

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Júlia Teixeira de Castro

**DESENVOLVIMENTO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA E ANÁLISE DE SEU
POTENCIAL VACINAL CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte
2020

Júlia Teixeira de Castro

**DESENVOLVIMENTO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA E ANÁLISE DE SEU
POTENCIAL VACINAL CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Trypanosoma cruzi***

Versão Final

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.

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Coorientadora: Dr^a. Natália Satchiko Hojo de Souza

Belo Horizonte

2020

043 Castro, Júlia Teixeira de.
Desenvolvimento de proteína quimérica e análise de seu potencial vacinal contra infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Júlia Teixeira de Castro. – 2020.
48 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli. Coorientadora: Dra. Natália Satchiko Hojo de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Doença de Chagas. 4. Vacinas. 5. Proteínas Recombinantes. I. Gazzinelli, Ricardo Tostes. II. Souza, Natália Satchiko Hojo de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



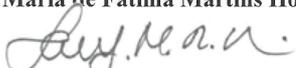
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

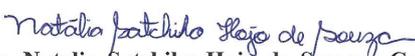
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIA TEIXEIRA DE CASTRO. Aos cinco dias do mês de fevereiro de 2020 às 14:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Desenvolvimento de proteína quimérica e análise de seu potencial vacinal contra infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*""", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Natalia Satchiko Hojo de Souza - Coorientadora (Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ), aprovada; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de fevereiro de 2020.


 Dr. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)


 Dr. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (UFMG)


 Dr. Natalia Satchiko Hojo de Souza - Coorientadora (Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ)


 Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (UFMG)


 Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. Ricardo Gazzinelli, pela confiança depositada em mim, por tudo que tem me ensinado e por me ajudar a crescer como pessoa e como profissional.

À minha coorientadora, Dr^a Natália Satchiko, por toda dedicação direcionada a mim e a este trabalho, e por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia e do CT-Vacinas, pela ótima convivência, pelos conselhos e pelos auxílios nos experimentos.

À Ana, por me ajudar a manter a sanidade nas horas árduas, por comemorar minhas conquistas e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Ao Lucas, por me incentivar a seguir em frente e por tornar os problemas menores do que eles pareciam ser.

À minha família, pelo apoio emocional e por me dar a certeza de que nunca estarei só. Em especial à minha avó, por todo o amor e carinho, demonstrados principalmente na forma de saudade ao me pedir para “me livrar de todos os ratos e voltar para Viçosa”.

RESUMO

A doença de Chagas (DC), causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), ainda é responsável por cerca de 10 mil mortes por ano, principalmente de pacientes crônicos. Os tratamentos disponíveis acarretam diversos efeitos adversos e apresentam baixa eficácia durante a fase crônica da doença. Diante disso, o desenvolvimento de uma vacina profilática e terapêutica para DC é extremamente importante. Estudos demonstraram o efeito protetor das proteínas *Trans-Sialidase* (TS) e *Amastigote Surface Protein – 2* (ASP-2) como antígenos vacinais. Neste trabalho, foi desenvolvida uma proteína quimérica, denominada DTT-1, contendo epítomos de ambas as proteínas, preditos como ligantes ao HLA (*Human Leucocyte Antigen*)-ABC. Com o objetivo de avaliar o potencial vacinal de DTT-1, camundongos C57BL/6 foram imunizados com três doses contendo 10 µg de DTT-1 associada de dois adjuvantes diferentes: CpG + Alumen ou Poly (I:C). Para fins comparativos, grupos de camundongos também foram vacinados com as regiões de TS ou ASP-2 presentes em DTT-1 (rTS e r-ASP-2). Trinta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com a cepa Y de *T. cruzi*. Os resultados demonstraram que a imunização com DTT-1 induziu a secreção de IFN-γ e IL-10 por esplenócitos após estimulação *in vitro* com rTS e rASP-2. Também foi observado que DTT-1 foi capaz de induzir a produção de IgG total, IgG1 e IgG2c antígeno-específicos. Além disso, a proteína quimérica recombinante gerou uma resposta anti-*T. cruzi* significativa, demonstrada pela diminuição da parasitemia em comparação aos grupos controle. Com o objetivo de investigar se a imunização com DTT-1 geraria uma imunidade duradoura, camundongos foram desafiados com *T. cruzi* aos 30, 90 ou 180 dias após a última dose vacinal. Observou-se que animais imunizados com DTT-1 desenvolveram baixa parasitemia até 90 dias comparativamente aos controles, mas apresentaram um aumento da carga parasitária aos 180 dias após a imunização. Os resultados obtidos sugerem que DTT-1 é uma candidata potencial a vacina contra a doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Vacinas. Proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Chagas' disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) accounts for ~10,000 deaths each year, mostly chronic patients. The available treatments have several adverse effects and present low efficacy during the chronic phase of disease. Therefore, the development of a prophylactic and therapeutic vaccine for CD is extremely important. Studies have shown the protective effect of Trans-Sialidase (TS) and Amastigote Surface Protein-2 (ASP-2) as vaccine antigens. In this work, a chimeric protein, named DTT-1, containing predicted HLA (*Human Leucocyte Antigen*)-ABC binding epitopes of both proteins was developed. In order to assess the potential of DTT-1 as a vaccine, C57BL/6 mice were immunized with three doses containing 10 ug of DTT-1 associated with two different adjuvants: CpG + Alum or Poly (I:C). For comparison, there were also groups vaccinated with the TS or the ASP-2 regions contained in DTT-1 (rTS and rASP-2). Thirty days post the last immunization, the animals were challenged with *T. cruzi* Y strain. The data showed that the vaccination with DTT-1 induced the secretion of IFN- γ and IL-10 by splenocytes after *in vitro* stimulation with rTS and rASP-2. It was also observed that DTT-1 was able to induce the production of antigen-specific total IgG, IgG1 and IgG2c. Moreover, this recombinant chimeric protein generated a significant response anti-*T. cruzi*, demonstrated by a decrease in parasitemia compared with control groups. In order to investigate whether the vaccination with DTT-1 would generate long-lasting immunity, mice were challenged with *T. cruzi* at 30, 90 or 180 days post immunization. DTT-1-immunized mice were found to develop low parasitemia levels up to 90 days, but showed an increase in parasite load with 180 days after immunization. The results obtained suggest that DTT-1 is a potential vaccine candidate against Chagas' disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas' disease. Vaccines. Recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do parasito <i>T. cruzi</i>	13
Figura 2. Esquema ilustrando a construção da proteína quimérica	29
Figura 3. Confirmação da purificação das proteínas recombinantes	30
Figura 4. Linha do tempo experimental.....	30
Figura 5. Produção de citocinas em resposta à estimulação com as proteínas rTS e rASP-2 em animais imunizados.....	31
Figura 6. Resposta imune humoral em animais vacinados.	32
Figura 7. Parasitemia e sobrevivência dos animais vacinados e desafiados	34
Figura 8. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos sob estímulos específicos	35
Figura 9. Detecção de anticorpos no plasma de animais imunizados.....	36
Figura 10. Avaliação do efeito protetor e antiparasitário das imunizações.	37
Figura 11. Linha do tempo experimental.....	38
Figura 12. Avaliação da duração da resposta anti- <i>T. cruzi</i> induzida pela vacinação.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Ad	Adenovírus
AdβGal	Adenovírus Beta-Galactosidase
ASP-2	<i>Amastigote Surface Protein – 2</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPI	Dias Pós Desafio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IEDB	<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>
IFN-γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL- (10, 12, 17)	Interleucina-(10, 12, 17)
kDa	Kilodalton(s)
M	Molar
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
mm	Milímetro(s)
N	Normal
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
∅	Vazio

OD	<i>Optical Density</i>
ODN	Oligodesoxinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFU	<i>Plaque-Forming Unit</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SAPA	<i>Shed Acute Phase Antigen</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Th (1, 2)	<i>Type (1, 2) T Helper</i>
TLR (3, 9)	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
TS	Trans-Sialidase
v/v	volume/volume
WHO	World Health Organization
WT	<i>Wild Type</i>
μg	Micrograma(s)
μL	Microlitro(s)
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Doença de Chagas	11
1.1.2 Ciclo Biológico do Parasito <i>T. cruzi</i>	12
1.1.3 Formas Clínicas	13
1.1.4 Profilaxia e Tratamento	14
1.2 Resposta Imune contra Doença de Chagas	16
1.3 Antígenos e Formulações Vacinais	17
1.4 Vacinas Recombinantes	19
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Predição de Epítomos de TS e ASP-2 e Construção da Proteína Quimérica	23
4.2 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes	23
4.3 Animais Experimentais	24
4.4 Imunizações	25
4.4.1 Imunização com Proteínas Recombinantes	25
4.4.2 Imunização com DNA TS/ASP + Ad TS/ASP	25
4.5 Avaliação da Resposta Imune Celular Específica	26
4.6 Avaliação da Resposta Imune Humoral Específica	26
4.7 Desafio e Parasitemia	27
4.8 Análise Estatística.....	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Construção, Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes DTT-1, rTS e rASP-2	28
5.2 Análise do Potencial Imunogênico das Proteínas Recombinantes.....	30
5.2.1 Indução de Resposta Imune Celular	31
5.2.2 Indução de Resposta Imune Humoral	32
5.2.3 Potencial Vacinal de DTT-1.....	33
5.3 Comparação de Adjuvantes.....	34
5.3.1 Indução de Resposta Imune Celular	34
5.3.2 Indução de Resposta Imune Humoral.....	35
5.3.3 Comparação do Potencial Vacinal na DTT-1 Associada a Diferentes Adjuvantes	36
5.4 Avaliação da Proteção de Longa Duração Induzida pela DTT-1 e Comparação com Formulação de Plasmídeo e Adenovírus	37
5.4.1 Proteção de Longa Duração	38
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanosomíase Americana, é uma das doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e acomete principalmente populações de baixa renda na América Latina, constituindo-se em grave problema de saúde pública (WHO, 2010).

O agente etiológico da doença de Chagas humana é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) pertencente à família Trypanosomatidae, que também pode infectar animais domésticos e principalmente silvestres, sendo transmitido por mais de 150 espécies de insetos hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae. A transmissão ocorre principalmente pelos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (COURA e VIÑAS, 2010). A via principal de contaminação é através do contato com fezes de triatomíneos infectados, que defecam após sugar o sangue do hospedeiro. Outros modos de transmissão incluem transfusão de sangue infectado pelo parasito, transmissão oral por alimentos contaminados, transmissão vertical (da mãe para o feto – transmissão congênita), transplante de órgãos ou acidentes em laboratório (WHO, 2015; DIAS *et al.*, 2016). No Brasil, relatos de transmissão oral ocorreram principalmente na região amazônica, por ingestão de alimentos/sucos contaminados (DIAS *et al.*, 2016).

A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina continental (Argentina, Belize, Venezuela, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Bolívia, Suriname e Uruguai), estendendo-se do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile (PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2017). Contudo, ocorrências em países não-endêmicos tem sido identificadas, principalmente devido a processos migratórios (LESCURE *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2016).

Embora tenha ocorrido progresso significativo no controle vetorial e transfusional da doença de Chagas na América Latina, com redução estimada de 20 milhões de pessoas infectadas em 1981 para 10 milhões em 2009, a doença ainda é considerada um problema de saúde pública a ser superado, visto que impacta negativamente a economia e a vida social da população afetada, além de causar

cerca de 10 mil mortes por ano (WHO, 2010; BERN, 2015). Atualmente estima-se que existam 6-7 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* (WHO, 2017). No Brasil, estimativas recentes apontam para 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo parasito (DIAS *et al.*, 2016).

1.1.2 Ciclo Biológico do Parasito *T. cruzi*

A doença de Chagas é uma antropozoonose (zoonose primária em animais que pode ser transmitida ao homem) cujo agente etiológico é o parasito *T. cruzi*. O parasito apresenta um ciclo biológico heteroxênico, visto que parte de seu desenvolvimento ocorre no triatomíneo (inseto vetor), e parte no mamífero (hospedeiro vertebrado). De acordo com Noireau *et al.* (2009), existem mais de 180 espécies de mamíferos que podem ser infectadas pelo *T. cruzi*, incluindo o homem.

