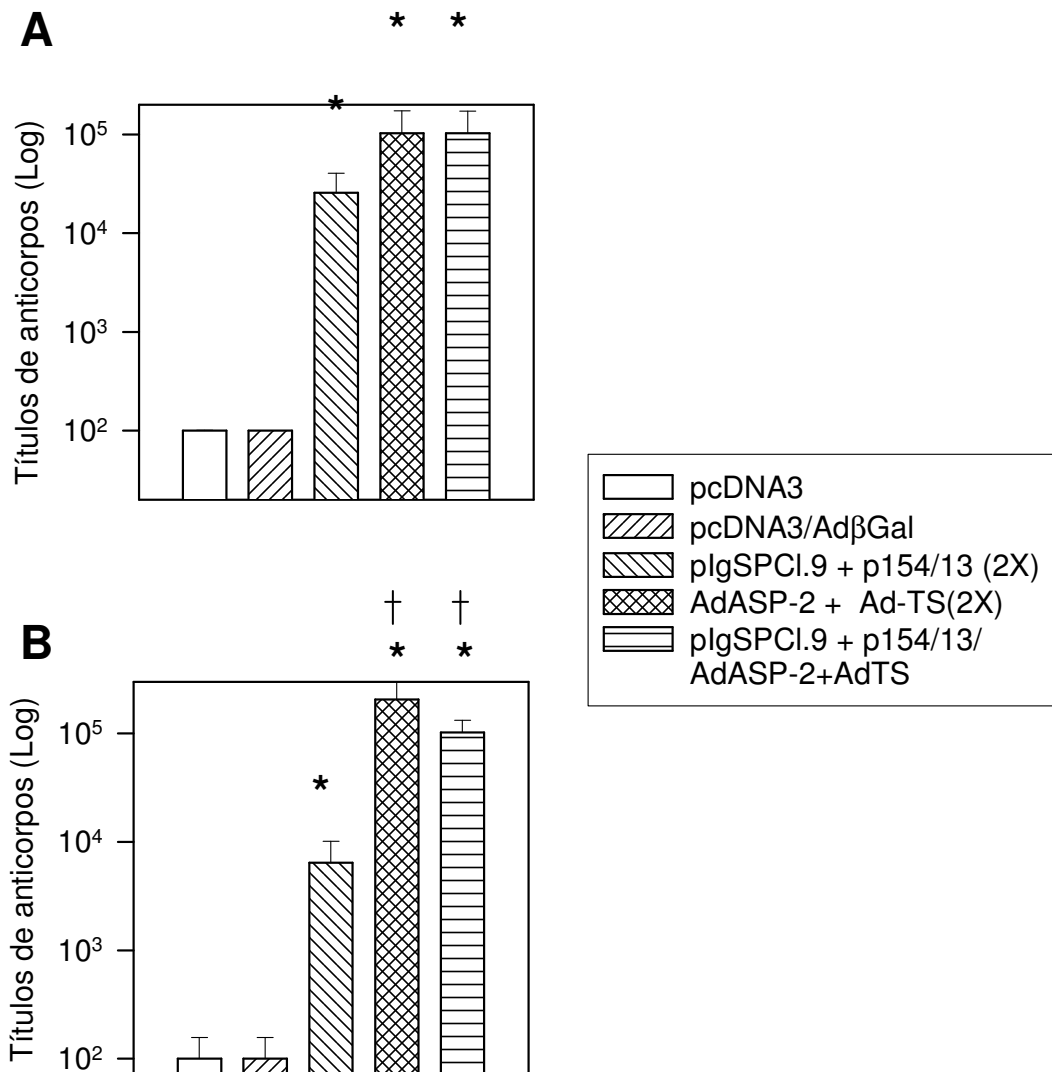
Grupo II- Duas doses, sendo a primeira de pcDNA3 e a segunda do adenovírus recombinante controle Ad β-gal;

Grupo III- Duas doses de DNA plasmidial plgSPCl. 9 contendo o gene *asp-2* e p154/13 contendo o gene *ts*;

Grupo IV- Duas doses de adenovírus recombinantes contendo os gene *asp-2* (AdASP-2) e *ts* (AdTS).

Grupo V- Duas doses, sendo a primeira de DNA plasmidial plgSPCl. 9 e p154/13 e a segunda dos adenovírus recombinantes AdASP-2 e AdTS.

Uma semana após a segunda dose, os animais foram sangrados e os títulos de anticorpos determinados por ELISA usando como substratos nas placas proteínas recombinantes representando cada um dos antígenos de *T. cruzi*. Como pode ser visto na figura 4, os animais imunizados do grupo III, IV e V apresentaram anticorpos específicos contra os antígenos recombinantes TS ou ASP-2 (figura 4A ou B, respectivamente). Os títulos de anticorpos dos camundongos que receberam adenovírus recombinantes foram significativamente maiores que os animais que receberam somente DNA plasmidial ( $p < 0.01$ ). Estes resultados demonstraram inequivocamente que houve expressão dos antígenos de *T. cruzi* na medida suficiente para a indução de resposta imune medida pela produção de anticorpos.



**Figura 4. Títulos de anticorpos após imunização com os genes da *asp-2* e *ts*.** Os camundongos A/Sn foram imunizados como descrito em Materiais e Métodos e o soro foi obtido uma semana após a segunda dose. O ensaio de ELISA foi realizado utilizando-se como substratos na placa as respectivas proteínas recombinantes: **A)** TS; **B)** His65kDa (ASP-2). Os resultados representam a médias  $\pm$  desvio padrão (n=04). Asteriscos denotam que a resposta imune de camundongos imunizados com genes de *T. cruzi* foi significativamente maior que de animais controles ( $p < 0.001$ , Anova Unidirecional). Cruzes representam que os animais que receberam adenovírus recombinantes contendo o genes de *T. cruzi* tiveram títulos de anticorpos significativamente mais altos que os que receberam somente DNA plasmidal ( $p < 0.01$ , Anova Unidirecional).

Um dos grupos imunizados (grupo V) foi selecionado para detectarmos também se houve ativação de linfócitos T específicos capazes de reconhecer o peptídeo/epítipo TEWETGQI. Após 2 semanas, a resposta imune foi medida através do ensaio de citotoxicidade *in vivo* e determinado o número de células específicas produtoras de IFN- $\gamma$  por ELISPOT. Como em animais infectados mostrados acima, foi observado intensa resposta específica dirigida contra este peptídeo, resultando em eliminação (citotoxicidade) da grande maioria das células recobertas com o peptídeo TEWETGQI do grupo V quando comparadas com controles, camundongos do Grupo II (figura 5A). Pelo ensaio de ELISPOT, o número de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$  após a re-estimulação com o peptídeo TEWETGQI também foi considerável (figura 5B). Estes resultados demonstraram que a imunização genética com o gene *asp-2* era capaz de induzir linfócitos T citotóxicos e produtores de IFN- $\gamma$  contra o epítipo CD8 TEWETGQI.

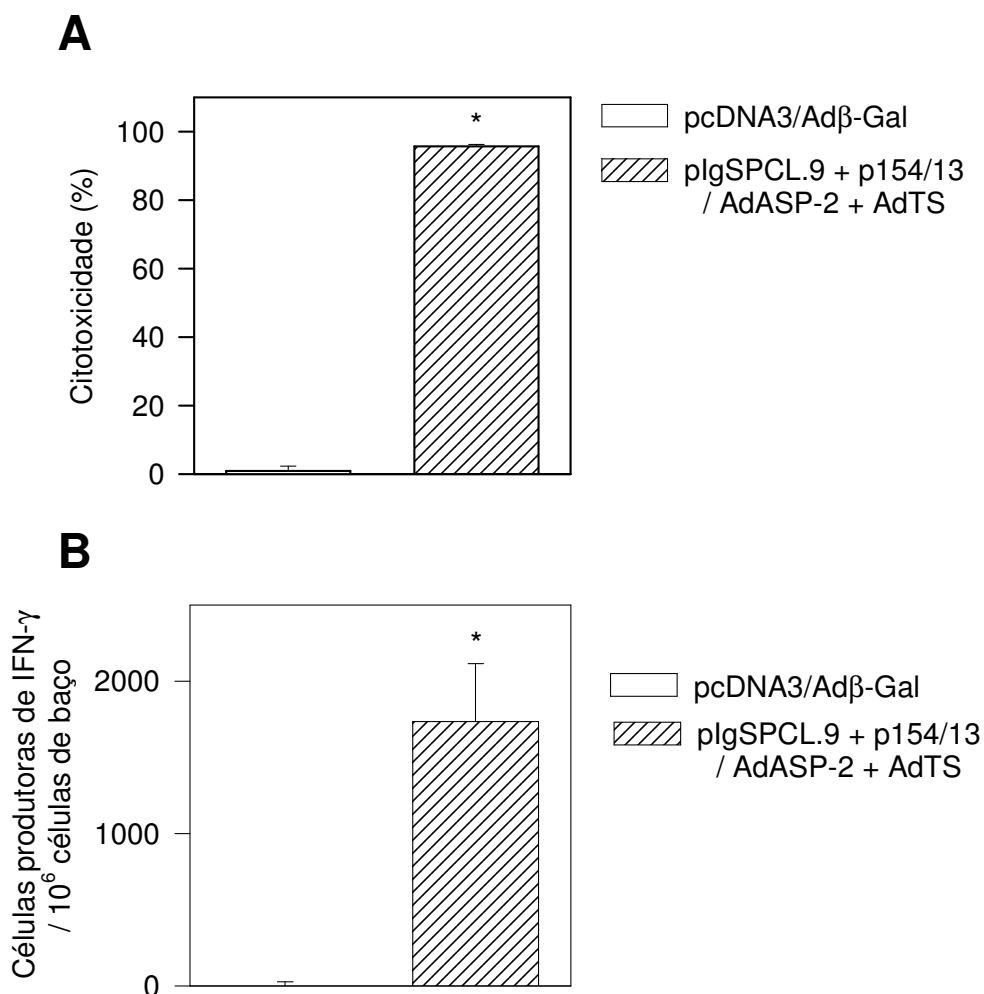
O objetivo seqüencial do trabalho foi verificar a possível imunidade protetora conferida a camundongos A/Sn contra a infecção experimental por parasitas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os animais foram imunizados de acordo com os seguintes protocolos:

Grupo I- Naive;

Grupo II- Duas doses, sendo a primeira de pcDNA3 e a segunda do adenovírus recombinante controle Ad $\beta$ -gal;

Grupo III- Duas doses de adenovírus recombinantes AdASP-2 e AdTS.

