

Carlos Andrés Toro Acevedo

Dissertação de Mestrado

Imunossupressão causada
por domínios repetitivos presentes
em antígenos do *Trypanosoma cruzi*

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

2017

Carlos Andrés Toro Acevedo

Imunossupressão causada
por domínios repetitivos presentes
em antígenos do *Trypanosoma cruzi*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Co-orientadora: Ester Roffê Santiago

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

2017

AGRADECIMENTOS

À professora Santuza, por ter me aberto as portas do seu laboratório, por me ensinar com dedicação e paciência, e me orientar neste caminho.

À professora Ester Roffê, por me co-orientar, por acreditar em mim e nas minhas ideias, por ter me ensinado mil coisas desde o começo.

Aos meus amigos/colegas de laboratório Bruna Mattioly, Nailma Apirigio, Gabriela Burde, Rafael Ferreira, Edson Oliveira, Viviane Silva, Wanessa Moreira, Melissa Soares, Thais Tavares e Caroline Leonel, por ter compartilhado tantas horas no laboratório, por terem me ajudado sempre, pela amizade e amabilidade.

Ao aluno de doutorado Bruno Galvão Filho, pela troca constante de ideias, por me ajudar em vários experimentos e pela amabilidade.

Ao professor Helton Costa Santiago, pelas discussões e troca de ideias, pela disposição constante a me ajudar; e aos seus alunos do laboratório de Imunoparasitologia (IMPAR) por me ajudarem sempre que precisei.

Ao professor Ricardo Gazzinelli por ter me aberto as portas do seu laboratório de Imunologia (LAIM) para fazer vários dos experimentos, e igualmente a todos os alunos desse laboratório pelo acolhimento e amabilidade.

Às professoras Ana Maria Caetano e Tatiane Uceli Maioli, e todos os alunos do Laboratório de Imunobiologia (LIB) que me ajudaram com amabilidade sempre que precisei.

À professora Rosa Arantes e as alunas de doutorado Mayra Ricci, e de pós-doutorado Samantha Ribeiro, do laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, por me ajudar nas análises histopatológicas.

Aos meus pais, que desde longe, me apoiaram e ajudaram constantemente, antes, durante e depois de começar este caminho.

A Nubia Morais Rodrigues, que foi minha companheira desde o começo, por me ajudar e ensinar mil coisas, pelo carinho, pelas discussões, pelo apoio constante, pelas aulas de português, pela paciência e por ter feito desta experiência a melhor.

I. RESUMO

Repetições de aminoácidos estão presentes em proteínas de todos os organismos vivos; no entanto, vários protozoários parasitos intracelulares possuem maior quantidade dessas repetições nos seus proteomas, o que poderia estar relacionado com a capacidade de imuno-evasão. A proteína ribossômica L7a do *Trypanosoma cruzi* contém repetições na porção N terminal. Para investigar o papel dessa repetição foram produzidas as proteínas recombinantes completa (TcL7a) e suas versões truncadas; TcL7aRep, contendo somente a parte repetitiva, e TcL7aΔRep, contendo a parte não repetitiva. Após imunizações com essas proteínas, camundongos BALB/c foram infectados com tripomastigotas sanguíneos do clone CL Brener de *T. cruzi*. A imunização com a proteína TcL7a inteira protegeu animais contra a infecção pelo *T. cruzi* pois diminuiu tanto a parasitemia quanto a mortalidade, enquanto a imunização com a parte não repetitiva TcL7aΔRep não teve efeito significativo. Entretanto, a imunização com a parte repetitiva TcL7aRep levou ao aumento da parasitemia e da mortalidade nos animais infectados. Para elucidar o mecanismo pelo qual a imunização com TcL7aRep tornou os camundongos mais susceptíveis à infecção, avaliamos a produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* nos animais infectados. Evidenciou-se uma menor quantidade de anticorpos IgM e IgG total contra o extrato proteico de *T. cruzi* em animais imunizados e infectados em comparação aos animais infectados do grupo controle (não imunizados). Análises histopatológicas de tecido de coração mostraram menor quantidade de infiltrado celular inflamatório e maior número de ninhos íntegros de amastigotas quando comparados com o grupo controle. Após estimulação de esplenócitos *in vitro* com Concanavalina A e α -CD3 observou-se que, quando incubados com a proteína contendo as repetições TcL7aRep, os linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos B CD19+ proliferaram menos do que os controles. Além disso, a incubação por 24 horas com a TcL7aRep antes do estímulo resultou em uma diminuição na expressão de moléculas de superfície importantes para a resposta imune adaptativa, tais como CD3, CD4, CD8 e CD25 em linfócitos do baço de camundongos não infectados. Nossos dados indicam portanto que os animais imunizados com TcL7aRep ou esplenócitos incubados *in vitro* com essa proteína apresentam

uma resposta indicativa de imunossupressão, o que poderia explicar a maior susceptibilidade dos animais imunizados com a porção repetitiva da proteína à infecção pelo *T. cruzi*. Assim como estudos anteriores relacionando o papel de outras repetições presentes em antígenos do *T. cruzi*, como as repetições SAPA presentes nas transialidases, os dados desse trabalho corroboram a existência de mecanismos de imunossupressão causada por repetições presentes em antígenos do parasito como parte das estratégias desenvolvidas por esse patógeno que permitem sua sobrevivência no hospedeiro mamífero.

ABSTRACT

Amino acid repeats are present in all organisms. However, the predicted proteomes of intracellular parasites have a higher content of repetitive domains than the proteomes of extracellular parasites or free living microorganisms. The presence of repeat domains has been associated with the immune-evasion capacity of different pathogens. The ribosomal *Trypanosoma cruzi* L7a protein contains a repeat domain at its N-terminus. To investigate the role of this repeat domain, we produced three versions of the recombinant, corresponding to the entire protein (TcL7a) and the truncated version that contains only the repeats (TcL7aRep) or the non-repetitive region (TcL7a Δ Rep). Immunization of BALB/c mice with these three proteins, followed by challenge with bloodstream trypomastigotes of the CL Brener clone showed that immunization with the complete TcL7a protein protected the animals against *T. cruzi* infection since parasitemia and mortality were diminished, while the immunization with the non-repetitive TcL7a Δ Rep did not result in a significant effect. Surprisingly, immunization with the repeat domain TcL7aRep results in exacerbated parasitemia and mortality in all infected animals. To elucidate the mechanism by which the TcL7aRep augments the susceptibility of mice to infection, we evaluated the specific antibody production against *T. cruzi* whole cell extracts in sera from infected animals. We observed lower levels of IgM and total IgG antibodies against the protein extract of *T. cruzi* in immunized and infected animals compared with infected animals that were not immunized (control). After splenocyte *in vitro* stimulation with concanavalin A and α -CD3, we observed that, when splenocytes are incubated with TcL7aRep, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes were less able to proliferate than control lymphocytes. Additionally, a 24 hours incubation with TcL7aRep before stimulation resulted in a decrease of surface important molecules for adaptive response, such as CD3, CD4, CD8 and CD25 in lymphocytes from spleen obtained from non-infected mice. Taken together, our data indicates that animals immunized with TcL7aRep or splenocytes incubated *in vitro* with this antigen present an immunosuppressive phenotype, which could explain the higher susceptibility to infection with *T. cruzi* of all animals immunized with the repeat domain. Similar to other studies that investigated the role other *T. cruzi*

antigens, such as trans-sialidase containing the SAPA repeats, our study correlates the existence of an immunosuppressive mechanism caused by parasite antigenic repeats as part of its strategy to survive inside the mammal host.

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.....	3
Figura 2. Cinética típica de uma parasitemia na fase aguda e crônica.....	4
Figura 3. Reconhecimento de tGPI-mucin, GIPL e CpG DNA do T. cruzi por TLR-2, 4 e 9.....	6
Figura 4. Rede de citocinas e células da resposta imune inata e adaptativa na doença de Chagas	8
Figura 5. Esquema de porcentagens dos diferentes tipos de proteínas reconhecidos por soros chagásicos.....	15
Figura 6. Análise comparativa da proteína ribossômica L7a em várias espécies.....	16
Figura 7. Esquema da proteína TcL7a de Trypanosoma cruzi e as versões truncadas.....	17
Figura 8. Programa utilizado no termociclador para reação de RT-PCR	28
Figura 9. Estratégia de gates no análise da citometria de fluxo.....	33
Figura 10. SDS-PAGE de bactérias transformadas para a expressão da proteína TcL7a.....	36
Figura 11. Cromatograma de eluição da proteína TcL7a.....	37
Figura 12. SDS-PAGE das frações após cromatografia de afinidade.....	38
Figura 13. SDS-PAGE da proteína inteira TcL7a e as versões truncadas TcL7aRep e TcL7aΔRep purificadas	39
Figura 14. Predição de epítomos lineares de linfócitos B da proteína TcL7a	41
Figura 15. Tabela de epítomos lineares para linfócitos B na proteína TcL7a.....	41
Figura 16. Protocolo de imunização e obtenção de amostras de sangue	42
Figura 17. Cinética de produção de anticorpos a-TcL7aRep.....	43
Figura 18. Esquema de imunizações e infecção dos camundongos.....	43
Figura 19. Parasitemia de camundongos infectados.....	44
Figura 20. Análise histopatológica dos tecidos de coração corados com HE.....	45

Figura 21. Quantificação da análise histopatológica.....	45
Figura 22. Quantificação de DNA de Trypanosoma cruzi por RT-PCR.....	47
Figura 23. Anticorpos a-TcL7aRep no pico da parasitemia	47
Figura 24. Anticorpos contra o extrato de T. cruzi (TcExt)	49
Figura 25. Produção de citocinas após estímulo de esplenócitos.....	50
Figura 26. Esquema do protocolo de duas imunizações com OVA para indução de resposta de hipersensibilidade.....	51
Figura 27. Resposta hipersensível.....	52
Figura 28. Anticorpos IgG a-OVA	53
Figura 29. Citotoxicidade celular	54
Figura 30. Produção de IgM em esplenócitos	55
Figura 31. Histograma do marcador CFSE na população de linfócitos T CD3+.....	57
Figura 32. Porcentagem de proliferação de linfócitos T CD3+.....	58
Figura 33. Histograma do marcador CFSE na população de linfócitos B CD19+.....	60
Figura 34. Porcentagem de proliferação de linfócitos B CD19+.	61
Figura 35. Intensidade média de fluorescência (MFI) das proteínas CD4, CD8 e CD3 (C)	63
Figura 36. Porcentagem de linfócitos CD4+CD25+ (A) e CD8+CD25+	64
Figura 37. MFI de CD25 em linfócitos CD4+ (A) e CD8+ (B).....	65
Figura 38. MFI de CD25 em linfócitos B CD19+	66
Figura 39. IL-10 e IL-2 nos sobrenadantes de esplenócitos após 72 horas de estímulo	67

III. ABREVIATURAS

Ab: Antibodies

ADCC: Antibody dependent cell cytotoxicity

BFT: Blood form trypomastigotes

BSA: Bovim serum albumin

CDC: complement dependent cytotoxicity

CFA: Complete Freund's adjuvant

CFDA-SE: carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl Ester

ConA: Concanavalina A

DTU: Discrete Typing Units

FBS: Fetal bovim serum

FSC: Forward scatter channel

FMO: Fluorescence minus one

HAO: Heat aggregated OVA

HE: Hematoxilina-eosina

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

KLH: Keyhole limpet hemocyanin

LA: Lytic antibodies

LB: Linfócito B

LT: Linfócito T

LPS: Lipopolissacarídeo

MASP: Mucin associated surface protein

NK: Natural killer

tGPI mucin : Mucina-glicosil-fosfotidilinositol

GIPLs : Glicoinositol-fosfolipidos

MHC: major histomcompatibility complex

MFI: Mean fluorescence Intensity

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

M.W: Molecular weight

iNOS: Inducible Nitric oxide synthase

NO: Nitric oxide

OVA: Ovalbumina

PAMPs: Pathogen associated molecular patterns

PHA: Phytohaemagglutinin

PRRs: Pattern recognition receptors

PBS: Phosphate buffered saline

PBST: PBS-Tween

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Real time polymerase chain reaction

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SMC: Spleen mouse cells

SRBC: Sheep Red Blood Cells

TI-I: T independent antigen type I

TI-II: T independent antigen type II

TcExt: *T. cruzi* extract

TLR: Toll like receptor

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2	A doença de Chagas	4
1.3	Resposta imune inata na doença de Chagas	5
1.4	Resposta adaptativa celular na doença de Chagas	9
1.5	Resposta humoral na doença de Chagas	10
1.6	Moléculas e mecanismos imunossupressores na doença de Chagas	11
1.7	Domínios repetitivos em proteínas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.8	A proteína L7a	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Animais	20
3.2	Parasitas	20
3.3	Transformação, expressão e purificação das proteínas recombinantes	21
3.4	Quantificação das proteínas	23
3.5	Predição de epítomos de linfócitos B	23
3.6	Imunização com a proteína recombinante TcL7aRep e infecção com <i>T. cruzi</i>	24
3.7	Cultura de esplenócitos, SMC (spleen mouse cells)	25
3.8	Dosagem de anticorpos	26
3.9	Dosagem de citocinas	26
3.10	Histopatologia	27
3.11	Quantificação de <i>T. cruzi</i> no coração por RT-PCR (Real Time-PCR)	27
3.12	Efeito da imunização com a TcL7aRep na resposta de hipersensibilidade	29
3.13	Teste de viabilidade celular pelo método MTT	30
3.14	Estímulo <i>in vitro</i> de esplenócitos em presença ou ausência da TcL7aRep	30

3.15	Citometria de fluxo	31
3.16	Análises estatísticas	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Expressão e purificação da proteína recombinantes TcL7a.....	35
4.2	Predição de epítomos de linfócitos B	40
4.3	Análise da resposta humoral antes da infecção	42
4.4	Imunizações com TcL7aRep e infecção.....	43
4.5	Histopatología	45
4.6	Quantificação de <i>T. cruzi</i> no coração por RT-PCR	47
4.7	Análise da resposta humoral.....	48
4.8	Estimulação de esplenócitos.....	50
4.9	Efeito da imunização com a TcL7aRep na resposta de hipersensibilidade	51
4.10	Efeito da incubação <i>in vitro</i> de esplenócitos com TcL7aRep	54
4.11	Efeito da incubação com TcL7aRep durante o estímulo na proliferação de esplenócitos <i>in vitro</i>	56
4.12	Efeito da incubação com TcL7aRep na expressão de moléculas de superfície de esplenócitos <i>in vitro</i>	62
4.13	Efeito da incubação com TcL7aRep na produção de citocinas por esplenócitos estimulados <i>in vitro</i>	67
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	78
7	BIBLIOGRAFIA.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana foi descoberta por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas no ano de 1909, e foi ele também quem elucidou o ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico dessa doença (1). É considerada uma doença negligenciada, que afeta de 6 a 7 milhões de pessoas ao redor do mundo (2). É uma doença endêmica da América Latina, no entanto nos últimos anos têm sido reportadas infecções com este parasito em países não endêmicos como Canadá, Estados Unidos e outros países da Europa, causadas principalmente por transfusões de sangue e transplante de órgãos de pacientes infectados, vindos de países endêmicos, a pacientes saudáveis (2, 3).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, e parasito intracelular obrigatório; junto com os causadores da Doença do sono, o *Trypanosoma brucei*, e os causadores da Leishmaniose, os parasitos do gênero *Leishmania*, eles pertencem à família dos cinetoplastídeos por apresentarem uma estrutura granular contendo DNA mitocondrial chamado cinetoplasto (4).

O *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo, infectando tanto hospedeiros vertebrados quanto invertebrados. O hospedeiro invertebrado é um inseto vetor hematófago, da família *Reduviidae* e sub família dos Triatomíneos, chamado comumente no Brasil de “barbeiro” (5). Os hospedeiros vertebrados são mamíferos, abrangendo mais de 100 espécies diferentes que servem como reservatórios do parasito, entre os quais estão espécies selvagens como morcegos, gambás e tatus, além de espécies domésticas como cães, ratos, gatos e suínos, e finalmente os humanos (6). Dentro dos hospedeiros vertebrados e invertebrados o parasito pode se diferenciar entre quatro formas no seu ciclo de vida, as quais são epimastigota, tripomastigota metacíclica, tripomastigota sanguínea e amastigota, que apresentam diferenças na morfologia, motilidade, capacidade replicativa e infectividade (7, 8) (Figura 1).

O ciclo de vida se inicia quando o inseto vetor deposita fezes contaminadas com o parasito na forma tripomastigota metacíclica, infectiva, mas não replicativa, perto do lugar onde suga sangue do hospedeiro vertebrado. As fezes com o parasito podem entrar em contato com a ferida feita pelo inseto quando a pessoa coça a ferida, ou por contato com mucosas, como os olhos ou a boca, onde o parasito infecta diferentes tipos de células (7). O parasito pode entrar na célula hospedeira por duas formas, a forma ativa e inativa, onde permanece dentro de uma vesícula chamada vacúolo parasitóforo durante os estágios iniciais do processo de invasão. Na forma ativa de invasão, o parasito entra mediante o recrutamento de lisossomos na membrana por um mecanismo dependente do influxo de cálcio e polimerização da actina. O parasito também pode entrar por invaginação, um mecanismo independente de polimerização de actina, mas dependente da enzima PI3K. A forma inativa de invasão depende da fagocitose/endocitose por células fagocíticas profissionais como os macrófagos (revisto por (9)).

Dentro do vacúolo parasitóforo, os tripomastigotas se transformam na forma amastigota, que após lise da membrana do vacúolo, se multiplicará por fissão binária no citoplasma, e depois se transforma em tripomastigota com alta motilidade, afetando seriamente a integridade da célula com consequente lise e morte celular. Isso culmina com a liberação de tripomastigotas na vizinhança, onde os parasitas podem invadir novas células. Eventualmente os tripomastigotas chegarão à corrente sanguínea, podendo invadir outras células ou infectar o inseto vetor quando este se alimenta do sangue do hospedeiro infectado. Dentro do intestino do triatomíneo, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, onde se multiplicarão e passarão ao reto. Lá, estas se diferenciarão para tripomastigotas metacíclicas, que serão depositadas nas fezes ao lado da ferida feita pelo inseto ao se alimentar de sangue do hospedeiro, onde o ciclo de vida começa de novo (7)(Figura 1).

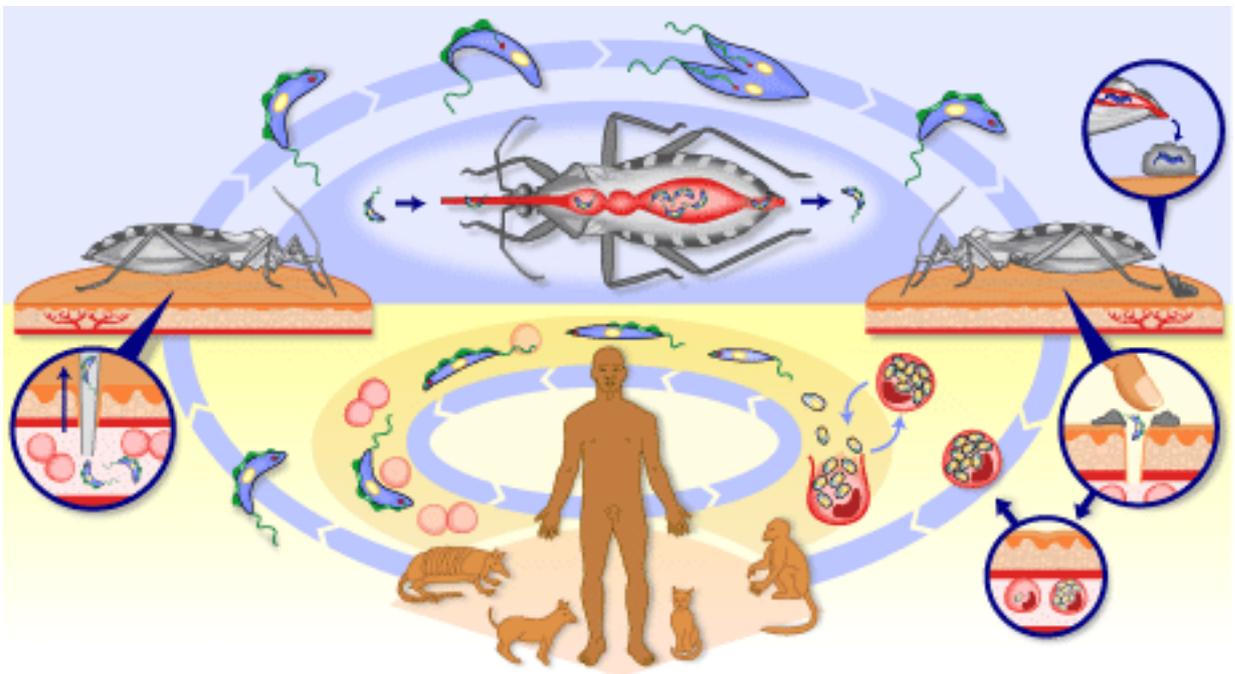


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Na parte superior, o ciclo de vida do parasito no hospedeiro invertebrado (inseto vetor), e na parte inferior, o ciclo de vida no hospedeiro vertebrado (mamíferos) (10).

1.2 A doença de Chagas

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases: a fase aguda, na qual o parasito pode ser detectado no sangue por análise com microscópio óptico comum, e a fase crônica, onde o parasito é dificilmente achado no sangue.

A fase aguda pode ser assintomática ou com sintomas fugazes, como febre ou inflamação na porta de entrada do parasito (chagoma de inoculação). Nos dois casos se evidencia parasitemia (presença de parasitos no sangue), que passa do estado pré-patente (antes de ser detectado) ao patente (detectado) até chegar ao pico da parasitemia, para depois descer de novo até níveis sub-patentes, onde começa a fase crônica (5) (Figura 2). Contudo, a cinética da parasitemia e a patologia resultante na infecção dependem das características genotípicas tanto do parasito quanto do hospedeiro. (11).

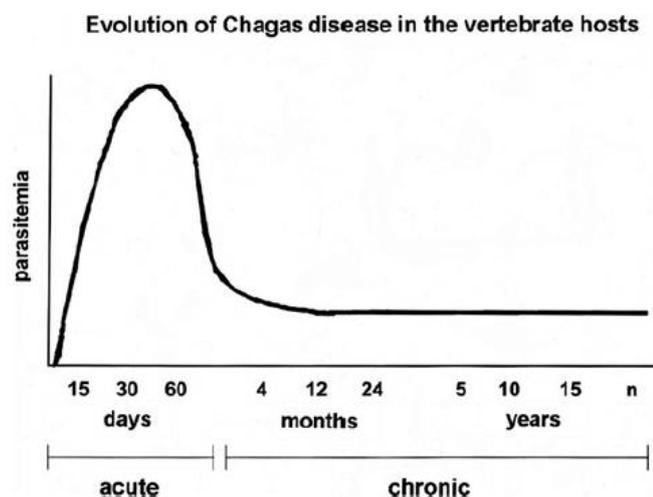


Figura 2. Cinética típica de uma parasitemia na fase aguda e crônica em um hospedeiro vertebrado infectado com *Trypanosoma cruzi* (12).

Na fase crônica, os parasitos são dificilmente encontrados no sangue e a sorologia é usualmente positiva. Nesta fase, a maioria dos pacientes apresenta uma forma clínica indeterminada, sem manifestações clínicas, mas aproximadamente 20-40% dos pacientes infectados desenvolvem formas determinadas, com sintomas na segunda ou terceira década após a infecção. Aproximadamente 94,5% desses pacientes sintomáticos desenvolvem complicações cardiológicas, chamadas em conjunto de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), que é caracterizada por arritmias, distúrbios na condução elétrica, falha cardíaca e embolia (13, 14). Aproximadamente 4,5% dos pacientes que apresentam formas clínicas desenvolvem falhas no sistema digestivo, desenvolvendo síndromes como megacólon e megaesôfago (15, 16).

1.3 Resposta imune inata na doença de Chagas

A resposta imune do hospedeiro é ativada logo após a infecção; primeiramente a resposta imune inata e depois a adaptativa, ambas importantes para o reconhecimento e controle da infecção pelo parasito (17).

Na resposta imune inata, os macrófagos e as células dendríticas têm um papel importante, pois são as células que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mediante os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), deflagrando uma resposta inflamatória mediada por citocinas e mediadores lipídicos. Além disso, estas células também são importantes para modular a posterior resposta imune inata, pois são células fagocíticas profissionais que endocitam/fagocitam micróbios, processam os antígenos e posteriormente apresentam para linfócitos T CD4+ (revisado em (17)).

Na família dos PRRs, os TLR-2, 4 e 9 (do inglês Toll like receptor) têm sido descritos como essenciais na doença de Chagas, tanto no reconhecimento do *Trypanosoma cruzi* quanto no início da resposta imune inata e modulação da adaptativa (18, 19), pois reconhecem PAMPs como mucina-glicosil-

fosfatidilinositol (tGPI-mucin), glicoinositol-fosfolípidos (GIPLs) e DNA genômico, deflagrando cascatas intracelulares de sinalização que culminam com a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12 (20, 21) (Figura 3).