O ciclo no inseto vetor (triatomíneo) inicia com a ingestão de tripomastigotas circulantes durante repasto sanguíneo. Os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do inseto, se replicam extracelularmente por divisão binária e seguem para a porção final do intestino e para o reto. Nesse local, epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas (forma infectante para vertebrados) que são eliminadas nas fezes do triatomíneo (**Figura 1**). Dessa forma, durante o repasto sanguíneo, tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro vertebrado através do local da picada ou de uma membrana mucosa intacta, como a conjuntiva. No hospedeiro, tripomastigotas metacíclicos infectam células do sistema mononuclear fagocitário e teciduais próximas ao sítio de inoculação, abrigoando-se no vacúolo parasitóforo que se funde aos lisossomos, dando origem ao fagolisossomo. A acidificação desse compartimento permite que tripomastigotas escapem para o citosol da célula infectada, onde se diferenciam em formas amastigotas, se multiplicam por divisão binária, se diferenciam em tripomastigotas e são liberados para o sangue como tripomastigotas circulantes (forma não-replicativa). Esses, por sua vez, infectam células de vários tecidos onde se transformam em amastigotas intracelulares e replicam a uma taxa de duplicação de cerca de 12 horas num período de quatro a cinco dias. Desta forma, tripomastigotas circulantes podem invadir outras células e iniciar novos ciclos replicativos ou infectarem o inseto vetor que se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo de transmissão. Na fase aguda da infecção

a parasitemia é mais elevada e após ativação eficiente da resposta imune do hospedeiro vertebrado, há redução da parasitemia e a infecção se torna crônica. (BERN, 2015; CARDOSO *et al.*, 2016).

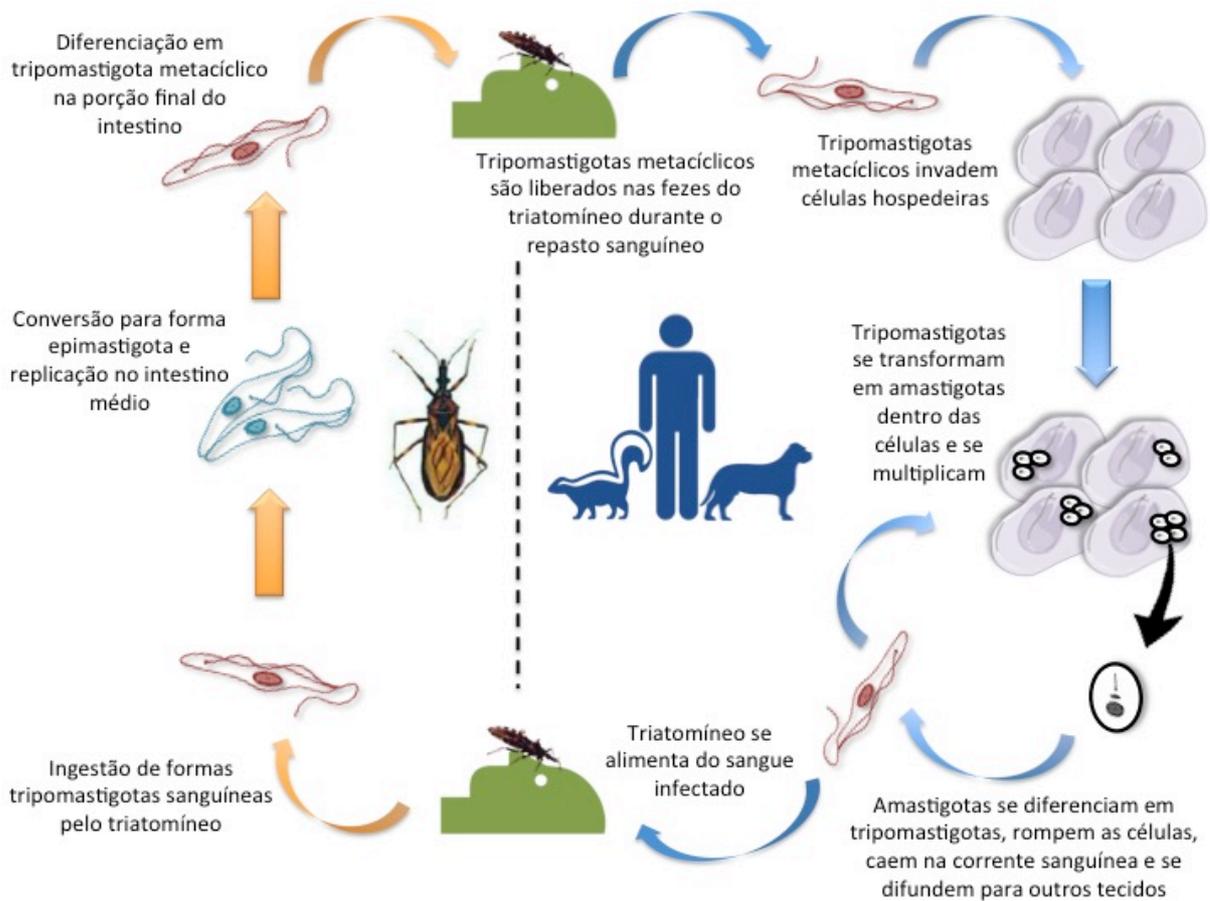


Figura 1. Ciclo biológico do parasito *T. cruzi*. Desenho esquemático representativo do ciclo heteroxênico do *T. cruzi*. Do lado esquerdo da figura é possível observar o ciclo no inseto vetor (triatomíneo) e do lado direito, no hospedeiro vertebrado (mamífero).

1.1.3 Formas Clínicas

O curso clínico da doença de Chagas caracteriza-se por duas fases: aguda e crônica. Após uma a duas semanas da transmissão vetorial (período de incubação) inicia-se a fase aguda da doença, com duração de quatro a oito semanas, que é caracterizada por sintomas inespecíficos como febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia, linfocitose atípica e parasitemia detectável microscopicamente. Na maior parte dos casos, esta fase é assintomática ou oligossintomática. No entanto, pode ocorrer o aparecimento de nódulo de pele

(chagoma) ou edema de pálpebra unilateral (sinal de Romaña), indicando o local de inoculação do parasito (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

A fase aguda da doença de Chagas se resolve espontaneamente, com redução da parasitemia e parasitismo tecidual, e a maioria das pessoas infectadas não desenvolve sintomas de doença crônica. Uma parcela dos pacientes (20 a 30%) pode apresentar evolução para a fase crônica com manifestações cardíacas ou viscerais, caso a doença não seja diagnosticada e tratada adequadamente com medicamentos antiparasitários como benznidazol (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RASSI JR *et al.*, 2010; WHO, 2015; BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2017).

A fase crônica da doença de Chagas, que pode se estender por anos ou décadas, se manifesta em diferentes formas clínicas: indeterminada ou assintomática, forma mais frequente; cardíaca, que ocorre em cerca de 30% dos pacientes; digestiva, com a ocorrência de megaesôfago e/ou megacólon; e cardiodigestiva, uma forma mista que afeta coração e tubo digestivo, com ocorrência em aproximadamente 10% dos pacientes infectados por *T. cruzi* (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; COURA e BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI JR *et al.*, 2010).

Devido à frequência e gravidade do quadro clínico, a forma cardíaca crônica mostra-se mais preocupante. A manifestação clínica, que ocorre geralmente após 5 a 15 anos da infecção inicial, caracteriza-se sobretudo por arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueio de condução elétrica cardíaca e tromboembolismo. Por outro lado, na forma digestiva crônica as manifestações clínicas são decorrentes de disperistalse (movimentos peristálticos dificultados) do esôfago e do cólon devido a destruição do plexo mioentérico e desenvolvimento de megaesôfago e megacólon (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

Essa variação na evolução clínica da doença ainda não é totalmente esclarecida, mas possivelmente fatores como linhagem do parasito, tropismo tecidual, carga parasitária, tempo de infecção, natureza da resposta imune, entre outros, podem estar envolvidos no processo (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

1.1.4 Profilaxia e Tratamento

Existem três níveis de prevenção contra a doença de Chagas, conforme descrito por Rassi Jr *et al.* (2009): O nível primário consiste em prevenir a

transmissão da doença, através do controle do vetor, de transfusões sanguíneas, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais. O nível secundário tem como alvo tratar a população que possui a doença em fase aguda e/ou assintomática, com a finalidade de erradicá-la. O nível terciário tem como objetivo prevenir a morbidade e a mortalidade pela doença uma vez que esta já está instalada, normalmente em pacientes de fase crônica. Dentre essas medidas, as mais realizadas são o controle do vetor através de inseticidas, de atividades de educação sanitária para a comunidade e melhorias das habitações em áreas de risco, a fim de eliminar possíveis refúgios para os triatomíneos, como rachaduras em paredes de casas “pau a pique”. No caso de transmissão congênita, recomenda-se o tratamento precoce da criança, visto que os medicamentos existentes não são recomendados para gestantes (COURA e DIAS 2009; RASSI JR *et al.* 2010).

Os medicamentos existentes para o tratamento da doença de Chagas são benznidazol (Rochagan – laboratório Roche) e nifurtimox (Lapit – laboratório Bayer). Atualmente, benznidazol é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e distribuído pelo Ministério da Saúde, e é o medicamento de escolha disponível no Brasil. Nifurtimox é utilizado apenas em casos de intolerância ou não responsividade ao benznidazol. Ambos os medicamentos agem tanto na forma tripomastigota quanto na amastigota e são mais eficazes na fase aguda. (MANNE *et al.*, 2012; Ministério da Saúde, 2017)

A hipótese de que a doença de Chagas crônica era de origem autoimune levou à conduta de não tratar estes pacientes com benznidazol, sobretudo em função dos efeitos colaterais da medicação que são mais pronunciados em adultos do que em crianças. Entretanto, diversos estudos indicam que a persistência do parasito é a causa do processo patogênico e identificaram melhora na evolução clínica e sorológica (soroconversão negativa) de pacientes crônicos tratados com benznidazol em comparação a aqueles não-tratados (VIOTTI *et al.*, 2014). Por outro lado, um estudo mostrou que a eficácia do benznidazol na fase aguda da doença de Chagas é de 70-80% (avaliada por sorologia negativa), e de apenas 8% na fase crônica (CANÇADO, 2002). Um estudo prospectivo recente mostrou que tratamento com benznidazol de pacientes com cardiomiopatia chagásica estabelecida reduziu significativamente a detecção de parasitos circulantes, mas não a progressão da

doença (MORILLO et al., 2015). Portanto, o uso desse medicamento na fase crônica ainda é discutível.

Além disso, as reações adversas são muitas e o tratamento pode durar até 90 dias. Benznidazol causa dermatite alérgica em cerca de 30% dos pacientes, e também pode gerar náuseas, vômitos, anorexia, perda de peso, insônia e perda de apetite. Nifurtimox é responsável por sintomas gastrointestinais em 50% dos pacientes, incluindo anorexia, desconforto abdominal e diarreia. Também pode causar insônia, irritabilidade e desorientação. Em raros casos, ocasiona polineuropatia, parestesias e mialgias. (CALDAS et al. 2014; RASSI JR et al. 2010).

1.2 Resposta Imune contra Doença de Chagas

Na fase aguda da doença de Chagas, o sistema imune inato desempenha papel importante na infecção, controlando a replicação e disseminação do parasito para tecidos. As citocinas IL-12 e TNF- α , produzidas por macrófagos e células dendríticas (DCs), induzem a secreção de IFN- γ por células *Natural Killer* (NK) e favorecem a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th1. Citocinas produzidas por esses tipos celulares (principalmente IFN- γ), por sua vez, estimulam macrófagos a produzir principalmente óxido nítrico (NO), controlando desta forma a replicação do parasito. Entretanto, excessiva ativação da resposta imune inata na infecção por *T. cruzi* pode levar a miocardite, efeito prejudicial para o hospedeiro. A secreção de IFN- γ também é responsável por estimular linfócitos B a produzirem anticorpos IgG, que promovem a lise do parasito ou facilitam a fagocitose por macrófagos através da opsonização (GOLGHER e GAZZINELLI, 2004; JUNQUEIRA et al., 2010). IgG1 é a subclasse mais abundante, e sua produção por linfócitos B pode ser estimulada por antígenos solúveis e por IL-4, citocina assinatura de uma resposta do tipo Th2 (SNAPPER e PAUL, 1987). Em contrapartida, a produção de IgG2 é inibida por IL-4 e induzida por IFN- γ , apresentando, então, um perfil de resposta do tipo Th1 (STEVENS et al., 1988).

