Eline Vital Rampazo

Direcionando a proteína ASP-2 de formas amastigotas
de *Trypanosoma cruzi* para o receptor DEC205 presente
na superfície de células dendríticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2012

Eline Vital Rampazo

Direcionando a proteína ASP-2 de formas amastigotas
de *Trypanosoma cruzi* para o receptor DEC205 presente
na superfície de células dendríticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Beatriz Boscardin

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rampazo, Eline Vital.

Direcionando a proteína ASP-2 de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* para o receptor DEC205 presente na superfície de células dendríticas / Eline Vital Rampazo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Direcionamento de antígenos para as células dendríticas.

Versão do título para o inglês: Targeting the ASP-2 protein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* to the DEC205 receptor on the surface of dendritic cells.

1. Células dendríticas 2. DEC205 3. Anticorpos híbridos
4. Doença de Chagas 5. *Trypanosoma cruzi* 6. ASP-2 I. Boscardin, Profa. Dra. Silvia Beatriz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0129/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eline Vital Rampazo.

Título da Dissertação: Direcionando a proteína ASP-2 de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* para o receptor DEC205 presente na superfície de células dendríticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEEA.002/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 082/08/CEEA, datado de 26.08.08 e por solicitação da Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos: **Eline Vital Rampazo, Ícaro Matioli Barbosa, Hugo Rezende Henriques** ao Projeto de Pesquisa "*Direcionamento de antígenos recombinantes para células dentríticas in vivo: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 13 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, sem Ele eu nada seria ou teria.

Aos meus pais Eltimio Rampazo e Nádia Rampazo, meu muito obrigada por TUDO! Pelo carinho inestimável, palavras de sabedoria (Né Papi), apoio incondicional. Enfim vocês são simplesmente sem palavras para descrever. Amo muito vocês.

Ao meu irmão Edrey e minha cunhada Rafaela. Vocês me deram a melhor experiência do mundo ano passado, a de ser tia do João Pedro, é simplesmente muito BOM. A minha irmã Elenir, nos entendemos somente num olhar, e é lógico ao cunhado Gil (Amo vocês!).

Aos membros do laboratório: aos que já passaram Ícaro, Hildener, e aos que ainda estão Renan, Márcio (o Incrível Márcio – **HERÓI** de todos nós), Tamara, Catarina, Raquel e Kelly – em todas eu sei que tenho amigas para todas as horas. E eu não poderia deixar de agradecer ao meu cúmplice e amigo Hugo, você tornou dias mais agradáveis, aliviou muitas tensões, me fez rir somente por ser você.

Aos amigos que conquistei no percurso: Suelen Santos, vou sentir falta dos nossos cafezinhos. Juliana Souza (Juju), sempre puxando a minha língua, Ana Paulo Ligeiro, Rafaella Yoshino, Michelle Marini (as muitas discussões de paper), Renato, Leandro. Enfim se me esqueci de alguém me perdoe.

Aos amigos do laboratório da prof^a Beatriz Stolf, Mariana, Mauricio, Leonardo e Soraia. Tem também todos do prof^o Claudio Marinho, meu muito obrigado.

Ao Prof^o Sandro Almeida, por muitas vezes deixamos usar o citômetro até tarde da noite. A Renata por estar ao nosso lado sempre.

Ao pessoal do Biotério, que muitas vezes nos socorreram, né Sandra? A toda equipe da Secretaria e da USP.

As amigas que sempre me deram apoio, Gisele Nunes Reis e Érika Araújo Nascimento, me perdoem pela ausência, vocês de alguma forma sempre estiveram comigo, amo vocês.

Eu não poderia deixar de agradecer a minha orientadora Silvia Beatriz Boscardin, obrigada pela oportunidade que você me deu, pode ter certeza que levarei muito de você comigo e espero deixar um pouco de mim com você. Muito obrigada!

Este trabalho foi realizado no laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº projeto 2007/08648-9), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Vacinas (INCTV-CNPq) e do Banco BNP-Paribas.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante”.

Charles Chaplin

RESUMO

Rampazo EV. Direcionando a proteína ASP-2 de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* para o receptor DEC205 presente na superfície de células dendríticas. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Fazendo parte do sistema imune inato, as células dendríticas (DCs) são críticas no processo de indução de imunidade e tolerância periférica. Estas células apresentam inúmeros receptores em sua superfície e podem ser classificadas em diferentes subpopulações de acordo com a expressão dos mesmos. Anticorpos monoclonais dirigidos contra diferentes receptores celulares vêm sendo utilizados com sucesso no tratamento de patologias como câncer. Nos últimos dez anos, demonstrou-se que é possível enviar antígenos diretamente para o receptor DEC205 presente na superfície das DCs *in vivo*. Quando isso acontece na ausência de estímulo inflamatório concomitante, o resultado é a indução de tolerância imunológica. Por outro lado, quando o antígeno é enviado a estas mesmas células na presença de um estímulo inflamatório, o resultado é a indução de uma forte resposta imunológica. Nesse estudo geramos um anticorpo α DEC205 em fusão com a proteína 2 de superfície dos amastigotas (ASP-2) de *Trypanosoma cruzi* e estudamos o efeito da administração deste anticorpo *in vivo* na presença de diferentes adjuvantes em duas linhagens distintas de camundongos. Observamos que ambas as linhagens de camundongos não foram capazes de gerar anticorpos, mas a resposta imune celular foi suficiente para reduzir a parasitemia quando desafiados com tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Camundongos A/J foram capazes de mediar apresentação cruzada. Em contrapartida, mapeamos um peptídeo que é reconhecido somente por camundongos BALB/c. Em contraste camundongos imunizados com Poly (I:C) como estímulo de maturação mostrou-se superior ao CpG.

Palavras-chave: Células Dendríticas. ASP-2. Vacina. Resposta Imune. DEC-205. Adjuvantes. Camundongos.

ABSTRACT

Rampazo EV. Targeting the ASP- 2 protein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* to the DEC205 receptor on the surface of dendritic cells. [Masters thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

As part of the innate immune system, dendritic cells (DCs) are critical in the process of induction of immunity and peripheral tolerance. These cells offer many receptors on their surface and can be classified in different subsets according to the expression there of. Monoclonal antibodies directed against different cellular receptors have been used successfully to treat diseases such as cancer. In the last ten years has been demonstrated that antigen can be sent directly to the receiver DEC205 present on the surface of DCs *in vivo*. When this happens in the absence of concomitant inflammatory stimulus, the result is the induction of immunological tolerance. Moreover, when the antigen is sent to the same cells in the presence of an inflammatory stimulus, the result is to induce a strong immune response. In this study we generated an antibody α DEC205 fusion protein with the amastigote surface protein 2 (ASP-2) from *Trypanosoma cruzi* and study the effect of administration of this antibody *in vivo* in the presence of different adjuvants in two distinct strains of mice. We observed that both strains of mice were unable to generate antibodies, but cellular immune response was sufficient to reduce the parasitemia when challenged with trypomastigotes Y strain of *Trypanosoma cruzi*. The mice A/J were able to mediate cross-presentation. In contrast, we mapped a peptide that is recognized by BALB/c mice. In counterpart mice immunized with Poly (I:C) as maturation stimuli was superior to CpG.

Keywords: Dendritic Cells. ASP-2. Vaccine. Immune Response. DEC-205. Adjuvants. Mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- O ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 2 - Amplificação e clonagem da sequência de DNA correspondente à porção de 65kDa da proteína ASP-2.	47
Figura 3 - Os anticorpos quiméricos α DEC-ASP-2 e ISO-ASP-2 foram purificados e contém a proteína ASP-2 associada.....	48
Figura 4 - Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos α DEC-ASP-2 e Iso-ASP-2 a células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo e DEC205 humano.	49
Figura 5 - Imunização de camundongos A/J com anticorpo quimérico α DEC-ASP-2 não é capaz de induzir níveis detectáveis de anticorpos anti-ASP-2 no soro dos animais imunizados.....	50
Figura 6 - Imunização de camundongos A/J com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz proliferação de células T CD4 ⁺	51
Figura 7 - Imunização de camundongos A/J com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz maior proliferação de células T CD8 ⁺ quando comparada aos animais imunizados com a proteína ASP-2 recombinante.	52
Figura 8 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de <i>T. cruzi</i> induz a produção de IFN- γ por esplenócitos reestimulados com o peptídeo TEWETGQI.....	53
Figura 9 - Imunização de camundongos com α DEC-ASP-2 foi capaz de reduzir o pico da parasitemia em animais desafiados com tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 10 - Imunização de camundongos BALB/c com o anticorpo α DEC-ASP-2 não é capaz de induzir anticorpos anti-ASP-2 no soro dos animais imunizados.....	55
Figura 11 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de <i>T. cruzi</i> induz a produção de IFN- γ	56
Figura 12 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz maior proliferação de células T CD4 ⁺ quando comparada com a imunização com o Isotipo controle ou com a proteína recombinante ASP-2.	57
Figura 13 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 não induz proliferação de células T CD8 ⁺ quando comparada à imunização com o Isotipo controle ou com a proteína recombinante ASP-2.	58
Figura 14 - Pools de peptídeos utilizados nos ensaios.	59
Figura 15 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de <i>T. cruzi</i> induz a produção de IFN- γ , quando estimulados com diferentes pools de peptídeos.	60
Figura 16 - Divisão do pool 4 em pool 4A e B.	60
Figura 17 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de <i>T. cruzi</i> induz a produção de IFN- γ quando as células são estimuladas com os peptídeos contidos no pool 4A.	61

Figura 18 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz a produção de IFN- γ quando as células são reestimuladas com o peptídeo WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT.....	62
Figura 19 - Imunização de camundongos com α DEC-ASP-2 foi capaz de proteger animais desafiados com tripomastigotas sanguíneos cepa Y de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 20 - Poly (I:C) tem melhor efeito adjuvante do que CpG ODN nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 As Células Dendríticas e Sua Origem.....	16
1.2 As Populações de Células Dendríticas.....	16
1.3 Receptores DEC205 e DCIR2.....	17
1.4 Receptores de Reconhecimento de Padrões	18
1.6 Imunidade e Tolerância	20
1.7 Direcionando Antígenos para as Populações de DCs CD8⁺DEC205⁺ e CD8-DCIR2⁺	20
1.8 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	24
1.9 Imunologia na Doença de Chagas.....	27
1.10 Proteína 2 da Superfície do Amastigota (ASP-2)	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais.....	34
3.2 Preparação de Bactérias Competentes	34
3.3 Transformação de Bactérias Competentes	34
3.4 Obtenção dos Plasmídeos Codificando para as Cadeias Leve e Pesada dos Anticorpos αDEC205 e Isotipo (ISO)	35
3.5 Clonagem da Sequência de DNA da Proteína ASP-2 em Fusão com a Sequência dos Anticorpos αDEC205 e Isotipo Controle.....	35
3.6 Clonagem do Gene ASP-2 de <i>T. cruzi</i> em Fusão com os Plasmídeos Codificando as Cadeias Pesadas dos Anticorpos αDEC205 e ISO-ASP-2	36
3.7 Produção dos Anticorpos Quiméricos por Transfecção Transiente de Células HEK293T e Purificação dos Mesmos à partir dos Sobrenadantes das Culturas.....	37
3.8 Avaliação da Integridade dos Anticorpos Quiméricos e da Proteína ASP-2 Fusionada a Eles	38
3.9 Ensaio para Detecção de LPS.....	38

3.10 Ensaio de Ligação dos Anticorpos Híbridos a Células CHO Expressando os Receptores DEC205 de Camundongo, e DEC Humano	39
3.11 Clonagem, Expressão e Purificação da Proteína Recombinante ASP-2 Produzida em Bactérias.....	39
3.12 Imunização de Camundongos com os Diferentes Anticorpos Quiméricos na Presença de Diferentes Estímulos de Ativação para as DCs e Análise da Resposta Imune Celular Gerada pelas Diferentes Combinações.....	40
3.13 Ensaio ELISPOT para Análise do Número de Células Produtoras de IFN-γ	41
3.14 Análise da Sobrevivência dos Animais Imunizados após Desafio Utilizando Formas Tripomastigostas da Cepa Y de Trypanosoma cruzi	42
3.15 Ensaio de ELISA	42
3.16 Ensaio de proliferação por diluição do corante CFSE.....	43
3.17 Análise dos Resultados.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Amplificação e Clonagem dos Genes ASP-2 de <i>T. cruzi</i> em Fusão com os Genes que Codificam as Cadeias Pesadas de Anticorpos αDEC205 e Isotipo Controle	46
4.2 Transfecção de Células HEK293T e Purificação dos Anticorpos Quiméricos	47
4.3 Ensaio de Ligação dos Anticorpos Quiméricos Contendo a Proteína ASP-2 em Células CHO que Expressam o Receptor DEC205.....	48
4.4 Imunização de Camundongos A/J com os Anticorpos Híbridos Contendo a Proteína ASP-2 de Trypanosoma cruzi	49
4.5 Imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos contendo a proteína ASP-2 de Trypanosoma cruzi.	54
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Células Dendríticas e Sua Origem

As células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) são células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), que foram inicialmente descritas por Paul Langerhans, em 1868, que pensou que estas faziam parte das células do sistema nervoso, devido ao seu aspecto estrelado (Revisto por Igyarto e Kaplan, 2010). Em 1973, Ralph Steinman e Zanvil Cohn começaram uma série de estudos mostrando uma nova população de células presentes no baço e linfonodo dos camundongos (Steinman e Cohn, 1973; Steinman et al., 1974). Tais células possuíam características funcionais e morfológicas que as diferenciavam de qualquer outra célula presente nesses órgãos (Bursch et al., 2007; Shortman e Liu, 2002). Os pesquisadores caracterizaram-nas baseando-se em aspectos morfológicos, localização *in vivo*, quantidade de células presentes em diferentes órgãos linfóides periféricos e em suas propriedades funcionais, denominando-as de células dendríticas.

As DCs são células do sistema imune importantes na indução de imunidade contra patógenos. Elas são responsáveis pela interação entre o sistema imune inato e adaptativo, capturando, fagocitando antígenos e apresentando-os para os linfócitos, sendo capazes de induzir tolerância ou fortes respostas imunes adaptativas (Banchereau e Steinman, 1998; Steinman et al., 2000).

As DCs, assim como outros leucócitos, se desenvolvem a partir de uma célula tronco hematopoética derivada da medula óssea. Sabe-se que a divergência entre linfócitos e mielócitos é um evento precoce na hematopoiese. Monócitos, macrófagos, granulócitos, megacariócitos e eritrócitos possuem o mesmo progenitor mieloide comum (CMP), enquanto que linfócitos B e T e as células NK (*Natural Killer*) se diferenciam de um progenitor linfoide comum (CLP) (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 2001).