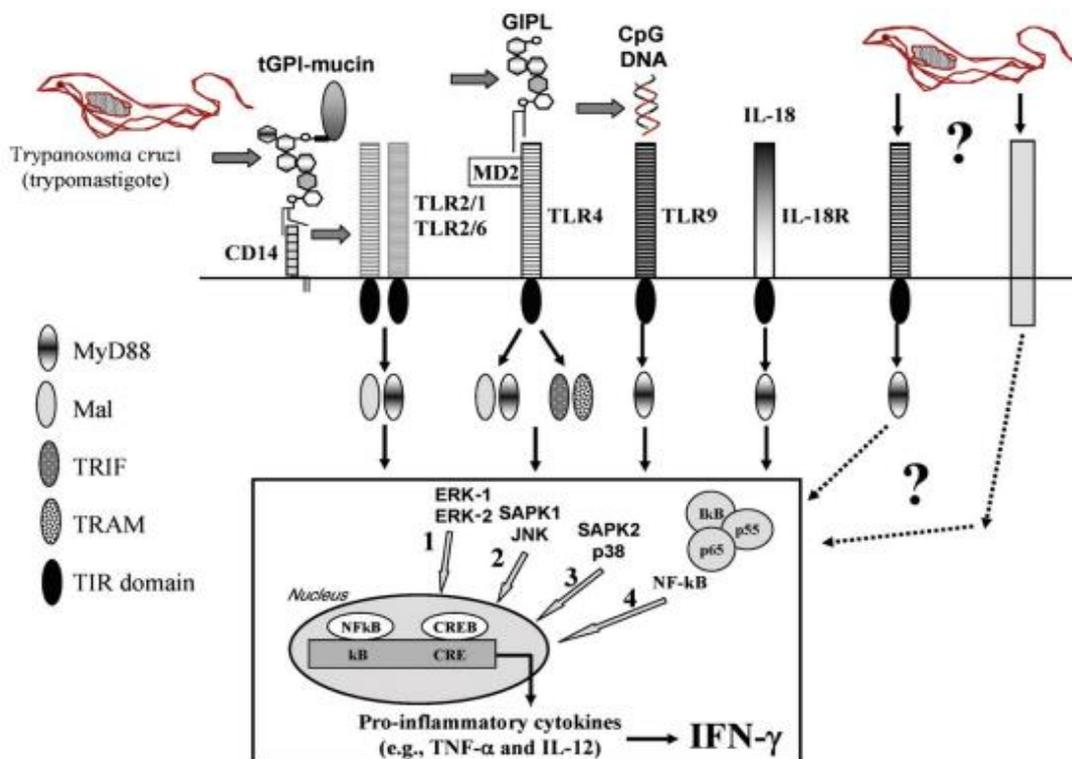


Figura 3. Reconhecimento de tGPI-mucin, GIPL e CpG DNA do *T. cruzi* por TLR-2, 4 e 9, respectivamente, pelos macrófagos e células dendríticas do hospedeiro, e a consequente ativação de proteínas adaptadoras e fatores de transcrição que levam à expressão de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias (20).

A citocina IFN- γ é produzida por células NK, pré-ativadas por IL-12 liberada por macrófagos ativados, e junto com TNF- α (Figura 4) ativam macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que mata diretamente o parasito (22). O reconhecimento de PAMPS por TLRs deflagra também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o anion radical superóxido $\bullet\text{O}_2^-$, que depois de reações espontâneas e outras catalisadas por enzimas e metais geram outros ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidróxido $\bullet\text{OH}$, e a reação com NO que gera peroxinitrito (ONOO^-), entre outros, que geram dano oxidativo ao parasito (23-25); no entanto, outras pesquisas apontam que ROS são importantes para o crescimento e sinalização do parasito (26, 27).

O sistema de complemento é um conjunto de proteínas que fazem parte do sistema imune inato e tem sido reportado como um dos mecanismos imunes de controle do *T. cruzi*, tanto em humanos quanto em camundongos. De forma interessante, as formas tripomastigotas metacíclicas são mais resistentes ao sistema de complemento quando comparadas às epimastigotas (28). A diferença na susceptibilidade está na expressão de moléculas de evasão do complemento como CRP (Complement regulatory protein), DAF (decaymnet accelerator factor), Complement C2 receptor inhibition trispanning (CRIT), gp 58/68, *T. cruzi* calreticulina, e H factor (HF) em tripomastigotas metacíclicas, (revisado em (29)). O bloqueio destes mecanismos de evasão é feito por anticorpos específicos contra essas proteínas produzidos pelo hospedeiro, chamados de anticorpos líticos (LA, do inglês lytic antibodies), permitindo ao sistema complemento agir corretamente (30-32).

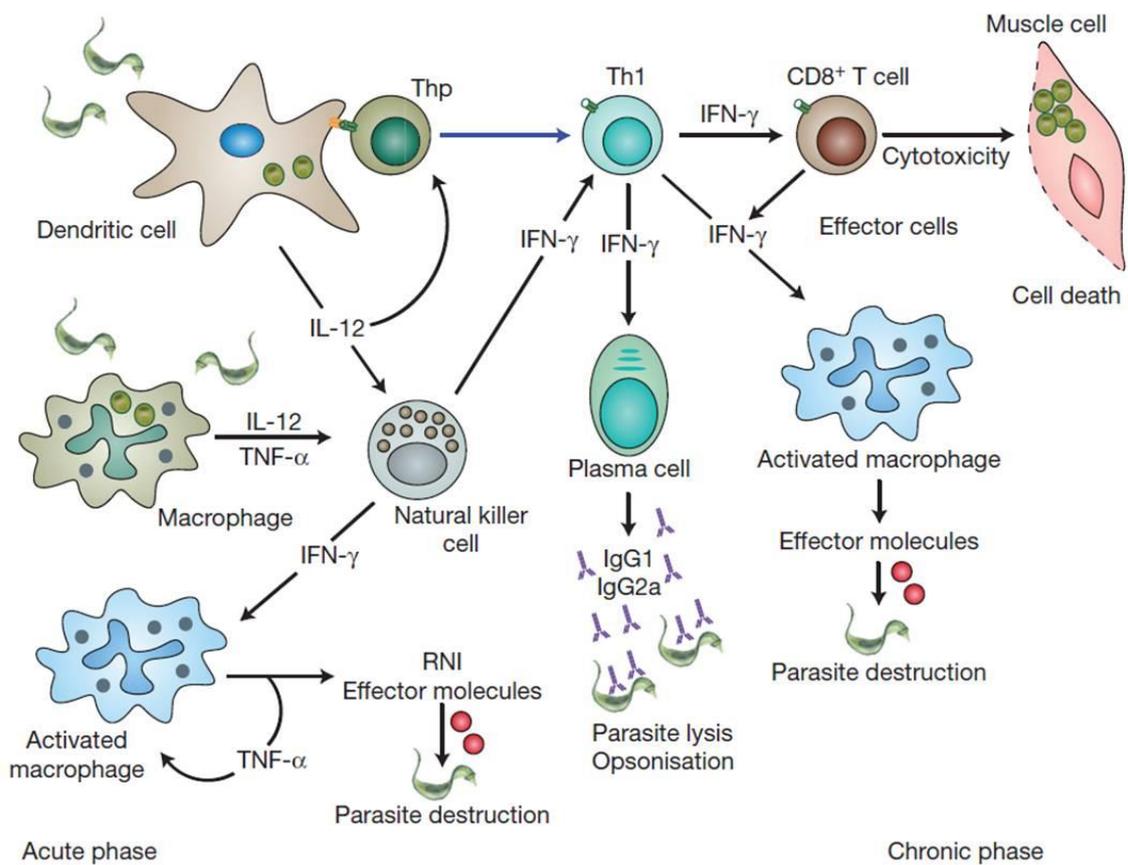


Figura 4. Rede de citocinas e células da resposta imune inata e adaptativa na doença de Chagas (33).

1.4 Resposta adaptativa celular na doença de Chagas

A resposta adaptativa é modulada por células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imune inato, como células dendríticas e macrófagos, que fagocitam, processam e apresentam antígenos exógenos, ligados ao complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II), para os linfócitos CD4+ (linfócitos T auxiliares, Th).

Em troca, os linfócitos Th (CD4+) modulam a resposta inata (34), humoral (35), e citotóxica (36) contra *T. cruzi*, mediante a produção de citocinas, que podem ser tipo Th1, Th2 (37) ou Th17 (38).

Na infecção intracelular, antígenos do patógeno ligados ao complexo principal de histocompatibilidade-I (MHC-I) são apresentados aos linfócitos CD8+ (linfócitos T citotóxicos, Tc). Os linfócitos T CD8+ têm um papel essencial no mecanismo de defesa na doença de Chagas (39), mais efetivo do que a resposta humoral (40). Além de produzir IFN- γ para ativar células apresentadoras de antígeno, os linfócitos CD8+ eliminam as células do hospedeiro infectadas com *T. cruzi* pelo reconhecimento de antígenos não próprios apresentados no MHC-I (41). Os linfócitos CD8+ junto com as células NK protegem o hospedeiro destruindo células infectadas (35), mediando sua resposta efetora citotóxica/citolítica através da produção de granzimas, que são transportadas intracelularmente por poros na membrana formados por perforinas e depois até o parasito pela granzulina, uma proteína presente em humanos, mas não em camundongos (42).

Apesar destes mecanismos de defesa serem efetivos, sabe-se que camundongos infetados com *T. cruzi* têm alterações imunológicas causadas por imunossupressão, pois seus esplenócitos têm capacidade reduzida de responder a estímulos *in vitro* com ativadores policlonais de linfócitos T como concanavalina A (ConA) (43) ou fitohemaglutinina (PHA) (44). Adicionalmente, a resposta hipersensível, induzida por imunizações com antígenos de *T. cruzi*,

é diminuída em camundongos infectados quando comparados com não infectados (45).

1.5 Resposta humoral na doença de Chagas

A resposta humoral é mediada por anticorpos que são produzidos por diferentes sub-tipos de linfócitos B. Na doença de Chagas, a resposta humoral tem sido reportada como relativamente menos importante, quando comparada com a resposta citotóxica mediada por linfócitos CD8+, porém essencial (40). Experimentos de depleção da resposta humoral mostram aumento da susceptibilidade de camundongos à infecção com *Trypanosoma cruzi* (46). A transferência de soro de animais infectados para camundongos antes da infecção confere proteção (47) e transferência de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra *T. cruzi* de animais infectados para camundongos saudáveis antes da infecção confere proteção, demonstrando a importância destes dois isotipos de anticorpos (48, 49). Estes experimentos suportam o importante papel da resposta humoral na doença de Chagas.

Na doença de Chagas, os anticorpos conferem proteção contra o parasito mediante vários mecanismos efetores, como ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity), melhora da citotoxicidade dependente do complemento (CDC) pelo bloqueio de moléculas reguladoras do sistema de complemento (30), neutralização da infectividade do parasito (50) e mediante opsonização, (revisado em (47)).

No entanto, camundongos e humanos infectados pelo *T. cruzi* mostram uma marcada imunossupressão humoral, evidenciada, por exemplo, pela diminuição na capacidade de produzir anticorpos quando camundongos infectados são imunizados com antígenos heterólogos como células vermelhas de cabra (51, 52). Alterações da resposta imunológica humoral têm sido reportadas também *in vitro*, pois os esplenócitos de camundongos infectados com *T. cruzi* mostram uma reduzida capacidade para responder quando estimulados com antígenos dependentes e independentes de linfócito T (53).

A doença de Chagas também está caracterizada por hipergamaglobulinemia, que é uma alta quantidade de anticorpos no soro. No entanto, a maioria destes anticorpos não são específicos para o parasito e estão associados com imunossupressão (54). Estes anticorpos são produzidos pela ativação inespecífica e policlonal de linfócitos B. Em *T. cruzi* estão identificados vários ativadores policlonais como a transialidase (55), malato desidrogenase (56), glutamato desidrogenase (57), rTc24 (57) e prolina racemase (58).

1.6 Moléculas e mecanismos imunossupressores na doença de Chagas

Os microorganismos patogênicos necessitam desenvolver mecanismos de evasão da imunidade para existirem, sobreviverem e continuarem seu ciclo de vida nos hospedeiros. O *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos têm ferramentas moleculares, chamadas de fatores de virulência, que permitem a invasão de células do hospedeiro e evasão do sistema imune (4).

Como descrito anteriormente, animais e humanos infectados pelo *T. cruzi* apresentam alterações no sistema imunológico adaptativo, tanto humoral (53), quanto celular (44, 59), que parece ser o resultado de alterações multifatoriais, entre as quais estão a proliferação de células mieloides imunossupressoras do hospedeiro (43, 59, 60), anergia dos linfócitos T (61) e diminuição da produção de IL-2 (62).

Além disso, o grupo de Kierszenbaum demonstrou diminuição da produção da citocina IL-2 e do receptor de IL-2, IL-2R (CD25) em linfócitos CD3+, CD8+ e CD4+, além da diminuição da expressão do receptor CD3 nos linfócitos e das moléculas CD4 e CD8 nos linfócitos correspondentes, quando linfócitos extraídos do sangue de humano são co-cultivados com *Trypanosoma cruzi* após estímulo com α -CD3 e PHA (63). Estes efeitos foram observados na cultura de linfócitos humanos co-cultivados com tripomastigotas e com

sobrenadantes de cultura de tripomastigotas metacíclicas (64), onde se confirmou que a proteína chamada TIF (*Trypanosomal Immunosuppressive Factor*) é a molécula responsável por essa imunossupressão (65).

A glicoproteína AGC10, que é ancorada à GPI e secretada pelo parasito nas formas tripomastigota, epimastigota e amastigota, também demonstrou capacidade em causar diminuição na proliferação e na expressão de IL-2R (CD25) e suas sub-unidades CD132 e CD122, quando linfócitos humanos estimulados com PHA (phytohaemagglutinin) e α -CD3 foram incubados com esta glicoproteína (66). Desta forma, algumas moléculas secretadas pelo *Trypanosoma cruzi* induzem imunossupressão em linfócitos por reduzirem os níveis de moléculas importantes no reconhecimento de antígenos e para a proliferação nos estados de ativação da resposta imune adaptativa (67).

Os mecanismos de imunoevasão na doença de Chagas e outras doenças microbianas são amplamente estudados, mas ainda não está perfeitamente esclarecido quais são os fatores do parasito responsáveis por esse fenômeno. Dados recentes da literatura, como também resultados recentes obtidos pelo nosso grupo, indicam que parece haver uma clara relação entre a imunossupressão e a grande quantidade de domínios repetitivos no proteoma de *Trypanosoma cruzi*.

1.7 Domínios repetitivos em proteínas de *Trypanosoma cruzi*

Um domínio repetitivo é uma parte de uma proteína que se define como duas ou mais cópias de um padrão de aminoácidos. Na natureza, tanto eucariotos quanto procariotos têm proteínas contendo domínios repetitivos (68). No entanto, estudos comparativos demonstram que os organismos eucariotos têm mais repetições do que os procariotos. Dados de análises comparativas de genomas tem demonstrado que parasitos eucariotos têm um número maior de repetições e repetições maiores em seus proteomas do que eucariotos de vida livre (não parasitos) (69). Além disso, Mendes et al. demonstraram que, entre

protozoários, parasitos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* têm maior número de repetições do que parasitos extracelulares, o que sugere que as repetições têm papel importante na adaptação do parasito ao nicho no hospedeiro e na evasão da resposta imune (70).

No projeto de sequenciamento do *Trypanosoma cruzi* foi evidenciado que ao redor do 50% do genoma do clone CL Brener é composto de repetições. Proteínas contendo repetições são envolvidas em processos de adesão celular e evasão imune, como transialidases, mucinas, gp63s e a família de proteínas de superfície associadas a mucinas, MASP (71). É interessante observar que muitos domínios repetitivos têm sido reportados como imunodominantes, pois são fortes alvos da resposta imune adaptativa. A imunodominância é a focalização da resposta imune adaptativa. Este fenômeno faz com que se reconheçam preferencialmente poucos epítomos entre centenas ou milhares de epítomos disponíveis num antígeno. A imunodominância se estabelece devido a vários fatores como abundância do epítomo, processamento do antígeno, afinidade pelo MHC (72, 73) e competência entre clones diferentes de linfócitos (74).

Na doença de Chagas, as repetições nas proteínas têm um papel importante na imunidade do hospedeiro. Goto et al. demonstraram que os domínios repetitivos em *tandem* apresentam imunodominância humoral (75). Além disso, tem sido reportado que 30% dos linfócitos T CD8+ na infecção experimental com *T. cruzi* são específicos para o epítomo ANYKFTLV, presente nas transialidases (76), codificadas pela maior família gênica do *T. cruzi* (77). Embora tenha sido proposto que a imunodominância poderia otimizar a resposta imune para uma resposta mais específica e efetiva, na doença de Chagas têm surgido hipóteses que propõem que a imunodominância seja mais um mecanismo de escape do *T. cruzi* contra uma resposta mais ampla e talvez mais efetiva (78).

Em parasitos como *Plasmodium falciparum*, a resposta imune humoral está altamente dirigida para os domínios repetitivos das proteínas; esse mecanismo, conhecido como “cortina de fumaça”, é considerado uma poderosa estratégia

de evasão que evitaria uma resposta dirigida para alvos mais importantes do parasito (79). Isto poderia se aplicar também para o *Trypanosoma cruzi*, pois tem sido descrito que as proteínas com repetições são fortes alvos da resposta imune humoral contra o *T. cruzi* (75).

Tendo em conta que os antígenos independentes de linfócitos T tipo II (TI-II) são antígenos multivalentes, com epítomos repetitivos que fazem *cross-linking* de vários receptores de linfócitos B e deflagram a proliferação e a produção de anticorpos (na presença de citocinas como IFN- γ e GMCSF) (80), Schofield propôs a hipótese de que os domínios repetitivos, presentes em *Plasmodium falciparum*, *T. cruzi* e outros parasitos, seriam antígenos TI-II potencias (81), o que explicaria a grande imunogenicidade humoral dos domínios repetitivos.

1.8 A proteína L7a

Com o objetivo de identificar proteínas para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e mais específicos, e antígenos candidatos ao desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra a doença de Chagas, nosso grupo realizou um *screening* de clones de uma bibliotecas de cDNA com soros de pacientes chagásicos. Esse *screening* mostrou que proteínas ribossômicas, proteínas paraflagelares e proteínas de choque térmico ou HSP (heat shock proteins), são as proteínas mais reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro de pacientes, sendo as ribossômicas responsáveis por 54% desse reconhecimento. Análises das sequencias dessas proteínas evidenciaram que cerca de 70% das que reagiram com soro de pacientes contém domínios repetitivos (Figura 5) (82).

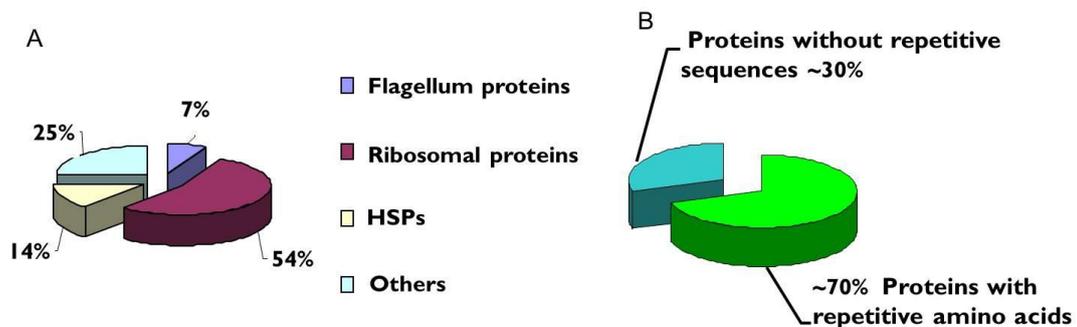


Figura 5. Esquema de porcentagens dos diferentes tipos de proteínas reconhecidos por soros chagásicos (A). Porcentagem de proteínas ribossômicas com e sem repetições (B).

Um dos clones reconhecidos pelos soros codifica para a proteína L7a do *Trypanosoma cruzi* (TcL7a), homóloga à proteína L7a de vários eucariotos, que faz parte da subunidade 60S do ribossomo. No entanto, análises comparativas da L7a com outras espécies parasitárias ou não parasitárias, mostram que o domínio repetitivo que codifica a sequência AAK(P/T/S) está presente exclusivamente na proteína do *T. cruzi* (82) (Figura 6).

TcRpL7a	MFGKEVKK	AAKPAAKTAAKTAAKPAAKSAAKPAAKPAAKPAAKPAAKTAAKPAKKE	AVKPTVKKPAAKAAAPYKKE-	79
<i>G. gallus</i>	MFKGKK--		AKGKKVAPAPAVVKKQEAKE	26
<i>A. thaliana</i>	MAPN-----		NGVKVAKKKTAEK	18
<i>T. brucei</i>	MAGKEVKK-----		AVKPTK-----AGVPYKKE	
TcRpL7a	-----	AAISPEVARPKNFGIGHDVPYARDLSRFMRWPTFVTMQRKKRVLQRRLLKVPVPAHQFTKVLDRSSRNELL		149
<i>G. gallus</i>	-----	VVNPLFEKRPKNFGIGQDIQPKRDLTRFKWPRYIRLQQRORSILYKRLKVPVAINQFSQALDRQTATQLL		96
<i>A. thaliana</i>	-----	VSNPLFERRPKQFGIGGALFPKKDLRSRYIKWPKSIRLQQRKRIILQRLKVPVPAIDNQFTKTLQKNLATSIF		88
<i>T. brucei</i>		VTQKKAKASAAAFSPFVARPKDFGIGRDPYARDLSRFMRWPTFVTMQRKKRVLQRRLLKVPVPAIDNQFTKVLDRSSRNELL		
TcRpL7a		KLVKYKPSETRARRQRLFDVATEKKKNE-EAASKKAPLSVVTGLQEVTRTIEKKTARLVMIANNVDPIELVLMWPTLCR		228
<i>G. gallus</i>		KLAKHYRPETKQEKQRLARAEQNAAGKGDTPK-RPPVLRAGVNTVTLVENKKAQLVVIADVDPIELVFLPALCR		175
<i>A. thaliana</i>		KVLLKYRPEDKAKKERLVKKAQAEAEAG-KPSESKE-FIVVKYGLNHVTYLLEQNKQAQLVVIADVDPIELVWLPALCR		166
<i>T. brucei</i>		KLVKKYAPETRKARRDRLTKVAEERKKKNEKGTVSTKAPLCVVSGLQEVTRTIEKKTARLVLIANNVDPIELVLMWPTLCR		
TcRpL7a		ANKVPYAIVKDKARLGDVAVGRKTATCVAITDVAEDEEAALKNLIRSVNARFLARSDVIRRQWGLQLSLRSRAELRKKRA		308
<i>G. gallus</i>		KMGVPYCIKSKARLGLRVLVHRKTCCTCVAPTQVNPEDKALAKLVEAVKTNYNDRYDEIRRHGGNVLGPKSVARIAKLEK		255
<i>A. thaliana</i>		RMEVYPCIVKGRSRLGAVVHQKTASCLCLTTVKNEKLEFSKILEAIKANFNDKYEEYRKKWGGGIMGSKSQAKTKAKER		246
<i>T. brucei</i>		ANKIPYAIVKDKARLGDVAVGRKTATCVAITDVAEDCAALKN		
TcRpL7a		RNAGKDAAAVM*		319
<i>G. gallus</i>		AKAKELATKLG*		266
<i>A. thaliana</i>		VIAKE-AAQRMN*		257

Figura 6. Análise comparativa da proteína ribossômica L7a em várias espécies (13).

Pais et al. avaliaram a correlação da quantidade de repetições na TcL7a em várias cepas de *T. cruzi* com a virulência destas. Neste trabalho, os autores demonstraram que genes codificadores dessas proteínas presentes em cepas mais virulentas, correspondentes ao grupo *T. cruzi* II, possuem maior número de repetições de aminoácidos nesta proteína. Além disso, estudos realizados com a proteínas recombinante e peptídeos sintéticos contendo essas repetições demonstraram que a porção repetitiva é reconhecida especificamente por soros de pacientes chagásicos (83). Buscando investigar o papel desse domínio repetitivo, o nosso grupo expressou, purificou e vacinou camundongos com a proteína TcL7a e suas versões truncadas: a porção repetitiva TcL7aRep e a proteína sem a porção repetitiva TcL7a Δ Rep (Figura 7).

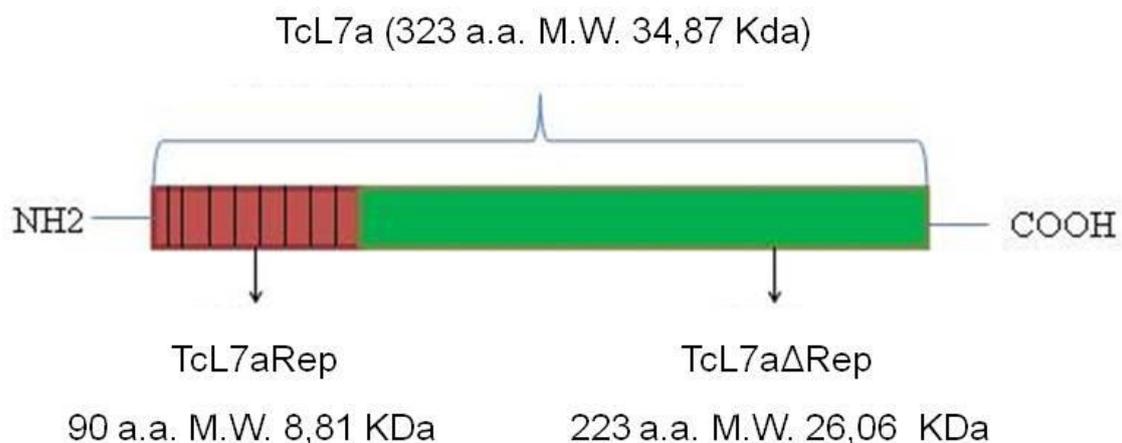


Figura 7. Esquema da proteína TcL7a de *Trypanosoma cruzi* e as versões truncadas.