Adicionalmente, células do sistema imune inato também ativam células T CD8⁺. Logo após a entrada do *T. cruzi* na célula alvo, há a formação do vacúolo parasitóforo lisossomo-*like*. Entretanto, o parasito é capaz de escapar para o citosol, onde se diferencia na forma amastigota e inicia a replicação, favorecendo o processamento e apresentação de antígeno pelo complexo de histocompatibilidade

principal classe I (MHC-I) e a indução de forte resposta de linfócitos T CD8⁺. Essa resposta é característica de hospedeiro vertebrado infectado por *T. cruzi* (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Entretanto, essas células T CD8⁺ induzidas reconhecem apenas alguns antígenos (imunodominância) e é possível que este fato explique a evasão à resposta imune, levando à persistência do parasito (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

Durante a fase crônica, acredita-se que o principal determinante da progressão de doença cardíaca seja a inflamação (produção de IFN- γ e TNF- α , e citotoxicidade de células T CD8⁺), além da virulência da cepa e tropismo tecidual. Na forma indeterminada, possivelmente há predominância de uma resposta imunorreguladora, caracterizada sobretudo pela produção de citocinas como IL-10 e IL-17 (SOUSA *et al.*, 2017; PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2017).

1.3 Antígenos e Formulações Vacinais

Em relação ao desenvolvimento de vacinas, estudos demonstram que vacinas de DNA são capazes de induzir imunidade protetora contra infecção experimental por *T. cruzi*. Conhecido como regime *prime-boost* heterólogo, essa estratégia utiliza dois vetores diferentes, um plasmidial e outro viral, ambos carregando o mesmo gene que codifica a proteína antigênica para imunização inicial (*prime*) e reforço (*boost*). (ALENCAR *et al.*, 2009; HAOLLA *et al.*, 2009; RIGATO *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Considerando que o parasito *T. cruzi* é capaz de invadir diversos tipos de células, tais como miócitos, adipócitos, células epiteliais, fibroblastos e macrófagos que podem processar proteínas do parasito para apresentação por moléculas de MHC classe I, a forte resposta de células T CD8⁺ específicas de antígeno são de particular importância na doença de Chagas (PADILLA *et al.*, 2009). Embora não sejam capazes de promover imunidade estéril, participam ativamente no controle da infecção. (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Diversas iniciativas têm investigado a possibilidade de vacinas profiláticas e terapêuticas contra a doença de Chagas. Vários estudos têm descrito extensivamente a superfamília gênica das *trans-sialidases* de *T. cruzi* e o potencial antigênico de algumas de suas proteínas. (SCHENKMAN *et al.*, 1994; LOW e TARLETON, 1997; WIZEL *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2011). Duas delas vêm

sendo amplamente testadas como antígenos vacinais em camundongos: *Trans-Sialidase* (TS) e *Amastigote Surface Protein-2* (ASP-2).

TS está presente principalmente na membrana de tripomastigotas, estágio extracelular do parasito, e possui em sua porção C-terminal uma região repetitiva (SAPA) que induz uma intensa produção de anticorpos por linfócitos B (SCHENKMAN *et al.*, 1992; AFFRANCHINO *et al.*, 1989). ASP-2 é tipicamente encontrada na membrana de amastigotas, forma intracelular de *T. cruzi*. Em modelo murino, a imunização com plasmídeos que contêm a sequência codificadora de ASP-2 é capaz de induzir uma potente resposta imune celular, levando à produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e T CD8⁺ (VASCONCELOS *et al.*, 2004).

O protocolo vacinal de maior eficácia até o momento, testado em camundongos, utiliza um *prime* de plasmídeos que possuem os genes de TS e ASP-2 e um *boost* de adenovírus tipo 5 (Ad5) que também codificam estas proteínas (DNA TS/ASP + Ad TS/ASP). Foi demonstrado que esta imunização é capaz de proteger não só camundongos resistentes (C57BL/6), mas também os mais susceptíveis (A/Sn) à infecção com cepa Y de *T. cruzi*. A vacina também proporcionou resultados satisfatórios em modelos experimentais crônicos, em que os animais foram desafiados com as cepas miotrópicas Brazil e Colombiana (VASCONCELOS *et al.*, 2004; MACHADO *et al.* 2006; ALENCAR *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2014).

Apesar de vacinas de DNA potencialmente imunogênicas e induzirem fortemente uma resposta celular, sua aplicação ainda está em debate. A agência federal estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) expõe em seu guia "*Points To Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications*" (1996, atualizado em 2007) algumas considerações que devem ser feitas pelos desenvolvedores de vacinas. O relatório descreve a possibilidade da geração de autoanticorpos, que poderia levar a uma doença autoimune; a indução de tolerância imunológica ao invés de imunogenicidade; e o risco da integração do DNA plasmidial no genoma das células hospedeiras, aumentando a chance de carcinogênese (KLINMAN *et al.*, 1997; MOR *et al.*, 1997; KLINMAN *et al.*, 2000).

Quanto aos vetores virais, existe a preocupação com a possibilidade de reversão da virulência, principalmente através da recombinação gênica entre o vírus

selvagem e sua versão atenuada (CONDIT *et al.*, 2016). Outro fator a ser considerado é a pré-existência de imunidade ao vetor, que anula o efeito vacinal, como foi relatado no ensaio clínico de uma vacina contra HIV que utiliza o Ad5 (“STEP” *trial*, 2005). Nesse estudo, foi observado que os indivíduos detentores de altos títulos de anticorpos contra Ad5 tiveram uma maior incidência de infecção por HIV, quando comparado com o grupo placebo (GRAY *et al.*, 2010).

1.4 Vacinas Recombinantes

Com o objetivo de minimizar os problemas citados anteriormente, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas a partir de proteínas antigênicas recombinantes. Para isso, utiliza-se a técnica de DNA recombinante, que consiste na inserção do gene de interesse em um sistema de expressão como bactérias, fungos, células de inseto ou de mamíferos. Estes, por sua vez, são induzidos a expressar a proteína de origem exógena, que em seguida é purificada para uso (FRANCIS, 2017).

Pela facilidade de manuseio, alto rendimento, crescimento rápido e cultivo simples e de baixo custo, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é um dos sistemas de expressão mais empregados na produção de proteínas recombinantes, inclusive por indústrias farmacêuticas. No mercado existem exemplos como insulina (produzida pela *Eli Lilly* e *Aventis*) hormônio do crescimento (fabricado por *Genentech*, *Eli Lilly*, *Pfizer* e *Novo Nordisk*), interleucina-2 (produzida pela *Chiron*) (TRIPATHI, 2016).

Além disso, também já existem vacinas de proteínas recombinantes que são comercializadas, como a Recombivax® (Merck, EUA) e a Engerix® (*SmithKline Biologicals*, Bélgica), ambas contra a Hepatite B. As proteínas do envelope viral são geradas num sistema de expressão que utiliza células de fungo (MICHEL e TIOLLAIS, 2010).

Como as proteínas recombinantes não possuem um repertório antigênico tão extenso, visto que são apenas subunidades do patógeno original, elas não são capazes de induzir uma resposta imune extremamente eficaz. Para aumentar a robustez da resposta, são acrescentados adjuvantes às formulações vacinais. Essas substâncias são altamente indutoras de células do sistema imune inato que, por sua vez, irão auxiliar na ativação e na polarização do sistema imune adaptativo (BASTOLA *et al.*, 2015).

Neste estudo, foram utilizadas duas composições de adjuvantes: CpG + Alumen e Poly (I:C). Os oligodesoxinucleotídeos CpG (CpG ODN), ricos em citosina e guanina, são reconhecidos pelo receptor do tipo toll 9 (TLR9), presente em células do sistema imune inato (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008; KUMAGAI *et al.*, 2008). O Poly (I:C) é um análogo ao RNA de dupla fita (dsRNA) viral, reconhecido por TLR3 (TAMURA e SASAKAWA,1983). A ativação de TLRs, principalmente em células dendríticas, leva à produção de IL-12, que influencia na polarização de linfócitos T CD4⁺ em Th1. Estas células, por sua vez, secretam IFN- γ , citocina responsável pela manutenção da resposta do tipo Th1, pela ativação de macrófagos e linfócitos T CD8⁺ e pela produção de anticorpos IgG (especialmente a subclasse IgG2) por linfócitos B (JUNQUEIRA *et al.*, 2012). Já o Alumen, além de ser um bom agente adsorvente, estimula a resposta do tipo Th2 e a ativação de linfócitos B, levando à produção de anticorpos (GRUN e MAURER, 1989).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da implementação de sistemas de controle e prevenção da doença de Chagas, ainda existem diversos obstáculos para sua erradicação. Nesse contexto, a produção de uma vacina seria o ideal, visto que este é o método mais eficaz no controle de doenças infecciosas depois da água potável, considerada um direito humano básico. Contudo, mesmo diante dos importantes avanços no conhecimento sobre a doença, desde sua caracterização há mais de um século por Carlos Chagas, o desenvolvimento de uma vacina continua sendo um desafio. Isto se deve principalmente à complexidade do genoma de *Trypanosoma cruzi* e pelas incertezas acerca da patofisiologia da doença, cujas principais hipóteses são a geração de autoimunidade e a permanência do parasito no tecido. Enquanto a ausência de uma vacina efetiva persiste, surgem cerca de 50.000 novos casos anualmente. Em termos econômicos, na América Latina a doença é responsável pela perda de aproximadamente 750.000 anos de vida produtiva e de 1,2 bilhões de dólares por ano. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina seria benéfico tanto para a saúde pública quanto para a economia. Foi demonstrado, inclusive, que mesmo uma vacina com eficácia de apenas 25%, custando U\$5,00 por pessoa, já economizaria U\$5,99 para uma região com 5% de incidência de infecção.

Além disso, como já relatado, os medicamentos existentes contra doença de Chagas provocam diversos efeitos adversos e são muito pouco eficazes na fase crônica. Sendo assim, o desenvolvimento de novas terapias, mais eficientes e menos tóxicas, é mais uma questão a ser solucionada. Apesar da proposta deste trabalho ser uma vacina profilática, é possível que futuramente esta mesma formulação seja testada como uma vacina terapêutica.

Considerando que vacinas utilizando vetores plasmidiais e virais potencialmente podem gerar reações adversas, tais como autoimunidade, tolerância imunológica, recombinação do DNA plasmidial com DNA do hospedeiro, reversão de virulência ou mesmo pré-imunidade ao vetor viral, novas estratégias vacinais vêm sendo empregadas. Nesse sentido, a construção de proteínas quiméricas contendo epítomos imunogênicos conhecidos tem se tornado uma alternativa que pode render uma vacina mais segura e eficaz.

3 OBJETIVOS

Geral

Desenvolver uma proteína recombinante quimérica (DTT-1) contendo regiões imunogênicas de *Trans-Sialidase* (TS) e *Amastigote Surface Protein – 2* (ASP-2) e avaliar seu potencial vacinal contra a infecção por *T. cruzi* em modelo murino.

Específicos

- Realizar predição de epítomos das proteínas TS e ASP-2 para os diferentes HLAs da população;
- Gerar uma proteína quimérica (DTT-1) a partir da junção de regiões imunogênicas de TS e ASP-2;
- Expressar a proteína quimérica em *E. coli* e purificá-la;
- Verificar a resposta imune celular e humoral desenvolvida por camundongos imunizados com diferentes formulações contendo TS e ASP-2;
- Avaliar o potencial vacinal de DTT-1 em camundongos C57BL/6;
- Avaliar a duração da resposta imune desenvolvida por animais imunizados com diferentes formulações contendo TS e ASP-2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Predição de Epítomos de TS e ASP-2 e Construção da Proteína Quimérica

Para a predição de epítomos foram utilizados três *softwares* diferentes: SYFPEITHI, Bimas e *The Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB). Utilizando as sequências de TS (acesso NW_001849266) e ASP-2 (acesso AAC47720), foi realizada a busca de epítomos contendo 10 aminoácidos para todos os alelos de HLA-ABC disponíveis em pelo menos dois dos programas.

Após a identificação dos epítomos nas sequências de TS e ASP-2, foi possível reconhecer as regiões mais imunogênicas das proteínas. Estas, por sua vez, foram unidas em uma única sequência, dando origem à proteína quimérica chamada DTT-1.

4.2 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes

Para um melhor entendimento do potencial imunogênico das sequências selecionadas de TS e ASP-2, além da proteína quimérica (DTT-1), também foram geradas proteínas recombinantes contendo apenas as regiões de TS e ASP-2, presentes na DTT-1.

