

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Rafael Polidoro Alves Barbosa

Imunização com protocolo heterólogo utilizando
influenza e adenovírus recombinantes expressando o
antígeno ASP-2 induz potente resposta imune celular e
proteção contra o *Trypanosoma cruzi*

Belo Horizonte

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Rafael Polidoro Alves Barbosa

Imunização com protocolo heterólogo utilizando influenza e adenovírus recombinantes expressando o antígeno ASP-2 induz potente resposta imune celular e proteção contra o *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção de título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadores: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli
Dr. Alexandre Vieira Machado

Belo Horizonte

2010

Epígrafe

“Ama-se o que se conquista com esforço”

Aristóteles

Agradecimentos

Agradeço em especial à banca, Dr. Flávio da Fonseca e Dra. Andréa Teixeira, pela disposição apresentada em participar prontamente da minha formação acadêmica, certo de que obterei grande aprendizado e proveito para toda a vida.

Agradeço aos meus pais, Sílvio e Dorinha, pelo apoio, confiança, sustento, e por me permitirem prosperar ou fracassar dentro do caminho que eu mesmo escolhi. A meus irmãos que apesar de muitos, não dividem a irmandade, mas sim a multiplicam, Melissa, Sílvio, Ana, André, Júlia, Clara e Pedro.

Agradeço a meus outros inúmeros pais e mães que cruzaram no meu caminho e me fizeram chegar à conclusão que as pessoas boas são amigas sem mesmo se conhecerem, mas tornam-se família após este fato. Aos membros de minha família por acreditarem em mim, muitas vezes mais até do que eu mesmo.

Aos que se foram, mas alteraram as vidas dos que por eles passaram de forma permanente, devido a seu grande amor e capacidade de mudarem o mundo e influenciarem tão positivamente a minha vida. Em especial à Jucélia e Melissa.

Aos meus amigos e amigas que são irmãos e irmãs, por fecharem este ciclo de afeto ligando as pessoas que são boas de alma e coração, intenções e atitudes.

Aos meus orientadores Dr. Ricardo Gazzinelli e Dr. Alexandre Vieira Machado pela confiança e oportunidade de crescer, por me introduzir ao mundo científico em um ambiente repleto de pessoas competentes e inteligentes. Pelos projetos em que pude ajudar a desenvolver e sua responsabilidade social intrínseca. Pelo respeito e educação a mim dispensados, não somente na vida científica, mas por toda a vida. Por fim, pelo vínculo criado. Aos meus amigos e amigas de laboratório pelos momentos de trabalho mais produtivos ou até descontraídos, agradeço especialmente a cada um.

Ao Oscar Bruña-Romero por ser minha porta de entrada na ciência, um grande amigo e auxiliador em meus passos científicos. E aos amigos do LAR, que já foram companheiros de trabalho e agora são amigos.

Às pessoas que participaram ativamente do projeto, Bruno Galvão, Dr. Policarpo Sales e Dr. Maurício M. Rodrigues. Ainda, à Msc. Miriam Dutra pelos ensinamentos, participação no projeto e a grande ajuda com a dissertação.

Aos citados e aos não citados, meu muito obrigado!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Biologia e epidemiologia da doença de Chagas	11
1.2. A imunologia da doença de Chagas	17
1.3. Estratégias de vacinação contra infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.4. Vírus recombinantes como ferramentas de vacinação	22
1.5. Vírus Influenza recombinantes como vetores de imunização	23
1.6. Adenovírus recombinantes como vetores de imunização	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS:	28
3.1. Camundongos	28
3.2. Células e parasitos	28
3.3. Construção dos Plasmídeos de Transferência	28
3.4. Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa	30
3.5. Obtenção dos estoques-trabalho dos vírus influenza gerados	33
3.6. Extração do RNA viral, análise por RT-PCR	35
3.7. Protocolo de imunização em camundongos	35
3.8. ELISA	36
3.9. Análise da produção de anticorpos específicos no soro de animais imunizados	36
3.10. Análise de imunospots ligados a enzimas (ELISPOT)	38
3.11. Ensaio de Proteção	39
3.12. Análises estatísticas dos dados	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa	41
4.3. Indução de resposta imune heteroespecífica anti-ASP2	43
4.3.1. Análise da indução da produção de Imunoglobulinas específicas	43
4.3.2. Análise de resposta imune celular específica anti-ASP2	45
4.4. Ensaio de proteção em camundongos C57BL/6 imunizados e desafiados com 1000 parasitos da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	46
5. DISCUSSÃO	49

6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS:.....	56
8. ANEXOS.....	66
8.1. Artigo publicado	66
8.2. Artigo de colaboração submetido na PLOS Pathogens 15/04/2010	67
8.3. Publicação de reportagem em revista de divulgação científica	68
8.4. Bill and Melinda Gates Foundation Global Health Travel Award	68

Lista de Abreviaturas

cDNA – DNA complementar

CTL – Linfócito T citotóxico

DC – Célula dendrítica

DL50 – Dose letal de 50% da amostra

DMEM – Meio Dulbecco Eagle Modificado

dNTP – desoxiribonucleotídeos fosfatados

DO – Densidade óptica

ELISA – Ensaio enzimático ligado à enzima

ELISPOT – Ensaio de imuno-absorção ligado à enzima em poços

Gal – Galactina

HEK – Célula de rim embrionário humano

IFN - Interferon

Ig – Imunoglobulinas

IL - Interleucina

kb – Kilo bases

kDa – Kilo Daltons

KO – knockout, deficiente

MDCK – Célula de rim canino Madin-Darby

mg - Miligrama

µg - Micrograma

mL - Mililitro

µL – Microlitro

mM – Milimolar

MM – Marcador de peso molecular

Mock – Controle negativo

m.o.i – Multiplicidade de infecção

n – número amostral

NA - Neuraminidase

NC – Região não-codificadora

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas

NK – Célula natural killer

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

nt - Nucleotídeo

ORF – Janela aberta de leitura

SAG – Antígeno de superfície do taquizoíto

Pb – Pares de Base

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T – Solução salina tamponada com fosfato adicionada de 0,05% Tween20

P.F.U. – Unidade formadora de placa

PMN – Leucócitos polimorfonucleares

rAd – Adenovírus recombinante

RPM – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa

SDS - duodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SN – Sobrenadante

TAE – tampão tris acetato EDTA pH 8,0

TEMED – N, N, N', N' – tetrametil-etilenodiamina

TGF – Fator de crescimento transformante

TNF – Fator de necrose tumoral

TLR – Receptor do tipo toll

vRNP – Complexo ribonucleoprotéico viral

Lista de figuras

Figura Complementar 1: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	16
Figura M1: Representação esquemática dos plasmídeos	30
Figura M2: Genética reversa	33
Figura M3: Linha do tempo de imunização e desafio	39
Figura R1: Placas de Lise dos vírus recombinantes	41
Figura R2: RT-PCR dos SN dos vírus de cultivo celular	42
Figura R3: ELISA do soro dos camundongos imunizados	44
Figura R4: Western Blot dos soros dos camundongos imunizados	44
Figura R5: ELISPOT dos esplenócitos dos camundongos imunizados	46
Figura R6: Análise da proteção frente ao desafio	48

Resumo

Apesar dos grandes avanços nas ciências médicas ao longo do último século, as doenças infecciosas ainda são um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. A doença de Chagas é um bom exemplo, sendo causada através da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, possui maior prevalência na América Latina e seu tratamento resume-se a curta fase aguda da doença, causando ainda efeitos adversos. Não há disponível para uso em humanos vacinas contra a doença de Chagas, portanto o estudo e desenvolvimento de um protocolo otimizado de vacinação se faz uma interessante linha de pesquisa. Os vírus recombinantes se apresentam como ferramentas interessantes para combinação em protocolos heterólogos de vacinação de indução e reforço da resposta imune. Usando técnicas de genética reversa, foram construídos três vírus influenza recombinantes carregando as porções C-terminal, medial e N-terminal da proteína ASP-2 de *T. cruzi*. Essa conservada proteína imunogênica induz altos níveis de proteção em camundongos susceptíveis através da estimulação de células T CD8+. Esses vírus recombinantes foram caracterizados genotipicamente e fenotipicamente. Além disso, os vírus influenza recombinantes foram avaliados quanto à sua capacidade de estimular linfócitos T CD8 específicos em C57BL/6 quando combinados com Adenovírus recombinantes carregando o segmento ASP2 em protocolo de indução e reforço da resposta imune. Os vírus influenza recombinantes como *indução* aplicados via intranasal, combinados com adenovírus recombinantes aplicados via subcutânea como *reforço* resultaram em potente estimulação de resposta imune, como demonstrado através das técnicas de ELISA e ELISPOT. A mesma combinação de protocolos foi capaz de proteger 100% dos camundongos desafiados via intraperitoneal com 1000 parasitos da cepa Y de *T. cruzi*.

Palavras-chave: Vírus recombinante; ASP2, *Trypanosoma cruzi*, Influenza

Abstract

Despite the great advances on medical sciences over the last century, infectious diseases still as a major health problem, especially in developing countries. Chagas` disease is a good example of these infectious diseases. Caused by the protozoan agent *Trypanosoma cruzi*, it has prevalence on Latin America and its treatment, restricted to acute phase, results on adverse effects. There is no human vaccine for Chagas` disease, thus studying the development of an optimum vaccine protocol is an interesting research subject. Recombinant viruses emerge as promising tools for testing heterologous prime-boost vaccination protocols. Using reverse genetics technique, three recombinant influenza viruses were generated encoding the C-terminal, medial and N-terminal portion of ASP-2 protein from *T. cruzi*. This conserved immunogenic protein reaches high protection levels in susceptible mice by specific CD8⁺T cells stimulation. Those viruses have been characterized genotypically and phenotypically. Further, we tested the viruses as their capacity to induce immune responses in C57BL/6 mice combined with recombinant adenoviruses encoding the ASP2 gene, in order to determine the best portion and protocol to induce higher specific T cells responses. The recombinant influenza viruses as prime, given by intra-nasal route, combined with recombinant adenoviruses, given subcutaneously, as boost generated potent immune responses as seen through ELISA and ELISPOT procedures. The same protocol was able to protect 100% of mice challenged by intra-peritoneal route with 1000 *T. cruzi* parasites from Y strain.

Key words: Recombinant virus; ASP2, *Trypanosoma cruzi*, Influenza

1. INTRODUÇÃO

1.1. Trypanosoma cruzi: Biologia e epidemiologia da doença de Chagas

Mais de um centenário após a descrição da doença de Chagas a doença de Chagas ainda é importante problema de saúde pública. Causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* a doença é endêmica nas América Latina e Central. Dados de 1990 indicavam que ao menos cem milhões de pessoas estavam em área de risco de infecção pelo *T. cruzi*. Indicavam ainda trinta milhões de infectados e a mortalidade anual em torno de 45 mil pessoas. Medidas de controle e prevenção da doença foram feitas a níveis intergovernamentais com relativo sucesso. Geralmente relacionados ao controle do vetor, controle dos bancos de sangue e estudo de casos.

Em 2005, a OMS adicionou a doença de Chagas na lista de doenças tropicais negligenciadas e em 2006, estimou-se a redução para oito milhões de indivíduos infectados e a mortalidade anual por volta de onze mil. Apesar disso, houve um aumento na prevalência da doença em países desenvolvidos, fato que pode ser explicado pela migração de indivíduos infectados conjuntamente com a ausência de experiência dos órgãos de saúde na falta de contato com a doença, e conseqüentemente, aumento da infecção por transfusão sanguínea, infecção congênita e transplante de órgãos (OMS, 2009; Biolo, Ribeiro *et al.*, 2010). Por fim, pesquisas para novos testes diagnósticos e novos tratamentos se fazem necessárias e desejáveis para conter a disseminação da doença (OMS, 2009).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi* pertencente à família Tripanosomatidae. Essa família é

formada por parasitas obrigatórios, entre os quais encontramos predominantemente insetos. Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* possuem ciclo digenético, isto é, possuem um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado. Todas as classes de vertebrados possuem tripanosoma parasita conhecido (Simpson, 1995).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* possui um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. Um Reduviidae, triatomíneo, suga o sangue de um mamífero infectado. Este inseto, mais conhecido como barbeiro, possui hábitos noturnos e usualmente defeca durante o repasto sanguíneo. Do sangue do hospedeiro infectado, o barbeiro obtém basicamente formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Tais formas são extracelulares e não replicativas, nas quais o parasito se apresenta numa forma alongada e com flagelo curto. No intestino do barbeiro as formas tripomastigotas se diferenciam a formas amastigotas, as quais são replicativas e aflageladas. Em seguida, as formas amastigotas derivam para formas epimastigotas, também replicativas, a partir de um alongamento do flagelo. A forma epimastigota passa a interagir com o epitélio mucoso do intestino do triatomíneo onde ocorre a transformação para a forma tripomastigota metacíclica, através de um encurtamento do flagelo e afinamento do citoplasma. Uma vez formadas, essas formas metacíclicas são liberadas na excreta do barbeiro. O mamífero pode se infectar por contato das fezes do barbeiro com a ferida causada pela picada ou interação das formas metacíclicas com a membrana mucosa através da ingestão da excreta (Kelly, 2000; Tyler e Engman, 2001).

As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar um grande número de células nucleadas de mamíferos. A invasão ocorre com um direcionamento por microtúbulos de lisossomos para a região de ligação do parasito com a célula, até circundar o parasito e permitir sua entrada. A acidificação do meio induz a expressão de proteínas de evasão do vacúolo. Uma vez no citoplasma, há a diferenciação para formas amastigotas

intracelulares, que se dividem assexuadamente até formarem um pseudocisto. Quando em grande quantidade, as formas amastigotas atingem a corrente sanguínea após diferenciação para tripomastigotas sanguíneas, que possuem um citoplasma maior que as formas metacíclicas. Essas formas podem escapar dos pseudocistos e infectar outras células nucleadas de maneira parecida com as formas metacíclicas. A presença de formas amastigotas e tripomastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero permitem que o ciclo se complete em um posterior repasto sanguíneo do barbeiro (Figura 1)(Kelly, 2000; Tyler e Engman, 2001).

Do ponto de vista de sintomatologia, a doença de Chagas possui diagnóstico complexo, visto que os sintomas variam dependendo do paciente e muitas vezes sem um padrão característico. A sintomatologia da doença de Chagas é dividida em três fases: aguda, indeterminada e crônica, valendo ressaltar que nem todos os pacientes apresentam de forma clara sintomas referentes a essas fases e boa parte dos sintomas podendo regredir naturalmente (Andrade, Andrade *et al.*, 1994; Rassi, Rassi *et al.*, 2000). Muitas vezes os sintomas passam despercebidos, uma vez que a fase aguda pode durar poucas semanas acompanhadas de sintomas não específicos, tais como febre, taquicardia, fraqueza, linfadenopatia, sudorese e, muito raramente, meningoencefalite (Parada, Carrasco *et al.*, 1997). Dois sintomas específicos que poderiam ajudar no diagnóstico ainda na fase aguda são: 1) inflamação da pele no local da entrada do parasito, conhecido como chagoma e 2) o sinal de Romaña, uma adenopatia periauricular. Porém nem todos os pacientes apresentam estes sintomas (Kierszenbaum, 2007; Biolo, Ribeiro *et al.*, 2010). Além disso, o exame sorológico somente identifica a doença na fase crônica, sendo necessária para diagnóstico durante a fase aguda a detecção de parasitos no sangue por microscopia. Estes fatores limitam muito o tratamento eficaz da doença, visto que os dois medicamentos disponíveis atualmente, nifurtimox e benzonidazol são eficazes apenas na fase aguda. Apesar disso,

há indícios de que no tratamento com as duas drogas durante a fase crônica há redução da severidade dos sintomas e pode evitar morbidade (Tarleton, Reithinger *et al.*, 2007; OMS, 2009).

O período indeterminado é caracterizado pela ausência de sintomas clínicos, apesar de poder haver sintomas subclínicos. Essa fase dura de meses a décadas, sendo que miocardite, por exemplo, pode ser indetectável em eletrocardiograma e raios-X do tórax. Estima-se que dois terços dos pacientes possuem lesão no miocárdio (Davila, Rossell *et al.*, 1989; OMS, 2009; Abuhid, Pedroso *et al.*, 2010) entre eles os mais importantes são cardiomiopatia, megaesôfago e megacolon (Andrade, Andrade *et al.*, 1994).

Apenas um terço dos pacientes apresenta sintomas na fase crônica, sendo os mais freqüentes são danos severos no miocárdio levando a arritmias, aneurisma ventricular apical e falha congestiva no coração. Outros sintomas freqüentes são megaesôfago e megacólon, porém são mais endêmicos na região central do Brasil (Andrade, Andrade *et al.*, 1994; Kierszenbaum, 2007).