Grupo IV- Duas doses, sendo a primeira de DNA plasmidial pIgSPCI. 9 e p154/13 e a segunda do adenovírus recombinantes AdASP-2 e AdTS.



**Figura 5 – Resposta imune em camundongos A/Sn mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o epítipo TEWETGQI após imunização conjunta com os genes *asp-2* e *ts*.** Camundongos A/Sn foram imunizados com duas doses sendo a primeira de DNA plasmidial (pIgSPCL.9 e p154/13) e a segunda de adenovirus recombinantes (AdASP-2 e AdTS). Animais controles receberam pcDNA3 e Adβ-gal. Duas semanas após a segunda dose foram realizados os ensaios: **A.** Citotoxicidade *in vivo* dirigida contra células alvo incubadas com o peptídeo TEWETGQI. **B.** Detecção de células esplênicas produtoras de IFN-γ específicas para o peptídeo TEWETGQI estimadas através do ensaio ELISPOT *ex vivo*. Os valores foram subtraídos dos números de células esplênicas produtoras de IFN-γ obtidos em culturas somente com o meio de cultura. Os resultados representam a médias ± desvio padrão (n=6). Asteriscos denotam que a resposta imune de camundongos imunizados com os genes de *T. cruzi* foi significativamente maior que de animais controle ( $p < 0.001$ , Anova Unidirecional).

Duas semanas após a segunda dose, os animais foram desafiados pela via i.p. com uma dose letal de tripomastigotas sangüíneos. Observamos que houve uma crescente parasitemia em todos os grupos de animais e que resultou na mortalidade destes. Houve um atraso na mortalidade de um dos grupos de camundongos (Grupo IV) em relação aos demais, mas que não proporcionou a sobrevivência de nenhum animal (figura 6 e 7).

Experimentos semelhantes foram então realizados só que nestes os animais foram desafiados com uma dose letal de parasitas da cepa COL de *T. cruzi*. Os animais foram imunizados de acordo com os seguintes protocolos:

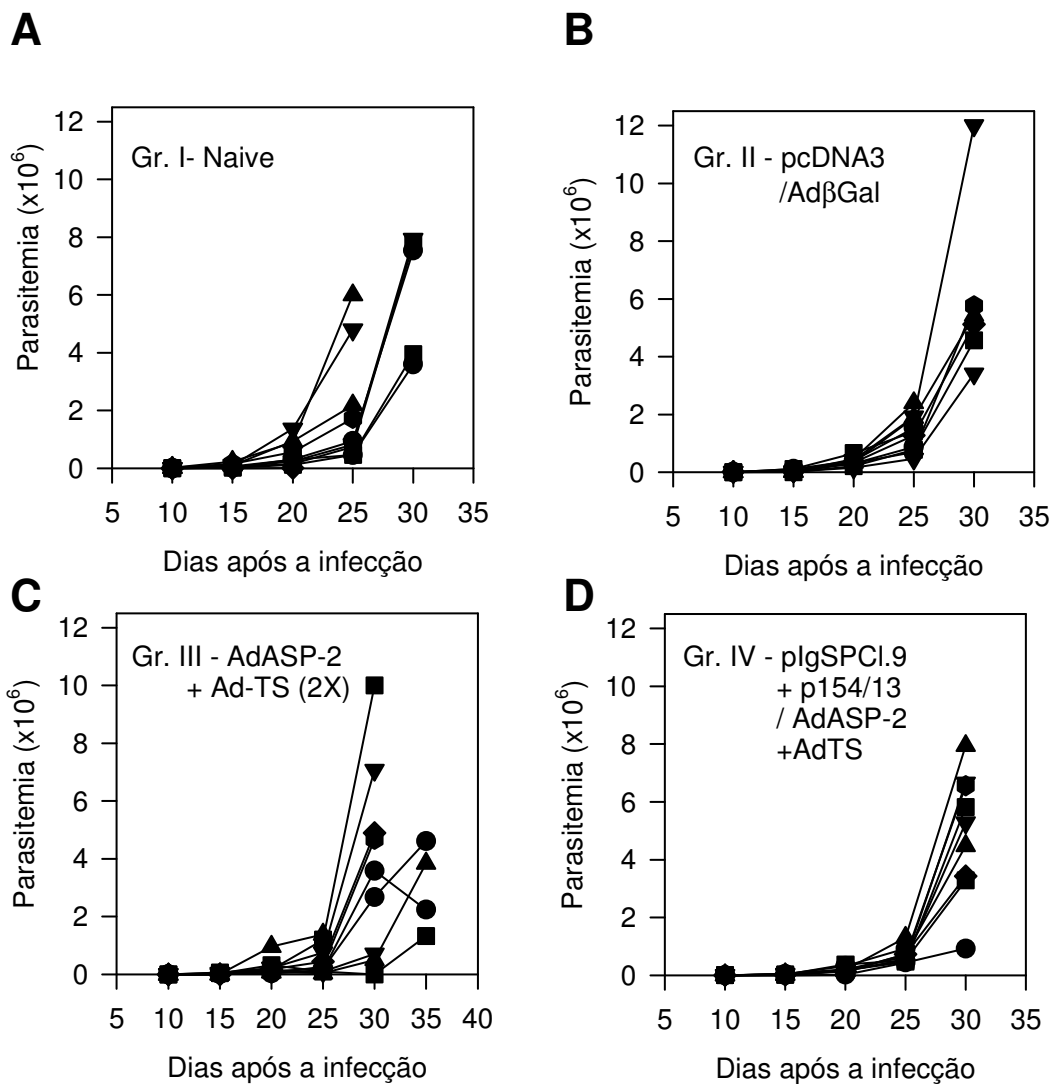
Grupo I- Naive;

Grupo II- Três doses de DNA plasmidial controle pcDNA3;

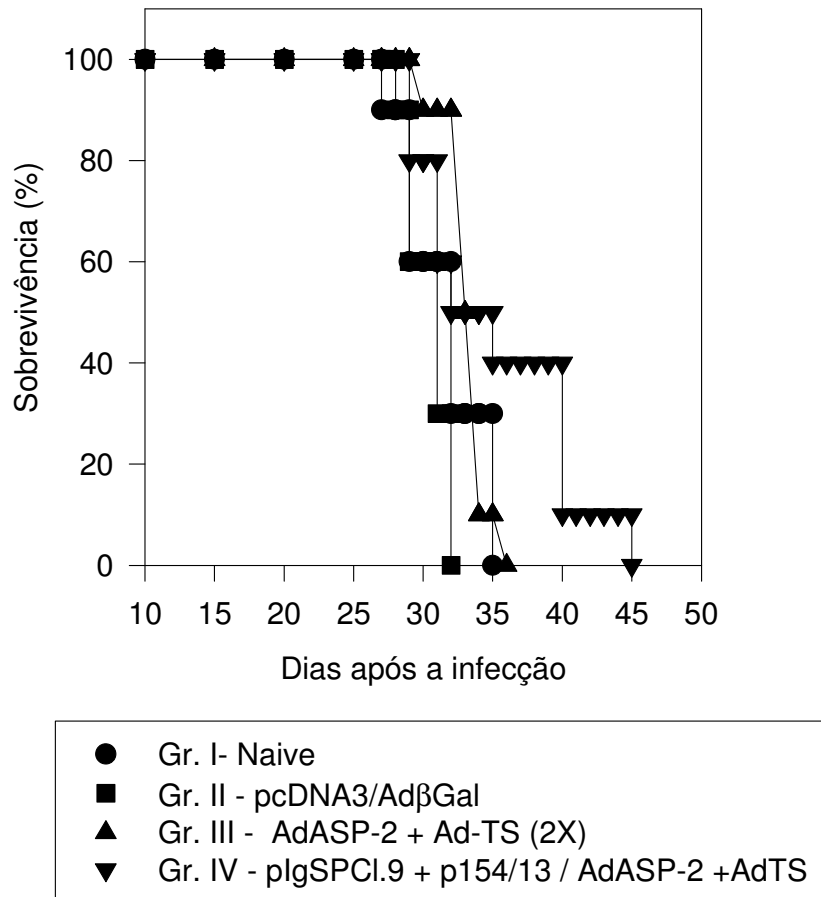
Grupo III- Três doses de DNA plasmidial plgSPCl.9 e p154/13.

Duas semanas após a terceira dose, os animais foram desafiados e a parasitemia e mortalidade determinada. Como pode ser observado na figura 8, a vacinação com plasmídeos contendo genes de *T. cruzi* (grupo III) levou a uma redução dramática no pico de parasitemia ( $p < 0.01$ ). Não só foi observada uma redução na parasitemia, mas todos os animais deste grupo sobreviveram à infecção aguda experimental (figura 9,  $p < 0.01$ ).