1.2 As Populações de Células Dendríticas

As DCs são uma população heterogênea de células que podem ser divididas em duas populações maiores: (1) DCs migratórias de órgãos não linfóides e DCs residentes de órgãos linfóides, e (2) DCs plasmocitóides (pDCs). O termo DCs “clássica” ou “convencional” tem sido utilizado recentemente para diferenciar as DCs residentes dos órgãos linfóides das pDCs (Merad e Manz, 2009).

O baço de camundongo, onde as DCs foram primeiramente descritas, contém duas populações majoritárias (Dudziak, et al., 2007; Shortman e Liu., 2002): uma população

convencionalmente identificada por expressar a cadeia α do co-receptor CD8 e o receptor CD205 ou DEC205 ($\text{CD8}^+\text{DEC205}^+$) e outra população que não expressa a cadeia α do co-receptor CD8 e expressa o receptor DCIR2 (*Dendritic Cells Immuno Receptor 2*), conhecida como $\text{CD8}^-\text{DCIR2}^+$. A população de DCs $\text{CD8}^+\text{DEC205}^+$ está localizada nas áreas de células T e na zona marginal, enquanto que aquela $\text{CD8}^-\text{DCIR2}^+$ é encontrada na polpa vermelha e nos canais comunicantes (“*bridging channels*”) (De Smedt et al., 1996; Idoyaga et al., 2009).

Estudos conduzidos na última década indicam que as DCs $\text{CD8}^+\text{DEC205}^+$ têm a capacidade de fazer apresentação cruzada de antígenos, inclusive de antígenos contidos em células apoptóticas (den Haan et al., 2000; Iyoda et al., 2002). Em contraste, a subpopulação de DCs $\text{CD8}^-\text{DCIR2}^+$ é mais eficiente no processo convencional de apresentação de antígenos exógenos via MHC classe II (Dudziak et al., 2007).

Os linfonodos contêm duas populações de DCs residentes, definidas pelos marcadores $\text{CD8}^+\text{DEC205}^+$ e $\text{CD8}^-\text{CD11b}^+$. Essas duas populações parecem corresponder as DCs $\text{CD8}^+\text{DEC205}^+$ e $\text{CD8}^-\text{DCIR2}^+$ presentes no baço, e essas características são comuns não somente com os marcadores de superfície, como também em suas funções (Allan et al., 2006; Belz et al., 2002; Shortman e Liu, 2002). Os linfonodos contêm também outra população de DCs que é migratória, entrando no linfonodos pelo sistema linfático de forma dependente de CCR7 (Ohl et al., 2004). Allan et al. (2006) demonstraram que essas DCs migratórias são capazes de transferir antígenos para as DCs $\text{DEC205}^+\text{CD8}^+$ residentes que os apresentam de forma cruzada.

Populações de DCs não são encontradas somente nos órgãos linfóides. Como citamos acima, há populações espalhadas por todo o corpo que capturam antígenos na periferia e os levam até os linfonodos drenantes, onde a apresentação de antígenos acontece (Liu e Nussenzweig, 2010).

1.3 Receptores DEC205 e DCIR2

Tanto o receptor DEC205 (CD205) quanto o DCIR2 são receptores endocíticos e, portanto, são endocitados pelas DCs quando sofrem ligação de seus respectivos ligantes (Tacke et al., 2007). Até o presente momento, os ligantes naturais destes receptores ainda não foram identificados, entretanto algumas diferenças já foram apontadas entre as populações de DCs que expressam um ou outro receptor (Dudziak et al., 2007; Steinman e Idoyaga, 2010). O receptor DEC205 pertence à família das lectinas tipo C do tipo I que inclui o receptor conhecido como MMR (*macrophage mannose receptor*), Langerina/CD207, DC-

SIGN/CD209, BDCA-2, Dectina-1 e DCIR-2 (Figdor et al., 2002; Jiang et al., 1995; Mahnke et al., 2000). Como o MMR, o receptor DEC205 apresenta um domínio amino-terminal intracelular rico em cisteínas, um domínio de fibronectina tipo II e múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos (revisto por Figdor et al., 2002). O DEC205 é altamente expresso pelas DCs presentes nas zonas de células T dos tecidos linfoides, particularmente nas DCs CD8⁺ (den Haan et al., 2000).

O receptor DCIR2 também é uma lectina tipo C, porém do tipo II. Ao contrário do receptor DEC205, ele contém apenas um domínio de ligação a carboidratos na porção carboxi-terminal extracelular. Receptores podem seguir caminhos distintos dentro do citosol, conforme os diferentes domínios neles contidos. Por exemplo, o DEC-205/CD205 possui uma sequência de três aminoácidos ácidos que faz com que o receptor dirija-se e recicle lentamente em endossomos tardios positivos para MHCII. O DCIR2 contém domínios intracelulares denominado de ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-Based Motif), que tem a capacidade de se ligar a antígenos glicosilados e com isso as DCs sofrem uma baixa regulação em sua maturação, ou seja, possui a capacidade de manipular o antígeno (revisto por Figdor et al., 2002).

1.4 Receptores de Reconhecimento de Padrões

O gene para o receptor Toll foi descoberto em meados dos anos 80 por Eric Wieschaus e Christiane Nüsslein-Volhard como um gene que atuava durante o desenvolvimento embrionário da mosca *Drosophila melanogaster* para especificar o padrão dorsoventral correto do inseto (Nüsslein-Volhard e Wieschaus, 1980). O receptor Toll atraiu atenção dos pesquisadores devido a sua implicação na resposta imune. Bruno Lemaitre e Jules A. Hoffman observaram que mutações neste receptor ou nas moléculas da via de sinalização de Toll deixavam as moscas susceptíveis à infecção pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. A causa desta susceptibilidade era que esta mutação afetava a produção do peptídeo microbiano drosomicina (Lemaitre et al., 1996). Um ano depois, Charles Janeway e Ruslan Medzhitov identificaram a presença de receptores semelhantes à Toll no genoma humano e os denominaram de *Toll-like receptors* (TLR) (Medzhitov et al., 1997). Esses receptores foram primeiramente descritos em células envolvidas na imunidade inata e, quando estimulados pelos seus respectivos ligantes, induziam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias. Sabe-se hoje que tanto camundongos quanto humanos possuem receptores semelhantes à Toll (TLR), cada um

aparentemente envolvido no reconhecimento de um padrão molecular associado à patógenos (PAMPs). A família de TLRs consiste em até 10 membros em humanos e 13 em murinos, sendo que a maioria deles, como o TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11 são expressos na superfície celular, enquanto outros, TLR 3, 7, 8 e 9 estão presentes em compartimentos endossomais de diferentes tipos celulares do sistema imune inato e adquirido, mas também são encontrados em células do sistema não imune (Kawai e Akira, 2006; McGettrick e O'Neill, 2010).

O primeiro TLR isolado, conhecido como TLR4, interage com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) presentes na superfície celular de bactérias gram-negativas. Animais com deficiência nesse receptor são excepcionalmente susceptíveis à infecção por bactérias gram-negativas (Werts et al., 2006). Além de lipopolissacarídeos, os TLRs reconhecem diversos outros componentes de patógenos, como paredes celulares de bactérias, leveduras e fungos, flagelina, RNA viral e DNA bacteriano.

Estes receptores estão localizados na superfície celular e também em vesículas endossômicas (Takeda e Akira, 2003).

De especial importância nesta dissertação são os receptores TLR3 e TLR9 pois seus ligantes serão utilizados para induzir a maturação de células dendríticas.

O TLR3 reconhece RNA dupla-fita (dsRNA) que é um produto da replicação viral em células infectadas induzindo a produção de interferons do tipo I (IFN α e β). Esta produção promove então a maturação das células dendríticas. Para o estudo da função do TLR3, vem sendo utilizado um dsRNA sintético que possui atividade muito semelhante a do dsRNA viral e é chamado de ácido *Polyinosine-polycytidylic acid* (Poly (I:C)) (Longhi et al., 2009; Trumpfheller et al., 2008).

O TLR9 é responsável pelo reconhecimento de CpG oligodeoxinucleotídeos (ODNs) não metilados de DNA bacteriano. A ligação dos CpG ODNs ao TLR9 estimula a ativação e maturação das DCs, de macrófagos e células matadoras naturais (NK), além de induzir uma potente resposta de perfil Th1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Klinman et al., 2009). Em seres humanos, o CpG vem sendo utilizados em ensaios clínicos envolvendo vacinas contra hepatite B (Halperin et al., 2003), gripe (Klinman et al., 2000), malária (Ellis et al., 2009) e na resposta imune anti - tumoral (Zhang et al., 2012).

Vale ressaltar que apesar dos TLRs serem de extrema importância no reconhecimento de microrganismos, eles não são os únicos PRRs (*Pattern recognition receptors*) com esta função. Receptores de manose e de β -glucana são moléculas que são expressas na superfície celular que também participam do reconhecimento e captura de componentes microbianos.

Além desses, existem receptores citosólicos como os NLR (*NOD - nucleotide-binding oligomerization domain - like receptors*) e os RLR (*RIG I - retinoic acid-inducible gene I - like receptors*) cuja função é reconhecer, respectivamente, bactérias e vírus que atingem o citoplasma. Crescem cada vez mais na literatura as evidências que esses outros PRRs podem cooperar com os TLRs no desenvolvimento de uma resposta imune contra patógenos (Creagh et al., 2006).

Após o reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs, esses receptores sofrem mudanças conformacionais e inicia-se então uma cascata de sinalização intracelular que resulta na produção de citocinas inflamatórias como TNF α , IL-6, IL-1 β e IL-12 e no aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras nas APCs (Medzhitov et al., 1997).

1.6 Imunidade e Tolerância

Tipicamente, as DCs estimuladas apenas por padrões aos quais sejam sensibilizadas, sem um estímulo inflamatório concomitante, tem uma ação imunoreguladora, podendo inclusive contribuir para indução e manutenção de tolerância aos mais diversos tipos de substâncias. Por outro lado, as DCs são ativadas quando entram em contato com estímulos aos quais não foram sensibilizadas, especialmente quando estes estímulos são concomitantes com uma modificação no perfil de citocinas. Neste estado as DCs se tornam potentes APCs, sendo ainda capazes de liberar citocinas e quimiocinas (Steinman et al., 2003).

1.7 Direcionando Antígenos para as Populações de DCs CD8⁺DEC205⁺ e CD8-DCIR2⁺

As vacinas desenvolvidas e utilizadas atualmente induzem potente resposta humoral, mas existe ainda enorme dificuldade no desenvolvimento de estratégias vacinais capazes de gerar uma resposta protetora mediada por uma resposta celular dependente de linfócitos T.

Tais vacinas seriam de extremo interesse, principalmente para o combate de infecções em que a resposta humoral isolada parece ser insuficiente, como: HIV1/AIDS, tuberculose, malária, leishmaniose, e especula-se até mesmo sua utilidade no combate a certos tipos de câncer (Trumpfheller et al., 2012). A descrição recente de outro grupo de linfócitos T, os linfócitos T reguladores, e a possibilidade de manipulação das respostas deste grupo de células, suscitam ainda possibilidade de atuação vacinal no combate a outros tipos de patologias, como alergias, rejeição de transplantes, autoimunidade, inflamações crônicas e arteroesclerose (Hermansson et al., 2010). O conhecimento sobre a biologia das células

dendríticas, em franca expansão, tem permitido o desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas na capacidade destas células de modular as respostas imunes adaptativas, inclusive e principalmente aquelas baseadas na indução de linfócitos T (Trumpfheller et al., 2012).

Embora a vacinação utilizando proteínas, complexos protéicos ou subunidades tenha potenciais vantagens como custo, segurança e facilidade de produção, normalmente estes protocolos apresentam problemas de baixa imunogenicidade para células T, mesmo quando altas doses são repetidamente administradas. No entanto, recentemente, alguns grupos têm desenvolvido técnicas para tornar tais protocolos de vacinação baseados em proteínas mais imunogênicos, em especial graças a duas descobertas.

A primeira foi a descrição de novos marcadores moleculares para DCs, que foram em seguida melhor estudados, e verificou-se sua capacidade de mediar, *in vivo*, a captação, o processamento e a apresentação de antígenos. O primeiro destes marcadores descritos foi o receptor CD205, ou DEC205 (Jiang et al., 1995), e a ele se seguiram outros como DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000) e DCIR2 (Flornes et al., 2004). A partir deste conhecimento, surgiu a possibilidade de se direcionar proteínas diretamente para DCs através destes receptores, melhorando a apresentação de antígenos para linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. A segunda foi a descoberta dos TLRs (Lemaitre et al., 1996), como descrito anteriormente, que são capazes de desencadear um complexo de sinalizações intracelulares que culminam na produção de citocinas e quimiocinas por diversos tipos celulares inclusive as DCs. Este conhecimento levantou a possibilidade de se direcionar antígenos para DCs através de receptores específicos, e simultaneamente induzir a maturação destas células pela administração de ligantes de TLRs, garantindo a captura e processamento adequados dos antígenos de interesse, para que fossem apresentados para linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ num contexto de inflamação (Trumpfheller et al., 2012).