O *Trypanosoma cruzi* pode ser transmitido por mais de 100 espécies da subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Dentre as inúmeras espécies, no Brasil, três gêneros são os mais importantes responsáveis pela transmissão da doença, *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Kelly, 2000; Teixeira, Nitz *et al.*, 2006). Mais comumente conhecido como barbeiro ou chupança, os triatomíneos adultos possuem hábitos noturnos e muitas vezes domiciliares. Seu ciclo de vida inclui o ovo, cinco estádios ninfais e o adulto sendo que no estágio adulto, tanto a fêmea quanto o macho são hematófagos, o que aumenta o potencial de transmissão da doença de Chagas. Todas as mudanças na forma de vida precisam ao menos de um repasto sanguíneo, que é caracterizado pela ingestão de quantidade nutricional suficiente no sangue, seguido de defecação por um tempo intra-específico. Esse tempo é espécie específica e é determinante na capacidade natural do triatomíneo de transmitir a doença (Gonçalves e Costa).

O controle do vetor é a forma mais eficaz de combate à transmissão da doença de Chagas na atualidade e seus benefícios já são evidentes. Entretanto, alguns aspectos da biologia do vetor devem ser considerados antes do uso indiscriminado dos inseticidas piretróides. Tais como a resistência ao jejum permite ao barbeiro ficar sem se alimentar de 57 a 217 dias dependendo do estágio de vida e conseqüentemente escapar da borrifação; e causar sua dispersão ativa, através da destruição do meio ambiente ou até deslocamento passivo sobre animais silvestres que precisam procurar novos abrigos com a destruição antrópica de seu habitat (Gonçalves e Costa; Teixeira, Nitz *et al.*, 2006).

Em 2006, a Comissão de Iniciativa Intergovernamental do Cone Sul Contra a Doença de Chagas declarou que o Brasil foi considerado livre da transmissão da doença de Chagas por vetores da espécie *Triatoma infestans*, marco importante visto que essa espécie era endêmica em mais de 700 municípios dos doze estados mais populosos (Schofield, Jannin *et al.*, 2006). Outros países se beneficiaram com o programa, tais como Uruguai, Paraguai, parte da Argentina e Chile, porém este resultado pode relaxar as políticas públicas e diminuir o investimento, acarretando um atraso muito grande na erradicação da doença e do vetor. Em todos os casos, a varredura dos bancos de sangue, novos diagnósticos, terapias, tratamentos e pesquisas se fazem necessários no combate a este importante agente etiológico (Schofield, Jannin *et al.*, 2006; Teixeira, Nitz *et al.*, 2006).

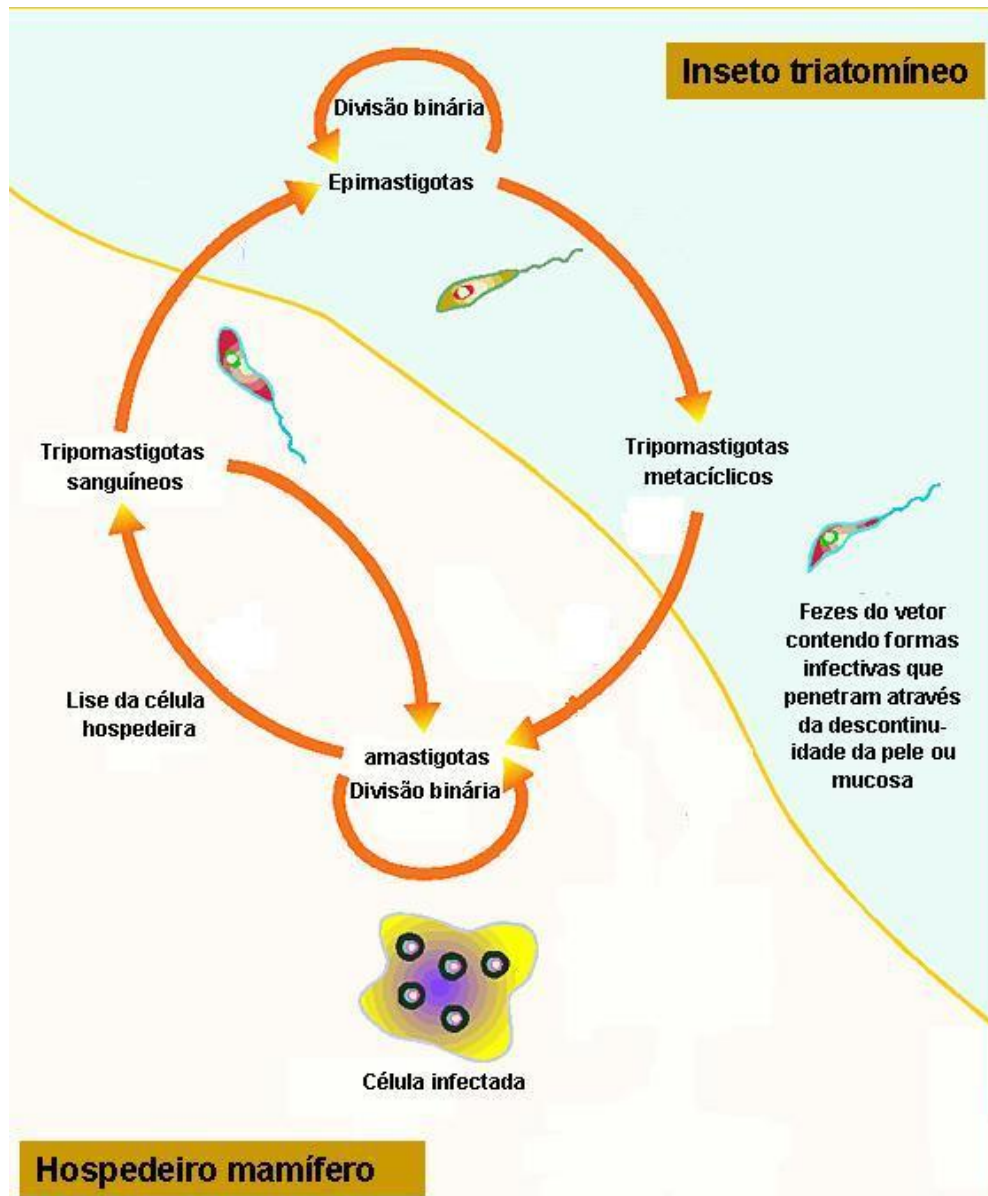


Figura complementar 1: ciclo de vida esquemático do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiro mamífero. Comumente, o parasito alcança a corrente sanguínea após contaminação do local da picada com as fezes do triatomíneo contendo formas tripomastigotas metacíclicas do parasito. Estas podem invadir ativamente um grande número de células nucleadas do hospedeiro mamífero, onde se transformam em formas amastigotas ovóides e fazem sucessivas divisões binárias. Em seguida, essas formas se diferenciam para tripomastigotas sanguíneas que são liberadas das células infectadas após a lise celular. Formas tripomastigotas circulantes podem infectar novas células ou serem sugadas durante o repasto sanguíneo do barbeiro. No intestino médio do inseto, há diferenciação do parasito para forma epimastigota, que também sofre sucessivas divisões binárias e transmigra para o intestino posterior, onde se modifica para forma tripomastigota metacíclica e pode completar o ciclo num próximo repasto sanguíneo. Ciclo adaptado e modificado de Kelly (Kelly, 2000).

1.2. A imunologia da doença de Chagas

A resposta imune inata na infecção pelo *T. cruzi* tem papel essencial no reconhecimento do parasito e direcionamento adequado para o desenvolvimento da resposta adaptativa. Na fase aguda da doença, a resposta imune inata regula a replicação do parasito e sua dispersão pelos tecidos. A IL-12 é a principal responsável pelo direcionamento da resposta adaptativa para Th1, através da estimulação da produção de IFN- γ e ativação de células natural killer (NK) (Kayama e Takeda, 2010). O IFN- γ também é responsável pela ativação de macrófagos, que, por sua vez, são capazes de eliminar ou impedir multiplicação dos parasitos intracelulares através da expressão da óxido nítrico sintase induzível. De fato, camundongos defectivos em IFN- γ , TNF- α e IL-12 são altamente susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Kayama e Takeda, 2010). Outrossim, somente a presença de IFN- γ não é capaz de conter a severidade da infecção, visto que macrófagos de camundongos knockout (KO) em LRG-47, uma GTPase induzida por IFN- γ , possuem produção normal de NO sintetase tipo II e TNF, porém são incapazes de eliminação das formas amastigotas *in vitro* (Santiago, Feng *et al.*, 2005). Tais resultados demonstram um papel da LRG-47 na eliminação dos parasitos e explicam como o interferon- γ pode alcançar seu papel protetor na ativação dos seus genes induzíveis.

Receptores do tipo Toll capazes de induzir a expressão dessas citocinas por células do sistema imune, mais especificamente, os receptores do tipo toll (TLRs) 2, 4 e 9 e a molécula adaptadora Myd88 são ativados pela presença do parasito (Campos e Gazzinelli, 2004; Bafica, Santiago *et al.*, 2006). Os receptores toll do tipo 2 são fortemente ativados pelas âncoras GPI e pela proteína secretada do *T. cruzi* Tc52 (Monteiro, Schmitz *et al.*, 2006). O TLR4 é ativado pela forma epimastigota do parasito, através do subtipo de âncoras GPI glico-inositol-fosfolípídeos (GIPLs), e seu papel na proteção contra a

infecção é controverso. Por fim, o TLR9, endosomal, reconhece o DNA genômico do parasito, sendo então ativado produzindo diversas citocinas importantes na eliminação do parasito. De fato, estudos mostram que macrófagos derivados de camundongos TLR9^{-/-} eram deficientes na produção de IL-6, IL12p40 e NO (Bafica, Santiago *et al.*, 2006; Bartholomeu, Ropert *et al.*, 2008; Kayama e Takeda, 2010). A infecção pelo *T. cruzi* também ativa resposta imune TLR-independente, onde se observa um aumento da concentração de Ca⁺⁺ intracelular, a qual acaba por ativar genes induzidos por células T ativadas, NFATc1, reconhecimento direto por Nod1 e ativação de NFκB, que levam a produção de IFN-γ (Kayama, Koga *et al.*, 2009; Kayama e Takeda, 2010).

A resposta imune adaptativa frente a infecção por *T. cruzi* tem como agente principal os linfócitos T CD8. No citoplasma, o parasito expressa proteínas que são processadas para apresentação em MHC do tipo I. Além disso, cada ciclo intracelular dura pelo menos cinco dias, o suficiente para detecção das células infectadas pelos linfócitos T CD8 (Padilla, Bustamante *et al.*, 2009). A resposta das células CD8 está diretamente relacionada a imunodominância, o que indica que a competição pela apresentação de antígenos deve restringir o número de epítopos que ativarão populações de linfócitos T CD8 específicas (Rodrigues, De Alencar *et al.*, 2008; Tzelepis, De Alencar *et al.*, 2008). Os mecanismos antiparasitários mediados por essas células são múltiplos, incluindo secreção de citocinas e citotoxicidade direta contra células infectadas (Muller, Sobek *et al.*, 2003). Recentemente, o papel do IFN-γ e da Perforina na citotoxicidade e uma relação direta com imunidade protetora foram bem demonstrados (De Alencar, Persechini *et al.*, 2009). Porém, o papel dos linfócitos citotóxicos Perforina⁺ foi também associado à miocardite e disfunção cardíaca em modelo murino (Silverio, De-Oliveira-Pinto *et al.*, 2009). A dependência de IFN-γ produzido pelos linfócitos CD8, pelo menos parcialmente, é dependente de NO, visto que camundongos que não

possuem receptores de IFN- γ possuem macrófagos deficientes na produção de NO, sugerindo que o IFN- γ é um potente indutor de NO (Rodrigues, M. M., Boscardin, S. B. *et al.*, 2003). Ademais, os camundongos deficientes na produção de NOS2 são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* de diferentes cepas (Rodrigues, Ribeiro *et al.*, 2000).

Estudos demonstram que camundongos deficientes em MHC do tipo II apresentaram mortalidade e parasitemia altas comparáveis aos animais deficientes em MHC do tipo I, frente ao desafio com *T. cruzi* (Tarleton, Grusby *et al.*, 1996). Já foi demonstrado também que a depleção de linfócitos T CD4 em modelo de vacinação influencia na mortalidade, ainda que não tão fortemente quanto a ausência dos linfócitos T CD8 (Araujo, De Alencar *et al.*, 2005; Machado, Cardoso *et al.*, 2006). Ademais, sua ajuda na proteção é efetiva, uma vez que linfócitos CD4 do tipo Th1 são capazes de mediar lise provocada por NO, além de serem auxiliadoras dos linfócitos citotóxicos CD8 (Rodrigues, Ribeiro *et al.*, 2000). A falta de linfócitos T CD4 em camundongos resultou em menor número de CTLs e conseqüentemente comprometimento da capacidade de proteção (Padilla, Xu *et al.*, 2007).

Os anticorpos têm papel relevante na sobrevivência à fase aguda e no controle da parasitemia na fase crônica em camundongos altamente susceptíveis (Umekita e Mota, 2000). A proteção por anticorpos está associada às subclasses de imunoglobulinas (Ig)G2c e IgG3, porém sua persistência na fase crônica também pode estar associada a lesões no tecido cardíaco por estimulação constante de linfócitos B (D'imperio Lima, Eisen *et al.*, 1986). Recentemente foi demonstrado que terapia com imunoglobulinas poliespecíficas, de doadores saudáveis inoculadas pela via intravenosa melhora a sobrevivência em modelo experimental quando administradas ainda na fase aguda (Olivieri, Vasconcellos *et al.*, 2010).

Um papel muito importante para os linfócitos B na proteção contra desafio na doença de Chagas foi o de células apresentadoras de antígeno,

fazendo uma apresentação cruzada dos epítomos imunodominantes para os linfócitos T CD8. Papel este que pôde ser confirmado com o aumento da expressão de MHC I e da molécula co-estimulatória CD80 nas células B na presença de antígeno de *T. cruzi* (Hoft, Eickhoff *et al.*, 2007). Outrossim, foi identificada uma depleção rápida no número de células B imaturas na medula óssea e periferia após a infecção pelo *T. cruzi*, funcionando como parte do processo de escape do parasito para alcançar a fase crônica. No baço, há uma ativação policlonal de células B, o que acaba por induzir apoptose para manutenção da homeostase via interação Fas-FasL e liberação de Gal-1. Esta última, por sua vez, inibe a produção de IFN- γ pelas células T e também induz apoptose nestas células (Acosta Rodriguez, Zuniga *et al.*, 2007).

Um último aspecto do papel da imunologia na doença de Chagas é o da patologia da doença. A imunidade é controversa uma vez que há inflamação exacerbada e ativação exagerada do sistema imune mesmo na presença de poucos parasitos, e isso pode comprometer a fisiologia do próprio hospedeiro sem curar a doença. Existem muitas hipóteses se a patologia da doença de Chagas é ou não resultado de um processo autoimune, mas sem um consenso geral (Soares, Pontes-De-Carvalho *et al.*, 2001; Golgher e Gazzinelli, 2004; Hyland, Leon *et al.*, 2007; Da Matta Guedes, Gutierrez *et al.*, 2010).

1.3. Estratégias de vacinação contra infecção por *Trypanosoma cruzi*

A ineficiência do tratamento terapêutico por causa da limitação do diagnóstico nos pacientes ainda em fase aguda e o aumento de casos em bancos de sangue em localidades não endêmicas, entre outros, tornam atrativos argumentos favoráveis à intervenção imunológica, tais como vacinação para o aumento da eficácia dos tratamentos e prevenção contra a doença de Chagas.

Foi previamente estabelecido que uma vacina protetora contra a infecção pelo *T. cruzi* seria direcionada para o perfil Th1 e caracterizada por alta produção de IFN- γ (Dumonteil, 2007; 2009). Além disso, anticorpos líticos, outras citocinas do perfil Th1 e CTLs são importantes no controle da infecção (Dumonteil, 2009). A participação efetiva de células CD4⁺ foi determinada baseada no fato de que a imunização apenas com epítomos CD8⁺ não são protetoras em camundongos frente ao desafio com o *T. cruzi* (De Alencar, Araujo *et al.*, 2007). Por fim, linfócitos B funcionando como células apresentadoras de antígenos profissionais se mostraram importantes na imunidade protetora induzida por DNA recombinante (Hoft, Eickhoff *et al.*, 2007).