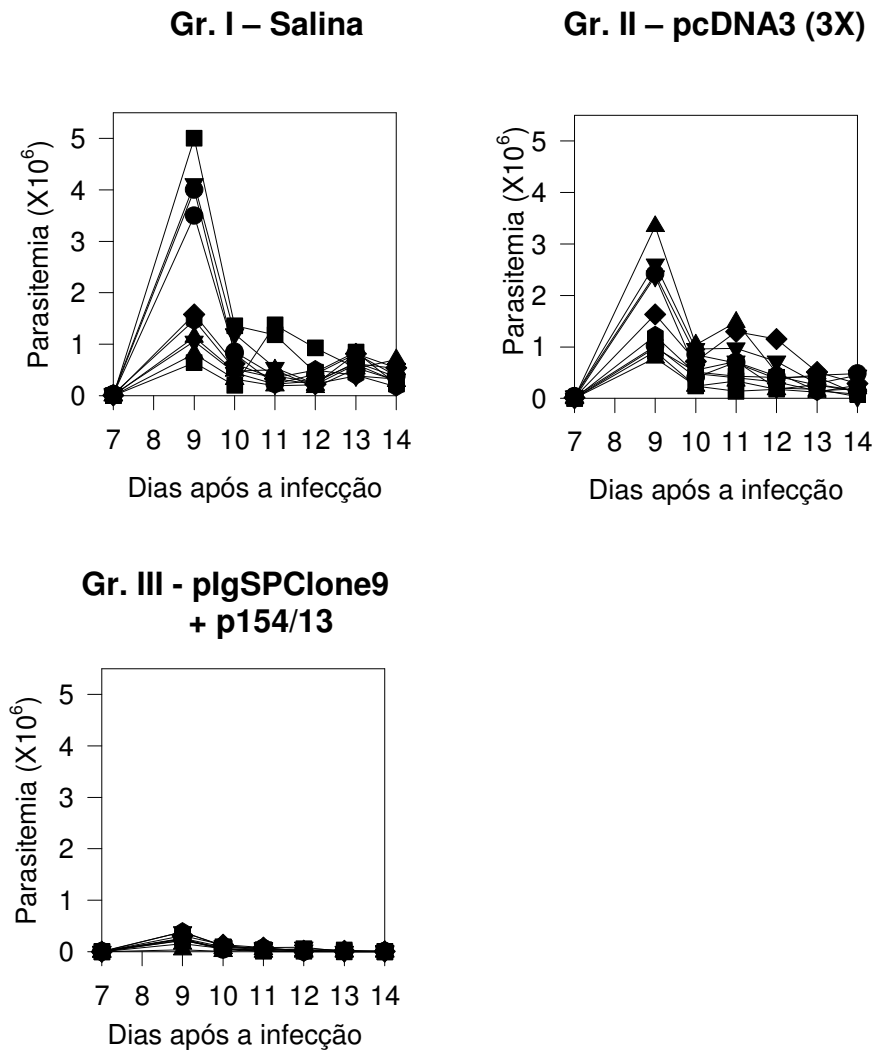




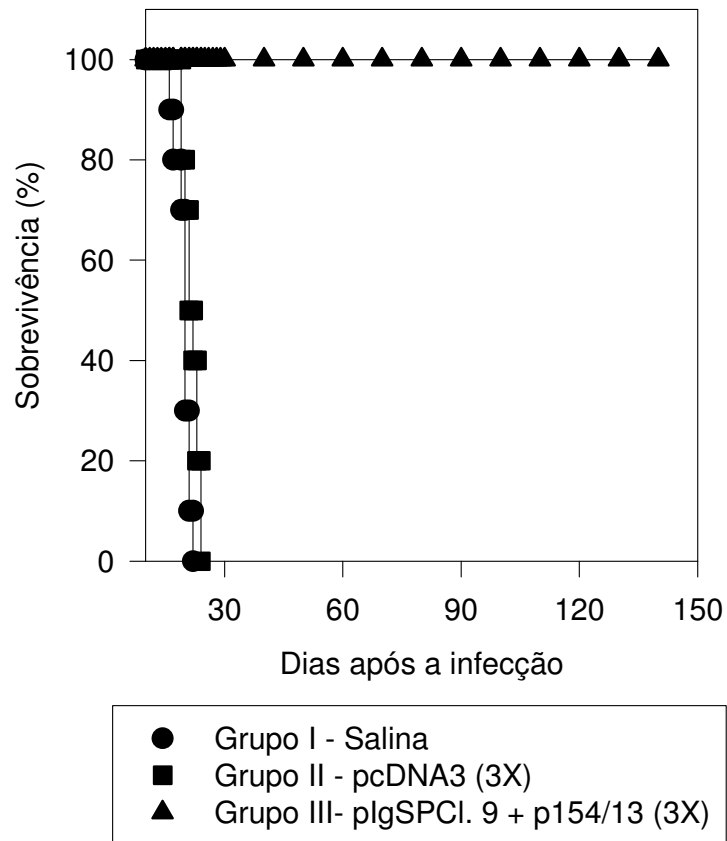
**Figura 6. Parasitemia dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes *asp-2* e *ts* após o desafio com a cepa Colombiana de *T. cruzi*.** Grupos de 6 ou 10 camundongos A/Sn foram imunizados segundo o protocolo descrito em Materiais e Métodos. Duas semanas após a última dose, os camundongos foram desafiados i.p. com 250 formas tripomastigotas da cepa Colombiana. Os resultados mostram as parasitemias individuais de cada grupo.



**Figura 7. Sobrevivência dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes *asp-2* e *ts* após o desafio com a cepa Colombiana de *T. cruzi*.** Grupos de 6 ou 10 camundongos A/Sn foram imunizados segundo o protocolo descrito em Materiais e Métodos. Duas semanas após a última dose, os camundongos foram desafiados i.p. com 250 formas tripomastigotas da cepa Colombiana. Os resultados mostram curva de sobrevivência Kaplan-Meier de cada grupo de animais. A análise estatística (teste de LogRank) determinou um atraso significativo na sobrevivência dos animais imunizados com o regime heterólogo (Grupo IV) quando comparados aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).



**Figura 8: Parasitemia dos camundongos A/Sn imunizados com plasmídeos contendo os genes *asp-2* e *ts* após o desafio com a cepa COL de *T. cruzi*.** Grupos de 10 camundongos A/Sn foram imunizados i.m. com 3 doses dos plasmídeos indicados ou salina nas semanas 0, 3 e 5. Duas semanas após da última dose, os camundongos foram infectados i.p. com 250 formas tripomastigotas da cepa COL. A análise estatística foi feita utilizando o teste Anova Unidirecional. O grupo III (plgSPClone9 + p154/13) apresentou uma parasitemia significativamente menor que os demais grupos controles ( $p < 0,01$ , em ambos os casos, Anova unidirecional).



**Figura 9. Sobrevivência dos camundongos A/Sn imunizados com DNA plasmidial contendo os genes *asp-2* e *ts* após o desafio com a cepa COL de *T. cruzi*.** Os camundongos foram imunizados e infectados como descrito na figura anterior. A mortalidade dos animais foi acompanhada até o 140º dia após a infecção. Os resultados mostram curva de sobrevivência Kaplan-Meier de cada grupo de animais. A análise estatística (teste de LogRank) determinou um atraso significativo na sobrevivência dos animais imunizados com gene de *T. cruzi* (Grupo III) quando comparados aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

Em um segundo experimento feito, seguimos os seguintes protocolos de imunização:

Grupo I- Duas doses de DNA plasmidial controle pcDNA3;

Grupo II- Duas doses, sendo a primeira de pcDNA3 e a segunda do adenovírus recombinante controle Ad $\beta$ -Gal;

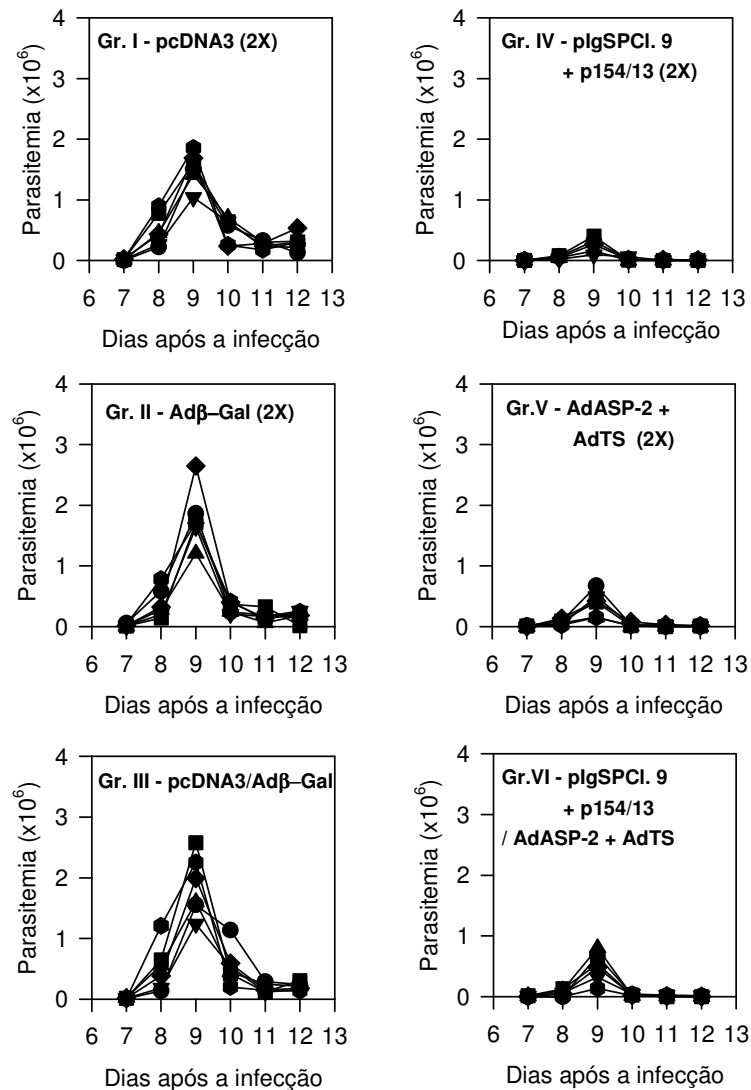
Grupo III- Duas doses de adenovírus recombinantes controles (Ad $\beta$ -gal).

Grupo IV- Duas doses de DNA plasmidial plgSPCI. 9 e p154/13;

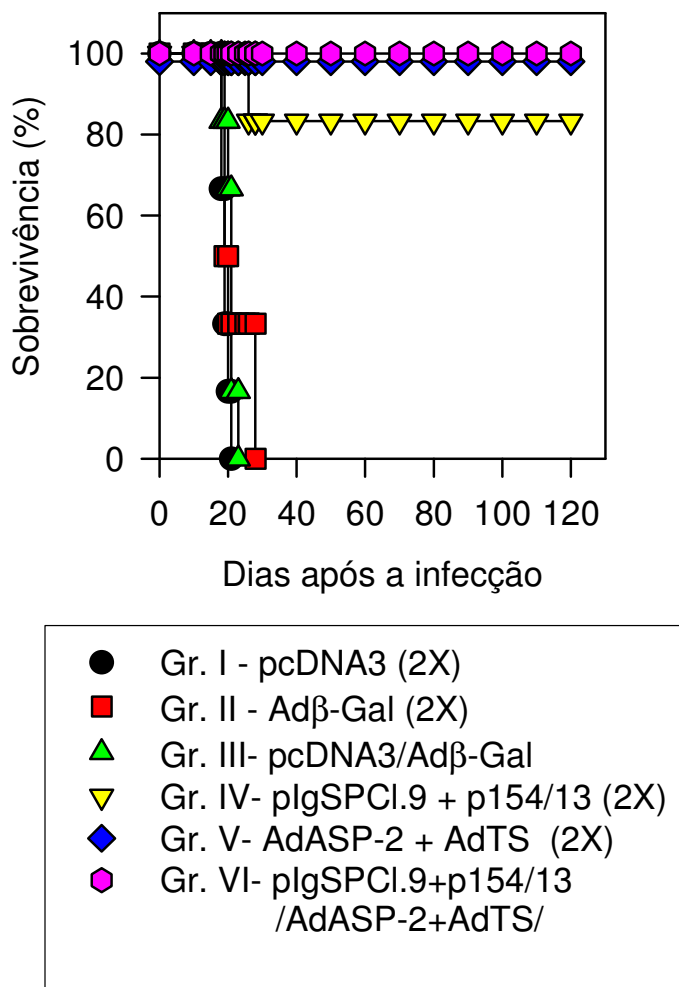
Grupo V- Duas doses de adenovírus recombinantes AdASP-2 e AdTS.

