

Universidade Federal de Minas Gerais

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Tese** apresentada e defendida publicamente por

Rafael Polidoro Alves Barbosa

*Vírus influenza recombinante como vetor vacinal: desenvolvimento e aplicação no modelo de doença de Chagas.*

Belo Horizonte

2014

Rafael Polidoro Alves Barbosa

Vírus influenza recombinante como vetor vacinal:  
desenvolvimento e aplicação no modelo de doença de Chagas.

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica e Imunologia do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito para obtenção de título de  
Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadores: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Dr. Alexandre Vieira Machado

Belo Horizonte

2014

## Dedicatória

*Á minha avó e madrinha Neponésia Barbosa Monteiro  
e á minha irmã Melissa Barbosa Alves  
pelo amor e por tê-las sempre comigo*

## Epígrafe

*Relâmpagos dividem o céu*  
*Brilhando em branco ofuscante*  
*E aqui estou, sonolento*  
*Matutando um lugar de paz*  
*e então sinto*  
*que encontrei meu lugar*  
*no espaço e tempo*  
*em esperança e fé*  
*e no amor que dou*  
*Minha mente clareou*  
*Não temo mais*  
*Nem caem lágrimas*  
*por ti, querida*  
*Porque este mundo é maravilhoso, tão lindo*  
*Se ao menos você pudesse abrir os olhos e enxergar*  
*Seu mundo é tudo o que sonhara*  
*Se ao menos você pudesse abrir a mente e entender*  
*que a Beleza está aqui*

The Lightning Song, Álbum "Weather Systems:" – Anathema

## Agradecimentos

Agradecimento especial para a banca composta pela colaboradora Dra. Joseli Lannes Vieira e também pela Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e pelos doutores Flávio da Fonseca e João Trindade Marques, além dos meus orientadores Doutores Alexandre Vieira Machado e Ricardo Tostes Gazzinelli pela disposição apresentada em participar prontamente da minha formação acadêmica, certo de que obtive grande aprendizado e proveito para toda a vida.

Agradeço também todos os cientistas envolvidos nas publicações advindas deste manuscrito e nos experimentos não publicados. Em especial meu braço direito Bruno Galvão-Filho, o Dr. Policarpo Sales, a Dra. Ana Paula Salgado, Dr. Remo Castro Russo e Dr. Maurício Martins Rodrigues.

Esta tese tem por consequência uma longa história de agradecimentos. É, portanto, impossível agradecer completamente e corretamente a todas e todos os participantes dela. É sempre imprescindível agradecer à família, mas vou começar um pouco antes, agradecendo ao acaso. Apesar de alongar os agradecimentos, não vejo outro lugar tão adequado quanto este para tanto. Tendências importantes me deram a vontade de alterar meu destino ativamente.

A primeira delas era a de ser o único negro na turma da infância em uma escola particular. A sensação de desvantagem material era aparente, não apenas porque éramos mesmo das famílias mais pobres da escola, mas porque ela me deixava para trás em todas as disputas. Com uma excelente memória e uma fixação por aparecer tive que deixar o protagonismo de uma peça de teatro para um loiro, e ainda abaixado a seu lado como um soldado menor, ditar o texto para ele. Notei logo que eu teria uma única vantagem a sobressair, pois era ruim em esportes, a inteligência.

Outra tendência importante se deu aos seis anos de idade seguindo meu pai. Trabalhando e estudando, passávamos pouco tempo juntos, e ele adorava jogar xadrez com um amigo intelectual inveterado, Vindilino Ottoni. Ele tinha dinheiro, e como eu sempre ia com meu pai a casa dele, Vindilino me desafiou certa vez a resolver um cubo de Kubrick em uma semana em troca de uma caixa de legos, a qual eu era obcecado, e uma bicicleta. Eu fiquei horas tentando, e continuei indo em vão todos os dias até completar uma semana. Associei, com Vindilino, ganho material à inteligência de forma positiva.

Outro episódio marcante foi aos nove anos. Após a separação dos meus pais passamos a estudar em escola estadual. Como incentivos, meu pai deu dinheiro à minha irmã para responder um livro de inglês. Meu irmão ganhou um curso de computação, e eu um aparelho dentário. Por despeito, aprendi inglês e me matriculei sozinho no Conservatório de música por influência de Eduardo Cormanich, já que pagava apenas 3 reais por semestre e Xerox. Eduardo foi importante em muitos aspectos intelectuais. Discutia muito história e sociologia em casa e me ensinou a debater, além de me introduzir ao mundo do RPG (*Role Playing Game*), onde aprendi a ler, entender e aplicar conceitos, regras e interpretação sem preguiça.

Nas tardes de sábado, minha mãe, que trabalhava e criava três adolescentes ao mesmo tempo, limpava a casa escutando música. Certa vez escutava a música “Quanto vale a vida”, dos Engenheiros do Havaii, e esta letra causara a minha primeira epifania. Seguir e entender as letras de bandas me trouxe à expressão “600 anos de estudo, ou 6 segundos de atenção, pra entender” e me traz ainda centenas de epifanias. Bem como ler. Livros da coleção ‘A Essência’, da editora Martin Claret, me ensinaram que há coisas as quais eu não tinha controle algum, como a genética. Algumas eu tinha controle parcial, como família, amigos e influências. E outras que eu tinha controle total, a transformação feita por mim para mim mesmo. Saí de espectador para ator na vida.

Não menos importante, quando mudamos de Varginha para Unaí, já aos 16 anos, fiz meu último ano de novo em escola particular com bolsa. Um professor de Biologia, chamado Carlos Komeno notou minha arrogância e espírito competitivo e trabalhou isso muito bem em mim. Eu nunca havia estudado para uma disciplina, e para a dele eu estudava muito e nunca tirei um total. Ao fim, fiquei com 86, a maior nota da história dele como professor, mas muito longe do que eu queria. A interação com ele me despertou o interesse em ciência e biologia.

Na mesma escola, ao primeiro dia de aula, cheguei muito cedo para evitar transtornos e o próximo aluno a chegar fora Edgar Noronha. Ambicioso intelectualmente, Edgar queria provar a todos da cidade que todos os anos de *bullying* que sofrera por ser “da roça” o tornara melhor que eles. Ele me introduziu à UFMG. Nunca tinha pensado em fazer faculdade quando ele perguntou naquele dia o que eu ia fazer de vestibular. Foi a primeira vez que ouvi a palavra vestibular. Notando a defasagem de possibilidades montamos um grupo de estudos intensivos na minha casa todas as tardes. E eu dava aula particular para conseguir dinheiro desde a oitava série. Dei aulas gratuitas para a minha turma nas tardes antes de provas para estudar e treinar. Mesmo assim o sonho de passar no vestibular não foi realizado. Mesmo tendo a maior nota de ônibus de Unaí no vestibular 2003, 72 pontos de 120, era longe do necessário para passar em Biologia na UFMG.

Este primeiro fracasso foi amainado pela trágica morte da minha irmã Melissa, e teve outras consequências essenciais, mas não intelectuais. No ano que seguiu, mudamos para Belo Horizonte e fiz cursinho para ter praticamente o mesmo resultado. Desta vez, o fracasso resultou em duas frases, uma de meu pai e uma de minha mãe, que foram “se você não passar dessa vez, corto sua pensão” e “eu acho que o Rafa não vai dar em nada”. Imagino que tenha sido um fracasso para todos, mas a maior fracassada foi minha arrogância e eu saí vencedor.

Desta forma, quando entrei na Universidade eu tinha uma sensação de que era fraco e um gosto azedo de ser dois anos mais velho que meus amigos. Entrei no laboratório do Dr. Oscar Bruña-Romero no primeiro dia. Já queria trabalhar com vacinas. Por ocasiões que não convém alongar passei à Iniciação Científica sob orientação do Dr. Alexandre Vieira-Machado (Abril 2006) pelo CPqRR. Na primeira Reunião Anual de Iniciação Científica do René Rachou (2007) o Dr. Henrique Lenzi, infelizmente hoje falecido, me ensinou o que a ciência pode e não pode me dar. Foi uma grande influência.

Com um projeto sob patente a primeira vez que apresentei em público foi em 2008 na mesma reunião regional. Lá fui agraciado com o prêmio entre os três melhores trabalhos sem sequer saber que havia um prêmio. Graças ao rigor científico e metodológico do Dr. Alexandre, passamos a apresentação algumas vezes, e discutimos sua estrutura, possíveis perguntas e respostas. E o mesmo procedimento me seguiu para sempre. A parte mais importante é que eu formaria em dezembro de 2008 e havia me inscrito para um concurso no INSS, no RJ. Era na mesma semana que a RAIC nacional. Eu disse a mim mesmo que aquele era um divisor de águas – se eu ganhasse o prêmio nacional, eu seguiria a carreira científica.

Quando voltei foi a primeira vez que o Dr. Ricardo Gazzinelli conversou comigo fora de uma reunião de laboratório. Sempre fora meu orientador em todas as situações, incluindo a iniciação científica e doutorado sanduíche. Aprendi que há alhos e bugalhos. Todos têm suas qualidades e defeitos. O Dr. Ricardo foi essencial para me ensinar o que um *paper* tem que mostrar; como uma mensagem deve ser passada através de resultados; como interpretar resultados e muito de política em ciência. Já o Dr. Alexandre, mais próximo da bancada, me ensinou grande parte do rigor científico que conheço. O desenvolvimento de perguntas, projetos, burocracias, metodologias, a escrever o *paper* em si. E é meu amigo diretamente.

Após minha primeira publicação como primeiro autor o Dr. Ricardo me ofereceu uma oportunidade de fazer doutorado sanduíche no laboratório da Dra. Barbara Burleigh, na escola de saúde pública de Harvard, a qual eu aceitei de bom grado. Lá tive contato com o curso Biologia do Parasitismo de Woods Hole. E ter sido aceito e participar deste curso foi o maior divisor de águas da minha vida científica. Aprendi que estamos na era das perguntas complexas na ciência, e qualidade é tão tão superior à quantidade. Navegar sobre o ruído.

Um agradecimento honesto e sincero aos supra-citados, pois me deram as características necessárias para escolher o meu caminho atual. Entretanto, nem todos os caminhos são diretos. E por isso não posso deixar de agradecer os participantes das minhas vidas sociais, de atividade física, amorosas e políticas.

Agradeço à minha mãe, Dorinha, cuja inteligência sócio-cognitiva e seu exemplo de trabalho incessante foram meus maiores exemplos. Ao meu pai Sílvio pela filosofia de vida abandonada por si mesmo, mas viva em mim. Ao tenente Sílvio, companheiro e irmão, por nunca me deixar baixar a guarda intelectualmente, moralmente e ante a nossa mãe. À sua esposa Melissa pelo suporte e, juntos, proporcionaram meu agradecimento ao Cássio e à Yasmin, minhas grandes paixões e razões de viver. E às outras irmãs e irmãos, cujos caminhos foram afastados à revelia, mas não diminuídos – Ana, André, Júlia, Clara e Pedro. E a todos os meus familiares pelo suporte e crédito.

Agradeço à Laika, Snoopy, Juninho e Spike pelo amor incondicional, paciência, esperança e superações.

Um agradecimento especial ao meu amigo Lélis Júnior cuja construção científica nossa se dera junta. Desde o início em risadas históricas nas menores coisas às reuniões sobre livros que queremos escrever, teorias que queremos tecer, projetos que queremos concretizar e documentado aqui estará tal vontade. A saber, se não cumpridas, ainda assim foram válidas.

Também agradeço:

Ao Rafael Elias e ao Ruiz Astigarraga pela amizade e pela ajuda com a tese; Ao amiguiu pelo fud, com destaques ao Xexéu, Perereco, Braulio, Eudes, Manguaça, Gingola, Doug jovem, Bruno véia, Goiás, Russo, Anão, Pedrão, Motoclei, Presuntinho e Alf;

Aos amigos do kung fu, em especial ao Vânio Tonussi e o mestre Evandro Almeida;

Aos professores e amigos do BoP-Woods Hole, em especial à Jana, Greg, Danielle (e pela ajuda com a tese), Eilidh, Sandro, Jorge e Ranjani;

Aos meus amigos de Boston Antonio Rotolo e Maria Soriano. Ao querido visitante Trotta, ao amigo de NY Rafael Czepielesky e a Ana Fazza, e à minha companheira em Boston, Sabrina Benghanem. E muitos outros amigos que compõem um excelente ano;

Aos companheiros de APG-UFMG, em especial ao Pedro Campelo e ao Gefter;

Aos meus amigos da Escola de Arquitetura da UFMG, professores Taquinho, Frederico Tófani, Paulo, André Buarque, Maria Elena, Cynara, Breno e Débora, entre outros;

Aos meus amigos e colegas dos laboratórios LAIM e IMPAR, com destaque à Clécia e Eneida, ao Marco Ataíde, a Dra. Carol, a Dra. Luara, ao Dr. Warrison e Marina Ribeiro; Aos colegas de departamento, com destaque à professora Maria Elena e ao Professor Alfredo Goes;

Aos companheiros de lab em Harvard, a orientadora Dra. Barbara Burleigh e à Sheena, ao Dr. Jose e Dr. Prasad. Aos colaboradores em outras cidades, Isabela Resende, Rafael Silva, Ronnie e Bruna Alencar;

Aos professores Dario Zamboni, Marcelo Bozza, André Báfica e João Marques pelos conselhos sobre não antecipar a defesa de tese que me permitiram crescer bastante;

A minha vizinha Sandra Amaral e seus familiares; Aos meus vizinhos, em especial Warley, Jonas e Jamil, pelo companheirismo. E, com eles, meus antigos vizinhos Danilo, Hugo e Juan; Ao Fabinho e Rachel, Jane e Valdir;

Aos amigos da Bio, Luiza, Tainá, João, Zé, Marla, Travaglia, Cris e André, Silvinha, Chico Bento, Rubão, Tchutchuca, Lion, Heron, Bocão e amigos da UFU; e ao grupo Matheus, Carol, Ana Paula, Samara e Felipe;

Agradeço ao CNPq pelo suporte desde a iniciação científica até o doutorado.

Agradeço, por fim, muitas outras e outros não citados aqui, mas que foram especiais e são eternamente importantes.



## RESUMO

A vacinação é considerada uma das aplicações médicas mais bem sucedidas e eficazes na prevenção de doenças infecciosas. Há estimativas que até 3 milhões de vidas são salvas através de vacinação por ano. Dentre as tecnologias mais viáveis para o desenvolvimento de novas vacinas se encontram os vírus recombinantes. Em 2010, nosso grupo demonstrou a viabilidade da construção e uso de vírus influenza (Flu) recombinantes em combinação com adenovírus (Ad) recombinantes contra a toxoplasmose em camundongos. A potencialidade do protocolo Flu-Ad nos levou a procura de um modelo experimental onde a resposta celular T CD8+ teria um papel central na proteção. Neste contexto, um importante modelo é o da infecção em camundongos por *Trypanosoma cruzi*. Este é o protozoário causador da doença de Chagas em humanos. Seu tratamento tem maior eficácia na fase aguda da doença, causando ainda efeitos adversos. Não há vacinas contra a doença de Chagas disponíveis para uso em humanos, portanto o estudo e desenvolvimento de um protocolo otimizado de vacinação se faz uma interessante linha de pesquisa. Usando a técnica genética reversa geramos vírus influenza recombinantes carreando as porções C-terminal e medial da proteína de superfície amastigota 2 (ASP2) de *T. cruzi*. Esses vírus recombinantes foram caracterizados genotipicamente e fenotipicamente. A imunização usando Influenza-ASP2 como *indução* e adenovírus codificando ASP2 (Ad-ASP2) como *reforço* estimula potente resposta CD8+ polifuncional e imunodominante capaz de proteger camundongos C57BL/6 e C3H/He desafiados com a cepa Y de *T. cruzi*. Apesar da proteção alcançada na fase efetora da resposta imune, uma redução significativa da sobrevivência foi observada nos animais vacinados e desafiados 130 dias após a vacinação de reforço. Quando analisamos o perfil celular no baço destes animais notamos a redução drástica da frequência da população imunodominante e da produção de citocinas após estímulo específico, o que pode explicar a redução na proteção na fase de memória.

Palavras-chave: Vírus recombinantes; *Trypanosoma cruzi*; Influenza; Adenovirus; ASP2.

## ABSTRACT

Vaccines are considered one of the most successful and effective medical interventions to prevent infectious diseases. It is estimated that up to 3 million human lives are spared through vaccination per year. The use of recombinant viruses as vectors is one of the most viable strategies for the development of new vaccines. In 2010, our group has demonstrated the feasibility of the generation and use of recombinant influenza (Flu) viruses in combination with recombinant adenoviruses (Ad) to protect against *Toxoplasma gondii* infection in mice. The potential of Flu-Ad protocol led us to the search of an experimental model in which the CD8 T cell response has a pivotal role in protection. In this context, an important model is the mice infection by *Trypanosoma cruzi*. This protozoan parasite is responsible for the Chagas disease in humans. The treatment has higher efficacy in the acute phase of the disease, yet causes undesired side effects. There are currently no vaccines against Chagas disease in humans, which makes the study and development of an optimized vaccination protocol an important research subject. Using reverse genetics we generated recombinant influenza viruses encoding the C-terminus and Medial portions of the *T. cruzi* amastigote surface protein (ASP2) and further characterized the phenotype and genotype of those viruses. Immunization using Influenza-ASP2 as prime and Ad-ASP2 as boost induced a potent CD8+ polyfunctional T cell response, which was mostly immunodominant. This immune response was able to protect C57BL/6 and C3H/He mice challenged with Y strain of *T. cruzi*. Despite the level of protection reached in the effector phase of immune response, a significant reduction of survival was observed when vaccinated mice were challenged 130 days after boost dose. Accordingly, the production of cytokines and number of immunodominant cells in splenocytes of vaccinated mice dropped in this time point, explaining the reduced memory protection.

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

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASP2 – Proteína de superfície amastigota 2

BSA – Albumina sérica bovina

cDNA – DNA complementar

CBA – Matriz de base citométrica, do inglês *Cytometric bead array*

CTL – Linfócito T citotóxico

DC – Célula dendrítica

DL50 – Dose letal de 50% da amostra

DMEM – Meio Dulbecco Eagle Modificado

dNTP – desoxiribonucleotídeos fosfatados

DO – Densidade óptica

d.p.i – dias pós inoculação

d.a.b – dias pós imunização de reforço.

d.a.c – dias pós-desafio

ELISA – Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima

ELISpot – Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima em pontos

Gal – Galactina

HE – Hematoxilina-Eosina

HEK – Célula de rim embrionário humano

IFN - interferon

Ig – Imunoglobulina

IL - Interleucina

kb – Kilo bases

kDa – Kilo Daltons

KO – deficientes, deficient – animais geneticamente deficientes

M – molar

MDCK – Célula de rim canino Madin-Darby

mg - Miligrama

µg - Micrograma

mL - Mililitro

µL – Microlitro

mM – Milimolar

MM – Marcador de peso molecular

Mock – Controle negativo

m.o.i – Multiplicidade de infecção

MPO – Mieloperoxidase

n – número amostral

NA – Neuraminidase

NAG – N-Acetilglucosamidase

NC – Região não-codificadora

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas

NK – Célula natural killer

nM – nanomolar

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

nt - Nucleotídeo

ORF – Janela aberta de leitura

SAG – Antígeno de superfície do taquizoíto

Pb – Pares de Base

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

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

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PI – Pós-infecção ou pós-inoculação

PMN – Leucócitos polimorfonucleares

rAd – Adenovírus recombinante

RCF – força centrífuga relativa ou força g

RPM – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

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

SDS - duodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SN – Sobrenadante

TAE – tampão tris acetato EDTA pH 8,0

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

TNF – Fator de necrose tumoral

TLR – Receptor do tipo toll

UFP - Unidade formadora de placa de lise – medida de título viral

vRNP – Complexo ribonucleoprotéico viral

Universidade Federal de Minas Gerais

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Projeto de Tese do Aluno: Rafael Polidoro Alves Barbosa

Orientadores:

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado

Ênfase: Imunologia

Título da Tese: Vírus influenza recombinantes como vetores vacinais: desenvolvimento e aplicação no modelo de doença de Chagas.

## ÍNDICE

Organização Geral do Trabalho	17
1 <i>Introdução e Objetivo Geral</i>	18
1.1	INTRODUÇÃO GERAL
	19
1.1.1 Uma breve história das vacinas	19
1.1.2 Novas tecnologias em vacinas	21
1.1.3 Vírus recombinantes como vetores vacinais	22
1.1.4 <i>Adenovírus</i>	24
1.1.5 <i>Influenza</i>	25
1.2	OBJETIVO GERAL
	28
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS
	28
2 <i>Construção e caracterização de vírus influenza recombinantes para uso como vetores vacinais em modelo murino de infecção pelo Trypanosoma cruzi.</i>	29
2.1	INTRODUÇÃO
	30
2.1.1 Doença de Chagas e sua importância	30
2.1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
2.1.3 Resposta imunológica na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
2.1.4 Estratégias de vacinação contra a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS
	39
2.2.1 Uso de células e animais	39
2.2.2 Peptídeos	40
2.2.3 Construção dos plasmídeos para genética reversa dos vírus influenza	40
2.2.4 Obtenção dos vírus influenza recombinantes	41
2.2.5 Obtenção dos adenovírus recombinantes	43

2.2.6	Obtenção dos estoques-trabalho dos vírus influenza gerados	44
2.2.7	Extração de RNA viral e confirmação por PCR-transcriptase reversa	45
2.2.8	Imunizações	46
2.2.9	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e Western blot	47
2.2.10	The Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot)	48
2.2.11	Perfil fenotípico por citometria de fluxo (FACS)	49
2.2.12	Histopatologia e <i>score</i> inflamatório	49
2.2.13	Ensaio de Proteção	50
2.2.14	Análises estatísticas dos dados	50
2.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
2.3.1	Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa	51
2.3.2	Análise da indução da produção de imunoglobulinas específicas	53
2.3.3	Análise de resposta imune celular específica anti-ASP2	55
2.3.4	Ensaio de proteção em camundongos imunizados	56
2.3.5	Perfil inflamatório no tecido de animais vacinados e infectados	58
2.3.6	Perfil fenotípico das células CD8 efectoras	61
2.3.7	Perfil fenotípico das células CD8 de memória e capacidade de proteção	70
3	<b>CONCLUSÃO</b>	78
4	<b>PERSPECTIVAS</b>	80
5	Artigos desenvolvidos durante o doutorado	86
	a) Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against <i>Trypanosoma cruzi</i> Infection	86
	b) Protective Immunity and Safety of a Genetically Modified Influenza Virus Vaccine	99
6	<b>REFERÊNCIAS</b>	113
7	<b>ANEXOS</b>	121

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1:	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 2:	Construção dos plasmídeos de transferência	41
Figura 3:	Esquema da genética reversa dos vírus influenza	43
Figura 4:	Caracterização fenotípica dos vírus gerados por genética reversa	51
Figura 5:	Caracterização genotípica dos vírus gerados por genética reversa	52
Figura 6:	Esquema representativo do desenho experimental das imunizações	53
Figura 7:	Resposta humoral de soro individual de camundongos C57BL/6 vacinados com vírus recombinantes contra a proteína recombinante ASP2	54

Figura 8 – Representação gráfica do ELISA dos soros de camundongos C3H/He imunizados. Figura 9 – Produção de IFN- $\gamma$ por esplenócitos de camundongos C57BL/6 (A) e C3H/He (B) imunizados com vírus recombinantes e estimulados ex vivo com peptídeos imunodominantes respectivos (Fig. 2).	56
Figura 10 – Curvas de parasitemia e mortalidade dos camundongos imunizados com <i>T. cruzi</i> .	58
Figura 11 – Perfil inflamatório no fígado, coração e baço de animais imunizados e infectados.	60
Figura 12 – Perfil fenotípico de esplenócitos de animais C57BL/6 imunizados.	62
Figura 13 – Perfil efector polifuncional indireto sob estimulação com peptídeo TEWETGQI.	63
Figura 14 – Análise da frequência de células CD8+ produtoras de Perforina.	64
Figura 15 – Análise da frequência de células CD8+ imunodominantes.	65
Figura 16 – Análise fenotípica de imunodominância nos esplenócitos de camundongos imunizados.	66
Figura 17 – Protocolos de indução e reforço da resposta imune.	67
Figura 18 – Indução de IFN- $\gamma$ pelo protocolo homólogo de vacinação com influenza.	68
Figura 19 – Janelas de análise das populações de memória 21 dpb.	71
Figura 20 – Perfil das populações de memória de esplenócitos de animais C3H/He imunizados 21 dpb.	72
Figura 21 – Populações CD8+Dextrâmero TEWETGQI+ 120 dias após reforço.	74
Figura 22 – Populações de linfócitos CD8+ imunodominantes de memória.	75
Figura 23 – Perfil efector de esplenócitos estimulados com o peptídeo TEWETGQI 120dpb	76
Figura 24 – Parasitemia e mortalidade de animais imunizados e desafiados 130 dias após a imunização de reforço.	77
Figura 25 – Perfil imunológico específico anti-ASP2 em vacinação de modelo crônico de infecção por <i>T. cruzi</i> .	84
Figura 26 – Perfil polifuncional dos esplenócitos dos camundongos infectados cronicamente e vacinados.	85
Tabela 1 – Sobrevivência de camundongos C3H/He machos de 8-12 semanas de idade vacinados com influenza e MVA recombinantes para ASP2.	82



## **Organização Geral do Trabalho**

O primeiro capítulo do trabalho tem por função introduzir um breve histórico sobre vacinas, sua origem e seu desenvolvimento tecnológico. Este trabalho visa estudar o desenvolvimento e teste de um vetor vacinal, o vírus *influenza*. Também estudamos um vetor mais conhecido em inúmeros outros modelos vacinais, os *adenovírus*.