Vacinas recombinantes, utilizando DNA expressando antígenos de *T. cruzi* são bem sucedidas em induzir um grande número de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Dumonteil, 2007). Vacinas que se utilizam de vírus recombinantes também são potentes indutoras de resposta protetora, e apresentam a vantagem de não precisarem de adjuvante, visto que os próprios vetores virais são responsáveis pelo recrutamento de APCs e direcionamento da resposta imune (Rocha, Caetano *et al.*, 2004). Uma única imunização com adenovírus expressando um epítomo CD8, seguido de imunização com vírus vaccinia recombinante expressando o mesmo antígeno foi capaz de conferir proteção em C57BL/6, mostrando um papel preponderante das CTLs em conferir proteção (Miyahira, Takashima *et al.*, 2005). Porém, os níveis de proteção, apesar de significativos, foram modestos e a linhagem de camundongos utilizada nos experimentos é naturalmente considerada resistente. Os principais estudos de imunização contra doença de Chagas se limitam a antígenos derivados de Trans-sialidases (TS), o que pode representar uma limitação à vacinação eficiente, devido ao alto polimorfismo encontrado na família das proteínas TS (Martin, Weatherly *et al.*, 2006).

Uma proteína da subfamília II das Trans-sialidases presente nas formas amastigotas do *T. cruzi* apresentou anticorpos e células CD8⁺ específicas em pacientes na fase crônica da doença de Chagas (Pan e McMahon-Pratt, 1989; Wízel, Palmieri *et al.*, 1998). Estudos de vacinação utilizando-se deste antígeno com cDNA, proteína ou vírus recombinantes estimularam células CD4⁺ Th1 e células CD8⁺ Tc1, resultando em potente imunidade protetora em pelo menos três linhagem geneticamente diferentes de camundongos e duas cepas diferentes (Boscardin, Kinoshita *et al.*, 2003; Vasconcelos, Hiyane *et al.*, 2004; Machado, Cardoso *et al.*, 2006; De Alencar, Persechini *et al.*, 2009). Além disso, um estudo de proteção cruzada entre diferentes cepas de *T. cruzi* demonstrou que poucas cepas podem expressar isoformas diferentes de ASP-2 (subfamília II de Trans-sialidases) que não compartilham epítomos protetivos (Claser, Espindola *et al.*, 2007). O que faz desse antígeno um importante alvo para vacinação contra a doença de Chagas.

1.4. Vírus recombinantes como ferramentas de vacinação

Dentre os diferentes vetores para carrear antígenos heterólogos, algumas das estratégias mais promissoras são baseadas na utilização de vírus recombinantes. Estes têm a capacidade de expressar antígenos heterólogos diretamente dentro das células hospedeiras, como aconteceria em uma infecção natural. Estudos utilizando diferentes vírus recombinantes (Vaccinia, adenovírus, sindbis e influenza) expressando antígenos do *Plasmodium yoelii*, mostraram que tais vírus são capazes de induzir uma imunidade protetora em camundongos BALB/c frente a uma infecção experimental por esporozoítos do *P. yoelii* (Li, Rodrigues *et al.*, 1993; Rodrigues, Li *et al.*, 1994; Tsuji, Bergmann *et al.*, 1998). Dentre os vírus acima citados, os adenovírus deficientes em replicação foram aqueles que se mostraram mais eficazes quando utilizados isoladamente, reduzindo em ~94%

as formas hepáticas do *P. yoelii* e induzindo uma imunidade protetora em 40% dos camundongos (Rodrigues, Zavala *et al.*, 1997). Quando os outros vetores virais foram utilizados isoladamente o nível de proteção obtido foi significativamente menor. (Li, Rodrigues *et al.*, 1993; Tsuji, Bergmann *et al.*, 1998; Rodrigues, M.M.; Boscardin, S.B.; *et al.*, 2003). Entretanto, resultados muito mais animadores foram obtidos quando os animais foram submetidos a duas imunizações seqüenciais (Li, Rodrigues *et al.*, 1993; Rodrigues, Li *et al.*, 1994; Murata, Garcia-Sastre *et al.*, 1996; Shiver, Fu *et al.*, 2002; Gherardi, M.M.; Najera, J.L.; *et al.*, 2003; Nakaya, Nakaya *et al.*, 2004). A título de exemplo da eficácia desta estratégia, poderíamos citar a inibição total do desenvolvimento das formas hepáticas e 100% de proteção contra a malária em camundongos que foram primeiramente imunizados com adenovírus recombinantes expressando a proteína CS do *P. yoelii* ou do *P. berghei*, e submetidos a uma imunização de reforço com um vírus Vaccinia expressando esta mesma proteína (Bruna-Romero, Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 2001; Gilbert, Schneider *et al.*, 2002).. Todos são capazes de induzir respostas do tipo Th1, produção de citocinas pró-inflamatórias, indução de células T (CD4⁺/CD8⁺) que são respostas mais comuns em doenças infecciosas (Rocha, Caetano *et al.*, 2004).

Imunizações com o mesmo vetor viral pode ter efeito reduzido devido à resposta imunológica contra o próprio vetor, neutralizando a infecção e impedindo a reapresentação do antígeno heterólogo. Em protocolos de indução e reforço utilizando mais de um vírus recombinante expressando o mesmo segmento antigênico este problema fica resolvido, uma vez que não existe exposição prévia ao segundo vetor. Assim, a resposta secundária contra o antígeno se dá de forma eficaz, aumentando a eficiência do protocolo de vacinação (Rocha, Caetano *et al.*, 2004).

1.5. Vírus Influenza recombinantes como vetores de imunização

Pertencentes à família *Orthomyxoviridae*, os vírus influenza possuem genoma segmentado de RNA fita simples e polaridade negativa. Existem três diferentes subtipos de vírus influenza: A, B ou C, sendo o mais importante para o homem os vírus influenza A, principais causadores de epidemias e pandemias em humanos. Estes vírus possuem um envelope no qual as duas proteínas transmembranas hemaglutinina (H ou HA) e neuraminidase (N ou NA) estão inseridas. Os vírus influenza se dividem em diferentes subtipos em função das diferentes HA e NA sendo hoje conhecidos 16 tipos de HA (H1 a H16) e 9 diferentes neuraminidase (N1 a N9). A hemaglutinina é a proteína responsável pela fixação do vírus ao receptor celular (as moléculas de ácido siálico) e pela penetração na célula hospedeira. A neuraminidase atua no brotamento viral, removendo o ácido siálico que recobre as células epiteliais do trato respiratório (nas quais ocorre a multiplicação viral) e do próprio vírus, evitando assim a aglutinação das partículas virais entre si e facilitando a sua propagação no meio extracelular (Julkunen, Melen *et al.*, 2000; Nayak, Hui *et al.*, 2004; Fields, Knipe *et al.*, 2007).

A menor unidade funcional de replicação dos vírus influenza é o complexo ribonucleoprotéico (vRNP). O complexo é formado pelo RNA viral (RNA_v), três subunidades da polimerase viral (PB1, PB2 e PA) e a nucleoproteína NP. A geração de vírus influenza recombinantes requer oito complexos RNP funcionais que serão transportados ao núcleo das células após a infecção e fusão do envelope viral com o endossomo (Neumann e Kawaoka, 2001).

Os vírus influenza recombinantes são considerados bons candidatos a vetores vacinais, visto que não se integram ao genoma do hospedeiro, possuem alta transdução do inserto recombinante e têm boa capacidade de infectar células apresentadoras de antígeno, além de serem excelentes estimuladores de linfócitos T CD8⁺ (Kittel, Ferko *et al.*, 2005). Nos Estados

Unidos já existem cepas atenuadas e vacinas vivas licenciadas para uso em humanos (Ben-Yedidia e Arnon, 2005). Em modelos experimentais, diversas vacinas utilizam influenza recombinantes como vetores com resultados promissores (He, Martinez-Sobrido *et al.*, 2007), desde doenças infecciosas como malária (Gonzalez-Aseguinolaza, Nakaya *et al.*, 2003), toxoplasmose (Machado, Caetano *et al.*, 2010) e até câncer (Restifo, Surman *et al.*, 1998). Outro argumento favorável para a escolha de vírus influenza como vetor para a expressão de seqüências heterólogas é o fato de que atualmente as técnicas de biologia molecular para a manipulação genética deste vírus já encontram bastante desenvolvidas (Neumann e Kawaoka, 2002; Neumann, Whitt *et al.*, 2002; Neumann e Kawaoka, 2004) e já existem diferentes estratégias para a expressão de proteínas heterólogas (Garcia-Sastre, Muster *et al.*, 1994; Percy, Barclay *et al.*, 1994; Takasuda, Enami *et al.*, 2002; Machado, A., Naffakh, N. *et al.*, 2003; Watanabe, Watanabe *et al.*, 2003). Soma-se às vantagens acima citadas, a capacidade deste tipo de vetor em induzir uma resposta imune heteroespecífica tanto local quanto sistêmica (Gherardi, M.M., Najera, J.L.; *et al.*, 2003; Garulli, Kawaoka *et al.*, 2004), a existência de uma tecnologia bem desenvolvida para a produção de vírus influenza em larga escala, a possibilidade de se utilizar vírus defectivos para a replicação (Stech, Garn *et al.*, 2005) ou cepas virais atenuadas (Gonzalez-Aseguinolaza, Nakaya *et al.*, 2003).

1.6. Adenovírus recombinantes como vetores de imunização

Adenovírus são vírus não envelopados pertencentes à família *Adenoviridae*. Os adenovírus caracterizam-se por apresentarem DNA fita dupla linear com cerca de 36Kb, que se encontra empacotado em um núcleo ou core envolvido por um capsídeo protéico icosaédrico com 20 faces triangulares (Imler, 1995). Esse é constituído de três estruturas protéicas principais, hexon,

penton e fibras. Os hexons constituem as faces triangulares do capsídeo. Os pentons formam os vértices da partícula, a partir dos quais se projetam as fibras, responsáveis pela interação com os receptores celulares (Nicklin, Wu *et al.*, 2005).

Dentre as características dos adenovírus algumas foram decisivas na escolha destes vírus como ferramenta de vacinação. Entre elas, (I) baixa patogenicidade, o que permite o desenvolvimento de vetores de imunização praticamente inócuos aos hospedeiros; (II) habilidade de infectar uma ampla variedade de células, além de células pós-mitóticas; (III) estratégias de replicação e genoma já foram bastante caracterizados, sendo o material genético viral incapaz de integrar-se ao da célula hospedeira; (IV) eles são relativamente estáveis e fáceis de manipular, dispensando refrigeração quando liofilizados; (V) fácil propagação, podendo ser obtidos em altos títulos ($>10^9$ unidades formadoras de placas/mL), o que permite sua produção em larga escala (Babiuk e Tikoo, 2000; Souza, Haut *et al.*, 2005); (VI) Finalmente, esses vírus são muito imunogênicos, sendo capazes de estimular tanto resposta imune inata quando a resposta imune adaptativa (Ginsberg, Horswood *et al.*, 1990; Ginsberg, Moldawer *et al.*, 1991; Yang, Xiang *et al.*, 1995). Os adenovírus recombinantes principalmente do tipo humano Ad5 foram, pelo menos na última década, os mais promissores vetores virais vacinais. Testes em fase clínica 1 e 2 estão sendo realizados com estes vetores em malária (Limbach e Richie, 2009). Tais vírus também são capazes de infectar células dendríticas, além de estimularem resposta imune contra diversos patógenos (Bruna-Romero, Lasarte *et al.*, 1997; Molinier-Frenkel, Lengagne *et al.*, 2002; Miyahira, Takashima *et al.*, 2005; Caetano, Bruna-Romero *et al.*, 2006; De Alencar, Persechini *et al.*, 2009; Machado, Caetano *et al.*, 2010). A resposta adjuvante induzida pelo Ad5 parece ser principalmente CD8+, sendo ainda capazes de estimular uma resposta imunológica de longa duração (Hovav, Panas *et al.*, 2007; Limbach e Richie, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o protocolo heterólogo de imunização utilizando vírus influenza recombinantes e adenovírus recombinantes carreando o antígeno ASP-2 de *Trypanosoma cruzi* em camundongos frente ao desafio com parasitos da cepa Y de *T. cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

1) Construir e caracterizar genotípica e fenotipicamente, em cultura celular, vírus influenza recombinantes carreando a proteína ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*.

2) Avaliar a resposta heteroespecífica humoral e celular em camundongos C57BL/6 imunizados com vírus influenza e adenovírus recombinantes para ASP-2.

3) Determinar a proteção de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína ASP-2 frente ao desafio com parasitos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Camundongos

Camundongos C57BL/6 machos e Webster-Suíço, de 10 a 12 semanas de idade foram adquiridos junto ao Biotério de Produção (BIOT) do Centro de Pesquisas René Rachou e mantidos de acordo com as recomendações de padrão institucionais.

3.2. Células e parasitos

Células MDCK foram cultivadas a 37°C em estufa com 5% CO₂. As Células foram cultivadas em meio Dulbecco Eagle Modificado completo (DMEM, Sigma) contendo 1mM de piruvato de sódio, 4,5 mg/mL de L-glicose, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, CUTILAB). As células 293T, foram cultivadas em meio DMEM completo suplementado com 10% de SFB. A cepa Y do Trypanosoma cruzi foi mantida através de passagem seriada em camundongos Suíços.

3.3. Construção dos Plasmídeos de Transferência

A construção dos plasmídeos de transferência contendo o cDNA que codifica o segmento selvagem da neuraminidase (NA) do vírus WSN foi previamente descrita (Machado, A. V., Naffakh, N. *et al.*, 2003). Este plasmídeo contém o segmento da NA clonado em orientação negativa no plasmídeo pPR7 entre a seqüência truncada do promotor da polimerase I humana (pol. I) e a seqüência da ribozima do vírus da hepatite δ (Crescenzo-Chaigne, Naffakh *et al.*, 1999). Este tipo de construção permite a síntese de

uma molécula de vRNA sintética nas células transfectadas. O plasmídeo pPR-NA38 é derivado do plasmídeo pPR-NA35 (Machado, A. V., Naffakh, N. *et al.*, 2003). Ele foi construído para conservar a integridade da extremidade 5' ao longo dos últimos 70 nucleotídeos da NA original. Isso se deu através da inserção de uma duplicação dos últimos 42 nucleotídeos da ORF da NA os quais foram inseridos entre o promotor 5' e as seqüências de ligação das enzimas de restrição *XhoI/NheI* (Vieira Machado, Naffakh *et al.*, 2006). O tamanho da seqüência inserida no plasmídeo pPR-NA38 é limitado pela estabilidade dos vírus a serem gerados, portanto, a seqüência gênica da proteína ASP-2 foi dividida em três segmentos, N-terminal, medial e C-terminal. As três seqüências foram então inseridas em orientação negativa entre os sítios *XhoI* e *NheI* (figura M1). Os plasmídeos assim obtidos foram chamados respectivamente pPR-NA38-ASP2-PTN1, pPR-NA38-ASP2-PTN2 e pPR-NA38-ASP2-PTN3.

A construção dos plasmídeos pPR-NA38-ASP2-PTN1, pPR-NA38-ASP2-PTN2 e pPR-NA38-ASP2-PTN3 foi realizada em duas etapas. Inicialmente, foram utilizados os óligos KpnI-PTN1, 2 ou 3 "forward" e os óligos PTN1, 2 ou 3-NheI "reverse" para amplificação da seqüência matriz, o plasmídeo pIgSP-Clone9, que contém a seqüência do segmento ASP-2 (Boscardin *et al.*, 2003).. O produto da amplificação foi purificado usando-se o kit PCR Purification Kit (Qiagen) e digerido com as enzimas KpnI e NheI. O produto de digestão foi então purificado em gel de agarose e clonado no plasmídeo pIgSP ao nível dos sítios de clivagem KpnI e NheI. Este plasmídeo contém a região N-terminal da cadeia kappa de camundongo com a seqüência SP da hemaglutinina do vírus influenza (IgSP). Os plasmídeos resultantes foram chamados pIgSP-PTN1, 2 ou 3. Em uma segunda etapa, estes plasmídeos foram utilizados como matrizes para PCR utilizando os iniciadores *XhoI*-pIgSP "forward" e PTN1, 2 ou 3-NheI "reverse". Os produtos da PCR foram purificados como descrito acima e inseridos no vetor pPR-NA38. O plasmídeo

obtido foi inicialmente analisado pelo perfil de digestão por enzimas de restrição e, posteriormente, por seqüenciamento.