Bonifaz et al. (2002) e Hawiger et al. (2001) descreveram inicialmente o direcionamento de antígenos para DCs utilizando o anticorpo α DEC205. Nesses estudos iniciais, o anticorpo α DEC foi conjugado ou fusionado diretamente a antígenos modelo como a ovalbumina (OVA) e lisozima de ovo de galinha (HEL). A administração desses anticorpos híbridos (α DEC-OVA e α DEC-HEL) foi capaz de direcionar os antígenos à população de DCs $CD8^+DEC205^+$ *in vivo*. Os antígenos foram então eficientemente processados e apresentados tanto para células T $CD4^+$ quanto para células T $CD8^+$ transgênicas. Na ausência de inflamação induzida por ligantes de TLR, o direcionamento de antígenos resultou na indução de tolerância periférica, observada pela deleção de células T transgênicas específicas

para o antígeno utilizado. Entretanto, quando os anticorpos foram administrados na presença de um estímulo de maturação para as DCs, como o anticorpo agonista α CD40, houve ativação prolongada de células T $CD4^+$ e $CD8^+$. Além disso, a imunidade induzida foi de longa duração e mais efetiva do que a induzida pela administração da proteína não direcionada na presença de potentes adjuvantes como o adjuvante completo de Freund (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001). Em outro estudo, o mesmo grupo mostrou que camundongos vacinados com o anticorpo α DEC-OVA na presença de α CD40 tornaram-se resistentes a infecção por um vírus vaccínia transgênico expressando OVA (Bonifaz et al., 2004). Além disso, a imunização de animais com o mesmo anticorpo promoveu a ativação de células T $CD4^+$ de memória (Boscardin et al., 2006), importantes para a ativação de linfócitos B antígeno específicos. Os estudos citados acima abriram a possibilidade de se utilizar anticorpos híbridos α DEC205 conjugados a antígenos clinicamente relevantes para a indução de imunidade protetora contra diferentes doenças prevalentes. A primeira doença escolhida foi a AIDS, e a proteína Gag do HIV foi fusionada ao anticorpo α DEC205, uma vez que havia evidências de que respostas imunes mediadas por células T contra essa proteína continham pelo menos alguma capacidade protetora (Edwards et al., 2002; Zuniga et al., 2006). O anticorpo α DEC-Gag foi administrado em uma única dose na presença de Poly (I:C) e α CD40 em camundongos, e observou-se uma resposta melhor quando Gag era direcionada, do que quando era administrada em fusão com um anticorpo inespecífico, Iso-Gag (Trumpfheller et al., 2006). Neste mesmo estudo, observou-se que diversos peptídeos foram apresentados a múltiplos tipos de MHC de camundongos, que a resposta induzida era duradoura, e que os camundongos imunizados resistiam a um desafio utilizando um vírus quimérico Vaccinia-Gag. No entanto, a utilização de α CD40 em humanos é controversa, e o uso de Poly (I:C) como único adjuvante foi testado em seguida, com resultados além do esperado quando foi administrada uma única dose, mas satisfatórios quando uma segunda dose, idêntica à primeira, de α DEC-Gag + Poly (I:C) foi injetada. Após a administração da segunda dose houve inclusive a indução de linfócitos T $CD4^+$ polifuncionais (produtores de diversas citocinas simultaneamente) específicos para peptídeos da proteína Gag e persistentes por pelo menos 7 semanas (Trumpfheller et al., 2008). Embora este estudo não tenha observado forte indução de linfócitos T $CD8^+$ nos camundongos imunizados, um outro trabalho, avaliando a capacidade das DCs apresentarem o antígeno Gag direcionado *in vitro* via α DEC-Gag para linfócitos T de indivíduos infectados pelo HIV, observou a ativação de linfócitos T $CD8^+$ destes pacientes, no contexto de diferentes classes de MHC classe I. Mas, uma vez que estes linfócitos já se encontravam primados, denominou-se o

fenômeno observado de apresentação cruzada (cross-presentation) (Bozzacco et al., 2007). Um estudo mais recente observou o mesmo fenômeno ocorrendo em camundongos, inclusive quando a proteína Gag foi direcionada para outros receptores da mesma população de DCs CD8⁺DEC205⁺, como os receptores Langerina e CLEC9A, ou para o DEC205 (Idoyaga et al., 2011). Este estudo nos permite analisar que os efeitos observados não se devem exclusivamente ao receptor para qual o direcionamento é realizado, mas também, e talvez principalmente, à população de DCs que expressa o receptor específico para o anticorpo quimérico utilizado.

Outras populações de DCs também podem ser alvo desta estratégia de direcionamento, como é o caso das DCs CD8⁻DCIR2⁺, que expressam o receptor DCIR2, alvo do anticorpo específico denominado 33D1. Estudos comparativos utilizando anticorpos α DEC-OVA e 33D1-OVA, demonstraram que quando direcionam-se antígenos para cada uma destas populações na presença de Poly (I:C), observam-se diferenças significativas entre o tipo de resposta celular desenvolvida, sendo que o direcionamento para DCIR2 mostrou-se mais eficiente na apresentação de antígenos para linfócitos T CD4⁺, enquanto o direcionamento para DEC205 foi superior na indução de resposta por linfócitos T CD8⁺ (Dudziak et al., 2007).

Um estudo similar, utilizando anticorpos quiméricos fundidos à proteína LACK de *Leishmania major*, corroborou os dados prévios de que ambas as populações de DCs são capazes de induzir uma resposta de linfócitos T CD4⁺, sendo 33D1 mais eficiente que α DEC. Contudo, ao analisar o perfil de citocinas induzido nestas células, observou-se um perfil mais Th1 induzido pelo direcionamento para o receptor DEC205, com maior número de células produtoras de IFN- γ induzidas quando o antígeno é direcionado para a população de dendríticas que expressam este receptor (Soares et al., 2007).

Em outros estudos envolvendo proteínas de outros patógenos relevantes, Boscardin et al. (2006) utilizaram o anticorpo α DEC205 fusionado à proteína circunsporozoíta (CS) expressa no estágio pré-eritrocítico de desenvolvimento do *Plasmodium yoelii*, agente causador da malária murina. A administração de uma única dose do anticorpo quimérico α DEC-CS, na presença de um estímulo de maturação para as DCs, foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, a indução de resposta imune humoral também foi observada após a administração de uma dose de reforço do anticorpo, na ausência de qualquer outro adjuvante.

Em outro trabalho, macacos *Rhesus* foram imunizados com o anticorpo α DEC205 fusionado à proteína CS de *P. falciparum* na presença de Poly (I:C). Observou-se a indução

de células T CD4⁺ polifuncionais e a produção de anticorpos anti-CS com características neutralizantes, capazes de bloquear em cerca de 43% a invasão de hepatócitos pelo *P. falciparum in vitro* (Tewari et al., 2010).

Mais recentemente, a imunização de primatas com o anticorpo α DEC205 fusionado à proteína Gag, seguida de um reforço utilizando um vírus vaccínia codificando as proteínas Gag, Pol e Nef do HIV, foi capaz de induzir forte resposta celular (Flynn et al., 2011). Além dos ensaios utilizando proteínas do vírus HIV e de *Plasmodium*, a estratégia de direcionar antígenos utilizando os anticorpos α DEC205 e 33D1 foi testada com um antígeno derivado da bactéria *Yersinia pestis* (agente causador da peste pneumônica). Quando a proteína LcrV foi fundida ao anticorpo α DEC205 e administrada a camundongos na presença de estímulos de maturação para as DCs, forte resposta imune celular foi induzida (Do et al., 2008). Além disso, observou-se a indução de resposta humoral com níveis de anticorpos semelhantes àqueles induzidos pela vacina comercial. Da mesma forma, a proteína LcrV direcionada para o receptor DCIR2 foi capaz de induzir proteção contra desafio utilizando uma cepa virulenta (Do et al., 2010). Além de experimentos *in vivo* utilizando camundongos e macacos, o anticorpo α DEC205 também foi utilizado com sucesso para direcionar antígenos para as DCs de humanos *in vitro*. Bozzacco et al. (2007) mostraram que ocorreu ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de IFN- γ quando o anticorpo híbrido α DEC205 fusionado à proteína Gag do vírus HIV foi incubado com DCs provenientes de pacientes soropositivos, e depois reestimuladas com as células T autólogas. Gurer et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram um anticorpo α DEC humano em fusão com o antígeno EBNA-1 do vírus Epstein-Barr.

Novos anticorpos α DEC205 humano foram gerados e selecionados por sua capacidade de reconhecer com alta afinidade o receptor DEC205. Esses anticorpos foram fusionados à proteína Gag de HIV e observou-se a indução de ampla resposta celular quando camundongos transgênicos expressando o DEC205 humano foram utilizados em ensaios de imunização (Cheong et al., 2010). Mais interessante ainda foi o fato de que esses anticorpos, assim como o anticorpo utilizado por Bozzacco et al. (2007), foram também capazes levar à estimulação de células T CD8⁺ *in vitro*.

1.8 O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma doença causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário pertencente a ordem kinetoplastida. O *T. cruzi*

tem como hospedeiros invertebrados os triatomíneos, e como hospedeiros vertebrados, várias espécies de mamíferos. Descoberta por Carlos Chagas, em 1909, a doença disseminou, tornando-se endêmica em muitas regiões, como consequência das precárias condições socioculturais e de habitação em que vive a população exposta (Chagas, 1909). Outro fator contribuinte para esse quadro são as constantes migrações de indivíduos chagásicos para regiões onde existem vetores, fechando assim o ciclo.

Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, mas mais predominantemente na América Latina, sendo que mais de 25 milhões de pessoas estão em áreas de risco, e em 2008 mais de 10 mil pessoas morreram em decorrência da Doença de Chagas (World Health Organization - WHO, 2012).

A Doença de Chagas é transmitida ao homem através do contato de indivíduos com as fezes de triatomíneos infectadas pelo *T. cruzi*. No entanto, há outras formas de transmissão, como por transmissão transfusional, a congênita (materno-fetal), a acidental (contaminação em laboratório), transplante de órgãos e as que ocorrem por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados.

O ciclo evolutivo de *T. cruzi* apresenta três formas distintas. No hospedeiro vertebrado são observadas as formas amastigotas (formas intracelulares) e tripomastigotas sanguíneos, enquanto nos hospedeiros invertebrados são vistas formas epimastigotas, que posteriormente se diferenciarão em tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas, com aproximadamente 25 µm de comprimento são caracterizados pela presença do cinetoplasto (mitocôndria modificada rica em DNA) localizado entre o núcleo e a porção posterior e o flagelo que atravessa toda a extensão do corpo do parasita e que se externaliza com um pequeno segmento ondulante. Os amastigotas, com aproximadamente 4 µm de diâmetro, são caracterizados pelo formato arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo interno e ausência de membrana ondulante. Os epimastigotas possuem 20 a 40 µm de comprimento, têm forma de fuso, cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido.

A forma tripomastigota é a forma infectante, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e na porção final do aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota faz parte do estágio intracelular do parasita no organismo do hospedeiro invertebrado (Siqueira-Batista et al., 1996).

O ciclo biológico do parasita envolve o hospedeiro invertebrado que se infecta por meio da ingestão de sangue de animais ou do homem infectado, contendo tripomastigotas sanguíneos. Essas formas passam por transformações no tubo digestivo dos triatomíneos e se

diferenciam em epimastigotas, as quais se dividem por divisão binária no intestino do inseto, e posteriormente, retornam à forma tripomastigota metacíclica.

Eles são transmitidos ao hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) através da deposição das fezes que os insetos realizam logo após a alimentação, onde são eliminadas as formas tripomastigotas metacíclicas que penetram em células das camadas subjacentes a pele do hospedeiro vertebrado. Uma vez dentro das células, esses tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam, fazendo com que essas células fiquem repletas de parasitas. Depois os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados na corrente sanguínea e podem ser ingeridos pelo hospedeiro invertebrado, perpetuando assim o ciclo (Brenner, 1973; Burleigh e Andrews, 1995; Tanowitz et al., 1992) (FIGURA 1).

Figura 1- O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Organização Mundial da Saúde [(2012)].

A doença de Chagas caracteriza-se por apresentar duas fases clínicas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda é determinada pela presença de tripomastigotas no sangue do hospedeiro e possui uma duração variável tanto na infecção humana quanto na experimental (Prata, 1994). Pode apresentar sinal de porta de entrada aparente, como o Sinal de Romanã, que é um edema ocular bipalpebral unilateral, ou Chagoma de Inoculação. Esta fase da

doença apresenta o aparecimento de uma miocardite, sendo detectada na maioria das vezes através de eletrocardiograma.

Passada a fase aguda, aparente ou inaparente, o hospedeiro entra na fase crônica da doença caracterizada pela escassez de parasitos no sangue ou nos tecidos, sendo detectáveis por técnicas de imunohistoquímica ou de amplificação de DNA do parasito (Jones et al., 1993; Lages-Silva et al., 2001; Vago et al., 1996).

A fase crônica apresenta as seguintes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista, sendo a indeterminada mais frequente. A fase crônica pode durar de 10 a 30 anos, o hospedeiro pode apresentar exames sorológicos e de xenodiagnósticos positivos na ausência de parasitemia patente, ou nas formas mais severas podem surgir sintomas relativos a lesões irreversíveis no coração, esôfago e/ou cólon, mesmo que a quantidade de parasitos seja escassa.

1.9 Imunologia na Doença de Chagas

Na doença de Chagas, o *T. cruzi* desenvolve nos hospedeiros vertebrados dois estágios do seu ciclo de vida que são biológica e morfologicamente distintos, com capacidade de ativar moléculas e células do sistema imune. Os tripomastigotas extracelulares são formas flageladas e não proliferativas, que circulam no sangue e são alvos potenciais de anticorpos e da lise mediada por complemento, assim como da fagocitose e morte por fagócitos ativados. Vários grupos já mostraram a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* em pacientes e modelos experimentais (Aliberti, et al., 1999; Brener, 1976; Brener e Gazzinelli, 1997).

Nos primeiros 7 a 10 dias após a infecção, antes da imunidade adquirida estar totalmente ativada, respostas inatas desempenham um papel chave contendo a parasitemia através da ação de mediadores microbicidas, como os reativos de oxigênio (ROIs), cuja produção é aumentada pela ação de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF α , e IFN- γ) liberadas por macrófagos, células *natural killer* (NK) e células T $\gamma\delta$ (Sardinha et al., 2006; Vespa et al., 1994). Em seguida, adquire-se imunidade mediada pelas células T-auxiliar 1 (T-helper 1, Th1) que é crucial para o controle da parasitemia e sobrevivência do hospedeiro. A liberação de IFN- γ por células T CD4⁺ Th1 induz a ativação de células fagocíticas para matar o parasita. Linfócitos Th1 também proporcionam ajuda para a produção adequada de anticorpos e para células T CD8⁺ citotóxicas. O bloqueio de qualquer destas respostas adaptativas (anticorpos, mas principalmente células T CD8⁺) resulta em níveis de parasitemia não controlados (Kumar e Tarleton, 1998; Padilla et al., 2009; Tarleton et al., 1996). Apesar

do controle da carga parasitária por diferentes respostas efetoras, isso não é suficiente para a eliminação do parasita, levando a cronificação da infecção. As diferentes formas do parasito são alvos potenciais de respostas imunes diferentes do hospedeiro. A forma tripomastigota circula pelo sangue estando assim exposta a destruição por anticorpos ou através da lise mediada pelo complemento, assim como por fagócitos ativados. Os antígenos de superfície dos tripomastigotas são candidatos naturais a produzir um tipo de resposta humoral protetora (Camargo, 2009).

As formas amastigotas, que se limitam ao ambiente intracelular, são, portanto inacessíveis à ação dos anticorpos circulantes. Nessa forma a defesa é por conta da imunidade celular, mediada pelos linfócitos T, que reconhecem as células infectadas por antígenos expressos na superfície celular (Abbas e Lichtman, 2003).

As DCs possui um papel importante na imunidade anti-*T. cruzi*. Além disso, diferentes moléculas de superfície do parasito têm sido identificadas como indutoras de imunidade inata, dentre elas há as âncoras de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol), e a enzima trans-sialidase (TS). Na fase crônica há a produção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10 (resposta perfil Th1) (revisado por Gazzinelli e Denkers, 2006).