Para isso, os genes codificadores das proteínas foram adquiridos comercialmente, clonados em plasmídeos de expressão pET-21a (Genscript). Esse plasmídeo confere resistência a canamicina e é constituído pelo promotor do fago T7 (pT7) e um operador lac, responsáveis pelo controle da expressão gênica após a indução com IPTG. Adjacente ao códon de parada foi solicitada a inclusão de sequência codificadora de seis histidinas para purificação da proteína por cromatografia de afinidade.

Em seguida, bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com as construções pET-21a_rTS, pET-21a_rASP-2 ou pET-21a_DTT-1, e cultivadas em meio LB com 50 µg/mL de canamicina a 37°C sob agitação a 200 rpm. A expressão das proteínas foi induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura para uma concentração final de 0,5 mM quando a D.O. 0.6 a 600 nm foi atingida. A fim de encontrar o melhor nível de expressão e solubilidade das proteínas, diferentes

temperaturas e tempos de cultivo foram analisados: 37°C por três horas e 18°C *overnight*. Em ambas as condições avaliadas, as três proteínas recombinantes apresentaram rendimentos semelhantes e estavam presentes na fração insolúvel da solução. Dessa forma, a condição de cultivo foi padronizada na temperatura de 37°C por três horas.

Posteriormente, os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 5 mM de benzamidina e 1 mM de PMSF) e a lise das células feita no homogeneizador Emulsiflex-C3. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 40.000 *g* por 30 min, e os corpos de inclusão (encontrados no *pellet*) foram solubilizados em 8M de ureia.

As proteínas foram então purificadas por cromatografia de afinidade em coluna carregada com níquel (HisTrap HP GE) no sistema Akta *prime* (GE). Foi aplicado um fluxo de 3 mL/min pela coluna e gradiente de eluição de 0 a 100% de tampão de eluição (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 500 mM de Imidazol) em 50 mL. Os demais passos da purificação foram realizados conforme instruções do fabricante da coluna.

As frações da purificação referentes ao pico de eluição do cromatograma foram analisadas em gel SDS-PAGE e por *western blot* com anticorpo anti-histidina para verificar degradação das proteínas após a purificação. As frações contendo as proteínas com maior nível de pureza foram reunidas e quantificadas com o 2-D quant kit (GE), conforme instruções do fabricante.

4.3 Animais Experimentais

No presente estudo, foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 *Wild Type* (WT) com idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFMG e mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Instituto René Rachou (Fiocruz, Belo Horizonte). Todos os experimentos foram conduzidos seguindo-se os princípios de conduta do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (protocolo LW 02/19).

4.4 Imunizações

4.4.1 Imunização com Proteínas Recombinantes

Os camundongos receberam três doses iguais, com 21 dias de intervalo, constituídas por 10 µg de proteína (rTS, rASP-2 ou DTT-1) associada aos adjuvantes Poly (I:C) (50µg por dose) ou CpG + Alumen (18µg e 30% v/v, respectivamente). A administração foi feita por via subcutânea, na região dorsal, num volume final de 100µL. Foram utilizados grupos controles de imunização que receberam três doses contendo apenas os adjuvantes Poly (I:C) ou CpG + Alumen. Além disso, também foi utilizado um grupo de animais controle experimental no qual foi administrado PBS

O CpG ODN utilizado, denominado CpG B344, é derivado do genoma de *T. cruzi* e possui a sequência nucleotídica TCGACGTTTGGATCGGT. O Alumen possui hidróxido de alumínio em sua composição e foi adquirido comercialmente (*Rehydrigel L.V. Solution - Reheis, Berkeley Heights, NJ*).

4.4.2 Imunização com DNA TS/ASP + Ad TS/ASP

Realizou-se a administração de um *prime* contendo 50 µg de plgSPC19 (plasmídeo que possui o gene de ASP-2) e 50 µg de p154/13 (plasmídeo construído com o gene de TS). O reforço (*boost*), que consiste em uma dose com 10⁸ PFU de AdASP-2 (adenovírus tipo 5 contendo inserção do gene de ASP-2) e 10⁸ PFU de AdTS (adenovírus tipo 5 que possui o gene de TS), foi realizado 21 dias depois. O grupo controle recebeu 100 µg de pcDNA3 - DNAØ (plasmídeo original, sem inserções) e 2 x 10⁸ PFU de AdβGal (adenovírus tipo 5 que possui o gene da β-galactosidase). As administrações foram feitas por via intramuscular, no músculo tibial anterior. Os plasmídeos e adenovírus utilizados na imunização dos animais foram gentilmente cedidos pelo Dr. José Ronnie Carvalho de Vasconcelos da Universidade Federal de São Paulo. Também foi utilizado um grupo de animais como controle experimental, que receberam PBS ao invés das formulações de imunização.

4.5 Avaliação da Resposta Imune Celular Específica

Os camundongos que foram imunizados, mas que não receberam o desafio, foram eutanasiados 30 dias após a última dose vacinal, para avaliação da eficácia da vacinação. Coletou-se o baço desses animais para a obtenção dos esplenócitos. As células obtidas foram incubadas com solução de lise de eritrócitos (*Ammonium-Chloride-Potassium* – ACK), lavadas com meio RPMI 1640 contendo 1% de antibiótico e contadas. Em seguida os esplenócitos isolados foram plaqueados em placas de 96 poços (1×10^6 células por poço) e estimulados por 48 horas com as proteínas rTS, rASP-2 ou DTT-1, na concentração de 10 µg/mL. Como controles negativos e positivos, foram utilizados RPMI e Concanavalina A (5 µg/mL), respectivamente. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas para coleta do sobrenadante, o qual foi armazenado a -20°C. Posteriormente, os níveis de IFN-γ e IL-10 no sobrenadante foram avaliados utilizando-se a técnica de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), seguindo-se as instruções do fabricante (*Mouse IFN-γ DuoSet ELISA e Mouse IL-10 DuoSet ELISA, R&D Systems*). As amostras foram avaliadas em duplicata e a leitura da reação colorimétrica foi realizada em leitor de microplacas a 450nm.

4.6 Avaliação da Resposta Imune Humoral Específica

Amostras de sangue dos animais foram coletadas pelo plexo orbital 30 dias após o desafio com *T. cruzi* para avaliação da presença de anticorpos específicos. Para tanto, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min para separação do plasma. O plasma obtido foi coletado e armazenado a -20°C. Posteriormente, uma placa de 96 poços foi sensibilizada com rTS ou rASP-2 (1 µg/mL) e incubada *overnight* a 4°C. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS + 0,05% Tween 20 e bloqueada com 1% de leite por 2 horas em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a placa foi novamente lavada e as amostras de plasma foram adicionadas, em duplicata, na diluição 1:400 (diluídas em solução de bloqueio). As amostras de plasma foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sendo a placa novamente lavada após a incubação. Em seguida, foi feita a incubação com anticorpos secundários anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2c conjugados com estreptavidina-HRP (diluição 1:5000) por 1 hora em temperatura ambiente. A placa

foi novamente lavada para a remoção do excesso de anticorpo secundário, sendo em seguida, adicionada a solução substrato, composta por Tetrametilbenzidina (TMB) (0,1 mg/mL) diluída em tampão citrato-fosfato na presença de H₂O₂. Por fim, adicionou-se a solução de parada (2N H₂SO₄), e a leitura da reação colorimétrica foi realizada em leitor de microplacas a 450nm.

4.7 Desafio e Parasitemia

O desafio dos animais foi realizado 30 dias após a última imunização, utilizando-se o inóculo de 10⁴ parasitos por animal, administrados intraperitonealmente num volume de 100 µL por animal. Formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas do sangue de camundongos com sete dias de infecção..

A parasitemia foi analisada durante 15 dias pós-desafio, por meio da visualização dos parasitos em microscópio óptico, seguindo-se método de Pizzi-Brener (1962). Para tanto, 5 µL de sangue é coletado da cauda do animal e colocado entre lâmina e lamínula (20 mm x 20 mm). Em seguida, faz-se a contagem do número de parasitos presentes em 50 campos aleatórios. Após a contagem, calcula-se o número total de parasitos por mililitro (mL), a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Parasitemia} = \text{n}^\circ \text{ de parasitos contados} \times \text{fator de correção do microscópio} \times 200 \text{ (para chegar-se a um valor de parasitos em 1 mL)}$$

4.8 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada por meio do programa *Prism* da GraphPad®. Inicialmente foi analisada a presença de *outliers*, utilizando-se o Teste de *Grubbs*. Em seguida, foi avaliado se a distribuição era paramétrica ou não, através do teste de *D'Agostino-Pearson*. Os dados que apresentaram distribuição normal foram aplicados os seguintes testes: Teste-t ou *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Bonferroni*. Já para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes de *Mann-Whitney* ou o teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste de *Dunn*. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Construção, Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes DTT-1, rTS e rASP-2

Utilizando os programas citados na metodologia, foi realizada a predição de epítomos das proteínas TS e ASP-2. Dos epítomos encontrados, foram selecionados os cinco melhores ranqueados para cada alelo de HLA-ABC, ou seja, os que possuíam a maior probabilidade de ligação ao MHC de classe I. Posteriormente, foi avaliada a frequência com que o mesmo peptídeo aparecia entre os cinco melhores diante de todos os alelos de HLA analisados, em busca de epítomos imunodominantes. Os peptídeos foram destacados por cores na sequência de aminoácidos das proteínas, de acordo com sua frequência.

Dessa maneira, foi possível detectar regiões potencialmente imunogênicas em ambas as proteínas. A sequência da proteína quimérica, chamada DTT-1, foi definida unindo-se a regiões de interesse de TS e ASP-2. Além disso, foram incluídos na sequência peptídeos de TS e ASP-2 que são comprovadamente imunogênicos para alelos de MHC de camundongo (H2-K^b e H2-K^d), de acordo com diversos trabalhos encontrados na literatura. Por último, também foram adicionadas três repetições SAPA, presentes na proteína TS. O desenho esquemático da construção de DTT-1 é apresentado na **Figura 2**.

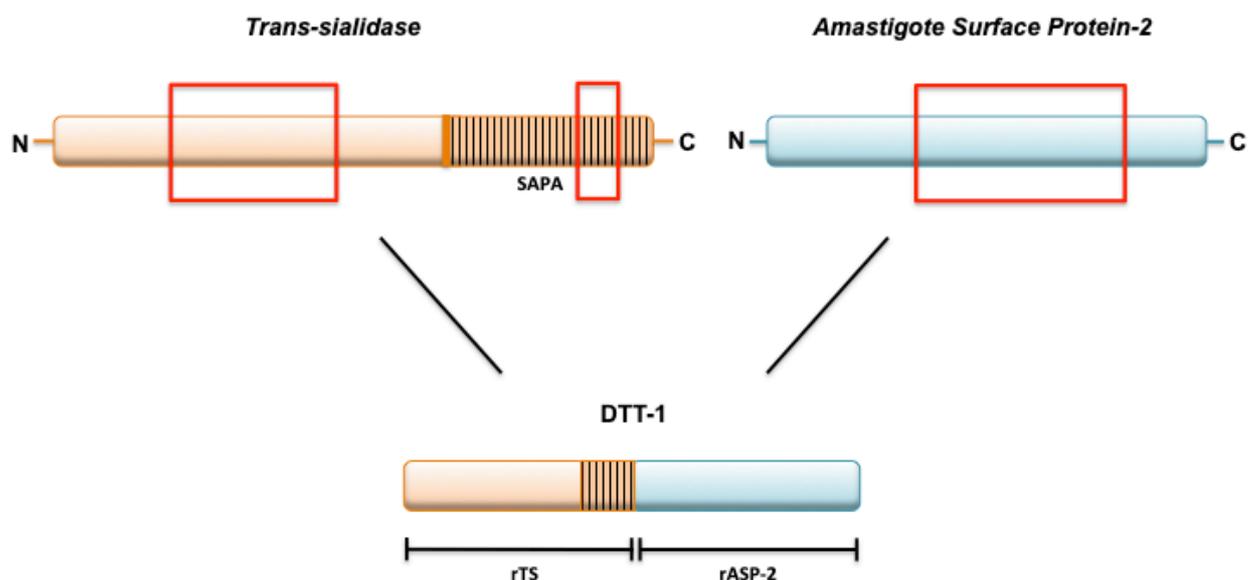


Figura 2. Esquema ilustrando a construção da proteína quimérica. Foram selecionadas regiões imunogênicas de TS e ASP-2, e suas seqüências unidas deram origem à proteína DTT-1.