Em um protocolo de três imunizações junto com adjuvantes (CpG + Alumen), evidenciou-se que a proteína completa TcL7a reduz a parasitemia e mortalidade. Contudo, isso não foi demonstrado para a TcL7a Δ Rep. Inesperadamente, a porção repetitiva TcL7aRep exacerbou a parasitemia e mortalidade quando os animais vacinados foram comparados com o grupo controle (84). Ao avaliar o mecanismo de proteção conferido pela imunização com a proteína TcL7a completa, o nosso grupo verificou que essa proteína induz a produção de anticorpos tanto contra a proteína TcL7a quanto contra a porção repetitiva TcL7aRep. No entanto, a imunização com o antígeno recombinante correspondente à repetição não induziu uma resposta humoral nem contra a proteína inteira nem contra a repetição (85).

A análise da resposta celular efetora pelo re-estímulo de esplenócitos de camundongos previamente imunizados com a proteína TcL7a e suas versões truncadas, demonstrou que a proteína inteira induz produção de IFN- γ e IL-10 quando os esplenócitos são re-estimulados com esta proteína, mas a imunização com a proteína repetitiva TcL7aRep e o posterior re-estímulo com a mesma não induz a produção destas citocinas (85). Em conjunto, esses dados indicaram que o mecanismo de proteção conferido pela imunização com a proteína completa TcL7a requer a geração de uma resposta humoral e celular efetiva contra esse antígeno. Entretanto não foram obtidos dados experimentais que indicassem qual o mecanismo responsável pelo aumento na parasitemia e na mortalidade causados pela imunização com antígenos contendo somente o domínio repetitivo. Esta é uma questão importante, pois a elucidação de mecanismos de evasão e imunossupressão são importantes para a pesquisas de novos alvos para o desenvolvimento racional de vacinas e fármacos contra *T. cruzi*. Para isto, nós produzimos a proteína recombinante TcL7aRep, contendo somente as repetições, e fizemos análises *in vivo* e *in vitro* da resposta imune de camundongos imunizados e infectados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a função imunológica do domínio repetitivo de proteínas contendo repetições do *Trypanosoma cruzi* na relação parasito-hospedeiro.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da imunização com o antígeno recombinante TcL7aRep, o qual contém somente o domínio repetitivo da proteína TcL7a, na susceptibilidade de camundongos à infecção pelo *T. cruzi*.
2. Correlacionar a susceptibilidade de camundongos imunizados com TcL7aRep com análises histopatológicas.
3. Investigar as alterações na resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados com TcL7aRep.
4. Investigar um possível efeito imunossupressor exercido pelo domínio repetitivo da proteína TcL7a por meio de experimentos de estimulação *in vitro* de células isoladas de camundongos saudáveis, na presença ou ausência desta proteína.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 4-6 semanas de idade, do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO) com a autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA).

3.2 Parasitos e células

Foi utilizado o parasito *Trypanosoma cruzi* do clone CL Brener, pois seu genoma já foi sequenciado, o que facilita análises comparativos e clonagem de fragmentos do seu DNA. As formas tripomastigotas metacíclicas foram cultivadas infectando a linhagem celular LLC-MK2 em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich). As células foram cultivadas a 37°C e mantidas por passagens semanais dos parasitos liberados no sobrenadante em novas células LLC-MK2.

O extrato de *T. cruzi* (TcExt) foi feito coletando-se os tripomastigotas no sobrenadante de cultura, liberados 5-7 dias após da infecção. Os parasitos foram centrifugados a 3400 rpm e lavados em PBS 1x estéril duas vezes. O extrato foi feito induzindo choque térmico, congelando-se as amostras em nitrogênio líquido e depois aquecendo em banho Maria a 37°C, isto por 10 vezes.

Os tripomastigotas de forma sanguínea (BFT) foram mantidas por passagem em camundongos BALB/c em intervalos de 15-20 dias.

3.3 Transformação, expressão e purificação das proteínas recombinantes

Vetores com a sequência correspondente da proteína TcL7a (número de acesso no Genebank: AF316150), o domínio repetitivo TcL7aRep, e a região não repetitiva TcL7a Δ Rep foram clonadas em vetores de expressão pET21a (Novagen), que contêm uma região que codifica para uma cauda de histidina (polyHis), pelo doutor Fabiano Sviatopolk-Mirsk Pais (83).

Para a transformação de bactérias, 10ng dos vetores de expressão pET21a contendo as sequências referentes à proteínas TcL7a, TcL7a Δ Rep e TcL7aRep foram utilizados para transformar bactérias quimiocompetentes BL21 Star™(DE3). As células e os plasmídeos foram incubados no gelo por 30 minutos e em seguida recebiam choque térmico a 42°C por 50 seg. Um minuto após o choque térmico foram adicionados 400 μ l de meio de cultura 2XYT (0,4g Tripton; 0,25g Extrato de levedura; 0,125g NaCl) e o material foi incubado a 37°C por 1 hora com agitação (37°C a 180 rpm - C25 Incubator). Foram plaqueados 100 μ L do transformado em placas contendo meio de cultura 2XYT com 1,5% de ágar e antibiótico ampicilina (100 mg/mL) cobrindo toda a área disponível. As placas foram mantidas *overnight* em estufa a 37°C para crescimento das colônias de bactérias contendo o DNA de interesse.

Para o pré-inóculo, várias colônias foram adicionadas em 25 mL de meio 2XYT com ampicilina, ficando sobre agitação a 37° até atingir a densidade óptica (OD) de 0,4 unidades por análise espectrofotométrica a 600 nm. Para o inóculo, foi realizada uma diluição do pré-inóculo na proporção de 1:20 no total de 500 mL de meio 2XYT com ampicilina e incubados sob agitação até a OD de 0,6 a 600 nm. Uma alíquota de 1 mL (não induzido) foi coletada para posterior análise da indução e no restante do crescido foi adicionado 1mM de IPTG, que então foi deixado sob agitação durante 3 horas para indução das proteínas recombinantes. Após 3 horas foi coletada uma alíquota de 1 mL (induzido) para análise da indução. As alíquotas e o restante do meio foram

centrifugados a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* referente a 500 mL de cultura foi armazenado a -80°C. Para confirmação da indução das proteínas, o *pellet* das alíquotas foi ressuspenso em 60µl de água e 20µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,00125%), fervido por 5 minutos e as proteínas foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE.

Após a confirmação da indução das proteínas recombinantes, os *pellets* correspondentes a cultura de 500 mL das proteínas TcL7a e TcL7aDeltaRep foram ressuspendidos em 20 mL de PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM NaH₂PO₄, pH 7,2) enquanto que o *pellet* correspondente a proteína TcL7aRep foi ressuspendido em tampão de ligação Histrap (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4). Todos os *pellets* foram homogeneizados e lisados usando o Homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da lise foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 min a 4°C, obtendo as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (*pellet*), sendo coletada uma alíquota da fração solúvel para posterior análise. Para a proteína TcL7a, a fração insolúvel foi ressuspendida com 20 mL de tampão de ligação Histrap (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) contendo 4M de uréia, centrifugado novamente a 13.000 rpm por 10 min a 4°C, separando a parte solúvel e insolúvel em uréia, foram coletados uma alíquota de ambas as frações para posterior análise. A fração insolúvel referente a proteína TcL7aDeltaRep foi ressuspendida em 20 mL de tampão de ligação Histrap (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) contendo 8M de uréia, centrifugado a 13.000 rpm por 10 min a 4°C, para separação das frações solúveis e insolúveis em uréia sendo alíquotas coletadas para análises posteriores.

As duas formas das proteínas foram purificadas em coluna de níquel (His Trap GE HealthCare), utilizando-se o programa *Histidine-tagged protéin purification, step elution* do cromatógrafo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). A eluição das proteínas foi realizada com solução contendo 20 mM de fosfato de sódio, 500 mM NaCl e 500 mM de imidazol, pH 7,4. As purificações foram analisadas em SDS-PAGE a 12,5%, em diferentes concentrações. As frações consideradas

puras foram unidas, dialisadas em cassetes de diálise (Slide-A-Lyzer/Thermo Scientific) e concentradas no neofilizador.

As proteínas recombinantes foram submetidas ao processo de extração de LPS com Triton X-114. Para isso, foi adicionado Triton X-114 10% (Sigma) em concentração final de 1% às proteínas e em seguida os tubos foram incubados em gelo por 30 min, vortexando-os a cada 10 min. Os tubos foram aquecidos por 5 min a 37°C e centrifugados a 13.000xg por 5 min à temperatura ambiente para separação das fases. A fase aquosa, correspondente à proteína, foi removida, transferida para um novo tubo e o processo foi repetido por 8 vezes.

Testes utilizando o kit LAL-Gel-Clot (Charles River Endosafe) foram realizados com todas as proteínas, para detectar a presença de LPS, de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Quantificação das proteínas

A quantificação da proteína TcL7a foi feita utilizando-se o reagente de Bradford (Biorad Protein assay) seguindo-se as instruções do fabricante, e comparando-se com curva padrão feita com BSA (Promega).

A quantificação da TcL7aRep foi feita por SDS-PAGE em gel de 12,5% em diferentes concentrações, comparando-se com curva de BSA.

3.5 Predição de epítomos de linfócitos B

A ferramenta on-line “Bepipred Linear Epitope Prediction” no servidor <http://tools.iedb.org/> foi utilizada para a predição de epítomos lineares de linfócitos B na proteína TcL7a.

3.6 Imunização com a proteína recombinante TcL7aRep e infecção com *T. cruzi*

Camundongos BALB/c fêmeas entre 4 e 6 semanas de idade, foram divididos em 2 grupos. No primeiro grupo, cada camundongo foi imunizado com 10 µg de TcL7aRep mais adjuvantes. O segundo grupo consistiu de camundongos injetados só com os adjuvantes. Para os dois grupos, a solução de adjuvantes foi preparada com 30% v/v de alumen, 18µg de CpG B344 (Alpha DNA) e água de injeção, num volume final de 100µL. As imunizações foram feitas 3 vezes, com 14 dias de intervalo, por via subcutânea (s.c). Amostras de sangue foram obtidas ao longo do protocolo de imunização, nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35, para o monitoramento de anticorpos no soro. Os 2 grupos imunizados foram desafiados com 5000 tripomastigotas de forma sanguínea (BFT) diluídas em PBS 1X, por via intraperitoneal (i.p), 20 dias após a última imunização.

A parasitemia foi mensurada em dias alternados a partir do dia 12 após a infecção, pelo método de Brener (86). Resumidamente, 5µL de sangue são retirados pela cauda e colocados entre lâmina e lamínula para a contagem do número de parasitos presentes em 50 campos em microscópio óptico.

No pico da parasitemia (ao redor do dia 20) os camundongos foram sangrados e depois sacrificados por deslocamento cervical. Os baços foram removidos em condições estéreis para cultura de esplenócitos. Os corações também foram removidos e cortados transversalmente pela metade, fixados e estocados em formalina tamponada 10% (3.7% formaldeído, Na₂HPO₄ 0,04 M, 0,3 M NaH₂PO₄) para posterior quantificação de parasitos e análise histopatológica.

Para se obter o soro, se permitiu a coagulação do sangue por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2000 xg por 10 minutos; o soro foi retirado e estocado a -20°C para posterior análise de anticorpos.

3.7 Cultura de esplenócitos, SMC (spleen mouse cells)

Os baços dos 2 grupos de camundongos foram coletados e cultivados em placas de 24 poços com 3 mL de meio RPMI completo (penicilina/estreptomicina, NaHCO₃ e 5% de soro fetal bovino (SFB) pH 7,2). Depois foram transferidos a filtros de 100 µm (Cell Strainer BD Falcon) e macerados com êmbolos de seringas junto com 3 mL de meio. As suspensões celulares foram coletadas em tubos de 50 mL e centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C. A cada tubo se adicionou 3 mL de tampão 1X de lise de eritrócitos ACK (ammonium-chloride-potassium, NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 0,1M e Na₂EDTA 0,1M) e se incubou em gelo por 5 minutos. Se adicionou 3 mL de meio RPMI para parar a reação e foram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi ressuspenso em 3 mL de meio RPMI completo e o material não digerido foi removido.

Alíquotas das suspensões celulares foram diluídas 1:100 em azul de tripan, e o número de células foi contado em câmara de Neubauer com ajuda do microscópio óptico no aumento de 40X.

Em placas de 24 poços, se adicionou 5X10⁶ esplenócitos por poço em meio RPMI com 10% de SFB, junto com os estímulos, num volume final de 1 mL. Os estímulos usados foram: extrato total de *T. cruzi* a uma concentração final de 20µg/mL, ConA (Sigma-Aldrich) a 5µg/mL e RPMI como controle negativo.

Após três dias (72 horas) de incubação a 37° C e 5% de CO₂, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi coletado e estocado a -20° C.

3.8 Dosagem de anticorpos

Placas de 96 poços (Maxisorb Nunc) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com extrato de tripomastigotas de cultura (TcExt) ou TcL7aRep a uma concentração de 10µg/mL, ou com Anti IgM (SouthernBiotech) diluído 1:2000, em tampão carbonato 0,1M (NaHCO₃ e Na₂CO₃, pH 9,6) em volume de final de 100µL.

Foi retirado então o conteúdo, o qual foi lavado uma vez com PBST (0,05% de Tween 20 em PBS 1X) e uma vez com PBS 1X. O excesso de líquido foi retirado e a placa foi bloqueada com 200 µL de tampão de bloqueio (3% de leite em pó em PBS 1X) por duas horas a 37°C. Depois o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada uma vez com PBST e uma vez com PBS 1X.

As amostras (soros) foram diluídas 1:200, e os sobrenadantes 1:100, em tampão de bloqueio, aplicadas aos poços e incubadas por uma hora a 37°C. O conteúdo foi descartado e a placa foi lavada 3 vezes com PBST e 3 vezes com PBS 1X. O excesso de líquido foi retirado e se aplicou o anticorpo de detecção anti IgG1, IgG2a, IgG total e IgM (Southern Biotech) diluídos a 1:2000 em tampão de bloqueio. A placa foi incubada a 37°C por uma hora, o conteúdo foi retirado e as placas foram lavadas 5 vezes com PBST e 5 com PBS 1X. Após retirar o excesso de líquido, foram adicionados 100µL de substrato (30 µL de H₂O₂ e 100 µg de TMB, diluídos em 10 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, Ph5) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente e no escuro até as soluções desenvolverem cor azul. A reação foi monitorada e depois parada com 20 µL de solução *stop* (H₂SO₄ 1:20). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placas de ELISA (SpectraMax 340) a 450nm.

3.9 Dosagem de citocinas

As citocinas IFN-γ, IL-10, e IL-2 foram dosadas nos sobrenadante das culturas de esplenócitos utilizando-se a técnica de ELISA com o kit R&D systems de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Histopatologia

Como descrito anteriormente, os corações foram cortados transversalmente em duas partes, e um dos dois fragmentos de cada coração foi embebido em parafina e corado com hematoxilina e eosina (HE); secções de corte foram fotografadas com um aumento de 20X e 40X, e as imagens foram analisadas pelo software Image J para quantificar sinais de inflamação e número de ninhos de parasitos.

Para a análise de infiltrado celular inflamatório, foi quantificada a porcentagem da área ocupada pelos núcleos de células mononucleares e polimorfonucleares nos cortes histológicos. Nestas mesmas fotografias foi contado o número de ninhos de amastigotas íntegros para a análise de média de ninhos íntegros por campo.

3.11 Quantificação de *T. cruzi* no coração por RT-PCR (Real Time-PCR)

Fragmentos de coração de 5 a 50 mg, fixados e conservados em formalina tamponada, como descrito anteriormente, foram utilizados para a extração de DNA genômico utilizando-se o kit illustra™ & cells genomicPrep Mini Spin kit.

O DNA total extraído, que corresponde tanto a DNA do camundongo quanto do *T. cruzi* foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro GeneQuant, e depois foi corrida uma eletroforese em gel de 1% de agarose com 300 ng DNA para conferir a integridade.

A quantificação do DNA de *T. cruzi* foi feita por RT-PCR (do inglês real time polymerase chain reaction), fazendo-se a reação de amplificação com 100 ng de DNA total extraído em 2µL, junto com 3 µL de iTaq Universal SYBR (Green

Supermix de Bio-Rad), 9,6 µL de água, junto com os primers para *T. cruzi* TCZ - Forward 5'-GCTCTTGCCACACGGGTGC-3' e TCZ - reverse 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' que anelam em sequencias repetitivas em *tandem*, chamadas de DNA satélite, do *T. cruzi* (87).

Reações de PCR com os primers IL-12 p40 forward 5'-GTAGAGGTGGACTGGACTCC-3' e IL-12 p40 reverse 5'-CAGATGTGAGTGGCTCAGAG-3', que anelam nos genes do camundongo, foram feitas como controle de *housekeeping gene* para a normalização da reação de PCR com os primers de *T. cruzi*.

As reações foram feitas num volume final de 15 µL na máquina de qPCR CFX96 Touch™ Real Time PCR detection System (BioRad), na qual o programa de polimerização foi o seguinte:

- 1) 12 minutos a 95°C para a dissociação inicial do DNA
- 2) 15 minutos a 95° para dissociação após cada ciclo
- 3) 30 segundo a 60°C para o anelamento, onde se mediu a absorvância
- 4) 30 segundos a 72°C para alongamento.

Os passos 2 ao 4 foram repetidos 45 vezes (Figura 8)

Depois do final da reação de PCR, foi feita uma curva de *melting point* para ver se os amplicons gerados foram específicos das reações.

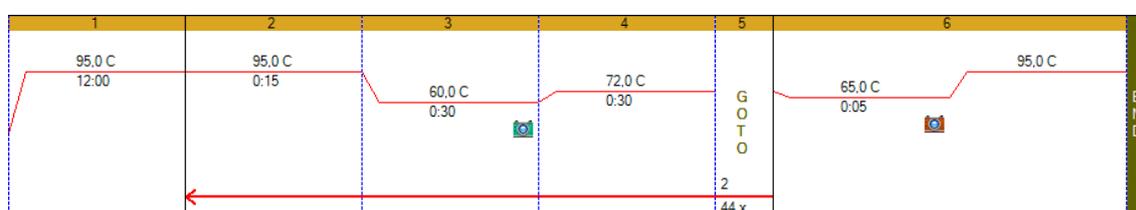


Figura 8. Programa utilizado no termociclador para reação de RT-PCR para quantificação de *T. cruzi* em tecido de coração de camundongo infectados.

3.12 Efeito da imunização com a TcL7aRep na resposta de hipersensibilidade tardia

2 grupos de camundongos BALB/c foram imunizados duas vezes com um intervalo de 10 dias, com 100 µg de OVA (Sigma-Aldrich) em 20 µL de água de injeção e emulsificados com 30 µL de adjuvante completo de Freund (CFA) para um volume final de 50 µL por via subcutânea. 24 horas antes de cada uma das duas imunizações, os camundongos de um dos dois grupos foram injetados s.c com 10µg de TcL7Rep diluída em água de injeção num volume total de 100 µL.

OVA agregada por calor, HAO (do inglês heat aggregated OVA) foi feita aquecendo-se 1 mL de solução a 2% de OVA em água de injeção, por 1 hora a 80°C. Depois, a solução de HAO, foi esfriada lentamente à temperatura ambiente e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o pellet ressuspenso em 1 mL de PBS 1x

7 dias após a segunda imunização com OVA, os camundongos foram injetados numa das patas traseiras com 30µL com água de injeção e na outra com 30µL de HAO. A resposta hipersensível foi medida comparando-se o endurecimento das patas nas 24, 48 e 72 horas após a injeção com o endurecimento antes da injeção, utilizando-se um paquímetro.

Amostras de soro foram obtidas 10 dias após a primeira imunização e 7 dias após a segunda, e estocadas a -20°C.

3.13 Teste de viabilidade celular pelo método MTT

A citotoxicidade das proteínas recombinantes e a consequente viabilidade celular de SMC incubadas com estas, foram avaliadas pelo método de MTT; para isso, foram plaqueadas 5×10^5 SMC em placas de 96 poços num volume final de 200 μ L em meio RPMI contendo 10% FBS em presença ou ausência de TcL7aRep, nas concentrações de 10, 5 e 1 μ g/mL. A seguir, incubou-se por 96 h e 144 h a 37°C.

Depois do tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados, e se adicionou 80 μ L de meio RPMI 10% FBS mais 20 μ L do reagente MTT (Invitrogen) diluído em PBS 1x, na concentração final de 2,5 μ g/mL, e incubou-se por duas horas a 37°C. Após este tempo foram adicionados 55 μ L de solução aquosa de HCl 0,1% e SDS (sodium dodecyl sulphate) 10% e as amostras foram incubadas *overnight* a 37°C. No dia seguinte se mediu a absorbância a 595 nm. A viabilidade das SMC incubadas com as diferentes proteínas nas diferentes concentrações foi comparada diretamente com SMC incubadas só com meio de cultura.

3.14 Estímulo *in vitro* de esplenócitos em presença ou ausência da TcL7aRep

SMC foram obtidas como foi descrito anteriormente e depois marcados com CFSE para monitorar a proliferação celular. Para isto, SMC foram lavadas duas vezes com meio RPMI sem soro, e depois ressuspensas em 1 mL de RPMI sem soro para obter uma concentração entre 5×10^6 e 10×10^7 SMC/ mL. Posteriormente se adicionou 1 μ L de solução estoque de CFSA a 5 mM para uma concentração final de 5 μ M, incubando-se no escuro por 15 minutos a 37°C. Depois as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 10% FBS e finalmente ressuspensas em meio RPMI 10% FBS.

Após a marcação com CFSE, as células foram incubadas numa densidade de 10×10^6 SMC/mL em presença ou ausência de $10 \mu\text{g/mL}$ de TcL7aRep diluído em RPMI 10% FBS por 24 h, depois foram plaqueadas 5×10^5 em placa de 96 poços num volume final de $200 \mu\text{L}$ de RPMI 10% SFB, incubadas a 37°C por 72 horas ou 120 horas em presença ou ausência de estímulos como ConA ($5 \mu\text{g/mL}$), LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) ou levados para poços previamente sensibilizados com $\alpha\text{-CD3}$.

Para a sensibilização com $\alpha\text{-CD3}$ a placa foi incubada *overnight* a 4°C com $50 \mu\text{L}$ de anticorpo $\alpha\text{-CD3}$ anti camundongo obtido em hamster (BD Biosciences) a $2 \mu\text{g/mL}$, diluído em PBS 1X estéril, sendo que antes do estímulo, o conteúdo foi retirado por pipetagem em condições estéreis.

Depois das 72 horas ou 120 h de estímulo, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -20°C .

3.15 Citometria de fluxo

Depois do estímulo de SMC e de recolher os sobrenadantes da placa de 96 poços como descrito anteriormente, as células foram lavadas uma vez com $200 \mu\text{L}$ de PBS wash (PBS 1X com 2 % de FBS), depois foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos, descartado o sobrenadante, e se pipetou em cada poço $50 \mu\text{L}$ do mix de anticorpos para citometria, os quais foram incubados por 30 minutos na escuridão à temperatura ambiente. Em seguida, $200 \mu\text{L}$ de PBS wash foram adicionados para lavar, e as placas foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos. Após o sobrenadante ter sido descartado, as células foram ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de PBS wash.

Os anticorpos para a marcação foram para CD19-APC-eFluor780 (eBioscience), CD3-Fluor 450 (eBioscience), CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience), CD8-PE-Cy5 (BD), CD25-PE (Biolegend), Fc Block (BD

Pharmagen), marcador de viabilidade LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) e CFSE (Sigma Aldrich).

Foi utilizado o citômetro LSRFortessa (BD Bioscience). Para a análise das populações celulares, foram construídos vários *gates* com os dados da citometria de fluxo, pelo software FlowJo v 10,0, com o objetivo de analisar a proliferação de linfócitos T e B, assim como a porcentagem de linfócitos CD4⁺CD25⁺ e CD8⁺CD25⁺, e da intensidade média da fluorescência (MFI) de moléculas como CD3, CD4, CD8 e CD25.

Para isto, inicialmente foi plotado o tamanho celular FSC-H com o marcador de viabilidade celular (com espectro de emissão no canal de AmCyan) e foram escolhidas as células vivas, que apresentam menor intensidade na fluorescência. Depois as células foram analisadas por tamanho celular (FSC-A vs FSC-H) e foram eliminadas as células em duplas (*duplets*), escolhendo só os *singlets*. A seguir, foi feito um gráfico baseado na granulocidade e no tamanho celular (SSC-A vs FSC-A), no qual se escolheu a população de células correspondente aos linfócitos. Seguidamente, se analisaram as células segundo a expressão dos marcadores CD3 e CD19, resultando em 4 populações, onde os linfócitos T são CD3⁺ CD19⁻, e linfócitos B são CD19⁺ CD3⁻. A análise da proliferação de LB e LT foi feita medindo-se a diminuição da fluorescência de CFSE (CFSE dim) no histograma (com espectro de emissão no canal de FITC), a partir de cada *gate* correspondente para estes tipos de células, sendo que a diminuição da intensidade de brilho do fluorocromo ou corrimento para a esquerda significa proliferação das células (Figura 8)

A partir do *gate* de linfócitos, descrito anteriormente, foi feito um gráfico de CD4 vs CD8 para análises de MFI destes dois marcadores. Finalmente foi plotado CD4 vs CD25, e CD8 vs CD25, para analisar a variação nas populações CD4⁺CD25⁺ e CD8⁺ CD25⁺ e MFI de CD25 nos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 9).