1.10 Proteína 2 da Superfície do Amastigota (ASP-2)

O sucesso do *T. cruzi* em manter seu ciclo de vida está relacionado a sua capacidade de causar uma infecção crônica no hospedeiro vertebrado, favorecendo assim seu encontro com o inseto vetor. Portanto, para manter a infecção latente, um balanço entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro é importante e necessário (Brener e Krettli, 1990). A resistência do hospedeiro à doença de Chagas é dependente tanto da imunidade inata como da adquirida, requerendo a combinação de macrófagos, células “Natural Killer” (NK), linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ bem como a produção de anticorpos por linfócitos B (revisado por dos Reis, 1997). Várias proteínas do *T. cruzi* foram descritas como importantes alvos na indução da resposta imune contra este parasita. Algumas destas proteínas pertencem a superfamília das sialidases/trans-sialidases. O sequenciamento do genoma do parasita mostrou que esta família de proteínas é a que apresenta maior número de representantes, com um total de 1430 genes (Atwood et al., 2005; El-Sayed et al., 2005). Boa parte destes genes apresentam códons de terminação precoces podendo ser considerados pseudo-genes (Boscardin et al., 2003). No entanto, as proteínas desta superfamília que são expressas são alvos para linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 no homem (Ribeirão et al., 2000) e no camundongo (Boscardin et al., 2003;

Machado et al., 2006; Millar et al., 1999; Rodrigues et al., 1999; Santori et al., 1996; Vasconcelos et al., 2004; Wrightsman et al., 1994). Além disso, são também alvos para linfócitos T CD8⁺ Tc1 no homem (Wizel et al., 1998) e no camundongo (Wizel et al., 1997; Rodrigues et al., 1999; Vasconcelos et al., 2004; Machado et al., 2006; Hoft et al., 2007; Silveira et al., 2008). Por fim, há evidências que estas moléculas são alvos de anticorpos capazes de inibir a infecção experimental pelo *T. cruzi* (Araguth et al., 1988; Chuenkova e Pereira, 1995; Gonzalez et al., 1991).

A superfamília das sialidases/*trans*-sialidases pode ser dividida em quatro grupos (I, II, III e IV). A proteína 2 de superfície dos amastigotas (ASP-2) pertence ao grupo II e é uma glicoproteína que não apresenta atividade de sialidase/*trans*-sialidase. Foi inicialmente clonada na cepa Brazil (Low e Tarleton, 1997) e posteriormente na cepa Y (Boscardin et al., 2003). Sua massa molecular é aproximadamente 83kDa e, após análise de sua sequência, observou-se que ela possui os motivos Asp Box, VTV Box e uma região hidrofóbica carboxi-terminal para a adição da âncora GPI.

O isolamento dos genes codificando a proteína ASP-2 de diferentes cepas de *T. cruzi* permitiu o início de estudos que visavam avaliar a capacidade protetora da mesma em ensaios de imunização. Para tanto, foram utilizados tanto plasmídeos codificando a sequência desta proteína quanto proteínas recombinantes produzidas em bactéria (Boscardin et al., 2003; Tarleton et al., 1997). Vários estudos em modelos murinos demonstraram que a proteína ASP-2 é alvo da imunidade protetora, mesmo contra infecções com diferentes cepas de *T. cruzi*. Além de induzir linfócitos T CD4⁺ Th1 e CD8⁺ Tc1 específicos, a ASP-2 também foi capaz de induzir uma resposta mediada por anticorpos. Mais importante, a imunização com plasmídeos ou proteínas recombinantes foi capaz de reduzir a parasitemia e mortalidade dos animais após desafio experimental com parasitas das cepas Y (Araujo et al., 2005; Boscardin et al., 2003; de Alencar et al., 2007; Vasconcelos et al., 2004) ou Brazil (Fralish e Tarleton, 2003; Garg e Tarleton, 2002). Quando uma linhagem de camundongos (A/Sn) altamente susceptível à infecção pela cepa Y de *T. cruzi* foi imunizada com um plasmídeo codificando para o gene ASP-2, observou-se que os animais imunizados com este gene sobreviveram ao desafio quando comparados aos animais imunizados com o plasmídeo controle. Na tentativa de desvendar os mecanismos que estariam por trás da proteção obtida nos camundongos A/Sn, várias construções contendo porções da proteína ASP-2 foram obtidas e conseguiu-se restringir a resposta de células T CD8⁺ citotóxicas a um forte epítipo (TEWETGQI) presente nesta proteína (Araujo et al., 2005; Tzelepis et al., 2006). Além disso, também já foram testados adenovírus recombinantes contendo o gene da ASP-2. Duas linhagens de

camundongos foram testadas e apresentaram uma redução significativa na parasitemia quando imunizadas com os dois tipos de adenovírus, além de apresentarem uma sobrevida de 100%. Essa imunidade protetora mostrou-se duradoura, já que os animais protegidos sobreviveram por pelo menos 14 semanas (Machado et al., 2006). Proteção duradoura também foi obtida em camundongos A/Sn imunizados com uma proteína recombinante derivada da ASP-2 (chamada GST-P4P7) na presença de adjuvante CpG ODN 1826 (de Alencar et al., 2007). Os resultados descritos acima mostram que a proteína ASP-2 é bastante imunogênica e poderá vir a constituir-se em um alvo interessante para o desenvolvimento de intervenções contra a doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivo principal deste projeto é analisar as respostas imunes celular e humoral geradas através da administração de um anticorpo quimérico α DEC205 em fusão com a proteína ASP-2 do parasita *T. cruzi* na presença de estímulos de maturação para as DCs.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonagem da sequência de DNA da proteína ASP-2 em fusão com a sequência do anticorpo α DEC205 e de um isotipo controle (ISO);
- produção dos anticorpos quiméricos por transfecção transiente de células HEK293T e purificação dos mesmos à partir dos sobrenadantes das culturas;
- imunização de camundongos com os anticorpos quiméricos α DEC205-ASP-2 e ISO-ASP-2 ou com a proteína ASP-2 recombinante na presença de estímulos de maturação para as DCs (Poly (I:C) e CpG ODN);
- análise das respostas imunes humoral e celular anti-ASP-2 geradas pelas diferentes combinações;
- desafio dos animais imunizados com formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeas BALB/c ou A/J com idades entre 6-8 semanas foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo e do Biotério da Universidade de Campinas (CEMIB - Unicamp). Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF) durante o curso dos estudos. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética de experimentação animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 082).

3.2 Preparação de Bactérias Competentes

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5 α ou BL21DE3 foi inoculada em 3 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani, Invitrogen), seguindo incubação por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). O inóculo foi então diluído em 200 mL de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação constante até que a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) estivesse entre 0,6-0,8. O recipiente contendo as bactérias foi então incubado em gelo por 30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.400 X g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, as bactérias foram ressuspensas em 75 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M e incubadas em gelo por 12 horas. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado bacteriano foi ressuspensado em 2 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M/glicerol 15%. As bactérias foram então dispensadas em alíquotas de 50 μ L, congeladas rapidamente em gelo seco contendo álcool e posteriormente estocadas a – 70 °C.

3.3 Transformação de Bactérias Competentes

Para as transformações, 50-100 ng do DNA plasmidial foram adicionados a tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 10 μ L de bactérias competentes e 90 μ L da solução de CaCl₂ 0,1 M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42 °C por exatamente 40 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 100 μ L de meio LB e os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sob agitação (200 rpm). O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido contendo 100 μ g/mL de

ampicilina ou 50 µg/mL de kanamicina (dependendo do plasmídeo utilizado) que foram incubadas a 37 °C durante a noite para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

3.4 Obtenção dos Plasmídeos Codificando para as Cadeias Leve e Pesada dos Anticorpos αDEC205 e Isotipo (ISO)

Os plasmídeos contendo as cadeias leves e pesadas dos anticorpos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University, Nova York). Cada plasmídeo da cadeia pesada codifica para a porção variável do anticorpo de interesse (anti-DEC205 ou ISO) seguida da porção constante da IgG1 de camundongo e de uma sequência “linker” (ASDMAKKETVWRLEEFGRF) (Hawiger et al., 2001). Todas as sequências dos genes de interesse foram clonadas em fase com estas sequências.

3.5 Clonagem da Sequência de DNA da Proteína ASP-2 em Fusão com a Sequência dos Anticorpos αDEC205 e Isotipo Controle

O plasmídeo contendo o gene que codifica para a porção de 65kDa da proteína ASP-2 foi gentilmente cedido pelo Dr. Mauricio Rodrigues (Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Boscardin et al., 2003).

Para a clonagem utilizamos preferencialmente as enzimas de restrição *XhoI/NotI* (New England Biolabs) exatamente como descrito por Hawiger et al. (2001). Os plasmídeos recombinantes foram então crescidos em larga escala e purificados utilizando-se os Kits “QIAGEN Plasmid Maxi Kit” (Qiagen, São Paulo, SP., Brasil), como descrito pelo fabricante. A sequência correspondente aos aminoácidos 78 à 694 da proteína ASP-2 (Boscardin et al., 2003) foi amplificada por PCR (Fynnzyme, New England Biolabs) utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos:

ASP2-senso

5'- GGCTCGAGGAGTTCGGTAGGTTCCCTCAATGGGTCGATATTTTTG-3' e

ASP-2-antisenso

5'- GGGCGGCCGCTCAGACCATTTTTAGTTCACCAAC -3'.

Os oligonucleotídeos foram obtidos da Invitrogen na escala de síntese de 25 nM e diluídos em estoques de 50 µM em água MilliQ. As reações de PCR foram feitas utilizando-se a enzima “Pfu DNA Polymerase” (Stratagene), seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, para cada 40 ng de DNA molde adicionou-se tampão Pfu 1X, 0,2 mM de dNTP,

0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e 1,25 U da enzima Pfu DNA Polymerase. As reações de amplificação foram feitas da seguinte maneira: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1-2 minutos (dependendo do tamanho do gene a ser amplificado). O ciclo de extensão foi feito a 72 °C por 10 minutos. Acrescentou-se então 1U da enzima Taq DNA polimerase e as reações foram incubadas por mais 15 minutos a 72 °C. As amostras foram misturadas com tampão de amostra e analisadas imediatamente em géis de agarose 1%.

3.6 Clonagem do Gene ASP-2 de *T. cruzi* em Fusão com os Plasmídeos Codificando as Cadeias Pesadas dos Anticorpos α DEC205 e ISO-ASP-2

Os produtos de PCR amplificados foram clonados no vetor pCR2.1 utilizando-se o “TA cloning kit” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da ligação foram então transformados em bactérias DH5 α e plaqueados em placas de LB sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina (LB/AMP). Além de ampicilina, cada placa foi também tratada com 40 μ L de X-gal (40 mg/mL, Sigma) e 40 μ L de IPTG (100 mM, Amresco). Este tratamento permitiu que as colônias fossem separadas em brancas (contendo inserto) e azuis (sem inserto). Cinco colônias brancas foram então crescidas meio LB/AMP por 16 horas a 37 °C e sob agitação constante (~200 rpm). Os plasmídeos foram então extraídos por maxi-prep. Cerca de 1-3 μ g dos plasmídeos pCR2.1 contendo o gene ASP-2 foram digeridos com 5U das combinações das enzimas de restrição *Xho* I/*Not* I (New England Biolabs) na presença de tampão adequado (1X), a 37 °C por 2-16 horas. Os fragmentos de DNA equivalentes aos tamanhos dos genes de interesse foram separados por eletroforese e purificados dos géis utilizando-se o “Qiaquick gel extraction kit” (QIAGEN). Paralelamente, 2 μ g dos plasmídeos contendo as cadeias pesadas do anticorpo α DEC foram digeridos com 5 U da combinação das enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I na presença de tampão adequado (1X), a 37 °C por 2-16 horas. A separação e purificação dos fragmentos de DNA foram feitas conforme descrito acima. Após a purificação, os DNAs foram dosados e as ligações foram realizadas utilizando-se 1 U da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) e 1X tampão de ligação contendo ATP em 10 μ l de reação. Considerou-se então uma proporção molar de 3:1 entre inserto: vetor e cerca de 50 ng de vetor foram utilizados em cada ligação, seguindo a seguinte fórmula:

[tamanho do inserto (pb) X quantidade do vetor] / tamanho do vetor (pb) = quantidade do inserto (ng).

As ligações aconteceram a 14 °C pelo período de 16-18 horas e foram transformadas em bactérias DH5 α . Cerca de quatro colônias obtidas de cada ligação foram crescidas, tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos com as enzimas *Xho* I/*Not* I, conforme descrito acima. Os plasmídeos contendo insertos de tamanho correto foram sequenciados. Os plasmídeos contendo as sequências corretas foram designados: pDEC-ASP-2 e pISO-ASP-2.

3.7 Produção dos Anticorpos Quiméricos por Transfecção Transiente de Células HEK293T e Purificação dos Mesmos à partir dos Sobrenadantes das Culturas

Foram utilizadas placas de 150mm (Costar ou TPP) posteriormente semeadas com $7,5 \times 10^6$ células HEK293T (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Armando Moraes Ventura, Universidade de São Paulo, Departamento de Microbiologia, São Paulo) em meio DMEM, acrescido de 2 mM L-glutamina, 10 U/mL antibiótico-antimicótico, 1mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência estava em torno de 70%), o meio das placas foi substituído por meio DMEM contendo os aditivos acima, sendo o soro fetal bovino substituído por 1% de nutridoma (Roche, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, as células foram transfectadas utilizando-se 10 μ g de cada um dos plasmídeos que codificam para as cadeias leve e pesada dos anticorpos α DEC em fusão com a proteína ASP-2 na presença de polietilenimina (0,45 mg/mL, Sigma). Brevemente, os 10 μ g de cada plasmídeo foram dissolvidos em 1 mL de uma solução de 150 mM de NaCl. Após curta agitação, 100 μ L de uma solução de polietilenimina 0,45 mg/mL foram adicionados e a mistura foi submetida a agitação por 10 segundos, seguida de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. O volume final de 1,1 mL foi então adicionado a cada placa utilizando-se uma pipeta de 1 mL. Após 5-7 dias em cultura, os sobrenadantes das culturas foram coletados, filtrados e então precipitados em uma solução contendo 60% de sulfato de amônio (Sigma, São Paulo, SP, Brasil). Os precipitados foram coletados por centrifugação e re-dissolvidos em PBS. Após uma diálise de 4 horas em PBS, os anticorpos quiméricos foram purificados utilizando-se “beads” de proteína G (Amersham-Pharmacia) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

3.8 Avaliação da Integridade dos Anticorpos Quiméricos e da Proteína ASP-2 Fusionada a Eles

A integridade dos anticorpos foi analisada em gel de SDS-PAGE 12% em condições redutoras (aquecimento a 95 °C por 5 minutos na presença de DTT) seguido de coloração por Coomassie Blue. A concentração dos anticorpos foi obtida utilizando-se uma curva padrão de IgG1 (BD biosciences) e o reagente de Bradford (Amresco). Os anticorpos quiméricos foram então aliquotados e estocados a -20 °C até uso. Também avaliamos a integridade da proteína ASP-2 fusionada aos anticorpos através da detecção desta em ensaio de Western Blot. Brevemente, 1 µg de cada um dos anticorpos (α DEC-ASP-2 e ISO-ASP-2) ou de um anticorpo controle negativo (α DEC-CS, contendo a proteína circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum*) foram aplicados em um gel de SDS-PAGE 12% e submetidos a uma corrente elétrica fixa em uma cuba de eletroforese. O Gel foi então retirado, e montado sobre uma membrana de nitrocelulose em aparato específico para transferência. Aplicou-se uma corrente fixa de 100 V por 2 h para que as proteínas do gel migrassem para a membrana de nitrocelulose que foi então recuperada, avaliando-se a transferência por coloração com corante Ponceau S. A membrana foi então bloqueada por 12 h em PBS + 0.05% Tween20 + 5% leite desnatado, e marcada utilizando-se um como primário um anticorpo monoclonal anti-ASP-2 (clone K2₂) (Claser et al., 2007) na concentração de 1:2000. Após lavagem com PBS+Tween20 0.05% diluímos a proteína A-HRP (Invitrogen) em PBS + 0.05% Tween20 + 5% leite desnatado na concentração de 1:5000 e incubamos por mais 1 h. Após 3 lavagens com PBS+Tween20 0.05%, revelamos a membrana em filme fotográfico (Amersham Hyperfilm ECL - Ge Healthcare).