Em seguida, foram adquiridos três plasmídeos sintéticos: pET-21a_rTS, pET-21a_rASP-2 e pET-21a_DTT-1. Conforme já descrito, bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com uma dessas construções e, em seguida, foram induzidas à produção das proteínas de interesse.

Após a expressão em *E. coli*, as três proteínas (rTS, rASP-2 e DTT-1) foram purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando-se colunas carregadas com níquel. Para confirmar a pureza das amostras, alíquotas das frações eluídas foram avaliadas em géis SDS-PAGE. Na **Figura 3**, é possível observar que as bandas de maior intensidade são correspondentes ao peso molecular aproximado das proteínas: rTS \cong 32 kDa (**A**), rASP-2 \cong 30 kDa (**B**) e DTT-1 \cong 62 kDa (**C**). Concluiu-se, portanto, que as amostras estavam adequadas para serem utilizadas em experimentos com animais.

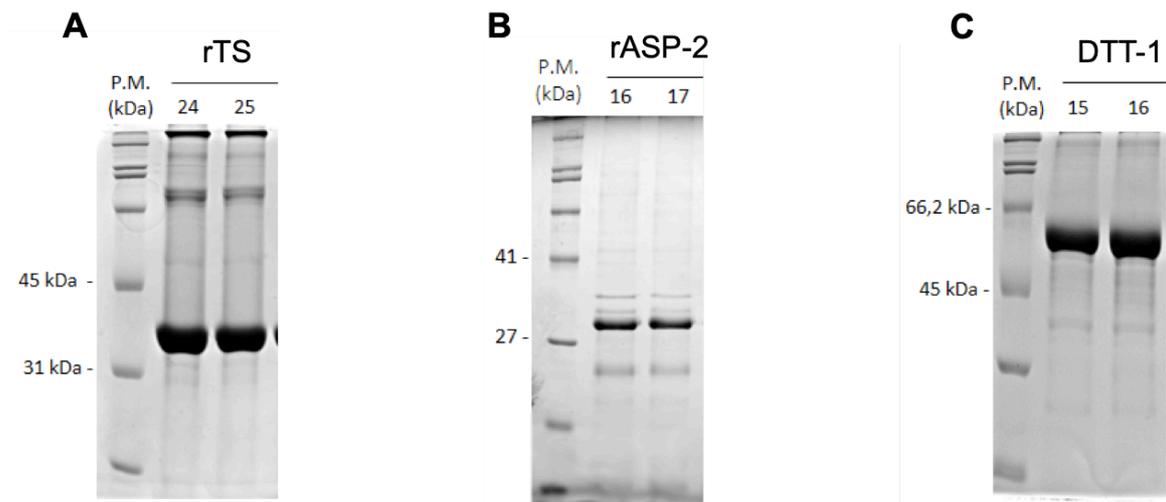


Figura 3. Confirmação da purificação das proteínas recombinantes. As imagens de eletroforese em géis de poliacrilamida exibem bandas intensas correspondentes ao peso molecular de rTS (A), rASP-2 (B) e DTT-1 (C).

5.2 Análise do Potencial Imunogênico das Proteínas Recombinantes

Com o objetivo de avaliar se a vacinação com as proteínas recombinantes seria imunogênica e capaz de induzir proteção contra a infecção por *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 foram imunizados com três doses de proteína associada aos adjuvantes CpG e Alumen. Trinta dias após a última imunização, parte dos animais foi eutanasiada para análise da resposta imune e parte foi desafiada com cepa Y de *T. cruzi* para avaliação da parasitemia. A linha do tempo experimental é ilustrada pela **Figura 4**.

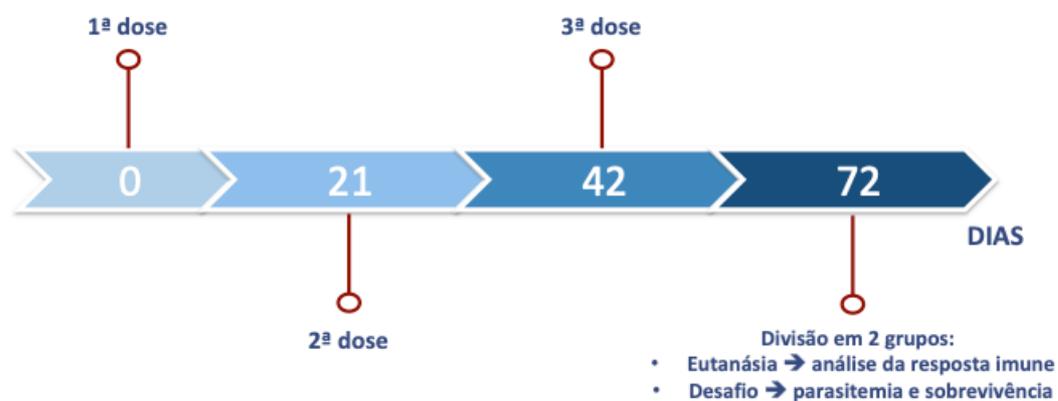


Figura 4. Linha do tempo experimental.

5.2.1 Indução de Resposta Imune Celular

A avaliação da resposta imune celular induzida pela vacinação foi avaliada indiretamente pela detecção de citocinas no sobrenadante de cultura. Para isso, esplenócitos de animais imunizados foram estimulados *in vitro* com as proteínas rTS e rASP-2. Concanavalina A (ConA) foi utilizada como controle positivo por ser um agente mitógeno, capaz de ativar linfócitos e induzir a produção de citocinas.

As citocinas IFN- γ e IL-10 foram avaliadas no sobrenadante de cultura por meio de ELISA. Como pode ser observado na **Figura 5A**, esplenócitos oriundos de animais vacinados com rTS, rASP-2 e DTT-1 produziram IFN- γ sob estímulo de rTS. A proteína rASP-2 estimulou a produção de IFN- γ apenas nos grupos imunizados com rASP-2 e DTT-1.

Conforme demonstrado na **Figura 5B**, a imunização com as três proteínas recombinantes foram capazes de induzir a produção de IL-10 sob estímulos específicos. No entanto, apenas os grupos imunizados com rTS e DTT-1 estimulados com rTS apresentaram níveis estatisticamente significativos em relação aos grupos controle.

Nos grupos controle PBS e CpG + Alumen, conforme esperado, não foi possível detectar ou apresentaram níveis baixos de IFN- γ e IL-10 em ambos os estímulos específicos.

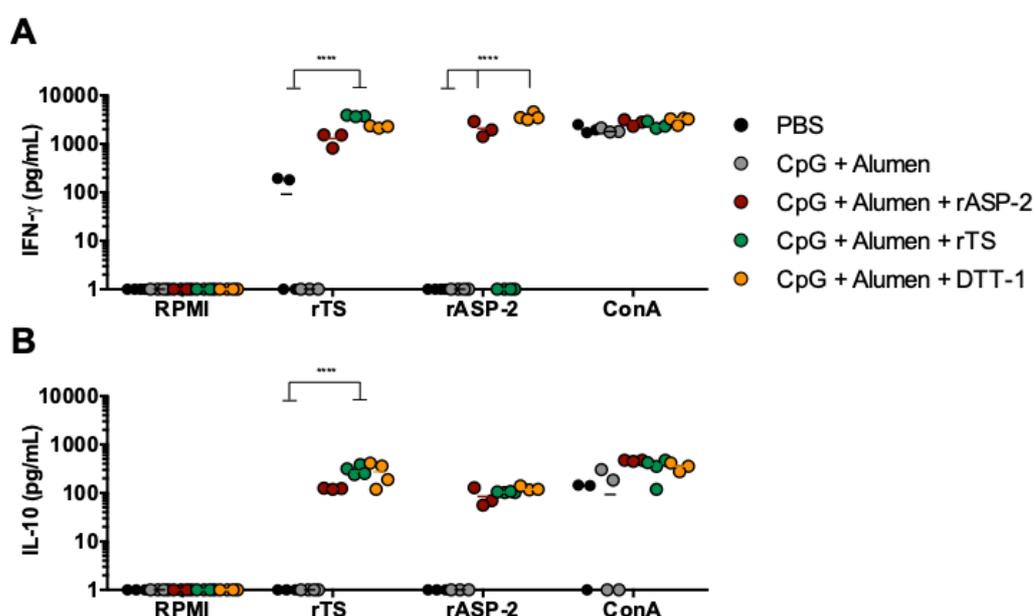


Figura 5. Produção de citocinas em resposta à estimulação com as proteínas rTS e rASP-2 em animais imunizados. Os níveis de IFN- γ (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de esplenócitos

foram detectados por ELISA, após 48h de estímulo. Como controle negativo foi utilizado apenas RPMI, e no controle positivo foi adicionado ConA. $n = 4$ animais/grupo. **** $p < 0,0001$

5.2.2 Indução de Resposta Imune Humoral

Para avaliar a resposta imune humoral induzida pela vacinação, foi avaliada a produção dos anticorpos IgG totais e as subclasses IgG1 e IgG2c no plasma dos animais, trinta dias após a última imunização.

Na **Figura 6A**, nota-se que apenas animais imunizados com DTT-1 possuem anticorpos IgG totais e IgG1 específicos para rASP-2. Não foram detectados anticorpos IgG2c em nenhum dos grupos. Por outro lado, observa-se altos níveis de IgG totais, IgG1 e IgG2c contra a proteína rTS (**Figura 6B**) nos camundongos vacinados com rTS e DTT-1, mas não com rASP-2.

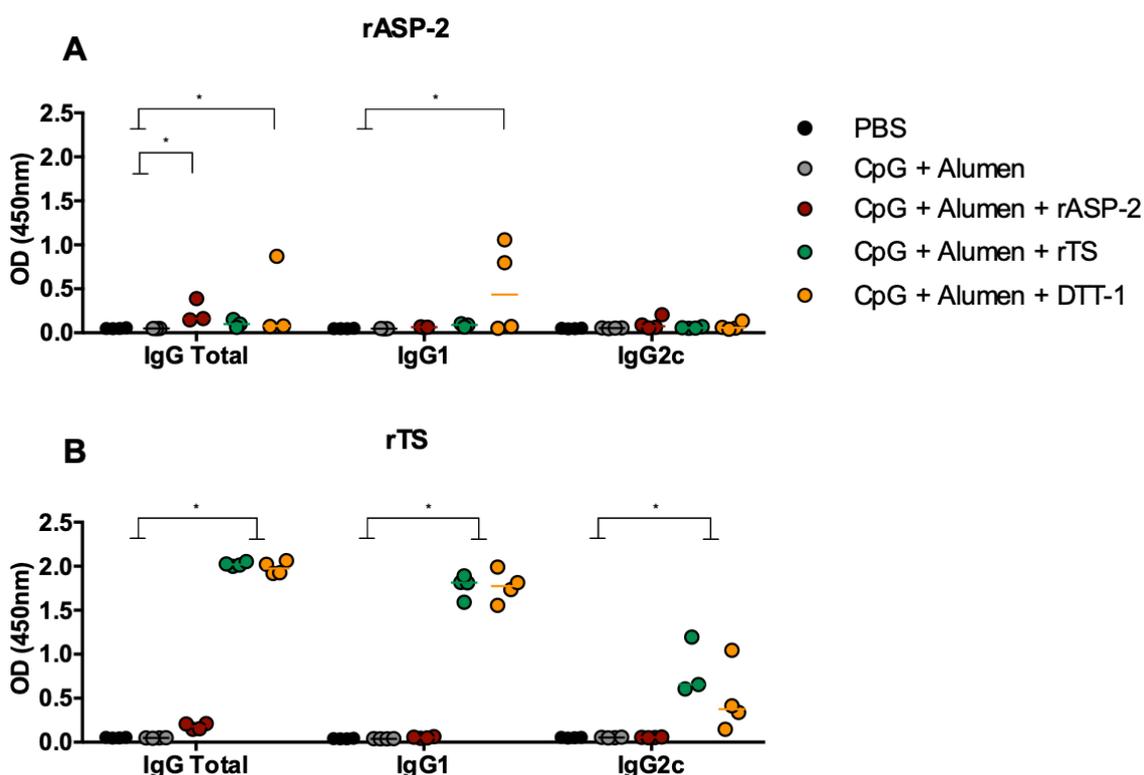


Figura 6. Resposta imune humoral em animais vacinados. A avaliação da resposta imune humoral foi realizada 30 dias após imunização. Foram utilizadas amostras de plasma dos animais (diluição 1:400) para detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c específicos contra rASP-2 (A) e rTS (B). A reatividade foi avaliada pela Densidade Óptica (OD) da reação colorimétrica medida a 450 nm. $n = 4$ animais/grupo. * $p < 0,05$.