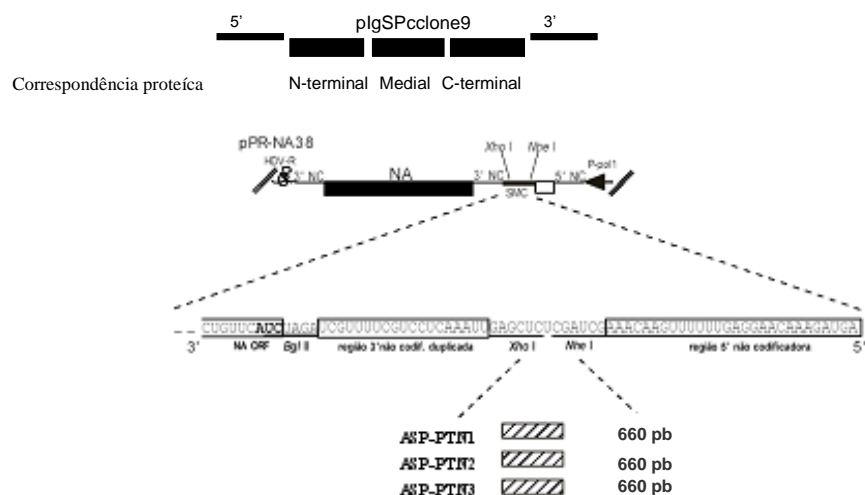


Figura M1: Representação esquemática dos plasmídeos de transferência para síntese dos segmentos dicistrônicos da NA derivados do vírus influenza A/WSN/33. Os plasmídeos contêm o cDNA do segmento recombinante da NA em orientação negativa, no qual a ORF da NA é seguida pela duplicação do promotor 3', um sítio de clonagem XhoI/NheI e o promotor 5' original. Os plasmídeos da série NA35 foram construídos a partir da duplicação da região 3' NC do plasmídeo original obtido do vírus influenza A/WSN/33 (Machado, A. V., Naffakh, N. *et al.*, 2003). Para inserção de uma seqüência "X" segmento heterólogo do pPR-NA35, ela deve ser feita em orientação negativa entre os sítios de restrição das enzimas XhoI e NheI entre a região duplicada 3' NC e a região 5' NC original. O plasmídeo pPR-NA38 é derivado do plasmídeo pPR-NA35 e foi construído para conservar a integridade da extremidade 5' ao longo dos seus últimos 70 nucleotídeos. Isto foi obtido pela inserção de uma duplicação dos últimos 42 nucleotídeos da ORF da NA (quadrado branco) os quais foram inseridos entre o promotor 5' e o "linker" XhoI/NheI (Vieira Machado, Naffakh *et al.*, 2006). A seqüência codificadora do polipeptídeo ASP2 foi dividida em três porções que, adicionadas da seqüência IgSP, foram inseridas em orientação negativa entre os sítios reconhecidos pelas enzimas XhoI e NheI. Os plasmídeos assim obtidos serão chamados: pPR-NA38-ASP2-PTN1, pPR-NA38-ASP2-PTN2 e pPR-NA38-ASP2-PTN3 pb: pares de base; NC: região não-codificadora; NA: neuraminidase

3.4. Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa

Os vírus influenza foram obtidos por genética reversa de acordo com a técnica descrita previamente por Fodor e colaboradores (figura M2) (Pleschka, Jaskunas *et al.*, 1996). Resumidamente, co-culturas sub-confluentes de células HEK 293T e MDCK, cultivadas em meio mínimo modificado por Dulbecco completo (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino

(SFB), foram transfectadas utilizando-se o reagente de transfecção Fugene® 6 (ROCHE). Na referida transfecção, utilizou-se os plasmídeos de transferência codificando o segmento selvagem (pPR-NA) ou recombinante da NA (pPR-NA38-ASP2-PTN1, pPR-NA38-ASP2-PTN2 e pPR-NA38-ASP2-PTN3), bem como os que codificam os demais 7 segmentos do vírus influenza (pPoli -PB1, pPoli-PB2, pPoli -PA, pPoli -NP, pPoli -M, pPoli -NS e pPoli -HA). Esses plasmídeos foram construídos sob controle da região promotora e terminal da RNA polimerase I e a seqüência da ribozima do vírus da hepatite δ (Crescenzo-Chaigne, Naffakh *et al.*, 1999). Juntamente com esses oito plasmídeos, foram usados na transfecção quatro plasmídeos, cuja região promotora está sob controle pela RNA polimerase II, responsáveis pela expressão das três subunidades da polimerase viral e a nucleoproteína NP (pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-PA e pcDNA-NP). Dessa forma, os oito complexos ribonucleoprotéicos foram constituídos nas células transfectadas permitindo a transcrição e a replicação de todos os segmentos virais e a síntese de novos vírions. As células 293T possuem uma eficiência de transfecção muitas vezes maior que as células MDCK. Porém, os vírus gerados se amplificam melhor nas células MDCK, justificando-se o uso da co-cultura. Após 24 horas de incubação a 35°C, as células transfectadas foram incubadas durante mais dois dias em DMEM suplementado 2% SFB. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados para posterior obtenção dos estoques-trabalho.

Os vírus influenza utilizados como controle negativo desta dissertação, chamados vNA38-SAG2, foram obtidos e amplificados como descrito por Machado e colaboradores em 2010. Resumidamente, co-culturas de células HEK 293T e MDCK foram co-transfectadas com quatro plasmídeos de expressão do RNP do vírus influenza, sete plasmídeos dos segmentos do influenza mais o plasmídeo da Neuraminidase bicistrônico carreando a seqüência do antígeno SAG-2 (NA38-SAG2) na presença de Fugene6

Reagent® (ROCHE). As células transfectadas foram mantidas a 35°C, 5%CO₂, e 24 horas pós transfecção o meio de cultura foi trocado por DMEM suplementado com 2% SFB e as células incubadas por mais 48 horas. Os sobrenadantes foram amplificados em MDCK como descrito acima.

Os adenovírus recombinantes carreando a proteína ASP2 e SAG-2 (controle negativo), sob a seqüência promotora da β -galactosidase da *Escherichia coli*, bem como detalhes dos estudos de geração e purificação dos vírus foram obtidos como previamente descrito (Bruna-Romero, Lasarte *et al.*, 1997; Caetano, Bruna-Romero *et al.*, 2006; Machado, Cardoso *et al.*, 2006). Resumidamente, o plasmídeo pJM17 contendo o genoma completo do Adenovírus 5 d1309 modificado para exceder o limite de embalagem (Ad5) e o plasmídeo contendo o inserto recombinante (ASP2 ou SAG-2) foram co-transfectados em células HEK 293A. A recombinação entre os plasmídeos resultou nos adenovírus recombinantes, que foram então propagados em células 293. Houve purificação por centrifugação utilizando-se CsCl e a banda respectiva aos vírus foi dialisada contra Tris 0,01M pH8,0 e os vírus aliquotados foram armazenados a -80°C.

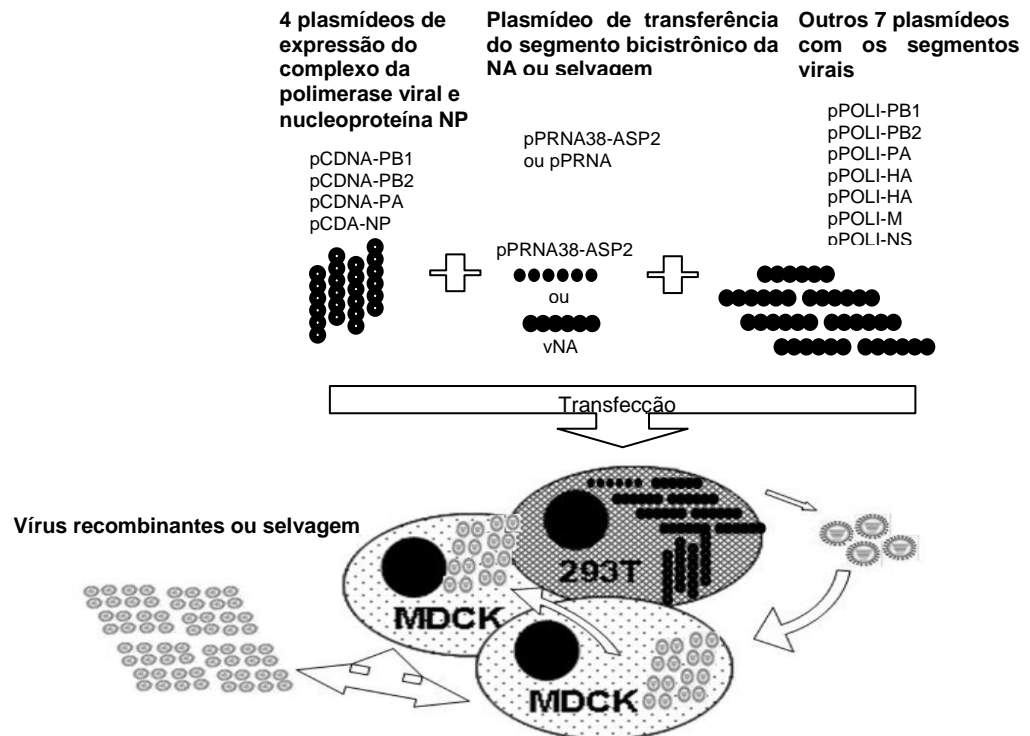


Figura M2: Genética reversa do segmento que codifica a neuraminidase do vírus A/WSN/33 sem vírus auxiliar (“Plasmid driven”) (Fodor, Devenish *et al.*, 1999).

Co-culturas de células HEK 293T e MDCK foram co-transfectadas com o plasmídeo que codifica o segmento da NA selvagem (pPR-NA) ou recombinante (pPR-NA38-ASP2-PTN1, pPR-NA38-ASP2-PTN2 e pPR-NA38-ASP2-PTN3), os demais segmentos do vírus influenza, além dos plasmídeos que permitem a expressão das proteínas do complexo polimerase (pcDNA-PB1, pcDNA-PB2 e pcDNA-PA) e da nucleoproteína NP (pcDNA NP). Nas células HEK 293T em que se encontram os 12 plasmídeos, vírus influenza recombinantes ou selvagem são gerados e liberados das células transfectadas. Esses vírus infectam as células MDCK onde se multiplicam. 72 horas pós-transfecção, os sobrenadantes contendo os vírus são coletados, clarificados e utilizados para posterior caracterização.

3.5. Obtenção dos estoques-trabalho dos vírus influenza gerados

Garrafas de cultura celular contendo camadas subconfluentes de MDCK foram infectadas com 500µL do sobrenadante (SN) da genética reversa para amplificação viral. Após uma hora de infecção a 35°C, meio DMEM completo contendo 2,5 % de soro fetal bovino (SFB) (CUTILAB®) foi adicionado às garrafas. As garrafas foram mantidas a 35°C, 5% de CO₂ por 72 horas. Os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e aliquotados para a realização da primeira e segunda clonagem.

O procedimento das clonagens consiste na infecção de placas de 6 poços contendo camadas subconfluentes de células MDCK com 400µL de diferentes diluições (puro, 10^{-1} e 10^{-2}) das alíquotas amplificadas. Após uma hora de infecção a 35°C, os poços foram recobertos por meio semi-sólido de agarose contendo tripsina, tratada com TPCK, a 0,5ug/mL (Sigma) e as placas mantidas por 72 horas em estufa a 35°C e 5% de CO₂. Das placas de lise formadas, alguns clones são escolhidos, retirados com auxílio de pipetas e adicionados em 1mL de DMEM completo com 2% de SFB. Esse procedimento é realizado duas vezes com cada clone. São chamadas de 1ª e 2ª clonagem. Os clones são mantidos em freezer a -70°C

Os clones obtidos são então amplificados na presença de tripsina tratada com TPCK a 0,5ug/mL (Sigma). São realizadas três etapas de amplificação. Na primeira, 500 µL do DMEM completo sem SFB contendo o clone do vírus a ser amplificado são adicionados em garrafas pequenas (T25). Ao fim de uma hora de incubação a 35°C, o meio foi completado para 3 mL volume final. Nas duas próximas etapas de amplificação do estoque-trabalho, a infecção se dá em garrafas de cultura de tamanho médio (T75), com 2000µL de meio DMEM completo sem SFB contendo vírus em uma quantidade 0,001 m.o.i. (multiplicidade de infecção, indicando que se adicionou aproximadamente 1 vírus para cada mil células presentes na garrafa. Ao fim de uma hora de incubação a 35°C, o meio foi completado para 10 mL volume final mais 0,5ug/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma). Os sobrenadantes são mantidos a -80°C e a quantificação dos estoques verificada por titulação.

A titulação dos estoques-trabalho foi realizada em placas de 6 poços contendo células MDCK com infecções de diluições seriadas dos sobrenadantes clarificados dos vírus sob camada de agarose. 72 horas pós-infecção, as placas são fixadas em formol a 10% e coradas com cristal violeta para contagem. Do número de placas de lise é determinado o título infeccioso em unidades formadoras de placas por mL (PFU).

3.6. Extração do RNA viral, análise por RT-PCR

O RNA viral dos estoques de trabalho foi extraído utilizando-se o reagente TRIZOL (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi suspenso em 20 µL de água livre de RNA, e 5 µL foram usados na reação de transcrição reversa pela Transcriptase Reversa (RT, PROMEGA) de Vírus da Leucemia Moloney Murina (M-MLV) e usando-se o iniciador senso positivo uni-L (5'- AGCAAAGCAGG-3') cuja seqüência corresponde aos últimos 12 nucleotídeos 3' N-terminal conservados de todos os segmentos virais do influenza (Robertson, 1979). As amplificações por PCR foram realizadas usando-se iniciadores (NA/+1085 and NA/NC/5') que permitiram a amplificação de um fragmento que compreende a região contendo a seqüência heteróloga, segundo o protocolo de amplificação previamente descrito (Machado, A. V., Naffakh, N. *et al.*, 2003). Os segmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% e visualizados com corante brometo de etídio. Por fim, os cDNAs dos segmentos PTN1, PTN2 e PTN3 da ASP2 extraídos do RNA viral foram submetidos a seqüenciamento.

3.7. Protocolo de imunização em camundongos

Para ensaios de imunização, machos de camundongos C57BL/6 foram submetidos a dois protocolos de indução e reforço da resposta imune. No protocolo homólogo, para inoculação de indução ("prime") nos camundongos, 10^8 pfu de adenovírus controle (Ad-SAG2) ou com o adenovírus recombinante expressando a proteína ASP2 (rAd-ASP2) foram administrados pela via subcutânea na base da cauda dos animais. No protocolo heterólogo, os animais foram anestesiadas com uma mistura de Ketamina (15 mg/kg) e Xilazina (0,6 mg/kg) e inoculadas com dose de 10^3 pfu de cada vírus em 25µL

de PBS estéril via intranasal. A imunização de reforço (“boost”) foi dada pela via subcutânea com 10^8 PFU de adenovírus recombinantes Ad-CTrl ou Ad-ASP2 nos dois protocolos, quatro semanas após a primeira imunização.

3.8. ELISA

O sangue dos camundongos imunizados foi coletado através do plexo orbital quatorze dias após a imunização de reforço. Anticorpos contra a proteína ASP-2 foram detectados por ELISA como previamente descrito (Giraldo, Cannizzaro *et al.*, 2000). Resumidamente, placas (Maxisorp®, NUNC) foram recobertas com a proteína ASP-2 recombinante, His65KDa (Araujo, De Alencar *et al.*, 2005) em 0,2M de carbonato de sódio pH 9,6 e incubadas a 4°C por 18 horas. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% e leite desnatado a 5% (tampão de bloqueio) por duas horas à temperatura ambiente. Os soros dos camundongos foram diluídos (1/50) em tampão de bloqueio e adicionados nas placas, seguido de incubação por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas exaustivamente com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) antes de serem incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (SIGMA) a 1:2000 durante uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T e posteriormente com PBS sem Tween-20, antes de serem reveladas com o 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, SIGMA). Após a interrupção da reação da reação, as densidades óticas de cada reação foram lidas a 450nm em espectrofotômetro (Molecular Dynamics).

3.9. Análise da produção de anticorpos específicos no soro de animais imunizados

3.9.1 *Eletroforese em gel de poliacrilamida*

A proteína recombinante ASP2 (His65KDa) purificada foi preparada em tampão de amostra a 0,5 µg para gel de proteína SDS-PAGE contendo 2-mercaptoetanol. O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de acrilamida, 0,1% de SDS em tampão 1,5M Tris-HCl, pH 8,8, e um gel de concentração contendo 4% de acrilamida, 0,1% de SDS em tampão 1M Tris-HCl, pH 6,8. A proteína foi dissolvidas em tampão de amostra (0,35M Tris-HCl pH 6,8; 0,35M SDS; 30% glicerol; 6% β - mercaptoetanol; 0,175mM azul de bromofenol) e aquecidas a 100°C por 5 min. para a desnaturação e o rompimento das pontes dissulfeto. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema vertical de eletroforese contendo tampão de corrida (0,025M Tris-HCl, 0,192M glicina, pH 8.3, 0,1% de SDS), sob voltagem constante (100V) por 2h. Após a migração das proteínas o gel foi corado para visualização. As massas moleculares das proteínas analisadas foram mensuradas utilizando-se padrões de massas moleculares (m.m.) conhecidas (BenchMark, Invitrogen).