3.9 Ensaio para Detecção de LPS

Para dosagem de LPS nas amostras contendo os anticorpos quiméricos, utilizou-se o kit QCL-1000 (Lonza). Brevemente, 5 µg de cada anticorpo quimérico foram diluídos em um volume final de 50 µL de água livre de pirógeno. Em seguida, cada amostra foi incubada a 37 °C. Após estabilização da temperatura, foram adicionados 50 µL de lisado de amebócitos de limulus. Após incubação a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 100 µL de uma solução cromógena, seguindo incubação por mais 6 minutos. A reação foi parada adicionando-se 50 µL de ácido acético a 25%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com DO_{405nm}. Uma

curva contendo concentrações conhecidas de LPS (1, 0.5, 0.25 e 0.125 EU/mL) foi diluída juntamente com as amostras.

3.10 Ensaio de Ligação dos Anticorpos Híbridos a Células CHO Expressando os Receptores DEC205 de Camundongo, e DEC Humano

Os anticorpos purificados foram diluídos nas seguintes concentrações: 10, 1, 0,1 µg/ml. Estes anticorpos foram então incubados com 100.000 células CHO expressando constitutivamente os receptores DEC205 (CHO-DEC), DCIR2 (CHO-DCIR) ou DEC humano (CHOhuman-DEC), gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University). Como controle negativo, as mesmas concentrações de anticorpos foram incubadas com células CHO que expressam o receptor DEC205 humano e o receptor DCIR de camundongo. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS+2% soro fetal bovino) e incubadas com um anticorpo secundário anti-camundongo marcado com PE (Jackson Laboratories) na diluição de 1:2000. As amostras foram então lidas em citômetro de fluxo (FACS Calibur ou FACS Canto) e analisadas utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

3.11 Clonagem, Expressão e Purificação da Proteína Recombinante ASP-2 Produzida em Bactérias

O vetor pHIS-65kDa que possui a sequência dos aminoácidos 78 a 694 da proteína ASP-2 (Boscardin et al., 2003) foi gentilmente cedido pelo Dr. Mauricio M. Rodrigues (Universidade Federal de São Paulo, São Paulo). Esse plasmídeo foi transformado com bactérias BL21DE3 e selecionado por crescimento em placa de meio LB-Ágar + Ampicilina 100 µg/mL, através da presença de um gene de resistência ao antibiótico Ampicilina no vetor. Uma colônia que apresentava o vetor com o inserto do gene *ASP-2* foi selecionada e cultivada em 500 mL de meio LB (Luria Broth - Amresco) + Ampicilina a 37 °C e sob agitação constante até atingir OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Então, adicionou-se 1 mM de IPTG (uma molécula análoga ao repressor do operon *lac* que compete pelo sítio do repressor, e permite a expressão das moléculas sob controle deste operon), e incubamos a cultura a 37 °C por overnight sob agitação constante. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em PBS 1 X, dividida em eppendorfs (com 1 mL/eppendorf) e nesta adicionou-se 250 µL de tampão de amostra. A lise ocorreu no gelo com o auxílio de um sonicador (Branson Sonifier

Ultrasonic Processor 450, USES). Três ciclos de sonicação foram aplicados consistindo de pulsos de 5 minutos com 5 minutos de intervalo na potência 45. O lisado bacteriano foi centrifugado a 18.000 X g por 30 minutos a 4 °C. A proteína foi então corrida em gel grande de SDS-PAGE 10%, e posteriormente extraídas do gel com auxílio de tampão de KCl 3M congelado, cujo tampão destacava a banda da proteína. O gel contendo a proteína foi então colocado em falcon de 50mL e adicionado água MiliQ, e colocado sob agitação overnight. O sobrenadante foi então filtrado, e as proteínas foram testadas por coloração com Reagente de Bradford (Amresco, São Paulo, SP, Brasil) e as amostras positivas para a presença de proteína foram separadas e testadas em gel de SDS-PAGE 12% para confirmar sua pureza.

3.12 Imunização de Camundongos com os Diferentes Anticorpos Quiméricos na Presença de Diferentes Estímulos de Ativação para as DCs e Análise da Resposta Imune Celular Gerada pelas Diferentes Combinações

Para os estudos envolvendo a proteína ASP-2 do parasita *T. cruzi*, o delineamento experimental foi o seguinte: grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados (intraperitonealmente) nas seguintes condições descritas abaixo.

Camundongos fêmeas BALB/c e A/J receberam duas doses dos anticorpos quiméricos na presença de diferentes estímulos de maturação para DCs. Esses camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo A:

1. anticorpo α DEC-ASP-2 (5 μ g/camundongo) na presença de 50 μ g de Poly (I:C);
2. anticorpo Iso-ASP-2 (5 μ g/camundongo) na presença de 50 μ g de Poly (I:C);
3. ASP-2 recombinante (2,32 μ g/camundongo) na presença de 50 μ g de Poly (I:C);
4. 50 μ g de Poly (I:C).

Grupo B:

1. anticorpo α DEC-ASP-2 (5 μ g/camundongo) na presença de 25 μ g de CpG ODN 1826;
2. anticorpo Iso-ASP-2 (5 μ g/camundongo) na presença de 25 μ g de CpG ODN 1826;
3. ASP-2 recombinante (2,32 μ g/camundongo) na presença de 25 μ g de CpG ODN 1826;
4. 25 μ g de CpG ODN 1826.

Uma dose de reforço nas mesmas condições descritas acima foi dada 40 dias após a imunização primária.

As condições específicas de cada experimento serão descritas na seção de Resultados. Sangrias foram realizadas nos animais 7 dias antes e 14 dias após a administração da segunda dose. Para os experimentos envolvendo cultura celular, os animais foram sacrificados 2 semanas após a segunda imunização.

3.13 Ensaio ELISPOT para Análise do Número de Células Produtoras de IFN- γ

Para o ensaio de ELISPOT, utilizou-se o kit “Ready-SET-Go!” (eBioscience) para detecção de IFN- γ e placas de nitrocelulose com 96 poços (MAIPS 4510, Millipore). As placas foram cobertas com 100 μ L/ poço de tampão estéril contendo o anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de captura diluído 250x. Após incubação em período noturno a 4 °C, a solução contendo o anticorpo monoclonal foi removida em ambiente estéril e as placas foram então lavadas 3 vezes com tampão estéril. As placas foram bloqueadas pela incubação dos poços com 200 μ L de meio RPMI (GIBCO) contendo 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) por, pelo menos, 2 horas a 37 °C. As células respondedoras foram obtidas dos baços de 2-3 camundongos imunizados com os diferentes anticorpos híbridos ou controles. As hemácias foram lisadas na presença do tampão ACK (EDTA 0,1mM, NH_4Cl 0,15 mM, KHCO_3 1 mM). As células foram então lavadas 3 vezes com meio RPMI, ressuspensas em meio RPMI completo contendo 10% de soro fetal bovino (R10) e 30 U de IL-2 humana recombinante e diluídas para uma concentração de 3×10^6 células/mL.

Cada suspensão contendo 100 μ L de células respondedoras foi pipetada individualmente em cada poço, seguida de mais 100 μ L do antígeno diluído na concentração desejada. As placas foram incubadas em condições estáticas por 18-20 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Depois da incubação, as células foram desprezadas. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween20 0,05% (PBS-T0,05). Cada poço recebeu então 100 μ L do anticorpo monoclonal anti-camundongo biotinilado diluído 250 x em tampão “assay buffer 1 x” contido no kit. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem das placas por 3 vezes com PBS-T0,05. Adicionou-se então estreptavidina-peroxidase diluída 250 x em “assay buffer 1x” em volume final de 100 μ L/poço. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e então lavadas 3 vezes com PBS-T0,05 e mais 2 vezes com PBS. As placas foram reveladas adicionando-se 100 μ L/poço do substrato

cromogênico contido no kit AEC (Becton Dickinson) seguindo por mais 45 minutos de incubação a 37 °C. A reação foi interrompida descartando-se a solução substrato e lavando-se as placas com água corrente. As placas foram então secas à temperatura ambiente e os “spots” foram contados em contador automatizado (AID GmbH).

3.14 Análise da Sobrevivência dos Animais Imunizados após Desafio Utilizando Formas Tripomastigostas da Cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

O desafio dos animais foi feito com tripomastigotas sanguíneos, gentilmente cedido pelo Instituto Dante Pazzanese. Diferentes grupos de 5 camundongos BALB/c e A/J foram imunizados intraperitonealmente com 2 doses (5 µg/animal) dos diferentes anticorpos quiméricos e 50 µg de Poly (I:C), ou somente com Poly (I:C) ou veículo. Vinte dias após a segunda dose, os animais foram desafiados de acordo com o seguinte protocolo: os animais foram inoculados intraperitonealmente com uma mistura de meio RPMI e 10^4 parasitas em 200 µL. A parasitemia desses camundongos começou a ser monitorada a partir do 5º dia após o desafio. A parasitemia foi feita com 5 µL de sangue extraído da cauda do camundongo, e contados 40 campos com lâmina de 11X11mm. O valor total de parasitas foi então multiplicado por 8000, resultando no meu valor total de parasitas/mL. A mortalidade foi acompanhada até a morte de todos os animais do grupo controle ou por 30 dias após o desafio.

3.15 Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA para a detecção dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados foi realizado da seguinte maneira: foram utilizadas placas de ELISA (“High binding”, Costar). A cada poço foram adicionados 250 ng da proteína ASP-2 diluída em PBS 1 X. As placas foram então deixadas à temperatura ambiente por 16-18 horas e posteriormente lavadas três vezes com a solução de PBS-Tween20 (Synth) 0,02%. Cada poço foi então bloqueado com 150 µL de uma solução de bloqueio (PBS-T0,02+5% leite desnatado + 1% BSA, AMRESCO) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas com 100 µL dos soros (diluídos em PBST0,2 + leite 5% + BSA 0,25%) em diluições seriadas (fator de diluição 3). As placas foram então lavadas por 3 vezes com PBS-T0,02 e o anticorpo secundário contendo anti-IgG de camundongo ligada a peroxidase (Jackson Laboratories) diluído em PBS-T0,02 + leite 5% + BSA 0,25% na proporção de

1:10.000 foi adicionado e incubado por mais 2 horas à temperatura ambiente (50 µL/poço). Após três lavagens com PBS-T0,02, cada poço recebeu 100 µL do substrato preparado da seguinte maneira: 10 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de uma solução contendo fosfato de sódio (Synth, São Paulo, SP, Brasil) 0,2 M e ácido cítrico (Synth) 0,1 M (pH 4,7) acrescido de 10 µL de H₂O₂ 30%. Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de uma solução de H₂SO₄ (Synth) 4N. As placas foram lidas em leitor BioTek ELx800 (Biotek) em comprimento de onda de 595 nm. Considerou-se como valor de título o primeiro valor de diluição em que a DO_{490nm} observada fosse superior a 0,1. Os gráficos foram construídos utilizando-se o valor do log da diluição correspondente ao título encontrado.

3.16 Ensaio de proliferação por diluição do corante CFSE

Foram separados 50×10^6 esplenócitos em um volume final de 1 mL. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS previamente aquecido a 37 °C contendo o corante CFDA na concentração de final de 1,25 µM (Vybrant CFDA SE – Cell Tracer Kit, Molecular Probes). As células foram então incubadas a 37 °C por 10 minutos em banho-maria e agitadas a cada 2 minutos para se obter uma marcação homogênea. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1.000 xg por 5 minutos e lavadas por 3 vezes com o dobro do volume usado na marcação. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de R10 e contadas novamente. Cada poço recebeu 3×10^5 células. As placas foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 5 dias. Após este período, as placas foram centrifugadas, lavadas em tampão FACS e as triplicatas foram combinadas em um único poço. A marcação fenotípica foi feita com os seguintes anticorpos: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-PE-Cy7 e anti-CD3-APC-Cy7 por 45 minutos em tampão FACS e no gelo. As placas foram lavadas por 3 vezes com tampão FACS e as amostras lidas no citômetro FACS Canto.

3.17 Análise dos Resultados

Análises estatísticas de significância foram realizadas através do teste ANOVA seguido de Tukey para comparação entre os diferentes grupos experimentais. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5, e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação e Clonagem dos Genes ASP-2 de *T. cruzi* em Fusão com os Genes que Codificam as Cadeias Pesadas de Anticorpos α DEC205 e Isotipo Controle

Os plasmídeos contendo as cadeias pesadas dos anticorpos α DEC e isotipo controle foram gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University, EUA). As sequências de nucleotídeos correspondentes às porções variáveis de cada um dos anticorpos foram clonadas à partir dos hibridomas originais NLDC-145 e GL-117 (Hawiger et al., 2001) que foram gerados em rato. A porção variável de cada um dos anticorpos foi clonada em fusão com uma sequência de IgG1 de camundongo mutada no sítio reconhecido pelo receptor de Fc para evitar a ligação do mesmo à receptores Fc presentes em outras células do sistema imune. Além disso, a substituição da porção constante do anticorpo de rato pela porção constante de camundongo visou minimizar a geração de resposta imune contra o próprio anticorpo. Desta forma, as porções constantes são muito parecidas em todos os anticorpos enquanto que são as porções variáveis que diferem mais significativamente, pois são elas que apresentam especificidades de ligação diferentes.

O fragmento correspondente a proteína ASP-2 (porção equivalente a 65 kDa da ASP-2, aminoácidos 78 a 694) (Boscardin et al., 2003) foi amplificado por PCR usando-se oligonucleotídeos específicos (FIGURA 2A) e clonado no vetor pCR 2.1. Após sequenciamento para detecção de alguma mutação, um clone correto foi digerido com as enzimas *XhoI* e *NotI* (FIGURA 2B). Os fragmentos foram então subclonados em fase com as cadeias pesadas dos anticorpos α DEC205 e isotipo controle em dois vetores conhecidos como pDEC e pIso, respectivamente. Foram então gerados os plasmídeos pDEC-ASP-2 e pIso-ASP-2. A FIGURA 2C mostra um clone de cada plasmídeo digerido com as enzimas *Nhe I* e *Not I* onde se pode observar a liberação de um fragmento de aproximadamente 1850 pb.