5.2.3 Potencial Vacinal de DTT-1

Com o objetivo de avaliar o potencial vacinal da DTT-1 contra a doença de Chagas experimental, após as três imunizações, os camundongos foram desafiados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (trinta dias após a última imunização). A presença de parasitos no sangue (parasitemia) foi avaliada por 15 dias após o desafio, e a sobrevivência dos animais foi acompanhada por 25 dias. A parasitemia foi avaliada a cada dois dias, iniciando-se no terceiro dia após o desafio.

Conforme pode ser observado na curva de parasitemia apresentada na **Figura 7A**, a imunização com rTS e rASP-2 induziu uma proteção parcial contra o parasito, uma vez que exibiram níveis intermediários de parasitemia. Já os camundongos imunizados com DTT-1 apresentaram os menores índices. No sétimo dia após o desafio foi possível observar uma redução de 96,7% na parasitemia no grupo imunizado com DTT-1 em relação ao grupo PBS (controle). Esses resultados demonstraram a eficácia da imunização com DTT-1 e sugerem que a DTT-1 é uma boa candidata vacinal contra a doença de Chagas experimental.

Quanto à sobrevivência dos animais (**Figura 7B**), observou-se que os animais imunizados com rASP-2, rTS e DTT-1 apresentaram 100% de sobrevivência até 25 dias após o desafio. Por outro lado, os grupos controles, PBS e CpG + Alumen, apresentaram 66,7% e 83,3% de sobrevivência, respectivamente.

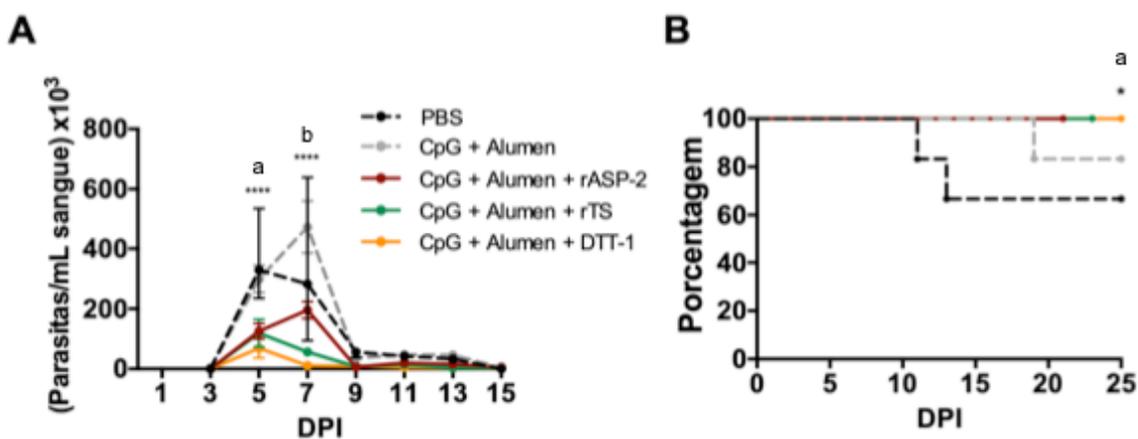


Figura 7. Parasitemia e sobrevivência dos animais vacinados e desafiados. Trinta dias após o desafio, camundongos foram desafiados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, e a carga parasitária no sangue (A) foi avaliada por 15 dias. A sobrevivência dos animais (B) foi observada durante 25 dias após a infecção. n = 6 animais/grupo. **** p < 0,0001 e * p < 0,05. DPI: Dias pós infecção

a = PBS, CpG + Alumen *versus* CpG + Alumen + rASP-2 / rTS / DTT-1

b = PBS, CpG + Alumen *versus* CpG + Alumen + rTS / DTT-1

5.3 Comparação de Adjuvantes

Frente aos resultados resultados promissores utilizando DTT-1, devido à grande indução de resposta celular e humoral, além da promoção de excelente proteção contra a infecção por *T. cruzi*, esta foi a proteína de escolha para dar seguimento aos ensaios de imunização. Posteriormente, realizou-se uma comparação de formulações vacinais, utilizando DTT-1 suplementada de dois adjuvantes diferentes. Por apresentar excelentes resultados em testes clínicos em humanos, em vacinas para câncer e para HIV (AMMI *et al.*, 2015; SAXENA *et al.*, 2019), Poly (I:C) foi o adjuvante escolhido para ser confrontado com CpG e Alumen.

5.3.1 Indução de Resposta Imune Celular

A indução de resposta imune celular foi realizada nos diferentes grupos experimentais através da detecção das citocinas IFN- γ e IL-10 no sobrenadante de cultura de esplenócitos. Neste ensaio experimental, além de dos estímulos com rASP-2 e rTS, foi acrescentado a DTT-1.

Conforme pode ser observado na **Figura 8A**, animais imunizados com a DTT-1, independentemente do adjuvante utilizado (CpG + Alumen ou Poly (I:C), foram capazes de secretar de IFN- γ na presença de rASP-2, rTS ou DTT-1. É importante destacar que as três proteínas recombinantes foram capazes de estimular os esplenócitos na mesma intensidade, não havendo diferença entre os estímulos. Os grupos imunizados apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ em relação aos grupos controle. Essa diferença foi mais pronunciada entre o grupo PBS e estimulado com rTS (~ 25 vezes maior).

A produção de IL-10 (**Figura 8B**) ocorreu em menor taxa quando comparada com a de IFN- γ . Entretanto, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados com CpG + Alumen em relação aos grupos controle, tanto na presença do estímulo com rASP-2 quanto DTT-1.

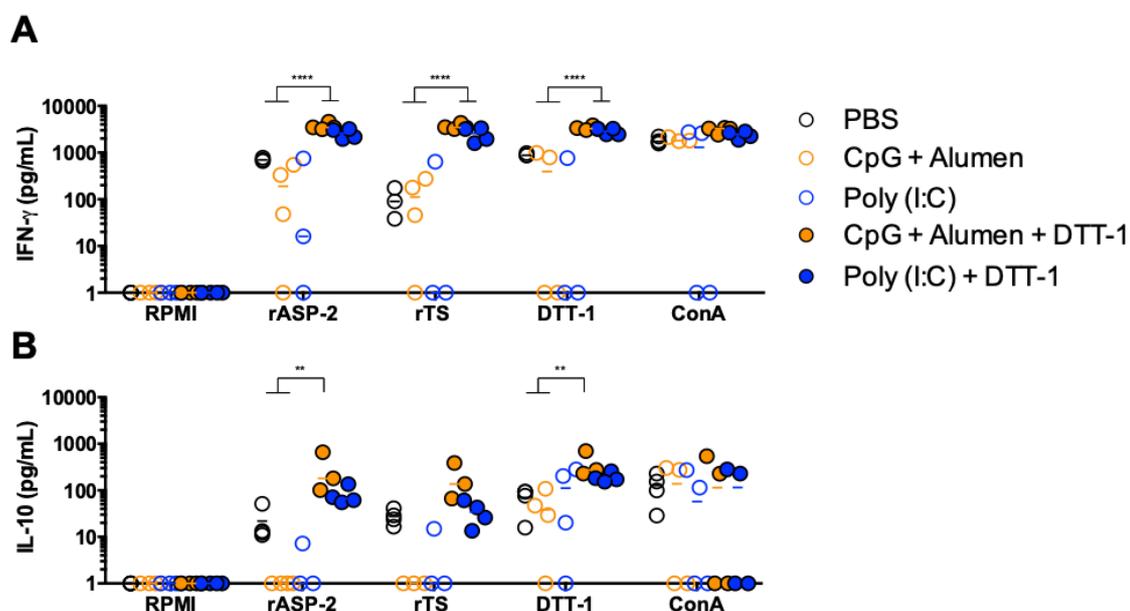


Figura 8. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos sob estímulos específicos. Esplenócitos foram estimulados com rASP-2, rTS e DTT-1 por 48h. Como controle negativo foi utilizado apenas RPMI, e como controle positivo, ConA (5 ug/mL). Os níveis de IFN- γ (**A**) e IL-10 (**B**) no sobrenadante de cultura foram detectados por ELISA. n = 4 animais/grupo. **** p < 0,0001 e ** p < 0,01.

5.3.2 Indução de Resposta Imune Humoral

A resposta imune humoral foi avaliada pela detecção de anticorpos IgG totais, IgG1 e IgG2c específicos contra as proteínas rASP-2 e rTS. É possível observar que tanto a imunização com CpG + Alumen + DTT-1 quanto com Poly (I:C) + DTT-1 estimulou a produção de anticorpos anti-rASP-2 (**Figura 9A**) e anti-rTS (**Figura 9B**). Além disso, é importante destacar que o uso de adjuvantes diferentes não foi capaz de alterar a produção de IgGtotal e IgG1 específicos para rASP e rTS. Entretanto, nota-se que a DTT-1 associada ao adjuvante Poly (I:C) induziu uma produção duas vezes maior de IgG2c (subclasse típica de respostas do tipo Th1) contra rASP-2, em comparação com o uso do adjuvante CpG + Alumen. Já nos grupos controle, como esperado, não foi constatada a produção de nenhum dos tipos de anticorpos.

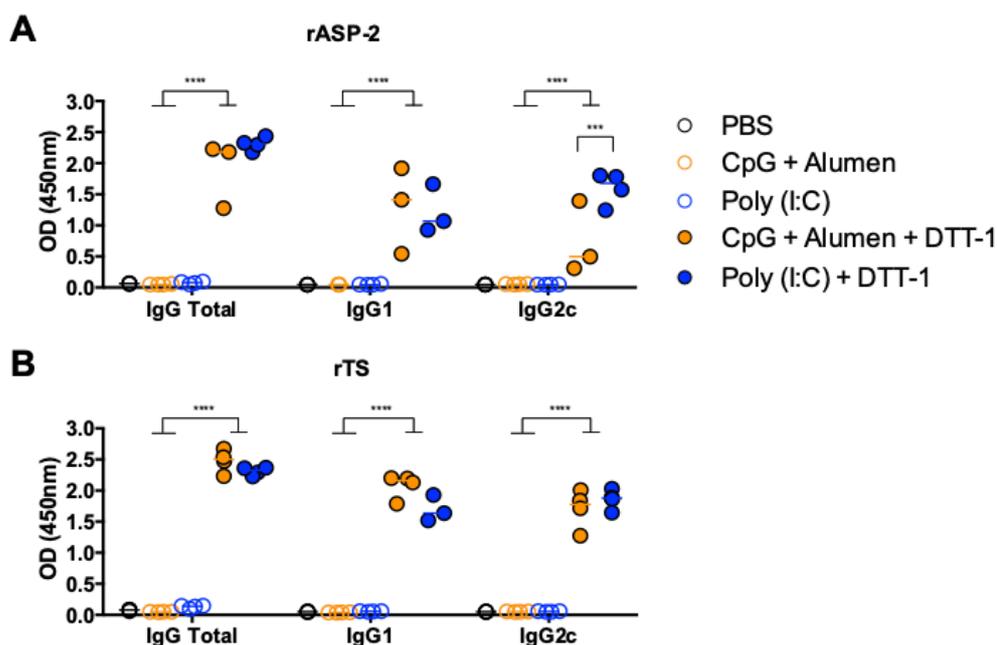


Figura 9. Detecção de anticorpos no plasma de animais imunizados. A avaliação da resposta imune humoral foi realizada 30 dias após a última imunização. Os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c específicos contra rASP-2 (**A**) e rTS (**B**) foram dosados por ELISA em amostra de plasma (diluição 1:400). A reatividade foi avaliada pela Densidade Óptica (OD) da reação colorimétrica medida a 450 nm. n = 4 animais/grupo. **** p < 0,0001.