3.9.2 *Western Blot*

As bandas protéicas do gel de eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) com poros de 0,45µm, por 1h30 a 300 mA. Após a eletrotransferência as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau S, para verificar a transferência da proteína do gel para a membrana. Em seguida, a membrana foi tratada com tampão bloqueador [5% de SFB (CUTILAB) em PBS 1x contendo

0,05% Tween 20 (PBST)] por 1h, à temperatura ambiente, para bloquear os sítios livres da membrana, sendo em seguida, lavada em PBST, três vezes, por 10min. As membranas foram incubadas com soro de camundongos imunizados com vírus recombinantes por duas horas. Novamente as membranas foram lavadas com PBST, três vezes, por 10 min. e colocadas em contato com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (Sigma) diluído na solução bloqueadora na proporção de 1:8000. A membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente. A reação de quimioluminescência foi visualizada com o reagente amplificador de quimioluminescência (GE HEALTHCARE), seguido de revelação em filme fotográfico (KODAK).

3.10. Análise de imunospots ligados a enzimas (ELISPOT)

Três semanas após a imunização de reforço, os camundongos foram eutanasiados e o baço retirado. O número de células T específicas para ASP2 foi determinado pela técnica de ELISPOT, como previamente descrito (Machado, Cardoso *et al.*, 2006). Resumidamente, placas com fundo de nitrocelulose de 96 poços (Millipore) foram incubadas overnight a 4°C com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (clone R4-6A2; Becton Dickson) em PBS estéril. As placas foram então lavadas e bloqueadas por duas horas com DMEM suplementado com 10% SFB. A preparação das células do baço utilizadas foi em DMEM a 10% SFB e IL-2 recombinante (100 U/mL). Durante 20 horas, as células, na concentração de 1×10^6 células por mL, foram estimuladas na presença do peptídeo H-2K^b da ASP-2, VNHRFTLV (PA8, a.a. 552-559) a 37°C, 5% CO₂. Após a incubação, as placas foram extensivamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IFN- γ de camundongo biotilado (XMG1.2 Becton Dickson) e, finalmente, com estreptavidina marcada com

peroxidase. As reações ocorreram na adição de substrato de peroxidase aos poços (50 mM Tris-HCL, pH 7.5) contendo 3,3'-diaminobenzidinatetrahidrocloro (1mg/mL) e solução de peróxido de hidrogênio a 30% (1 µL/mL). A reação foi interrompida em água corrente. Os spots foram contados através de um programa de informática chamado S5 Core ELISPOT Analyser (CTL).

3.11. Ensaio de Proteção

Decorridas 4 semanas após a imunização de reforço os animais foram desafiados para o ensaio de proteção. Para tanto, os animais foram inoculados via intraperitoneal com 1000 parasitos obtidos no pico da infecção do sangue de camundongos Suíços infectados. O monitoramento da parasitemia foi realizado em diferentes dias pós-infecção de acordo com a técnica descrita por Brener (Brener, 1962) e a mortalidade foi acompanhada diariamente e descrita cumulativamente num certo período de tempo.



Figura M3: Linha do tempo dos experimentos de imunização. Quatro semanas após a dose de indução (“prime”) é dada a dose de reforço (“boost”) da resposta imune como descrito acima. O soro dos animais é obtido 14 dias pós “boost” para dosagem de anticorpos séricos específicos (tópico 3.8). Três semanas pós-“boost” os animais foram eutanasiados e os baços coletados para realização do ELISPOT (tópico 3.9). Por fim, os animais foram desafiados 4 semanas após a imunização de reforço, segundo a descrição na seção 3.10 da metodologia, e realizado o acompanhamento da parasitemia até sua redução e mortalidade durante 40 dias.

3.12. Análises estatísticas dos dados

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism v5.0. Para a comparação entre os grupos nos resultados de ELISA e ELISPOT foi utilizado o teste de Tukey na análise “One-Way Anova”. Para análise da parasitemia foi realizado o teste de Bonferoni também dentro da análise “Anova”. O teste de “LogRank” foi utilizado para comparar a sobrevivência dos camundongos após o desafio com *T. cruzi*. As diferenças mínimas consideradas como significativas foram de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa

Os clones de vírus influenza A recombinantes carreando o segmento dicistrônico da neuraminidase, contendo além da seqüência da NA, as seqüências gênicas que expressam as porções N-terminal, medial e C-terminal da proteína de superfície amastigota 2 (ASP2) do *Trypanosoma cruzi* chamados vNA38-ASP2-PTN1 (Flu-ASP2-PTN1 ou Flu-PTN1), vNA38-ASP2-PTN2 (Flu-ASP2-PTN2 ou Flu-PTN2) e vNA38-ASP2-PTN3 (Flu-ASP2-PTN3 ou Flu-PTN3), foram gerados utilizando-se a técnica de transfecção por 12 plasmídeos conforme previamente descrita por Fodor et al. (Fodor, Devenish *et al.*, 1999). Após uma etapa de amplificação, seguiu-se a titulação de 1ª e 2ª clonagens. Foram observadas placas de lise das quais clones foram selecionados. Desses clones, fez-se o estoque de trabalho e a caracterização fenotípica. Os vírus obtidos apresentaram o fenótipo ligeiramente alterado que consistiu em placas de lise menores do que aquelas obtidas após a infecção com o vírus selvagem (vNA) em células MDCK (figura R1). O título dos vírus recombinantes obtidos foi inferior ao do vírus selvagem em todas as passagens ao menos em um \log_{10} .

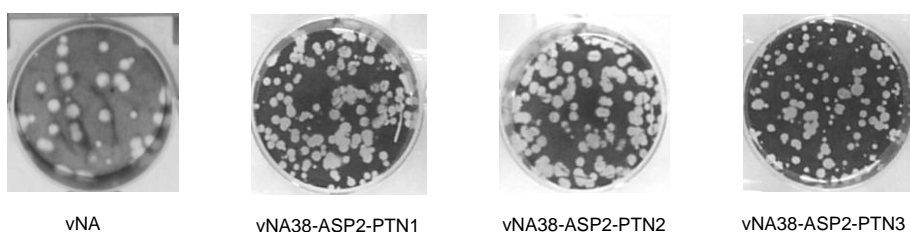


Figura R1: Placas de lise resultantes da infecção de células MDCK por vírus recombinantes vNA38-ASP2-PTN1, vNA38-ASP2-PTN2 e vNA38-ASP2-PTN3 ou selvagem vNA sob camada semi-sólida de agarose. Nota-se que células infectadas com o vírus selvagem vNA possuem placas de lise ligeiramente maiores que as placas infectadas com os clones dos vírus recombinantes gerados.

4.2. Caracterização genotípica dos vírus influenza recombinantes gerados

O RNA dos vírus selvagem e recombinantes foi extraído e foi realizada a PCR-Transcriptase Reversa (RT-PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores NA/+1085 e NA/NC/5' que permitem a amplificação do segmento inserido. A análise foi realizada em gel de agarose 1% com brometo de etídio. Conforme mostra a figura R2, o tamanho dos amplicons obtidos na PCR foi igual ao obtido a partir do plasmídeo utilizado na geração dos vírus. Esses resultados indicam a estabilidade genética dos vírus vNA38-ASP2-PTN1, vNA38-ASP2-PTN2 e vNA38-ASP2-PTN3 em cultura celular, uma vez que estes mantiveram a seqüência heteróloga mesmo após as sucessivas passagens em células MDCK. Por fim, o cDNA do segmento dicistrônico da NA extraído dos vírus foi submetido a seqüenciamento. Os insertos se mantiveram na conformação correta e sem mutações indesejadas, indicando estabilidade genética dos vírus mesmo após várias passagens em cultura celular. O modelo de produção desses vírus com a NA dicistrônica se mostrou estável geneticamente diversas vezes, com insertos de variados tamanhos, e o tamanho limite de obtenção de títulos viáveis foi o de 660 nucleotídeos. (Vieira Machado, Naffakh *et al.*, 2006; Machado, Caetano *et al.*, 2010).

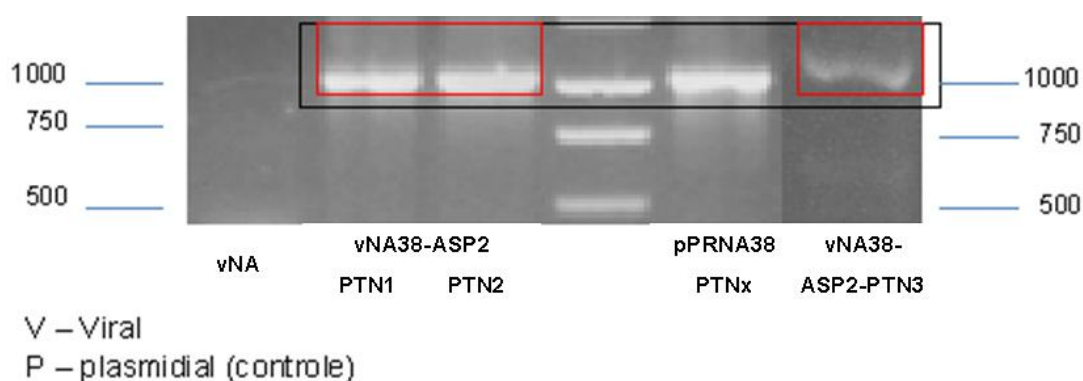


Figura R2: Análise do inserto gênico da NA recombinante em gel de agarose 1%. Amostras do RNA total de clones dos vírus recombinantes vNA38-ASP2-PTN1, vNA38-ASP2-PTN2 e vNA38-ASP2-PTN3 foram submetidas à RT-PCR. O nome do segmento correspondente ao vírus foi abreviado pelo inserto recombinante que carregam (PTNs) ou selvagem (NA). O tamanho dos fragmentos nos clones analisados (estoques-trabalho) se mostra idêntico ao do plasmídeo que

originou o inserto, com cerca de 1100 pares de base (660pb do inserto recombinante mais regiões que flanqueiam a região amplificada). MM: marcador de massa molecular; PB: pares de base.

4.3. Indução de resposta imune heteroespecífica anti-ASP2

A indução de resposta imune humoral específica anti-ASP2 foi analisada nos camundongos primo-imunizados com vírus influenza recombinantes para as porções N-terminal, medial e C-terminal da ASP2 e submetidos a uma imunização de reforço com adenovírus recombinantes carreando o antígeno completo ASP2 segundo o protocolo descrito na seção 3.7 da metodologia.

4.3.1. Análise da indução da produção de Imunoglobulinas específicas

A presença de anticorpos específicos anti-ASP2 no soro dos camundongos imunizados foi detectada pela técnica de ELISA 14 dias após a imunização de reforço. Os resultados apresentados na figura R3 demonstram por densidade óptica que o nível de anticorpos anti-ASP2 foi significativamente maior nos camundongos imunizados no protocolo heterólogo vNA38-ASP2-PTN3 /AdASP2 em comparação ao controle vNA38-CT/AdCT. Além disso, os níveis de imunoglobulinas específicas aumentaram de forma significativa em relação ao grupo de animais que receberam uma única imunização com AdASP2. Resultados semelhantes foram observados através da técnica de Western Blot utilizando-se os soros individuais dos camundongos C57BL/6. O título de anticorpos dos grupos Flu-PTN3/AdASP2 e AdASP2/AdASP2, que receberam dois vírus recombinantes, foi maior do que os animais que receberam apenas uma imunização com AdASP2, como evidenciado na figura R4, confirmando o resultado do ELISA.

C57/B6

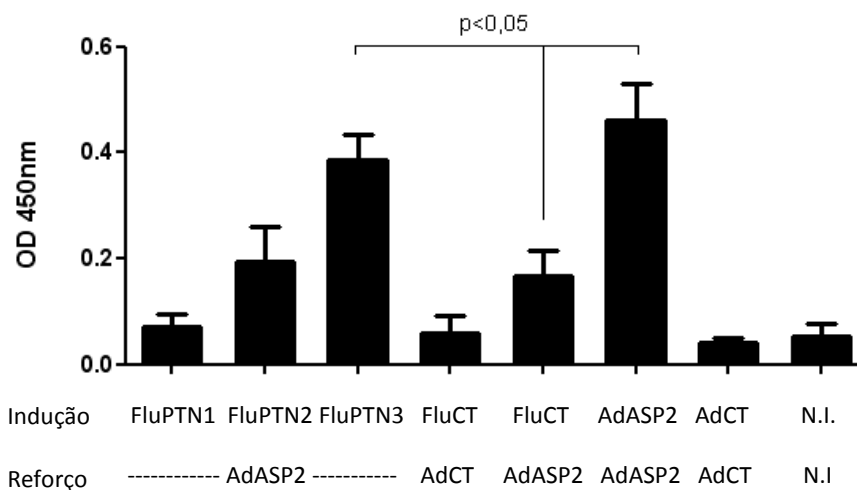


Figura R3: Resposta imune humoral anti-ASP2 no soro de camundongos imunizados. Camundongos C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas foram primo-inoculados com 10^3 PFU via intranasal de vírus influenza recombinantes carregando diferentes porções da proteína ASP2 ou SAG2 (CT) ou adenovírus recombinante a 5×10^7 PFU via subcutânea carregando o antígeno ASP2 ou SAG2 (CT). Quatro semanas depois, os camundongos receberam a imunização de reforço com adenovírus carregando ASP2 ou SAG2(CT) usando a mesma via e quantidade da primeira imunização. Quatorze dias após a última imunização o sangue dos camundongos foi retirado pelo plexo orbital e o soro obtido por centrifugação. Os resultados são representativos de dois experimentos de imunização diferentes usando a diluição do soro a 1:50 (n=4). Títulos comparáveis são obtidos nos grupos imunizados indução-reforço com Ad-ASP2/AdASP2 e influenza carregando a porção carboxi-terminal da proteína ASP2, vNA38-ASP2-PTN3, aqui chamado FluPTN3, como indução e AdASP2 como imunização de reforço. Os camundongos foram imunizados como descrito na seção 3.7 em materiais e métodos.

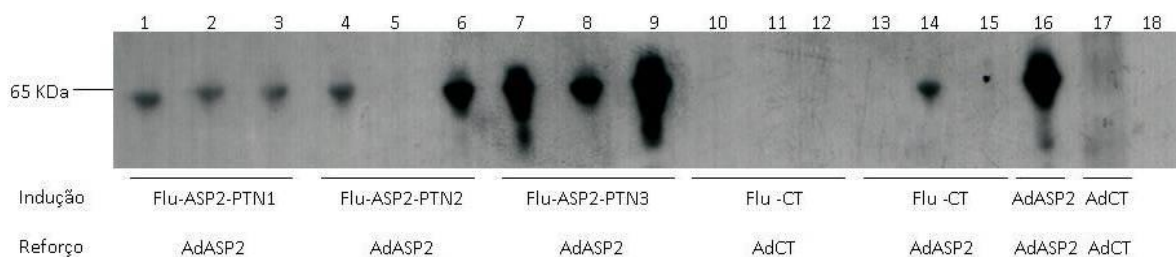


Figura R4: Western blot do soro dos camundongos imunizados com vírus recombinantes. Soro de camundongos C57BL/6 machos foram diluídos em tampão de bloqueio na proporção 1:300 e testados contra 0,5 µg de proteína recombinante ASP2 (65KDa). Os camundongos imunizados com Flu-ASP2-PTN3 como indução, e AdASP2 como reforço (linhas 7-9) apresentaram um aumento visível na produção de anticorpos específicos comparável ao protocolo homólogo AdASP2/AdASP2. Os camundongos foram imunizados como descrito na seção 3.7 em materiais e métodos.

4.3.2. Análise de resposta imune celular específica anti-ASP2

A capacidade do protocolo heterólogo de indução e reforço da resposta imune em induzir uma resposta imune celular específica para ASP2 foi demonstrada pela técnica de ELISPOT, como descrito na seção 3.10 da metodologia. Resumidamente, esplenócitos dos camundongos imunizados foram obtidos três semanas após a imunização de reforço e estimulados *ex vivo* com o epítipo imunodominante VNHRFTLV (PA8), presente apenas na porção carboxi-terminal da proteína ASP2 (PTN3) quando apresentado no haplótipo de MHC de classe I H2K^b presente na linhagem de camundongos C57BL/6. Como demonstrado na figura R5, um aumento significativo no número de células T produtoras de IFN- γ específicas para PA8 pôde ser visto nos grupos primo-imunizados com os vírus influenza recombinantes carregando as porções medial e carboxi-terminal da proteína ASP2 seguido de imunização de reforço com AdASP2 ou no grupo que recebeu duas imunizações com AdASP2. É importante ressaltar que apenas uma imunização com AdASP2 foi o suficiente para induzir alta quantidade de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas para o epítipo PA8, apesar de que um aumento significativo do número de células específicas ocorreu nos grupos citados. Todos os grupos que receberam ao menos uma imunização com AdASP2 estimularam um número de células T CD8 produtoras de IFN- γ significativo em relação aos grupos imunizados com os vírus controles.