Figura 2 - Amplificação e clonagem da sequência de DNA correspondente à porção de 65kDa da proteína ASP-2.

(A) A reação de PCR foi realizada na presença ou ausência do plasmídeo contendo o DNA molde utilizando os pares de oligonucleotídeos baseados na sequência do gene da ASP-2. (B) Os produtos de PCR foram clonados em vetor pCR2.1 e o DNA de 2 clones derivados de cada ligação foi posteriormente digerido com as enzimas *Xho I* e *Not I*. Os fragmentos liberados foram então subclonados nos vetores pDEC e pISO. (C) Digestão dos plasmídeos pDEC e pISO com as enzimas *Nhe I* e *Not I*. Os fragmentos foram separados em géis de agarose 1% e as bandas equivalentes a 2 kb do padrão de peso molecular estão indicadas. O fragmento correspondente a ASP-2 deve ter o tamanho de 1851 pb.

Fonte: Rampazo (2012)

4.2 Transfecção de Células HEK293T e Purificação dos Anticorpos Quiméricos

Inicialmente, transfectamos células HEK293T com as cadeias leve e pesada dos anticorpos α DEC ou Isotipo em fusão com a proteína ASP-2 de *T. cruzi*. Após sua purificação, cada um dos anticorpos foi dosado pelo ensaio de Bradford e, confirmadas as concentrações por gel de SDS-PAGE, testado para contaminação com LPS. Nenhum dos anticorpos apresentou contaminação por LPS detectável no ensaio (dados não mostrados). Os géis de SDS-PAGE 12% em condições redutoras mostraram as cadeias leve (de massa molecular em torno de 25 kDa) e pesada (aproximadamente 115 kDa) dos anticorpos α DEC e Isotipo fundidos a ASP-2 (FIGURA 3A). Também foram preparados géis de SDS-PAGE 12%, em condições redutoras e estes géis foram utilizados para Western Blot. A membrana foi então bloqueada e em seguida procedeu-se à marcação por primário anti-ASP-2 seguido da Proteína A conjugada a HRP (FIGURA 3B). Desta forma pudemos verificar a presença da

proteína ASP-2 nos anticorpos, bem como a integridade destes. Como controle utilizamos um anticorpo α DEC-CS que contém a proteína circunsporozoita de *Plasmodium falciparum* e a proteína recombinante ASP-2 de *T. cruzi*.

Figura 3 - Os anticorpos quiméricos α DEC-ASP-2 e ISO-ASP-2 foram purificados e contém a proteína ASP-2 associada.

(A) Gel SDS-PAGE 12% em condições redutoras mostrando 1 μ g de cada um dos anticorpos quiméricos ou a proteína ASP-2 recombinante. Para cada anticorpo podemos observar a banda referente a cadeia pesada ligada a ASP-2, com peso molecular de aproximadamente 115 kDa, e a banda referente a cadeia leve, com peso molecular de 25 kDa. (B) Western blot confirmando a presença da proteína ASP-2 nos anticorpos quiméricos.

Fonte: Rampazo (2012)

4.3 Ensaio de Ligação dos Anticorpos Quiméricos Contendo a Proteína ASP-2 em Células CHO que Expressam o Receptor DEC205

Após verificarmos a integridade dos anticorpos produzidos, precisávamos verificar se a adição da proteína ASP-2 não alteraria a conformação do anticorpo de modo a fazê-lo perder sua especificidade de ligação ao receptor DEC205. Para verificar se o anticorpo α DEC-ASP-2 mantinha sua capacidade de ligação, incubamos diferentes concentrações do mesmo com células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo ou DEC205 humano. Como podemos ver na FIGURA 4, o anticorpo α DEC-ASP-2 ligou-se de forma específica e dose dependente somente ao receptor DEC205 de camundongo (FIGURA 4B comparada a 4A). Por outro lado, o anticorpo isotipo controle, que não é específico para os receptores DEC205

de camundongo ou humano, não apresentou ligação alguma a nenhuma das células utilizadas (FIGURA 4 C e D).

Figura 4 - Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos α DEC-ASP-2 e Iso-ASP-2 a células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo e DEC205 humano.

Cem mil células CHO expressando os diferentes receptores foram incubadas com 10, 1 e 0,1 μ g/mL dos diferentes anticorpos híbridos por 30 minutos, e posteriormente incubadas na presença de anti-IgG de camundongo marcada com PE. Trinta mil eventos foram adquiridos utilizando-se o citômetro FACSCalibur. A análise foi feita utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

Fonte: Rampazo (2012)

Após a verificação da integridade dos anticorpos e visto que eles não perderam sua capacidade de ligação as DCs, iniciamos os ensaios de imunização dos camundongos.

4.4 Imunização de Camundongos A/J com os Anticorpos Híbridos Contendo a Proteína ASP-2 de *T. cruzi*

Camundongos A/J foram imunizados com os anticorpos α DEC-ASP-2 ou Iso-ASP-2, além da proteína recombinante ASP-2, na presença de Poly (I:C) como adjuvante. Como controle negativo, um grupo de animais foi imunizado somente com o adjuvante. Quarenta

dias após a administração da primeira dose, os animais receberam uma dose de reforço e 15 dias depois foram sangrados para a realização do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos anti-ASP-2. Observamos que o grupo de animais imunizados com α DEC-ASP-2 não apresentou título de anticorpos detectável, assim como o grupo controle que recebeu somente o adjuvante. Por outro lado, animais imunizados com o isotipo controle ou com a proteína recombinante ASP-2 apresentaram títulos de anticorpos maiores (FIGURA 5).

Figura 5 - Imunização de camundongos A/J com anticorpo quimérico α DEC-ASP-2 não é capaz de induzir níveis detectáveis de anticorpos anti-ASP-2 no soro dos animais imunizados.

Camundongos A/J foram imunizados com 5 μ g do anticorpo α DEC-ASP-2, Iso-ASP-2 ou 2,32 μ g da proteína ASP-2 recombinante (quantidade de proteína equivalente ao número de moléculas de ASP-2 presentes em 5 μ g do anticorpo α DEC-ASP-2), na presença de 50 μ g de Poly (I:C). Cada animal recebeu 2 doses com intervalo de 40 dias. Quatorze dias após a administração de cada dose, os animais foram sangrados e um ensaio de ELISA foi realizado com seus soros e com a proteína ASP-2 recombinante adsorvida na placa. O gráfico mostra o título de anticorpos em escala logarítmica de cada animal. As médias de cada grupo também estão representadas.

Fonte: Rampazo (2012)

A análise da resposta imune celular induzida nestes animais mostrou que células T $CD4^+$ tanto dos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 quanto com a proteína ASP-2 recombinante foram capazes de proliferar *in vitro* quando reestimuladas com a proteína ASP-2 recombinante (FIGURA 6, barras cinza). Por outro lado, a proliferação foi bem menor quando utilizamos a proteína ovalbumina (OVA) como controle (FIGURA 6, barras brancas). Este dado indica que o direcionamento da proteína ASP-2 para DCs

DEC205⁺ foi capaz de induzir forte proliferação de linfócitos T CD4⁺ que, porém, não foi maior do que aquela induzida pela administração da proteína recombinante.

Figura 6 - Imunização de camundongos A/J com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz proliferação de células T CD4⁺.

Grupos de camundongos A/J foram imunizados com α DEC-ASP-2 e ou com a proteína ASP-2 recombinante na presença de 50 μ g de Poly (I:C) ou somente com o adjuvante. Quarenta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo na presença do adjuvante Poly (I:C). A resposta imune celular foi avaliada por proliferação com diluição de CFSE vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 μ g/mL das proteínas recombinantes ASP-2 e OVA (como proteína não relacionada). O gráfico mostra a média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de células CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSElow).

Fonte: Rampazo (2012)

Neste mesmo experimento, tentamos também analisar a proliferação de células T CD8⁺ específicas para a proteína ASP-2. Para tanto, utilizamos um peptídeo (sequência: TEWETGQI) que foi previamente descrito como indutor de células T CD8⁺ em camundongos com haplótipo H-2K^k, como é o caso dos camundongos A/J (Araujo et al., 2005). A figura 7 mostra uma proliferação específica de mais de 20% de células T CD8⁺ no grupo dos animais que foi imunizado com α DEC-ASP-2 comparada aos animais imunizados com a proteína recombinante. Este dado sugere que o direcionamento da proteína ASP-2 para DCs DEC205⁺ induz a ativação de linfócitos T CD8⁺ através do mecanismo conhecido como apresentação cruzada.

Figura 7 - Imunização de camundongos A/J com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz maior proliferação de células T CD8⁺ quando comparada aos animais imunizados com a proteína ASP-2 recombinante.

Grupos de camundongos A/J foram imunizados e testados como descrito na figura 6. O gráfico mostra a média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de células CD3⁺CD8⁺ que perderam CFSE (CFSElow). E **representa diferença estatística significativa e $p < 0.01$.

Fonte: Rampazo (2012)

Além da proliferação, analisamos também a produção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais imunizados. Como podemos ver na figura 8, o número de esplenócitos produtores de IFN- γ nos animais que foram imunizados com o α DEC-ASP-2 foi estatisticamente mais significativo do que aquele encontrado em animais imunizados com a proteína ASP-2 recombinante.

Figura 8 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de *T. cruzi* induz a produção de IFN- γ por esplenócitos reestimulados com o peptídeo TEWETGQI.

Grupos de camundongos A/J foram imunizados com os anticorpos α DEC-ASP-2 ou com a proteína ASP-2 recombinante na presença de Poly (I:C) ou somente com o adjuvante. Quarenta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo na presença do adjuvante Poly (I:C). A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 μ g/mL da proteína recombinante ASP-2. O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão. E * representa diferença estatística significativa e $p < 0.05$.

Fonte: Rampazo (2012)

Os dados mostrados acima indicaram ser possível induzir resposta imune celular nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2. Para verificar se tal resposta seria protetora, grupos de 5 animais foram imunizados e desafiados com tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. A figura 9 mostra a curva de parasitemia obtida nestes animais. Interessantemente, os animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 apresentaram parasitemia reduzida no 11º dia (correspondente ao dia do pico) quando comparados aos animais imunizados somente com o adjuvante. Esta redução foi significativa.

Figura 9 - Imunização de camundongos com α DEC-ASP-2 foi capaz de reduzir o pico da parasitemia em animais desafiados com tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*.

Camundongos A/J imunizados com α DEC-ASP-2 ou com a proteína ASP-2 recombinante como descrito na figura 6 foram desafiados com 10^4 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. A parasitemia foi determinada em diferentes dias e os dados estão apresentados em número de parasitas/mL de sangue $\pm$ erro padrão de 5 animais/grupo. E *** representa diferença estatística significativa e $p < 0.001$.

Fonte: Rampazo (2012)

Nossos resultados indicam que a imunização de camundongos A/J com o anticorpo α DEC-ASP-2 é capaz de induzir resposta imune mediada por células T $CD4^+$ e $CD8^+$ capazes de reduzir o pico de parasitemia após desafio com formas tripomastigotas.

4.5 Imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos contendo a proteína ASP-2 de *T. cruzi*

Além dos camundongos A/J, decidimos testar a eficiência da imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 em camundongos BALB/c que possuem um haplótipo diferente H-2K^d dos primeiros. Além disso, imunização desses animais com um plasmídeo contendo o mesmo gene ASP-2 usado por nós neste estudo foi também capaz de reduzir a parasitemia nestes animais (Boscardin et al., 2003). Desta forma, grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com 5 μ g dos anticorpos α DEC-ASP-2 ou ISO-ASP-2, ou com a proteína ASP-2 recombinante, na presença de 50 μ g de Poly (I:C) como adjuvante. Como controle negativo, um grupo de animais foi imunizado somente com o adjuvante. Quarenta dias após a

administração da primeira dose, os animais receberam uma dose de reforço contendo 5 µg de cada anticorpo em presença do adjuvante de Poly (I:C) novamente. E após 15 dias o boost, os animais foram sangrados, para a realização do ensaio de ELISA, para verificar a detecção de anticorpos anti-ASP-2. Novamente, o grupo de animais imunizados com α DEC-ASP-2 não apresentou títulos de anticorpos anti-ASP-2 detectáveis. Fomos porém capazes de detectar baixos títulos no animais imunizados com o isotipo controle (ISO-ASP-2) e também detectamos resposta nos animais imunizados com a proteína ASP-2 recombinante (FIGURA 10).

Figura 10 - Imunização de camundongos BALB/c com o anticorpo α DEC-ASP-2 não é capaz de induzir anticorpos anti-ASP-2 no soro dos animais imunizados.

Camundongos BALB/c foram imunizados com 5µg do anticorpo α DEC-ASP-2, ISO-ASP-2 ou 2,32µg da proteína ASP-2 recombinante (quantidade de proteína equivalente ao número de moléculas de ASP-2 presentes em 5µg do anticorpo α DEC-ASP-2), na presença de 50µg de Poly (I:C). Cada animal recebeu 2 doses com intervalo de 40 dias. Quatorze dias após a administração de cada dose, os animais foram sangrados e um ensaio de ELISA foi realizado com seus soros e com a proteína ASP-2 recombinante adsorvida na placa. O gráfico mostra o título de anticorpos em escala logarítmica de cada animal. As médias de cada grupo também estão representadas.

Fonte: Rampazo (2012)

Da mesma forma que fizemos com os camundongos A/J, fomos analisar a resposta de células T nos animais imunizados com as diferentes preparações. A figura 11 mostra o número de células produtoras de IFN- γ nos esplenócitos dos animais imunizados. Detectamos

um número significativamente maior de células produtoras de IFN- γ nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 quando comparados aos animais imunizados com o isotipo controle ou com a própria proteína ASP-2 recombinante.

Figura 11 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de *T. cruzi* induz a produção de IFN- γ .

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com os anticorpos α DEC-ASP-2, ou Isotipo controle ou com a proteína ASP-2 recombinante na presença de Poly (I:C), ou somente com o adjuvante. Quarenta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo na presença do adjuvante Poly (I:C). A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 μ g/mL da proteína recombinante ASP-2. O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão. E * representa diferença estatística significativa e $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$.

Fonte: Rampazo (2012)

O ensaio de proliferação mostrou que as células T CD4⁺ dos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 foram capazes de proliferar significativamente mais do que as células dos animais imunizados com o isotipo controle ou com a proteína recombinante (FIGURA 12). Por outro lado, quando analisamos a resposta de células T CD8⁺, nenhuma diferença foi observada entre os grupos (FIGURA 13).