As doenças negligenciadas são obstáculos importantes em países em desenvolvimento. Como partes da abordagem do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas estão o apoio e o desenvolvimento de vacinas contra essas doenças. Neste contexto se insere nosso trabalho que trata do uso combinado de influenza e adenovírus recombinantes como vetores vacinais contra o protozoário causador da doença de Chagas, *T. cruzi*. As abordagens vacinais deste modelo são descritas no capítulo dois.

Abordaremos, então, conclusões dos resultados, vantagens e limitações do modelo durante o manuscrito e principalmente na conclusão da tese no capítulo 3.

Não menos importante, as perspectivas estão discutidas no capítulo 4 com alguns resultados preliminares e outras ideias a serem desenvolvidas posteriormente ao projeto.

Em seguida, no capítulo cinco estão apresentados os artigos advindos do doutoramento sendo o primeiro o projeto principal que discute a estratégia vacinal constante na tese. O segundo artigo foi advindo do estudo de um vetor alternativo para uma limitação importante do protocolo estudado – a manutenção da virulência viral em doses maiores que a vacinal.

## **CAPÍTULO UM**

### **1 *Introdução e Objetivos Gerais***

## **1.1 INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1.1 Uma breve história das vacinas**

As vacinas são consideradas uma das aplicações médicas mais bem sucedidas e eficazes na prevenção de doenças infecciosas. Em maio de 2012 os membros da Assembleia dos Estados da Organização Mundial de Saúde (OMS) endossou o plano vacinal de ação global dentro da visão que ao menos de 2 a 3 milhões de vidas são salvas por ano através de vacinação

([http://www.who.int/immunization/global\\_vaccine\\_action\\_plan/en/](http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/en/)) (Rappuoli, Pizza et al. 2014).

A OMS descreve vacinas como um preparado biológico que estimula a imunidade a uma doença em particular. Uma vacina tipicamente contém um agente similar ao micro-organismo causador da doença, e é frequentemente composta de formas mortas ou atenuadas do organismo, suas toxinas ou uma de suas proteínas de superfície. Tal agente estimula o sistema imune de forma a reconhecer o agente como não próprio, controlá-lo e memorizá-lo de forma que o sistema imune mais facilmente o reconheça e elimine em um próximo encontro (Organization 2014). Os conceitos apresentados na descrição da OMS estão presentes na origem da vacina, seu presente e seu futuro.

Dois hábitos são relacionados com o desenvolvimento do processo médico e vacinal dentro da História Natural: um é o de tentar aliviar o próprio mal-estar e o daqueles a nossa volta usando plantas que estão à disposição; e o outro é relacionado à observação de que uma pessoa pode ficar resistente a um veneno ou toxina administrando pequenas doses. Por consequência, os Chineses e sua medicina experimental apresentam já no século XI indícios de uso da maceração de lesão cutânea de varíola aspirada de forma intranasal para imunizar contra uma exposição posterior (Plotkin 2005). Em textos oficiais, a chamada “variolação” apareceu apenas no século XVII. Outro candidato para a origem da variolação é a Índia, onde pode ter sido desenvolvida separadamente ou importada. De um dos dois

lugares a varíola cutânea viajou para o Oriente Médio e África, e da Turquia à Grã-Bretanha (Fenner, Henderson et al. 1988; Plotkin 2005; Plotkin 2014).

Apesar do sucesso da varíolação, o número de fatalidades era um impedimento a sua aplicação. Assim, Edward Jenner, observando que ordenhadeiras que apresentavam pequenas lesões de varíola bovina nas mãos não desenvolviam a doença, desenvolveu o método de vacinar com a varíola bovina. A origem da palavra Vacina vem de “Vaccinus”, do Latim – que deriva da vaca (Plotkin 2014).

O desenvolvimento racional de vacinas tem sua pedra fundamental Louis Pasteur. Em 1881 Pasteur estudava cólera em galinhas que é causada pela bactéria gram-negativa *Pasteurella multocida*. Uma cultura deixada na bancada durante o verão foi inoculada em galinhas, porém não surtiu efeito. Pasteur preparou uma cultura fresca e inoculou as mesmas galinhas, entretanto elas não desenvolveram a doença (Pasteur 1880). Pasteur lançou então a hipótese de que patógenos poderiam ser atenuados através de choques ambientais, como temperatura, oxigênio e químicos e usados para vacinação e com isso obteve sucesso em Antraz e Raiva (Pasteur 1881). Assim originou-se sua famosa frase “O acaso favorece as mentes preparadas”.

O princípio de atenuação foi usado posteriormente em cultivo bacteriano em meio artificial, alterações de temperatura e atenuação por passagem seriada em animais que eram infectados, mas não desenvolviam a doença. A atenuação em embriões de galinhas e camundongos do vírus da Febre Amarela, por exemplo, ocorreu no início do século passado, entretanto seu maior risco era a não esterilidade das amostras obtidas. O mesmo ocorreu com a raiva e pólio. Em seguida, a segunda revolução tecnológica em vacinologia foi a utilização do cultivo de células desenvolvido para a atenuação viral. Este processo de passagem *in vitro* foi usado por Albert Sabin em sua vacina contra pólio, e outros usaram para desenvolverem vacinas contra rubéola, sarampo, varicela e caxumba (Enders, Weller

et al. 1949; Sabin, Hennesen et al. 1954; Katz, Kempe et al. 1960; Hilleman, Buynak et al. 1968).

Apesar de inúmeros avanços de técnicas acontecerem após os procedimentos descritos acima, os princípios utilizados no desenvolvimento de vacinas variam pouco de sua base fundamentada na atenuação e uso do patógeno ou partes dele.

### **1.1.2 Novas tecnologias em vacinas**

As vacinas são divididas em vivas atenuadas, de organismos inativados, frações proteicas ou sacarídeas e de organismos geneticamente modificados. Com o auxílio da biologia molecular dos organismos, iniciou-se uma revolução tecnológica no campo das vacinas. O co-cultivo de vírus para permitir o rearranjo gênico levou à geração das vacinas contra influenza A e B, bem como aumentou sua segurança e permitiu também a adaptação de linhagens resistentes a baixas temperaturas que são atenuadas à temperatura corporal (Francis, Salk et al. 1946; Maassab and DeBorde 1985). A vacina contra rotavírus também foi gerada através de rearranjo advindo de co-cultivo de rotavírus humano e bovino (Clark, Offit et al. 2006).

Uma revisão bibliográfica em vacinologia permite identificar algumas centenas de métodos inovadores para seu desenvolvimento. Para fins de breve citação, pois não é o objetivo deste manuscrito, estão as vacinas utilizando plantas geneticamente modificadas para codificarem em suas folhas, ou em outros tecidos, proteínas de micro-organismos de interesse médico (Penney, Thomas et al. 2011; Pelosi, Shepherd et al. 2012). Também vacinas utilizando eletroporação e DNA recombinante, ou proteínas recombinantes na presença de adjuvantes, entre outras (Dumonteil 2007; Finco and Rappuoli 2014). Vale ressaltar que há vacinas contraceptivas e testes de vacinas contra tabaco e outras substâncias que causam vício (Naz 2011; Fahim, Kessler et al. 2013). A maioria vai a testes clínicos e é suspensa por falta de segurança ou perda de eficácia quando produzidos em larga escala.

De modo geral, a primeira geração de vacinas foi desenvolvida racionalmente, mas de forma empírica (Rappuoli, Pizza et al. 2014), seguida dos novos métodos de atenuação, mas ainda sem muitas bases moleculares ou entendimento de mecanismos. As vacinas de DNA recombinante foram o próximo passo. Desde então, a formação de glicoconjugados de polissacarídeos e proteínas do tétano foram passos importantes, principalmente para imunização infantil cuja imunidade duradoura é mais dificilmente alcançada. O próximo passo foi a vacinologia reversa, que consiste na identificação de candidatos potenciais usando as sequências gênicas dos micro-organismos (Rappuoli, Pizza et al. 2014). Hoje, o futuro da vacinologia se resume então ao uso de métodos *in silico*, tais como vacinologia estrutural, biologia sintética de RNAs e o estudo aprofundado do sistema imune humano para o desenvolvimento de adjuvantes melhores e mais adequados ao perfil da doença (Plotkin 2005; Finco and Rappuoli 2014; Rappuoli, Pizza et al. 2014).

### **1.1.3 Vírus recombinantes como vetores vacinais**

Em 2005, estimava-se que o desenvolvimento de vacinas leva de 10 e 15 anos, e possui o custo entre 300 e 800 milhões de dólares, incluindo os custos dos projetos sem sucesso, que são a vasta maioria (Plotkin 2005). O fato do desenvolvimento de vacinas ser um processo lento, caro e árduo serve de desincentivo às empresas. Os primeiros programas vacinais a serem abandonados por consequência deste desincentivo foram das doenças consideradas negligenciadas, tais como doença de Chagas, Leishmaniose, dengue, entre outras. Por outro lado, ainda que uma empresa privada tenha resistência por menor lucro em desenvolver vacinas contra doenças negligenciadas, a humanidade economiza (não lucra) trilhões de dólares por ano por tratamentos e perda de produtividade além de salvar milhões de vidas com essas vacinas (<http://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/ivac/resources/vaccine-cost-effectiveness.html>). Hoje os programas de governo e fundações públicas e que recebem incentivos ou renúncias fiscais, por exemplo a fundação Bill e Melinda Gates são os principais investidores neste campo, e em nosso país as Universidades e Institutos de Pesquisas Públicos são os maiores investigadores.

Adjuvantes são considerados agentes farmacológicos ou imunológicos que ampliam e/ou modulam uma resposta antigênica (Mesa and Fernandez 2004). É um dos mais importantes campos de pesquisa em vacinologia, porém poucos chegam a serem usados em humanos devido à problemas em segurança e toxicidade (Marrack, McKee et al. 2009). A dependência de adjuvantes vacinais é muitas vezes um empecilho para seu sucesso em humanos, e neste manuscrito utilizamos um processo vacinal que dispensa o uso de adjuvantes: os vírus recombinantes.

Dentre os diferentes vetores para carrear antígenos heterólogos, algumas das estratégias mais promissoras são baseadas na utilização de vírus recombinantes (Harrop, John et al. 2006). Estes têm a capacidade de expressar antígenos heterólogos diretamente dentro das células hospedeiras, como aconteceria em uma infecção natural. Estudos utilizando diferentes vírus recombinantes (Vaccinia, adenovírus, sindbis e influenza) expressando antígenos do *Plasmodium yoelii*, mostraram que tais vírus induzem imunidade protetora em camundongos BALB/c frente a infecção experimental por esporozoítos do *P. yoelii* (Li, Rodrigues et al. 1993; Rodrigues, Li et al. 1994; Tsuji, Bergmann et al. 1998). Dentre os vírus acima citados, os adenovírus deficientes em replicação foram aqueles que se mostraram mais eficazes quando utilizados isoladamente, reduzindo em ~94% as formas hepáticas do *P. yoelii* e induzindo imunidade protetora em 40% dos camundongos (Rodrigues, Zavala et al. 1997). Quando os outros vetores virais foram utilizados isoladamente o nível de proteção obtido foi significativamente menor (Li, Rodrigues et al. 1993; Tsuji, Bergmann et al. 1998; Rodrigues, Boscardin et al. 2003). Entretanto, resultados muito mais animadores foram obtidos quando os animais foram submetidos a duas imunizações sequenciais (Li, Rodrigues et al. 1993; Rodrigues, Li et al. 1994; Murata, Garcia-Sastre et al. 1996; Shiver, Fu et al. 2002; Gherardi, Najera et al. 2003; Nakaya, Nakaya et al. 2004). Um exemplo da eficácia desta estratégia é a inibição total do desenvolvimento das formas hepáticas e 100% de proteção contra a malária em camundongos que foram primeiramente imunizados com adenovírus recombinantes

expressando a proteína CS do *P. yoelii* ou do *P. berghei*, e submetidos a imunização de reforço com vírus vaccínia carreando esta mesma proteína (Bruna-Romero, Gonzalez-Aseguinolaza et al. 2001; Gilbert, Schneider et al. 2002). Os vetores virais são capazes de induzir respostas do tipo Th1, levar à produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de células T (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) que são respostas mais comuns em doenças infecciosas (Rocha, Caetano et al. 2004).

#### 1.1.4 Adenovírus

Adenovírus são vírus não envelopados pertencentes à família *Adenoviridae*. Os adenovírus caracterizam-se por apresentarem DNA fita dupla linear com cerca de 36Kb, que se encontra empacotado em um cerne envolvido por um capsídeo proteico icosaédrico com 20 faces triangulares (Imler 1995). Esse é constituído de três estruturas proteicas principais, hexon, penton e fibras. Os hexons constituem as faces triangulares do capsídeo. Os pentons formam os vértices da partícula, a partir dos quais se projetam as fibras, responsáveis pela interação com os receptores celulares (Nicklin, Wu et al. 2005).

Dentre as características dos adenovírus algumas foram decisivas na escolha destes vírus como ferramenta de vacinação. Entre elas, (I) baixa patogenicidade, o que permite o desenvolvimento de vetores de imunização praticamente inócuos aos hospedeiros; (II) habilidade de infectar uma ampla variedade de células, além de células pós-mitóticas; (III) as estratégias de replicação e genoma já foram caracterizadas, sendo o material genético viral incapaz de integrar-se ao da célula hospedeira; (IV) eles são relativamente estáveis e fáceis de manipular, dispensando refrigeração quando liofilizados; (V) fácil propagação, podendo ser obtidos em altos títulos (>10<sup>9</sup> unidades formadoras de placas/mL), o que permite sua produção em larga escala (Babiuk and Tikoo 2000; Souza, Haut et al. 2005); (VI) Finalmente, esses vírus são muito imunogênicos, sendo capazes de estimular tanto resposta imune inata quando a resposta imune adaptativa (Ginsberg, Horswood et al. 1990; Ginsberg, Moldawer et al. 1991; Yang, Xiang et al. 1995). Os adenovírus recombinantes principalmente do tipo humano AdHu5 foram, pelo menos na última década, os mais



promissores vetores virais vacinais. Testes em fase clínica 1 e 2 estão sendo realizados com estes vetores em malária (Limbach and Richie 2009). Tais vírus também são capazes de infectar células dendríticas, além de estimularem resposta imune contra diversos patógenos (Bruna-Romero, Lasarte et al. 1997; Molinier-Frenkel, Lengagne et al. 2002; Miyahira, Takashima et al. 2005; Caetano, Bruna-Romero et al. 2006; de Alencar, Persechini et al. 2009; Machado, Caetano et al. 2010). A resposta adjuvante induzida pelo AdHu5 parece ser principalmente CD8+, sendo ainda capazes de estimular resposta imunológica de memória (Hovav, Panas et al. 2007; Limbach and Richie 2009).

Em 2006, nosso grupo conseguiu alcançar ótimos níveis de proteção e resposta imunológica utilizando adenovírus humano do tipo 5 (AdHu5) carreando genes para duas proteínas de *T. cruzi*, *trans-sialidase* (TS) e ASP2 em BALB/c e C57BL/6 (Machado, Cardoso et al. 2006). Porém imunizações com o mesmo vetor viral podem ter efeito reduzido devido à resposta imunológica contra o próprio vetor, neutralizando a infecção e impedindo a reapresentação do antígeno heterólogo (Liu, Ewald et al. 2008; Ahi, Bangari et al. 2011). Uma maneira de contornar essa limitação é usar protocolos de indução e reforço utilizando mais de um vírus recombinante expressando o mesmo segmento antigênico (protocolo heterólogo de indução e reforço da resposta imune). Assim, sem resposta secundária ao vetor e com resposta secundária ao antígeno, há o aumento da eficiência do protocolo de vacinação (Rocha, Caetano et al. 2004).

### **1.1.5 Influenza**

Pertencentes à família *Orthomyxoviridae*, os vírus influenza possuem genoma segmentado de RNA fita simples e polaridade negativa. Existem três diferentes subtipos de vírus influenza: A, B ou C, sendo o mais importante para o homem os vírus influenza A, principais causadores de epidemias e pandemias em humanos (Fields, Knipe et al. 2007). Estes vírus possuem um envelope no qual as duas proteínas transmembranas hemaglutinina (H ou HA) e neuraminidase (N ou NA) estão inseridas. Os vírus influenza se dividem em diferentes subtipos em função das diferentes HA e NA sendo hoje conhecidos

ao menos 18 tipos de HA (H1 a H18) e 11 diferentes neuraminidase (N1 a N11) (<http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>). A HA é a proteína responsável pela fixação do vírus às moléculas de ácido siálico e pela penetração na célula hospedeira. A neuraminidase atua removendo o ácido siálico que recobre as células epiteliais do trato respiratório (nas quais ocorre a multiplicação viral) e do próprio vírus, evitando assim a aglutinação das partículas virais entre si e facilitando a sua propagação no meio extracelular (Julkunen, Melen et al. 2000; Nayak, Hui et al. 2004; Fields, Knipe et al. 2007).

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

Os vírus influenza recombinantes são considerados bons candidatos a vetores vacinais, visto que não se integram ao genoma do hospedeiro, possuem alta transdução do inserto recombinante e têm boa capacidade de infectar células apresentadoras de antígeno, além de serem excelentes estimuladores de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Kittel, Ferko et al. 2005). Nos Estados Unidos já existem cepas atenuadas e vacinas vivas licenciadas para uso em humanos, porém não como vetores (Ben-Yedidia and Arnon 2005). Em modelos experimentais, diversas vacinas utilizam influenza recombinantes como vetores com resultados promissores (He, Martinez-Sobrido et al. 2007), desde doenças infecciosas como malária (Gonzalez-Aseguinolaza, Nakaya et al. 2003), toxoplasmose (Machado, Caetano et al. 2010) e até câncer (Restifo, Surman et al. 1998). As técnicas de biologia molecular para a manipulação genética deste vírus já encontram bastante desenvolvidas (Neumann and Kawaoka 2002; Neumann, Whitt et al. 2002; Neumann and Kawaoka 2004) e existem diferentes estratégias para a expressão de proteínas heterólogas (Garcia-Sastre, Muster et al. 1994; Percy, Barclay et al. 1994; Takasuda, Enami et al. 2002; Machado, Naffakh et al.

2003; Watanabe, Watanabe et al. 2003). Soma-se às vantagens acima citadas a capacidade deste tipo de vetor em induzir resposta imune heteroespecífica tanto local quanto sistêmica (Gherardi, Najera et al. 2003; Garulli, Kawaoka et al. 2004); a existência de tecnologias bem desenvolvidas para a produção de vírus influenza em larga escala e; a possibilidade de se utilizar vírus defectivos para a replicação (Stech, Garn et al. 2005) ou cepas virais atenuadas (Gonzalez-Aseguinolaza, Nakaya et al. 2003).

Entre as desvantagens deste sistema estão a proteção prévia a outros subtipos de influenza, a manutenção de virulência viral e velocidade de produção. Testes de toxicidade, virulência, segurança em pacientes imunocomprometidos serão necessários para cada subtipo. Além disso, quais doenças seriam adequadas para a produção e avaliação se outros subtipos de influenza geram a mesma resposta imune seriam inconvenientes importantes a serem considerados.

Em 2010 foi demonstrada em camundongos a capacidade dos vírus influenza recombinantes em reduzir o número de cistos cerebrais de *Toxoplasma gondii* e direcionar a resposta específica para Th1 quando usados em vacinação sequencial com AdHu5 carreando o gene que codifica a proteína de superfície SAG2 do parasito (Machado, Caetano et al. 2010). O que realça a viabilidade dessa estratégia.

Assim sendo, o próximo passo foi o desenvolvimento e teste deste protocolo vacinal em um modelo no qual as células CD8 possuem papel fundamental para a proteção, e cujos quais uma resposta imunológica específica pudesse ser medida com peptídeos CD8. O modelo experimental da doença de Chagas possui estas características.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

- *Construção e caracterização de vírus influenza recombinantes para uso como vetores vacinais em modelo murino de infecção pelo **Trypanosoma cruzi** (capítulo 2).*

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Construir e caracterizar genotípica e fenotipicamente, em cultivo celular, vírus influenza recombinantes carreando a proteína ASP2 de Trypanosoma cruzi.*
- *Avaliar a resposta imune heteroespecífica humoral e celular em camundongos imunizados com vírus influenza e adenovírus recombinantes para ASP2. Caracterizar as diferenças de respostas imunológicas comparando o protocolo homólogo e heterólogo de vacinação.*
- *Determinar a proteção induzida pela vacinação sequencial com influenza e adenovírus carreando antígenos da proteína ASP2 frente ao desafio com parasitos da cepa Y de Trypanosoma cruzi em linhagem resistente (C57BL/6) e susceptível (C3H/He).*
- *Determinar a resposta imunológica de memória específica anti-T. cruzi induzida após a vacinação, além de testar a resposta de memória e proteção em um período maior que 100 dias após a imunização de reforço.*

## **CAPÍTULO DOIS**

# ***2 Construção e caracterização de vírus influenza recombinantes para uso como vetores vacinais em modelo murino de infecção pelo Trypanosoma cruzi.***

## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 Doença de Chagas e sua importância

Mais de cem anos após sua descrição (Chagas 1909), a doença de Chagas ainda é um importante problema de saúde pública, sobretudo na América Latina. Em 2005, a OMS adicionou a doença de Chagas na lista de doenças tropicais negligenciadas. Estima-se que até cem milhões de pessoas vivem em áreas de risco nos países endêmicos, além da mortalidade anual chegar a treze mil indivíduos devidos a complicações clínicas e dificuldades de tratamento farmacológico (Rassi, Rassi et al. 2010; Vazquez-Chagoyan, Gupta et al. 2011). Apesar disso, houve um aumento na prevalência da doença em países desenvolvidos (Gascon, Bern et al. 2010; Bern, Kjos et al. 2011), fato que pode ser explicado pela migração de indivíduos infectados conjuntamente com a ausência de experiência dos órgãos de saúde na falta de contato com a doença, e consequentemente, aumento da infecção por transfusão sanguínea, infecção congênita e transplante de órgãos (WHO 2009; Biolo, Ribeiro et al. 2010). Somente no Brasil estima-se de 2,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas com a mortalidade anual de cerca de 5 mil indivíduos (Anais do 30<sup>th</sup> Meeting on Applied Research on Chagas' Disease, 2014, a ser publicado).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi* pertencente à família Tripanosomatidae. Essa família é formada por parasitas obrigatórios. Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* possuem ciclo digenético, isto é, possuem um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado. Todas as classes de vertebrados possuem um *Trypanosoma sp.* parasito conhecido (Simpson 1995).

O *Trypanosoma cruzi* pode ser transmitido por mais de 100 espécies da subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Dentre as inúmeras espécies, no Brasil, três gêneros são os mais importantes responsáveis pela transmissão da doença, *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Kelly 2000; Teixeira, Nitz et al. 2006). Mais comumente conhecido como barbeiro ou chupança, os triatomíneos adultos possuem

hábitos noturnos e muitas vezes domiciliares. O controle do vetor é a forma mais eficaz de combate à transmissão da doença de Chagas na atualidade e seus benefícios são evidentes. Porém, o avanço do desmatamento causa deslocamento de animais silvestres infectados e pode aumentar a transmissão em novas localidades (Gonçalves and Costa). Assim, a melhoria das residências associada à informação sobre saúde e acompanhamento médico também caracteriza uma frente essencial de combate à transmissão da doença (Salvatella, Irabedra et al. 2014). Em 2006, a Comissão de Iniciativa Intergovernamental do Cone Sul Contra a Doença de Chagas declarou que o Brasil foi considerado livre da transmissão da doença de Chagas por vetores da espécie *Triatoma infestans*, marco importante visto que essa espécie era endêmica em mais de 700 municípios dos doze estados mais populosos (Schofield, Jannin et al. 2006). Outros países se beneficiaram com o programa, tais como Uruguai, Paraguai, parte da Argentina e Chile, porém este resultado pode relaxar as políticas públicas e diminuir o investimento, acarretando um atraso muito grande na redução da transmissão da doença e controle eficaz da população de barbeiros. Em todos os casos, a varredura dos bancos de sangue, novos diagnósticos, terapias, tratamentos e pesquisas se fazem necessários no combate a este importante agente etiológico (Schofield, Jannin et al. 2006; Teixeira, Nitz et al. 2006). Uma importante fonte de transmissão cuja infecção aguda leva a uma maior mortalidade ocorre através de caldo de cana, açaí entre outras fontes alimentares que quando são maceradas na presença de barbeiros infectados levam à transmissão oral da doença. Há estimativas de que 50 mil pessoas são infectadas por ano com o parasito *T. cruzi* (Anais do 30<sup>th</sup> Meeting on Applied Research on Chagas' Disease, 2014, a ser publicado).