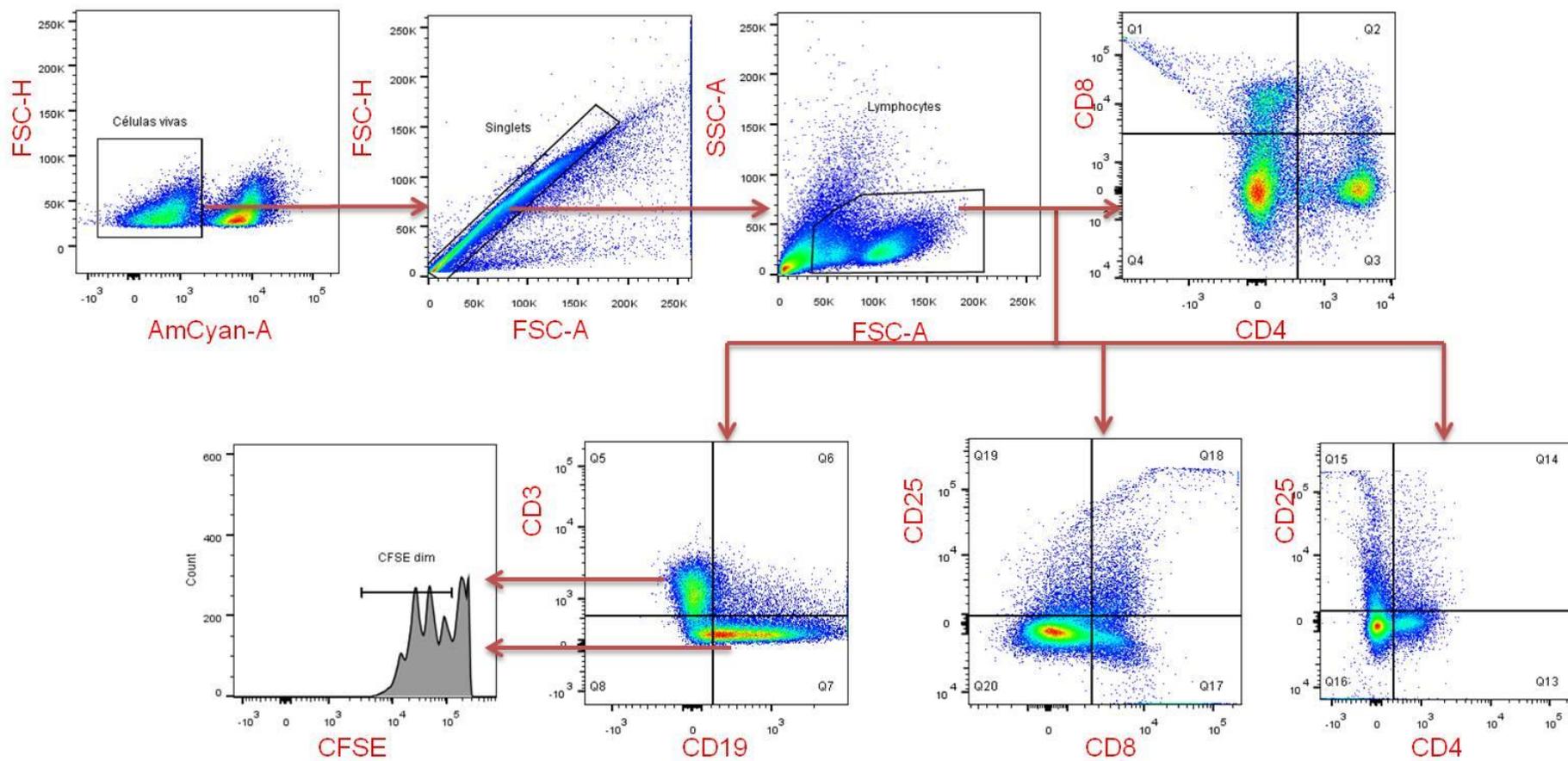


Figura 9. Estratégia de gates no análise da citometria de fluxo. Foram selecionadas primeiramente as células vivas, das quais foram selecionados os *singlets*, dos quais foi escolhida a população de linfócitos, a partir da qual foram construídos os gates de CD8 vs CD4, CD8 vs CD25, CD4 vs CD25 e CD3 vs CD19, na qual foi medida a proliferação de linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD19+ segundo o corrimento do fluorocromo CFSE.

3.16 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 6. Os dados apresentados são a média \pm o desvio padrão, e se utilizou o teste t-student para as análises de comparação entre dois grupos, e o teste One Way ANOVA para comparação múltipla, onde as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$ simbolizado por *, $P \leq 0.01$ por **, $P \leq 0.001$ por *** e $P \leq 0.0001$ por ****.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação da proteína recombinantes TcL7a

O domínio repetitivo TcL7aRep foi a única proteína recombinante utilizada neste trabalho, no entanto, a proteína inteira recombinante TcL7a foi produzida e purificada, com o objetivo de utiliza-la em análises posteriores. Para isso bactérias da cepa BL21 Star™(DE3) foram transformadas com o plasmídeo PET21 correspondente à sequência para TcL7a, e a indução da proteína foi feita adicionando-se IPTG, como descrito na seção materiais e métodos. Alíquotas das bactérias antes e depois da indução foram coletadas para analisar a indução, como também alíquotas depois do lisado, que foi diluído em PBS 1X com 4M de Ureia.

A análise de SDS-PAGE mostra uma banda correspondente a uma proteína de 35 KDa na amostra induzida comparada com a não induzida, e que correspondente à proteína TcL7a contendo cauda de histidina. Este gel mostra também que quantidades significativas da TcL7a estão presentes na fração solúvel do lisado de bactérias (Figura 10).

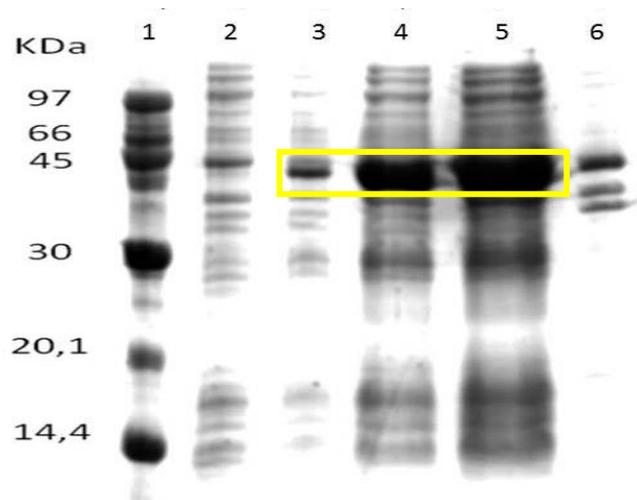


Figura 10. SDS-PAGE de bactérias transformadas para a expressão da proteína TcL7a, com o marcador molecular (1), bactérias antes da indução (2), bactérias depois da indução (3), 9 μ L (4) e 18 μ L do lisado solúvel de bactérias induzidas (5) e a fração insolúvel (pellet) das bactérias induzidas e lisadas (6). O quadro amarelo indica a posição da proteína recombinante TcL7a.

A proteína TcL7a foi purificada da fração solúvel do lisado das bactérias transformadas e induzidas, mediante cromatografia de afinidade por coluna de níquel, coletando-se várias frações eluídas com imidazol (minuto 182 a 220) (Figura 11).

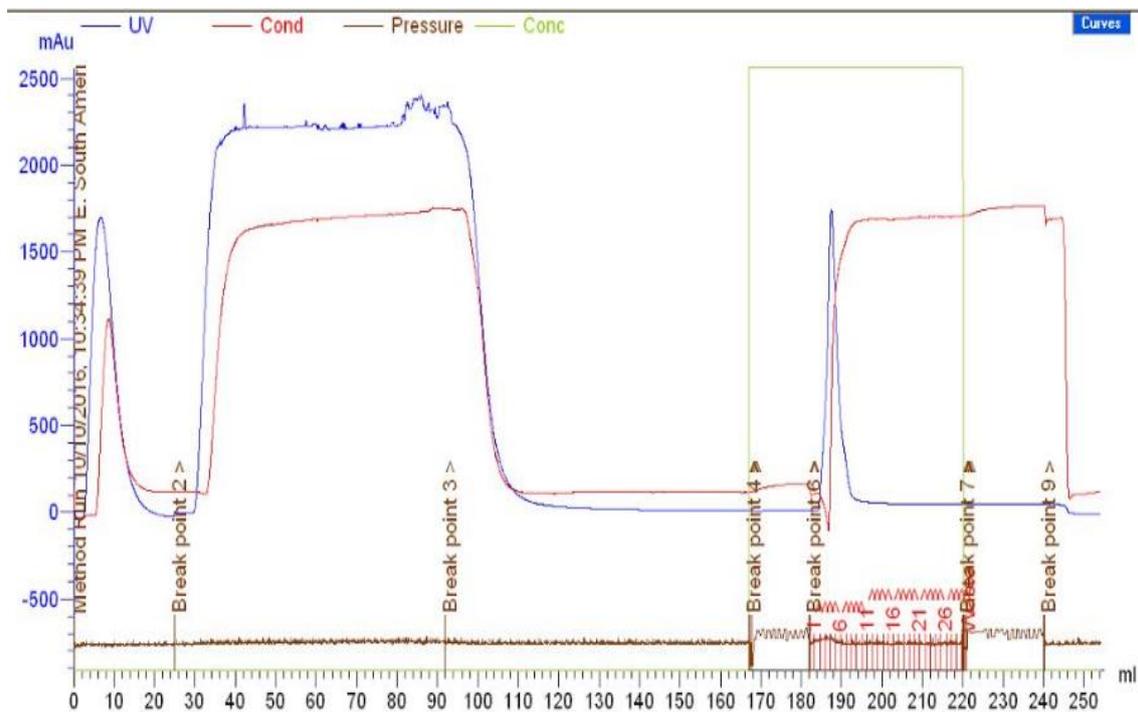


Figura 11. Cromatograma de eluição da proteína TcL7a. No eixo Y está representada a absorbância a 280 nm (Ultravioleta) e no eixo X o tempo de eluição em minutos. A linha azul representa a absorbância da proteína na coluna, a vermelha mostra a condutância e a verde as concentrações crescentes de imidazol.

Como pode se observar no cromatograma da figura 11 e na análise por SDS-PAGE na figura 12, as frações 3 até a 8 contêm grandes quantidades da proteína com alto grau de pureza.

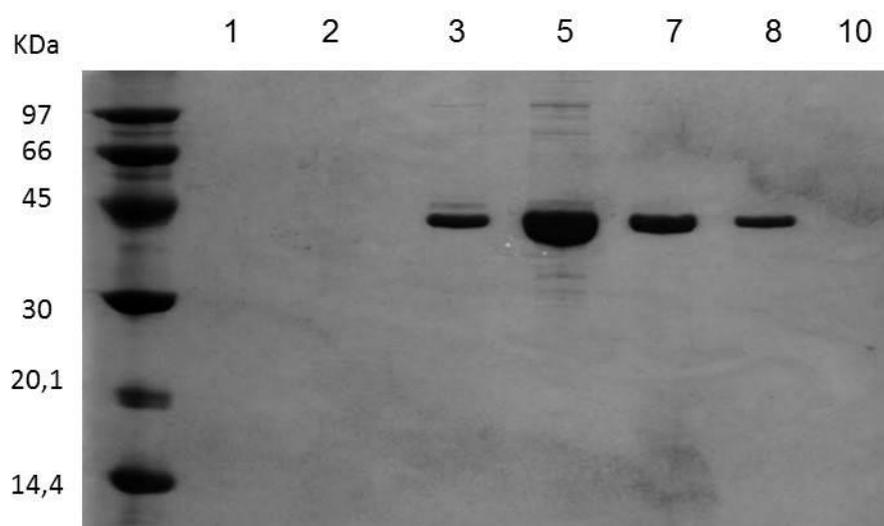


Figura 12. SDS-PAGE das frações após cromatografia de afinidade. Frações 1,2,3,5,7 e 10, eluídas na cromatografia de afinidade da proteína TcL7a.

As frações 3 a 8 foram reunidas e esta solução foi primeiramente dialisada. Em seguida, o LPS remanescente foi extraído com Triton X-114, como descrito em materiais e métodos. Depois, esta amostra foi analisada no SDS-PAGE, junto com as proteínas TcL7aRep e TcL7a Δ Rep, obtidas anteriormente pelas alunas de doutorado Nailma Aprigio e Bruna Matiolly Valente, respectivamente (figura 13). A estimativa da concentração das proteínas foi feita utilizando quantidades conhecidas de BSA aplicadas no mesmo gel.

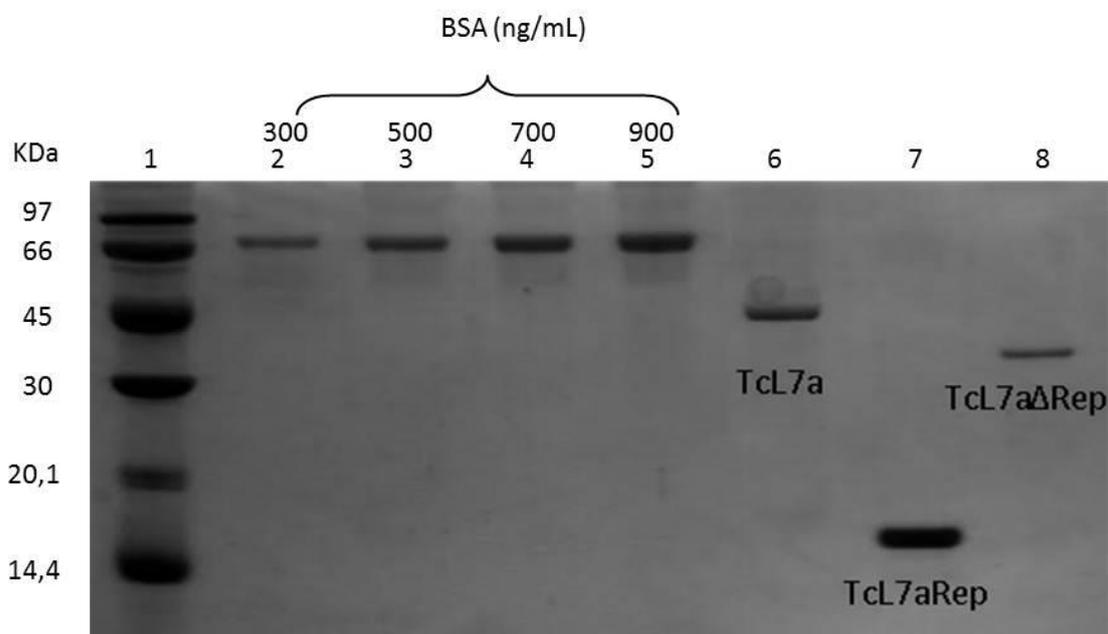


Figura 13. SDS-PAGE da proteína inteira TcL7a e as versões truncadas TcL7aRep e TcL7a Δ Rep purificadas, com o marcador molecular (1), padrões de BSA com 300 ng (2), 500 ng (3), 700 ng (4) e 900 ng (5), e as proteínas recombinantes TcL7a (6), Tc7aRep (7), TcL7a Δ Rep (8).

4.2 Predição de epítomos de linfócitos B

A análise de predição de epítomos lineares da proteína TcL7a, pela ferramenta *on-line* “Bepipred Linear Epitope Prediction” no servidor <http://tools.iedb.org/>, mostra regiões potenciais para epítomos para linfócitos B que predominam na região repetitiva TcL7aRep (Figura 14). Desta forma, a produção de anticorpos α -TcL7aRep após as imunizações com esta região seria esperada. A tabela de epítomos potenciais na proteína TcL7a mostra a região desde o aminoácido 1 até o 82 como uma região de alta probabilidade para se ligar em linfócitos B, sendo que a clonagem da TcL7aRep foi produzida de maneira a conter desde o aminoácido 1 até o 90 (Figura 15).

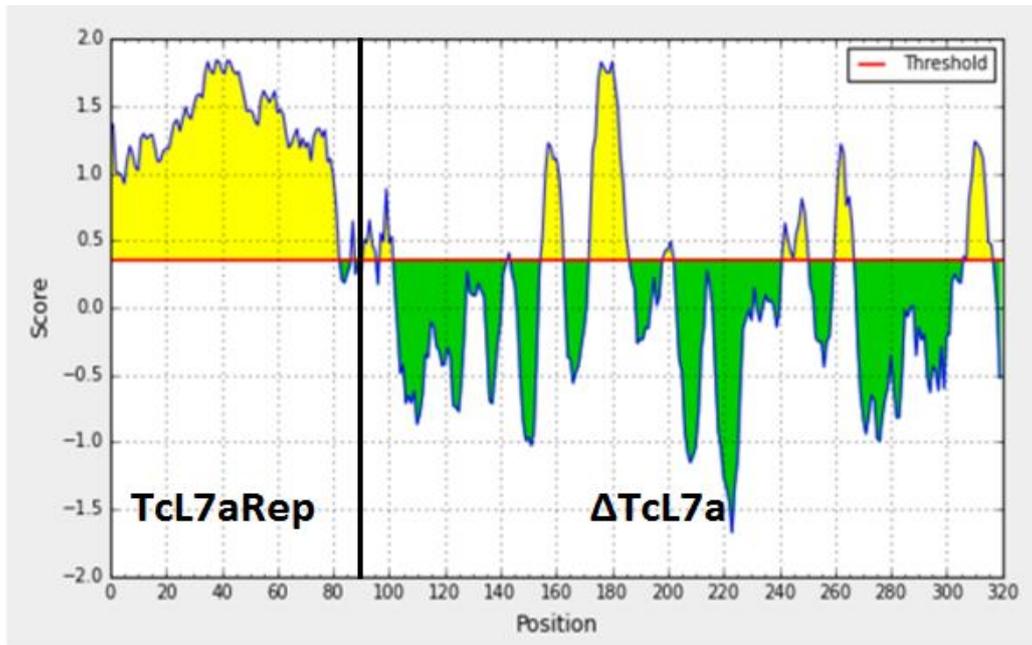


Figura 14. Predição de epítomos lineares de linfócitos B da proteína TcL7a pela ferramenta IEDB, com *threshold* de 0,48.

Predicted peptides:

No. ▾	Start ◊	End ◊	Peptide	Length ◊
1	1	82	MPGKEVKKAAKPAAKTAAKTAAKPAAKSAAKPAAKPAAKPAAKPAAKPAAKTAAKPAKPAVKPTVKPAAKAAAPYKKPAAI	82
2	87	87	A	1
3	91	95	NFGIG	5
4	97	101	DVPYA	5
5	143	143	S	1
6	155	162	YPSETRRA	8
7	172	186	TEKKKNPEAASKKAP	15
8	198	202	RTIEK	5
9	241	250	ARLGDAVGRK	10
10	260	266	VNAEDEA	7
11	306	306	K	1
12	308	316	ARNAGKDA	9

Figura 15. Tabela de epítomos lineares para linfócitos B na proteína TcL7a.

4.3 Análise da resposta humoral antes da infecção

Para analisar se a região repetitiva TcL7aRep é imunogênica para linfócitos B, como foi predito pela ferramenta IEDB, foram extraídas amostras de sangue durante o protocolo de imunização (antes da infecção), para a análise de anticorpos IgM α -TcL7aRep no grupo de camundongos imunizados com TcL7aRep e do grupo só imunizado com os adjuvantes, nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35, sendo que as imunizações com esta proteína foram nos dias 0, 14 e 28 como descrito em materiais e métodos (Figura 16)

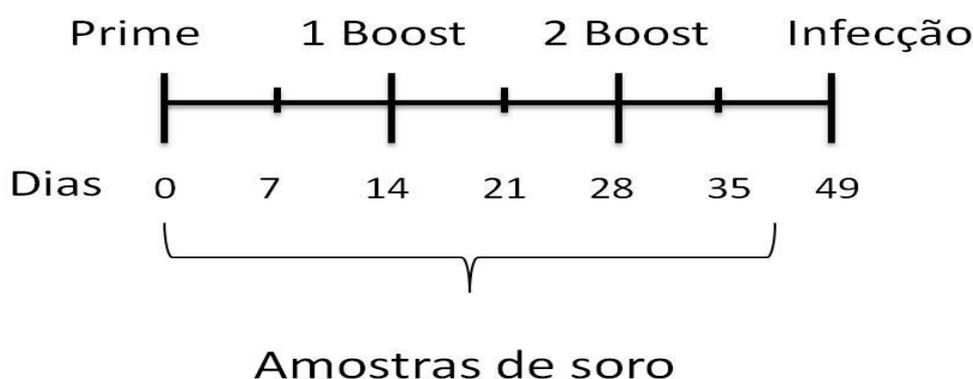


Figura 16. Protocolo de imunização e obtenção de amostras de sangue de camundongos imunizados com a proteína TcL7aRep e adjuvantes ou só os adjuvantes (Controle) antes da infecção.

Embora a TcL7aRep mostre alta quantidade de potenciais epítomos de linfócitos B (figuras 14 e 15), não foi detectado um aumento da produção de anticorpos IgM α -TcL7aRep nos soros dos animais imunizados com a TcL7aRep ao longo do protocolo de imunização, quando comparamos com os animais que só receberam os adjuvantes (figura 17). Análises anteriores do soro de animais imunizados com a proteína TcL7aRep, feitos pela aluna Bruna Mattioly, não detectaram anticorpos α -TcL7aRep do isotipo IgG.

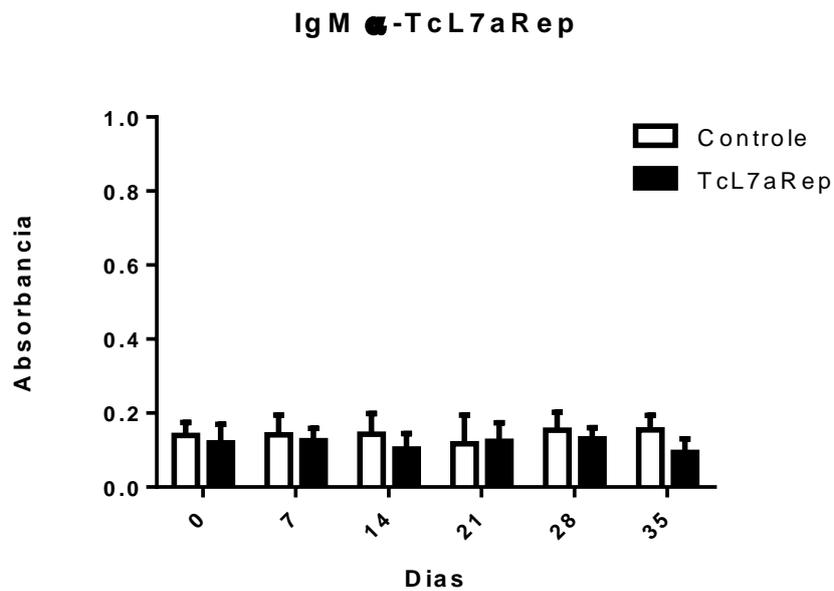


Figura 17. Cinética de produção de anticorpos IgM α -TcL7aRep após imunizações nos dias 0, 14 e 28 com a proteína TcL7aRep e adjuvantes ou só os adjuvantes (Controle).

4.4 Imunizações com TcL7aRep e infecção

A seguinte figura esquematiza o protocolo de imunizações com a proteína TcL7aRep e a posterior infecção dos camundongos (Figura 18).

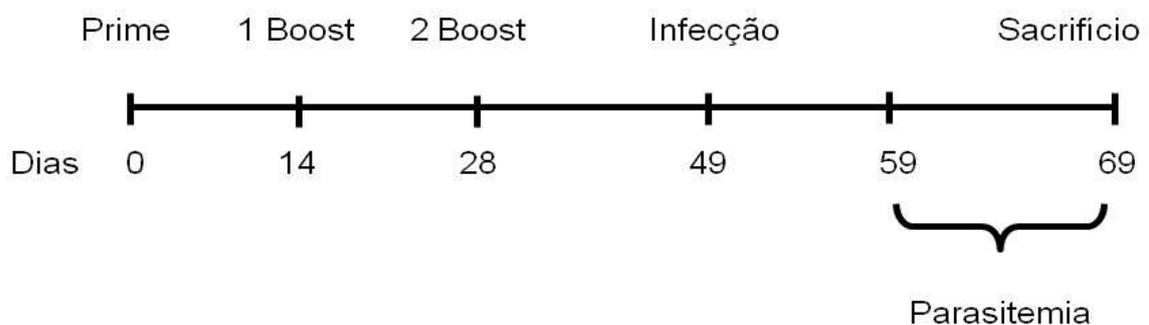


Figura 18. Esquema de imunizações e infecção dos camundongos.