Grupo VI- Duas doses, sendo a primeira de DNA plasmidial plgSPCI. 9 e p154/13 e a segunda do adenovírus recombinantes AdASP-2 e AdTS.

Duas semanas após a segunda dose, os animais foram desafiados e a parasitemia e mortalidade determinada. A vacinação com genes de *T. cruzi* (grupos IV, V e VI) levou a uma redução dramática no pico de parasitemia (figura 10,  $p < 0.01$ ). Não só foi observada uma redução na parasitemia, mas a vasta maioria dos os animais destes grupos sobreviveram à infecção aguda experimental (figura 11,  $p < 0.01$ ).



**Figura 10. Parasitemia dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes *asp-2* e *ts* após o desafio com a cepa COL de *T. cruzi*.** Grupos de 6 camundongos A/Sn foram imunizados como descrito em Materiais e Métodos. Duas semanas após a última dose os camundongos foram desafiados i.p. com 250 formas tripomastigotas da cepa COL. Os animais imunizados com os genes de *T. cruzi* (Gr. IV, V e IV) apresentaram uma parasitemia significativamente mais baixa quando comparados aos demais grupos controles ( $p < 0,01$  em todos os casos, Anova Unidirecional).



**Figura 11. Sobrevivência dos camundongos A/Sn imunizados com diferentes protocolos contendo os genes *asp-2* e *ts* após o desafio com a cepa COL de *T. cruzi*.** Grupos de 6 camundongos A/Sn foram imunizados como descrito em Materiais e Métodos. Duas semanas após a última dose, os camundongos foram desafiados i.p. com 250 formas tripomastigotas da cepa COL. A mortalidade dos animais foi acompanhada até o 120<sup>o</sup> dia após a infecção. Os resultados mostram curva de sobrevivência Kaplan-Meier de cada grupo de animais. A análise estatística (teste de LogRank) determinou um atraso significativo na sobrevivência dos animais imunizados com genes de *T. cruzi* (Grupo IV, V e VI) quando comparados aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

Ao avaliarmos os resultados dos traçados eletrocardiográficos dos animais do segundo experimento (Grupos IV, V e VI) na fase crônica tardia da doença, 120 dias, pudemos observar essas alterações que refletem a presença de distúrbio de condução elétrica no nodo sinusal e atrioventricular compatíveis com as relatadas em indivíduos durante a fase crônica da doença de Chagas (Figura 12 e Tabela 2).

No grupo imunizado com duas doses de adenovírus recombinantes (Grupo V) houve menor incidência de alterações eletrocardiográficas quando comparado com os demais grupos sobreviventes (Tabela 2).

Para estabelecer uma possível relação causal para estas alterações encontradas, confeccionamos lâminas histológicas para avaliação do comprometimento do coração e demais órgãos desses animais. Não observamos diferenças significantes através da coloração hematoxilina-eosina. Com o intuito de relacionar acúmulo de tecido fibrótico ou de reparação tecidual com as alterações elétricas, realizamos a coloração de Picrosirius para a detecção de colágeno intersticial. Ao analisarmos as áreas através da ajuda do software ImageJ, pudemos então estabelecer esta relação uma vez que este grupo obteve menor porcentagem de área foi também o grupo de animais vacinados que receberam duas doses de adenovirus recombinantes como mostrado na figura 13 ( $p < 0,01$ ). Fotos representativas das lâminas estão dispostas na figura 14.



A

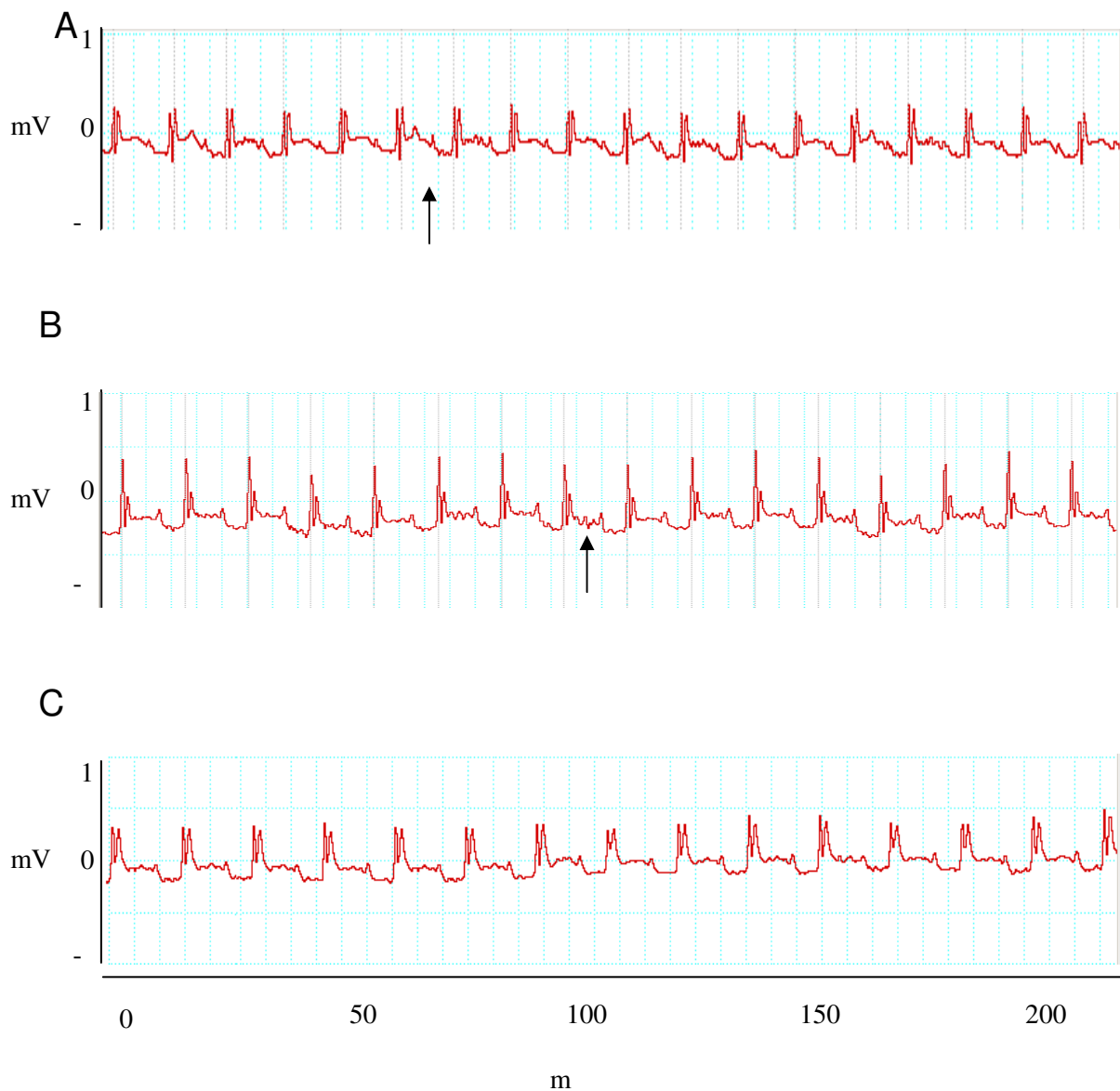
Grupo experimental	PR interval(ms)	P-wave duration (ms)	QTc	QRS	Frequência
Grupo controle (8)	38,5±7,2	16,5±1,9	31,4±10,4	14,2±2,6	521,6±73,3
G IV (4)	43,9±15,0	24,8±11,5	37,1±6,5	15,0±12,5	463,7±84,4
G V (6)	52,5±5,0	41,7±20,2	52,5±17,1	12,5±2,6	454,8±41,7
G VI (5)	42,9±5,8	18,5±3,3	58,3±29,7	14,5±3,4	413,3±122