Do ponto de vista de sintomatologia, a doença de Chagas possui diagnóstico complexo, visto que os sintomas variam dependendo do paciente e muitas vezes sem um padrão característico. A doença de Chagas é dividida em duas fases: aguda, e crônica, valendo ressaltar que nem todos os pacientes apresentam de forma clara sintomas referentes a essas fases e boa parte destes podendo regredir naturalmente (Andrade,

Andrade et al. 1994; Rassi, Rassi et al. 2000). Muitas vezes os sinais passam despercebidos, uma vez que a fase aguda pode durar poucas semanas acompanhadas de sinais não específicos, tais como febre, taquicardia, fraqueza, linfadenopatia, sudorese e, muito raramente, meningoencefalite (Parada, Carrasco et al. 1997). Dois sinais clínicos específicos que ajudam no diagnóstico ainda na fase aguda são: 1) inflamação da pele no local da entrada do parasito, conhecido como chagoma e 2) o sinal de Romaña bipalpebral. Porém nem todos os pacientes apresentam estes sinais clínicos (Kierszenbaum 2007; Biolo, Ribeiro et al. 2010). Além disso, o exame sorológico somente identifica a doença na fase crônica, sendo necessária para diagnóstico durante a fase aguda a detecção de parasitos no sangue por microscopia. Estes fatores limitam muito o tratamento eficaz da doença, visto que os dois medicamentos disponíveis atualmente, nifurtimox e benznidazol são principalmente eficazes na fase aguda. Apesar disso, há indícios de que no tratamento com as duas drogas durante a fase crônica há redução da gravidade dos sintomas e pode reduzir morbidade (Tarleton, Reithinger et al. 2007; WHO 2009).

A forma indeterminada é caracterizada pela ausência de sinais clínicos, apesar de poder haver sinais subclínicos. Essa fase dura de meses a décadas, sendo que miocardite, por exemplo, pode ser indetectável em eletrocardiograma e raios-X do tórax. Estima-se que dois terços dos pacientes possuem lesão no miocárdio (Davila, Rossell et al. 1989; Abuhid, Pedroso et al. 2010). Apenas um terço dos pacientes apresenta sinais na fase crônica, sendo os mais frequentes são danos graves no miocárdio levando a arritmias, aneurisma ventricular apical e falha congestiva no coração. Outros sinais frequentes são insuficiência cardíaca, megaesôfago e megacólon, porém são mais endêmicos na região central do Brasil (Andrade, Andrade et al. 1994; Kierszenbaum 2007).

### **2.1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***

O ciclo de vida do *T. cruzi* possui um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (Chagas 1909). Um triatomíneo da família Reduviidae suga o sangue de um mamífero infectado (Figura 1.1). Este inseto é popularmente conhecido como barbeiro,



possuindo hábitos noturnos e usualmente urina e defeca durante o repasto sanguíneo (Nagajyothi, Machado et al. 2012). Do sangue do hospedeiro infectado, o barbeiro obtém basicamente formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Tais formas são extracelulares e não replicativas, nas quais o parasito se apresenta numa forma alongada e com flagelo curto. No intestino do barbeiro as formas tripomastigotas se diferenciam a formas esferomastigotas, as quais são replicativas e aflageladas, mantendo um pequeno sulco flagelar (Nagajyothi, Machado et al. 2012). Em seguida, as formas esferomastigotas derivam para formas epimastigotas, a partir de um alongamento do flagelo (Figura 1.2) e também se replicam por divisões binárias (Figura 1.3). Então, as formas epimastigotas passam a interagir com o epitélio mucoso do intestino do triatomíneo e ocorre a transformação para a forma tripomastigota metacíclica através de um encurtamento do flagelo e afinamento do citoplasma (Figura 1.4). Uma vez formadas, essas formas metacíclicas são liberadas na excreta do barbeiro no momento de um sequente repasto sanguíneo (Figura 1.5). O mamífero pode se infectar por contato das fezes do barbeiro com a lesão causada pela picada, interação das formas metacíclicas com a membrana mucosa e através da ingestão da excreta ou de fragmentos do barbeiro infecatado (Figura 1.5) (Kelly 2000; Tyler and Engman 2001).

As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar um grande número de células de mamíferos (Figura 1.6) (Tyler and Engman 2001). A invasão ocorre com um direcionamento por microtúbulos de lisossomos para a região de ligação do parasito com a célula, até circundar o parasito e permitir sua entrada (Chiribao, Libisch et al. 2014). A acidificação do meio induz a expressão de proteínas de evasão do vacúolo. Uma vez no citoplasma, há a diferenciação para formas amastigotas intracelulares, que se dividem assexuadamente até formarem um pseudocisto ou ninho (Figura 1.7). Quando em grande quantidade, as formas amastigotas atingem a corrente sanguínea após diferenciação para tripomastigotas sanguíneas, que possuem um citoplasma maior que as formas metacíclicas (Figura 1.8). Essas formas podem escapar dos ninhos e infectar outras células de maneira

parecida com as formas metacíclicas (Figura 1.7) (Fernandes and Andrews 2012). A presença de raras formas amastigotas e, principalmente, tripomastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero permitem que o ciclo se complete em um posterior repasto sanguíneo do barbeiro (Figura 1.8) (Kelly 2000; Tyler and Engman 2001).

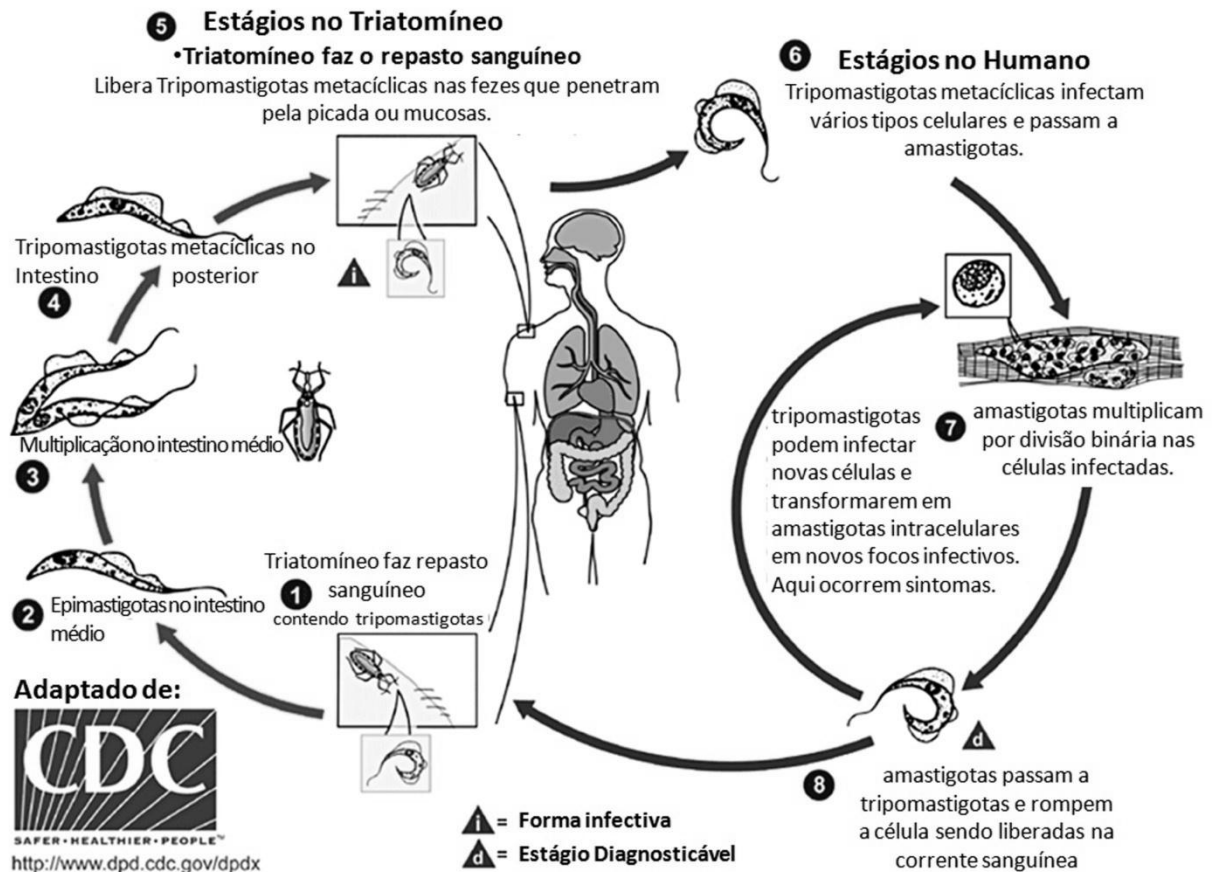


Figura 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Figura adaptada do sítio da rede

<http://www.cdc.gov/parasites/Chagas/biology.html>.

### 2.1.3 Resposta imunológica na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A resposta imune inata em mamíferos infectados pelo *T. cruzi* tem papel essencial no reconhecimento do parasito e direcionamento adequado para o desenvolvimento da resposta adaptativa. Na fase aguda da doença, a resposta imune inata controla a replicação do parasito e sua dispersão pelos tecidos. A Interleucina-12 (IL-12) é a principal responsável pelo direcionamento da resposta adaptativa para Th1, através da estimulação da produção

de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e ativação de células natural killer (NK) (Kayama and Takeda 2010). O IFN- $\gamma$  também é responsável pela ativação de macrófagos, que, por sua vez, são capazes de eliminar ou impedir multiplicação dos parasitos intracelulares através da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). De fato, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* (Kayama and Takeda 2010). Igualmente, somente a presença de IFN- $\gamma$  e NO não são capazes de conter a severidade da infecção, visto que macrófagos de camundongos deficientes (KO) em LRG-47, uma GTPase induzida por IFN- $\gamma$ , possuem produção normal de NO sintase tipo II e TNF- $\alpha$ , porém são ineficazes de eliminação das formas amastigotas *in vitro* (Santiago, Feng et al. 2005). Tais resultados demonstram um papel da LRG-47 na eliminação dos parasitos e indicam a importância do interferon- $\gamma$ .

A ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) induz a expressão dessas citocinas por células do sistema imune, mais especificamente, TLRs 2, 4 e 9 e a molécula adaptadora Myd88 são ativados pela presença do parasito (Campos and Gazzinelli 2004; Bafica, Santiago et al. 2006). O TLR2 é fortemente ativado pelas âncoras GPI e pela proteína secretada do *T. cruzi* Tc52 (Monteiro, Schmitz et al. 2006). O TLR4 é ativado pela forma epimastigota do parasito, através do subtipo de âncoras GPI glico-inositol-fosfolipídeos (GIPLs), e seu papel na proteção contra a infecção é controverso. Por fim, o TLR9, endosomal, reconhece o DNA genômico do parasito, sendo então ativado induzindo diversas citocinas importantes na eliminação do parasito. De fato, estudos mostram que macrófagos derivados de camundongos deficientes em TLR9 são deficientes na produção de IL-6, IL12p40 e NO (Bafica, Santiago et al. 2006; Bartholomeu, Ropert et al. 2008; Kayama and Takeda 2010). A infecção pelo *T. cruzi* também ativa resposta imune TLR-independente, através do reconhecimento direto por Nod1 e ativação de NF $\kappa$ B, que levam a produção de IFN- $\gamma$  causados pelo aumento da concentração de Ca<sup>++</sup> intracelular em células T ativadas (Kayama, Koga et al. 2009; Kayama and Takeda 2010).

A resposta imunológica adaptativa contra a infecção pelo *T. cruzi* tem como principal agente as células T CD8+ (Rodrigues, Boscardin et al. 2003). Estudos demonstram que camundongos deficientes em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo II apresentaram mortalidade e parasitemia altas comparáveis aos animais deficientes em MHC do tipo I, frente ao desafio com *T. cruzi* (Tarleton, Grusby et al. 1996). Já foi demonstrado também que a depleção de linfócitos T CD4 em modelo de vacinação influencia na mortalidade, ainda que não tão fortemente quanto a ausência dos linfócitos T CD8 (Paiva, Castelo-Branco et al. 1999; Machado, Cardoso et al. 2006; de Alencar, Persechini et al. 2009). Ademais, sua ajuda na proteção é efetiva, uma vez que linfócitos CD4 do tipo Th1 são capazes de mediar lise provocada por NO, além de serem auxiliaadoras dos linfócitos citotóxicos CD8+ (Rodrigues, Ribeiro et al. 2000). A falta de linfócitos T CD4 em camundongos resultou em menor número de CTLs e consequentemente comprometimento da capacidade de proteção (Padilla, Xu et al. 2007). Os mecanismos usados pelas CTLs no controle da infecção variam desde eliminação direta das células infectadas à secreção de citocinas principalmente IFN- $\gamma$  (Haggerty, Meyer et al. 1960; Muller, Sobek et al. 2003). A produção de NO por macrófagos é dependente do IFN- $\gamma$ , visto que camundongos que não possuem receptores de IFN- $\gamma$  têm macrófagos deficientes na produção de NO (Rodrigues, Boscardin et al. 2003). Ademais, os camundongos deficientes na produção de NO são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* de diferentes cepas (Rodrigues, Ribeiro et al. 2000).

A resposta CD8 é diretamente relacionada à imunodominância, na qual podemos encontrar competição na apresentação de antígenos que restringiria a população específica CD8 que seria ativada (Rodrigues, de Alencar et al. 2008; Tzelepis, de Alencar et al. 2008; de Alencar, Persechini et al. 2009; Dominguez, Silveira et al. 2011). Células T CD8 contra a proteína de superfície amastigota (ASP2) foram detectadas no sangue de pacientes infectados na fase crônica, indicativo de sua importância imunológica (Pan and McMahon-Pratt 1989). Assim, inúmeros grupos testaram e testam epitopos ou a proteína ASP2

completa com resultados promissores. Entre eles encontramos uso de proteína recombinante, vacina de DNA ou vírus recombinantes expressando epítomos ou a ASP2 em diferentes linhagens de camundongos (Boscardin, Kinoshita et al. 2003; Vasconcelos, Hiyane et al. 2004; Machado, Cardoso et al. 2006; de Alencar, Persechini et al. 2009; Duan, Yonemitsu et al. 2009).

Os mecanismos antiparasitários mediados pelas células CD8 são múltiplos, incluindo secreção de citocinas e citotoxicidade direta contra células infectadas (Muller, Sobek et al. 2003; de Alencar, Persechini et al. 2009). Como acima ressaltada a importância do IFN- $\gamma$  e das células CD8 esta proteção se dá quando estas células estão presentes no coração e nos tecidos (Silverio, Pereira et al. 2012). Porém, o papel dos linfócitos citotóxicos perforina<sup>+</sup> foi também associado à miocardite e disfunção cardíaca em modelo murino quando células CD8<sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> estavam presentes no tecido cardíaco (Silverio, de-Oliveira-Pinto et al. 2009; Silverio, Pereira et al. 2012).

A resposta humoral tem papel limitado às fases extracelulares do parasito, e sua remoção não impacta negativamente a mortalidade em modelo murino (Hoft, Eickhoff et al. 2007). Entretanto, os anticorpos têm papel relevante na sobrevivência à fase aguda e no controle da parasitemia na fase crônica em camundongos altamente susceptíveis (Umekita and Mota 2000). Foi demonstrado que terapia com imunoglobulinas poliespecíficas, de doadores saudáveis inoculadas pela via intravenosa melhora a sobrevivência em modelo experimental quando administradas ainda na fase aguda (Olivieri, Vasconcellos et al. 2010). Um papel muito importante para os linfócitos B na proteção contra desafio na doença de Chagas foi o de células apresentadoras de antígeno, fazendo uma apresentação cruzada dos epítomos imunodominantes para os linfócitos T CD8. Papel este que pôde ser confirmado com o aumento da expressão de MHC I e da molécula co-estimuladora CD80 nas células B na presença de antígeno de *T. cruzi* (Hoft, Eickhoff et al. 2007). Foi identificada depleção rápida no número de células B imaturas na medula óssea e periferia após a infecção pelo *T. cruzi*, podendo auxiliar no processo de escape do parasito para a

fase crônica. No baço, há uma ativação policlonal de células B e T, o que acaba por induzir apoptose para manutenção da homeostase via interação Fas-FasL e liberação de Gal-1 (Grisotto, D'Imperio Lima et al. 2001; Acosta Rodriguez, Zuniga et al. 2007).

#### **2.1.4 Estratégias de vacinação contra a infecção por *Trypanosoma cruzi***

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

Dados os mecanismos de morte celular por CTLs e macrófagos via ativação por IFN- $\gamma$ , Dumonteil postulou que uma vacina protetora contra a infecção pelo *T. cruzi* seria direcionada para o perfil Th1 e caracterizada por alta produção de IFN- $\gamma$  (Dumonteil 2007; Dumonteil 2009). Além disso, anticorpos líticos e rápida ativação de CTLs são importantes no controle da infecção (Dumonteil 2009). A participação efetiva de células CD4<sup>+</sup> foi determinada baseada no fato de que a imunização apenas com epítopos CD8<sup>+</sup> não são protetoras em camundongos frente ao desafio com o *T. cruzi* (de Alencar, Araujo et al. 2007). Por fim, linfócitos B funcionando como células apresentadoras de antígenos profissionais se mostraram importantes na imunidade protetora induzida por DNA recombinante (Hoft, Eickhoff et al. 2007). Vale ressaltar que a maioria das avaliações de vacinação contra doença de Chagas advém de modelo experimental usando camundongos e que esta é uma limitação importante, exigindo cautela nas extrapolações.

A ASP2 da subfamília II das trans-sialidases é expressa nas formas amastigotas do *T. cruzi* e foi capaz de induzir anticorpos e células CD8<sup>+</sup> específicas em pacientes na fase crônica da doença de Chagas (Pan and McMahon-Pratt 1989; Wizek, Palmieri et al. 1998). Estudos de vacinação utilizando-se deste antígeno com cDNA, proteína ou vírus recombinantes estimularam células CD4<sup>+</sup> Th1 e células CD8<sup>+</sup> Tc1, resultando em potente

imunidade protetora em pelo menos três linhagem geneticamente diferentes de camundongos e duas cepas diferentes (Boscardin, Kinoshita et al. 2003; Vasconcelos, Hiyane et al. 2004; Machado, Cardoso et al. 2006; de Alencar, Persechini et al. 2009). Além disso, um estudo de proteção cruzada entre diferentes cepas de *T. cruzi* demonstrou que poucas cepas podem expressar isoformas diferentes de ASP2 que não compartilham epítomos protetores (Claser, Espindola et al. 2007). O que faz desse antígeno um importante alvo para vacinação contra a doença de Chagas.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Uso de células e animais

Camundongos convencionais das linhagens C57BL/6 e C3H/He machos, de 8 a 12 semanas de idade foram adquiridos junto ao Biotério de Produção (BIOT) do Centro de Pesquisas René Rachou e no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz-RJ e mantidos de acordo com as recomendações de padrão institucionais. Licença do CEUA LW9-09.

Células MDCK foram cultivadas a 37°C em ambiente úmido contendo 5% CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas em meio Dulbecco Eagle Modificado completo (DMEM, Sigma) contendo 1mM de piruvato de sódio, 4,5 mg/mL de L-glicose, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina suplementado com 5% (MDCK) de soro fetal bovino (SFB, CUTILAB) ou 10% (293T). A cepa Y do *T. cruzi* foi mantida através de passagem seriada em camundongos Webster-Suíços a intervalos de 14 dias. Os desafios infecciosos foram efetuados inoculando-se 500 (C3H/He) ou 1000 (C57BL/6) tripomastigotas sanguíneos da cepa Y via intraperitoneal. A sobrevivência foi monitorada diariamente e a parasitemia mensurada contando-se os parasitos em 5 µL de sangue fresco retirado da veia caudal (Brener 1962).

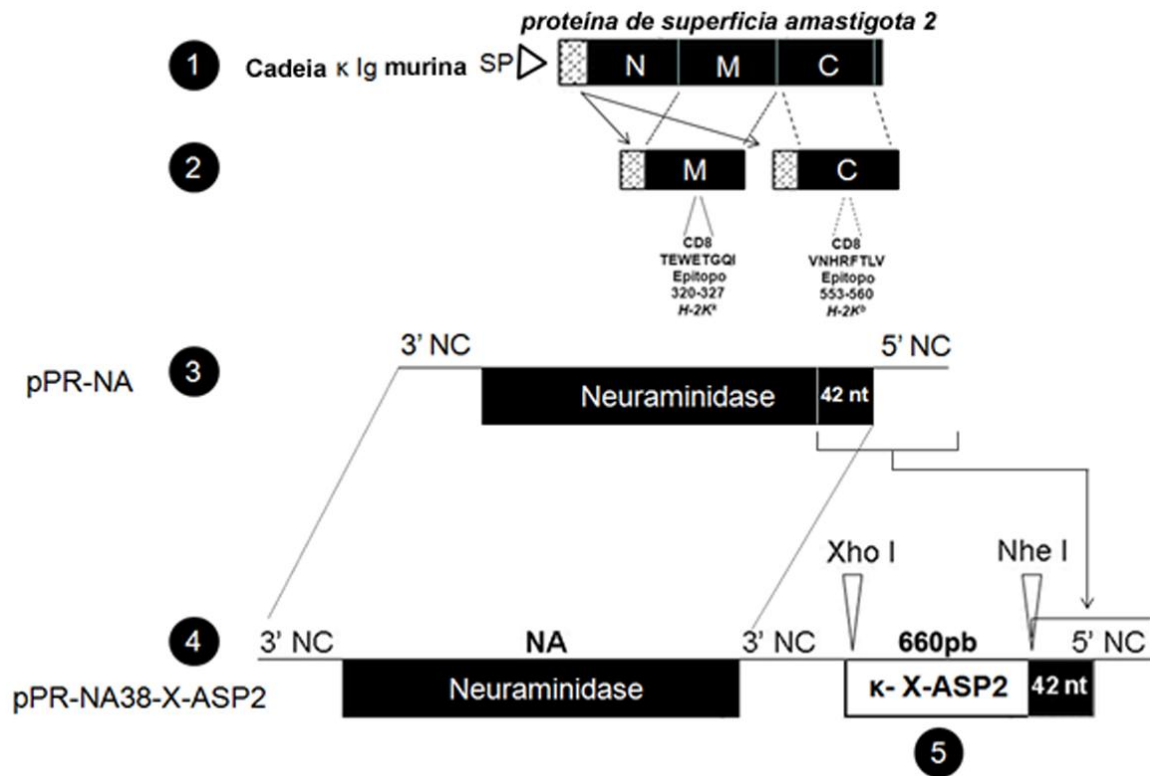
### 2.2.2 Peptídeos

Os peptídeos da proteína ASP2 VNHRFTLV e TEWETGQI (Figura 2.2) foram adquiridos da empresa Genscript (Piscataway, NJ). A pureza determinada foi maior que 90%. Suas identidades foram confirmadas por Q-TOF Micro equipado com fonte de ionização eletrospray (Micromass, United Kingdom).

### 2.2.3 Construção dos plasmídeos para genética reversa dos vírus influenza

O plasmídeo selvagem (pPRNA) e o dicistrônico (pPRNA38) do segmento da neuraminidase (NA) do vírus AWSN/33 (H1N1) foram construídos como previamente descrito (Machado, Naffakh et al. 2003; Vieira Machado, Naffakh et al. 2006). O gene da ASP2 foi dividido em três segmentos de 660 pares de base (pb), os quais destacamos a porção medial (M-ASP2) e C-terminal (C-ASP2) por codificarem regiões que contém peptídeos imunodominantes conhecidos (Figura 2). Essas sequências foram obtidas por PCR usando o plasmídeo pAdCMV-ASP2 como molde (Machado, Cardoso et al. 2006) e *primers* específicos para cada porção. Os *amplicons* foram clonados no plasmídeo digerido pIgSP ao nível dos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas de restrição KpnI e NheI em *tandem* com a sequência que codifica a cadeia *kappa* da imunoglobulina murina, permitindo a secreção das porções heterólogas (Boscardin, Kinoshita et al. 2003). Os constructos resultantes foram usados como molde para gerarmos os segmentos IgSP-M e C-ASP2, os quais foram clonados de forma sítio dirigida no vetor pPRNA38 (Figura 2.5). Os plasmídeos resultantes foram chamados pPR-NA38-M-ASP2 e pPR-NA38-C-ASP2 (Fig. 2), analisados usando “Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT®”(AMERSHAM) e o sequenciador “Megabace 1000 automatic” (AMERSHAM).