Vinte dias após a última imunização (2 Boost) com a proteína TcL7aRep, os camundongos, incluindo o controle previamente injetados somente com os adjuvantes, foram infectados com 5000 tripomastigotas de forma sanguínea (BFT) do clone CL Brener de *T. cruzi*. O sangue dos camundongos foi coletado a partir do dia 10 pós-infecção para análise da parasitemia. Como mostra a figura 18 não observou-se diferenças significativas, excetuando-se o dia 20, quando o grupo controle e o grupo imunizado com TcL7aRep apresentaram uma diferença de 3,3 vezes na média da parasitemia (média de $1,69 \times 10^6 \pm 471356,9$ para o grupo controle e $6,01 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^6$ parasitos/mL, para o grupo imunizado (Figura 19).

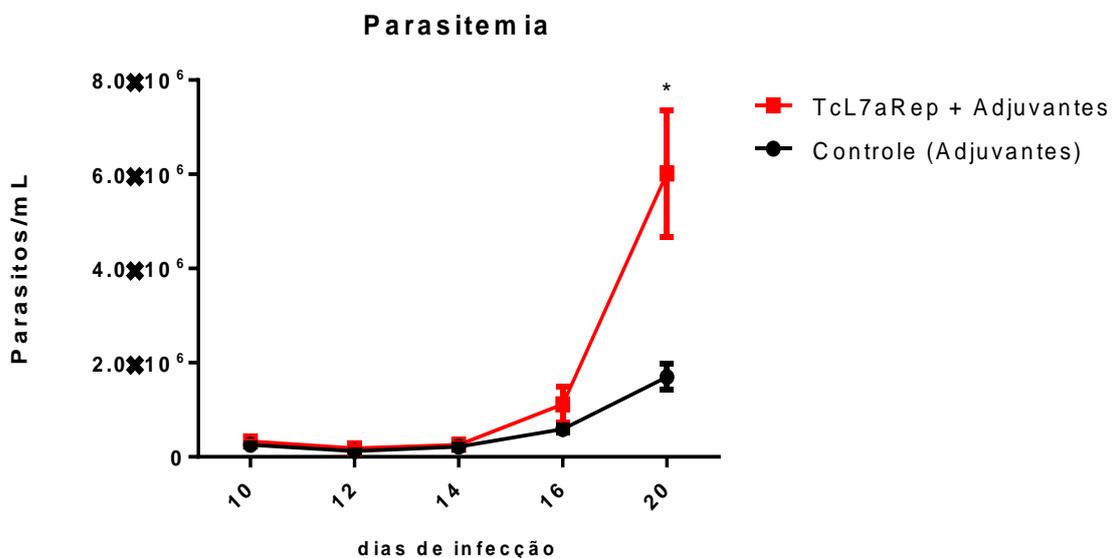


Figura 19. Parasitemia de camundongos infectados, previamente imunizados com a proteína TcL7aRep e adjuvantes ou só os adjuvantes (Controle).

Como foi descrito na seção de materiais e métodos, no pico da parasitemia (dia 20 após infecção), os camundongos foram sacrificados e o soro, coração e esplenócitos foram coletados para análise dos níveis de anticorpos, análises histopatológicas e cultura celular, respectivamente, com o objetivo de investigar alterações clínicas e/ou imunológicas que possam explicar a exacerbação da parasitemia pela imunização com a TcL7aRep.

4.5 Histopatología

Ao se comparar os tecidos de coração corados com HE obtidos de animais infectados e previamente imunizados com a TcL7aRep e adjuvantes, ou só os adjuvantes (controle) (Figura 20), se evidencia uma tendência dos animais imunizados com a repetição de apresentarem quantidade maior de ninhos de amastigota íntegros em relação ao grupo controle, apesar de não ter sido observada uma diferença estatisticamente significativa (figura 21A). Adicionalmente, o grupo de imunizados com a TcL7aRep apresentou menor quantidade de infiltrado de células mononucleares, o que indica menor inflamação (figura 21B). Estes dados sugerem imunossupressão induzida pela imunização com a TcL7aRep.

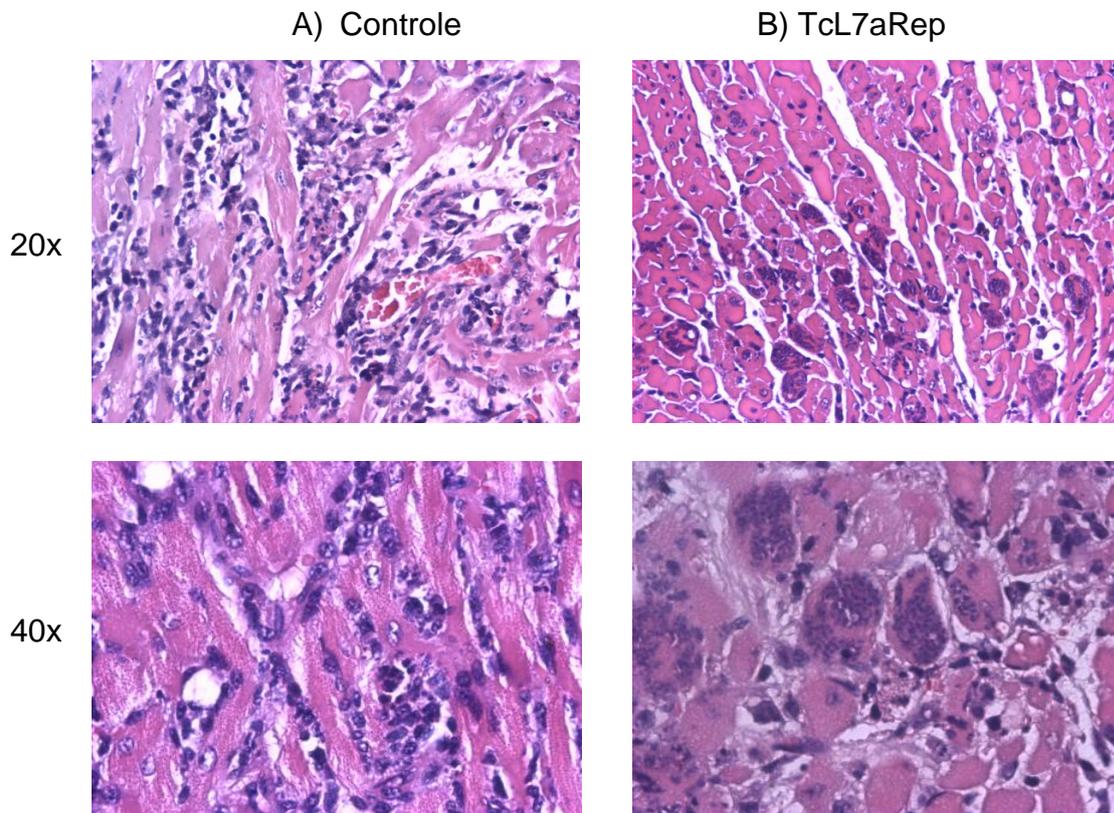


Figura 20. Análise histopatológica dos tecidos de coração corados com HE. Imagens representativas de cortes histológicos de coração de camundongos infectados, previamente imunizados só com os adjuvantes (A) e imunizados com TcL7aRep e adjuvantes (B). Aumento de 20x e 40x.

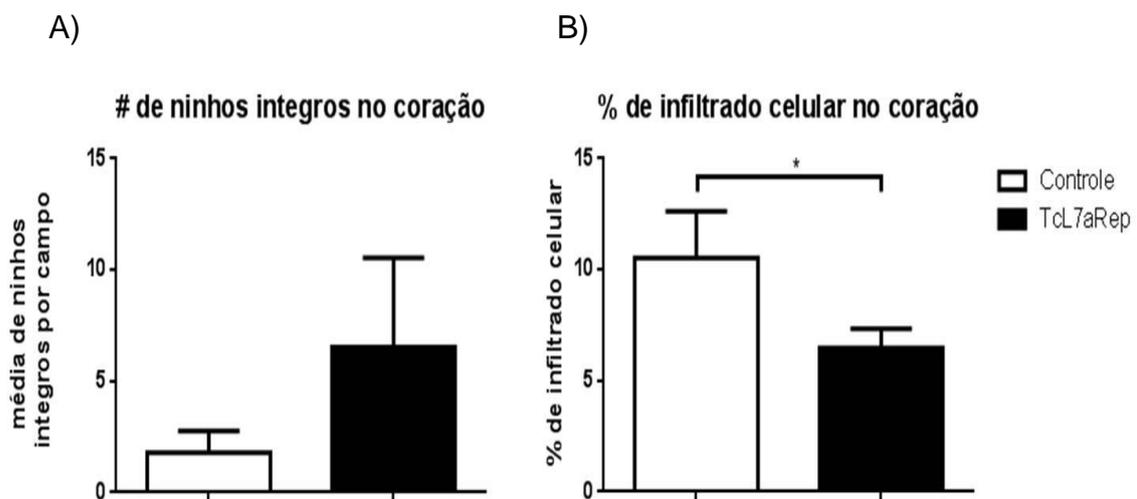


Figura 21. Quantificação da análise histopatológica. Média de ninhos íntegros por campo (A) e porcentagem de infiltrado celular em cada corte histológico (B) dos corações de camundongos infectados (Controle) e animais imunizados com TcL7aRep e infectados.

4.6 Quantificação de *T. cruzi* no coração por RT-PCR

Após a extração do DNA total das amostras de coração dos dois grupos de camundongos, a quantidade de DNA de *T. cruzi* por RT-PCR foi quantificada como descrito em materiais e métodos. Por causa da variabilidade da massa de cada amostra de tecido de coração, o valor de DNA de *T. cruzi* foi normalizado dividindo-se pela quantidade de DNA do camundongo extraída, amplificada pelos *primers* que anelam no gene de IL-12 no camundongo.

A RT-PCR revelou que a quantidade média de *T. cruzi* no grupo controle e no grupo imunizado com TcL7aRep foram estatisticamente similares (Figura 22).

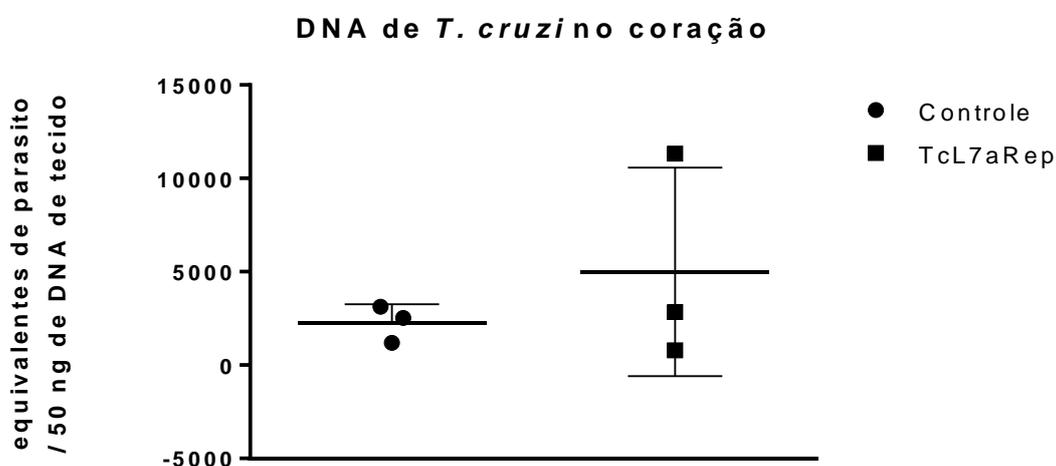


Figura 22. Quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* por RT-PCR em animais infectados controle e infectados e imunizados com TcL7aRep no tecido de coração.

4.7 Análise da resposta humoral

Como descrito anteriormente, foi analisada a resposta humoral nos dois grupos de camundongos infectados, o grupo controle não imunizado e o grupo imunizado com TcL7aRep antes da infecção. Foram determinados os níveis de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgM nos soros dos animais no dia do pico da parasitemia, quando os animais foram sacrificados, utilizando-se a proteína recombinante TcL7aRep e o extrato proteico total de *T. cruzi* (TcExt) como antígenos. Como mostra a Figura 22, nem o grupo de animais imunizados com TcL7aRep nem o grupo controle apresentaram quantidades significativas de anticorpos das classes IgG ou IgM α -TcL7aRep (Figura 23).

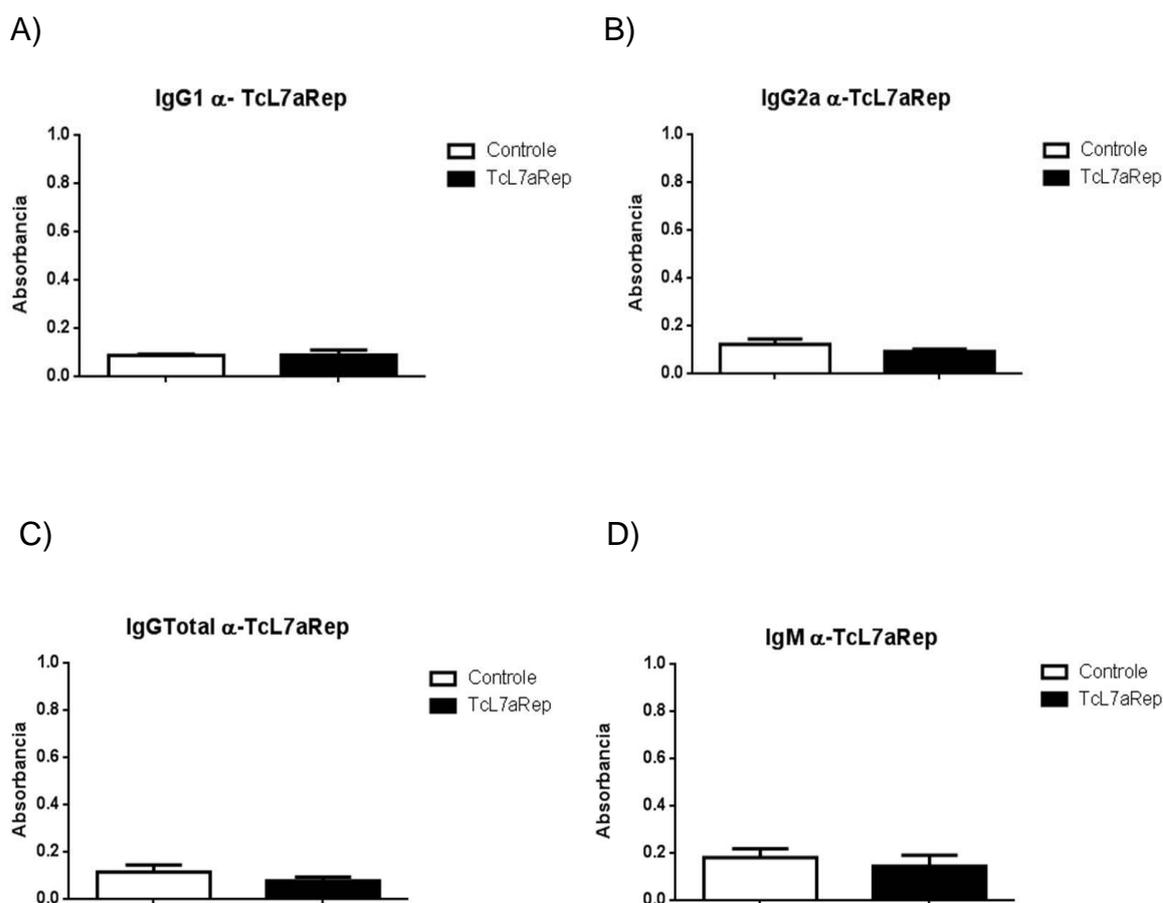


Figura 23. Anticorpos α -TcL7aRep no pico da parasitemia em soro de animais infectados, imunizados previamente com só os adjuvantes (controle) e animais imunizados com a proteína TcL7aRep. IgG1 (A), IgG2a (B), IgG Total (C) e IgM (D).

Por outro lado, a análise dos anticorpos contra o extrato total de *T. cruzi* (TcExt) mostra alta produção de anticorpos (IgG total, IgG2a e IgM) nos dois grupos. Foram detectados níveis mais baixos de anticorpos do isotipo IgG1 nos dois grupos de animais. De forma interessante, os animais imunizados com TcL7aRep apresentaram níveis significativamente mais baixos de anticorpos, IgG total e IgM contra extrato total do parasito (TcExt) quando comparados aos animais somente infectados (Figura 24), indicando que o domínio repetitivo imunossuprime a resposta humoral contra os antígenos do *T. cruzi*.

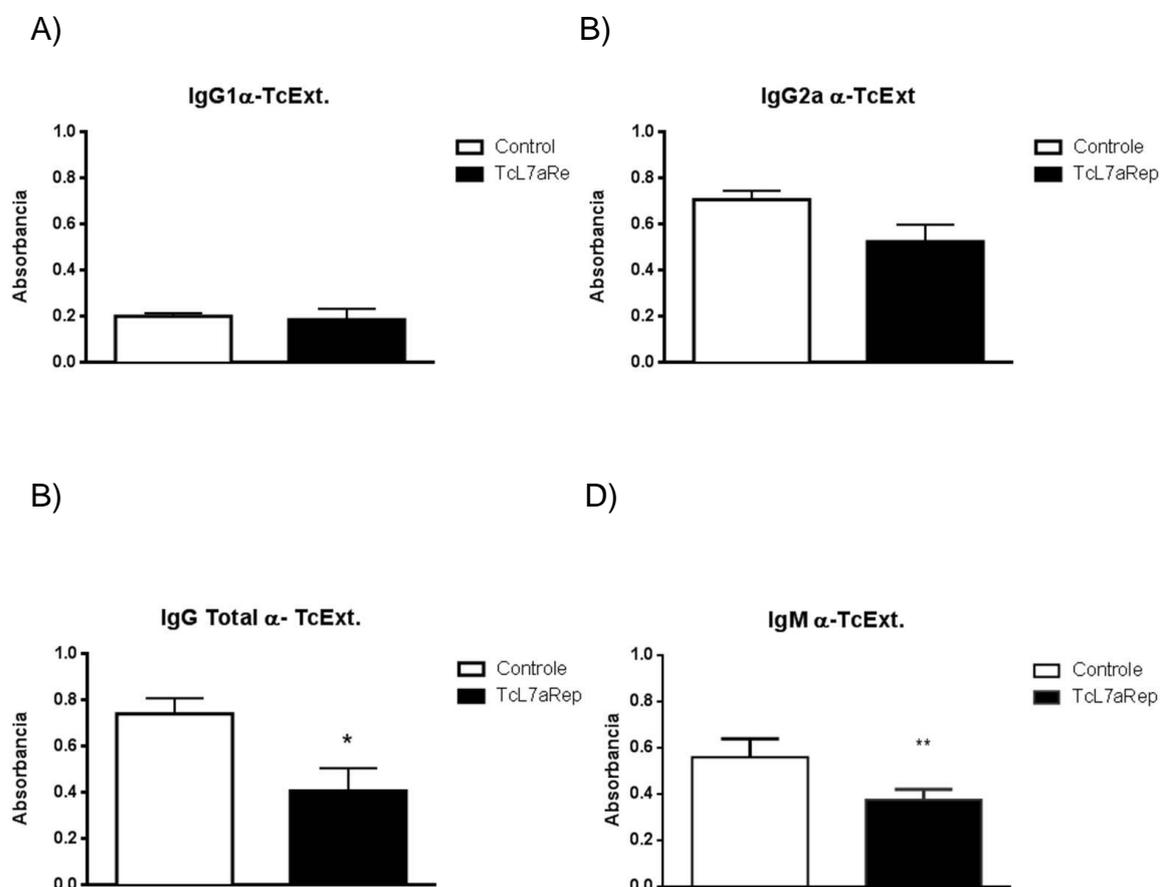


Figura 24. Anticorpos contra o extrato de *T. cruzi* (TcExt) no soro de animais infectados no pico da parasitemia, imunizados previamente somente com os adjuvantes (controle) e animais imunizados com a proteína TcL7aRep. IgG1 (A), IgG2a (B), IgG Total (C) e IgM (D).

4.8 Estimulação de esplenócitos

Com o objetivo de verificar alterações na resposta celular nos animais imunizados com a TcL7aRep em relação ao grupo controle, os esplenócitos dos dois grupos foram coletados no pico da parasitemia, e estimulados *in vitro*. Como mostra a figura 25, não foram detectadas diferenças significativas na produção de IFN- γ e IL-10 quando os esplenócitos foram estimulados com o extrato de *T. cruzi* (TcExt). Como controle, os esplenócitos foram estimulados com ConA.

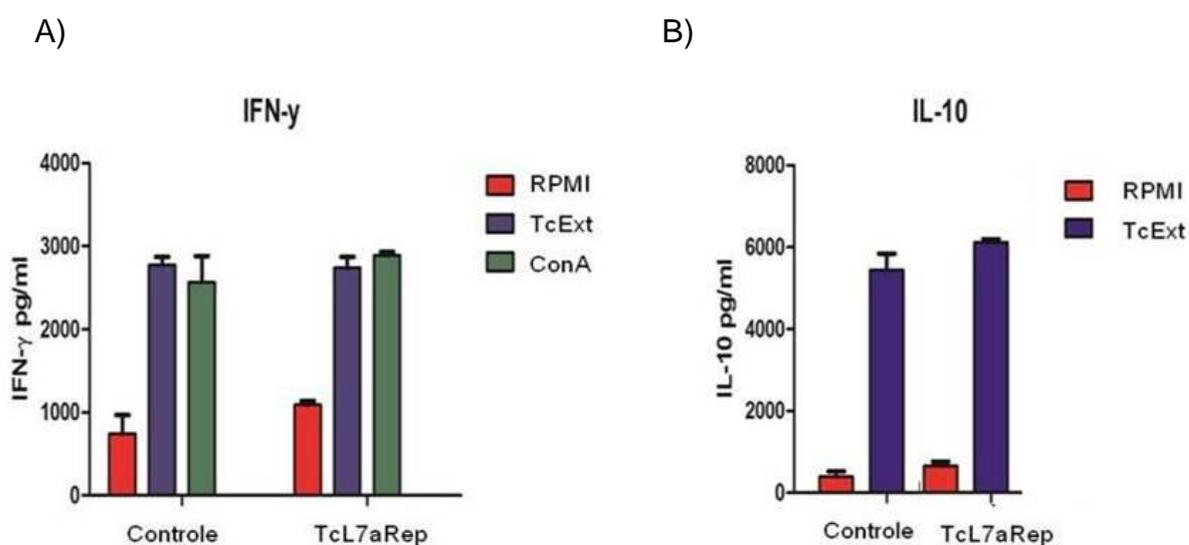


Figura 25. Produção de citocinas após estímulo de esplenócitos. Produção de IFN- γ (A) e IL-10 (B) por esplenócitos de camundongos coletados no pico da parasitemia e estimulados com extrato total de *T. cruzi* (TcExt). Foram comparados esplenócitos de animais controle, injetados com os adjuvantes ou imunizados com a proteína TcL7aRep.

4.9 Efeito da imunização com a TcL7aRep na resposta de hipersensibilidade tardia

Com o objetivo de verificar se a proteína TcL7aRep induziria uma diminuição na resposta humoral e celular contra um antígeno heterólogo, não presente no *T. cruzi*, foi feito um protocolo de imunizações com OVA, como descrito anteriormente em materiais e métodos. Resumidamente, camundongos foram imunizados por via subcutânea, duas vezes com 100 µg de OVA emulsificada com FCA, sendo que um dos grupos foi previamente injetado com 10 µg de TcL7aRep (24 horas antes das imunizações), e o grupo controle foi injetado com água (H₂O) (Figura 26).

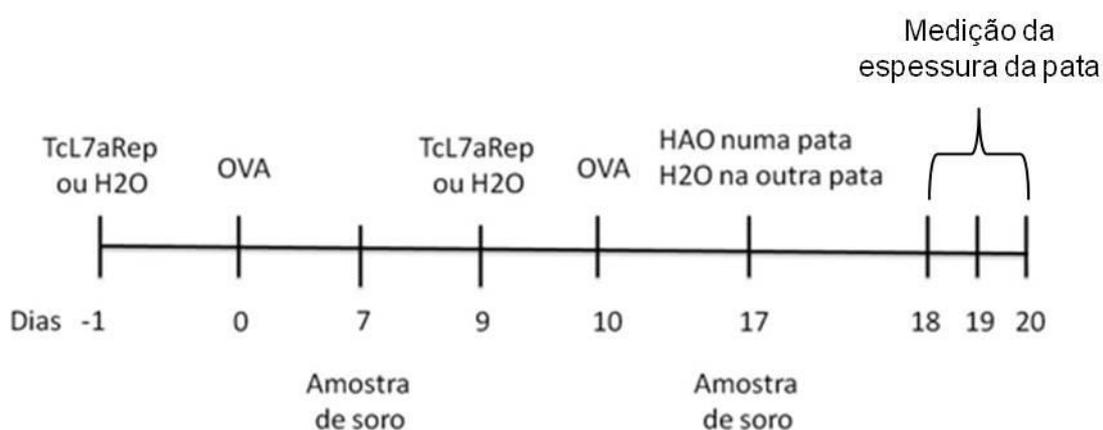


Figura 26. Esquema do protocolo de duas imunizações com OVA para indução de resposta de hipersensibilidade e sua medição. Um grupo foi injetado 24 horas com TcL7aRep antes de cada imunização e o outro só com água. 7 dias após a segunda imunização, os camundongos foram injetados com OVA agregada por calor (HAO) numa pata, e na outra só água.