B

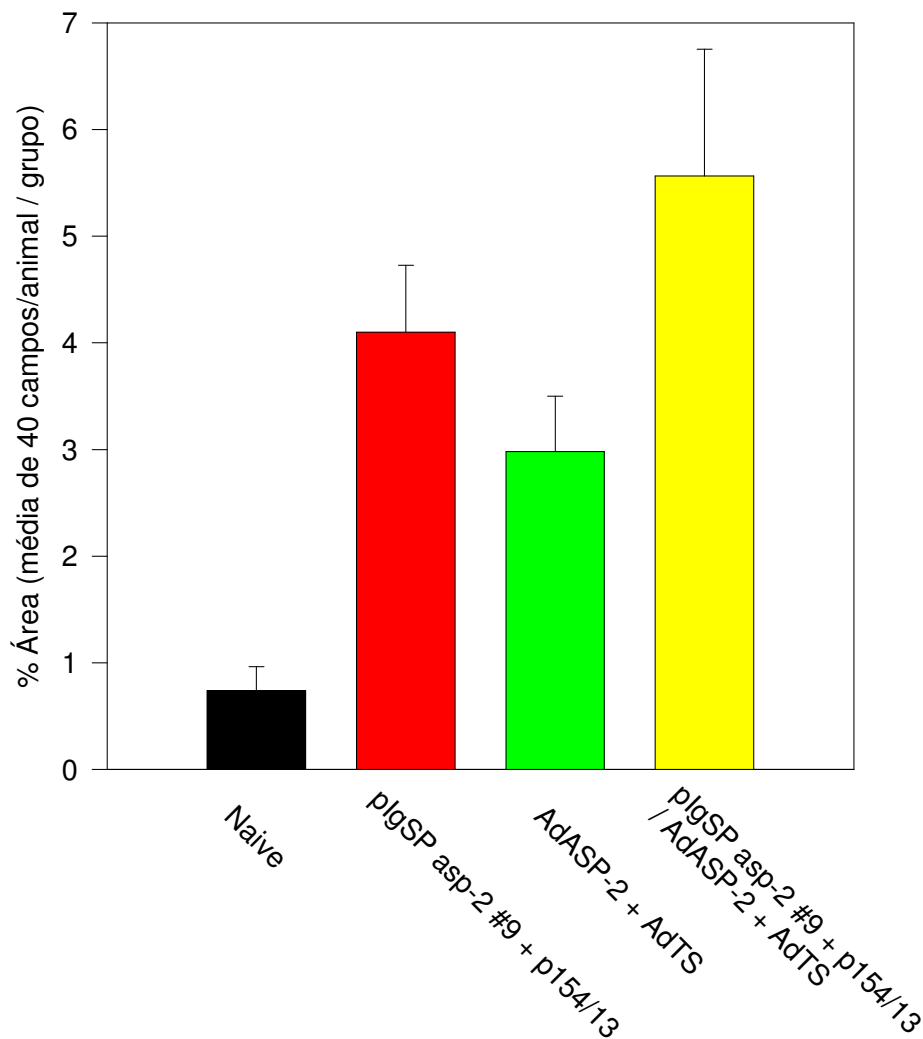
	NAIVE	G IV	G V	GVI
% /	0/8	3/4	3/6	4/5
ARS	0	0	0	0
ARV	0	0	0	40
EXT	0	0	0	0
BRAD	0	0	0	40
BAV 1	0	0	0	40
BAV 2	0	75	50	0
SUPRA	0	0	0	0
INFRA	0	0	0	0
DEFLEX	0	0	0	0

ARS Arritmia Sinusal	ARV Arritmia Ventricular	EXT Extrasístole ventricular
BRAD Bradicardia Sinusal	BAV1 Bloqueio Atrioventricular de 1ºGrau	BAV2 Bloqueio Atrioventricular de 2ºGrau
DEFLEX Deflexão de onda Q	INFRA Infranivelamento de onda Q	SUPRA Supranivelamento de onda Q

**Tabela 2. Representações numéricas de anormalidades encontradas nos perfis eletrocardiológicos de camundongos imunizados infectados pela cepa COL de *T. cruzi*** O eletrocardiograma foi realizado conforme a figura 12 e os dados foram coletados de forma a representar os intervalos obtidos na avaliação do eletrocardiograma dos animais (A). Em (B) está representada uma tabela mostrando a porcentagem de animais acometidos por anomalias cardíacas.

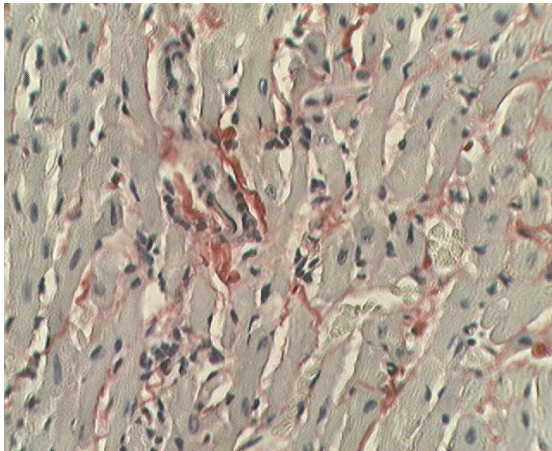


**Figura 12. Representações de perfis eletrocardiográficos em animais imunizados e infectados pela cepa COL de *T.cruzi* durante a fase crônica da infecção.** O exame foi realizado após 120 dias de infecção pela cepa COL. Os animais que receberam imunizações exclusivamente plasmidiais ou o regime heterólogo apresentaram maior proporção de animais acometidos por distúrbios elétricos quando comparamos com o grupo homólogo de adenovírus. Os principais acometimentos encontrados foram bloqueios atrioventriculares de segundo grau (BAV-2) como podemos observar nas setas nas figuras A (grupo IV) e B (grupo VI). Em C, temos como exemplo um traçado de preservação de atividade elétrica obtida em 50% dos animais pertencentes ao grupo V.

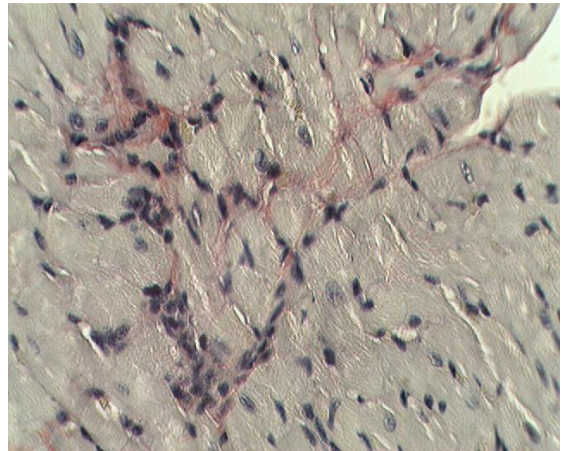


**FIGURA 13 – Análise de cortes histológicos de corações de camundongos A/Sn imunizados e corados pelo método de Picrosirius durante a fase crônica de infecção após desafio com a cepa COL.** Corações foram fixados em 4% de paraformaldeído em PBS, incluídos em parafina, seccionados e corados pelo kit EasyPath (Erviagas) para Picrosirius. Os cortes foram examinados por microscopia de luz (x400) e analisados utilizando programa específico (NIH *ImageJ* software) através de uma micro-camara acoplada ao microscópio. A área total de lesão de cada animal é a média obtida através da análise de quarenta campos. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos versus o naíve e também quando comparamos o grupo AdASP-2 + AdTS nas duas doses com os demais imunizados ( $p < 0.01$ ). A análise estatística foi feita utilizando o teste de Anova Unidirecional.

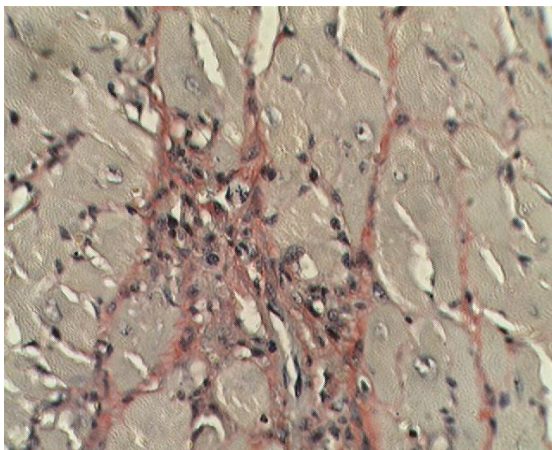
A



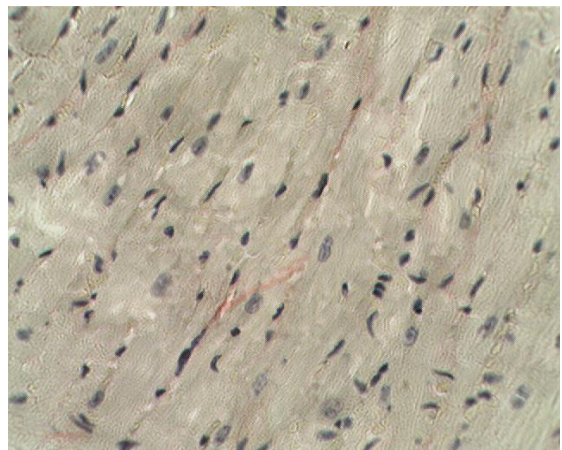
B



C



D



**Figura 14 - Fotografias de lâminas coradas pelo método de Picosírius.** Em A, B e C, observamos intensa marcação em vermelho das fibras de colágeno presentes no tecido cardíaco. Em D, uma foto representativa de áreas não acometidas por fibrose tecidual.

## **DISCUSSÃO**

---

A hipótese central testada nesta tese foi a da possibilidade de que a vacinação genética usando os antígenos ASP-2 e TS de *T. cruzi* pudesse conferir imunidade protetora em camundongos altamente susceptíveis A/Sn contra um desafio letal com parasitas de duas cepas isoladas na Colômbia. Nossos resultados demonstraram claramente que o desafio com cada uma das cepas leva a um resultado distinto em termos de parasitemia e mortalidade. Os animais vacinados geneticamente com antígenos de *T. cruzi* apresentaram um aumento progressivo da parasitemia e completa mortalidade após a infecção com parasitas da cepa Colombiana. Por outro lado, após o desafio experimental com parasitas da cepa COL, os animais vacinados apresentaram parasitemias reduzidas em relação aos animais controles e sobreviveram à infecção letal.

Duas possíveis explicações não excludentes entre si podem ser responsáveis pela variação observada. A primeira explicação possível para estes resultados discrepantes seria um polimorfismo antigênico representado pela ausência de epítomos críticos para a imunidade protetora nos parasitas da cepa Colombiana. Entretanto, em estudos iniciais demonstramos que ambas as cepas apresentam o epítomo reconhecido por linfócitos T CD8<sup>+</sup> imuno-protetores representado pelos aminoácidos TEWETGQI. Assim, pelo menos nesta região antigênica as duas cepas são idênticas. Este fato deveria levar a um controle ao menos parcial do desenvolvimento da cepa Colombiana o que não foi observado. Os resultados da indução de resposta imune também eliminam a possibilidade que estas cepas sejam diferentes na capacidade de apresentação antigênica *in vivo* pois ambas induzem respostas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o epítomo TEWETGQI.

Eventuais polimorfismos em outras regiões da ASP-2 e/ou TS poderiam também ser responsáveis por esta diferença. De fato o seqüenciamento dos

transcritos de ASP-2 a partir da cepa Colombiana demonstraram algumas variações na seqüência primária de aminoácidos (Claser *et al.*, 2007). Entretanto a conservação foi alta com 96.8% de identidade ao nível da seqüência primária. Ainda mais importante foi a observação de que a imunização com DNA plasmidial expresando o gene *asp-2* isolado da cepa Colombiana induziu imunidade protetora contra a infecção experimental de camundongos A/Sn após desafio com parasitas da cepa COL (Silveira *et al.*, 2008).