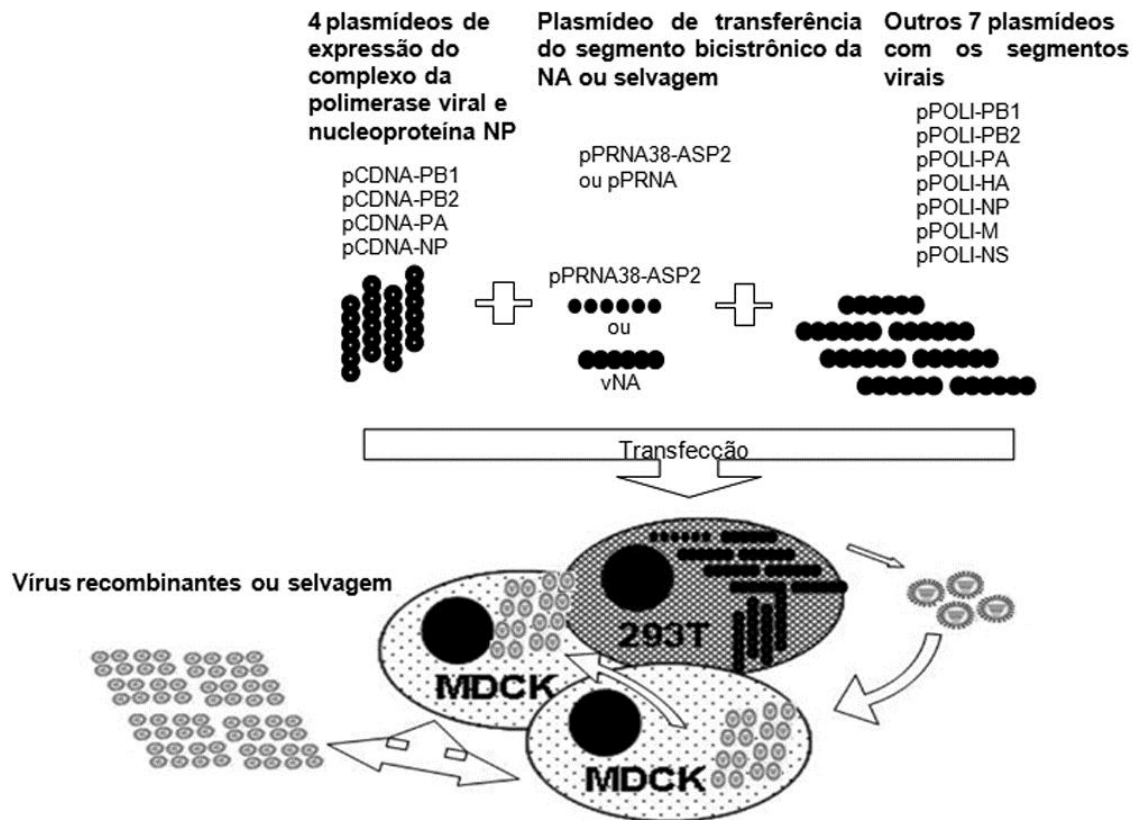


**Figura 2 – Construção dos plasmídeos de transferência.** 1 – Representação da sequência da proteína de superfície amastigota 2 (ASP2) do *T. cruzi* denotando a divisão em três partes para recombinação com o segmento da neuraminidase do vírus influenza. Este plasmídeo é derivado do clone 9 pIgSP-ASP2 (Boscardin, Kinoshita et al. 2003), usado também na construção do adenovírus recombinante para ASP2 (Machado, Cardoso et al. 2006). 2 – Após amplificação das sequências gênicas correspondentes às regiões M e C-ASP2, foi adicionada a porção secretória da cadeia kappa de imunoglobulina murina em *tandem* em cada uma delas. Ainda está denotado o posicionamento de correspondência proteica dos epítomos imunodominantes presentes em cada porção. 3 – Representação esquemática do segmento da neuraminidase selvagem do vírus influenza, usado para geração do plasmídeo recombinante. 4 – Esquema do plasmídeo recombinante pPR-NA38 onde podemos notar que ele deriva da conservação da sequência completa da neuraminidase, a duplicação da região 3' não codificadora (NC), do inserto recombinante, e da região 5' NC. 5 – Representação do inserto recombinante de 660 pares de base (pb) inserido entre as sequências para clonagem com as enzimas de restrição Xho I e Nhe I seguido da conservação dos últimos 42 nucleotídeos (nt) codificadores da neuraminidase.

## 2.2.4 Obtenção dos vírus influenza recombinantes

Os vírus influenza foram obtidos por genética reversa de acordo com a técnica descrita previamente por Fodor e colaboradores em 1999 (Figura 3) (Fodor, Devenish et al. 1999). Resumidamente, co-cultivos sub-confluentes de células HEK-293T ( $4 \times 10^5$  por poço) e MDCK ( $3 \times 10^5$  por poço) cultivadas em DMEM completo suplementado com 10% de soro

fetal bovino (SFB), foram transfectadas com 0,5µg de cada plasmídeo citado abaixo, utilizando-se o reagente de transfecção Fugene® 6 (ROCHE). Na referida transfecção, utilizou-se os plasmídeos de transferência codificando o segmento selvagem (pPR-NA) ou recombinante da NA (pPR-NA38-SAG2, pPR-NA38-M-ASP2, pPR-NA38-C-ASP2), bem como os que codificam os demais 7 segmentos do vírus influenza (pPoli -PB1, pPoli-PB2, pPoli -PA, pPoli -NP, pPoli -M, pPoli -NS e pPoli -HA). Esses plasmídeos foram construídos sob controle da região promotora e terminal da RNA polimerase I e a sequência da ribozima do vírus da hepatite δ para que o DNA que codifica o RNA viral seja reconhecido e transcrito sem modificações (Crescenzo-Chaigne, Naffakh et al. 1999). Juntamente com esses oito plasmídeos, foram usados na transfecção quatro plasmídeos, cuja região promotora está sob controle pela RNA polimerase II, responsáveis pela expressão das três subunidades da polimerase viral e a nucleoproteína NP (pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-PA e pcDNA-NP). Dessa forma, os oito complexos ribonucleoprotéicos foram constituídos nas células transfectadas permitindo a transcrição e a replicação de todos os segmentos virais e a síntese de novos vírions nas células HEK 293T. Após 24 horas a 35°C o meio foi substituído por DMEM suplementado com 2% SFB por outras 48 horas. Os sobrenadantes das culturas celulares foram centrifugados a 1876 rcf por 10 minutos e coletados para posterior obtenção dos estoques-trabalho.



**Figura 3 – Esquema representativo do experimento de genética reversa dos vírus influenza gerados.** O background viral usado foram os segmentos do vírus influenza A/WSN/33. Basicamente os cDNAs do complexo da polimerase viral e nucleoproteína são transcritos e traduzidos no complexo vRNP e caso os outros 8 segmentos virais estiverem presentes na polaridade negativa serão reconhecidos pela polimerase viral e novas partículas virais serão geradas. Os plasmídeos são transfectados mais facilmente nas células HEK e as partículas virais formadas se amplificam melhor nas células MDCK.

### 2.2.5 Obtenção dos adenovírus recombinantes

Os AdHu5 recombinantes carreando a proteína ASP2 (Ad-ASP2) e SAG-2 (Ad-SAG2, ou Ad-CT), sob a sequência promotora da  $\beta$ -galactosidase da *Escherichia coli*, bem como detalhes dos estudos de geração e purificação dos vírus foram obtidos como previamente descrito (Bruna-Romero, Lasarte et al. 1997; Caetano, Bruna-Romero et al. 2006; Machado, Cardoso et al. 2006). Em resumo, a amplificação viral é feita em células permissivas 293A em meio de cultura DMEM com antibióticos suplementado com 10% SFB por uma semana. Os sobrenadantes são guardados para posterior ampliações, porquanto os *pellets* são obtidos usando um *cell scraper*, acumulados e macerados 80 vezes na presença de gelo. Posteriormente o macerado é completado com tampão Tris-Cl 0,1M e

submetido à ultra-centrifugação na presença de gradiente supersaturado de cloreto de céσιο. Por fim, um anel violeta contendo a maioria dos vírus obtidos é removida com o auxílio de uma seringa. Os vírus são dialisados com Tris 0,001M e suspensos em Tris-Cl 0,1M e aliquotados. A titulação se dá diluições seriadas em células 293A.

### **2.2.6 Obtenção dos estoques-trabalho dos vírus influenza gerados**

Para a obtenção dos estoques de trabalho, inicialmente foi realizada uma amplificação dos vírus obtidos por genética reversa. Para este fim, garrafas de cultura celular contendo camadas subconfluentes de MDCK ( $3 \times 10^6$  células/garrafa de 25 cm<sup>2</sup>) foram infectadas com 500µL do sobrenadante (SN) da genética reversa para amplificação viral. Após uma hora de adsorção a 35°C, meio DMEM completo contendo 2 % de soro fetal bovino (SFB) (CUTILAB®) foi adicionado às garrafas que foram então mantidas à mesma temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Os sobrenadantes foram coletados, clarificados por centrifugação a 1876 rcf(g) por dez minutos, aliquotados e armazenados a -70°C para a realização da primeira e segunda clonagem.

O procedimento das clonagens consistiu na infecção de placas de cultivo celular de 6 poços contendo camadas subconfluentes de células MDCK usando diluições seriadas das alíquotas amplificadas. Após uma hora de adsorção a 35°C, os poços foram recobertos por meio semissólido de agarose contendo tripsina, tratada com TPCK, a 0,5µg/mL (Sigma) e as placas mantidas por 72 horas em estufa a 35°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Das placas de lise formadas, alguns clones foram escolhidos e agarose acima de cada uma foi removida e adicionada 1mL de DMEM completo com 2% de SFB. Esse procedimento fora realizado duas vezes com cada clone. Os clones obtidos são mantidos em freezer a -70°C.

Os clones obtidos foram então aplicados em células MDCK para geração do estoque semente. A primeira e segunda clonagens foram amplificadas em garrafas pequenas (T25). Nas duas próximas etapas de amplificação do estoque-trabalho, a infecção se deu em garrafas de cultura de tamanho médio (T75), e a quantidade a ser amplificada

corresponde a 0,001 m.o.i. (multiplicidade de infecção, indicando que se adicionou aproximadamente um vírus para cada mil células presentes na garrafa). Ao fim de uma hora de incubação a 35°C, o meio foi completado para na presença de 0,5 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma) por 72h. Os sobrenadantes foram mantidos a -70°C.

A titulação dos estoques-trabalho foi realizada em placas de seis poços contendo camadas subconfluentes de células MDCK usando diluições seriadas dos sobrenadantes dos vírus sob camada de agarose. 72 horas pós-infecção, as placas foram fixadas em formol a 10% e coradas com cristal violeta para contagem. O número de unidades formadoras de placa por mL (UFP) foi determinado segundo a fórmula abaixo, onde n corresponde ao número de placas de lise, d (diluição) e f (fator de correção=2,5)

$$UFP=n \times d \times 2,5$$

### **2.2.7 Extração de RNA viral e confirmação por PCR-transcriptase reversa**

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

### 2.2.8 Imunizações

Para ensaios de imunização, machos de camundongos C57BL/6 ou C3H/He foram submetidos a dois protocolos de indução e reforço da resposta imune. No protocolo homólogo, para inoculação de indução (“prime”) nos camundongos,  $10^8$  UFP de adenovírus controle (Ad-CT) ou com o adenovírus recombinante expressando a proteína ASP2 (Ad-ASP2) foram administrados pela via subcutânea na base da cauda dos animais. No protocolo heterólogo, os animais foram anestesiadas via subcutânea com uma mistura de Ketamina (15 mg/kg) e Xilazina (0,6 mg/kg) diluídas em PSB 1x estéril, e inoculadas com dose de  $10^3$  UFP de cada vírus em 25 $\mu$ L de PBS estéril via intranasal. A imunização de reforço (“boost”) foi dada pela via subcutânea com  $10^8$  UFP de adenovírus recombinantes Ad-CTrl ou Ad-ASP2 nos dois protocolos, quatro semanas após a primeira imunização. O desenho experimental em animais foi representado na figura 6.

Alternativamente, o protocolo homólogo com duas doses de influenza foi usado para verificação se há possibilidade de indução de resposta imune anti-*T. cruzi* neste protocolo. Para tanto, o procedimento de *prime* foi idêntico porquanto o procedimento de *boost* foi usando  $10^5$  UFP de Flu-M-ASP2 via subcutânea. O esquema abaixo apresenta as imunizações com a dose e via respectiva.

Prime			Boost (28 dias após o prime)		
Vírus	Dose	Via	Vírus	Dose	Via
Flu-M-ASP2	$10^3$ UFP	intranasal	Ad-ASP2	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea
Flu-C-ASP2	$10^3$ UFP	intranasal	Ad-ASP2	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea
Flu-CT	$10^3$ UFP	intranasal	Ad-CT	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea
Ad-CT	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea	Ad-CT	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea
---//---	---//---	---//---	Ad-ASP2	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea
Ad-ASP2	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea	Ad-ASP2	$5 \times 10^7$ UFP	subcutânea
Flu-M-ASP2	$10^3$ UFP	intranasal	Flu-M-ASP2	$10^5$ UFP	subcutânea
Flu-CT	$10^3$ UFP	intranasal	Flu-CT	$10^5$ UFP	subcutânea

## 2.2.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e Western blot

O sangue dos camundongos imunizados foi coletado através do plexo orbital quatorze dias após a imunização de reforço. Anticorpos contra a proteína ASP2 foram detectados por ELISA como previamente descrito (Giraldo, Cannizzaro et al. 2000). Resumidamente, placas (Maxisorp®, NUNC) foram recobertas com a proteína ASP2 recombinante, His65KDa em 0,2M de carbonato de sódio pH 9,6 e incubadas a 4°C por 18 horas (de Alencar, Persechini et al. 2009). Posteriormente, as placas foram bloqueadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% e leite em pó desnatado a 5% (tampão de bloqueio) por duas horas à temperatura ambiente. Os soros dos camundongos foram diluídos (1/50) em tampão de bloqueio e adicionados nas placas, seguido de incubação por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas exaustivamente com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (SIGMA) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T e posteriormente com PBS sem Tween-20, antes de serem reveladas com o 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, SIGMA). Após a interrupção da reação da reação, as densidades óticas de cada reação foram lidas a 450nm em espectrofotômetro (Molecular Dynamics).

Para a realização dos procedimentos de *Western Blot* o sistema SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo duodecil sulfato de sódio) foi preparado nas seguintes condições: concentração de 12% de acrilamida, 0,1% de SDS em tampão 1,5M Tris-HCl, pH 8,8, e um gel de concentração (*stack*) contendo 4% de acrilamida, 0,1% de SDS em tampão 1M Tris-HCl, pH 6,8. A proteína foi dissolvida em tampão de amostra (0,35M Tris-HCl pH 6,8; 0,35M SDS; 30% glicerol; 6% β - mercaptoetanol; 0,175mM azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 min. para a desnaturação. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema vertical de eletroforese contendo tampão de corrida (0,025M Tris-HCl, 0,192M glicina, pH 8,3, 0,1% de SDS), sob voltagem constante (100V) por 2h. Em seguida foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose

(Amersham Biosciences). As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween contendo SFB (CUTILAB, 5%) e cortada em tiras para incubação com o soro individual ou pool (controles) dos animais vacinados. Após lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo (SIGMA) e a presença de anticorpos específicos para rASP2 foi revelada usando filme de raio-X e reveladores adequados (KODAK) após uma reação padrão de quimioluminescência (ECL Detection System, Amersham Biosciences).

### **2.2.10 The Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot)**

Três semanas após a imunização de reforço, os camundongos foram eutanasiados e o baço removido para separação e preparação dos esplenócitos. O número de células T específicas para ASP2 foi determinado pela técnica de ELISpot, como previamente descrito (Machado, Cardoso et al. 2006). Resumidamente, placas com fundo de nitrocelulose de 96 poços (MAHAS45, Millipore) foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  (clone R4-6A2; Becton Dickson) diluído em PBS estéril. As placas foram então lavadas e bloqueadas por duas horas com RPMI suplementado com 10% SFB. As células do baço foram mantidas em RPMI a 10% SFB e IL-2 recombinante (100 U/mL). A viabilidade das células foi avaliada usando exclusão por azul de tripan 0,2%. O número de esplenócitos foi então ajustado para  $1 \times 10^6$  células por poço contendo meio de cultura na presença ou ausência dos peptídeos específicos imunodominantes na concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  de VNHRFTLV (aa 553-560; quando esplenócitos de C57BL/6) ou TEWETGQI (aa 320-327; quando esplenócitos de C3H/He). Dezoito horas após incubação a 37°C, as placas foram extensivamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IFN- $\gamma$  de camundongo conjugado à biotina (XMG1.2 Becton Dickson) e, finalmente, com estreptavidina marcada com peroxidase. As reações ocorreram na adição de substrato de peroxidase aos poços (50 mM Tris-HCL, pH 7.5) contendo 3,3'-diaminobenzidinatetrahidrocloro (DAB a 1mg/mL) e solução de peróxido de hidrogênio a 30% (3  $\mu\text{L/mL}$ ). A reação foi interrompida em água corrente. Os spots foram contados através do *software* chamado S5 Core ELISpot Analyser.



Para estimar a produção de IFN- $\gamma$ , os esplenócitos obtidos e incubados por 72 horas e 5% CO<sub>2</sub>. A concentração foi determinada em sobrenadante de culturas sob estimulação com os peptídeos imunodominantes usando o kit DuoSet (ELISA Development System mouse IFN- $\gamma$  kit, R&D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante.

### **2.2.11 Perfil fenotípico por citometria de fluxo (FACS)**

Para caracterização fenotípica, os esplenócitos obtidos como descrito acima foram ajustados para  $1 \times 10^6$  por poço em meio de cultura contendo GolgiStop™ e GolgiPlug™ de acordo com instruções dos fabricantes (BD Pharmigen) na presença de anti-CD107a-PE (BD, Biosciences). Em metade das culturas, uma concentração final de 10  $\mu$ g/ml de TEWETGQI (aminoácidos 320-327; C3H/He) foi adicionada. Após 12 horas de incubação, as células foram marcadas com dextrâmero TEWETGQI fluorescente fluoresceína isotiocianato (FITC; Immudex, Dinamarca). 10 min depois as células foram incubadas com anti-CD8-complexo clorofila peridina (PerCP) ou ficoeritrina Cy7 (PeCy7) anti-CD8 ou anti-CD3-FITC (em análises sem o dextrâmero). As células foram então fixadas e permeabilizadas usando o kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences). Em seguida, foram realizadas as marcações com os anticorpos alofococianina (APC)- anti-IFN- $\gamma$  e APC-cy7 anti-TNF- $\alpha$ . Por fim, as células foram fixadas em paraformaldeído e 200 a 300 mil eventos foram adquiridos em citômetros de fluxo FacsCanto, LSRFortessa ou FacsAria II (BD, Biosciences) e analisados usando o *software* FlowJo (ThreeStars).

### **2.2.12 Histopatologia e score inflamatório**

O fígado, o coração e o baço foram removidos imediatamente após a eutanásia e processados para análise histopatológica do dia 15 após o desafio. No processamento, os órgãos foram imersos em 10% de formalina fosfato-tamponada, e em seguida em álcool 70% até fixação em parafina. Os tecidos foram cortados em tiras de 4  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina.

### 2.2.13 Ensaio de Proteção

Decorridas quatro semanas após a imunização de reforço os animais foram inoculados via intraperitoneal com 500 (C3H/He) ou 1000 (C57BL/6) parasitos obtidos no pico da infecção do sangue de camundongos Suíços infectados. O monitoramento da parasitemia foi realizado em diferentes dias pós-infecção de acordo com a técnica descrita por Brener (Brener 1962), resumidamente, 5 $\mu$ L do sangue da cauda dos animais foi adicionado em lâmina lisa e adicionada a lamínula (22mmx22mm), sendo contados 50 campos e multiplicados os fatores de correção das objetivas e do microscópio. A mortalidade foi acompanhada diariamente e descrita cumulativamente durante cinquenta dias.

### 2.2.14 Análises estatísticas dos dados

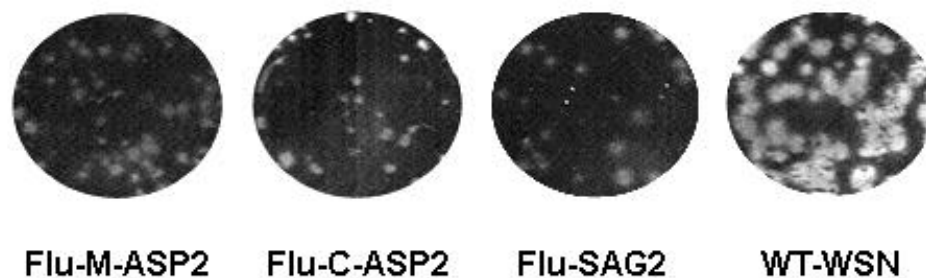
Os grupos de animais vacinados com Ad-CT /Ad-CT e Flu-CT/Ad-CT foram os controles negativos com os quais todos os outros foram comparados. O grupo Ad-ASP2 imunizado uma vez, no momento do *boost* dos outros grupos foi utilizado para confirmação da importância do uso do vetor influenza como *prime*. O grupo Ad-ASP2/Ad-ASP2 já foi previamente caracterizado seu papel protetor, sendo o controle positivo deste estudo (Machado, Cardoso et al. 2006). Para a comparação entre os grupos nos resultados de ELISA, ELISpot e FACS foi utilizado o teste de Tukey na análise “One-Way Analysis of Variance (Anova)”. Para análise da parasitemia foi realizado o teste de Bonferoni também dentro da análise “Anova”. O teste de “LogRank” foi utilizado para comparar a sobrevivência dos camundongos após o desafio com *T. cruzi*. Software de análises usado: GraphPad Prism v5.0.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa

Os clones de vírus influenza H1N1 A/WSN/33 recombinantes ou selvagem (vNA) carreando o segmento dicistrônico da neuraminidase, contendo além da sequência da NA, as sequências gênicas que codificam as porções N-terminal, medial e C-terminal da ASP2 do *T. cruzi* respectivamente chamados Flu-N, M e Flu-C-ASP2 e o controle contendo a sequência SAG2 (glicoproteína de antígeno de superfície) do *T. gondii* (Flu-CT), foram gerados utilizando-se a técnica de transfecção por 12 plasmídeos conforme previamente descrita por Fodor e colaboradores (Fodor, Devenish et al. 1999).

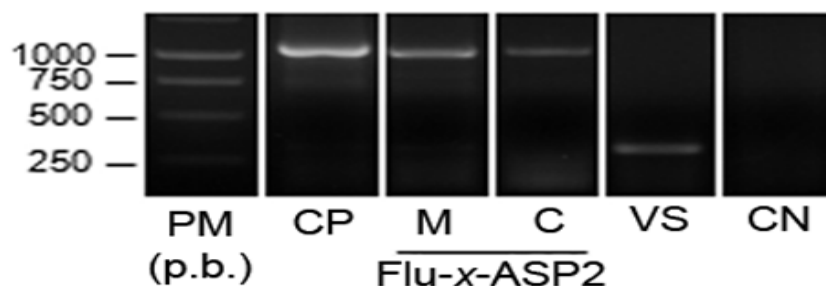
Conforme mostrado na figura 4, o tamanho das placas de lise dos vírus FLU-M-ASP2 e FLU-C-ASP2 foi comparável àquelas do vírus FLU-CT e significativamente menores do que aquelas do vírus selvagem vNA. Além disso, os títulos infecciosos desses vírus ( $1 \times 10^6$  UFP/ml Flu-M-ASP2 e  $2.8 \times 10^6$  UFP/ml Flu-C-ASP2) foram significativamente menores do que aqueles do vírus influenza selvagem vNA ( $1 \times 10^8$  UFP/ml).



**Figura 4 – Caracterização fenotípica dos vírus influenza recombinantes gerados por genética reversa.** Camadas semi-confluentes de células MDCK implantadas em placas de 6 poços foram infectadas com diluição seriada de vírus influenza recombinantes ou selvagem. Uma hora após a infecção às células foram adicionado meio de cultivo DMEM em 1% de agarose. 72 horas após a infecção a agarose foi removida, as células fixadas em PFA e coradas com cristal violeta. A contagem da titulação resulta em Unidade Formadora de Placa de lise (UFP).

As placas de lise menores foram esperadas uma vez que a inserção de um inserto heterólogo da ASP2 foi feita na NA após a duplicação da região 3' não codificadora. Como o complexo da polimerase viral parece a região 3'NC com a região 5'NC para expressão gênica, a região duplicada inserida antes da ASP2 compete com a 3' natural, anterior à neuraminidase e assim afeta o desempenho replicativo viral, uma vez que ela é responsável pela liberação dos vírus das células (Vieira Machado, Naffakh et al. 2006).

Após 6 passagens seriadas em células MDCK a estabilidade dos vírus recombinantes foi avaliada após através de RT-PCR dos segmentos da NA e posterior sequenciamento dos estoques virais semente e de trabalho (Figura 5). Para esse fim, foi utilizada uma dupla de iniciadores que amplificam a região flanqueando o sítio de inserção da sequência heteróloga (Vieira Machado, Naffakh et al. 2006). Conforme mostrado na figura 5, a análise dos produtos de RT-PCR em gel de agarose e corados com brometo de etídeo, mostrou que os tamanhos dos produtos de amplificação oriundos dos segmentos dicistrônicos NA-M-ASP2 e NA-C-ASP2 utilizados na genética reversa foram do tamanho esperado, sendo correspondentes ao do segmento controle positivo (CP, pPRNA38-M-ASP2). Ademais, análise desses produtos de amplificação por sequenciamento evidenciou a ausência de mutações, demonstrando que esses vírus são estáveis geneticamente (dados não mostrados).