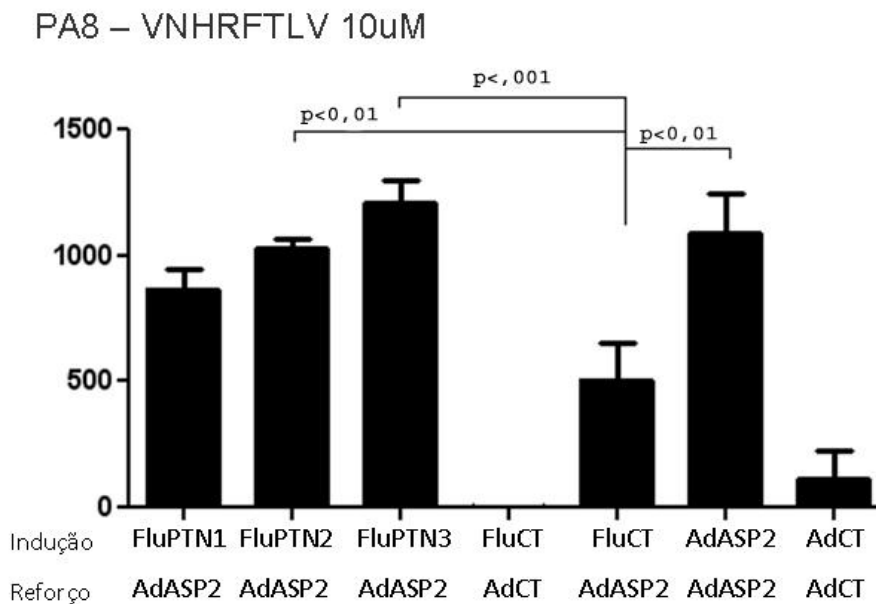


Figura R5: Resposta imune celular induzida pelos vírus recombinantes em número de spots. Esplenócitos obtidos de camundongos C57BL/6 (n=3) imunizados 21 dias após a imunização de reforço foram submetidos à técnica de ELISPOT sob estímulo do epítipo imunodominante para MHC classe I da ASP2 para o haplótipo dessa linhagem VNHRFTLV (PA8). Um efeito de “boost” significativo foi observado no número de “spots” em dois grupos imunizados com influenza recombinantes carregando as porções medial e carbóxi-terminal da ASP2 (FluPTN2 e FluPTN3) seguidos de imunização de reforço com adenovírus recombinantes carregando ASP2 e no grupo que recebeu duas imunizações com estes vírus (AdASP2) em se comparando com o grupo que recebeu apenas uma imunização com AdASP2. Por outro lado, nota-se que todos os grupos que receberam ao menos uma imunização com AdASP2 apresentaram um número significativo de células produtoras de IFN- γ estimuladas com PA8 em relação aos controles. Os camundongos foram imunizados como descrito na seção 3.7 em materiais e métodos e os resultados são representativos de dois experimentos de imunização diferentes.

4.4. Ensaio de proteção em camundongos C57BL/6 imunizados e desafiados com 1000 parasitos da cepa Y do *T. cruzi*

A fim de verificar se a resposta imune celular observada nos grupos imunizados seria capaz de proteger os animais frente ao desafio utilizando-se carga parasitária letal de *T. cruzi*, os camundongos C57BL/6 dos grupos imunizados que apresentaram as melhores respostas humoral e celular (Flu-ASP2-PTN3/AdASP2 e AdASP2/AdASP2), um grupo imunizado apenas uma vez com AdASP2 e seus respectivos controles foram inoculados via

intraperitoneal com 1000 parasitos da cepa Y quatro semanas após a imunização de reforço.

Os resultados da figura R6A mostram que resposta imunológica humoral e celular dos protocolos de imunização com os vírus recombinantes foram capazes de reduzir a carga parasitária de forma significativa em relação aos controles no pico parasitário (dia 9) e no primeiro dia de queda (dia 10). Além disso, como observado na figura R6B, os camundongos dos grupos controles morreram com exceção de um. Fica evidente que a resposta imunológica induzida por apenas uma imunização com AdASP2 demonstrada no ELISA e ELISPOT foi capaz de proteger os camundongos desafiados, visto que de todos os grupos que receberam uma imunização com esse vírus apresentou proteção significativa em relação aos grupos imunizados com os vírus controles FluCT/AdCT e AdCT/AdCT ($p < 0,001$ em ambos os casos). Resta saber se esta única dose de imunização seria persistente caso utilizássemos um modelo susceptível à infecção, e caso o desafio fosse realizado 14 semanas após a última imunização, longe da fase efetora. Alguns trabalhos já mostraram a baixa eficácia da utilização de apenas uma imunização com adenovírus para estimular células de memória capazes de proteger contra infecções (Machado, Cardoso *et al.*, 2006; Hovav, Panas *et al.*, 2007; Reyes-Sandoval, Berthoud *et al.*, 2009).

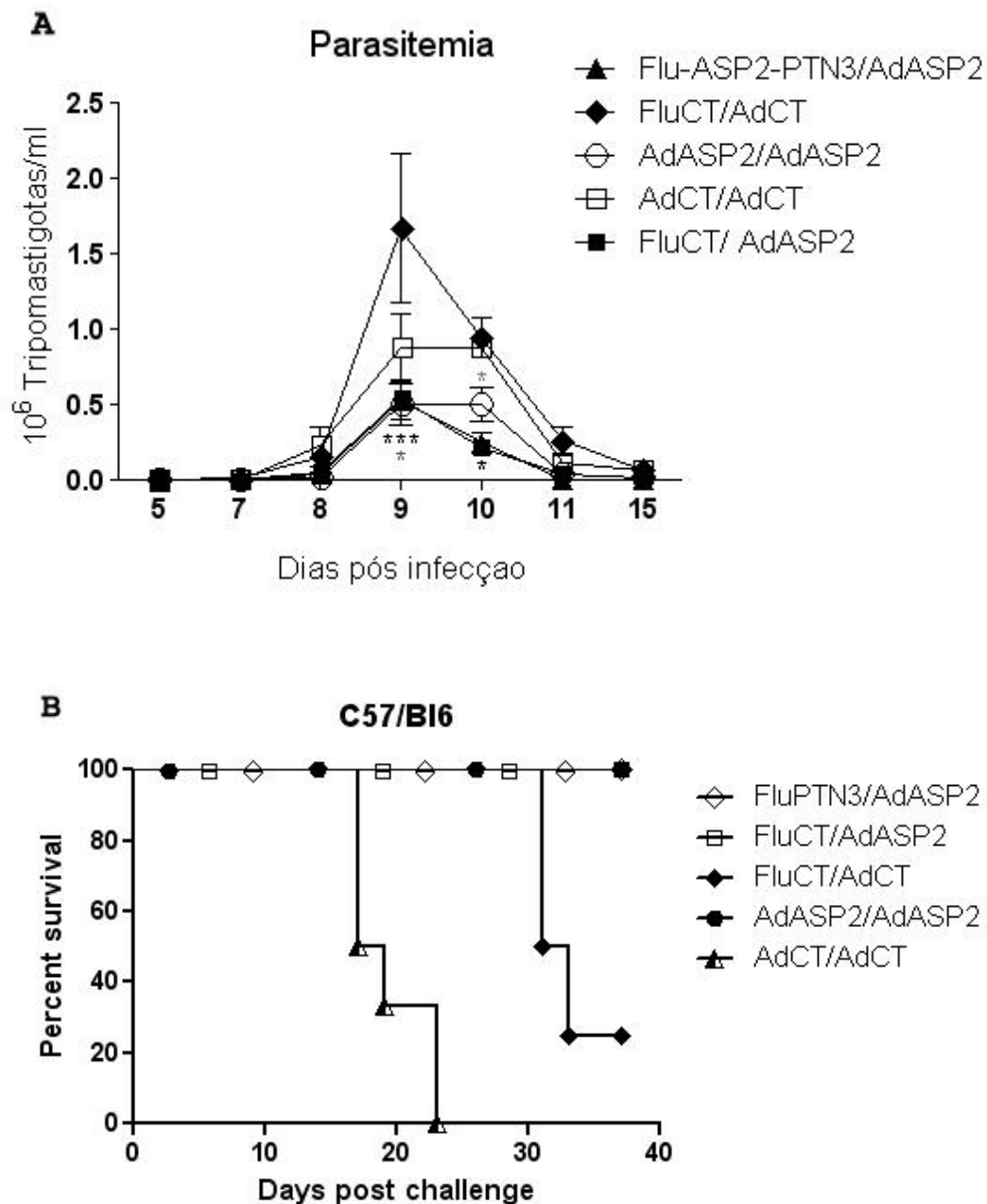


Figura R6: Análise de proteção frente desafio com *T cruzi* pelos grupos imunizados. Os camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na seção 3.7 em materiais e métodos. Os grupos imunizados receberam desafio via intraperitoneal com 1000 parasitos da cepa Y de *T. cruzi*. A) A parasitemia de cada grupo está representado como erro padrão (n=4). Asteriscos pretos denotam que o grupo imunizado com Flu-ASP2-PTN3 seguido de imunização com AdASP2 e o grupo imunizado com uma dose de AdASP2 tiveram parasitemia significativamente menor que animais imunizados com FluCT seguido de AdCT (p<0,001). Asteriscos cinzas denotam que o grupo que recebeu duas imunizações com AdASP2 teve redução significativa de parasitemia (p<0,01) se comparado com seu controle que recebeu duas imunizações com AdCT. B) O gráfico demonstra a curva Kaplan-Meier para sobrevivência de camundongos. Todos os camundongos imunizados com Flu-ASP2-PTN3/AdASP2 (n=6), apenas AdASP2 (n=4) e AdASP2/adASP2 (n=6) sobreviveram mesmo após 90 dias após o desafio. Os animais do grupo controle AdCT/AdCT (n=6) todos morreram, e apenas um animal do grupo imunizado com FluCT/AdCT (n=4) sobreviveu.

5. DISCUSSÃO

Através da técnica de genética reversa, três vírus influenza A recombinantes foram gerados carreando segmentos dicistrônicos da NA, contendo além da seqüência da NA, as seqüências gênicas que expressam as porções N-terminal, medial e C-terminal da proteína de superfície amastigota 2 (ASP2) do *Trypanosoma cruzi*. Os vírus gerados apresentaram, em células MDCK placas de lise ligeiramente menores que o vírus controle vNA (Figura R1). Isso se deve possivelmente a uma alteração na expressão da proteína viral neuraminidase, uma vez que seu segmento é dicistrônico, e, portanto, além da neuraminidase viral, o segmento heterólogo também é expresso, causando um desbalanço no número de proteínas virais em relação ao vírus selvagem. (Vieira Machado, Naffakh *et al.*, 2006). Uma vez que a função da neuraminidase é a clivagem do ácido siálico para saída dos vírus das células, uma menor produção desta proteína acarretaria em menores placas de lise. Ainda, havia sido previamente demonstrado que o segmento dicistrônico da neuraminidase pode afetar a multiplicação dos vírus recombinantes através de uma menor expressão da NA em comparação aos vírus selvagens, possivelmente havendo competição da região 3' duplicada do promotor interno com o promotor 3' externo pelo pareamento com a região 5', necessário para transcrição dos segmentos (Machado, A., Naffakh, N. *et al.*, 2003). Vírus com níveis diminuídos da expressão da NA apresentaram propriedades de crescimento alteradas (Fodor, Palese *et al.*, 1998) *in vitro* e eram atenuados em camundongos (Solorzano, Zheng *et al.*, 2000). Nossos vírus apresentaram tal fenótipo atenuado em células, com possibilidade de eles serem atenuados em camundongos.

A imunização utilizando os vírus recombinantes carreando ASP-2 em protocolos com duas imunizações alcançaram bons níveis de anticorpos séricos em camundongos C57BL/6. Evidências sugerem que a habilidade de redução da parasitemia e proteção na fase aguda pelos anticorpos são

concomitantes com eventos mediados por células. Em camundongos susceptíveis, é sugerido que os anticorpos podem mudar o curso da infecção direcionando os parasitos para células que reconhecem organismos opsonizados e as ajuda na destruição dos mesmos através de eventos envolvendo células ativadas por citocinas ou seus produtos de secreção (Umekita, Takehara *et al.*, 1988; Umekita e Mota, 2000). Em nosso projeto, os dados de indução de anticorpos específicos serviram também como verificação de produção da proteína heteróloga induzida pelos vírus recombinantes *in vivo*.

A resposta imune mediada por células T é crítica para o controle da infecção. Isso foi bem demonstrado visto que a depleção de linfócitos T CD4 e CD8 resulta em descontrole da parasitemia e fatalidade conseqüente à infecção (Rodrigues, M. M., Boscardin, S. B. *et al.*, 2003; Miyahira, 2008). No controle da fase aguda é crítica a ativação de macrófagos mediada por citocinas para destruição intracelular dos parasitos. Camundongos deficientes para IL-10 (IL-10), por exemplo, apresentam menor parasitemia e maior produção de IFN- γ e NO ante a infecção com a cepa Y. Outro dado interessante é que o tratamento de camundongos selvagens com anti-IL-12, anti-IFN γ e anti-TNF resultaram em aumento de parasitemia, mostrando a importância destas citocinas produzidas tanto pelo sistema imune inato quanto adquirido (Abrahamsohn e Coffman, 1996). Em infecção com a cepa Colombiana, o papel do IFN- γ , INOS e IL-12 também foi bem demonstrados em camundongos KO, principalmente no controle da parasitemia no tecido cardíaco, inflamação e resistência. Esplenócitos de camundongos deficientes em IL-12 produzem quantidades muito menos de IFN- γ , sugerindo uma relação direta entre os dois (Michailowsky, Silva *et al.*, 2001). Em um modelo utilizando-se uma cepa não virulenta de *T. cruzi* também foi demonstrado o papel crucial do IFN- γ , visto que a falta desta citocina altera completamente o perfil sintomático, parasitemia tecidual, inflamação e mortalidade em

camundongos C3H/HePAS. O efeito protetor do IFN- γ parece ser independente de NO, visto que os camundongos iNOS KO não demonstraram aumento de parasitemia em mortalidade nesse modelo. Ainda no mesmo modelo, camundongos deficientes em células T CD4 ou CD8 apresentaram perfil intermediário, com maior dano tecidual, porém sem alteração da carga parasitária (Marinho, Nunez-Apaza *et al.*, 2007). Esses experimentos sugerem de forma consistente que a citocina IFN- γ advinda de diversas fontes é a principal determinante no controle da infecção, proteção e reativação da fase aguda na infecção com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental.

Nossos resultados indicam que os linfócitos T CD8 produtores de IFN- γ foram prontamente ativados em todos os protocolos de imunização com os vírus influenza recombinantes carreando porções da proteína ASP-2 seguidos de imunização com AdASP2, bem como o grupo que recebeu duas imunizações com AdASP2. Concomitante, o grupo imunizado apenas com adenovírus carreando o segmento ASP-2 foi capaz de estimular linfócitos CD8 específicos em quantidades significativas em relação ao controle. Esses resultados endossam os resultados de Alencar e colaboradores, que mostrou que uma única imunização com Adenovírus carreando a ASP2 foi capaz de alcançar 100% de citotoxicidade *in vivo* na presença do peptídeo VNLHRFTLV (PA8) em camundongos C57BL/6 antes do desafio.

De acordo com os resultados de proteção apresentados, vírus influenza recombinantes, carreando um inserto heterólogo na neuraminidase dicistrônica, em conjunto com adenovírus recombinantes são capazes de induzir respostas imunológicas celular e humoral protetoras quando usados na estratégia de imunização de indução-reforço (prime-boost) contra doença de Chagas. Adenovírus recombinantes carreando o inserto da ASP2 já foram caracterizados como bons vetores de imunização em protocolos de indução e reforço anteriores (Machado, Cardoso *et al.*, 2006; Tzelepis, De Alencar *et al.*,

2008; De Alencar, Persechini *et al.*, 2009). Não houve diferença significativa na resposta imunológica induzida em se comparando os protocolos homólogo e heterólogo no que se refere à indução de anticorpos e estimulação de células T CD8⁺ específicas. Fica evidente, porém, um potente efeito de “boost” foi observado tanto na produção de anticorpos quanto na resposta celular em se comparando a imunização com o Influenza recombinante como prime e adenovírus como boost com apenas uma imunização de adenovírus recombinante. Esses resultados corroboram com os de Hovav e colaboradores, que mostraram o impacto de uma imunização de reforço nas células efetoras apresentando diversos fenótipos imunológicos dependendo dos vetores usados, e se o protocolo é homólogo e heterólogo (Hovav, Panas *et al.*, 2007).

O modelo C57BL/6 é um bom modelo para estudo de infecções parasitárias que exigem um perfil Th1, porém torna difícil evidenciar as possíveis diferenças entre os protocolos de vacinação e capacidade das células induzidas por eles de protegerem os animais frente à infecção por *T. cruzi*, visto que é considerada uma linhagem naturalmente resistente à infecção com esse parasito (Galvao Da Silva, Jacysyn *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que uma única imunização com adenovírus recombinante expressando um epítipo CD8⁺ de *T. cruzi* foi capaz de induzir imunidade protetora em camundongos C57BL/6 (Miyahira, Takashima *et al.*, 2005). Tais dados nos levam a crer que para avaliar melhor os resultados imunológicos observados em nossos protocolos de imunização em relação à proteção, o estudo dos protocolos de vacinação em uma linhagem susceptível seria necessário.