Após a injeção com HAO numa das patas traseiras, e água na outra como controle de inflamação inespecífica, os camundongos dos dois grupos apresentaram inflamação local com pico 24 horas após a injeção. Os animais previamente injetados com TcL7aRep apresentaram inflamação menos intensa 24 após a injeção quando comparados com o grupo só imunizado com OVA (controle), indicando que a TcL7aRep induz supressão da resposta celular (Figura 27).

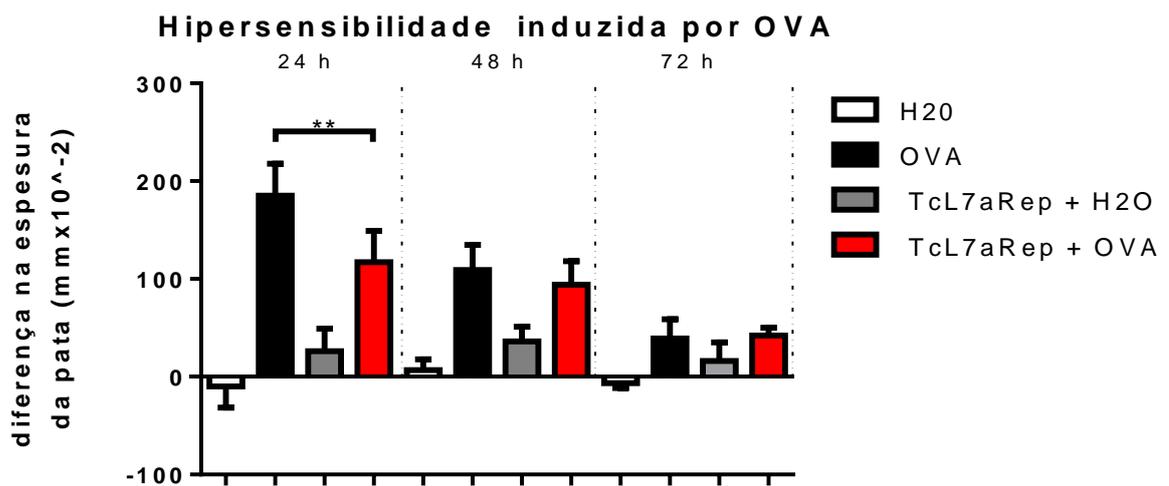


Figura 27. Resposta de hipersensibilidade. Diferença na espessura da pata 24, 48 e 72 horas após a injeção com HAO numa pata, e H2O na outra, de camundongos previamente imunizados com OVA.

A resposta humoral foi analisada, onde se evidenciou que a injeção prévia com TcL7aRep reduziu significativamente os níveis de anticorpos IgG α -OVA detectados 7 dias após a imunização com OVA, mas não 17 dias após, indicando que a imunização com TcRpL7a causa imunossupressão da resposta humoral (Figura 28).

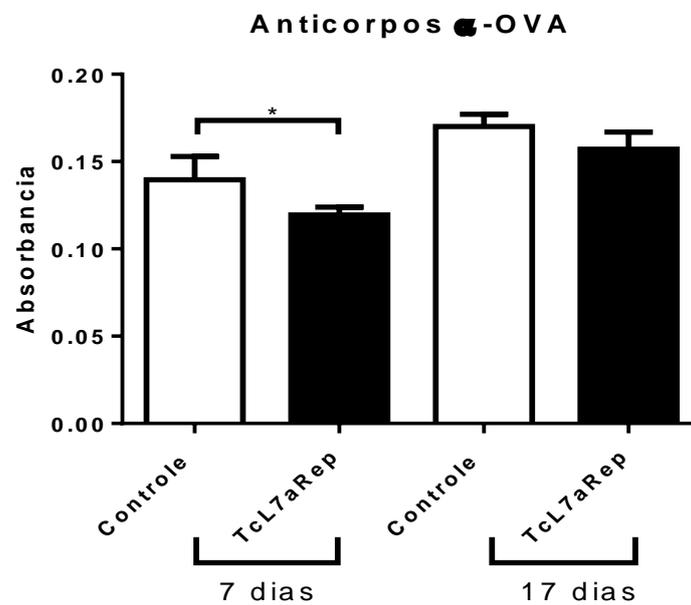


Figura 28. Anticorpos IgG α -OVA em soro de camundongos, 7 dias e 17 dias após a imunização com OVA. Em branco, animais controle, só imunizados com OVA; em preto, animais imunizados com TcL7aRep 24 horas antes da imunização com OVA.

4.10 Efeito da incubação *in vitro* de esplenócitos com TcL7aRep

Com o objetivo de estudar possíveis alterações que a TcL7aRep induz na resposta imune adaptativa, foram realizados experimentos *in vitro*, de incubação e estimulação de esplenócitos de camundongos saudáveis, na presença ou ausência desta proteína.

Inicialmente foi medido o efeito citotóxico da proteína repetitiva TcL7aRep em diferentes concentrações, utilizando o método de MTT. Nosso objetivo era determinar as concentrações ideais, não citotóxicas ou levemente citotóxicas (<20% citotoxicidade) da proteína TcL7aRep, para os posteriores ensaios *in vitro* de estimulação de esplenócitos.

Observamos que a proteína TcL7aRep nas concentrações de 10, 5 e 1 µg/mL não causa citotoxicidade significativa (maior que 10%) quando esplenócitos de camundongos saudáveis são incubados por 96 e 144 horas. Desta forma, este resultado indica que qualquer destas concentrações é adequada para ensaios com esplenócitos *in vitro* (Figura 29).

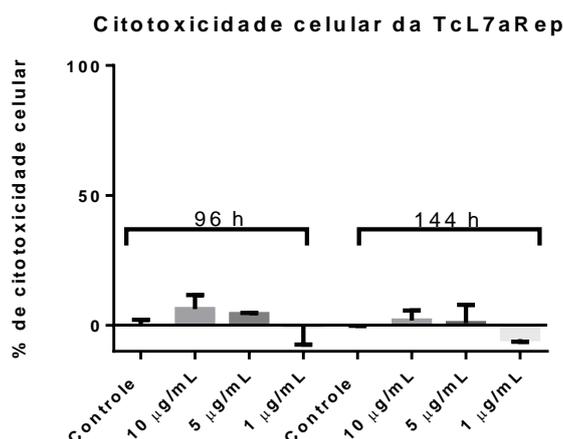


Figura 29. Citotoxicidade celular pelo método de MTT, da proteína TcL7aRep a 10, 5 e 1 µg/mL em esplenócitos de camundongo BALB/c.

Em seguida, com o objetivo de verificar se a TcL7aRep atua como um antígeno independente de linfócito T tipo I (TI-I), isto é, se ela é capaz de induzir ativação policlonal de linfócitos B, determinamos os níveis de anticorpos IgM inespecíficos no sobrenadante de esplenócitos incubados com TcL7aRep, nas concentrações de 10, 5 e 1 μmL por 96 horas. Os valores foram comparados com os níveis de IgM produzidos pela ativação com LPS, um conhecido ativador policlonal de linfócitos B.

Como esperado, o LPS a 10 $\mu\text{g/mL}$ induziu maior produção de IgM no sobrenadante em relação ao controle (sem estímulo). Por outro lado, a incubação com TcL7aRep nas diferentes concentrações não resultou em aumento da produção de IgM, indicando que o domínio repetitivo não atua como ativador policlonal inespecífico (Figura 30).

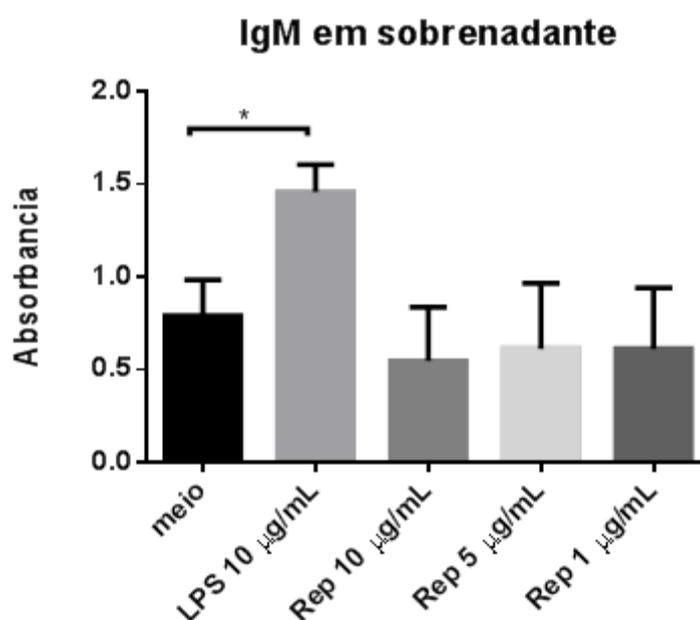


Figura 30. Produção de IgM em esplenócitos após incubação por 96 horas com LPS a 10 $\mu\text{g/mL}$ e TcL7aRep nas concentrações de 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$,

4.11 Efeito da incubação com TcL7aRep durante o estímulo na proliferação de esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de verificar se a proteína TcL7aRep altera de alguma forma a resposta imune adaptativa, esplenócitos de camundongos não imunizados e não infectados, foram marcados com CFSE, e estimulados *in vitro* com ativadores policlonais de linfócitos T, como ConA (5 µg/mL) e α-CD3 (2 µg/mL), e de linfócitos B, como LPS (10 µg/mL), na presença ou ausência de TcL7aRep. Cento e vinte horas após o estímulo, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -20 °C, enquanto que os esplenócitos foram marcados na superfície com anti-CD3 para analisar linfócitos T e anti CD19 para linfócitos B. Em seguida foram analisadas por citometria de fluxo.

Para a análise da proliferação, foi medida a diminuição da marcação com CFSE (CFSE dim) nas populações de linfócitos T CD3+ e Linfócitos B CD19+. Evidenciou-se que a TcL7aRep na concentração de 10 µg/mL não estimula a proliferação dos linfócitos T, e como já demonstrado, ConA e α-CD3, mas não LPS, estimulam a proliferação de linfócitos T. No entanto, a adição de TcL7aRep 10 µg/mL 24 horas antes do estímulo (24 ha) aboliu completamente a proliferação com estes dois estímulos, o que não ocorreu quando esta proteína foi adicionada juntamente com o estímulo (nh) (Figura 31). A figura 32 mostra a quantificação da proliferação dos histogramas da figura 31.

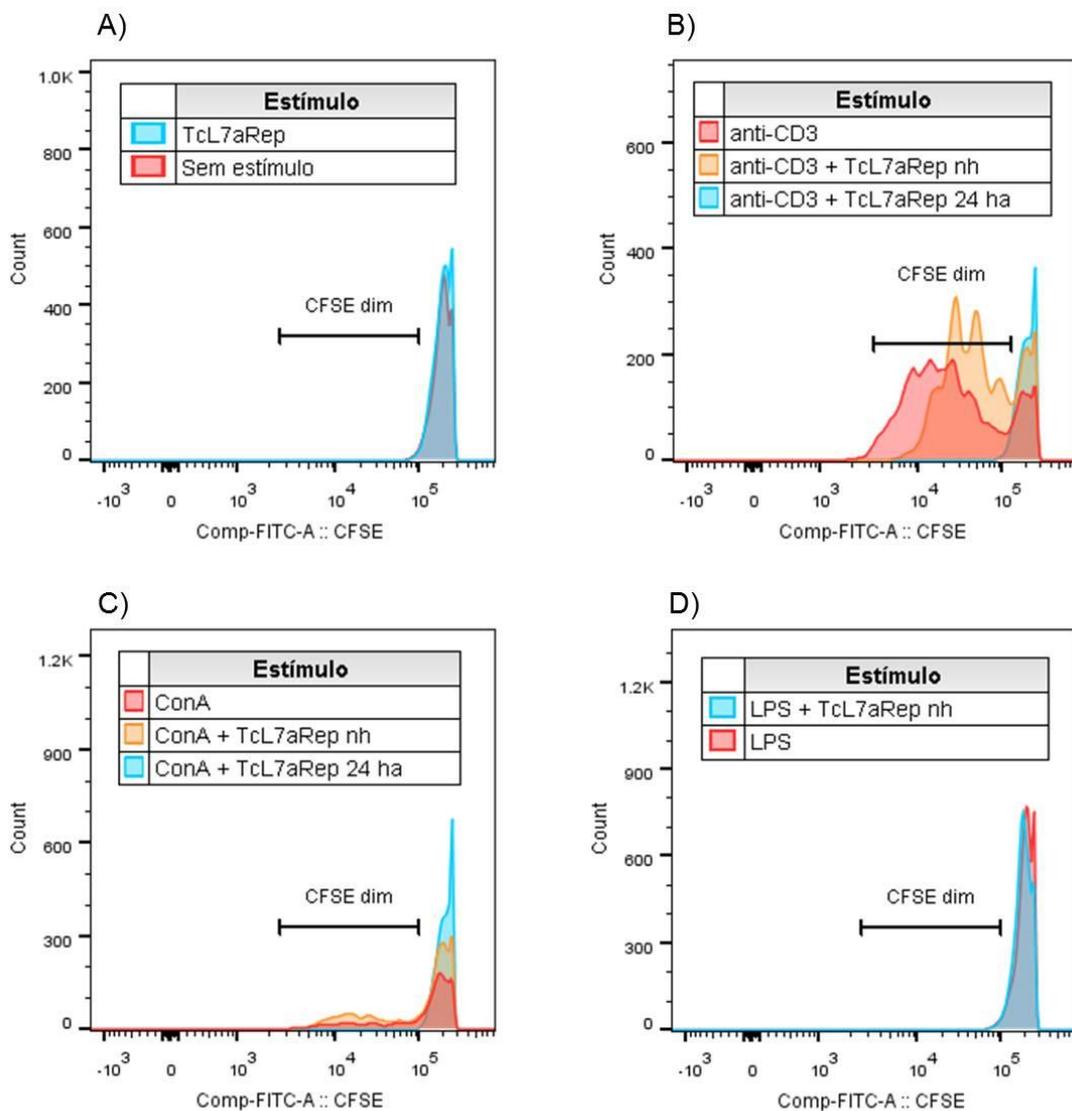


Figura 31. Histograma do marcador CFSE na população de linfócitos T CD3+ sem estímulo (A), com anti-CD3 (B), com ConA (C) e com LPS (D) na presença ou ausência de TcL7aRep 10 µg/mL adicionada na hora do estímulo (nh) ou 24 horas antes (24 ha).

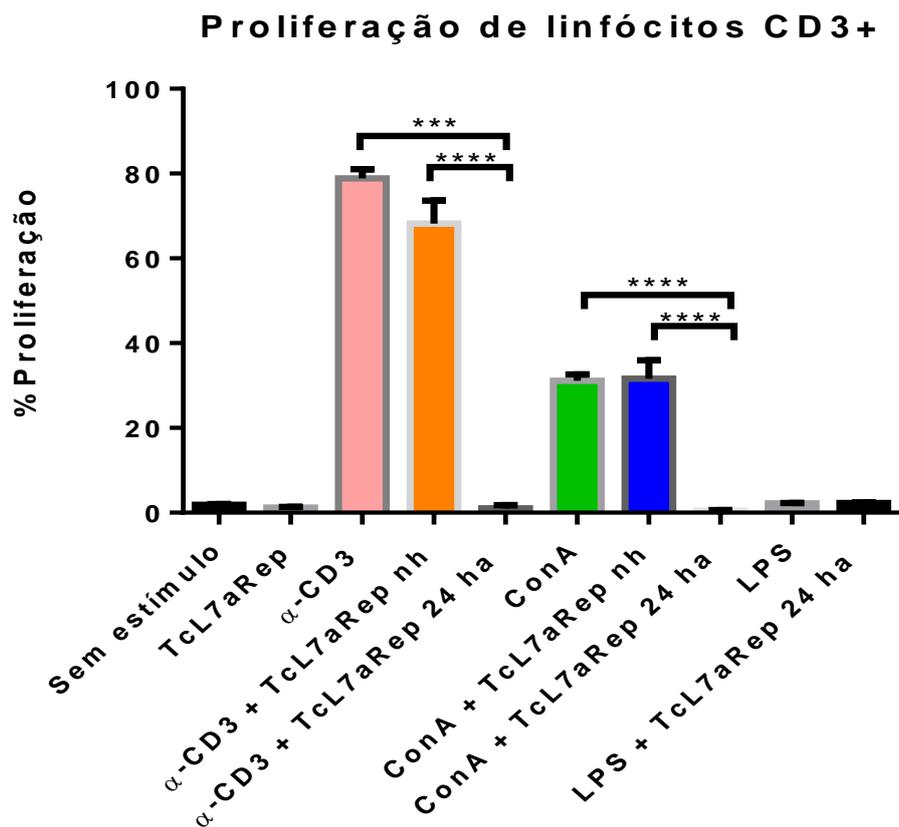


Figura 32. Porcentagem de proliferação de linfócitos T CD3+. Quantificação da diminuição da fluorescência do marcador CFSE (CFSEdim) como medida da proliferação, após estímulo com α-CD3, ConA e LPS por 120 horas na ausência da proteína TcL7aRep, ou na presença dessa proteína, adicionada na hora do estímulo (nh) ou 24 horas antes (24 ha).

Não foi observada proliferação dos linfócitos B (CD19+) em presença da TcL7aRep, mas sim após o estímulo com α -CD3, ConA e LPS quando comparada aos controles sem estímulos, como já descrito. A adição de TcL7aRep na concentração de 10 μ g/mL alterou significativamente a proliferação tanto no momento da adição dos estímulos (nh), quanto 24 horas antes (24 ha) de adicionar esses reagentes. Como observado com os linfócitos T, quando os esplenócitos foram incubados com a proteína 24 horas antes do estímulo (TcL7aRep 24 ha) com α -CD3, ConA e LPS, ocorreu a inibição completa da proliferação (figura 33). Na figura 34, é mostrado o gráfico da quantificação da proliferação de linfócitos B CD19+ procedentes dos histogramas da figura 33.

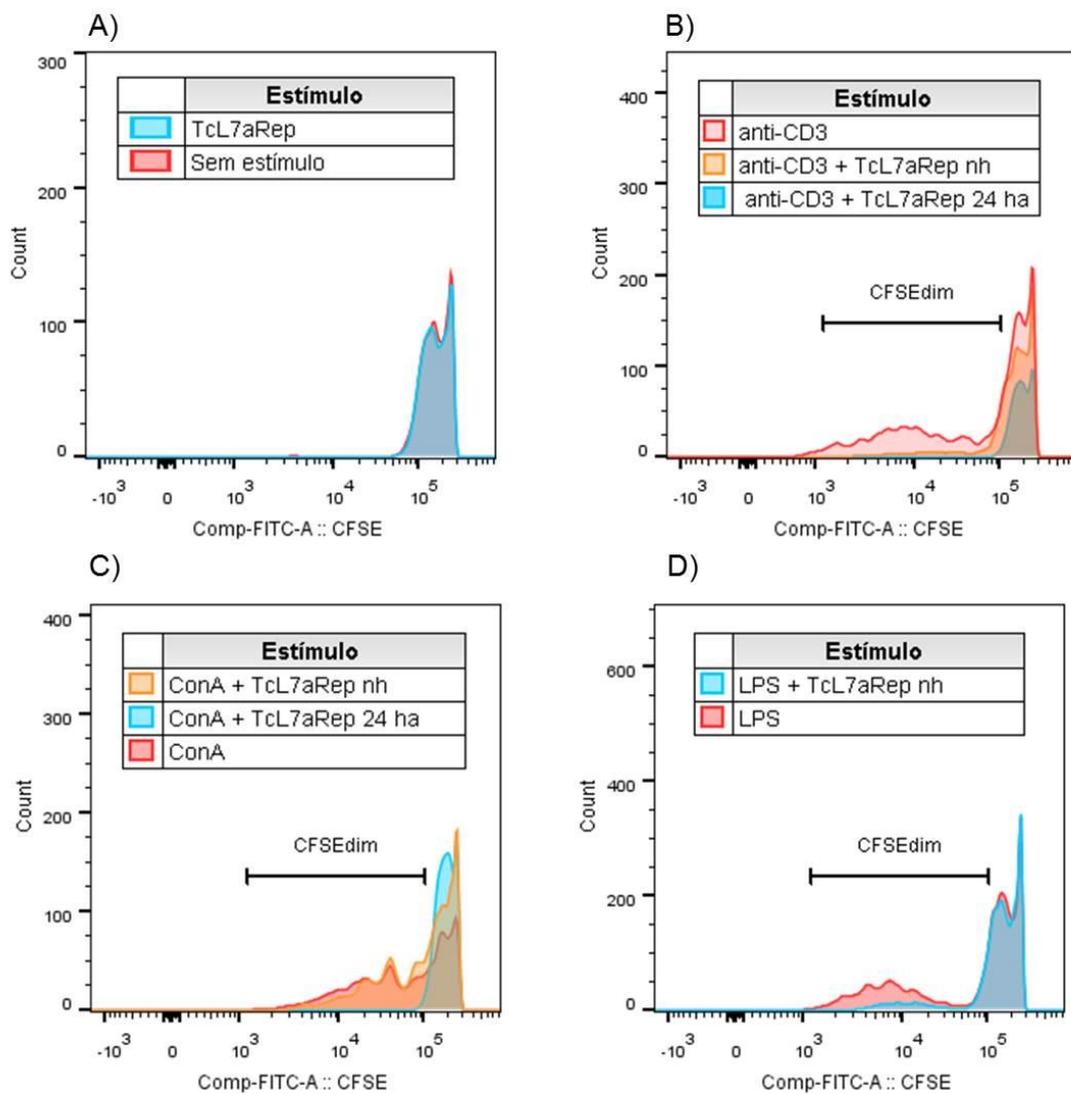


Figura 33. Histograma do marcador CFSE na população de linfócitos B CD19+ sem estímulo (A), com anti-CD3 (B), com ConA (C) e com LPS (D) na presença ou ausência de TcL7aRep 10 µg/mL adicionada na hora do estímulo (nh) ou 24 horas antes (24 ha).

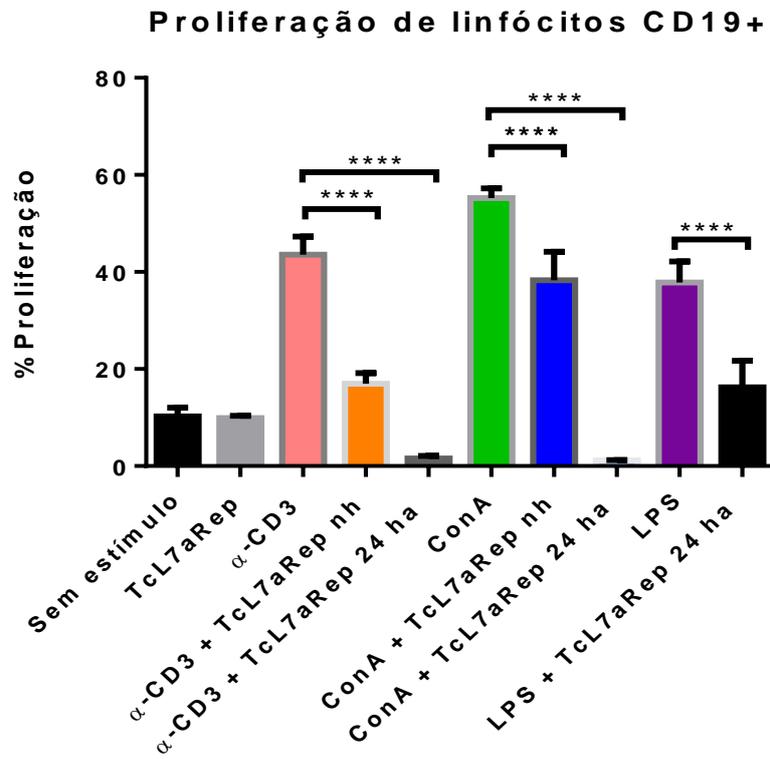


Figura 34. Porcentagem de proliferação de linfócitos B CD19+. Quantificação da diminuição da fluorescência do marcador CFSE (CFSEdim) como medida da proliferação, após estímulo com α -CD3, ConA e LPS por 120 horas na ausência da proteína TcL7aRep, ou na presença dessa proteína, adicionada na hora do estímulo (nh) ou 24 horas antes (24 ha).

4.12 Efeito da incubação com TcL7aRep na expressão de moléculas de superfície de esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de observar possíveis alterações moleculares que expliquem a imunossupressão evidenciada nos experimentos *in vivo* e a diminuição na capacidade de proliferar de LT e LB na presença da TcL7aRep, foram feitas análises da intensidade média da fluorescência, MFI, das moléculas CD3, CD4, CD8 e do receptor de IL-2 (CD25) em SMC estimuladas na presença ou na ausência de TcRpL7a.

Os resultados da figura 35 mostram que, como esperado, essas células apresentaram valores maiores de CD4, CD8 e CD3, após estimulação com α -CD3 e ConA. Não foram detectadas alterações do MFI de CD4, CD8 ou CD3 nos esplenócitos incubados com TcL7aRep na concentração de 5 μ g/mL na ausência de estímulos. De forma interessante, a proteína TcL7aRep diminuiu a expressão de CD3+, CD4+ e CD8+ na superfície celular após o estímulo com α -CD3, quando comparado com estímulo na ausência do dessa proteína (Figura 35).