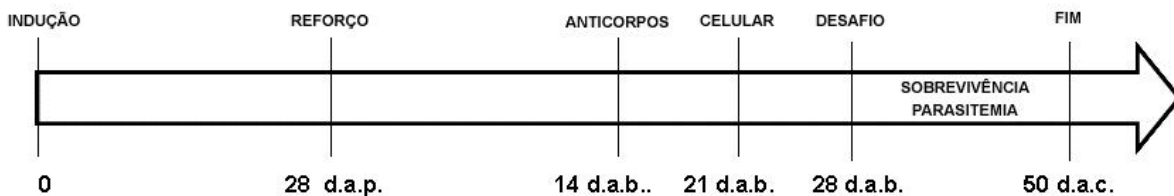


**Figura 5 – Caracterização genotípica dos vírus gerados por genética reversa.** Gel de agarose corado com brometo de etídeo visualizado sob fluorescência contendo os cDNAs obtidos por RT-PCR dos extratos de RNA viral e plasmídeo controle. Legenda: VS – influenza selvagem WSN usado como *background* para a geração dos recombinantes; CN – controle negativo correspondendo ao cDNA gerado através da Transcrição Reversa do RNA extraído das células MDCK não infectadas; PM – marcador de peso molecular em pares de

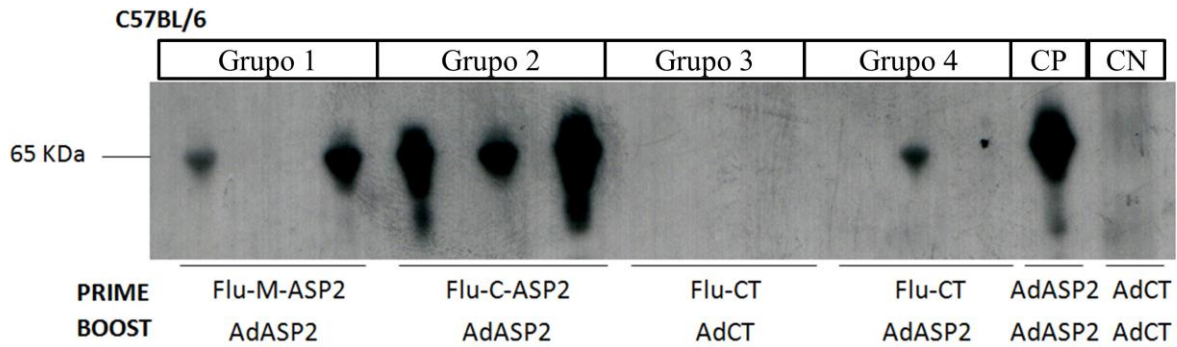
base (p.b.); CP – controle positivo correspondendo a um dos plasmídeos usado na genética reversa para geração dos vírus.

### 2.3.2 Análise da indução da produção de imunoglobulinas específicas

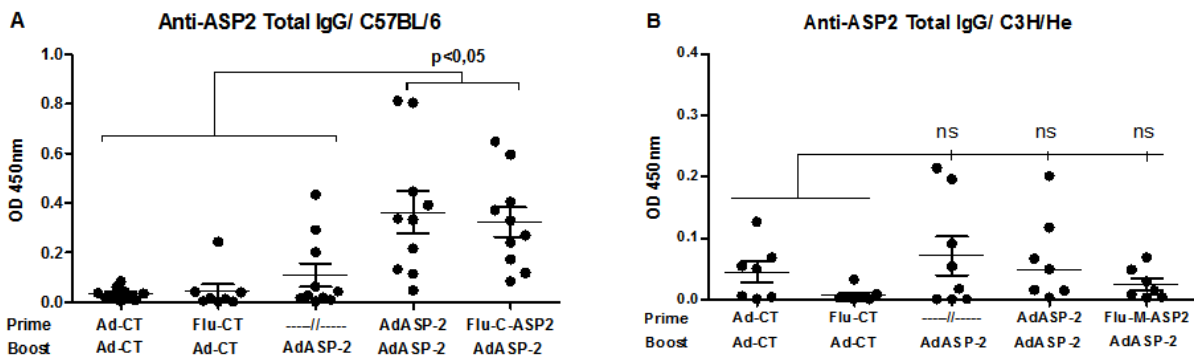
A presença de anticorpos específicos anti-ASP2 no soro dos camundongos obtidos 14 dias após a imunização de reforço foi avaliada pelas técnicas de ELISA e *Western blot*. O esquema de imunizações está demonstrado na figura 6. Os resultados apresentados na figura 7 mostram que o nível de anticorpos anti-ASP2 foi significativamente maior nos camundongos C57BL/6 imunizados no protocolo heterólogo Flu-C-ASP2/Ad-ASP2 (Grupo 2) em comparação ao controle FluCT/Ad-CT (Grupo 3). Além disso, os níveis de imunoglobulinas específicas aumentaram de forma significativa em relação ao grupo de animais que receberam uma única imunização com Ad-ASP2 (Grupo 4). O mesmo perfil contra a ASP2 recombinante foi observado no ELISA dos soros dos C57BL/6 imunizados (Figura 8). Por outro lado, alguns animais C3H imunizados apresentaram títulos positivos de anticorpos, enquanto a maioria não apresentou níveis de anticorpos estatisticamente maiores em comparação aos controles negativos (Figura 8).



**Figura 6 – Esquema representativo do desenho experimental das imunizações.** Legendas: d.a.p. – dias após primeira imunização (*prime*); d.a.b. – dias após a segunda imunização (*boost*); d.a.c. – dias após o desafio (*challenge*). A *indução* é dada usando Flu-C-ASP2, ou Flu-M-ASP2, Ad-ASP2 (CP), Ad-CT (CN) ou nenhuma imunização. 28 dias após a indução a dose *boost* é dada usando Ad-CT (CN) ou Ad-ASP2 nos outros grupos. Duas semanas após o *reforço* o soro dos animais é obtido. Três semanas após o *reforço* os animais foram eutanasiados e o baço removido para análise celular. Quatro semanas após a imunização de reforço os animais foram desafiados com 500 (C3H/He) ou 1000 (C57BL/6) tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi* e medidos parâmetros de sobrevivência.



**Figura 7 – Resposta humoral de soro individual de camundongos C57BL/6 vacinados com vírus recombinantes contra a proteína recombinante ASP2.** A proteína recombinante ASP2 (rASP2-his-65KDa) foi carregada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e transferida à membrana de nitrocelulose a qual foi cortada em tiras e incubadas na presença de soro individual diluído em PBS-T e 5% de SFB CUTILAB proveniente de camundongos imunizados (n=3) com os protocolos denotados na imagem. Em seguida a membrana foi desenvolvida em ECL Plus e revelada usando filme fotográfico. CP – controle positivo (n=1). CN – controle negativo (n=1).

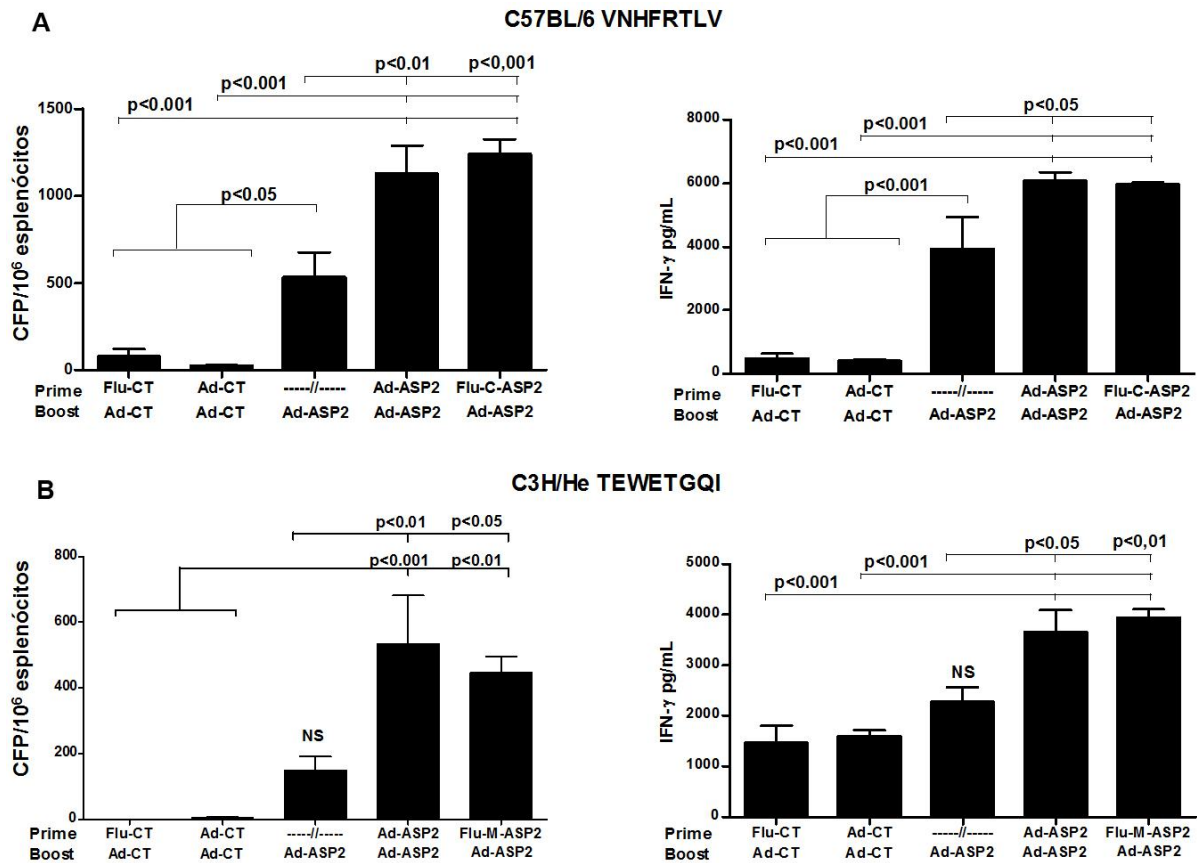


**Figura 8 – Representação gráfica do ELISA dos soros de camundongos C3H/He e C57BL/6 imunizados.** Placas de 96 poços Maxisorp foram revestidas com a proteína recombinante ASP2. Depois de bloqueadas, os soros de animais C57BL/6 e C3H/He vacinados nos diferentes protocolos indicados foram adicionados na diluição 1/100 em duplicatas. O.D. – densidade óptica. Cada ponto representa a média da duplicata de um animal. ns – não significativo no teste ANOVA e post-test Bonferroni.

É importante ressaltar que a forma infectiva que apresenta a proteína ASP2 no *T. cruzi* é amastigota que é uma forma intracelular, assim a eficácia dos anticorpos contra essa fase do ciclo de vida do parasito é secundária. Também, é esperado que apenas a porção C-ASP2 fosse capaz de estimular a promoção adequada de anticorpos, como demonstrado anteriormente, que é onde se encontra o epítipo B e no animal C57BL/6 (Araujo, de Alencar et al. 2005).

### 2.3.3 Análise de resposta imune celular específica anti-ASP2

A capacidade do protocolo heterólogo de indução e reforço da resposta imune em induzir uma resposta imune celular específica para ASP2 foi demonstrada pela técnica de ELISpot, como descrito em materiais e métodos (seção 2.3.9). Resumidamente, esplenócitos dos camundongos imunizados foram obtidos três semanas após a imunização de reforço e estimulados *ex vivo* com o epítipo imunodominante VNHRFTLV (PA8) presente apenas na porção carbóxi-terminal da proteína ASP2 (C-ASP2) quando apresentado no haplótipo de MHC de classe I H-2K<sup>b</sup> presente na linhagem de camundongos C57BL/6. No caso dos camundongos da linhagem C3H/He o epítipo usado foi TEWETGQI (TEW), cujo haplótipo de MHC correspondente é o H-2K<sup>k</sup>. Como demonstrado na figura 9, houve um aumento significativo do número de células T CD8<sup>+</sup> específicas para os epítopos PA8 (C57BL/6) e TEW (C3H) e da produção de IFN- $\gamma$  nos grupos de camundongos imunizados com Flu-M-ASP2/Ad-ASP2, Flu-C-ASP2/Ad-ASP2 e Ad-ASP2/Ad-ASP2. É importante ressaltar que uma imunização com Ad-ASP2 foi o suficiente para estimular a resposta T CD8<sup>+</sup> específica para ASP2 tanto em camundongos C57BL/6 (Figura 9A) quanto em camundongos C3H (Fig. 9B). Todavia, tanto o número de células T CD8<sup>+</sup> específicas produtoras de IFN- $\gamma$  quanto os níveis dessa citocina presente nos sobrenadantes das culturas dos esplenócitos foram significativamente menores do que aquelas observadas nos grupos que receberam duas imunizações com vírus recombinantes carreando ASP2. Desta forma, o conjunto dos nossos resultados demonstrou que a capacidade protocolo heterólogo de indução da resposta imune em induzir resposta celular específica para ASP2 foi comparável àquela do protocolo homólogo. Além disso, nossos resultados demonstraram que duas imunizações com vírus recombinantes são necessárias para que seja obtida uma resposta celular específica para ASP2 mais robusta.



**Figura 9 – Produção de IFN-γ por esplenócitos de camundongos C57BL/6 (A) e C3H/He (B) imunizados com vírus recombinantes e estimulados *ex vivo* com peptídeos imunodominantes respectivos.** As colunas da esquerda demonstram a presença de pontos em poços de imunospot revelados pela presença IFN-γ (ELISpot) de esplenócitos totais incubados por 18 horas. As colunas da direita são resultantes de ELISA para verificação da presença de IFN-γ no sobrenadante dos esplenócitos incubados na presença do peptídeo respectivo por 72 horas. CFP – células formadoras de pontos; pg/ml – picogramas por mililitro. n = 8

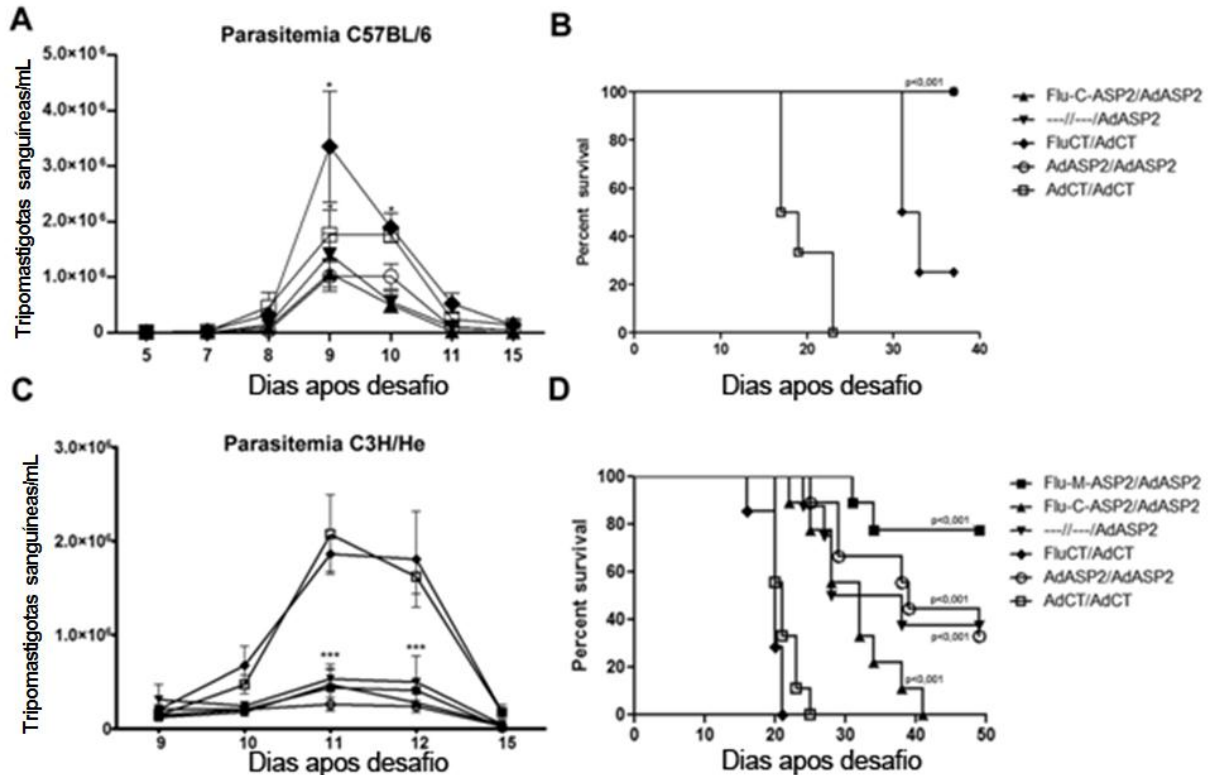
### 2.3.4 Ensaios de proteção em camundongos imunizados

Após os ensaios indiretos (via estímulo *ex vivo*) de proteção, os camundongos imunizados foram submetidos à infecção aguda usando a cepa Y de *T. cruzi*. Nos animais C57BL/6, foi usada uma dose de 1000 parasitos por animal e em C3H/He de 500 parasitos por animal, ambos via intraperitoneal. Em camundongos resistentes C57BL/6, a resposta imunológica induzida pela vacinação em todos os protocolos usando ao menos uma dose de Ad-ASP2 foi capaz de reduzir a parasitemia (Figura 10A) de forma estatisticamente significativa em relação aos controles no pico parasitário (dia 9) e no primeiro dia de queda (dia 10). Além disso, como observado na figura 10B, apenas os camundongos dos grupos



controle morreram com exceção de um. Fica evidente que a resposta imunológica induzida por apenas uma imunização com Ad-ASP2 é capaz de proteger os camundongos C57BL/6 desafiados, visto que de todos os grupos que receberam uma imunização com esse vírus apresentou proteção significativa em relação aos grupos imunizados com os vírus controles ( $p < 0,001$ ).

Com relação à linhagem de camundongos susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* C3H/He todos os grupos imunizados com ao menos uma dose de Ad-ASP2 também foram capazes de controlar a parasitemia no pico como evidenciado na figura 10C. Também, é importante notar que todos os grupos imunizados com ao menos uma dose de Ad-ASP2 obtiveram um atraso significativo na mortalidade em se comparando com os grupos controle negativos (Figura 10D,  $p < 0,001$   $n=7-9$ ). Porém, quando se observa a mortalidade, apenas a resposta imunológica induzida pela vacinação com vírus influenza carreando a porção medial da proteína ASP2 contendo o epítipo imunodominante para o haplótipo H-2K<sup>k</sup> conseguiu obter além de atraso e redução na mortalidade (cerca de 80%,  $p=0,05$   $n=9$ ) em se comparando ao grupo imunizado com uma dose de Ad-ASP2 (sobrevivência de ~30%,  $n=9$ ; Figura 10D). É importante ressaltar que essa melhora foi dependente da presença do epítipo imunodominante, visto que o grupo imunizado com a porção Flu-C-ASP2 apresentou uma mortalidade parecida com os animais imunizados com uma ou duas doses de Ad-ASP2.

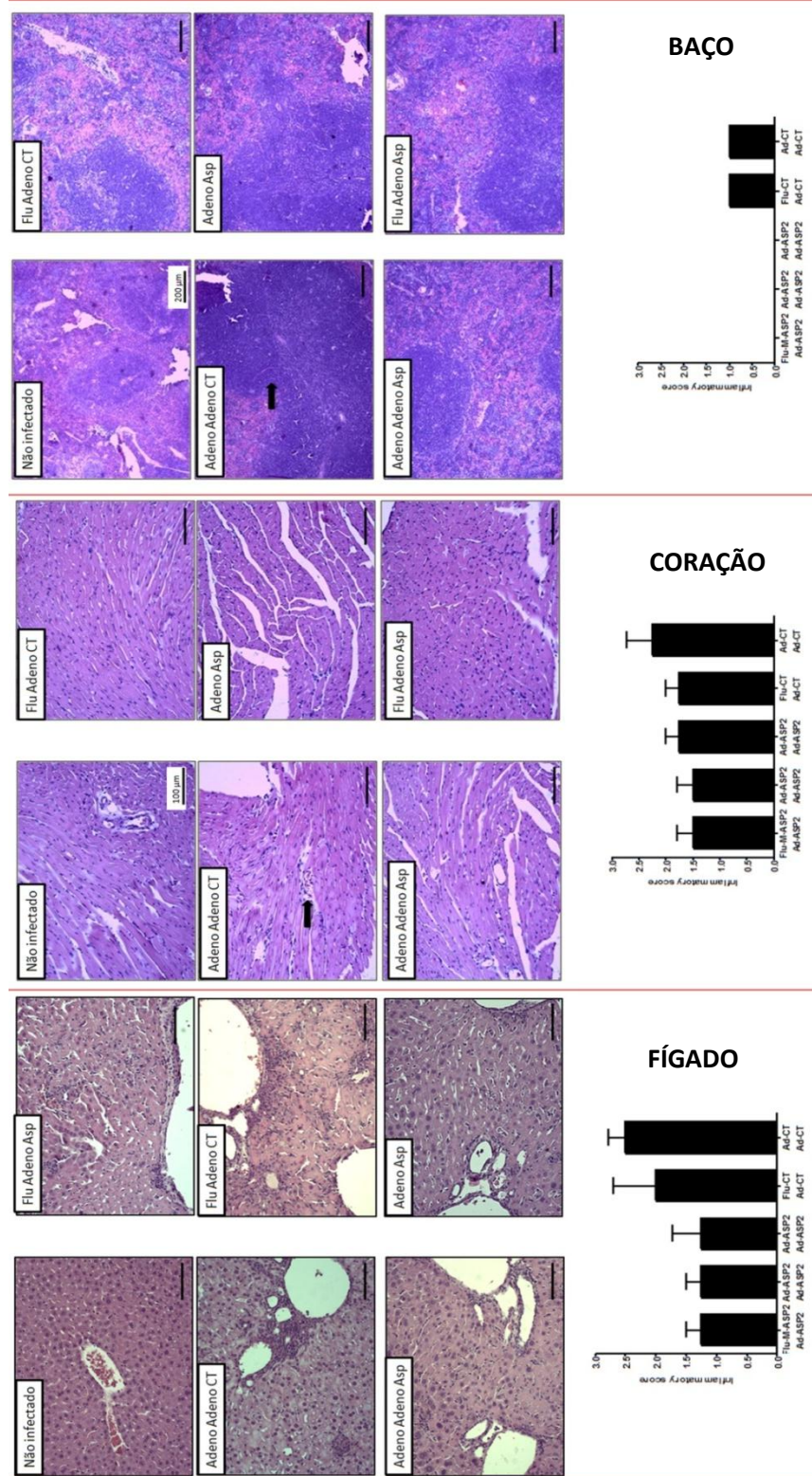


**Figura 10 – Curvas de parasitemia e mortalidade dos camundongos imunizados com *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 e C3H/He foram imunizados como descrito em materiais e métodos e quatro semanas após a imunização de reforço os animais foram desafiados via intraperitoneal com 1000 e 500 parasitos da cepa Y, respectivamente. A parasitemia foi avaliada como o número de tripomastigotas sanguíneas por mL de sangue (A, n=4; C, n=8). A sobrevivência dos animais C57BL/6 (B, n=7) e C3H/He (D, n=7-9) foi avaliada até 50 dias após o desafio.

### 2.3.5 Perfil inflamatório no tecido de animais vacinados e infectados

Com o objetivo de melhor compreender os mecanismos responsáveis pela maior sobrevivência dos animais vacinados segundo o protocolo heterólogo, haja vista que os resultados obtidos com a mensuração do número de parasitas sanguíneos não foram capazes de explicar a diferença de proteção observada, realizamos análises histopatológicas em órgãos-alvo da infecção pela cepa Y do *T. cruzi*. Desta forma, camundongos C3H/He foram imunizados conforme descrito na seção de métodos. Seis semanas depois da última imunização os animais foram desafiados com 500 parasitos da cepa Y. Quinze dias após a infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos coletados para análise histopatológica.

Conforme observado na figura 11, a análise histopatológica no fígado, baço e coração, ainda que tenha demonstrado uma diminuição das lesões patológicas nos órgãos dos animais imunizados com vírus recombinantes carreando ASP2, esses resultados não evidenciaram diferenças entre os grupos Ad-ASP2, Flu-M-ASP2/Ad-ASP2 e Ad-ASP2/Ad-ASP2. Estes três grupos foram capazes de controlar a inflamação exacerbada em relação aos órgãos dos animais não infectados (Figura 11).