A utilização de vírus recombinantes como vetores vacinais em modelo murino tem resultados promissores em inúmeras doenças infecciosas. Nosso grupo já demonstrou a eficácia da utilização de adenovírus e influenza recombinantes contra Toxoplasmose e do adenovírus carreando o antígeno

de superfície amastigota (ASP-2) e o antígeno Trans-sialidase (TS) do *T. cruzi* em Balb/c e C57BL/6 contra a doença de Chagas (Caetano, Bruna-Romero *et al.*, 2006; Machado, Cardoso *et al.*, 2006; Machado, Caetano *et al.*, 2010). Ademais, outros grupos demonstraram ótimos resultados em vacinação com influenza e MVA recombinantes contra a infecção pelo HIV e Malária em vários trabalhos diferentes (Gonzalo, Rodriguez *et al.*, 1999; Haglund, Leiner *et al.*, 2002; Gherardi, M. M., Najera, J. L. *et al.*, 2003; Gonzalez-Asequinolaza, Nakaya *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrada a capacidade protetora do vírus Sendai recombinante carreando o antígeno ASP-2 contra a infecção pelo *T. cruzi* em C57BL/6 (Duan, Yonemitsu *et al.*, 2009).

O crescente aumento de alternativas de protocolos e vetores de imunização vem demonstrar a necessidade de aprimoramento de outros vetores virais diferentes, porque independente dos resultados promissores de cada vetor individualmente, vacinações sucessivas poderiam gerar imunização prévia contra o vetor e diminuição da eficácia vacinal. Esse é o caso do adenovírus tipo 5, que possui alta prevalência em humanos (Abbink, Lemckert *et al.*, 2007). Apesar de o adenovírus recombinante do tipo 5 ser capaz de induzir respostas imunológicas mais potentes quantitativamente do que qualquer outro vetor viral quando imunizado individualmente, tentativas são feitas para solucionar o problema da resistência prévia a este vírus. Tais como outra rota de inoculação; uso de outros adenovírus de tipos raros em humanos; modificação de epítomos imunodominantes de células B para evitar a apresentação cruzada a nível de anticorpos e; uso de adenovírus não humanos. Mesmo com resultados bons em roedores e primatas não humanos, nenhum tipo raro de adenovírus foi tão imunogênico quanto o adenovírus tipo 5 recombinante (Fitzgerald, Gao *et al.*, 2003; Pinto, Fitzgerald *et al.*, 2003; Lemckert, Sumida *et al.*, 2005; Ophorst, Radosevic *et al.*, 2006; Roberts,

Nanda *et al.*, 2006; Thorner, Lemckert *et al.*, 2006; Croyle, Patel *et al.*, 2008; Liu, Ewald *et al.*, 2008).

Em relação à prioridade de uso em vacinação de um vetor viral muito eficaz, como o Ad5, a doença de Chagas provavelmente iria perder em prioridade para doenças como malária, HIV e câncer. Assim, os vírus influenza recombinantes gerados e estudados neste trabalho, sendo capazes de estimular uma resposta imunológica adequada para um vetor de vacinação, se tornam uma alternativa ao uso continuado do adenovírus recombinante como vetor de imunização. E ainda indicam a viabilidade do uso desses vírus influenza para estudos de imunização heterólogas de indução e reforço da resposta imune em combinação com outros vetores e vias de inoculação, como o MVA e vacinas de DNA. Recentemente, em nosso laboratório, conseguimos construir outros vírus influenza recombinantes atenuados truncados no gene da neuraminidase, podendo haver a inserção de insertos maiores, como o antígeno ASP-2 inteiro, tornando melhores indutores de resposta celular auxiliar. Tais vírus foram construídos sob uma plataforma de vírus selvagem diferente (PR8/34) do vNA que usamos no presente estudo (WSN/33), indicando inclusive a possibilidade da utilização de duas imunizações com vírus influenza recombinantes em um mesmo protocolo de vacinação.

6. CONCLUSÕES

Construímos e caracterizamos vírus influenza recombinantes carreando as porções N-terminal, medial e C-terminal do antígeno ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*. Os vírus gerados se mostraram estáveis geneticamente em cultura celular. Quando combinados em protocolo heterólogo de imunização com adenovírus recombinantes carreando ASP2, a expressão do segmento heterólogo através da infecção pelo vírus recombinantes foi responsável pela indução de potente de resposta imunológica celular específica anti-ASP2 em camundongos. A estimulação imunológica resultante da imunização com o protocolo heterólogo foi capaz de proteger 100% dos camundongos frente a desafio com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Ao ser desenvolvido, nosso projeto apresentou algumas limitações. Um exemplo inesperado foi o de que uma imunização com adenovírus carreando ASP2 foi capaz de proteger os camundongos imunizados frente ao desafio em C57BL/6. Como solução, devemos utilizar uma linhagem susceptível à infecção; diminuir a dose de imunização com o adenovírus em um \log_{10} ; aumentar o tempo entre o boost e o desafio a fim de averiguar se a resposta imunológica de memória induzida por apenas uma imunização é capaz de proteger os animais e; estudar o perfil das células efectoras e de memória nos animais imunizados com os diferentes protocolos. O tamanho do inserto suportado pelos vírus recombinantes vNA38 e sua virulência em camundongos (Machado, Caetano *et al.*, 2010) faz do estabelecimento de uma plataforma usando de vírus atenuados na neuraminidase um próximo passo importante no desenvolvimento do nosso projeto. Por fim, a utilização dos vírus influenza recombinantes em combinações com outro vetor viral, o MVA carreando o antígeno ASP2 será uma alternativa à utilização do adenovírus recombinante do tipo 5 que apresenta as limitações citadas na discussão.

7. REFERÊNCIAS:

- Abbink, P., A. A. Lemckert, *et al.* Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol, v.81, n.9, May, p.4654-63. 2007.
- Abrahamsohn, I. A. e R. L. Coffman. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. Exp Parasitol, v.84, n.2, Nov, p.231-44. 1996.
- Abuhid, I. M., E. R. Pedrosa, *et al.* [Scintigraphy for the detection of myocardial damage in the indeterminate form of Chagas disease.]. Arq Bras Cardiol, Jun 11. 2010.
- Acosta Rodriguez, E. V., E. I. Zuniga, *et al.* Trypanosoma cruzi infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? Scand J Immunol, v.66, n.2-3, Aug-Sep, p.137-42. 2007.
- Andrade, Z. A., S. G. Andrade, *et al.* Myocardial changes in acute Trypanosoma cruzi infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. Am J Pathol, v.144, n.6, Jun, p.1403-11. 1994.
- Araujo, A. F., B. C. De Alencar, *et al.* CD8+-T-cell-dependent control of Trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. Infect Immun, v.73, n.9, Sep, p.6017-25. 2005.
- Babiuk, L. A. e S. K. Tikoo. Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. J Biotechnol, v.83, n.1-2, Sep 29, p.105-13. 2000.
- Bafica, A., H. C. Santiago, *et al.* Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. J Immunol, v.177, n.6, Sep 15, p.3515-9. 2006.
- Bartholomeu, D. C., C. Ropert, *et al.* Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi. J Immunol, v.181, n.2, Jul 15, p.1333-44. 2008.
- Ben-Yedidia, T. e R. Arnon. Towards an epitope-based human vaccine for influenza. Hum Vaccin, v.1, n.3, May-Jun, p.95-101. 2005.
- Biolo, A., A. L. Ribeiro, *et al.* Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? Prog Cardiovasc Dis, v.52, n.4, Jan-Feb, p.300-16. 2010.
- Boscardin, S. B., S. S. Kinoshita, *et al.* Immunization with cDNA expressed by amastigotes of Trypanosoma cruzi elicits protective immune response against experimental infection. Infect Immun, v.71, n.5, May, p.2744-57. 2003.
- Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.4, Nov-Dec, p.389-96. 1962.

Bruna-Romero, O., G. Gonzalez-Aseguinolaza, *et al.* Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. Proceeding of National Academy of Sciences of United States of America, v.98, n.20, p.11491-11496. 2001.

Bruna-Romero, O., J. J. Lasarte, *et al.* Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. Hepatology, v.25, n.2, Feb, p.470-7. 1997.

Caetano, B. C., O. Bruna-Romero, *et al.* Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of toxoplasma gondii induces immune response and protection against infection in mice. Hum Gene Ther, v.17, n.4, Apr, p.415-26. 2006.

Campos, M. A. e R. T. Gazzinelli. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm, v.13, n.3, Jun, p.139-43. 2004.

Claser, C., N. M. Espindola, *et al.* Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of Trypanosoma cruzi. Microbes Infect, v.9, n.8, Jul, p.1011-9. 2007.

Crescenzo-Chaigne, B., N. Naffakh, *et al.* Comparative analysis of the ability of the polymerase complexes of influenza viruses type A, B and C to assemble into functional RNPs that allow expression and replication of heterotypic model RNA templates in vivo. Virology, v.265, n.2, p.342-53. 1999.

Croyle, M. A., A. Patel, *et al.* Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. PLoS One, v.3, n.10, p.e3548. 2008.

D'imperio Lima, M. R., H. Eisen, *et al.* Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J Immunol, v.137, n.1, Jul 1, p.353-6. 1986.

Da Matta Guedes, P. M., F. R. Gutierrez, *et al.* IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.2, p.e604. 2010.

Davila, D. F., R. O. Rossell, *et al.* Cardiac parasympathetic abnormalities: Cause or consequence of chagas heart disease? Parasitol Today, v.5, n.10, Oct, p.327-9. 1989.

De Alencar, B. C., A. F. Araujo, *et al.* Cross-priming of long lived protective CD8+ T cells against Trypanosoma cruzi infection: importance of a TLR9 agonist and CD4+ T cells. Vaccine, v.25, n.32, Aug 10, p.6018-27. 2007.

De Alencar, B. C., P. M. Persechini, *et al.* Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite,

Trypanosoma cruzi, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. Infect Immun, v.77, n.10, Oct, p.4383-95. 2009.

Duan, X., Y. Yonemitsu, *et al.* Efficient protective immunity against Trypanosoma cruzi infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. Vaccine, v.27, n.44, Oct 19, p.6154-9. 2009.

Dumonteil, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. J Biomed Biotechnol, v.2007, n.6, p.90520. 2007.

_____. Vaccine development against Trypanosoma cruzi and Leishmania species in the post-genomic era. Infect Genet Evol, v.9, n.6, Dec, p.1075-82. 2009.

Fields, B. N., D. M. Knipe, *et al.* Fields virology. Philadelphia ; London: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins. 2007

Fitzgerald, J. C., G. P. Gao, *et al.* A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. J Immunol, v.170, n.3, Feb 1, p.1416-22. 2003.

Fodor, E., L. Devenish, *et al.* Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J Virol, v.73, n.11, Nov, p.9679-82. 1999.

Fodor, E., P. Palese, *et al.* Attenuation of influenza A virus mRNA levels by promoter mutations. J Virol, v.72, n.8, Aug, p.6283-90. 1998.

Galvao Da Silva, A. P., J. F. Jacysyn, *et al.* Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to Trypanosoma cruzi infection but fail to mount a T helper type 2 response. Immunology, v.108, n.2, Feb, p.230-7. 2003.

Garcia-Sastre, A., T. Muster, *et al.* Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus. Journal of Virology, v.68, n.10, p.6254-6261. 1994.

Garulli, B., Y. Kawaoka, *et al.* Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus. Journal of Virology, v.78, n.2, p.1020-1025. 2004.

Gherardi, M. M., J. L. Najera, *et al.* Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. J Virol, v.77, n.12, Jun, p.7048-57. 2003.

_____. Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. Journal of Virology, v.77, n.12, p.7048-7057. 2003.

Gilbert, S. C., J. Schneider, *et al.* Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. Vaccine, v.20, n.7-8, p.1039-1045. 2002.

Ginsberg, H. S., R. L. Horswood, *et al.* Role of early genes in pathogenesis of adenovirus pneumonia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.16, Aug, p.6191-5. 1990.

Ginsberg, H. S., L. L. Moldawer, *et al.* A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.5, Mar 1, p.1651-5. 1991.

Giraldo, M., H. Cannizzaro, *et al.* Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. J Clin Microbiol, v.38, n.4, Apr, p.1453-60. 2000.

Golgher, D. e R. T. Gazzinelli. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. Autoimmunity, v.37, n.5, Aug, p.399-409. 2004.

Gonçalves, T. C. e J. Costa. Biologia dos vetores da doença de Chagas: Fiocruz disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=23>.

Gonzalez-Aseguinolaza, G., Y. Nakaya, *et al.* Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8⁺-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. J Virol, v.77, n.21, Nov, p.11859-66. 2003.

Gonzalo, R. M., D. Rodriguez, *et al.* Enhanced CD8⁺ T cell response to HIV-1 env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. Vaccine, v.17, n.7-8, Feb 26, p.887-92. 1999.

Haglund, K., I. Leiner, *et al.* Robust recall and long-term memory T-cell responses induced by prime-boost regimens with heterologous live viral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env proteins. J Virol, v.76, n.15, Aug, p.7506-17. 2002.

He, Q., L. Martinez-Sobrido, *et al.* Live-attenuated influenza viruses as delivery vectors for *Chlamydia* vaccines. Immunology, v.122, n.1, Sep, p.28-37. 2007.

Hoft, D. F., C. S. Eickhoff, *et al.* 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, v.179, n.10, Nov 15, p.6889-900. 2007.

Hovav, A. H., M. W. Panas, *et al.* The impact of a boosting immunogen on the differentiation of secondary memory CD8⁺ T cells. J Virol, v.81, n.23, Dec, p.12793-802. 2007.

Hyland, K. V., J. S. Leon, *et al.* Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. Infect Immun, v.75, n.7, Jul, p.3641-50. 2007.

Imler, J. L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. Vaccine, v.13, n.13, Sep, p.1143-51. 1995.

- Julkunen, I., K. Melen, *et al.* Inflammatory responses in influenza A virus infection. Vaccine, v.19 Suppl 1, Dec 8, p.S32-7. 2000.
- Kayama, H., R. Koga, *et al.* NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Pathog, v.5, n.7, Jul, p.e1000514. 2009.
- Kayama, H. e K. Takeda. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect, v.12, n.7, Jul, p.511-517. 2010.
- Kelly, J. M. A B-cell activator in Chagas disease. Nat Med, v.6, n.8, Aug, p.865-6. 2000.
- Kierszenbaum, F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. Acta Parasitologica, v.52, n.1, p.1–12. 2007.
- Kittel, C., B. Ferko, *et al.* Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. J Virol, v.79, n.16, Aug, p.10672-7. 2005.
- Lemckert, A. A., S. M. Sumida, *et al.* Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. J Virol, v.79, n.15, Aug, p.9694-701. 2005.
- Li, S., M. Rodrigues, *et al.* Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.90, n.11, p.5214-8. 1993.
- Limbach, K. J. e T. L. Richie. Viral vectors in malaria vaccine development. Parasite Immunol, v.31, n.9, Sep, p.501-19. 2009.
- Liu, J., B. A. Ewald, *et al.* Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. J Virol, v.82, n.10, May, p.4844-52. 2008.
- Machado, A., N. Naffakh, *et al.* Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. Virology, v.313, n.1, p.235-249. 2003.
- Machado, A. V., B. C. Caetano, *et al.* Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. Vaccine, v.28, n.18, Apr 19, p.3247-56. 2010.
- Machado, A. V., J. E. Cardoso, *et al.* Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Hum Gene Ther, v.17, n.9, Sep, p.898-908. 2006.
- Machado, A. V., N. Naffakh, *et al.* Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. Virology, v.313, n.1, Aug 15, p.235-49. 2003.