No caso da TS de *T. cruzi*, os transcritos de parasitas da cepa Colombiana não foram isolados e seqüenciados podendo assim também conter variações genéticas relevantes que poderiam explicar pelo menos em parte a susceptibilidade dos animais vacinados. Mas assim como no caso do antígeno ASP-2, os genes que codificam a região catalítica da TS usado por nós para a vacinação genética (AA 1-678) descritos em 5 diferentes cepas não apresentaram extensas variações. A relação da seqüência por nós utilizada com a das demais cepas já descrita é alta. As identidades com as seqüências deduzidas de AA são 96, 84, 92, e 97%, nas cepas CL (GenBank accession number: XP\_807431), Sylvio X-10/4 (P23253), CAI (CAA40511) e Tulahuen "/isolate="Tul2 (AAA99443), respectivamente. Entretanto, as pequenas regiões polimórficas podem ainda serem críticas neste processo de indução de imunidade.

A segunda possível explicação para a variação obtida é que além do polimorfismo antigênico, outras formas de variabilidade biológica podem existir responsáveis pelas diferenças observadas. Parasitas de diferentes cepas são descritos como tendo tropismo para diferentes tecidos. Assim algumas cepas são denominadas miotrópicas por que maior número de parasitas é detectado em tecidos musculares. Outras cepas são denominadas reticulotrópicas por serem os

parasitas observados em células do sistema reticuloendotelial principalmente no baço e fígado. Apesar desta classificação geral, não é absolutamente claro onde ocorre a multiplicação dos parasitas de cada cepa na fase aguda e crônica das infecções experimentais ou humana. Por exemplo, estudos recentes demonstraram que parasitas da cepa Brazil transfectados com o gene “reporter” da luciferase, após infecção i.p., se multiplicam predominantemente no grande intestino (Hyland *et al.*, 2008). Assim, para impedir uma multiplicação na fase aguda, a imunidade nesta região pode ser crítica. Nenhuma informação desta natureza é ainda disponível para outras cepas, impedindo assim conclusões a respeito. Portanto, pode ser que os tecidos alvos para a multiplicação na fase aguda da infecção por *T. cruzi* das cepas Colombiana e COL sejam distintos, o que seria uma explicação plausível para explicar a diferença na imunidade protetora.

O tecido da infecção pode também ser crítico para a eliminação do *T. cruzi* sobretudo por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Foi descrito que ao penetrar nos tecidos musculares, linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos se tornam incapazes de serem propriamente ativados (Leavey and Tarleton, 2003). Desta forma, apesar da presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no baço dos camundongos imunizados ou infectados com parasitas das duas linhagens, é possível que no caso dos animais infectados com a cepa Colombiana, estes não sejam capazes de impedir o crescimento no tecido muscular.

Na fase crônica tardia da infecção – mais de 120 dias - realizamos uma avaliação eletrocardiográfica desses animais. Os traçados apresentaram alterações na grande maioria dos animais sobreviventes. Esse fato contrastou com experimentos prévios feitos por nós em camundongos A/Sn imune infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (de Alencar *et al.*, submetido à publicação). Apesar de terem



sobrevivido à infecção letal com a cepa COL de *T. cruzi*, os animais A/Sn vacinados e desafiados apresentaram sintomas como bloqueios atrioventriculares ou de ramos, sugerindo cardiomiopatia chagásica que se assemelha a encontrada em seres humanos. De acordo com (Punukollu *et al.*, 2007), os sintomas mais presentes, na fase crônica da doença, são alterações cardíacas como aumento ventricular, insuficiência cardíaca e cardite. No eletrocardiograma, pudemos verificar alterações no intervalo PQ, bloqueios atrioventriculares e extrasístole, mostrando distúrbios elétricos possivelmente causados pela infecção, culminando com a destruição do tecido nervoso condutor ou inflamação local que levaria ao desequilíbrio eletrolítico e alteração da contração das fibras musculares induzida pela presença de citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Kroll-Palhares *et al.*, 2008), além de NO (Chandra *et al.*, 2002a; Chandra *et al.*, 2002b) causando até mesmo danos as mesmas. Dentre os grupos experimentais, pudemos notar redução do número de animais acometidos por estas alterações somente no grupo cujo vetor utilizado foi o adenovírus nas duas doses. A razão deste melhor efeito necessita ser detalhadamente avaliada em futuros estudos.

Poucos trabalhos (Rocha *et al.*, 2006; Caldas *et al.*, 2008) mostram a quantificação da área cardíaca afetada através da utilização de marcadores como colágeno e fibrina provenientes da atividade inflamatória e reparação do tecido destruído (Sanchez *et al.*, 1993; Abdalla *et al.*, 2008; Garzoni *et al.*, 2008). Esse ensaio mostrou-se útil neste trabalho, pois os grupos com maior porcentagem de alterações cardíacas foram os mesmos que apresentaram maior deposição de colágeno e desestruturação das fibras musculares cardíacas, corroborando com os resultados observados a partir do ECG. Assim, a relação de maior índice fibrótico no tecido cardíaco foi diretamente proporcional ao perfil obtido através do exame de

ECG; portanto sugerindo que lesões ao tecido cardíaco causadas pela infecção causariam o aparecimento de tais anormalidades no perfil elétrico

Finalizando, com este trabalho pudemos sugerir que para a proteção desses animais altamente susceptíveis A/Sn, uma resposta imune de maior magnitude ou maior espectro deve ser conferida para que haja redução dos sintomas da cardiomiopatia na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

Vários autores vêm buscando antígenos que possam ser capazes de induzir imunidade protetora contra a infecção chagásica (Dumonteil, 2007). Estes antígenos podem ser utilizados para a indução de imunidade protetora contra cepas que como a Colombiana sejam refratárias a imunidade induzida por nossa vacina genética. Assim, estes antígenos poderiam ser parte de uma vacina do tipo “cocktail” que abrangeria diversas cepas de *T. cruzi*.

Com intuito de buscar novos antígenos que possam levar a uma imunidade no modelo experimental por nós utilizados de infecção de camundongos altamente susceptíveis A/Sn,(Silveira *et al.*, 2008), realizou uma busca para outros genes/proteínas do parasita que poderiam ser capazes de induzir imunidade protetora. Foram identificados 2 antígenos (ASP-3 e ASP-4), pertencentes à super-família das *trans*-sialidases, que são capazes de conferir imunidade protetora após a vacinação genética de camundongos A/Sn após desafio com parasitas da cepas Y ou COL de *T. cruzi*. Baseado nestes resultados poderemos agora testar se a imunização com os genes da ASP-3 e/ou ASP-4 podem também induzir imunidade contra a infecção com a cepa Colombiana de *T. cruzi*.

## **CONCLUSÃO**

---

Concluimos a partir deste trabalho que a vacinação genética com os genes *asp-2* e *ts* de *T. cruzi* é de fato uma possibilidade para ser usado na profilaxia da doença de Chagas aguda contra algumas cepas isoladas na região endêmica da Colômbia. Esta vacinação impediu o desenvolvimento da parasitemia e aumentou a sobrevivência de animais altamente susceptíveis infectados com parasitas da cepa COL de *T. cruzi*.

Pudemos também observar que parasitas de outra cepa isolada nesta mesma região (cepa Colombiana) é completamente refratária a este mesmo esquema de imunização. Estes resultados são importantes, pois não se havia determinado anteriormente se uma mesma vacina recombinante poderia ser eficiente para uma determinada cepa e completamente inócua para outra.

## **REFERÊNCIAS**

---

- ABDALLA, G.K., FARIA, G.E., SILVA, K.T., CASTRO, E.C., REIS, M.A., and MICHELIN, M.A. (2008). Trypanosoma cruzi: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Experimental parasitology* **118**, 514-521.
- ABEL, L.C., KALIL, J., and CUNHA NETO, E. (1997). Molecular mimicry between cardiac myosin and Trypanosoma cruzi antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al* **30**, 1305-1308.
- ABRAHAMSOHN, I.A., and COFFMAN, R.L. (1996). Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental parasitology* **84**, 231-244.
- ALIBERTI, J.C., CARDOSO, M.A., MARTINS, G.A., GAZZINELLI, R.T., VIEIRA, L.Q., and SILVA, J.S. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity* **64**, 1961-1967.
- ALMEIDA-DE-FARIA, M., FREYMULLER, E., COLLI, W., and ALVES, M.J. (1999). Trypanosoma cruzi: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experimental parasitology* **92**, 263-274.
- ANEZ, N., CRISANTE, G., DA SILVA, F.M., ROJAS, A., CARRASCO, H., UMEZAWA, E.S., STOLF, A.M., RAMIREZ, J.L., and TEIXEIRA, M.M. (2004). Predominance of lineage I among Trypanosoma cruzi isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health* **9**, 1319-1326.
- BAFICA, A., SANTIAGO, H.C., GOLDSZMID, R., ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T., and SHER, A. (2006). Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* **177**, 3515-3519.
- BHATIA, V., and GARG, N.J. (2008). Previously unrecognized vaccine candidates control Trypanosoma cruzi infection and immunopathology in mice. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1158-1164.
- BOSCARDIN, S.B., KINOSHITA, S.S., FUJIMURA, A.E., and RODRIGUES, M.M. (2003). Immunization with cDNA expressed by amastigotes of Trypanosoma cruzi elicits protective immune response against experimental infection. *Infection and immunity* **71**, 2744-2757.
- BOTERO, L.A., MEJIA, A.M., and TRIANA, O. (2007). [Biological and genetic characterization of two Colombian clones of Trypanosoma cruzi groups I and II]. *Biomedica* **27 Suppl 1**, 64-74.
- BRIONES, M.R., SOUTO, R.P., STOLF, B.S., and ZINGALES, B. (1999). The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and biochemical parasitology* **104**, 219-232.