5.3.3 Comparação do Potencial Vacinal na DTT-1 Associada a Diferentes Adjuvantes

A fim de comparar a capacidade das duas formulações vacinais de induzir uma resposta antiparasitária, os camundongos imunizados foram desafiados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A parasitemia foi avaliada por 15 dias após o desafio, a cada 2 dias, iniciando-se no terceiro dia após a infecção. Como pode ser observado na **Figura 10A**, os camundongos imunizados com DTT-1, independentemente do adjuvante utilizado, apresentaram os menores índices de parasitemia, quando comparados aos grupos controle. Isso demonstra, portanto, que as duas formulações foram eficientes na prevenção da infecção experimental por *T. cruzi*. Além disso, ambos os grupos imunizados apresentaram taxa de sobrevivência de 100% (**Figura 10B**). Em contraste, os grupos controle de imunização, CpG + Alumen e Poly (I:C), apresentaram taxa de sobrevivência de 83,3% e 80% respectivamente. Já o grupo controle experimental (PBS) a taxa de sobrevivência foi de apenas 66,67%.

Dessa forma, é possível perceber que, em todos os aspectos analisados, as formulações vacinais obtiveram resultados semelhantes. Considerando os testes clínicos em humanos aprovados com uso de Poly (I:C), e a ausência de reação adversa desse adjuvante nos animais, o Poly (I:C) foi o adjuvante de escolha para os próximos experimentos.

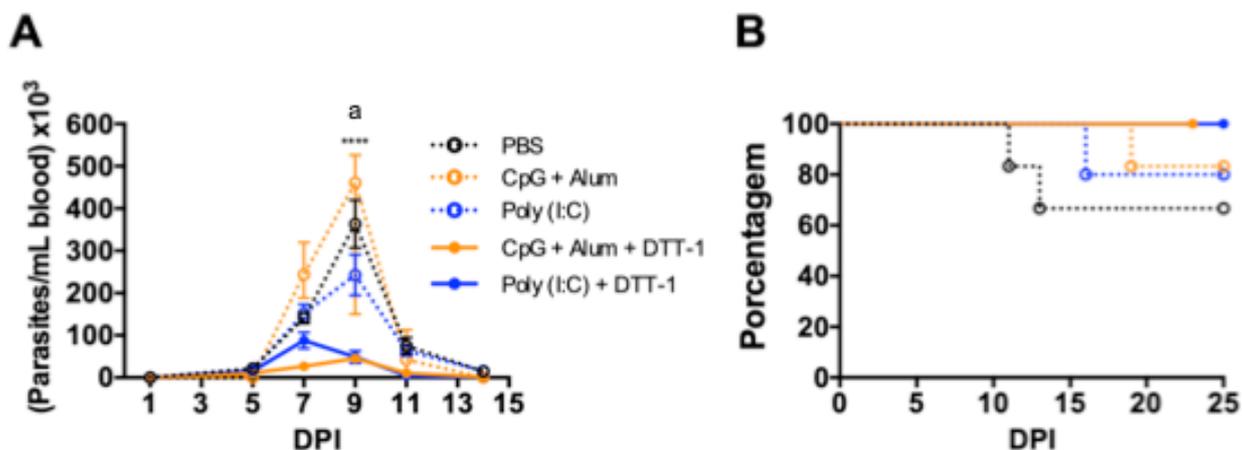


Figura 10. Avaliação do efeito protetor e antiparasitário das imunizações. Trinta dias após o desafio, camundongos foram desafiados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, e a parasitemia **(A)** foi avaliada por 15 dias. A sobrevivência dos animais **(B)** foi observada durante 25 dias após a infecção. $n = 6$ animais/grupo. **** $p < 0,0001$. DPI: Dias pós infecção. a = PBS, CpG + Alumen, Poly (I:C) versus CpG + Alumen + DTT-1 e Poly (I:C) + DTT-1

5.4 Avaliação da Proteção de Longa Duração Induzida pela DTT-1 e Comparação com Formulação de Plasmídeo e Adenovírus

Com o objetivo de avaliar se a vacinação com Poly (I:C) + DTT-1 continuaria conferindo proteção a longo prazo, os camundongos foram imunizados e posteriormente desafiados em três tempos: 30, 90 e 180 dias após a última dose vacinal. Além disso, a eficácia dessa formulação vacinal foi comparada com outro protocolo considerado padrão-ouro, que consiste em um *prime* de plasmídeo contendo os genes de TS e ASP-2 (DNA TS/ASP) e um *boost* de adenovírus que também possui as sequências de TS e ASP-2 (Ad TS/ASP). Como controle dessa formulação, um grupo experimental recebeu DNA \emptyset + Ad β Gal.

Conforme apresentado na **Figura 11**, nos três tempos determinados os animais foram desafiados com 10^4 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, e a parasitemia foi avaliada durante 15 dias.

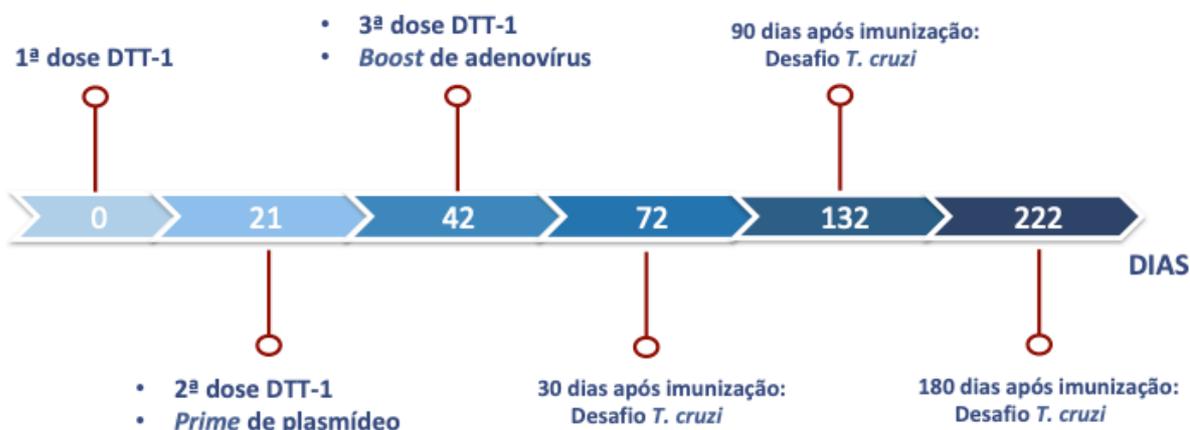


Figura 11. Linha do tempo experimental.

5.4.1 Proteção de Longa Duração

Conforme demonstrado na **Figura 12A**, a parasitemia dos grupos experimentais imunizados com DNA TS/ASP + AdTS/ASP ou DTT-1 atingiu níveis significativamente mais baixos que os grupos controle de imunização [DNAØ + AdβGal e Poly (I:C)] e controle experimental (PBS) nos tempos de 30 e 90 dias após a vacinação. É importante destacar que em ambos os tempos, a curva de parasitemia dos grupos DNA TS/ASP + Ad TS/ASP e Poly (I:C) + DTT-1 foi bastante similar.

Entretanto, quando os animais foram desafiados 180 dias após a última imunização esse padrão de resposta não é mais observado. No quinto dia pós o desafio os animais que receberam Poly (I:C) + DTT-1 exibiram uma parasitemia aproximadamente 3,5 vezes maior do que o grupo DNA TS/ASP + Ad TS/ASP. No entanto, ao longo do tempo a curva dos camundongos vacinados com a proteína recombinante decresce, e permanece significativamente menor do que as dos grupos controle.

Ao analisar a **Figura 12B**, observa-se que, nos três tempos avaliados, 100% dos animais vacinados com Poly (I:C) + DTT-1 e DNA TS/ASP + Ad TS/ASP resistiram à infecção. Ao contrário dos grupos controle, que apresentaram uma mortalidade de 20-40% com 30 dias, chegando a 60% no grupo PBS com 180 dias.

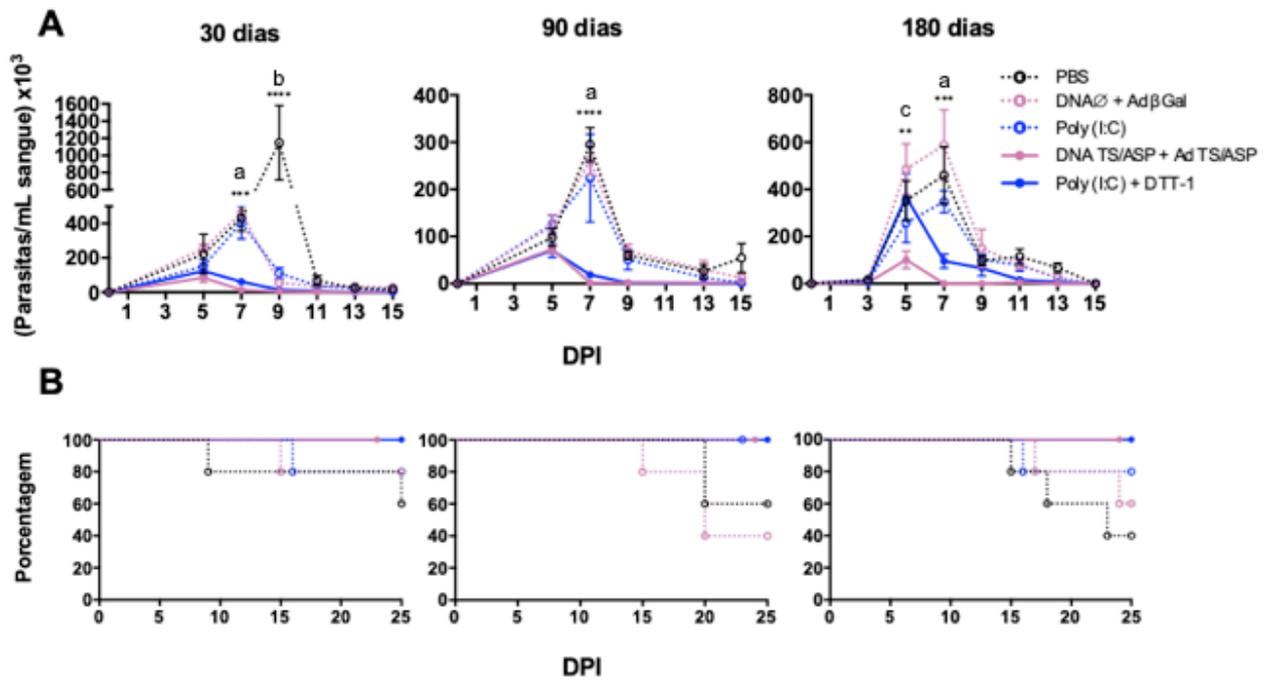


Figura 12. Avaliação da duração da resposta anti-*T. cruzi* induzida pela vacinação. Camundongos imunizados foram desafiados aos 30, 90 180 dias após a última imunização. A resposta antiparasitária foi analisada através parasitemia **(A)** e a resistência à infecção foi avaliada pela sobrevivência dos animais **(B)**. n = 6 animais/grupo. **** p < 0,0001 *** p < 0,001 e p < 0,01. DPI: Dias pós infecção
a = PBS, DNA∅ + AdβGal, Poly (I:C) *versus* Poly (I:C) + DTT-1 e DNA TS/ASP + Ad TS/ASP
b = PBS *versus* demais grupos
c = DNA TS/ASP + Ad TS/ASP *versus* Poly (I:C) + DTT-1

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o objetivo de desenvolver uma vacina utilizando uma proteína quimérica recombinante (DTT-1), que possui regiões imunogênicas das proteínas *Trans-sialidase* (TS) e *Amastigote Surface Protein – 2* (ASP-2). Primeiramente, foi observado que a imunização com DTT-1 é mais eficaz do que apenas suas regiões isoladas – rTS e ASP-2. Apesar de as três proteínas terem induzido a secreção de IFN- γ por esplenócitos sob estímulos específicos, apenas DTT-1 foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG totais e IgG1 anti-rASP-2. Ademais, esta foi a imunização com maior sucesso em fomentar uma resposta antiparasitária, atingindo os menores índices de parasitemia.

O uso de adjuvantes em vacinas de subunidade se faz necessário principalmente por estimular o sistema imune inato, ativando células apresentadoras de antígeno (APCs) que, por sua vez, vão auxiliar na ativação de linfócitos T e na consequente polarização do sistema adaptativo (COFFMAN *et al.*, 2010). Adicionalmente, algumas destas substâncias são capazes de induzir apresentação cruzada, ou seja, antígenos exógenos poderão ser apresentados via MHC I, favorecendo a ativação de linfócitos T CD8⁺ (MELIEF *et al.*, 2002).