Figura 12 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz maior proliferação de células T $CD4^+$ quando comparada com a imunização com o Isotipo controle ou com a proteína recombinante ASP-2.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados como descrito na figura 11. A resposta imune celular foi avaliada por proliferação com diluição de CFSE vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 μ g/mL das proteínas recombinantes ASP-2 e OVA (como proteína não relacionada). O gráfico mostra a média das porcentagens de células $CD3^+CD4^+$ que perderam CFSE (CFSElow) $\pm$ desvio padrão. E ** representa diferença estatística significativa e $p < 0.01$.

Fonte: Rampazo (2012)

Figura 13 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 não induz proliferação de células T CD8⁺ quando comparada à imunização com o Isotipo controle ou com a proteína recombinante ASP-2.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados e tiveram suas células analisadas como descrito na figura 12. O gráfico mostra a média das porcentagens de células CD3⁺CD8⁺ que perderam CFSE (CFSElow) $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Rampazo (2012)

Na tentativa de nos aprofundarmos na análise da resposta imune celular em camundongos BALB/c imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2, decidimos utilizar alguns peptídeos correspondentes à sequência da proteína ASP-2 em nossos ensaios. Estes peptídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Mauricio M. Rodrigues (UNIFESP) e suas sequências de aminoácidos estão mostradas na FIGURA 14. Para facilitar nossas análises, fizemos 5 pools de peptídeos contendo 5-6 peptídeos cada.

Figura 14 - Pools de peptídeos utilizados nos ensaios.

Pool 1: ESEP KRPNM VYIV HEHNL PYEIVAGYI GKPYEIV YEIVAGYI	Pool 2: GSRNGNDRL CYLQRPTAV DVVTAGGSGIVMQNDTLVFP LMVNGQNYPFSSITYSTDKG QNYPFSSI	Pool 3: NTWVFPEGISPVGC LDPRI GCLDPRI TEWETGQI TEWETGQILMIVQCKDDQSV TEWETGQI CKDDQSVFESRDMGK
Pool 4: DQSVFESRDMGKTWT FESRDMGKTWTEAIGTILSGV WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT LYSDGALHL TPTAGLVGF ESSTPTAGL	Pool 5: WIDDYRCV DNRQYSFV RQYSFVNH GYVYVDGVI DYRCVHASV PETLGHEI	

Todos os peptídeos foram gentilmente cedidos pelo professor Maurício M. Rodrigues (UNIFESP) e ressuspensos em DMSO na concentração final de 10 mg/mL. A partir deste estoque foram feitos os pools contendo peptídeos de diferentes tamanhos.

Fonte: Rampazo (2012)

Realizamos então ensaios de ELISPOT para detecção de células produtoras de INF- γ . A figura 15 mostra que a resposta foi principalmente direcionada contra peptídeo(s) contido(s) no pool 4. O pool 4 foi então dividido em pool 4A e 4B (FIGURA 16) e descobrimos que a resposta era específica para um peptídeo maior contido no pool 4 A (FIGURA 17).

Figura 15 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de *T. cruzi* induz a produção de IFN- γ , quando estimulados com diferentes pools de peptídeos.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com os anticorpos α DEC-ASP-2 ou Isotipo controle na presença de Poly (I:C) ou somente com o adjuvante. Quarenta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo na presença do adjuvante Poly (I:C). A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL dos pools peptídeos da ASP-2. O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Rampazo (2012)

Figura 16 - Divisão do pool 4 em pool 4A e B.

<p>Pool 4A:</p> <p>DQSVFESRDMGKTWT FESRDMGKTWTEAIGTLGV WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT</p>	<p>Pool 4B:</p> <p>LYSDGALHL TPTAGLVGF ESSTPTAGL</p>
---	---

Fonte: Rampazo (2012)

Figura 17 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 de *T. cruzi* induz a produção de IFN- γ quando as células são estimuladas com os peptídeos contidos no pool 4A.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados e testados como descrito na figura 15. O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão. E *** representa diferença estatística significativa e $p < 0.001$.

Fonte: Rampazo (2012)

Finalmente, o pool 4A foi dissolvido e testamos cada um dos peptídeos separadamente (FERSDMGKTWTEAIGTLSGV, WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT e o CKDDQSVFESRDMGK). A figura 18 mostra que a resposta foi direcionada contra o peptídeo WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT.

Figura 18 - Imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 induz a produção de IFN- γ quando as células são reestimuladas com o peptídeo WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com os anticorpos α DEC-ASP-2, ou Isotipo controle, ou com a proteína recombinante ASP-2 na presença de Poly (I:C) ou somente com o adjuvante. Quarenta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo na presença do adjuvante Poly (I:C). A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL dos peptídeos da ASP-2. O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão. E *** representa diferença estatística significativa e $p < 0.001$

Fonte: Rampazo (2012)

Finalmente, decidimos avaliar a parasitemia nos animais imunizados. A figura 19 mostra a parasitemia ao longo dos dias nos animais imunizados com as diferentes preparações e desafiados com a cepa Y de *T. cruzi*.

O grupo dos animais imunizados com α DEC-ASP-2 apresentou uma diminuição da parasitemia e essa diminuição foi significativa quando comparada com o Isotipo controle ou somente o controle do experimento (Poly (I:C)) (FIGURA 19).

Figura 19 - Imunização de camundongos com α DEC-ASP-2 foi capaz de proteger animais desafiados com tripomastigotas sanguíneos cepa Y de *T. cruzi*.

Camundongos BALB/c imunizados com α DEC-ASP-2, Isotipo controle ou a proteína ASP-2 recombinante na presença de poly I: C ou somente com o adjuvante, foram desafiados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Os dados estão apresentados como o número de parasitas/mL de sangue $\pm$ desvio padrão de 3 animais/grupo. E *** representa diferença estatística significativa e $p < 0.001$.

Fonte: Rampazo (2012)

Finalmente, para cumprir a última etapa do projeto, grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com as diferentes preparações em presença tanto de Poly (I:C) (agonista do receptor TLR3) quanto de CpG ODN (agonista do receptor TLR9). A figura 21 mostra um ELISPOT para detecção de células produtoras de IFN- γ nos animais imunizados com as diferentes proteínas e adjuvantes. Como podemos observar, a imunização com o anticorpo α DEC-ASP-2 em presença de Poly (I:C) foi capaz de induzir o maior número de células produtoras de IFN- γ , conforme já mostramos na FIGURA 18. Por outro lado, a adição de CpG como estímulo de maturação para as DCs não contribuiu para melhorar a resposta imune celular detectada contra o peptídeo WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT.

Figura 20 - Poly (I:C) tem melhor efeito adjuvante do que CpG ODN nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com os anticorpos α DEC-ASP-2, Isotipo controle e a proteína recombinante ASP-2, na presença de 50 μ g de Poly (I:C) e 25 μ g de CpG ODN 1826 ou somente com os adjuvantes. Quarenta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo na presença do adjuvante Poly (I:C) ou CpG. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT vinte dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL dos peptídeos da ASP-2. O gráfico mostra o número de células produtoras de INF- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão. E * representa diferença estatística significativa e $p<0.05$ e **, $p<0.01$.

Fonte: Rampazo (2012)

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que fomos capazes de inserir a proteína ASP-2 (sua porção de 65kDa) em fusão com as cadeias pesadas dos anticorpos α DEC205 e isotipo controle (FIGURAS 2 e 3). Esta é a primeira vez que uma proteína de massa molecular tão grande é fundida aos anticorpos quiméricos. Todos os outros anticorpos foram gerados com proteínas menores a eles fundidas (Boscardin et al., 2006; Do et al., 2010; Hawiger et al., 2001; Soares et al., 2007; Trumpfheller et al., 2006). Também é importante ressaltar que a porção de 65kDa da proteína ASP-2 parecia estar intacta no anticorpo α DEC-ASP-2, pois a mesma foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal K2₂ que havia sido anteriormente produzido contra ela (Claser et al., 2007).

Além de ter sido produzido com sucesso, o anticorpo α DEC-ASP-2 ainda foi capaz de ligar-se de forma específica e dose dependente ao receptor DEC205 expresso na superfície de células CHO transfectadas (FIGURA 4). Esta ligação mostra que, apesar da inserção de uma proteína de massa molecular grande como foi o caso da ASP-2, a estrutura terciária do anticorpo não foi tão alterada de modo a fazê-lo perder sua capacidade de ligação. Também importante foi o fato do anticorpo isotipo controle não apresentar nenhuma ligação inespecífica às células testadas.

Uma vez que o anticorpo estava funcionando, ensaios de imunização foram realizados com camundongos de duas linhagens: A/J e BALB/c. Estas linhagens foram escolhidas por dois motivos: 1. é importante validar o efeito do direcionamento em diferentes linhagens de camundongos pois a população humana que será alvo de tal vacina não é isogênica e expressa vários diferentes e 2. porque alguns trabalhos haviam mostrado que a imunização de animais de haplótipo H-2K^k (A/J) e H-2K^d (BALB/c) com a proteína ASP-2 administrada na forma de DNA ou de proteína recombinante levava a uma redução no pico de parasitemia destas linhagens (Araujo et al., 2005; Boscardin et al., 2003; de Alencar et al., 2007; Vasconcelos et al., 2004). De fato, Araujo et al. (2005) haviam descrito um peptídeo imunodominante para células T CD8⁺ que era reconhecido por animais A/Sn cujo haplótipo também é H-2^k. Como as DCs DEC205⁺CD8 α ⁺ são capazes de fazer apresentação cruzada e ativar linfócitos T CD8⁺ quando o anticorpo α DEC205 contendo uma proteína é para elas direcionado (Bonifaz, 2004; Boscardin, 2006), nós decidimos iniciar nossos protocolos de imunização utilizando primeiramente os animais A/J.

Grupos de camundongos A/J foram então imunizados com duas doses do anticorpo α DEC-ASP-2 na presença de Poly (I:C). Este composto foi utilizado inicialmente porque estudos prévios haviam demonstrado a maior eficiência de Poly (I:C) em estimular respostas celulares quando antígenos são direcionados para a população de DCs CD8 α ⁺CD205⁺

(Trumpfheller, 2008). Foi demonstrado recentemente que o Poly (I:C) é um agonista capaz de estimular, além do TLR3, receptores do tipo NLR (no caso, MDA5) e com isso induzir a expressão de níveis séricos elevados de Interferons tipo I liberados por DCs, células epiteliais e monócitos, que auxiliam na maturação eficiente das DCs, e estimulam sua migração para órgãos linfóides (Longhi et al., 2009). Outros estudos preliminares ainda não publicados do mesmo grupo apontam que a indução da expressão e liberação de Interferons tipo I pelas próprias DCs, em uma via de sinalização autócrina, já seria suficiente para gerar estes efeitos (Trumpfheller et al., 2011).

A análise da resposta imune humoral anti-ASP2 mostrou que o direcionamento desta proteína para as DCs DEC205⁺CD8⁺ não foi capaz de induzir títulos significativos de anticorpos anti-ASP-2. Por outro lado, a imunização com o isotipo controle ou com a proteína recombinante purificada produziu títulos maiores (FIGURA 5). Este dado foi bastante inesperado já que uma resposta de anticorpos contra a proteína fusionada havia sido já descrita na literatura em outros modelos (Boscardin et al., 2006; Do et al., 2008, 2010; Tewari et al., 2010). Quando fomos analisar a resposta imune celular, primeiramente observamos forte proliferação de células T CD4⁺ reestimuladas com a proteína recombinante ASP-2 nos animais imunizados tanto com o anticorpo α DEC-ASP-2 quanto com a proteína recombinante ASP-2 (FIGURA 6). Assim, neste caso em particular, o direcionamento da ASP-2 para as DCs parece não conferir vantagem em relação à proteína recombinante. É importante, no entanto especular que a proteína recombinante é produzida de maneira artesanal e não podemos assegurar que esteja pura na preparação que utilizamos para imunizar os animais. Pode haver outros componentes para os quais estejamos imunizando. A análise da resposta proliferativa de células T CD8⁺ foi feita utilizando-se o peptídeo TEWETGQI que havia sido anteriormente descrito (Araújo et al., 2005). Neste caso observamos intensa proliferação (~15%) de linfócitos T CD8⁺ no grupo de animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 (FIGURA 7). Este dado corrobora outros já descritos na literatura que mostram que o direcionamento de antígenos para as DCs DEC205⁺CD8⁺ induz células T CD8⁺ (Bonifaz et al., 2004; Boscardin et al., 2006).

Além da análise da proliferação, decidimos também analisar a produção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais imunizados (FIGURA 8). O IFN- γ tem sido descrito como uma citocina muito importante para o controle da parasitemia do *T. cruzi* (Holscher et al., 1998; Michailowsky et al., 2001). Observamos neste caso que os animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 apresentaram um número duas vezes maior (e estatisticamente

significativo) de células produtoras de IFN- γ quando comparados aos animais imunizados com a proteína recombinante.

Finalmente, decidimos analisar a proteção conferida aos animais pela imunização (FIGURA 9). Para tanto, os diferentes grupos foram desafiados com formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. No décimo primeiro dia, quando ocorreu o pico da infecção, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo imunizado somente com o controle e aquele imunizado com o anticorpo α DEC-ASP-2. A imunização com este último foi capaz de reduzir o pico de parasitemia nos animais. A imunização com a proteína recombinante também reduziu a quantidade de parasitas em relação aos animais do grupo controle, porém esta diminuição não foi significativa. Conforme mencionamos acima, a imunização com a proteína ASP-2 recombinante foi capaz de reduzir o pico de parasitemia de animais imunizados (Araujo et al., 2005). Porém, neste caso, foram administradas 3 doses da proteína ASP-2 adsorvida em alum. Em nosso caso, administramos 2 doses contendo cerca de 2,32 μ g desta proteína recombinante (quantidade de ASP-2 presente em 5 μ g do anticorpo), o que já apresentou um efeito significativo na redução da parasitemia. Maiores ajustes seriam necessários a este protocolo para obtermos uma diferença maior. Porém, estes dados mostram que o direcionamento da ASP-2 para as DCs ativa tanto células T CD4⁺ quanto T CD8⁺ que podem então ser responsáveis pelo controle da parasitemia.

Prosseguimos então para os ensaios com animais da linhagem BALB/c. A análise da resposta humoral anti-ASP-2 mostrou resultado semelhante ao observado nos animais A/J (FIGURA 10), ou seja, detectamos anticorpos anti-ASP-2 nos grupos imunizados com o isotipo controle ou com a proteína ASP-2 recombinante.

A análise da produção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais mostrou uma frequência de células produtoras maior nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 (FIGURA 11). Esta diferença foi estatisticamente maior do que nos animais imunizados com o isotipo controle ou com a proteína ASP-2 recombinante. Este resultado também foi semelhante ao obtido nos camundongos A/J. Diferentemente dos camundongos A/J, a proliferação de linfócitos T CD4⁺ dos animais imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 foi também estatisticamente significativa (e maior) em comparação aos animais imunizados com o isotipo controle ou com a proteína recombinante (FIGURA 12). No entanto, não observamos diferença estatística quando a proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi analisada (FIGURA 13). Estas diferenças são explicadas pelo haplótipo dos animais. Até o momento sabemos que a proteção induzida nos camundongos BALB/c é mediada principalmente por linfócitos T CD4⁺

(Boscardin et al., 2003) e não há nenhum epítipo da ASP-2 descrito para células T CD8⁺ nesses animais.