- BRISSE, S., VERHOEF, J., and TIBAYRENC, M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International journal for parasitology* **31**, 1218-1226.
- CALDAS, I.S., TALVANI, A., CALDAS, S., CARNEIRO, C.M., DE LANA, M., DA MATTA GUEDES, P.M., and BAHIA, M.T. (2008). Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitology research* **103**, 413-421.
- CAMPOS, M.A., ALMEIDA, I.C., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., VALENTE, E.P., PROCOPIO, D.O., TRAVASSOS, L.R., SMITH, J.A., GOLENBOCK, D.T., and GAZZINELLI, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**, 416-423.
- CAMPOS, M.A., and GAZZINELLI, R.T. (2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators of inflammation* **13**, 139-143.
- CARDILLO, F., POSTOL, E., NIHEI, J., AROEIRA, L.S., NOMIZO, A., and MENGEL, J. (2007). B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* **122**, 584-595.
- CARDILLO, F., VOLTARELLI, J.C., REED, S.G., and SILVA, J.S. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and immunity* **64**, 128-134.
- CASTANOS-VELEZ, E., MAERLAN, S., OSORIO, L.M., ABERG, F., BIBERFELD, P., ORN, A., and ROTTENBERG, M.E. (1998). *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infection and immunity* **66**, 2960-2968.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 159-218.
- CHANDRA, M., SHIRANI, J., SHTUTIN, V., WEISS, L.M., FACTOR, S.M., PETKOVA, S.B., ROJKIND, M., DOMINGUEZ-ROSALES, J.A., JELICKS, L.A., MORRIS, S.A., WITTNER, M., and TANOWITZ, H.B. (2002a). Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection (Brazil Strain): an echocardiographic study. *International journal for parasitology* **32**, 207-215.
- CHANDRA, M., TANOWITZ, H.B., PETKOVA, S.B., HUANG, H., WEISS, L.M., WITTNER, M., FACTOR, S.M., SHTUTIN, V., JELICKS, L.A., CHAN, J., and SHIRANI, J. (2002b). Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *International journal for parasitology* **32**, 897-905.
- CHAPMAN, M.D., BAGGALEY, R.C., GODFREY-FAUSSET, P.F., MALPAS, T.J., WHITE, G., CANESE, J., and MILES, M.A. (1984). *Trypanosoma cruzi* from the

- Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *The Journal of protozoology* **31**, 482-486.
- CLASER, C., ESPINDOLA, N.M., SASSO, G., VAZ, A.J., BOSCARDIN, S.B., and RODRIGUES, M.M. (2007). Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **9**, 1011-1019.
- COSTA, F., FRANCHIN, G., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., RIBEIRAO, M., SCHENKMAN, S., and RODRIGUES, M.M. (1998). Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* **16**, 768-774.
- COURA, J.R. (2003). Tripanosomose, doença de Chagas. *Cienc. Cult* **55**, 30-33.
- COURA, J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 113-122.
- CUNHA-NETO, E., BILATE, A.M., HYLAND, K.V., FONSECA, S.G., KALIL, J., and ENGMAN, D.M. (2006). Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* **39**, 41-54.
- CUNHA-NETO, E., COELHO, V., GUILHERME, L., FIORELLI, A., STOLF, N., and KALIL, J. (1996). Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *The Journal of clinical investigation* **98**, 1709-1712.
- CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., DE MESSIAS, I., STOLF, N., BELLOTTI, G., PATARROYO, M.E., PILLEGGI, F., and KALIL, J. (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3541-3545.
- CUNHA-NETO, E., RIZZO, L.V., ALBUQUERQUE, F., ABEL, L., GUILHERME, L., BOCCHI, E., BACAL, F., CARRARA, D., IANNI, B., MADY, C., and KALIL, J. (1998). Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]* **31**, 133-137.
- DE BARROS-MAZON, S., GUARIENTO, M.E., and ABRAHAMSOHN, I.A. (1997). IL-12 enhances proliferation of peripheral blood mononuclear cells from Chagas' disease patients to *Trypanosoma cruzi* antigen. *Immunology letters* **57**, 39-45.
- DOS SANTOS, R.R., ROSSI, M.A., LAUS, J.L., SILVA, J.S., SAVINO, W., and MENGEL, J. (1992). Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine* **175**, 29-39.



- DUMONTEIL, E. (2007). DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2007**, 90520.
- DUMONTEIL, E., ESCOBEDO-ORTEGON, J., REYES-RODRIGUEZ, N., ARJONATORRES, A., and RAMIREZ-SIERRA, M.J. (2004). Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infection and immunity* **72**, 46-53.
- DUTHIE, M.S., KAHN, M., WHITE, M., KAPUR, R.P., and KAHN, S.J. (2005). Both CD1d antigen presentation and interleukin-12 are required to activate natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* **73**, 1890-1894.
- DUTHIE, M.S., WLEKLINSKI-LEE, M., SMITH, S., NAKAYAMA, T., TANIGUCHI, M., and KAHN, S.J. (2002). During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. *Infection and immunity* **70**, 36-48.
- DUTRA, W.O., MARTINS-FILHO, O.A., CANCADO, J.R., PINTO-DIAS, J.C., BRENER, Z., GAZZINELLI, G., CARVALHO, J.F., and COLLEY, D.G. (1996). Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* **43**, 88-93.
- ELIES, R., FERRARI, I., WALLUKAT, G., LEBESGUE, D., CHIALE, P., ELIZARI, M., ROSENBAUM, M., HOEBEKE, J., and LEVIN, M.J. (1996). Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* **157**, 4203-4211.
- FERNANDES, O., MANGIA, R.H., LISBOA, C.V., PINHO, A.P., MOREL, C.M., ZINGALES, B., CAMPBELL, D.A., and JANSEN, A.M. (1999a). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* **118 ( Pt 2)**, 161-166.
- FERNANDES, O., SANTOS, S., JUNQUEIRA, A., JANSEN, A., CUPOLILLO, E., CAMPBELL, D., ZINGALES, B., and COURA, J.R. (1999b). Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 195-197.
- FERNANDES, O., SOUTO, R.P., CASTRO, J.A., PEREIRA, J.B., FERNANDES, N.C., JUNQUEIRA, A.C., NAIFF, R.D., BARRETT, T.V., DEGRAVE, W., ZINGALES, B., CAMPBELL, D.A., and COURA, J.R. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **58**, 807-811.
- FRALISH, B.H., and TARLETON, R.L. (2003). Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* **21**, 3070-3080.
- FRANCHIN, G., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., SCHENKMAN, S., and RODRIGUES, M.M. (1997). Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infection and immunity* **65**, 2548-2554.

- FUJIMURA, A.E., KINOSHITA, S.S., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., and RODRIGUES, M.M. (2001). DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infection and immunity* **69**, 5477-5486.
- GALVAO DA SILVA, A.P., JACYSYN, J.F., and DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. (2003). Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology* **108**, 230-237.
- GARG, N., and TARLETON, R.L. (2002). Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* **70**, 5547-5555.
- GARZONI, L.R., ADESSE, D., SOARES, M.J., ROSSI, M.I., BOROJEVIC, R., and DE MEIRELLES MDE, N. (2008). Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *The Journal of infectious diseases* **197**, 906-915.
- GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., HIENY, S., JAMES, S.L., and SHER, A. (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European journal of immunology* **22**, 2501-2506.
- GOLGHER, D., and GAZZINELLI, R.T. (2004). Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* **37**, 399-409.
- HIGO, H., MIURA, S., HORIO, M., MIMORI, T., HAMANO, S., AGATSUMA, T., YANAGI, T., CRUZ-REYES, A., UYEMA, N., ROJAS DE ARIAS, A., MATTA, V., AKAHANE, H., HIRAYAMA, K., TAKEUCHI, T., TADA, I., and HIMENO, K. (2004). Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology international* **53**, 337-344.
- HOFT, D.F., EICKHOFF, C.S., GIDDINGS, O.K., VASCONCELOS, J.R., and RODRIGUES, M.M. (2007). Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *trypanosoma cruzi* immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J Immunol* **179**, 6889-6900.
- HOLSCHER, C., KOHLER, G., MULLER, U., MOSSMANN, H., SCHAUB, G.A., and BROMBACHER, F. (1998). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* **66**, 1208-1215.
- HYLAND, K.V., ASFAW, S.H., OLSON, C.L., DANIELS, M.D., and ENGMAN, D.M. (2008). Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. *International journal for parasitology* **38**, 1391-1400.
- IWAI, L.K., JULIANO, M.A., JULIANO, L., KALIL, J., and CUNHA-NETO, E. (2005). T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis

- of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *Journal of autoimmunity* **24**, 111-117.
- KATAE, M., MIYAHIRA, Y., TAKEDA, K., MATSUDA, H., YAGITA, H., OKUMURA, K., TAKEUCHI, T., KAMIYAMA, T., OHWADA, A., FUKUCHI, Y., and AOKI, T. (2002). Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infection and immunity* **70**, 4833-4840.
- KIERSZENBAUM, F., and HAYES, M.M. (1980). Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of *T. cruzi* in human and murine in vitro systems. *Immunology* **40**, 61-66.
- KIERSZENBAUM, F., MEJIA LOPEZ, H., TANNER, M.K., and SZTEIN, M.B. (1995). *Trypanosoma cruzi*-induced decrease in the level of interferon-gamma receptor expression by resting and activated human blood lymphocytes. *Parasite immunology* **17**, 207-214.
- KRETTLI, A.U., and BRENER, Z. (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* **116**, 755-760.
- KRETTLI, A.U., WEISZ-CARRINGTON, P., and NUSSENZWEIG, R.S. (1979). Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical and experimental immunology* **37**, 416-423.
- KROLL-PALHARES, K., SILVERIO, J.C., DA SILVA, A.A., MICHAILOWSKY, V., MARINO, A.P., SILVA, N.M., CARVALHO, C.M., PINTO, L.M., GAZZINELLI, R.T., and LANNES-VIEIRA, J. (2008). TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**, 375-385.
- KUMAR, S., and TARLETON, R.L. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite immunology* **20**, 207-216.
- LAGES-SILVA, E., RAMIREZ, L.E., KRETTLI, A.U., and BRENER, Z. (1987). Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Parasite immunology* **9**, 21-30.
- LEAVEY, J.K., and TARLETON, R.L. (2003). Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **170**, 2264-2268.
- LIEKE, T., GRAEFE, S.E., KLAUENBERG, U., FLEISCHER, B., and JACOBS, T. (2004). NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infection and immunity* **72**, 6817-6825.