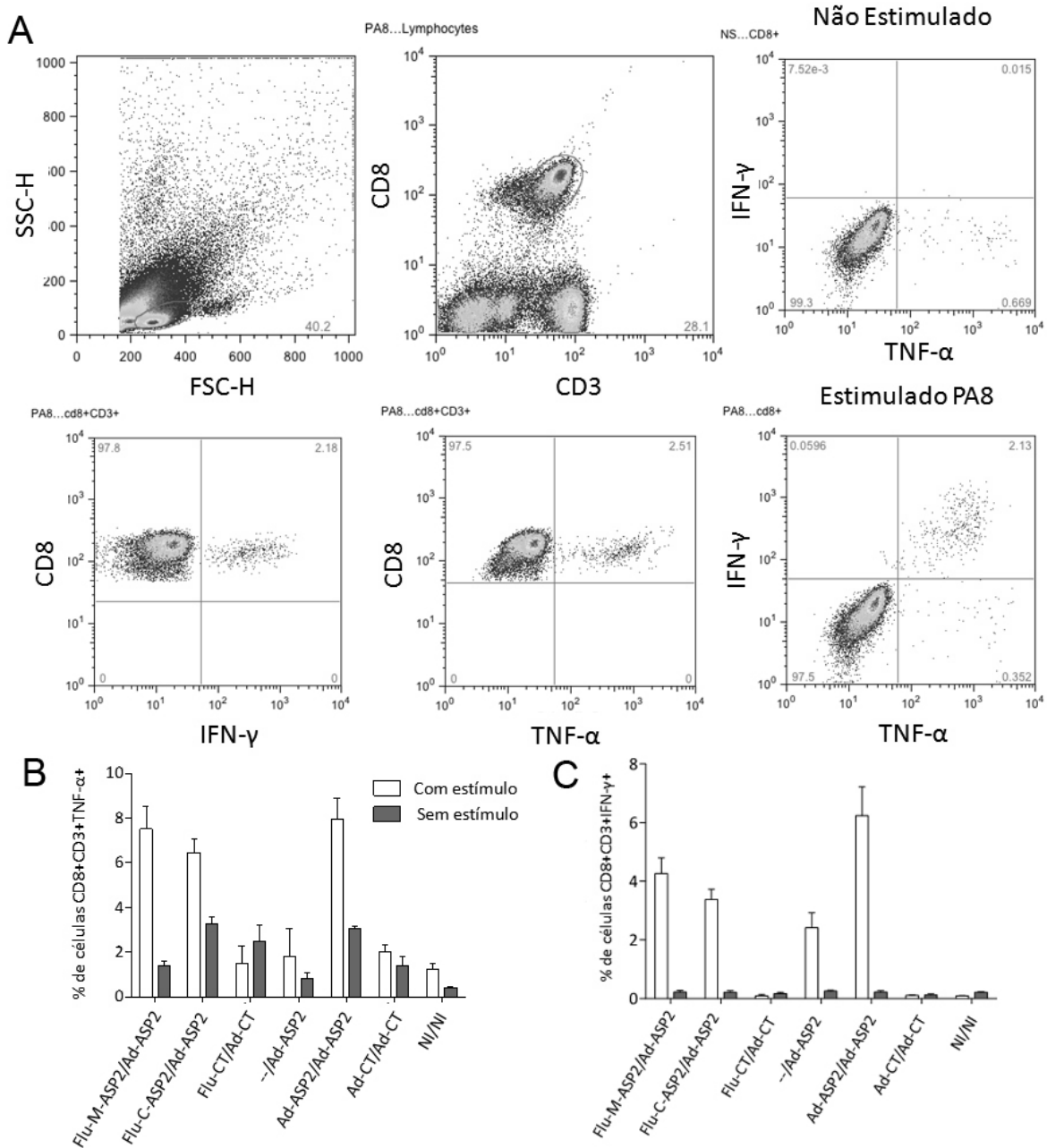
**Figura 11 – Perfil inflamatório no fígado, coração e baço de animais imunizados e infectados.** Fígado, cujo score foi classificado como: 1, foco inflamatório tecidual discreto; 2, focos múltiplos de inflamação no fígado e presença de infiltrado inflamatório; 3, inflamação extensa e generalizada, focos inflamatórios grandes e interligados, nítida

perturbação do parênquima. Coração, cujo índice inflamatório foi considerado: 0, nenhum; 1, leve; 2, moderado; 3, intenso. Baço, cujo índice inflamatório foi considerado: 0, ativação normal; 1, folículos linfoides aumentados em grau leve; 2, aumentados em grau moderado; 3, aumentados em grau intenso. Os *scores* histopatológicos foram classificados como a média  $\pm$ SEM. Não houve diferença estatística entre os *scores* analisados.

### 2.3.6 Perfil fenotípico das células CD8 efetoras

Em seguida, 21 dias após a imunização de reforço investigamos o perfil fenotípico dos esplenócitos dos animais C57BL/6 quanto à produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . É importante salientar que as janelas de análise escolhidas para todas as análises fenotípicas seguiram o perfil demonstrado na figura 12A. Coerente com os dados de ELISpot e ELISA do sobrenadante de esplenócitos estimulados, os dados de citometria indicaram que o grupo Ad-ASP2/Ad-ASP2 possui a melhor produção tanto de TNF- $\alpha$  (Figura 12B) quanto de IFN- $\gamma$  (Figura 12C). Os grupos imunizados com influenza carreando as porções medial e C terminal da ASP2 seguido de *boost* com Ad-ASP2 apresentaram maior produção de TNF- $\alpha$  do que o controle somente uma dose de Ad-ASP2 (Figura 12B). Entretanto, a produção de IFN- $\gamma$  é comparável entre estes três grupos (Figura 12C) e está de acordo com a parasitemia e mortalidade observadas. Uma vez que os animais C57BL/6 são considerados resistentes, a diferença fenotípica não foi o suficiente para confirmar a essencialidade de duas imunizações para proteção contra infecção aguda experimental com a cepa Y de *T. cruzi* neste modelo.

Modelos de resistência usando C57BL/6 demonstraram proteção total com outros vírus recombinantes, incluindo influenza, adenovírus e vírus sendai, além da proteína recombinante ou DNA como prime, mas nenhum testou ou demonstrou a essencialidade das duas doses (Boscardin, Kinoshita et al. 2003; Vasconcelos, Hiyane et al. 2004; Miyahira, Takashima et al. 2005; Machado, Cardoso et al. 2006; Duan, Yonemitsu et al. 2009; Takayama, Ono et al. 2010; Rigato, de Alencar et al. 2011). Indispensável ressaltar que é a primeira vez que um grupo demonstrou que a imunização com apenas uma dose de Ad-ASP2 é capaz de proteger animais C57BL/6 contra infecção aguda pelo *T. cruzi*.

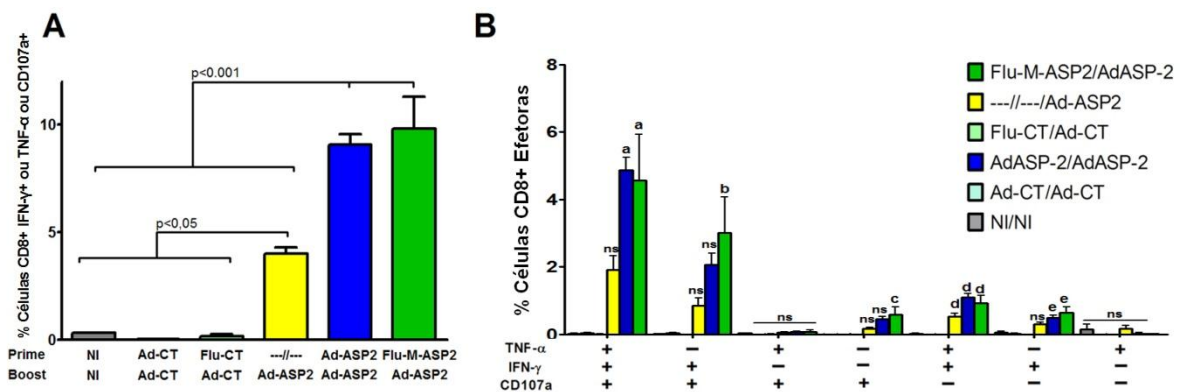


**Figura 12 – Perfil fenotípico de esplenócitos de animais C57BL/6 imunizados.** Três semanas após a dose de *reforço* os animais foram eutanasiados e o baço removido para análise dos esplenócitos por citometria de fluxo. As janelas de análises estão demonstradas em A, que representa um animal do grupo Flu-C-ASP2/Ad-ASP2. A ordem de janelas foi: demarcação de linfócitos pelo tamanho e granulosidade, seguido da seleção de linfócitos CD8 e CD3 positivos. Desta janela analisamos as citocinas intracelulares TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em separado e duplo positivas, que são praticamente iguais às IFN- $\gamma$  positivas em %. Os marcadores foram anti-CD8-PeCy7, anti-CD3 PerCP, anti-IFN- $\gamma$ -APC e anti-TNF- $\alpha$ -PE. Estão descritas as porcentagens de linfócitos T CD8 positivos para TNF- $\alpha$  (B) e IFN- $\gamma$  (C). Este gráfico é representativo de dois experimentos independentes.

Com relação aos camundongos susceptíveis C3H/He, a parasitemia, o perfil inflamatório tecidual, a produção de anticorpos e a produção estímulo-específico de IFN- $\gamma$

medidos por ELISA ou ELISpot também não foram capazes de explicitar a diferença observada na proteção dos animais C3H/He. Assim, a próxima etapa do nosso trabalho consistiu num aprofundamento da análise do perfil das células CD8 específicas ativadas pela vacinação para entendermos a diferença de proteção.

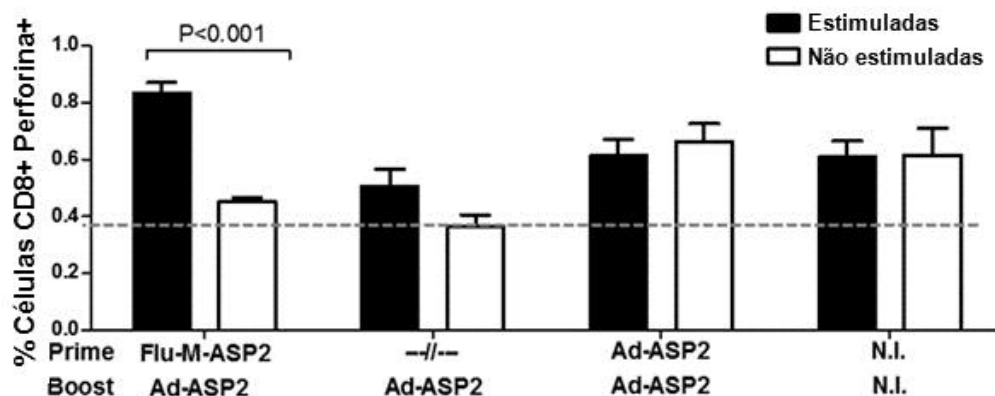
Na análise de polifuncionalidade de produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e na mobilização do marcador de superfície CD107a (citotoxicidade indireta), o perfil entre os grupos vacinais foi muito parecido com o ELISpot (Figura 13A). Com exceção das células produtoras de IFN- $\gamma$ +CD107a+ e somente CD107a, os outros perfis efetores não demonstraram diferença significativa entre Ad-ASP2/Ad-ASP2 e Flu-ASP2/Ad-ASP2 (Figura 13B;  $p < 0,05$ ). Ainda, os animais que apresentaram quantidade significativa de células CD8 efetoras sobreviveram por mais tempo e apresentaram menor mortalidade em se comparando com os controles negativos (Figura 10), demonstrando sua importância mesmo em modelos de susceptibilidade. É importante salientar este dado, visto que apesar de ser comum na literatura protocolos utilizando Adenovírus recombinantes em *prime-boost*, o controle com uma dose de Adenovírus sozinho em geral é ignorado.



**Figura 13 – Perfil efector polifuncional indireto sob estimulação com peptídeo TEWETGQI.** Representação gráfica de dados gerados em esplenócitos de camundongos C3H/He imunizados, estimulados por 12 horas na presença de Brefeldina A e Monesina, marcados e submetidos à citometria de fluxo. O gráfico da A indica a porcentagem de células CD8+ positivas para qualquer um dos parâmetros estudados, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou CD107a. Perfil booleano da produção de citocinas e mobilização de CD107a (B). O grupo não imunizado e não infectado NI/NI (n=3) foi o controle negativo.

Nossos resultados não foram capazes de explicar a diferença de proteção observada nos animais vacinados segundo diferentes protocolos de imunização. Apesar de as células terem sido estimuladas com um peptídeo específico para os linfócitos T CD8+, essa técnica não permite a distinção dos linfócitos T CD8+ que são específicos para esse peptídeo imunodominante, um mecanismo imunológico importante na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* (Rodrigues, de Alencar et al. 2008; Dominguez, Silveira et al. 2011).

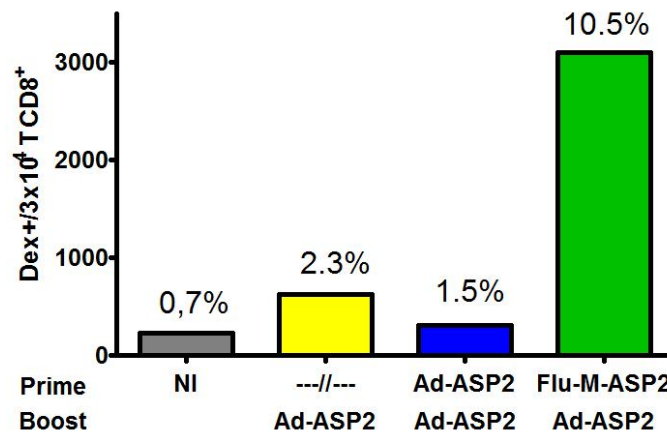
Células T CD8 produtoras de perforina demonstraram ser essenciais para a proteção em um protocolo de vacinação anterior utilizado pelo nosso grupo (de Alencar, Persechini et al. 2009). Não apenas isso, mas animais deficientes em perforina sucumbem à infecção de forma agressiva quando infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (Muller, Sobek et al. 2003). A presença destas células no coração de animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* foi diretamente relacionada com patologia no modelo crônico de infecção da doença de Chagas (Silverio, Pereira et al. 2012). Quando avaliamos esplenócitos dos animais vacinados, o único grupo que apresentou um acréscimo na produção de perforina pelas células CD8+ estimuladas com o peptídeo imunodominante foi o grupo onde vacinamos com influenza-M-ASP2 e Ad-ASP2 (Figura 14). No contexto de infecção aguda que utilizamos esta resposta muito provavelmente está mais próxima da relação de proteção do que de patologia, corroborando os dados de Muller e colaboradores em 2003 (Muller, Sobek et al. 2003). Por fim, vale ressaltar que não avaliamos a presença desta proteína no tecido cardíaco dos animais.





**Figura 14 – Análise da frequência de células CD8+ produtoras de Perforina sob estimulação.** 21 dias após a imunização de reforço esplenócitos dos animais vacinados foram purificados, marcados e submetidos à citometria de fluxo na presença de Brefeldina A com e sem estímulo com o peptídeo imunodominante TEWETGQI. A linha pontilhada representa o *background*.

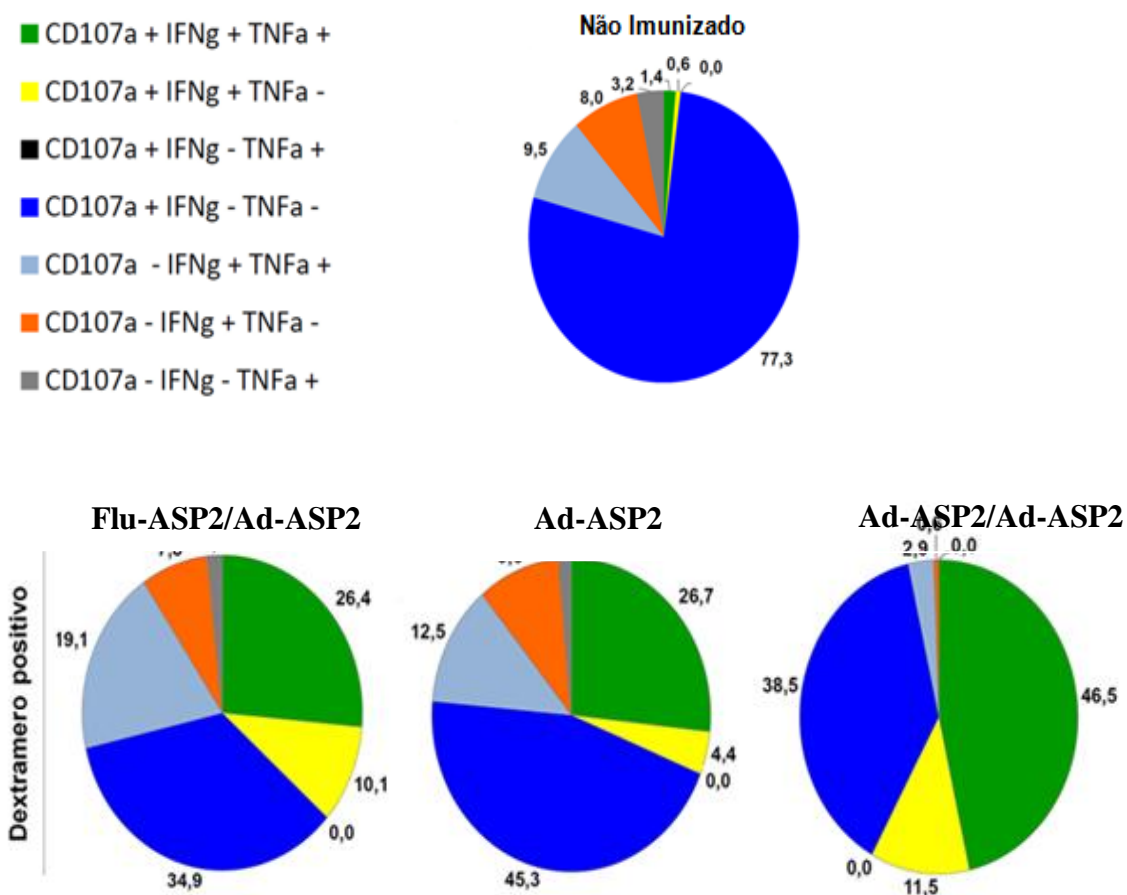
Assim, o próximo passo consistiu na análise do perfil específico usando um dextrâmero de MHC que ancora o peptídeo CD8 imunodominante TEWETGQI marcado com FITC para consideração da frequência das células CD8 específicas contra *T. cruzi*. Como demonstrado na figura 15, os esplenócitos dos camundongos imunizados com FluM-ASP2/Ad-ASP2 apresentaram maior número de linfócitos T CD8+ que ligaram ao dextrâmero contendo o epítipo imunodominante.



**Figura 15 – Análise da frequência de células CD8+ imunodominantes.** 21 dias após a imunização de reforço os esplenócitos foram purificados, marcados e submetidos à citometria de fluxo. Está representada a frequência e o número de células T CD8+ que se ligam ao dextrâmero contendo MHC-I complexado com o peptídeo imunodominante TEWETGQI entre 30 mil esplenócitos CD8+. As janelas de análise foram: seleção de *singlets* (FSC-A versus FSC-H); linfócitos por tamanho e granulosidade e; seleção de CD8+ e Dextrâmero+.

Além disso, como demonstrado na figura 16, a principal subpopulação CD8+dextrâmero+ encontrada nos animais vacinados foi CD107a positiva seguida da população triplo positiva (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CD107a). O perfil percentual induzido pela vacinação com Flu/Ad-ASP2 é muito próximo ao do grupo imunizado com Ad-ASP2, onde as células CD8+IFN- $\gamma$ +TEWETGQI+ se apresentaram em uma frequência muito maior (19% e 12,5%, respectivamente) em se comparando ao grupo imunizado com duas doses de

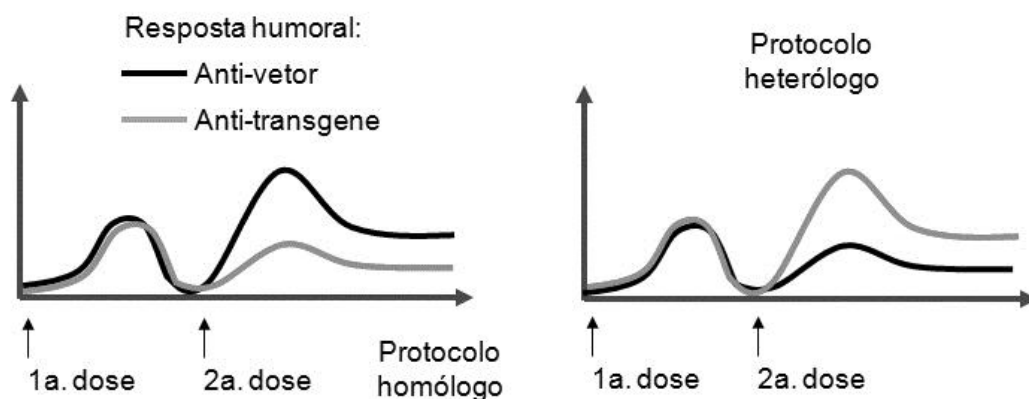
ASP2 (2,9%). Nosso resultado demonstra que apenas uma dose de Ad-ASP2 é o suficiente para imunomodular as subpopulações imunodominantes protetoras, enquanto o *prime* com influenza permite o aumento da frequência destas populações. Uma segunda dose de Ad-ASP2, usando o mesmo vírus como *prime*, altera o perfil para um mais citotóxico e menos imunomodulatório, caracterizado por maior indução de células efetoras que mobilizaram o marcador de superfície CD107a (96,5%), conquanto no grupo Flu-M-ASP2/Ad-ASP2 esta porcentagem é de 71,4. Notadamente os adenovírus recombinantes são os maiores indutores de Th1 dentre os vetores vacinais, explicando o fato. Não houve diferença de perfil fenotípico nas populações de linfócitos efetores dextrâmero negativos entre os três grupos imunizados com Ad-ASP2 (Figura 13).



**Figura 16 – Análise fenotípica de imunodominância nos esplenócitos de camundongos imunizados.** As janelas de análise foram: seleção de *singlets* (FSC-A versus FSC-H); linfócitos por tamanho e granulosidade; seleção de CD8+ e Dextrâmero+; gates individuais para cada citocina e análise booleana. Percentuais de células com perfil

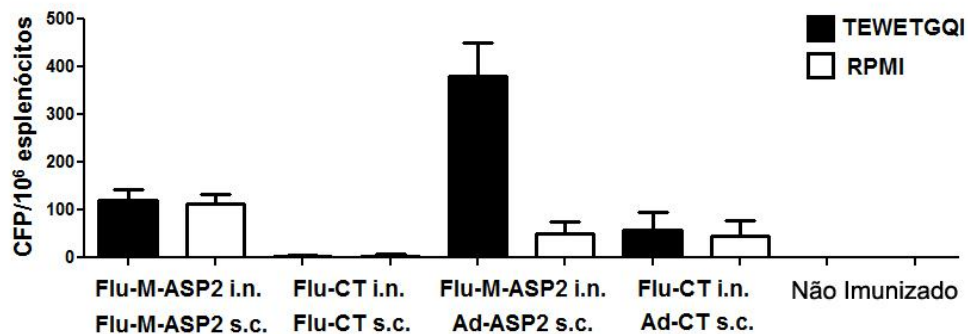
efetor dentro de células T CD8+ dextrâmero TEWETGQI+ nos diferentes protocolos vacinais ou em animais não imunizados. O número total de células efetoras foi considerado 100% o número de esplenócitos com cada perfil foi multiplicado proporcionalmente para gerar os gráficos.

O tamanho da população imunodominante, superior a 10% do total de CD8+ dentre os esplenócitos analisados, é um sinal de diferença entre os protocolos vacinais, e a imunodominância é demonstrada ser de importante para proteção em nas infecções no *T. cruzi* (Fenner 1977; Rodrigues, de Alencar et al. 2008; Tzelepis, de Alencar et al. 2008; Dominguez, Silveira et al. 2011). A quantidade de células reduzidas nos grupos imunizados apenas com o adenovírus pode ser explicada de duas maneiras já descritas na literatura: 1 – o protocolo homólogo de vacinação resulta em uma resposta imunológica secundária anti-vetor, diminuindo assim a resposta direta contra o antígeno heterólogo inserido (Hovav, Panas et al. 2007; Radosevic, Rodriguez et al. 2009). 2 – A própria imunogenicidade do vetor adenovírus humano do tipo 5 resulta em grandes populações imunodominantes, vindo a competir a imunodominância do inserto heterólogo, como demonstrado por Schirmbeck e colegas em 2008 (Schirmbeck, Reimann et al. 2008). Esta hipótese encontra subsídio em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, os quais demonstraram que a imunização com plasmídeos e/ou adenovírus codificando somente os epítomos subdominantes da ASP2 foi menos eficaz em induzir imunidade protetora do que a imunização com esses vetores codificando o epítomo dominante (Dominguez, Silveira et al. 2011). Um modelo desta hipótese se encontra na figura 17.