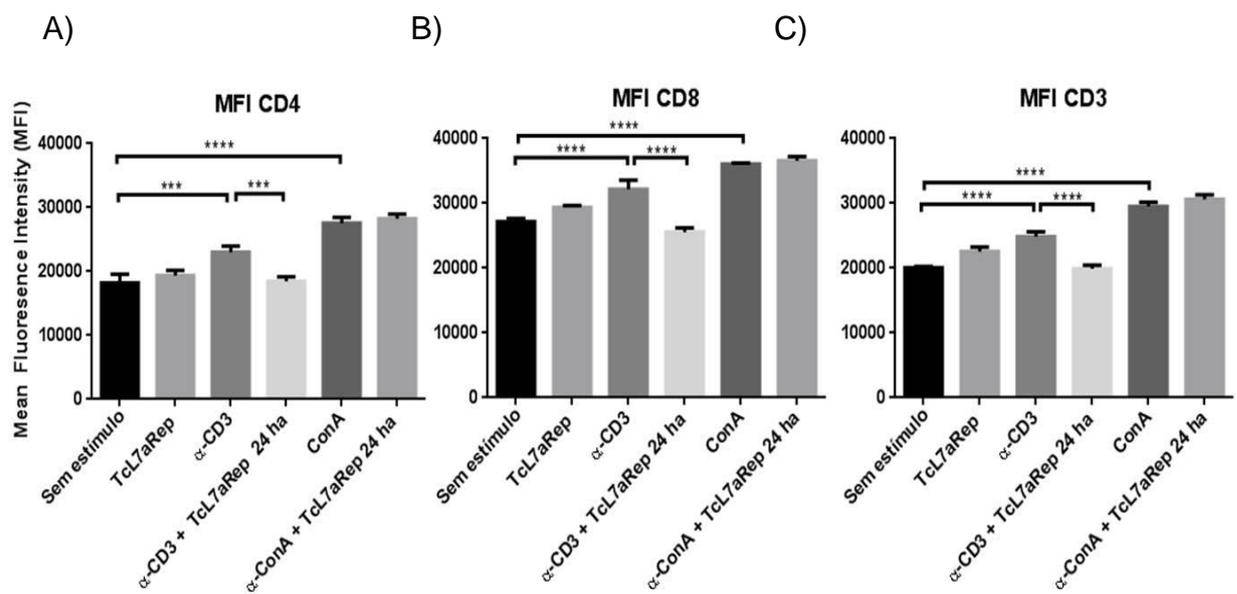


Figura 35. Intensidade média de fluorescência (MFI) das proteínas CD4 (A), CD8 (B) e CD3 (C) por citometria de fluxo de esplenócitos estimulados com α -CD3 e ConA em ausência ou presença da proteína TcL7aRep 24 horas antes (24 ha) dos estímulos na concentração de 5 μ g/mL.

Em relação à análise da porcentagem de linfócitos CD4+CD25+ e CD8+CD25+, foi observado um aumento estatisticamente significativo, quando os esplenócitos são estimulados com ConA, mas não com α CD3. No entanto, quando as células são incubadas com TcL7aRep 24 horas antes do estímulo com α -CD3, a porcentagem destas duas populações diminui; mas não com o estímulo de ConA (figura 36).

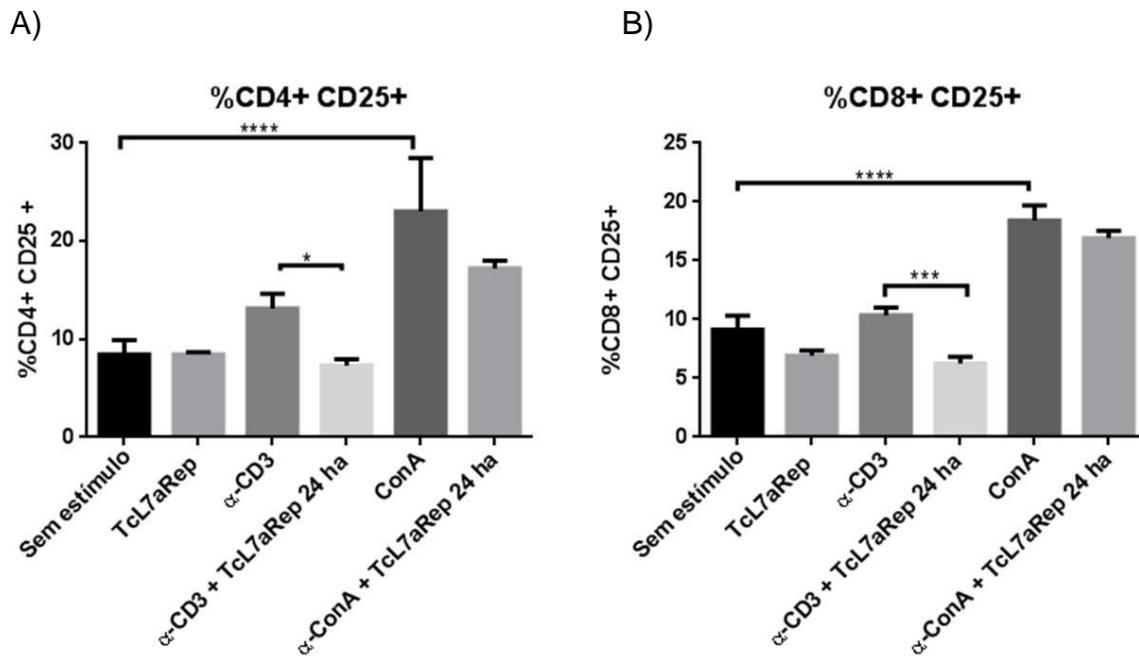


Figura 36. Porcentagem de linfócitos CD4+CD25+ (A) e CD8+CD25+ (B) de esplenócitos estimulados com α -CD3 e ConA, em ausência ou presença de TcL7aRep 24 horas antes (24 ha) dos estímulos na concentração de 5 μ g/mL. Análise por citometria de fluxo.

A análise da MFI do receptor de CD25 mostrou que, após o estímulo com α -CD3 e ConA, linfócitos T CD4 têm a expressão desse receptor aumentada na superfície, quando comparado com a expressão em linfócitos não estimulados. Além disso, a proteína TcL7aRep, na concentração de 5 μ g/mL, diminuiu significativamente a expressão de CD25 nos linfócitos CD4+ quando estimulados com α -CD3, mas não com ConA, quando comparado com o estímulo só. Não houveram diferenças significativas em relação à MFI de CD25 em linfócitos CD8+, seja na presença de estímulo mitogênico ou da TcL7aRep quando comparados com o controle (Figura 37).

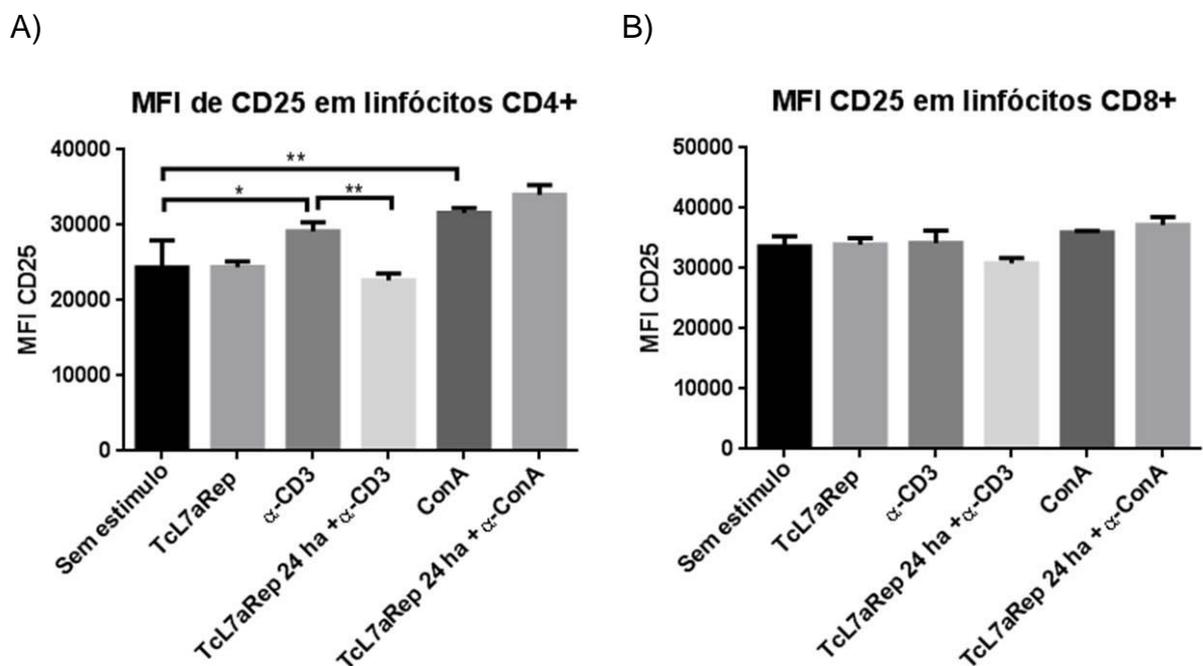


Figura 37. MFI de CD25 em linfócitos CD4+ (A) e CD8+ (B) de esplenócitos estimulados com α -CD3 e ConA, em ausência ou presença de TcL7aRep 24 horas antes (24 ha) dos estímulos na concentração de 5 μ g/mL. Análise por citometria de fluxo.

Adicionalmente se analisou a MFI de CD25 nos linfócitos B, pois este é um marcador de ativação e maduros (88, 89), além de que já foi reportado que o *Trypanosoma cruzi* e produtos solúveis liberados pelo parasito podem diminuir sua expressão (67, 90). Observou-se, como esperado, o aumento da expressão de CD25 após o estímulo com α -CD3 e ConA. A incubação com TcL7aRep, 24 horas antes do estímulo com α -CD3, resultou na diminuição significativa da MFI nessas células (Figura 38).

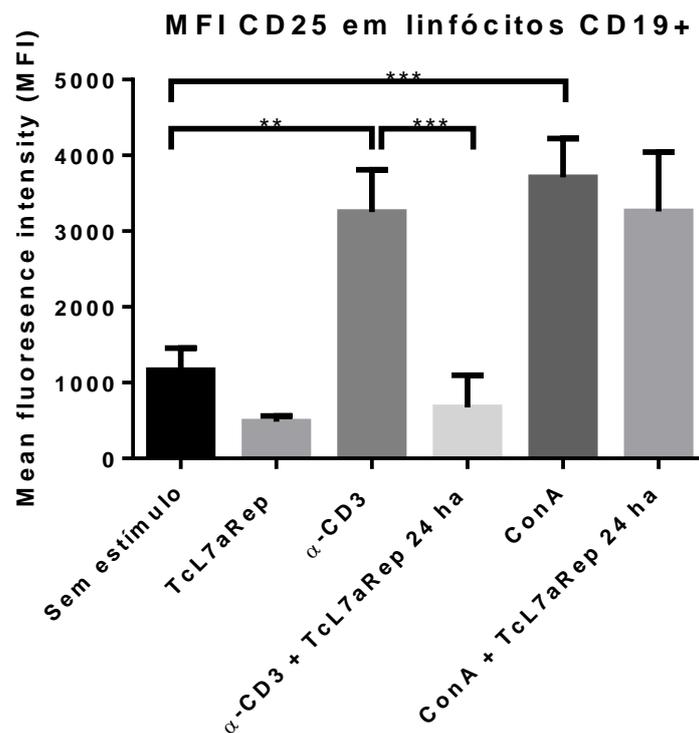


Figura 38. MFI de CD25 em linfócitos B CD19+ de esplenócitos estimulados com α -CD3 e ConA, em ausência ou presença de TcL7aRep 24 horas antes (24 ha) dos estímulos na concentração de 5 μ g/mL. Análise por citometria de fluxo.

4.13 Efeito da incubação com TcL7aRep na produção de citocinas por esplenócitos estimulados *in vitro*

A quantificação das citocinas IL-2 e IL-10 nos sobrenadantes dos esplenócitos estimulados em presença ou ausência da TcL7aRep mostrou, como esperado, que a estimulação com α -CD3 e ConA resulta em altos níveis de IL-10 e IL-2, 72 horas após o estímulo quando comparados com o controle. Adicionalmente, como esperado, o LPS estimula a produção de IL-10, mas não de IL-2. No entanto, a presença de TcL7aRep na concentração de 5 μ g/mL, 24 horas antes do estímulo, inibe a produção de IL-10 após o estímulo com ConA, mas não com α -CD3 ou LPS. A produção da citocina IL-2 não foi afetada pela presença da TcL7aRep em nenhum dos estímulos (Figura 39).

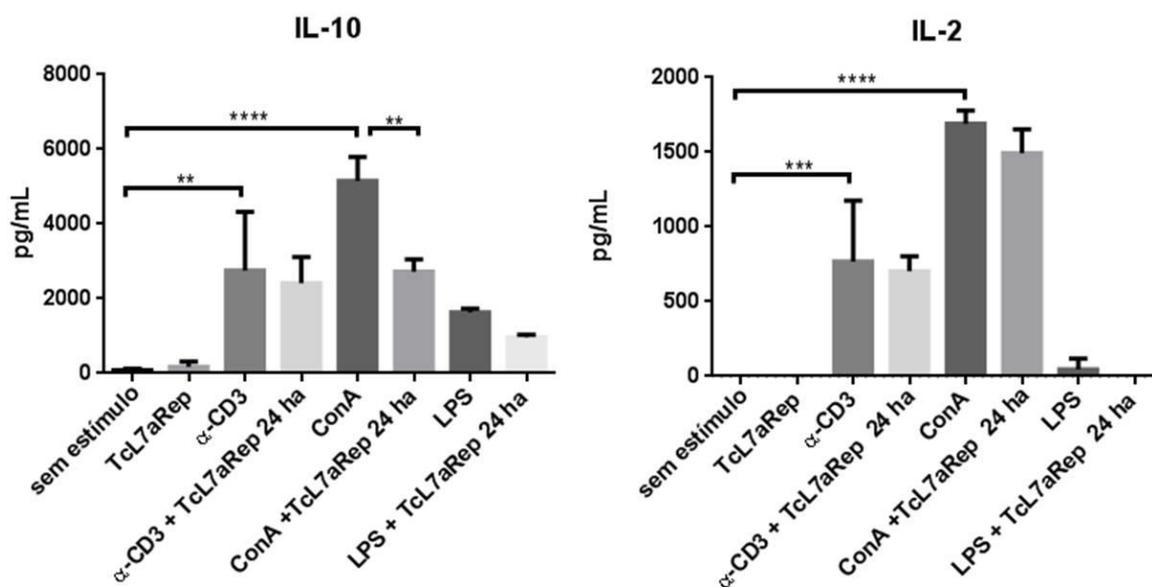


Figura 39. IL-10 e IL-2 nos sobrenadantes de esplenócitos após 72 horas de estímulo com α -CD3, ConA e LPS, em presença ou ausência de 5 μ g/mL de TcL7aRep.

5. DISCUSSÃO

A relação parasito-hospedeiro na doença de Chagas é complexa; nela são deflagrados mecanismos imunoprotetores do hospedeiro, inatos e adaptativos, para erradicar o microorganismo (91). No entanto, o parasito fica no hospedeiro para o resto da vida; raramente acontecem reações imunológicas esterilizantes contra o *T. cruzi*, e isto requer constantemente mecanismos de evasão do sistema imune (92). Vários destes mecanismos de invasão, imunoevasão e imunossupressão, conhecidos como fatores de virulência, têm sido descritos na infecção por *T. cruzi* (93).

T. cruzi e outros parasitos intracelulares possuem maior quantidade de repetições nas suas proteínas do que parasitos extracelulares e espécies eucariotas livres (69, 70), sugerindo-se uma relação entre as repetições e a capacidade de sobreviver no interior de células do hospedeiro. Pais et al. correlacionaram a virulência de diferentes cepas de *T. cruzi* com a quantidade de repetições, pois mostraram que as cepas pertencentes ao DTU *T. cruzi* II (mais virulentas) têm mais repetições em alguns antígenos do que cepas de *T. cruzi* I (menos virulentas) (83). No sequenciamento do genoma de *T. cruzi* do clone CL Brener, altamente virulento, mostrou-se que 50% deste genoma possui regiões repetitivas (71).

Várias hipóteses têm surgido para explicar o papel das repetições nas proteínas do *Trypanosoma cruzi* e de outros parasitos. Em 1991, Schofield hipotetizou que os domínios repetitivos podem atuar como antígenos independentes de linfócitos B tipo II, pois este tipo de antígeno, de natureza multivalente e repetitiva, possui capacidade de induzir *cross-linking* simultâneo de vários receptores nos linfócitos B, e portanto de induzir sua ativação na ausência de linfócitos T. Desta forma, a grande quantidade destas proteínas poderia levar à imunodominância, o que foi relacionado a um mecanismo de

imunoevasão, pois a resposta humoral independente de linfócitos T não é tão eficiente quanto a dependente (81).

Várias pesquisas têm mostrado que as repetições são fortes alvos da resposta imune humoral na doença de Chagas. Mediante o *immunoscreening* de uma biblioteca de cDNA de *T. cruzi* com soro de pacientes chagásicos, Da Rocha et al (2002), demonstraram que 50% dos clones positivos são proteínas ribossômicas, e destas 70% tem domínios repetitivos (Figura 5) (82). Goto et al, também concluíram por *immunoscreening* de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos, testados com soro de pacientes chagásicos, que as proteínas com domínios repetitivos que incluem proteínas da família das transialidases, MASP, mucinas e algumas proteínas hipotéticas, são imunodominantes (75). A imunodominância na doença de Chagas também foi demonstrada por Tzlepis et. al (2008), que mostraram que a proteína transialidase, que contém o domínio repetitivo conhecido como SAPA, é imunodominante (76). Todos esses dados apontam para o papel das repetições nas proteínas deste parasito na virulência e na resposta imune deflagrada pelo hospedeiro contra o parasito. A imunodominância das repetições tem sido estudada também em outros protozoários parasitos, como por exemplo, o causador da malária. Proteínas com sequências repetitivas foram relacionadas à mecanismos de imunoevasão, e de acordo com o modelo da “Cortina de fumaça”, esses antígenos imunogênicos seriam alvos da resposta adaptativa, principalmente humoral, que levariam a um desvio dos alvos mais importantes no parasito (79).

Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório mostraram que a proteína ribossomal de *T. cruzi*, TcL7a, homóloga à proteína eucariótica ribossomal L7a, contém um domínio repetitivo de 90 aminoácidos com a sequência consenso AAK(P/T/S) (Figura 6) (82). Adicionalmente, foi mostrado que o soro de pacientes chagásicos contém anticorpos contra o domínio repetitivo da TcL7a. No entanto, não é claro se a resposta contra esta proteína com domínio repetitivo é parte do mecanismo de imunoevasão para desviar a resposta contra outros alvos do parasito, ou se estes anticorpos conferem proteção contra o parasito.

Com o objetivo de conhecer o papel do domínio repetitivo na proteína ribossomal L7a do *Trypanosoma cruzi*, experimentos de imunização com a proteína TcL7a recombinante e suas versões truncadas, TcL7aRep e TcL7adeltaRep foram realizados. A posterior infecção com o parasito mostrou que a imunização com a proteína inteira TcL7a conferiu proteção contra o parasito, enquanto que a imunização com o domínio não repetitivo não causou diferença significativa na parasitemia nem na mortalidade, quando comparado com o controle. De forma interessante, a imunização com TcL7aRep resultou em aumento da mortalidade e da parasitemia, o que sugere um papel imunossupressor do domínio repetitivo. Não é claro, no entanto, por que a proteína inteira, mesmo contendo o domínio repetitivo, age de forma oposta à TcL7aRep, isto é, confere proteção (84).

A hipótese de que esse aumento da parasitemia e da mortalidade na infecção, induzido pela imunização com TcL7aRep (Figura 19), seja resultado de múltiplos fatores, que incluiriam alterações imunológicas com consequências patológicas, foi testada nesse trabalho. As análises histopatológicas mostraram menor quantidade de infiltrado de células inflamatórias no coração do grupo de animais infectados e imunizados com TcL7aRep quando comparado com os animais controle não imunizados, o que poderia explicar a menor capacidade desses animais de controlar a infecção (Figuras 20 e 21B).

A contagem do número de ninhos de amastigota e a análise por qPCR da quantidade de DNA de *T. cruzi* no coração, apesar de mostrarem uma tendência do grupo imunizado com a TcL7aRep a apresentar um maior parasitismo, não nos permitiu concluir que isto realmente tenha ocorrido, pois não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 21A e 22). Se for confirmada, esta tendência ao aumento do parasitismo do coração pode ser correlacionada com a diminuição do infiltrado inflamatório no grupo imunizado com TcL7aRep, pois esta resposta é importante para o controle do parasito.

De forma interessante, Valente et al. mostraram que a imunização com o domínio não repetitivo TcL7a Δ Rep induz, como a TcL7a, a produção de anticorpos contra esse domínio, mas de forma diferente da imunização com a TcL7a completa (que mostrou atividade protetora), a TcL7a Δ Rep não induz anticorpos contra a repetição (85). Pode-se sugerir então, que a capacidade de conferir proteção pela imunização com a proteína inteira TcL7a seja devida, pelo menos em parte, à produção de anticorpos contra o domínio repetitivo imunossupressor TcL7aRep.

Como foi observado nos experimentos de imunização e infecção, a imunização com TcL7aRep leva a uma redução nos níveis de anticorpos IgG e IgM contra o extrato de *T. cruzi* (Figura 24). Uma resposta humoral contra a TcL7aRep bloquearia a imunossupressão exercida pela repetição. Neste caso, se esperaria então que a imunização com a TcL7a, indutora de produção de anticorpos contra a repetição, ajudaria ao aumento da resposta humoral contra o extrato de *T. cruzi* nos animais imunizados com a proteína inteira. No entanto, esta hipótese ainda não foi avaliada.

A diminuição da resposta humoral específica (figura 24) é um sinal da imunossupressão induzida pela imunização com TcL7aRep, o que explicaria, pelo menos em parte, a susceptibilidade aumentada destes animais, refletida no aumento da parasitemia (figura 19), pois várias pesquisas têm demonstrado o papel da resposta imune humoral na proteção contra *T. cruzi* (47-49).

A doença de Chagas é caracterizada por hipergamaglobulinemia, ou seja, o aumento indiscriminado de anticorpos no soro. Minoprio et al. demonstraram que a maioria dos anticorpos gerados na doença de Chagas são inespecíficos para *T. cruzi* (54) e foram relacionados com o esgotamento e anergia de linfócitos B geradores de resposta humoral específica protetora (94, 95).

Vários ativadores policlonais têm sido descritos em *T. cruzi* e podem contribuir com a hipergamaglobulinemia e imunoevasão na doença de Chagas. A transialidase, uma proteína de superfície, é expressa em formas tripomastigotas e contém um domínio repetitivo chamado SAPA, sendo

considerada um ativador policlonal. Pesquisas feitas por Wenda Gao et al. (2002) mostraram que na transialidase, a propriedade de ativação policlonal e a capacidade mitogênica são induzidas pelo domínio repetitivo SAPA, e as magnitudes destas respostas são diretamente proporcionais ao número de repetições deste domínio (55). A resposta policlonal gera anticorpos inespecíficos e afeta negativamente a produção de anticorpos específicos. Contudo, apesar das predições computacionais (Figura 14 e 15) a TcL7aRep não induz anticorpos *in vivo* contra ela (Figura 17 e 23). Desta forma, formulamos a hipótese de que inicialmente esta proteína poderia ser um ativador policlonal semelhante ao domínio repetitivo SAPA. Entretanto, a incubação de esplenócitos com a TcL7aRep a 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ por 96 horas não produziu anticorpos IgM inespecíficos nos sobrenadantes (figura 30). Adicionalmente, esta proteína também não se mostrou mitogênica para linfócitos T ou B, pois a incubação desta proteína com esplenócitos não induziu proliferação *in vitro* (figura 31 e 33), pelo qual esta hipótese parece errada.

Para explicar a aparente contradição das predições computacionais com a incapacidade da proteína TcL7aRep de estimular a produção de anticorpos *in vivo* (figura 17 e 23), surgem duas hipóteses: na primeira, pode-se especular que a não produção de anticorpos contra o domínio repetitivo, em animais imunizados com o antígeno contendo somente esse domínio, é consequência da falta de epítomos de linfócitos T, os quais estão presentes no domínio não-repetitivo (84). Essa interpretação explicaria a ausência de anticorpos específicos anti-repetições em animais imunizados com TcRepL7a, mas não explica a imunossupressão induzida por esta proteína, evidenciada por:

- diminuição da resposta humoral de animais infectados, observada após a imunização (Figura 24),
- diminuição de infiltrado celular inflamatório e uma tendência ao aumento de ninhos de amastigota no coração (figura 21A e B),
- diminuição da resposta celular e humoral após imunização com OVA (figura 27 e 28),

- diminuição da proliferação de linfócitos T e B quando estimulados na sua presença (figura 31, 32, 33 e 34).