- LIMA-MARTINS, M.V., SANCHEZ, G.A., KRETTLI, A.U., and BRENER, Z. (1985). Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite immunology* **7**, 367-376.
- MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., OLIVEIRA, R.P., and PENA, S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 1-12.
- MACHADO, A.V., CARDOSO, J.E., CLASER, C., RODRIGUES, M.M., GAZZINELLI, R.T., and BRUNA-ROMERO, O. (2006). Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human gene therapy* **17**, 898-908.
- MANOEL-CAETANO FDA, S., and SILVA, A.E. (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica* **23**, 2263-2274.
- MARINHO, C.R., NUNEZ-APAZA, L.N., MARTINS-SANTOS, R., BASTOS, K.R., BOMBEIRO, A.L., BUCCI, D.Z., SARDINHA, L.R., LIMA, M.R., and ALVAREZ, J.M. (2007). IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scandinavian journal of immunology* **66**, 297-308.
- MCCABE, R.E., and MULLINS, B.T. (1990). Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and importance of oxygen-independent killing. *J Immunol* **144**, 2384-2388.
- MICHAILOWSKY, V., SILVA, N.M., ROCHA, C.D., VIEIRA, L.Q., LANNES-VIEIRA, J., and GAZZINELLI, R.T. (2001). Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology* **159**, 1723-1733.
- MILES, M.A., CEDILLOS, R.A., POVOA, M.M., DE SOUZA, A.A., PRATA, A., and MACEDO, V. (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* **1**, 1338-1340.
- MILES, M.A., LANHAM, S.M., DE SOUZA, A.A., and POVOA, M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* **74**, 221-237.
- MILES, M.A., SOUZA, A., POVOA, M., SHAW, J.J., LAINSON, R., and TOYE, P.J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* **272**, 819-821.
- MORATO, M.J., BRENER, Z., CANCADO, J.R., NUNES, R.M., CHIARI, E., and GAZZINELLI, G. (1986). Cellular immune responses of chagasic patients to antigens

- derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **35**, 505-511.
- NATHAN, C., NOGUEIRA, N., JUANGBHANICH, C., ELLIS, J., and COHN, Z. (1979). Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine* **149**, 1056-1068.
- NICKELL, S.P., STRYKER, G.A., and AREVALO, C. (1993). Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J Immunol* **150**, 1446-1457.
- NOMIZO, A., CARDILLO, F., POSTOL, E., DE CARVALHO, L.P., and MENGEL, J. (2006). V gamma 1 gammadelta T cells regulate type-1/type-2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **8**, 880-888.
- OKABE, K., KIPNIS, T.L., CALICH, V.L., and DIAS DA SILVA, W. (1980). Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clinical immunology and immunopathology* **16**, 344-353.
- OLIVEIRA, A.C., PEIXOTO, J.R., DE ARRUDA, L.B., CAMPOS, M.A., GAZZINELLI, R.T., GOLENBOCK, D.T., AKIRA, S., PREVIATO, J.O., MENDONCA-PREVIATO, L., NOBREGA, A., and BELLIO, M. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* **173**, 5688-5696.
- PEDROSO, A., CUPOLILLO, E., and ZINGALES, B. (2003). Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Molecular and biochemical parasitology* **129**, 79-90.
- PLANELLES, L., THOMAS, M.C., ALONSO, C., and LOPEZ, M.C. (2001). DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and immunity* **69**, 6558-6563.
- PUNUKOLLU, G., GOWDA, R.M., KHAN, I.A., NAVARRO, V.S., and VASAVADA, B.C. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International journal of cardiology* **115**, 279-283.
- REED, S.G. (1988). 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* **140**, 4342-4347.
- REED, S.G., NATHAN, C.F., PIHL, D.L., RODRICKS, P., SHANEBECK, K., CONLON, P.J., and GRABSTEIN, K.H. (1987). Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *The Journal of experimental medicine* **166**, 1734-1746.

- REIS, M.M., HIGUCHI MDE, L., BENVENUTI, L.A., AIELLO, V.D., GUTIERREZ, P.S., BELLOTTI, G., and PILEGGI, F. (1997). An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clinical immunology and immunopathology* **83**, 165-172.
- RIBEIRAO, M., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., EICHINGER, D., RODRIGUES, M.M., and SCHENKMAN, S. (1997). Temperature differences for trans-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology* **7**, 1237-1246.
- ROCHA, A., DE MENESES, A.C., DA SILVA, A.M., FERREIRA, M.S., NISHIOKA, S.A., BURGARELLI, M.K., ALMEIDA, E., TURCATO JUNIOR, G., METZE, K., and LOPES, E.R. (1994). Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **50**, 261-268.
- ROCHA, N.N., GARCIA, S., GIMENEZ, L.E., HERNANDEZ, C.C., SENRA, J.F., LIMA, R.S., CYRINO, F., BOUSKELA, E., SOARES, M.B., RIBEIRO DOS SANTOS, R., and CAMPOS DE CARVALHO, A.C. (2006). Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology* **133**, 729-737.
- RODRIGUES, M.M., RIBEIRAO, M., and BOSCARDIN, S.B. (2000). CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunology letters* **73**, 43-50.
- ROTTENBERG, M., CARDONI, R.L., ANDERSSON, R., SEGURA, E.L., and ORN, A. (1988). Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scandinavian journal of immunology* **28**, 573-582.
- ROTTENBERG, M.E., BAKHIET, M., OLSSON, T., KRISTENSSON, K., MAK, T., WIGZELL, H., and ORN, A. (1993). Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infection and immunity* **61**, 5129-5133.
- ROTTENBERG, M.E., RODRIGUEZ, D.A., and ORN, A. (1992). Control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice deprived of T-cell help. *Scandinavian journal of immunology* **36**, 261-268.
- SANCHEZ-BURGOS, G., MEZQUITA-VEGA, R.G., ESCOBEDO-ORTEGON, J., RAMIREZ-SIERRA, M.J., ARJONA-TORRES, A., OUAISSI, A., RODRIGUES, M.M., and DUMONTEIL, E. (2007). Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS immunology and medical microbiology* **50**, 333-341.
- SANCHEZ, J.A., MILEI, J., YU, Z.X., STORINO, R., WENTHOLD, R., JR., and FERRANS, V.J. (1993). Immunohistochemical localization of laminin in the hearts of patients with chronic chagasic cardiomyopathy: relationship to thickening of basement membranes. *American heart journal* **126**, 1392-1401.

- SANTOS LIMA, E.C., and MINOPRIO, P. (1996). Chagas' disease is attenuated in mice lacking gamma delta T cells. *Infection and immunity* **64**, 215-221.
- SARDINHA, L.R., ELIAS, R.M., MOSCA, T., BASTOS, K.R., MARINHO, C.R., D'IMPERIO LIMA, M.R., and ALVAREZ, J.M. (2006). Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* **74**, 2031-2042.
- SARTORI, A.M., LOPES, M.H., BENVENUTI, L.A., CARAMELLI, B., DI PIETRO, A., NUNES, E.V., RAMIREZ, L.P., and SHIKANAI-YASUDA, M.A. (1998). Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **59**, 784-786.
- SATELLITE-MEETING. (1999). Recommendations from a satellite meeting. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 429-432.
- SEPULVEDA, P., HONTEBEYRIE, M., LIEGEARD, P., MASCILLI, A., and NORRIS, K.A. (2000). DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* **68**, 4986-4991.
- SILVEIRA, E.L., CLASER, C., HAOLLA, F.A., ZANELLA, L.G., and RODRIGUES, M.M. (2008). Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1292-1300.
- SOUTO, R.P., and ZINGALES, B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and biochemical parasitology* **62**, 45-52.
- TARLETON, R.L., GRUSBY, M.J., POSTAN, M., and GLIMCHER, L.H. (1996). *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. *International immunology* **8**, 13-22.
- TARLETON, R.L., GRUSBY, M.J., and ZHANG, L. (2000). Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* **165**, 1520-1525.
- TARLETON, R.L., KOLLER, B.H., LATOUR, A., and POSTAN, M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* **356**, 338-340.
- TARLETON, R.L., ZHANG, L., and DOWNS, M.O. (1997). "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3932-3937.
- TZELEPIS, F., DE ALENCAR, B.C., PENIDO, M.L., CLASER, C., MACHADO, A.V., BRUNA-ROMERO, O., GAZZINELLI, R.T., and RODRIGUES, M.M. (2008).

- Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol* **180**, 1737-1748.
- TZELEPIS, F., DE ALENCAR, B.C., PENIDO, M.L., GAZZINELLI, R.T., PERSECHINI, P.M., and RODRIGUES, M.M. (2006). Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infection and immunity* **74**, 2477-2481.
- UMEKITA, L.F., and MOTA, I. (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]* **33**, 253-258.
- VASCONCELOS, J.R., BOSCARDIN, S.B., HIYANE, M.I., KINOSHITA, S.S., FUJIMURA, A.E., and RODRIGUES, M.M. (2003). A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. *Immunology and cell biology* **81**, 121-129.
- VASCONCELOS, J.R., HIYANE, M.I., MARINHO, C.R., CLASER, C., MACHADO, A.M., GAZZINELLI, R.T., BRUNA-ROMERO, O., ALVAREZ, J.M., BOSCARDIN, S.B., and RODRIGUES, M.M. (2004). Protective immunity against *trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human gene therapy* **15**, 878-886.
- VRAY, B., DE BAETSELIER, P., OUAISSI, A., and CARLIER, Y. (1991). *Trypanosoma cruzi* but not *Trypanosoma brucei* fails to induce a chemiluminescent signal in a macrophage hybridoma cell line. *Infection and immunity* **59**, 3303-3308.
- WHO. Chagas; Control of Chagas disease; WHO expands fight against Chagas disease with support from Bayer.
- WIZEL, B., GARG, N., and TARLETON, R.L. (1998). Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* **66**, 5073-5081.
- WIZEL, B., NUNES, M., and TARLETON, R.L. (1997). Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. *J Immunol* **159**, 6120-6130.
- YEO, M., ACOSTA, N., LLEWELLYN, M., SANCHEZ, H., ADAMSON, S., MILES, G.A., LOPEZ, E., GONZALEZ, N., PATTERSON, J.S., GAUNT, M.W., DE ARIAS, A.R., and MILES, M.A. (2005). Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International journal for parasitology* **35**, 225-233.
- YOSHIDA, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology international* **57**, 105-109.
- ZINGALES, B., SOUTO, R.P., MANGIA, R.H., LISBOA, C.V., CAMPBELL, D.A., COURA, J.R., JANSEN, A., and FERNANDES, O. (1998). Molecular epidemiology



of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International journal for parasitology* **28**, 105-112.

ZINGALES, B., STOLF, B.S., SOUTO, R.P., FERNANDES, O., and BRIONES, M.R. (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 159-164.

# 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](#)