- Marinho, C. R., L. N. Nunez-Apaza, *et al.* 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. Scand J Immunol, v.66, n.2-3, Aug-Sep, p.297-308. 2007.
- Martin, D. L., D. B. Weatherly, *et al.* CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. PLoS Pathog, v.2, n.8, Aug, p.e77. 2006.
- Michailowsky, V., N. M. Silva, *et al.* 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. Am J Pathol, v.159, n.5, Nov, p.1723-33. 2001.
- Miyahira, Y. Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8+ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine. Parasitol Int, v.57, n.1, Mar, p.38-48. 2008.
- Miyahira, Y., Y. Takashima, *et al.* Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control Trypanosoma cruzi infection. Infect Immun, v.73, n.11, Nov, p.7356-65. 2005.
- Molinier-Frenkel, V., R. Lengagne, *et al.* Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. J Virol, v.76, n.1, Jan, p.127-35. 2002.
- Monteiro, A. C., V. Schmitz, *et al.* Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by Trypanosoma cruzi. J Immunol, v.177, n.9, Nov 1, p.6325-35. 2006.
- Muller, U., V. Sobek, *et al.* Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of Trypanosoma cruzi from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. Eur J Immunol, v.33, n.1, Jan, p.70-8. 2003.
- Murata, K., A. Garcia-Sastre, *et al.* Characterization of in vivo primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. Cellular Immunology, v.173, n.1, p.96-107. 1996.
- Nakaya, Y., T. Nakaya, *et al.* Induction of cellular immune responses to simian immunodeficiency virus gag by two recombinant negative-strand RNA virus vectors. Journal of Virology, v.78, n.17, 9366-9375. 2004.
- Nayak, D. P., E. K. Hui, *et al.* Assembly and budding of influenza virus. Virus Res, v.106, n.2, Dec, p.147-65. 2004.
- Neumann, G. e Y. Kawaoka. Reverse genetics of influenza virus. Virology, v.287, n.2, Sep 1, p.243-50. 2001.
- _____. Generation of influenza A virus from cloned cDNAs--historical perspective and outlook for the new millenium. Reviews in Medical Virology, v.12, n.1, p.13-30. 2002.

_____. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. Current Topics in Microbiology and Immunology, v.283, p.43-60. 2004.

Neumann, G., M. Whitt, *et al.* A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? Journal of General Virology, v.83, n.11, p.2635-2662. 2002.

Nicklin, S. A., E. Wu, *et al.* The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. Mol Ther, v.12, n.3, Sep, p.384-93. 2005.

Olivieri, B. P., R. Vasconcellos, *et al.* Intravenous immunoglobulin increases survival time in the acute phase of experimental Chagas disease. Parasite Immunol, v.32, n.6, Jun, p.464-9. 2010.

OMS. Chagas disease: control and elimination. p.4. 2009

Ophorst, O. J., K. Radosevic, *et al.* Immunogenicity and protection of a recombinant human adenovirus serotype 35-based malaria vaccine against *Plasmodium yoelii* in mice. Infect Immun, v.74, n.1, Jan, p.313-20. 2006.

Padilla, A., D. Xu, *et al.* Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. Infect Immun, v.75, n.1, Jan, p.231-5. 2007.

Padilla, A. M., J. M. Bustamante, *et al.* CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Curr Opin Immunol, v.21, n.4, Aug, p.385-90. 2009.

Pan, A. A. e D. McMahon-Pratt. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein. J Immunol, v.143, n.3, Aug 1, p.1001-8. 1989.

Parada, H., H. A. Carrasco, *et al.* Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. Int J Cardiol, v.60, n.1, Jun 27, p.49-54. 1997.

Percy, N., W. S. Barclay, *et al.* Expression of a foreign protein by influenza A virus. Journal of Virology, v.68, n.7, p.4486-4492. 1994.

Pinto, A. R., J. C. Fitzgerald, *et al.* Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. J Immunol, v.171, n.12, Dec 15, p.6774-9. 2003.

Pleschka, S., R. Jaskunas, *et al.* A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. Journal of Virology, v.70, n.6, p.4188-92. 1996.

Rassi, A., Jr., A. Rassi, *et al.* Chagas' heart disease. Clin Cardiol, v.23, n.12, Dec, p.883-9. 2000.

- Restifo, N. P., D. R. Surman, *et al.* Transfectant influenza A viruses are effective recombinant immunogens in the treatment of experimental cancer. Virology, v.249, n.1, Sep 15, p.89-97. 1998.
- Reyes-Sandoval, A., T. Berthoud, *et al.* Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses. Infect Immun, v.78, n.1, Jan, p.145-53. 2009.
- Roberts, D. M., A. Nanda, *et al.* Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.239-43. 2006.
- Robertson, J. S. 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. Nucleic Acids Res, v.6, n.12, Aug 24, p.3745-57. 1979.
- Rocha, C. D., B. C. Caetano, *et al.* Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. Int Microbiol, v.7, n.2, Jun, p.83-94. 2004.
- Rodrigues, E. G., F. Zavala, *et al.* Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. Journal of Immunology, v.158, n.3, p.1268-1274. 1997.
- Rodrigues, M., S. Li, *et al.* Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. Journal of Immunology, v.153, n.10, p.4636-48. 1994.
- Rodrigues, M. M., S. B. Boscardin, *et al.* Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. An Acad Bras Cienc, v.75, n.4, Dec, p.443-68. 2003.
- _____. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, v.75, n.4, p.443-468. 2003.
- Rodrigues, M. M., B. C. De Alencar, *et al.* Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? Braz J Med Biol Res, Nov 28. 2008.
- Rodrigues, M. M., M. Ribeiro, *et al.* CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. Immunol Lett, v.73, n.1, Jul 3, p.43-50. 2000.
- Santiago, H. C., C. G. Feng, *et al.* Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. J Immunol, v.175, n.12, Dec 15, p.8165-72. 2005.
- Schofield, C. J., J. Jannin, *et al.* The future of Chagas disease control. Trends Parasitol, v.22, n.12, Dec, p.583-8. 2006.
- Shiver, J. W., T. M. Fu, *et al.* Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. Nature, v.415, p.331-5. 2002.

Silverio, J. C., L. M. De-Oliveira-Pinto, *et al.* Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. Int J Exp Pathol, v.91, n.1, Feb, p.72-86. 2009.

Simpson, D. A. M. A. L. Evolution of Parasitism in Kinetoplastid Protozoa. Parasitology Today, v.II, n.I, p.30-32. 1995.

Soares, M. B., L. Pontes-De-Carvalho, *et al.* The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An Acad Bras Cienc, v.73, n.4, Dec, p.547-59. 2001.

Solorzano, A., H. Zheng, *et al.* Reduced levels of neuraminidase of influenza A viruses correlate with attenuated phenotypes in mice. J Gen Virol, v.81, n.Pt 3, Mar, p.737-42. 2000.

Souza, A. P., L. Haut, *et al.* Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. Braz J Med Biol Res, v.38, n.4, Apr, p.509-22. 2005.

Stech, J., H. Garn, *et al.* A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. Nature Medicine, v.11, n.6, p.683-689. 2005.

Takasuda, N., S. Enami, *et al.* Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. Vaccine, v.20, p.1579-1585. 2002.

Tarleton, R. L., M. J. Grusby, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. Int Immunol, v.8, n.1, Jan, p.13-22. 1996.

Tarleton, R. L., R. Reithinger, *et al.* The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. PLoS Med, v.4, n.12, Dec, p.e332. 2007.

Teixeira, A. R., N. Nitz, *et al.* Chagas disease. Postgrad Med J, v.82, n.974, Dec, p.788-98. 2006.

Thorner, A. R., A. A. Lemckert, *et al.* Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. J Virol, v.80, n.24, Dec, p.12009-16. 2006.

Tsuji, M., C. Bergmann, *et al.* Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. Journal of Virology, v.72, n.8, p.6907-6910. 1998.

Tyler, K. M. e D. M. Engman. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol, v.31, n.5-6, May 1, p.472-81. 2001.

Tzelepis, F., B. C. De Alencar, *et al.* Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8⁺ T cells leading to immunodominance. J Immunol, v.180, n.3, Feb 1, p.1737-48. 2008.

Umekita, L. F. e I. Mota. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? Braz J Med Biol Res, v.33, n.3, Mar, p.253-8. 2000.

Umekita, L. F., H. A. Takehara, *et al.* Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. Immunol Lett, v.17, n.1, Jan, p.85-9. 1988.

Vasconcelos, J. R., M. I. Hiyane, *et al.* Protective immunity against *trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Hum Gene Ther, v.15, n.9, Sep, p.878-86. 2004.

Vieira Machado, A., N. Naffakh, *et al.* Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice. Virology, v.345, n.1, Feb 5, p.73-87. 2006.

Watanabe, T., S. Watanabe, *et al.* Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. Journal of Virology, v.77, n.19, p.10575-83. 2003.

Wizel, B., M. Palmieri, *et al.* Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. J Clin Invest, v.102, n.5, Sep 1, p.1062-71. 1998.

Yang, Y., Z. Xiang, *et al.* Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.16, Aug 1, p.7257-61. 1995.

8. ANEXOS

8.1. Artigo publicado

Vaccine 28 (2010) 3247–3256



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity

Alexandre V. Machado^{a,c,*}, Bráulia C. Caetano^{a,c,d}, Rafael P. Barbosa^{a,c}, Ana Paula C. Salgado^{a,c}, Renata H. Rabelo^{a,c}, Cristiana C. Garcia^a, Oscar Bruna-Romero^b, Nicolas Escriou^e, Ricardo T. Gazzinelli^{a,c,d}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-910, MG, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-910, MG, Brazil

^c Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil

^d Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

^e Laboratoire de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2009

Received in revised form 21 January 2010

Accepted 3 February 2010

Available online 26 February 2010

Keywords:

Influenza

Reverse genetics

Toxoplasmosis

SAG2

Adenovirus

Vaccine

ABSTRACT

In this work, we explored an original vaccination protocol using recombinant influenza and adenovirus. We constructed recombinant influenza viruses harboring dicistronic NA segments containing the surface antigen 2 (SAG2) from *Toxoplasma gondii* under control of the duplicated 3' promoter. Recombinant influenza viruses were able to drive the expression of the foreign SAG2 sequence in cell culture and to replicate efficiently both in cell culture and in lungs of infected mice. In addition, mice primed with recombinant influenza virus and boosted with a recombinant adenovirus encoding SAG2 elicited both humoral and cellular immune responses specific for SAG2. Moreover, when immunized animals were challenged with the cystogenic P-Br strain of *T. gondii*, they displayed up to 85% of reduction in parasite burden. These results demonstrate the potential use of recombinant influenza vectors harboring the dicistronic segments in the development of vaccines against infectious diseases.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Infectious diseases remain as important global health problems. A major handicap of the development of efficient vaccines is the insufficient stimulation by traditional vaccines of cellular immune responses, mediated by CD8+ T lymphocytes [1,2]. Because viruses are obligatory intracellular pathogens, viral vectors could be useful tools to induce CD8+ T cell-mediated immune responses [3,4]. In addition, viral proteins and genetic material such as double stranded RNA are able to trigger the innate immune system, acting as strong immunological adjuvants and improving vaccine efficacy [5–8]. Influenza A viruses are enveloped viruses belonging to family *Orthomyxoviridae*. These viruses are promising but currently under-explored vectors, which display some advantageous features to be used as live recombinant vaccines [3,9], such as ability to infect and activate antigen presenting cells and present high immunogenicity at mucosal and systemic levels [10]. Indeed, some

noteworthy studies have demonstrated that influenza viral vectors administered by intranasal route elicit heterospecific humoral and cellular immune responses both in the mucosal compartment and systemically [11–14]. Moreover, intranasal administration of influenza induces mucosal immunity in the intestinal and genital tracts [15,16]. These features indicate that influenza vectors are useful to elicit protective immune response against mucosal or food borne diseases.

The Influenza A genome consists of eight negative single strand RNA segments [17]. Each segment comprise a coding region flanked by partially complementary 3' and 5' non-coding regions, which contain the transcription and replication signals [18–21]. In addition, these non-coding regions as well as their adjacent coding sequences contain the influenza segments packaging signals [20,22–26].

We have developed a modified neuraminidase segment carrying a duplication of the 3' promoter [27,28] that can be used for cloning and expression of foreign sequences. In the modified segment, the expression of viral neuraminidase is controlled by the external 3' promoter, whereas any foreign sequences cloned into this segment is placed under control of the internally located 3' promoter. Recombinant viruses harboring such dicistronic NA segment (NA38) and coding a foreign sequence

* Corresponding author at: Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ), Laboratory of Immunopathology, Avenida Augusto de Lima nº 1715, Bairro: Barro Preto, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil. Tel.: +55 31 34092634.

E-mail address: amarok@cpqrr.fiocruz.br (A.V. Machado).

Platelet-Activating Factor Receptor Mediates Lung Injury and Death Caused by Influenza A in Mice

Cristiana C. Garcia¹, Remo C. Russo¹, Rodrigo Guabiraba¹, Caio T. Fagundes¹, Rafael P. Barbosa¹, Luciana P. Tavares¹, Geovanni D. Cassali², Ricardo T. Gazzinelli¹, Lirlândia P. Sousa³, Alexandre V. Machado⁴, Mauro M. Teixeira¹

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

² Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Setor de Patologia Clínica, Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁴ Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil.

Corresponding Author: Mauro Martins Teixeira (also for reprint requests).

E-mail: mmtex@icb.ufmg.br. Phone/FAX: 55 31 3409 2651.

Running head: PAFR mediates Influenza A lung injury

Abstract

Influenza A virus causes annual epidemics which affect thousands of people worldwide. A recent Influenza pandemic brought new awareness over the disease. It is thought that an exacerbated inflammatory response against the virus contributes to disease severity and death. Therefore, modulating the effects of inflammatory mediators may represent new therapy against the flu. To assess whether the phospholipid mediator platelet-activating factor (PAF) is important for the pathogenesis of Influenza A infection in mice, PAF receptor (PAFR) deficient or wild type mice were infected with Influenza A/WSN/33 H1N1 or the reassortant strain Influenza A H3N1. The following parameters were evaluated: death rates, cell recruitment to the airways, lung pathology, viral titers and cytokine levels in mice lungs. The PAFR antagonist PCA4248 was also used after the onset of flu symptoms. Absence or antagonism of PAFR caused significant protection against flu-associated lethality and lung injury. The protection was correlated with decreased neutrophil recruitment, lung edema and injury. Despite lower levels of IL-12p40 and IFN- γ in the lungs, there was no increase of viral load and greater recruitment of NK1.1⁺ cells. Antibody responses were similar in WT and PAFR-deficient mice and animals were protected from re-infection. Therefore, it is suggested that PAFR plays an important role in driving neutrophil influx and lung damage after infection of mice with two strains of Influenza A. Further studies should investigate whether targeting PAFR may be useful to reduce lung pathology associated with Influenza A infection in humans.

8.3. Publicação de reportagem em revista de divulgação científica



Revista CH / Revista CH - 2009

Gripe contra doença de Chagas?

Cientistas criam vírus da influenza modificado que pode originar vacina contra essas duas enfermidades

Por: Mariana Ferraz

Publicado em 15/09/2009 | Atualizado em 04/11/2009

Uma vacina para a doença de Chagas capaz de imunizar os pacientes também contra a gripe. O primeiro passo para a concretização desse objetivo ambicioso acaba de ser dado por cientistas brasileiros. Eles construíram um vírus da influenza modificado que traz em seu material genético um gene do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. A expectativa é que, quando expostos ao novo vírus, animais – e futuramente, humanos – apresentem resposta imunológica contra as duas doenças, ficando protegidos da infecção por ambas.

O feito é fruto da pesquisa de mestrado em bioquímica e imunologia de Rafael Polidoro, bolsista do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação do bioquímico Ricardo Tostes Gazzinelli e do microbiologista Alexandre Vieira Machado, ambos do Centro de Pesquisa René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais.



Trypanosoma cruzi, protozoário causador da doença de Chagas.

Polidoro conta que foi preciso um ano de trabalho até que o vírus modificado estivesse pronto. “Usamos uma técnica conhecida como genética reversa para inserir um gene do *T. cruzi* no vírus da gripe”, explica. “Com isso, construímos um vírus capaz de induzir as células infectadas a produzirem uma proteína, a ASP-2, que protege contra a infecção pelo protozoário”, completa.

Agora os pesquisadores estão realizando testes com camundongos para saber o grau de imunização obtido com a exposição ao novo vírus. “Acabamos de administrar o vírus nos animais. Em pouco tempo daremos a dose de reforço, do mesmo modo como é feito na vacinação em humanos. Só então poderemos submeter os camundongos ao chamado teste desafio, no qual eles serão expostos ao protozoário que causa a doença de Chagas.”

Além de ser um passo rumo à descoberta de uma vacina contra a doença de Chagas – que atualmente mata cerca de 16 mil pessoas por ano no mundo –, o vírus criado por Polidoro foi patenteado e poderá ser usado, por exemplo, para o desenvolvimento de vacinas que protejam contra mais de um tipo de gripe.

Mariana Ferraz
Ciência Hoje/RJ

8.4. Escolha do Bill and Melinda Gates Foundation Global Health Travel Award

Keystone Symposia Scholarship information Entrada X

scholarships@kestonesympo [mostrar detalhes](#) 25 jun (10 dias atrás)

Responder

Friday June 25, 2010

Dear Rafael Polidoro,

On behalf of Bali Pulendran, Rino Rappuoli and Bruce A. Beutler, it is my pleasure to award you with the Bill and Melinda Gates Foundation Global Health Travel Award. Please accept this invitation for you to attend the Keystone Symposia S1 Immunological Mechanisms of Vaccination to be held at the Sheraton Seattle Hotel, Seattle, WA, USA on Oct 27 - Nov 1, 2010.

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](#)