**Figura 17 – Protocolos de indução e reforço da resposta imune.** O eixo Y representa a magnitude da resposta imune humoral (principalmente IgG) após vacinação usando vírus recombinantes. No gráfico da esquerda se entende que duas imunizações usando o mesmo vetor resultam em uma resposta anti-vetor secundária que pode prejudicar a resposta humoral anti-gene de interesse. Por sua vez, o gráfico da direita demonstra que o uso de dois vetores diferentes evita a resposta secundária anti-vetor e permite uma expansão mais apropriada da resposta humoral anti-gene de interesse.

Para averiguar se duas doses de Flu-M-ASP2 é incapaz de estimular linfócitos T CD8+ específicos contra ASP2 imunizamos animais com estes vírus via intranasal como *prime* e via subcutânea como imunização de *reforço* 28 dias depois. Como pode ser visto na figura 18, apenas o protocolo Flu-M-ASP2/Ad-ASP2 foi capaz de estimular a produção de IFN- $\gamma$  em esplenócitos estimulados com peptídeo TEWETGQI. O resultado é esperado uma vez que a imunização com influenza uma dose é capaz de induzir a geração de anticorpos anti-influenza e neutralizar uma segunda imunização.



**Figura 18 – Indução de IFN- $\gamma$  pelo protocolo homólogo de vacinação com influenza.** 21 dias após a imunização de *reforço* os camundongos C3H/He foram eutanasiados e os esplenócitos obtidos e incubados em placas de ELISpot revestidas com anti-IFN- $\gamma$  com e sem estímulo peptídeo-específico. Após 18 horas de incubação as células foram removidas e as placas incubadas com anti-IFN- $\gamma$  conjugado a biotina e reveladas com TMB. O número de pontos foi avaliado com o auxílio de software descrito em materiais e métodos.

O uso de vírus influenza recombinantes como vetores em protocolos heterólogos de imunização previamente demonstrou induzir resposta imune protetoras contra doenças infecciosas, tais como malária e toxoplasmose (Gonzalez-Aseguinolaza, Nakaya et al. 2003; Machado, Caetano et al. 2010). Ademais, na apresentação de antígenos heterólogos serve como alternativa a outros vetores no desenvolvimento de uma vacina contra a doença de

Chagas uma vez que já temos um vetor demonstrando resultados positivos, o rAdHu5 (Miyahira, Takashima et al. 2005; Machado, Cardoso et al. 2006; de Alencar, Persechini et al. 2009), e nós mostramos aqui que em uma linhagem resistente, apenas uma imunização com Ad-ASP2 foi suficiente para alcançar proteção. Todavia, o uso de adenovírus encontra limitações, tais como imunidade prévia, além de falharem em demonstrar em humanos a mesma proteção vista em primatas não humanos (Abbink, Lemckert et al. 2007), o que justifica a procura de novos vetores alternativos.

O uso de vírus influenza vivos replicativo pode ser visto como uma alternativa aos vírus adaptados a baixas temperaturas que possuem algumas limitações no uso para vacinação em idosos ou pela grande quantidade de vírus necessária para causar proteção (Cox, Brokstad et al. 2004). Também serviriam como alternativa para vírus influenza truncados na proteína Não-Estrutural 1 (NS1), uma vez que seu truncamento pode inibir a indução do sistema imune adaptativo por suprimir a função da célula dendrítica que é crucial para proteção em doenças infecciosas (Fields, Knipe et al. 2007). A resposta imune induzida pelos vírus influenza recombinantes dicistrônicos na neuraminidase como *prime* foi alcançada em baixas doses de vírus (1000 vírus por animal) e a resposta gerada com a dose reforço com adenovírus recombinantes foi capaz proteger camundongos susceptíveis frente à infecção, como visto neste trabalho e em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Machado, Caetano et al. 2010).

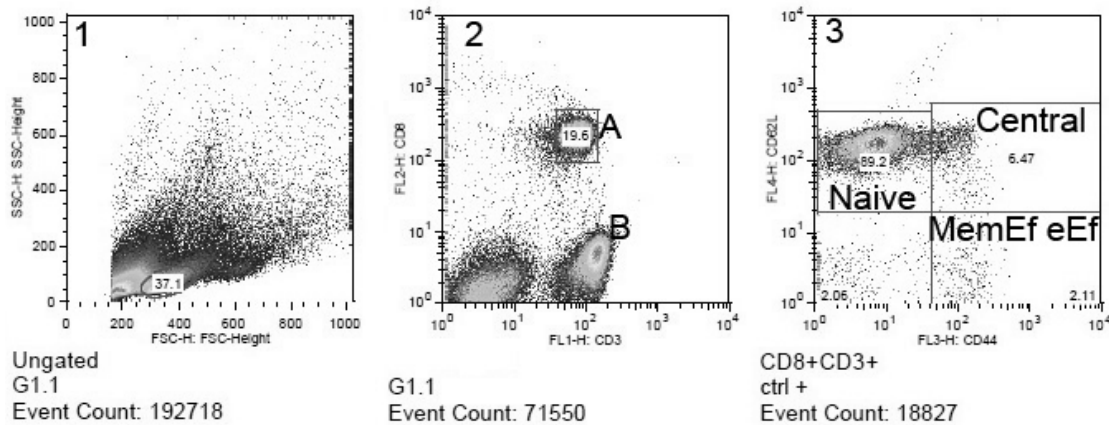
A qualidade da resposta imune é um assunto recente na literatura de vacinas, na qual o paradigma em que há a maior produção de IFN- $\gamma$  não é mais a maneira mais adequada de se alcançar proteção em algumas doenças infecciosas, como o HIV (Masopust 2009; Kim, Rerks-Ngarm et al. 2010; Varadarajan, Julg et al. 2011). Nosso protocolo de vacinação heterólogo usando Flu-M-ASP2 ou Flu-C-ASP2 como imunização de indução e Ad-ASP2 como reforço puderam estimular uma grande produção de IFN- $\gamma$ , porém esta produção não foi completamente relacionada com proteção no modelo susceptível C3H/He. Os fatores responsáveis pela proteção no grupo imunizado Flu-M-ASP2/Ad-ASP2

que estão ausentes no grupo imunizado Ad-ASP2/Ad-ASP2 provavelmente têm correlação direta com imunodominância e suas subpopulações efetoras induzidas pela vacinação, como demonstramos estar alterada entre os diferentes grupos de animais vacinados.

### **2.3.7 Perfil fenotípico das células CD8 de memória e capacidade de proteção**

O desenvolvimento de novas estratégias vacinais para o novo século encontra alguns obstáculos importantes, tais como manter imunidade efetora em crianças, segurança de adjuvantes, segurança dos conjugados e geração e manutenção de memória imunológica (Plotkin 2005; Plotkin 2014; Rappuoli, Pizza et al. 2014). Os vírus recombinantes usados nesta tese, adenovírus e influenza, dispensam o uso de adjuvantes e possuem mecanismos de atenuação para aumento de segurança. Os vírus influenza (WSN/33) são adaptados a camundongos (Machado, Naffakh et al. 2003; Vieira Machado, Naffakh et al. 2006) e os adenovírus (AdHu5) são deficientes em replicação (Caetano, Bruna-Romero et al. 2006; Machado, Cardoso et al. 2006). Também mostramos que uma dose de adenovírus-ASP2 é capaz de proteger a linhagem resistente de camundongos contra a infecção com *T. cruzi* na fase efetora. Entretanto, inúmeros estudos sugerem a relevância do modelo de duas imunizações para geração de linfócitos T CD8 de memória (Hovav, Panas et al. 2007; Masopust 2009; Nolz and Harty 2011). Neste contexto testamos a capacidade da imunização *prime-boost* Flu/Ad-ASP2 na geração de memória T CD8 específica em C3H e protetora na infecção experimental contra *T. cruzi*.

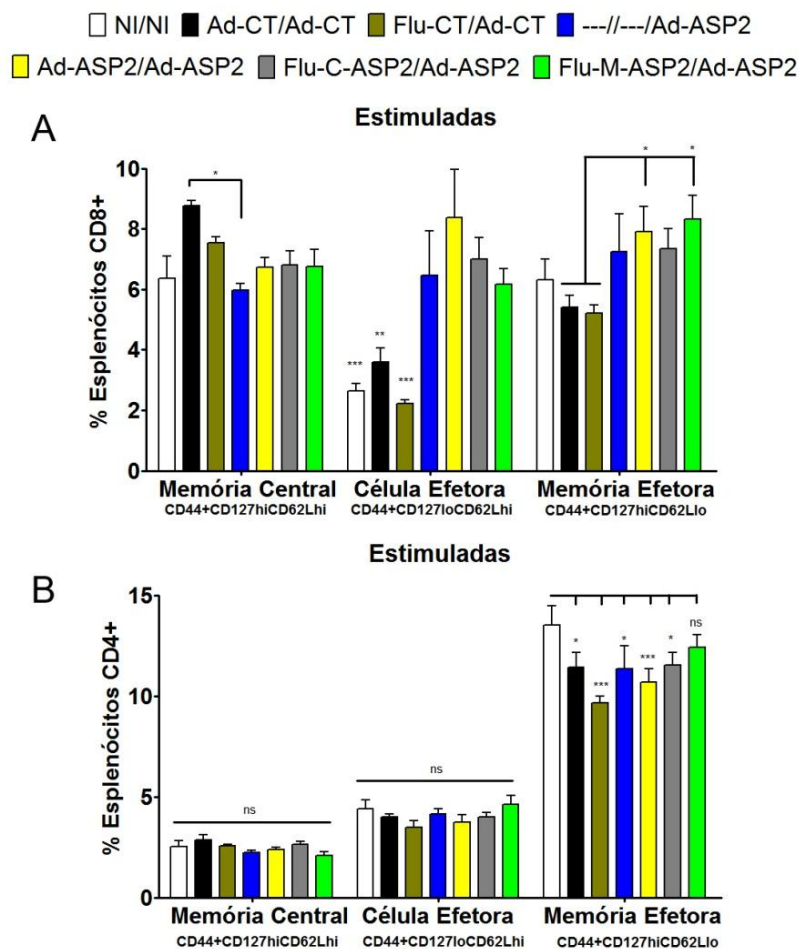
Investigamos primeiramente a geração de populações de memória e efetores 21 dias após a imunização de *boost*. As janelas de análise são apresentadas na figura 19. É importante salientar que as populações CD8 foram diretamente marcadas (Figura 19A), porquanto as populações CD4 foram consideradas CD8-CD3+ (19B).



**Figura 19 – Janelas de análise das populações de memória 21 dpb.** Ao menos 200 mil eventos foram adquiridos de esplenócitos de camundongos C3H/He imunizados nos diferentes protocolos vacinais. Os *singlets* foram escolhidos dando origem ao gráfico 1, do qual selecionamos por tamanho VS granulosidade a população de linfócitos. Então, as populações CD8(A) e CD4(B) foram selecionadas pelos marcadores CD8 e CD3 (2). Dentro de cada uma dessas populações os marcadores CD62L e CD44 foram usados para diferenciação de subpopulações de memória (3). As populações efetoras foram diferenciadas usando CD127 em histograma como será demonstrado posteriormente.

As moléculas CD44 e CD11a (ITGAL) são moléculas co-estimulatórias e adesinas expressas em linfócitos ativados, enquanto a molécula CD62L (ou L-selectina) é uma molécula de adesão de linfócitos residentes em tecidos linfóides, geralmente expresso em baixas quantidades em células efetoras (Hovav, Panas et al. 2007; Nolz and Harty 2011). Já a molécula CD127, ou receptor da interleucina-7 está presente em diferenciação de linfócitos e nas populações de memória (Nolz and Harty 2011). Como apresentado na figura 20, as populações de memória central ( $CD44+CD62L^{hi}CD127^{hi}$ ) tanto CD8 (Figura 20A) quanto CD4 (Figura 20B) não apresentaram diferença entre os protocolos vacinais com exceção do grupo Ad/Ad-CT em comparação com o grupo imunizado uma vez com Ad-ASP2. Das populações de linfócitos T CD8+ efetoras  $CD44+CD62L^{lo}CD127^{lo}$  todos os grupos imunizados ao menos com uma dose de Ad-ASP2 apresentaram uma expansão significativa em relação aos controles não infectados ou imunizados com os vírus controle (Figura 20A). Por outro lado, este aumento não foi visto nas populações efetoras T CD4 (Figura 20B). Por fim, as populações CD8+ de memória efetora,  $CD44+CD62L^{lo}CD127^{hi}$  consideradas protetoras em modelos de infecção por *T. cruzi* (Padilla, Bustamante et al.

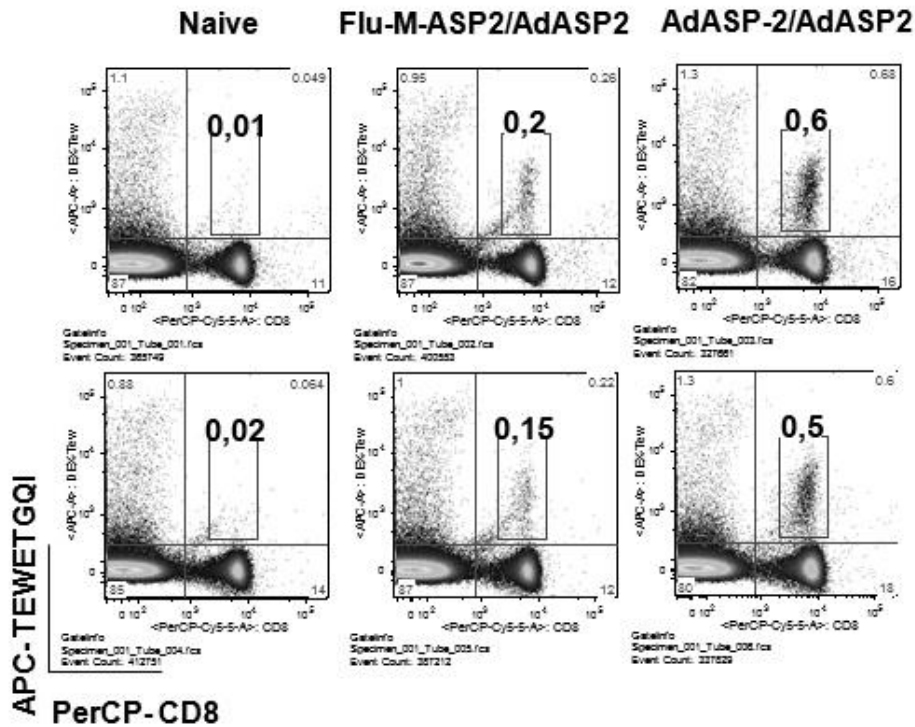
2009; Dos Santos Virgilio, Pontes et al. 2014) se apresentaram aumentadas de forma significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos Flu-M-ASP2/Ad-ASP2 e Ad/Ad-ASP2 ( $n=4$ ) quando comparados com os animais vacinados com os vírus controle. Figura 20A. Diferentemente, as populações CD4 de memória efetora apresentam uma retração significativa em todos os protocolos vacinais, exceto Flu-M-ASP2/Ad-ASP2, quando comparados com os animais não imunizados nem infectados (Figura 20B).



**Figura 20 – Perfil das populações de memória de esplenócitos de animais C3H/He imunizados 21 dpb.** Camundongos C3H/He foram imunizados como descrito em materiais e métodos. 21 dias após o *boost* os animais foram eutanasiados e o baço removido e os esplenócitos preparados para citometria de fluxo. As janelas de análises foram: *singlets*; linfócitos; A – populações CD8+CD3+. B – populações CD8-CD3+; então CD44 e CD62L como descrito na figura 19 e; CD127. As populações foram divididas em células CD8 ou CD4 efetoras, de memória central ou de memória efetora. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e; \*\*\*  $p < 0,001$ .

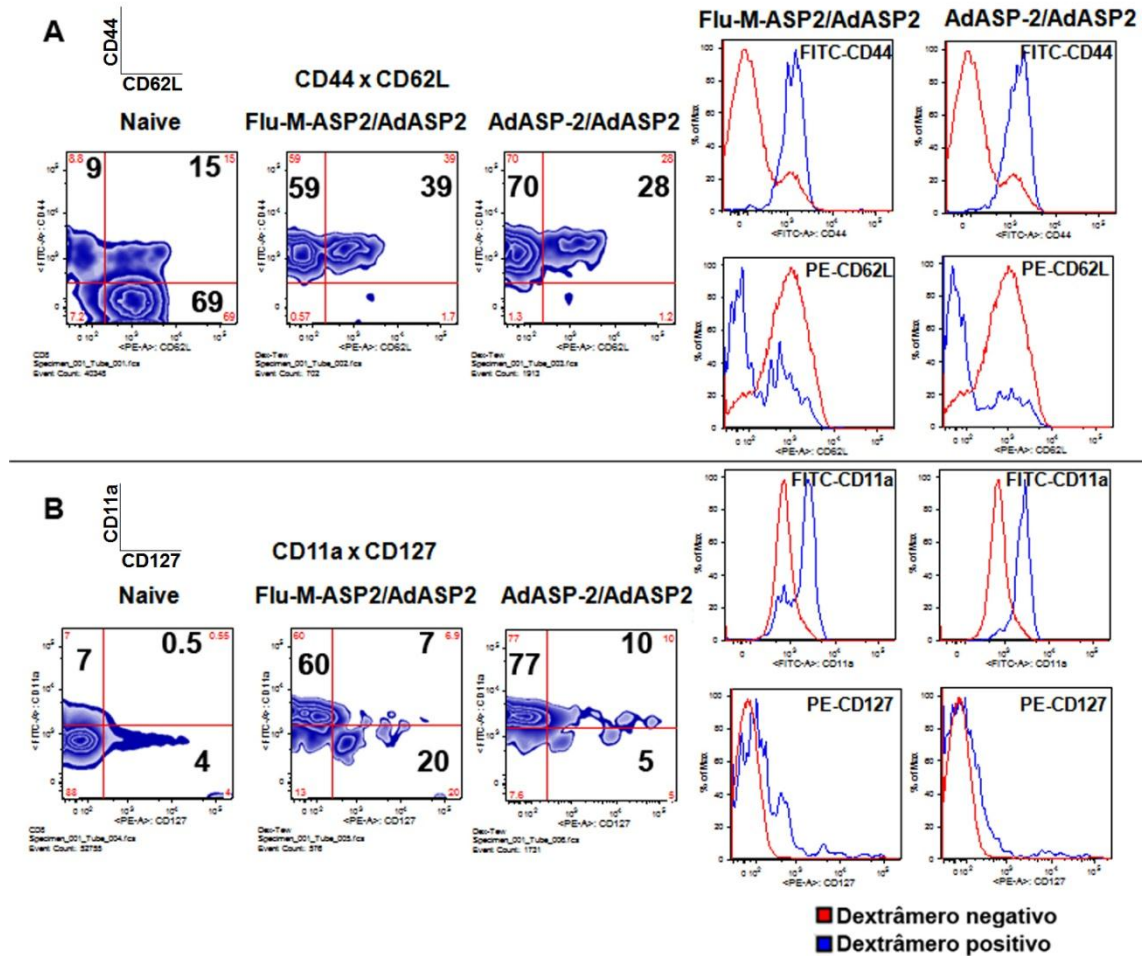


Com os resultados das populações de memória formadas ainda 21 dias após a imunização de reforço investigamos a longevidade e capacidade de responder a estímulos destas populações 120 dias após o *boost*. As figuras 21 a 23 foram adquiridas no mesmo experimento (n=4). Como visto na figura 21, o número de linfócitos CD8+ imunodominantes para o peptídeo TEWETGQI (dextrâmero+) decresce de forma abrupta nos grupos imunizados com Flu-M-ASP2/Ad-ASP2, enquanto esta redução não é tão acentuada em relação a 21 dias após o *reforço* nos camundongos que receberam duas doses de Ad-ASP2. Este resultado pode ser devido à persistência do adenovírus no tecido, já demonstrado anteriormente poder ficar até 100 dias expressando a proteína heteróloga (Schirmbeck, Reimann et al. 2008; Wortmann, Vohringer et al. 2008). Entretanto, se os adenovírus também são dados via subcutânea no *boost* no grupo *primo* imunizado com influenza, a razão mais provavelmente seria o local onde as células são estimuladas. Como o influenza *prima* as células no pulmão, quando a imunização de reforço é dada as células específicas tenderiam a se multiplicar nos linfonodos associados aos pulmões, a qual não é mantida estimulada pelas células apresentadoras de antígenos após a contração da resposta imune (Maini, Casorati et al. 1999), que estarão apresentando nos linfonodos associados à imunização subcutânea do adeno. Ainda, ambas as populações dex+ são menores que 1%, o que ocorre é que o gate é para todos os eventos. Em números absolutos, a quantidade média é de 1129 células CD8+dex+ para Ad/Ad e de 581 células CD8+dex+ no grupo Flu/Ad a cada 30 mil linfócitos. Assim, a redução é de ao menos 5 vezes para o protocolo Flu/Ad enquanto não houve redução para o grupo Ad/Ad em se comparando à frequência dessas populações encontrada 21 dias após o *boost*.



**Figura 21 – Populações CD8+Dextrâmero TEWETGQI+ 120 dias após dose de reforço.** Animais C3H/He foram imunizados e 120 dias após o *boost* os animais foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos preparados para citometria sem estimulação representando um pool de 4 animais em duplicata. O máximo de eventos foi adquirido (entre 230 e 430 mil) e a única janela de análise usada é a apresentada na figura. Portanto, as porcentagens são respectivas a 230-420 mil eventos. A porcentagem dentro do gate CD8+ para o grupo Flu-Ad é de 1,93%, porquanto a do grupo Ad/Ad é de 3,7%.

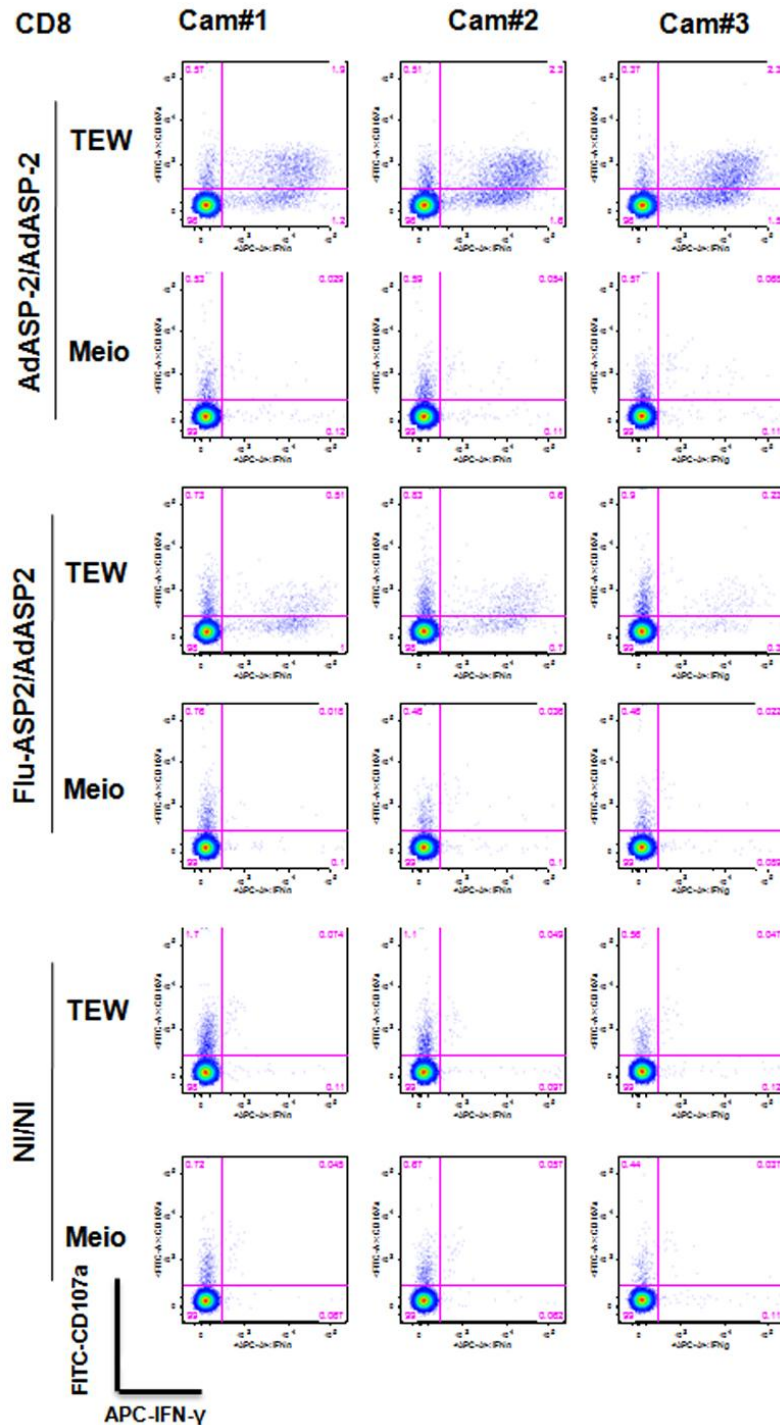
Mesmo com a redução da população imunodominante para o epítipo TEWETGQI as células imunodominantes apresentaram um perfil ativado, sendo sua maioria (59% no grupo Flu/Ad-ASP2 e 70% no grupo Ad/AdASP2) efetora ou de memória efetora (Figura 22A). O grupo imunizado com influenza possui 10% a menos de célula efetora e 10% a mais de célula de memória central, em se comparando com o grupo Ad/Ad-ASP2 (Figura 22A). Ademais, fatores de diferenciação de células de memória efetora ou efetora indicam uma maior frequência de células efetoras CD127<sup>lo</sup> no grupo imunizado com Ad/AdASP2 (77%, Figura 22B). Estes dados confirmam uma maior eficiência do vetor adenovírus na manutenção de memória específica anti-*T.cruzi* 120 dias após o *boost*.