Neste trabalho, foram testadas duas formulações diferentes: CpG + Alumen + DTT-1 e Poly (I:C) + DTT-1. Ao compará-las, observou-se que ambas induziram respostas significativas de IFN- γ , possivelmente porque CpG e Poly (I:C) estimulam uma resposta do tipo Th1, através da ativação de TLRs 9 e 3, respectivamente. (TAMURA e SASAKAWA, 1983; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008;). É sabido que IFN- γ tem um papel essencial no controle do parasito (JUNQUEIRA *et al.*, 2010), o que leva a crer que as baixas curvas de parasitemia observadas nos dois grupos estejam associadas à produção desta citocina. No entanto, apenas a imunização com CpG + Alumen foi capaz de induzir níveis estatisticamente significativos de IL-10, o que pode ser justificado pelo fato de Alumen ser um estimulador de resposta do tipo Th2 (GRUN e MAURER, 1989). Possivelmente é também por estas razões foi observada uma maior razão IgG2c/IgG1 (indicativo de polarização Th1) no grupo Poly (I:C) + DTT-1 do que em CpG + Alumen + DTT-1. Unindo estas considerações ao registro de lesões cutâneas nos animais que receberam CpG + Alumen, chegou-se à conclusão de que Poly (I:C) seria a melhor escolha para esta formulação vacinal.

Sabe-se que uma das características essenciais de uma vacina é a indução de uma resposta imune duradoura, por meio da geração de memória imunológica (ESSER *et al.*, 2003). Com o objetivo de avaliar se a imunização com Poly (I:C) + DTT-1 teria esta capacidade, camundongos previamente imunizados foram desafiados com *T. cruzi* em três tempos diferentes: 30, 90 e 180 dias após a última dose vacinal. Para fins de comparação, outro grupo experimental foi imunizado com um protocolo heterólogo de *prime-boost*, que utiliza plasmídeos e adenovírus que contêm sequências de TS e ASP-2 (DNA TS/ASP + Ad TS/ASP). Estudos anteriores demonstraram que esta formulação induz fortemente a geração de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora (VASCONCELOS *et al.*, 2014). Os resultados obtidos demonstraram que nos tempos de 30 e 90 dias Poly (I:C) + DTT-1 foi tão eficaz quanto DNA TS/ASP + Ad TS/ASP no combate ao parasito. Contudo, no tempo de 180 dias, os animais imunizados com a proteína recombinante sofreram um declínio na atividade antiparasitária, e o protocolo heterólogo se mostrou mais eficaz. Esses resultados corroboram dados da literatura que demonstram a eficiência de vacinas de DNA que utilizam vetores plasmidiais e/ou virais utilizando-se TS e ASP-2 como imunógenos (ARAÚJO *et al.*, 2014). Protocolos que utilizam DNA plasmidial associados a adenovírus possibilitam que os antígenos sejam produzidos pela própria célula hospedeira e apresentados via MHC I a linfócitos T CD8⁺, gerando uma potente resposta imune celular, estimulando o desenvolvimento de células de memória (KHAN, 2013). Visando melhorar o desempenho da vacina recombinante desenvolvida, uma alternativa seria administrar uma dose reforço de Poly (I:C) + DTT-1 aos 90 dias pós imunização, e assim aumentar a robustez da resposta induzida.

De todo modo, apesar de ter tido um desempenho abaixo da vacinação heteróloga, a imunização com proteína possui a vantagem de ser mais segura. Foi descrito que a utilização de vetores plasmidiais pode levar à geração de autoanticorpos e indução de tolerância imunológica; além de haver o risco da integração do DNA plasmidial no genoma das células hospedeiras (KLINMAN *et al.*, 1997; MOR *et al.*, 1997; KLINMAN *et al.*, 2000). Já os vetores virais podem ter sua virulência revertida através da recombinação gênica entre o vírus selvagem e sua versão atenuada (CONDIT *et al.*, 2016). Adicionalmente, pode haver uma anulação do efeito vacinal caso haja pré-existência de imunidade ao vetor (GRAY *et al.*, 2010).

Além disso, esta é uma vacina projetada para utilização em humanos, e possui em sua sequência diversos epítomos que foram preditos como ligantes de alelos do MHC-I humano (HLA-ABC). Portanto, é possível que a vacinação com DTT-1 seja ainda mais imunogênica do que foi demonstrado em camundongos C57BL/6, cujo MHC difere geneticamente dos alelos humanos (SHIINA *et al.*, 2016). Por outro lado, ainda que vacinas de DNA venham obtendo sucesso em modelos experimentais murinos, o mesmo não ocorre em ensaios com animais de maior porte (ovelhas, por exemplo) e humanos (KENNEDY *et al.*, 2006; KHAN, 2013).

Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a imunização com DTT-1 foi capaz de estimular elementos essenciais no combate à infecção por *T. cruzi*. A produção de IFN- γ é importante para a ativação de macrófagos e de linfócitos T CD8⁺, para a indução de plasmócitos a produzirem anticorpos IgG e para a polarização de linfócitos T CD4⁺ em Th1. Anticorpos IgG1 e IgG2, por sua vez, promovem a lise do parasito ou facilitam a fagocitose por macrófagos através da opsonização. Dessa forma, sabe-se que uma resposta inflamatória exacerbada é prejudicial e está associada com a severidade da patologia. Portanto, a produção de citocinas antiinflamatórias como IL-10 é necessária para balancear a resposta (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

7 CONCLUSÃO

No presente estudo avaliou-se o potencial vacinal de uma proteína quimérica recombinante, DTT-1, e sua capacidade de induzir proteção contra doença de Chagas experimental. Os resultados obtidos permitiram concluir que a imunização com DTT-1 + Poly (I:C):

- Induz a secreção de IFN- γ por esplenócitos sob estímulos específicos;
- Estimula a produção de anticorpos IgG totais, IgG1 e IgG2c anti-rASP-2 e anti-rTS por linfócitos B;
- Promove uma resposta antiparasitária, caracterizada pela diminuição da parasitemia;
- Induz proteção significativa contra *T. cruzi* mesmo após 90 dias da última dose vacinal, tendo seu desempenho decaído apenas aos 180 dias pós imunização;
- Demonstra ser uma candidata vacinal promissora contra a doença de Chagas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFRANCHINO, J. L. *et al.* Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. v. 34, n. 3, p. 221-228, 1989.

ALENCAR, B. C. G. *et al.* Perforin and Gamma Interferon Expression Are Required for CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell-Dependent Protective Immunity against a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*, Elicited by Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Adenovirus 5 Boost Vaccination. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p.4383-4395, 2009.

ALENCAR, B.C.G. *et al.* Perforin and Gamma Interferon Expression Are Required for CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell-Dependent Protective Immunity against a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*, Elicited by Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Adenovirus 5 Boost Vaccination. **Infection and Immunity**. v. 77, n. 10, p. 4383–4395, 2009.

ARAÚJO, A.F. *et al.* Genetic Vaccination against Experimental Infection with Myotropic Parasite Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p.1-13, 2014.

BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Recruitment and Endo-Lysosomal Activation of TLR9 in Dendritic Cells Infected with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal Of Immunology**, v. 181, n. 2, p.1333-1344, 2008.

BASTOLA, R. *et al.* Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. **Archives Of Pharmacal Research**, v. 40, n. 11, p.1238-1248, 2017.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, 2017.

CALDAS, S. *et al.* Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology**. v. 141, n. 12, p.1628-1637, 2014.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.44, n., p.29-37, 2002.

CARDOSO, M.S.; REIS-CUNHA, J.L.; BARTHOLOMEU, D.C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunol.** v.18, n.6, 659, 2016.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p.492-503, 2010.

CONDIT, R. C. *et al.* Unique safety issues associated with virus-vectored vaccines: Potential for and theoretical consequences of recombination with wild type virus strains. **Vaccine**, v. 34, n. 51, p.6610-6616, 2016.

COURA J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**. v.465 (7301):S6-7, 2010.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**. v.115, n.1-2, p.5-13, 2010.

COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104, p. 31-40, 2009.

DIAS, J. C. *et al.* Brazilian consensus on chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.49, suppl. I, 2016.

ESSER, M. T. *et al.* Memory T cells and vaccines. **Vaccine**, v. 21, n. 5-6, p.419-430, 2003.

FRANCIS, M. J. Recent Advances in Vaccine Technologies. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p.231-241, 2018.

FREITAS, L. M. *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**, v. 6, n. 10, p. e25914, 2011.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R.T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**. v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.

GRAY, G.; BUCHBINDER, S.; DUERR, A. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. **Current Opinion In Hiv And Aids**, v. 5, n. 5, p.357-361, 2010.

GRUN, J. L.; MAURER, P.H. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: The role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. **Cellular Immunology**, v. 121, n. 1, p.134-145, 1989.

HAOLLA F.A. *et al.* Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Vaccine**. v. 27, n. 41, p. 5644-5653, 2009.

JUNQUEIRA, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 12: e29, 2010.

JUNQUEIRA, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Adjuvants Potentiate T Cell-Mediated Immunity Induced by a NY-ESO-1 Based Antitumor Vaccine. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e36245, 2012

KENNEDY, N. J. *et al.* DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. **Vaccine**, v. 24, n. 7, p.970-979, 2006.

KHAN, K. H. DNA vaccines: roles against diseases. **Germes**, v. 3, n. 1, p.26-35, 2013.
KLINMAN D.M. *et al.* DNA vaccines: safety and efficacy issues. **Springer Semin Immunopathol**, v. 19, n. 2, p. 245-256, 1997.

KUMAGAI, Y.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 7, p.795-804, 2008.

LESCURE F.X. *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 10, p. 556-570, 2010.

LOW, H. P.; TARLETON, R. L. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the Trypanosoma cruzi sialidase superfamily. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 88, n. 1-2, p.137-149, 1997.

MANNE, J. *et al.* Supply chain problems for Chagas disease treatment. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 12, n. 3, p.173-175, 2012.

MELIEF, C. J. M. *et al.* Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. **Immunological Reviews**, v. 188, n. 1, p.177-182, 2002.

MICHEL, M.I.; TIOLLAIS, P. Hepatitis B vaccines: Protective efficacy and therapeutic potential. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 4, p.288-295, 2010.

MOR, G. *et al.* Do DNA Vaccines Induce Autoimmune Disease? **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 3, p.293-300, 1997.

MORILLO, C.A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**. v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

NOIREAU F.; DIOSQUE P.; JANSEN A.M. Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**. v. 40, n. 2, p. 26, 2009.

PADILLA A.M.; BUSTAMANTE J.M.; TARLETON R.L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Current Opinion in Immunology**. v. 21, n. 4, p. 385-390, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4, 2017.

RASSI A. JR. *et al.* Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart (British Cardiac Society)**. v. 95, n. 7, p. 524-534, 2009.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**. v. 375, p.1388-1402, 2010.

RIGATO P.O. *et al.* Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**. v. 79, p. 2120-2130, 2011.

SCHENKMAN, S. *et al.* Structural and Functional Properties of *Trypanosoma* Trans-Sialidase. **Annual Review Of Microbiology**, v. 48, n. 1, p.499-523, 1994.

SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 2, p. 567-575, 1992.

SHIINA, T. *et al.* Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. **Immunology**, v. 150, n. 2, p.127-138, 2016.

SOUSA G.R. *et al.* The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. **PLoS One**. v. 12, e0172833, 2017.

TAMURA, M.; SASAKAWA, S. Induction of human leukocyte interferon by heat-treated poly I: Poly C. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 110, n. 3, p.851-858, 1983.

TRIPATHI, N. K. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. **ChemBioeng Reviews**, v. 3, n. 3, p.116-133, 2016.

VASCONCELOS J.R. *et al.* Adenovirus vector-induced CD8⁺ T effector memory cell differentiation and recirculation, but not proliferation, are important for protective immunity against experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Human Gene Therapy**. v. 25, p. 350-363, 2014.

VASCONCELOS, J. R. *et al.* Protective Immunity Against *Trypanosoma cruzi* Infection in a Highly Susceptible Mouse Strain After Vaccination with Genes Encoding the Amastigote Surface Protein-2 and Trans-Sialidase. **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 9, p.878-886, 2004.

VIOTTI, R. *et al.* Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.58, n.2, p. 635–639, 2014.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*, 90 (6), 33–44, 2015.

WHO. Chagas Disease. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
Acesso: 02.11. 2017.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010. Geneva: World Health Organization, 2010.

WIZEL, B.; NUNES, M.; TARLETON R.L. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8⁺ TC1 responses. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 12 p. 6120-6130, 1997.