Uma segunda hipótese é baseada no modelo do "immunon", desenvolvido por Dintzis et al (1976), no qual foi estabelecido que para que um antígeno multivalente, contendo epítomos repetitivos, possa atuar como um antígeno independente de linfócitos T, isto é, que seja capaz de gerar anticorpos sem a participação de linfócitos T, é necessária a presença de pelo menos 20 repetições do epítomo, de maneira que estes façam o *cross-linking* de simultaneamente pelo menos 20 BCR (B cell receptors), formando um "immunon" ou *cluster* de BCR, que leva à ativação do linfócito B (96). Se o domínio contendo a repetição está abaixo deste *threshold* de 20 epítomos, seria gerada uma resposta tolerogênica, a qual afetaria a geração de anticorpos específicos dependentes de linfócitos T (97). Como a TcL7aRep possui 90 aminoácidos e um M.W. de 8,81 KDa (figura 7), e sabendo-se que um epítomo linear de linfócito B tem de 6 a 9 aminoácidos (98), a TcL7aRep teria de 9 a 15 epítomos. Assim,, de acordo com o modelo do "immunon", a TcL7aRep seria tolerogênica, o que explicaria não só a ausência de anticorpos α -TcL7aRep, mas também a imunossupressão induzida por ela.

Embora a segunda hipótese seja interessante, o modelo do "immunon" foi desenvolvido com polímeros ligados a múltiplos anticorpos α -Ig, o que gera efeitos imunológicos policlonais mensuráveis. No entanto, em contextos reais, as ligações de BCR e repetições, presumivelmente, seriam mono ou oligoclonais, e provavelmente de magnitude e significância baixa. Porém, também poderia-se hipotetizar que os linfócitos B-1 (CD5+), produtores de anticorpos naturais, também sejam alvos de moléculas repetitivas como a TcL7aRep, e levando-se em conta que seus BCR são polirreativos e ligam-se a moléculas de estrutura conservada (99, 100), as repetições poderiam alcançar um número de alvos suficientemente grande, como este tipo de linfócito, gerando um efeito tolerogênico significativo. É importante saber que no modelo do "immunon" não foi elucidado o mecanismo de tolerogenicidade. Desta forma, são muitas as possibilidades de mecanismos possíveis envolvidos no fenômeno da imunossupressão.

É interessante lembrar que os linfócitos CD5+ têm sido relacionados com a hipergamaglobulinemia e o aumento da resposta humoral inespecífica na doença de Chagas (94). No entanto, na hipótese de tolerogenicidade induzida pela TcL7Rep apresentada neste trabalho, os linfócitos CD5+ estariam também associados hipoteticamente com o aumento da susceptibilidade à infecção, mas por meio de um mecanismo diferente do mostrado por Minoprio et al. (94, 95). Estudos mais avançados precisam ser feitos para observar se este tipo de linfócitos são alvos da proteína repetitiva TcL7aRep.

Alterações na resposta celular e humoral foram observadas no experimento de indução da resposta de hipersensibilidade pela imunização com o antígeno heterólogo OVA, pois os camundongos injetados com 10 μ g de TcL7aRep, 24 horas antes das duas imunizações com OVA, tiveram menor resposta, refletida em menor inflamação na pata 24 horas após a injeção de OVA quando comparados com animais controle (Figura 27). Estes dados revelam alteração na resposta celular causada por TcRpL7a, pois a inflamação após a injeção na pata de animais previamente sensibilizados com esse antígeno é uma manifestação da resposta adaptativa celular efetora específica, mediada inicialmente por linfócitos T, que induzem recrutamento de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, vasodilatação e inflamação (101). Da mesma forma, esse experimento mostrou que a resposta humoral foi também alterada, pois os níveis de anticorpos anti-OVA no dia 7 após a imunização sofreram uma diminuição nos camundongos injetados previamente com 10 μ g de TcL7aRep (Figura 28). Assim, estes resultados indicam que a TcL7aRep induz imunossupressão da resposta celular e humoral de forma inespecífica, pois diminui a resposta contra a proteína OVA, não presente no *T. cruzi*. De fato, alterações na resposta hipersensível já haviam sido reportadas em camundongos infectados crônicos. Entretanto, parece que na infecção experimental, esse efeito é devido a um mecanismo distinto da imunossupressão observada nos nossos experimentos com a TcL7aRep, pois a imunossupressão reportada na literatura é específica contra antígenos de *T. cruzi*, e não contra antígenos heterólogos como KLH (Keyhole limpet hemocyanin) e SRBC (Sheep Red Blood Cells) (45).

Com o objetivo de elucidar o mecanismo imunológico de supressão feito pelo domínio repetitivo, foram feitos experimentos *in vitro* de estimulação de esplenócitos, em presença ou ausência de TcL7aRep. Como resultado, observamos uma diminuição na capacidade de proliferação de linfócitos T CD3+ (Figura 31 e 32) e linfócitos B CD19+ (Figura 33 e 34) com estímulos policlonais como α -CD3, ConA e LPS na presença de TcRpL7a.

No entanto, é importante ressaltar que a ConA e o α -CD3 estimulam policlionalmente os linfócitos T de maneiras diferentes, e que o LPS é um antígeno independente de Linfócito T tipo I (TI-I). Isto sugere um mecanismo de imunossupressão geral, não específico, que poderia ser causado por fatores comuns, tais como citocinas pleiótricas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , ou a diminuição da produção de citocinas e expressão de receptores de citocinas pleiotrópicas importantes para a ativação dos dois tipos de linfócitos, como IL-2 e IL-2R.

A análise de CD3, CD4 e CD8 em linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+, respectivamente, mostrou, como esperado, o aumento da MFI destas proteínas, após o estímulo de esplenócitos com α -CD3 e ConA. De forma interessante, observou-se a diminuição significativa da expressão destes 3 marcadores após o estímulo de α -CD3 na presença de TcL7aRep, mas não com o estímulo de ConA (figura 35). A diminuição da quantidade de CD3 nos linfócitos CD3+ pode explicar a diminuição da proliferação deste tipo de células após o estímulo com α -CD3 na presença da repetição, observado nos experimentos de proliferação celular (figura 31 e 32).

Se os efeitos da TcL7aRep mencionados acima estiverem causando estes mesmos efeitos *in vivo*, isto explicaria o aumento da susceptibilidade de camundongos imunizados com TcL7aRep à infecção com *T. cruzi* (figura 19), a diminuição da sua resposta humoral (figura 24), e a diminuição da resposta celular e humoral na indução da resposta hipersensível (figura 27 e 28). Sabe-se que CD3 faz parte do complexo que compõe o receptor dos linfócitos T (TCR) e é importante para o reconhecimento de antígenos apresentados por

células apresentadoras de antígeno, APC. Adicionalmente, as proteínas CD4 e CD8 são importantes para a interação linfócitos T e as APCs. Assim, alterações nestes 3 componentes podem comprometer a resposta adaptativa mediada pelos linfócitos T, além de afetar indiretamente o desenvolvimento da resposta humoral.

O receptor de IL-2 (CD25) é uma molécula essencial para a proliferação de linfócitos T ativados; por isso, avaliamos sua presença e quantidade na superfície celular. Evidenciamos, como esperado, um aumento na porcentagem de linfócitos CD4+CD25+ após o estímulo com α CD3 e ConA, e a diminuição dessa diferença na presença da TcL7aRep após o estímulo com α -CD3. Os dados de marcação com CFSE mostram também que a porcentagem de linfócitos CD8+CD25+ que proliferam quando estimulados com α CD3 na presença de TcL7aRep é menor do que na ausência desse antígeno (fato não observado com o estímulo com ConA) (Figura 36).

Ao analisar os níveis do receptor de IL-2 (CD25), observamos uma diminuição da MFI em linfócitos CD4+ estimulados com α -CD3 na presença de TcL7aRep quando comparada com células estimuladas na ausência do antígeno. Inesperadamente, não houve alteração na MFI de CD25 em linfócitos CD8+ após os estímulos, na presença ou ausência de TcL7aRep (Figura 37). Estes dados explicam parcialmente a menor capacidade de proliferação dos linfócitos T CD3+ (que podem ser linfócitos CD4+ e CD8+) quando estimulados com α -CD3 na presença do domínio repetitivo (figura 31 e 32), pois a IL-2 é um fator de crescimento importante para linfócitos ativados, e expressão do receptor de IL-2 (CD25), tanto em linfócitos CD4+ quanto CD8+, é indispensável para essa ativação (102).

Ao analisar os níveis de CD25 em linfócitos B CD19+, observamos um aumento de CD25 após estimulação com α -CD3, aumento esse que também se reduz na presença da TcL7aRep. Novamente observamos essa diferença somente após o estímulo com α -CD3, mas não quando estimulados com ConA (Figura 38). Esse dado explica a redução da proliferação de linfócitos B CD19+

estimulados com α -CD3 em presença do domínio repetitivo quando comparado só com o estímulo (Figura 33 e 34).

Por fim, observamos também que a produção das citocinas IL-2 e IL-10 no sobrenadante, após o estímulo de esplenócitos com α -CD3 e ConA, foi significativamente aumentada, como esperado. Na presença de TcL7aRep, o estímulo com ConA, mas não com α -CD3, resultou em uma diminuição na produção de IL-10. Entretanto, a presença do domínio repetitivo não afetou significativamente a produção de IL-2 (Figura 39), diferente do que foi observado para o seu receptor.

A redução da produção de IL-10 pode afetar bastante o controle da resposta inflamatória, o que na infecção pode levar a uma resposta imune exacerbada e danos imunopatológicos (103). Adicionalmente, como mostrado em linfócitos B de humanos, a diminuição da produção de IL-10 pode levar à redução da resposta humoral, pois esta citocina, junto com IL-2, participa da ativação deste tipo de resposta em linfócitos B num mecanismo diferente do aumento do receptor de CD25 (104). Desta forma, estudos mais aprofundados são necessários para conferir se um mecanismo semelhante a este estaria contribuindo com a diminuição da resposta humoral (figura 24) e o aumento da susceptibilidade observados nos experimentos *in vivo* de camundongos imunizados com TcL7aRep e infectados (figura 19) ou imunizados com TcL7aRep e imunizados com OVA (figura 27 e 28).

Resumidamente, como observado nos experimentos de proliferação *in vitro*, os linfócitos T e B proliferam quando estimulados com α -CD3 e ConA, mas na presença de TcL7aRep, ambas as proliferações diminuem. Além disso, o aumento da expressão de moléculas como CD3, CD4, CD8 e CD25 foi observado após esses mesmos estímulos, mas a presença de TcL7aRep inibe este aumento só na estimulação com α -CD3, mas não com ConA (figura 32, 34, 35, 36, 37 e 38). Um mecanismo diferente de imunossupressão em relação ao mencionado acima foi observado na análise da produção de IL-10. O estímulo de esplenócitos com α -CD3 e ConA induz a produção de IL-10; no entanto, a presença da TcL7aRep só diminui a produção de IL-10 causada por

ConA, mas não por α -CD3 (figura 39) Estes dois comportamentos poderiam ser mediados por dois mecanismos immunossupressivos diferentes, onde a incapacidade dos linfócitos de proliferarem ao estímulo por α -CD3 na presença da TcL7aRep é causada pela diminuição da expressão de moléculas como CD3, CD4, CD8 e CD25, mas a imunossupressão da TcL7aRep antes do estímulo com ConA estaria mediada por um mecanismo diferente ao primeiro, mas relacionado à diminuição na produção de IL-10.

A hipótese do “immunon” prevê a iniciação de uma resposta tolerogênica mediada por linfócitos B, pois seus receptores (BCRs) são potenciais alvos da repetição TcL7aRep. Levando-se em conta estudos que mostram que o caráter ativador ou immunossupressor de linfócitos B depende do tipo de estímulo (105), podemos ainda levantar a hipótese de que um dos mecanismos de imunossupressão evidenciados neste trabalho levaria à proliferação ou ativação de linfócitos B reguladores. Estudos adicionais são necessários para que possamos investigar melhor essa e outras hipóteses.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O domínio repetitivo da proteína L7a do *Trypanosoma cruzi* é uma sequência que está presente somente na proteínas ribossômicas deste organismo.

A imunização com a TcL7aRep antes da infecção com *T. cruzi* aumenta a susceptibilidade dos camundongos quando comparados com o controle, pois a parasitemia é exacerbada, e correlacionada, segundo as análises histopatológicas, com a diminuição do infiltrado celular inflamatório no coração.

As análises *in vivo*, como a indução da resposta hipersensível contra OVA, indicam que o domínio repetitivo é um immunossupressor inespecífico da resposta humoral e celular.

As análises *in vitro* de estimulação de esplenócitos com TcL7aRep nos permitiram observar parte do mecanismo supressor da resposta imunológica, onde podemos concluir que o domínio repetitivo:

- Não é imunogênico;
- Não é ativador policlonal;
- Diminui a capacidade de proliferação de linfócitos T CD3+ e B CD19+;
- Diminui a proliferação de linfócitos CD4+ CD25+ e CD8+CD25+;
- Diminui a expressão das proteínas CD3, CD4 e CD8 na superfície das células correspondentes;
- Diminui a produção de IL-10, quando o estímulo com ConA está na presença dessa proteína;
- Não altera a produção de IL-2;
- É imunossupressor da resposta imune adaptativa.

Este trabalho abre várias perspectivas, entre elas os seguintes experimentos:

- Analisar se a proteína ribossomal L7a do *T. cruzi* e seu domínio repetitivo são liberados no transcurso da infecção.
- Investigar se os efeitos causados pela TcL7aRep no estímulo de esplenócitos *in vitro* são reproduzidos *in vivo*, após a imunização.
- Elucidar os mecanismos envolvidos na imunossupressão induzido pela TcL7aRep, como por exemplo a participação de células B regulatórias.
- Analisar a hipótese de que a produção de anticorpos α -TcL7aRep induzidos pela imunização com a proteína inteira TcL7a bloqueia este fator virulento e permite uma melhor resposta celular e humoral.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Telleria J, Tibayrenc M. American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research: Elsevier; 2010.
2. (WHO) WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> [updated março de 2016; cited 2016 16/12/2016].
3. Moncayo Á, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:17-30.
4. Bartholomeu DC, de Paiva RMC, Mendes TA, DaRocha WD, Teixeira SM. Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites. *PLoS Pathog*. 2014;10(12):e1004399.
5. de Araújo-Jorge TC, de Castro SL. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal: SciELO-Editora FIOCRUZ; 2000.
6. Jansen AM, Roque AR. Domestic and wild mammalian reservoirs. *American Trypanosomiasis, Chagas disease-one hundred years of research* London: Elsevier. 2010:249-76.
7. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*. 1973;27(1):347-82.
8. De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International review of cytology*. 1984;86:197-283.
9. Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*. 2010;126(3):283-91.
10. (WHO) WHO. Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/T_cruzi/lifecycle.htm2002 [cited 2016 17 de dezembro].
11. Ayo CM, Dalalio MMdO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed research international*. 2013;2013.
12. Krettli AU. The utility of anti-trypanomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:142-51.
13. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:152-8.
14. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
15. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102:113-22.
16. Meneghelli UG, de Godoy R, Macedo J, de Oliveira R, Troncon L, Dantas RO. Basal motility of dilated and non-dilated sigmoid colon and rectum in Chagas' disease. *Arquivos de gastroenterologia*. 1981;19(3):127-32.
17. Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current opinion in immunology*. 2007;19(4):430-4.
18. Oliveira A-C, De Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, et al. Impaired innate immunity in Tlr4-/- mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9-or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000870.
19. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of parasitology research*. 2012;2012.

20. Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunological reviews*. 2004;201(1):9-25.
21. Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infection and immunity*. 2001;69(4):2162-71.
22. Vespa G, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and immunity*. 1994;62(11):5177-82.
23. Gupta S, Dhiman M, Wen J-j, Jain Garg N. 7 ROS Signalling of Inflammatory Cytokines During *Trypanosoma cruzi* Infection. *Advances in parasitology*. 2011;76:153.
24. Cardoni R, Antunez M, Morales C, Nantes IR. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;56(3):329-34.
25. Melo RC, Fabrino DL, D'Ávila H, Teixeira HC, Ferreira AP. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biology International*. 2003;27(10):853-61.
26. Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(7):2531-42.
27. Goes GR, Rocha PS, Diniz AR, Aguiar PH, Machado CR, Vieira LQ. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004555.
28. Nogueira N, Bianco C, Cohn Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine*. 1975;142(1):224-9.
29. Tomlinson S, Raper J. Natural human immunity to trypanosomes. *Parasitology today*. 1998;14(9):354-9.
30. Kipnis T, Krettli A, DA SILVA W. Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scandinavian journal of immunology*. 1985;22(2):217-26.
31. Krettli A, Weisz-Carrington P, Nussenzweig R. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical and experimental immunology*. 1979;37(3):416.
32. Krautz G, Kissinger J, Krettli A. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 2000;16(1):31-4.
33. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine*. 2010;12:e29.
34. Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunology Letters*. 2000;73(1):43-50.
35. Rottenberg M, Cardoni R, Andersson R, Segura E, Örn A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scandinavian journal of immunology*. 1988;28(5):573-82.
36. Fujimura AE, Kinoshita SS, Pereira-Chiocola VL, Rodrigues MM. DNA Sequences Encoding CD4+ and CD8+ T-Cell Epitopes Are Important for Efficient Protective Immunity Induced by DNA Vaccination with a *Trypanosoma cruzi* Gene. *Infection and immunity*. 2001;69(9):5477-86.
37. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of allergy, asthma & immunology*. 2000;85(1):9-21.

38. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008;28(4):454-67.
39. Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*. 1990;144(2):717-24.
40. Kumar S, TARLETON RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite immunology*. 1998;20(5):207-16.
41. Nickell SP, Stryker G, Arevalo C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *The Journal of Immunology*. 1993;150(4):1446-57.
42. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, Ansara JA, Burleigh BA, Walch M, et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nature medicine*. 2016;22(2):210-6.
43. Ramos C, Schädler-Siwon I, Ortiz-Ortiz L. Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *The Journal of Immunology*. 1979;122(4):1243-7.
44. Kierszenbaum F, BUDZKO DB. *Trypanosoma cruzi*: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. *Parasite immunology*. 1982;4(6):441-51.
45. Scott M. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice: specific suppressor cells in chronic infection. *Immunity*. 1981;44(2):409.
46. Rodriguez A, Santoro F, Afchain D, Bazin H, Capron A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infection and Immunity*. 1981;31(2):524-9.
47. Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *The Journal of Immunology*. 1976;116(3):755-60.
48. Takehara H, Perini A, Da Silva M, Mota I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Experimental parasitology*. 1981;52(1):137-46.
49. Brodskyn C, Silva Ad, Takehara H, Mota I. IgG subclass responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology & Cell Biology*. 1989;67(6).
50. Buschiazzo A, Muiá R, Larrieux N, Pitcovsky T, Mucci J, Campetella O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog*. 2012;8(1):e1002474.
51. Cunningham D, Grogl M, Kuhn R. Suppression of antibody responses in humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*. 1980;30(2):496-9.
52. Cunningham DS, Kuhn RE, Rowland EC. Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Infection and immunity*. 1978;22(1):155-60.
53. Ramos C, Lamoyi E, Feoli M, Rodriguez M, Perez M, Ortiz-Ortiz L. *Trypanosoma cruzi*: immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. *Experimental parasitology*. 1978;45(2):190-9.
54. Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scandinavian journal of immunology*. 1988;28(5):553-61.
55. Gao W, Wortis HH, Pereira MA. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *International immunology*. 2002;14(3):299-308.
56. Montes C, Zuniga E, Vazquez J, Arce C, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;127(1):27-36.
57. Montes CL, Acosta-Rodríguez EV, Mucci J, Zuniga EI, Campetella O, Gruppi A. A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B

cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. *European journal of immunology*. 2006;36(6):1474-85.

58. Bryan MA, Norris KA. Genetic immunization converts the *Trypanosoma cruzi* B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen. *Infection and immunity*. 2010;78(2):810-22.

59. O'daly JA, Simonis S, Rolo ND, Caballero H. Suppression of humoral immunity and lymphocyte responsiveness during experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1984;26(2):67-77.

60. Kierszenbaum F. Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells. *The Journal of Immunology*. 1982;129(5):2202-5.

61. Tarleton RL, Kuhn RE. Measurement of parasite-specific immune responses in vitro: evidence for suppression of the antibody response to *Trypanosoma cruzi*. *European journal of immunology*. 1985;15(8):845-50.

62. Cunningham DS, Benavides GR, Kuhn RE. Differences in the regulation of humoral responses between mice infected with *Trypanosoma cruzi* and mice administered T. cruzi-induced suppressor substance. *The Journal of Immunology*. 1980;125(5):2317-21.

63. Sztejn MB, Cuna W, Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 1990;144(9):3558-62.

64. LOPEZ HM, Tanner M, Kierszenbaum F, Sztejn M. Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. *Parasite immunology*. 1993;15(5):273-80.

65. Kierszenbaum F, Cuna W, Beltz L, Sztejn M. Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product (s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Immunology*. 1990;144(10):4000-4.

66. Kierszenbaum F, Fresno M, Sztejn MB. The *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, interleukin-2 and its high-affinity receptor subunits. *Molecular and biochemical parasitology*. 2002;125(1):91-101.

67. Kierszenbaum F, Moretti E, Sztejn M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression. Altered expression by activated human lymphocytes of molecules which regulate antigen recognition and progression through the cell cycle. *Biological research*. 1992;26(1-2):197-207.

68. Marcotte EM, Pellegrini M, Yeates TO, Eisenberg D. A census of protein repeats. *Journal of molecular biology*. 1999;293(1):151-60.

69. Fankhauser N, Nguyen-Ha T-M, Adler J, Mäser P. Surface antigens and potential virulence factors from parasites detected by comparative genomics of perfect amino acid repeats. *Proteome science*. 2007;5(1):1.

70. Mendes T, Lobo F, Rodrigues T, Luiz-Rodrigues G, Rocha W, Fujiwara R, et al. Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. *Molecular biology and evolution*. 2013:mst001.

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

72. Yewdell JW, Bennink JR. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses 1. *Annual review of immunology*. 1999;17(1):51-88.

73. Sette A, Sundaram R. The phenomenon of immunodomination: Speculations on the nature of immunodominance. *Immunodominance: The Choice of the Immune System*. 2006:57-71.

74. Willis RA, Kappler JW, Marrack PC. CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(32):12063-8.
75. Goto Y, Carter D, Reed SG. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infection and immunity*. 2008;76(9):3967-74.
76. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *The Journal of Immunology*. 2008;180(3):1737-48.
77. Freitas LM, Dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *Plos one*. 2011;6(10):e25914.
78. Rodrigues MM, de Alencar B, Claser C, Tzelepis F. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009;42(3):220-3.
79. Kemp D, Coppel R, Anders R. Repetitive proteins and genes of malaria. *Annual Reviews in Microbiology*. 1987;41(1):181-.
80. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annual review of immunology*. 1995;13(1):655-92.
81. Schofield L. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitology Today*. 1991;7(5):99-105.
82. DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macêdo CD, Horta FM, Cunha-Neto E, Donelson JE, et al. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitology research*. 2002;88(4):292-300.
83. Pais FS, DaRocha WD, Almeida RM, Leclercq SY, Penido ML, Fragoso SP, et al. Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*. 2008;10(7):716-25.
84. de Assis Burle-Caldas G. Papel de antígenos contendo repetições de aminoácidos na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: imunização com a proteína ribossômica TcRpl7a: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
85. Mattioly V, Bruna. Antígenos contendo repetições de aminoácidos como fatores de virulência na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: Universidade Federal de Minas gerais; 2014.
86. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1962;4(6):389-96.
87. Moser DR, Kirchhoff L, Donelson J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1989;27(7):1477-82.
88. Amu S, Gjerdtsson I, Brisslert M. Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scandinavian journal of immunology*. 2010;71(4):275-82.
89. Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins LV, Tarkowski A. Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. *Immunology*. 2006;117(4):548-57.
90. Kierszenbaum F, Moretti E, Szein M. *Trypanosoma cruzi* induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of interleukin-2 receptors by stimulated human B lymphocytes. *Immunology*. 1991;74(2):317.
91. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al., editors. *Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease*. *Seminars in immunopathology*; 2012: Springer.
92. Bustamante J, Tarleton R. Reaching for the Holy Grail: insights from infection/cure models on the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):445-51.

93. Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and infection*. 2012;14(15):1390-402.
94. Minoprio P, Coutinho A, Spinella S, Hontebeyrie-Joskowicz M. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *International Immunology*. 1991;3(5):427-33.
95. Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of Murine T *Cruzi* Infection: The Predominance of Parasite-nonspecific Responses and the Activation of TCRIT Cells. *Immunological reviews*. 1989;112(1):183-207.
96. Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(10):3671-5.
97. Dintzis R, Middleton M, Dintzis H. Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of T-independent antigens. *The Journal of Immunology*. 1983;131(5):2196-203.
98. Berglund L, Andrade J, Odeberg J, Uhlén M. The epitope space of the human proteome. *Protein Science*. 2008;17(4):606-13.
99. Casali P, Schettino E. Structure and function of natural antibodies. *Immunology of Silicones*: Springer; 1996. p. 167-79.
100. Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *The journal of immunology*. 2015;194(1):13-20.
101. Titus RG, Chiller JM. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *Journal of immunological methods*. 1981;45(1):65-78.
102. Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO reports*. 2007;8(12):1142-8.
103. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):5771-7.
104. Itoh K, Inoue T, Ito K, Hirohata S. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. *Cellular immunology*. 1994;157(2):478-88.
105. Shimabukuro-Vornhagen A, Kondo E, Liebig T, von Bergwelt-Baildon M. Activated human B cells: stimulatory or tolerogenic antigen-presenting cells? *Blood*. 2009;114(3):746-7.