Para tentarmos explorar um pouco mais a resposta de células T CD4⁺ detectada nestes animais, fizemos uso de alguns peptídeos que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Mauricio M. Rodrigues (UNIFESP) e que representam diferentes porções da ASP-2. Para nossa surpresa, fomos capazes de isolar o peptídeo WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT que é reconhecido pelos linfócitos T CD4⁺ dos camundongos BALB/c (FIGURAS 15-18). Este peptídeo não havia sido anteriormente descrito e é alvo dos linfócitos T CD4⁺ que são provavelmente as células produtoras de IFN- γ . Porém, serão necessários experimentos adicionais para mostrar isto claramente.

Para avaliar o papel protetor destas células, desafiamos os animais imunizados com tripomastigotas das cepa Y de *T. cruzi*. Como observamos nos animais A/J, camundongos BALB/c imunizados com o anticorpo α DEC-ASP-2 apresentaram uma redução significativa no pico da parasitemia quando comparados aos animais imunizados com o isotipo controle ou com a proteína ASP-2 recombinante (FIGURA 19).

Nossos dados mostraram até o momento que a imunização de diferentes linhagens de camundongos com o anticorpo α DEC-ASP-2 foi capaz de induzir potente resposta imune celular, seja de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ e produção de IFN- γ , que devem contribuir para a redução no pico da parasitemia quando os animais são desafiados com as formas tripomastigotas.

Para finalizar, decidimos ainda testar outro adjuvante que não o Poly (I:C) em nosso sistema. Escolhemos para este propósito, o adjuvante CpG ODN que é um ligante do TLR9. Vários estudos estão sendo conduzidos em humanos (ver www.clinicaltrials.gov) utilizando formulações de CpG ODN como adjuvantes. Elas parecem ser seguras e bem toleradas, o que justifica seu uso em ensaios clínicos. Além disso, o CpG ODN, em combinação com proteínas recombinantes tem induzido boas respostas imunes em diferentes modelos (Rosa et al., 2007). Para nossa surpresa, detectamos uma resposta imune bem mais baixa nos animais imunizados com CpG ODN quando comparados àqueles imunizados com Poly (I:C) (FIGURA 20). Esta grande diferença na eficiência de indução de uma resposta imune pode se dever ao fato de que as DCs DEC205⁺CD8 α ⁺ não expressam o TLR9 mas expressam abundantemente o TLR3 (Nussenzweig, comunicação pessoal)¹. Desta forma, para nosso tipo de abordagem, parece ser

¹ Informação fornecida por Michel C. Nussenzweig no Congresso de Imunologia, em outubro de 2011.

de fundamental importância que a subpopulação de DCs para a qual o antígeno é direcionado expresse receptores para o adjuvante utilizado.

6 CONCLUSÕES

Com os nossos resultados podemos concluir que:

- a produção dos anticorpos quiméricos em fusão com a proteína ASP-2 foi realizada com sucesso. Os anticorpos se mantiveram íntegros e sua capacidade de ligação específica ao receptor DEC205 foi preservada;
- a imunização de camundongos A/J e BALB/c com o anticorpo α DEC-ASP2 não foi capaz de gerar títulos de anticorpos anti-ASP-2, ao contrário do Isotipo controle e da proteína recombinante;
- imunização de camundongos A/J com o anticorpo α DEC-ASP-2 foi capaz de mediar a apresentação cruzada e ativar linfócitos T CD8⁺;
- a parasitemia foi significativamente reduzida em camundongos A/J e BALB/c;
- mapeamos um peptídeo, o WVMSQPGVRLYKIFRVGALIT, reconhecido especificamente pelo haplótipo de camundongos BALB/c, e que é capaz de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e produção de IFN- γ ;
- a imunização com Poly (I:C) mostrou-se superior àquela obtida quando CpG ODN foi utilizado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Filadélfia: Pensilvânia:Saunders; 2003.
- Akashi A, Mizuno SI. Epstein-Barr virus-infected natural killer cell leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2000;40(1-2):57-66
- Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans*. 2003;Jun;31(Pt 3):637-42
- Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1999;67(9):4819-26.
- Araguth MF, Rodrigues MM, Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes: neutralization by the stage-specific monoclonal antibody 1G7 and immunogenicity of 90 kD surface antigen. *Parasite Immunol*. 1988;10(6):707-12.
- Araújo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Penido ML, Boscardin SB, Hoft DF, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. CD8+ T cell dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a high susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun*. 2005;73:6017-25.
- Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 2005;309(5733):473-6.
- Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR, Carbone FR. Migratory dendritic cells transfer antigen to lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*. 2006;25:153-62.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. Review.
- Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Miller JF, Jones C, Lejon K, Fathman CG, Mueller SN, Shortman K, Carbone FR, Heath WR. The CD8alpha (+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med*. 2002;196:1099-104.
- Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*. 2004;199:815-24.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002;196:1627-38.

*De acordo com:International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts to Biomedical Journal: sample references. [update 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, Morrot A, Zavala F, Steinman RM, Nussenzweig RS, Nussenzweig MC. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med*. 2006;203(3):599-606.

Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect Immun*. 2003;71(5):2744-57.

Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, Nussenzweig MC, Piperno AG, Steinman RM. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8⁺ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:1289-94.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347-82. Review.

Brener Z, Costa CA, Chiari C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1976;18(6):450-5.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114(2):103-10. Review.

Brener Z, Krettli AU. Immunology of Chagas' disease. parasite biology: cellular immunological and molecular aspects.. In: Wyler, DJ. USA:1990; p.247-61.

Burleigh BA, Andrews NW. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:175-200.

Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, Hogquist KA. Identification of a novel population of Lagerin⁺ dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204:3147-56.

Camargo EP. Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):275-80.

Chagas C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. SP., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;1:159-218.

Cheong C, Choi JH, Vitale L, He LZ, Trumpfheller C, Bozzacco L, Do Y, Nchinda G, Park SH, Dandamudi DB, Shrestha E, Pack M, Lee HW, Keler T, Steinman RM, Park CG. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood*. 2010;116(19):3828-38.

Chuenkova M, Pereira ME. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J Exp Med*. 1995;181(5):1693-703.

Claser C, Espíndola NM, Sasso G, Vaz AJ, Boscardin SB, Rodrigues MM. Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2007;9(8):1011-9.

Claser C, Espíndola NM, Sasso G, Vaz AJ, Boscardin SB, Rodrigues MM. Cross-priming of long lived protective CD8⁺ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: importance of a TLR9 agonist and CD4⁺ T cells. *Vaccine*. 2007;25(32):6018-27.

Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 2006;27(8):352-7.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *J Exp Med.* 1996;184:1413-24.

Den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. *J Exp Med.* 200;192(12):1685-96.

Do Y, Park CG, Kang YS, Park SH, Lynch RM, Lee H, Powell BS, Steinman RM. Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC-205/CD205-positive mouse dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(1):20-9.

Do Y, Koh H, Park CG, Dudziak D, Seo P, Mehandru S, Choi JH, Cheong C, Park S, Perlin DS, Powell BS, Steinman RM. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *Eur J Immunol.* 2010;40(10):2791-6.

Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigens processing by dendritic cell subset *in vivo*. *Science.* 2007;315:107-11.

Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha + DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol.* 2003;33:827-33.

Ellis RD, Mullen GE, Pierce M, Martin LB, Miura K, Fay MP, Long CA, Shaffer D, Saul A, Miller LH, Durbin AP. A Phase 1 study of the blood-stage malaria vaccine candidate AMA1-C1/Alhydrogel with CPG 7909, using two different formulations and dosing intervals. *Vaccine.* 2009;27(31):4104-9.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 2005;309(5733):409-15.

Figdor CG, van kooyk Y, Adema GJ. C-Type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):77-84.

Flynn BJ, Kastenmüller K, Wille-Reece U, Tomaras GD, Alam M, Lindsay RW, Salazar AM, Perdiguero B, Gomez CE, Wagner R, Esteban M, Park CG, Trumpfheller C, Keler T, Pantaleo G, Steinman RM, Seder R. Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(17):7131-6.

Flornes LM, Bryceson YT, Spurkland A, Lorentzen JC, Dissen E, Fossum S. Identification of lection-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex. *Immunogenetics.* 2004;56:506-17.

Fralish BH, Tarleton RL. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* 2003; 21(21-22):3070-80.

- Garg N, Tarleton RL. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 2002;70(10):5547-55.
- Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):895-906.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000;100:575-85.
- González J, Araguth MF, e Yoshida N. Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with a 90-kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun*. 1991;59(3):863-7
- Gurer C, Strowig T, Brilot F, Pack M, Trumpfheller C, Arrey F, Park CG, Steinman RM, Münz C. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood*. 2008; 112(4):1231-9.
- Halperin SA, Van Nest G, Smith B, Abtahi S, Whiley H, Eiden JJ. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphosothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*. 2003;21:2461-67.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induces peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J Exp Med*. 2001;194(6):769-79.
- Hermansson A, Ketelhuth DF, Strodthoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, Paulsson-Berne G, Hansson GK. Inhibition of T cell response to native low-densitylipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp Med*. 2010;207:1081-93.
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F.. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 1998;66:1208-15.
- Idoyaga J, Suda N, Suda K, Park CG, Steinman RM. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 alpha + dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:1524-9.
- Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, Lahoud MH, Caminschi I, Huang Y, Rodriguez A, Clausen BE, Park CG, Trumpfheller C, Steinman RM. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:2384-89.
- Igyarto BZ, e Keplán DH. The evolving function of Langerhans cells in adaptive skin immunity. *Immunology and Cell Biology*. 2010;88:361-65 Lages-Silva E, *et al*. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):435-41.

- Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman RM, Inaba K. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med*. 2002;195(10):1289-302.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 1995;375:151-5.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(3):348-57.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):816-25. Review.
- Klinman DM, Ishii KJ, Gursel M, Gursel I, Takeshita S, Takeshita F. Immunotherapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Drug News Perspect*. 2000; 13(5):289-96.
- Klinman DM, Klaschik S, Sato T, Tross D. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(3):248-55.
- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:759-806.
- Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ cells function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*. 1998;20:207-16.
- Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):435-41.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86:973-83.
- Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*. 2010;234:45-51.
- Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, Salazar AM, Colonna M, Steinman RM. Dendritic cells require a systemic type I interferon responses to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med*. 2009; 206:1589-602.
- Low HP, Tarleton RL. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;88(1-2):137-49.
- Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. 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*. 2006;17(9):898-908.

- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol.* 2000;151(3):673-84.
- McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(1):20-7.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388:394-397.
- Merad M, e Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood.* 2009;113(15):3418-27.
- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. 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.* 2001;159:1723-33.
- Millar AE, Wleklinski-Lee M, e Kahn SJ. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. *J Immunol.* 1999;162(10):6092-9.
- Nüsslein-Volhard C, e Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980; 287(5785):795-801.
- Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Förster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 2004;21:279-88.
- Padilla A, Xu D, Martin D, Tarleton R. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. *Infect Immun.* 2007;75(1):231-5.
- Prata A. Chagas disease. *Infect Dis Clin North Am* 1994;8(1):61-75.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:92-100.
- Ribeirão M, Pereira-Chiocola VL, Rénia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 2000;22(1):49-53.
- Rodrigues MM, Ribeirão M, Pereira-Chiocola V, Renia L, Costa F. Predominance of CD4+ Th1 and CD8+ Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun.* 1999;67(8):3855-63.
- Santori F R, Paranhos-Bacalla GS, Franco DA Silveira J, Yamauchi LM, Araya JE, Yoshida N. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. *Infect Immun.* 1996;64(4):1093-9.

- Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, Alvarez JM. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2006;74(4):2031-42.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:151-61.
- Silveira EL, Claser C, Haolla FA, Zanella LG, Rodrigues MM. Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(8):1292-00.
- Siqueira-Batista R, Huggins DW. Chagas disease perspectives for the 21st. Century *Arq Bras Cardiol*. 1996; 66(2):79-81.
- Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, Dudziak D, Nussenzweig MC, Steinman RM. Subsets of dendritic cells induces CD4⁺ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism *in vivo*. *J Exp Med*. 2007;204:1095-106.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137:1142-62.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vitro*. *J Exp Med*. 1974;139:380-97.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties *in vivo*. *J Exp Med*. 1974;139:1431-45.
- Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad USA*. 1978;75:5132-36.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-11.
- Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*. 2010; 234(1):5-17.
- Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):790-802.
- Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3932-7.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *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*. 1996;8(1):13-22.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas Disease. *Clin Microbiol Rev*, Washington. 1992;5:400-19.

Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, Kastenmueller K, Salazar AM, Anderson CA, Soundarapandian V, Ahumada A, Keler T, Hoffman SL, Nussenzweig MC, Steinman RM, Seder RA. Poly (I:C) in an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4⁺ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and alpha DEC-CSP in non human primates. *Vaccine*. 2010;28(48):7256-66.

Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, Schlesinger SJ, Steinman RM. Dendritic cell-targeting protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J Int Med*. 2012. In press. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02496.

Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, Schlesinger SJ, Colonna M, Steinman RM. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4⁺ T cell immunity together with a dendritic cell targeting vaccine. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:2574-79.

Trumpfheller C, Finke JS, López CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, Huang Y, Schlesinger SJ, Park CG, Nussenzweig MC, Granelli-Piperno A, Steinman RM. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med*. 2006;203:607-17.

Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8⁺ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun*. 2006;74:2477-81.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*. 1996;348(9031):891-2

Vasconcelos JR, Boscardin SB, Hiyane MI, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(2):121-9.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. 1994; 62: 5177-5182.

Werts C, Girardin SE, Philpott DJ, Tir, Card and Pyrun: Three domains for an antimicrobial Triad. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):798-15.

World Health Organization. TDR Strategic Direction: Chagas Disease. 1-6. [cited from 2012 Apr 04]. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/.

Wizel B, Palmieri M, Mendoza C, Arana B, Sidney J, Sette A, Tarleton R. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Clin Invest*. 1998;102(5):1062-71.

Wizel B, Nunes M, Tarleton RL. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8⁺ TC1 responses. *J Immunol*. 1997;159(12):6120-30.

Wrightsmann RA, Dawson BD, Fouts DL, Manning JE. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J Immunol.* 1994; 153(7):3148-54.

Zhang H, Liu L, Yu D, Kandimalla ER, Sun HB, Agrawal S, Guha C. An In Situ Autologous Tumor Vaccination with Combined Radiation Therapy and TLR9 Agonist Therapy. *PLoS One.* 2012;7(5):38111.

Zuñiga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J, Brander C. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T Lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol.* 2006;80:3122-25.