**Figura 22 – Populações de linfócitos CD8+ imunodominantes de memória.** Animais C3H/He foram imunizados e 120 dias após o *boost* os animais foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos preparados para citometria sem estimulação sendo o n de 4 animais em duplicata, 1 milhão de células por poço. As populações dos animais não infectados não imunizados (naïve) incluem todas as células CD8+. Os outros gráficos de *dotplot* apresentam populações CD8+Dex+. A – Gráfico apresentando as populações CD44 x CD62L dextrâmero+ acompanhado dos histogramas de comparação das populações CD8+ dextrâmero+ e CD8+ sobrepondo dextrâmero-. B - Gráfico das populações CD11a x CD127 dextrâmero+ acompanhado dos histogramas de comparação das populações CD8+ dextrâmero+ sobrepondo CD8+ dextrâmero -.

Estimulamos então os esplenócitos obtidos dos animais imunizados 120 dias após o *reforço* com peptídeo TEWETGQI por 12 horas na presença de Brefeldina A para verificação da produção de citocinas (n=3). Como podemos ver na figura 23, não apenas as frequências das populações de memória efetora e efetora estão maiores no grupo imunizado com Ad/Ad-ASP2, em se comparando com Flu/Ad-ASP2, mas também sua função efetora total, demonstrada pela produção de CD107a e IFN-γ sob estimulação

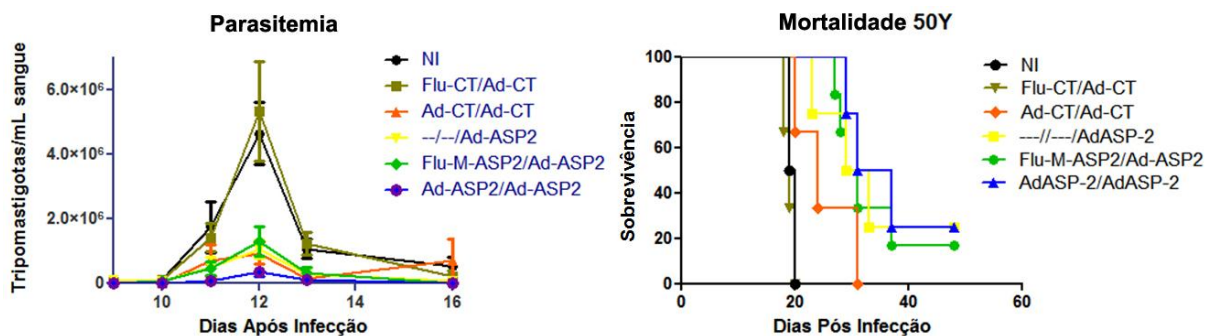
(Figura 23). Vale ressaltar que o mesmo ocorre para a produção de TNF- $\alpha$  (dados não mostrados).



**Figura 23 – Perfil efector de esplenócitos estimulados com o peptídeo TEWETGQI 120 dpb.** Animais C3H/He foram imunizados e 120 dias após o *boost* os animais foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos preparados para citometria sem estimulação sendo o n= 3. Os esplenócitos foram cultivados na presença ou ausência de 10mM do

peptídeo TEWETGQI e Brefeldina A a 37° e 5% CO<sub>2</sub> por 12 horas, marcados para CD8-PerCP, fixados/permeabilizados e marcados para citocinas intracelulares e submetidos à citometria. Cada coluna indica um animal individual em linhas que indicam o grupo e se a janela representada foi de esplenócitos estimulados ou incubados com meio de cultura sem estimulação. O eixo Y representa o marcador indireto de citotoxicidade CD107a e o eixo Y a citocina IFN- $\gamma$ .

Por fim, para verificação se a resposta de memória induzida pela imunização com os vírus recombinantes é capaz de proteger os animais contra o desafio, os camundongos C3H/He vacinados foram desafiados com 50 parasitos da cepa Y do *T. cruzi* 120 dias após a imunização de reforço em dois experimentos independentes (N=7 e N=6). Como visto na figura 24, todos os grupos que receberam ao menos uma dose de Ad-ASP2 ainda conseguiram evitar o pico de parasitemia. Além disso, houve um atraso na mortalidade em ambos os grupos vacinados, porém com a sobrevivência final variando entre 15 e 25% (Figura 24). O grupo imunizado com duas doses de Ad-ASP2 apresentou o maior atraso na mortalidade em ambos os experimentos, apesar de não significativo ( $p>0,05$ ). O conjunto de dados de memória indica que há geração e manutenção de uma resposta de memória mínima capaz de evitar a letalidade de menos de um quarto os animais contra um desafio 10x menor que o usado na fase efetora. Vale ressaltar que a infecção experimental com a cepa Y é aguda e não comparável com uma infecção natural. Uma infecção com a cepa Colombiana seria mais apropriada para este experimento.



**Figura 24 – Parasitemia e mortalidade de animais imunizados e desafiados 130 dias após a imunização de reforço.** Camundongos C3H/He imunizados com os diferentes protocolos vacinais foram desafiados com 50 parasitos da cepa Y 130 após a imunização de reforço. A parasitemia foi realizada em 5 $\mu$ L de sangue em lâminulas de 22x22mm e contagem em microscópio óptico até a queda do pico. A mortalidade foi acompanhada até o

dia 50 após o desafio. A proteção e a redução do pico de parasitemia foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparados com os controles negativos.

### 3 CONCLUSÃO

As vacinas são consideradas como uma das maiores conquistas da saúde pública na prevenção de mortes e enfermidades (Organization 2014). O maior mecanismo de sucesso das vacinas já disponíveis consiste na produção de anticorpos e estimulação de resposta de plasmócitos B de memória (Finco and Rappuoli 2014). Apesar do seu sucesso, inúmeras doenças humanas continuam sem vacinas disponíveis, e a maioria delas é causada por patógenos intracelulares. Por isso, na área da vacinologia houve um esforço dos últimos 15 anos para que encontrar vacinas que induzam uma potente resposta CD8+ (Plotkin 2005; Miyahira 2008; Jacobs, Langland et al. 2009). Os vírus recombinantes despontaram como promissores vetores vacinais, visto que são parasitas intracelulares e podiam dispensar o uso de adjuvantes, entre outras vantagens (Kay, Glorioso et al. 2001; Small and Ertl 2011). Neste contexto os adenovírus despontaram como principal vetor viral, sendo escolhidos e levados a testes clínicos para doenças como câncer, hepatite e malária, e outras doenças (Mizuguchi, Kay et al. 2001; Tatsis and Ertl 2004; de Andrade, Gazzinelli et al. 2007; Liu, Ewald et al. 2008; Limbach and Richie 2009; Machado, Caetano et al. 2010; Small and Ertl 2011). Ainda que os adenovírus venham a ser vacinas para uso em humanos, algumas doenças serão priorizadas e há a limitação devido a proteção cruzada (Wortmann, Vohringer et al. 2008). Recentemente, resultados animadores demonstraram proteção robusta em humanos vacinados com adenovírus contra tuberculose mesmo quando já tiveram contato anterior com AdHu5 (Smaill, Jeyanathan et al. 2013).

Nosso grupo estuda o uso de um vetor alternativo, o influenza, que pode ser modificado geneticamente através do uso da técnica de genética reversa. Os vírus influenza sozinhos não foram capazes de induzir proteção contra *T. cruzi* ou *T. gondii* em modelos experimentais ou em nossos experimentos, pois anticorpos neutralizantes impedem a vacinação homóloga, enquanto no modelo de adenovírus ainda são protetores (Hovav,

Panas et al. 2007; Smaill, Jeyanathan et al. 2013). Assim, em regime de vacinação *prime-boost* com adenovírus recombinantes demonstramos a viabilidade dos vírus influenza recombinantes como vetor em modelo murino de toxoplasmose (Machado, Caetano et al. 2010) e fase aguda da doença de Chagas (Barbosa, Filho et al. 2013).

Além disso, nossos resultados permitiram demonstrar que os diferentes protocolos vacinais empregados foram capazes de modular a resposta imune celular anti-ASP2, impactando de forma significativa a proteção. Também demonstramos que o mecanismo de proteção foi uma potente resposta imunodominante e polifuncional. É importante ressaltar que no protocolo influenza-adeno-ASP2 a resposta IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ + e a resposta IFN- $\gamma$ + somadas foram maiores que a resposta CD107a, o que indica um perfil mais imunoregulador do que citotóxico. Acreditamos, portanto, que a proteção se deu porque a vacinação Flu-Ad induz uma resposta imunológica de alta qualidade regulatória, não-citotóxica, e específica contra o peptídeo imunodominante da fase amastigota do *T. cruzi*.

Apesar dos resultados promissores em fase efetora da resposta imune induzida pela vacina Flu/Ad-ASP2, a resposta imunológica de memória gerada neste protocolo é reduzida após 100 dias do início da vacinação tanto do ponto de vista de produção de citocinas quanto de proteção propriamente dita. Entretanto, a cepa Y usada para os testes de fase aguda foi assim escolhida por suas características agressivas e agudas, convenientes para encurtar os longos experimentos de vacinação e desafio. De certa forma tal cepa pode ser considerada inapropriada para o desafio na fase de memória, uma vez que outras cepas se parecem mais com as principais cepas que afligem humanos são de desenvolvimento mais lento, permitindo que o sistema imune expanda sua resposta específica e combata o parasito de forma mais próxima à realidade.

Uma importante limitação do primeiro vetor viral utilizado no capítulo 2 desta tese e no trabalho de 2010, era a manutenção da virulência em camundongos quando estes vírus eram administrados em dose 50 vezes maior que a dose vacinal também por via intranasal

(Machado, Caetano et al. 2010). A partir daí, estudamos as diferentes possibilidades de atenuação viral e optamos por usar a alteração homóloga no gene da NA viral, removendo a maior parte da região codificadora adaptando um protocolo que já havia sido descrito (Shinya, Fujii et al. 2004). Testamos então a atenuação destes vírus em inúmeros parâmetros inflamatórios e em modelos de imunodeficiência demonstramos que estes vírus ainda são seguros. Ainda, são capazes de estimular a resposta imune anti-Flu mesmo com uma inflamação muito menor que a dos vírus selvagens (Barbosa, Salgado et al. 2014).

#### **4 PERSPECTIVAS**

Uma limitação importante do nosso modelo foi o uso da cepa Y, já discutido acima. Por consequência da velocidade que os animais sucumbem à infecção, não verificamos a carga parasitária nos tecidos, pois não observamos diferença no perfil inflamatório nos mesmos (Figura 11). A ausência da carga parasitária tecidual limita a interpretação da proteção apenas à sobrevivência. Averiguar a carga parasitária e experimentos utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* são necessários e confirmação da eficácia do protocolo vacinal Flu-Ad.

Outro aspecto interessante a ser explorado no mecanismo pelo qual a vacinação usando Flu-M-ASP2/Ad-ASP2 é protetora advém da característica regulatória deste protocolo vacinal. Como visto na figura 16, a população que mais reduz neste protocolo é a CD107a+, causando um aumento nas populações produtoras de IFN- $\gamma$  que não são citotóxicas para este parâmetro. Uma expectativa interessante é que uma população importante produtora de IFN- $\gamma$  e IL-10 ao mesmo tempo também esteja sendo estimulada. Em 2011, Ester Roffê e colaboradores demonstraram a importância da IL-10 na redução da carga parasitária, na parasitemia e na proteção em modelos experimentais com diferentes linhagens de camundongos e diferentes cepas de *T. cruzi* (Roffe, Rothfuchs et al. 2012). Portanto, novos experimentos devem ser feitos para avaliar o papel da IL-10 dentro do perfil de linfócitos CD8+ específicos que são ativados pelo nosso protocolo vacinal.



O vetor vNA deletado para neuraminidase construído para evitar o problema da virulência viral causada pelo WNS/33 usado nesta tese precisa agora ser estudado codificando genes de protozoários, tais como *T. gondii* e *T. cruzi*. Nosso grupo já gerou vírus vNA- $\Delta$  carreando as porções correspondente à M-ASP2 e M e C-ASP2 combinadas, para aumentar a abrangência de epítomos CD8+ e incluir a região gênica que codifica o epítomo B presente na proteína ASP2. Resultados preliminares em C3H/He usando os vírus vNA- $\Delta$ -M-ASP2 via intranasal em combinação com Ad-ASP2 via subcutânea demonstraram que este protocolo não foi melhor que o Flu-M-ASP2/Ad-ASP2 na proteção (dados não mostrados), mas ainda assim protetores. O experimento precisa ser repetido em diferentes títulos virais e por diferentes vias para a avaliação de aumento de imunogenicidade.

A incapacidade de manter uma resposta de memória específica tão eficaz quanto na fase efetora nos leva a uma perspectiva deste projeto onde testaremos vírus influenza NA- $\Delta$  codificando o gene da IL-15 entre outras citocinas com o intuito de melhorar a resposta de memória. Em 2011, Eickhoff e colaboradores demonstraram que a administração de plasmídeo codificando para IL-15 em conjunto com vacina de DNA-ASP2 é capaz de melhorar a proteção de longo prazo contra *T. cruzi* (Eickhoff, Vasconcelos et al. 2011).

Uma vez que os adenovírus recombinantes possuem limitações intrínsecas de grande número de propostas vacinais utilizando o AdHu5, ou proteção cruzada contra outros sorotipos ou exposição prévia de pacientes, outros vetores vacinais podem ser testados em combinação com o influenza. Provavelmente vacinas de DNA-ASP2 poderiam ser usadas, já que se demonstraram protetoras em mais de um modelo contra *T. cruzi* (de Alencar, Persechini et al. 2009; Eickhoff, Vasconcelos et al. 2011; Rigato, de Alencar et al. 2011). Outra alternativa seria o uso de um terceiro vetor viral. Nosso grupo, em colaboração com o prof. Flávio da Fonseca no ICB-UFMG conseguiu o vetor vírus vaccínia Ankara modificado (MVA) recombinante para ASP2, MVA-ASP2 e fizemos um teste de proteção utilizando estes vírus. A tabela 1 apresenta os resultados de sobrevivência de camundongos C3H/He

imunizados com os vírus Flu-M-ASP2 como *prime* e MVA-ASP2 como *boost* e desafiados com 500 parasitos da cepa Y de *T. cruzi*.

Grupos – desafio 500Y	N inicial	N final (30 dpi)
Flu-M-ASP2 ( $10^3$ UFP) in/MVA-ASP2 ( $10^7$ ) im	6	0
Flu-M-ASP2 ( $10^3$ UFP) in/Ad-ASP2 ( $5 \times 10^7$ UFP) sc	7	5
-- / MVA-ASP2 ( $10^7$ ) im	7	1
Flu-CT ( $10^3$ UFP) in/MVA-CT ( $10^7$ ) im	5	0
Flu-CT ( $10^3$ UFP) in/Ad-CT ( $10^7$ ) im	5	0
Não Imunizado	5	0

**Tabela 1 – Sobrevivência de camundongos C3H/He machos de 8-12 semanas de idade imunizados com influenza e MVA recombinantes.** Os animais foram vacinados com os vírus e vias descritos na primeira coluna em um intervalo de 28 dias entre o *prime* e o *boost*. in – intranasal. im – intramuscular. UFP- unidade formadora de placa. SC – subcutânea. dpi – dias após a infecção.

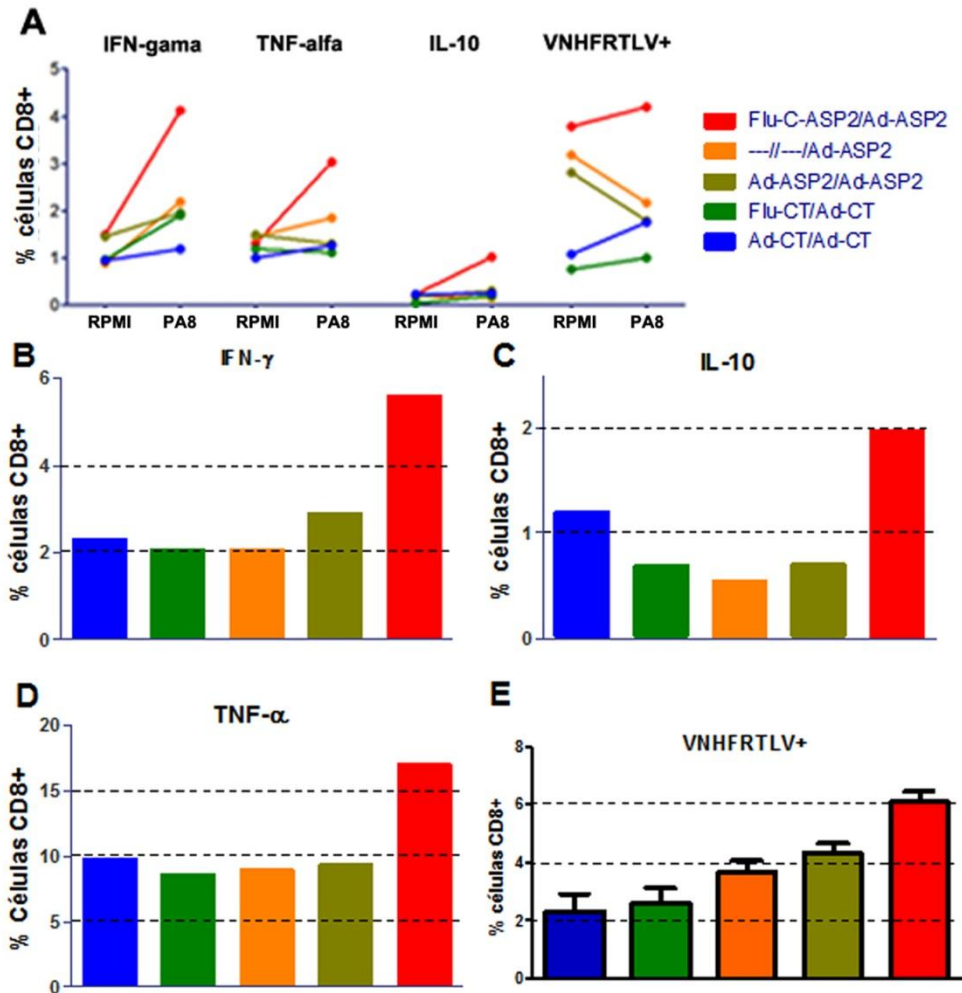
Recentemente, Silvério e colaboradores demonstraram que linfócitos CD8+ presentes no tecido cardíaco podem ter papéis protetores ou podem contribuir para o dano cardíaco dependendo do perfil se citotóxico ou imunoregulador (Silverio, Pereira et al. 2012). Para tanto, lançaram mão de um modelo de infecção crônico de doença de Chagas no qual camundongos C57BL/6 são infectados com *T. cruzi* cepa Colombiana e parasitemia e ECGs são realizados para incluir animais que possuem alterações cardíacas claras. Considerando este modelo, seria uma perspectiva interessante investigar a capacidade dos vírus influenza recombinante em combinação com os adenovírus-ASP2 como vacina terapêutica contra a doença de Chagas experimental na presença e ausência de drogas tripanomicidas para tentar reverter ou melhorar o quadro cardíaco dos camundongos.

Resultados preliminares promissores foram obtidos em um experimento em colaboração com a Dra. Joseli Lannes-Vieira que pode ser visto nas figuras 25 e 26. Como visto na figura 25, os animais vacinados com  $10^3$  UFP de Flu-C-ASP2 via intranasal/  $5 \times 10^7$  UFP de Ad-ASP2 via subcutânea foram os maiores produtores de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 após estimulação com o peptídeo imunodominante VNHFRTLTV (PA8). Interessantemente, como visto na figura 25A, a quantidade de linfócitos CD8+VNHFRTLTV+ diminuiu após estimulação com o peptídeo imunodominante nos grupos imunizados com uma ou duas doses de Ad-ASP2, enquanto aumentou nos outros três grupos. A quantidade de IFN- $\gamma$  (Fig. 25B) e IL-10 (Fig. 25C) é ao menos duas vezes maior no grupo Flu-C-ASP2/Ad-ASP2 em comparação com os outros grupos. A produção de TNF- $\alpha$  pelo grupo Flu/Ad-ASP2 foi 5% maior que dos outros grupos (Fig. 25D). Também a porcentagem de linfócitos T CD8+ que se ligam ao tetrâmero VNHFRTLTV após a estimulação é o dobro no grupo vacinado com Flu/Ad-ASP2 (Fig 25E).

Também avaliamos o perfil polifuncional dos linfócitos imunodominantes T CD8+VNHFRTLTV+ após 12 horas de estimulação com o peptídeo PA8. A principal população estimulada é duplo positiva IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , seguida da população triplo positiva IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. Novamente, o grupo infectado que foi imunizado com Flu-C-ASP2/Ad-ASP2 foi o que apresentou maior frequência das populações polifuncionais (Figura 26). A produção de IL-10 e o perfil polifuncional regulador podem ser muito positivos (Roffe, Rothfuchs et al. 2012), como discutido acima. Entretanto, testes de ECG 190 dias após a infecção indicaram que não houve reversão dos danos cardíacos causados pelo parasito.

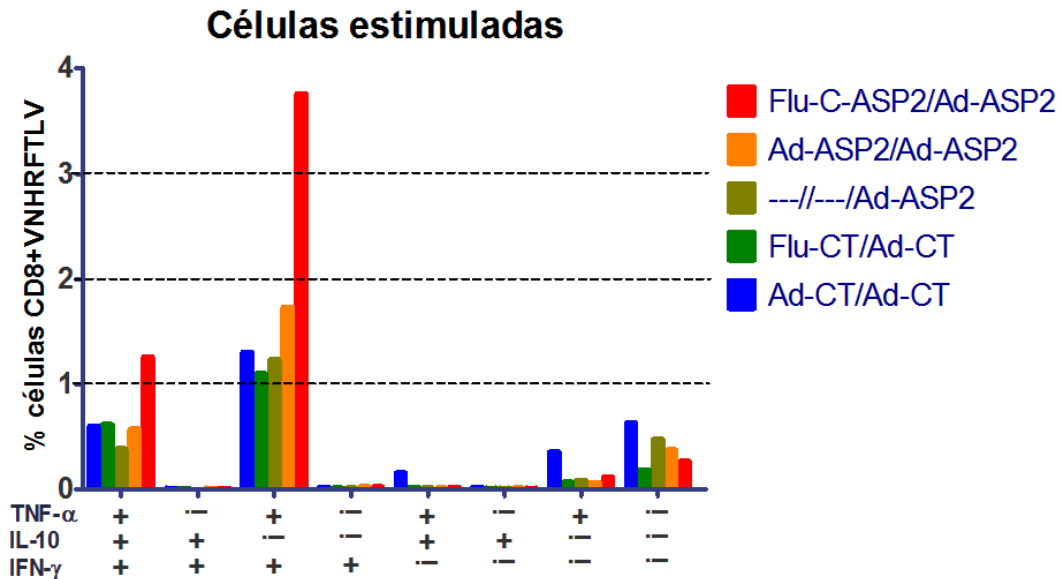
Esses resultados imunológicos preliminares do uso do protocolo Flu-Adeno como vacina terapêutica foram animadores, entretanto a ausência de melhora no quadro cardíaco é o limite desta melhora. Outro limite foi que não avaliamos a citotoxicidade nos linfócitos imunodominantes por Perforina ou CD107a (LAMP-1), uma vez que o tetrâmero usa o mesmo fluorocromo destas citocinas. Apesar disso, a indicação de uma potente resposta regulatória fica como um indicativo interessante de se fazer a intervenção vacinal em

conjunto com drogas trimanomicidas, tais como o Benznidazol, e outras drogas que tratem do quadro cardíaco. Por fim, estes experimentos precisam ser repetidos e o controle não vacinado utilizado nas análises.



**Figura 25 – Perfil imunológico específico anti-ASP2 em vacinação de modelo crônico de infecção por *T. cruzi*.** Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas de idade foram infectados com 50 parasitos da cepa colombiana de *T. cruzi*. A presença de parasitas no sangue foi determinada 45 dpi e o primeiro ECG realizado 60 dpi. No dia 119 pós-infecção outro ECG foi realizado para incluir apenas animais que apresentam anomalias cardíacas. 120 dpi os animais foram vacinados com Flu-C-ASP2 ou Ad-ASP2 e seus respectivos controles ou alternativamente não vacinados (n=5). 160 dpi os animais receberam a dose de *boost* e 190 dpi os animais foram eutanasiados, os baços removidos e os esplenócitos preparados para citometria de fluxo. Os esplenócitos foram adicionados em pool e incubados na presença de Brefeldina A e Monesina A por 12 horas em duplicata. Metade das amostras foi estimulada na presença do peptídeo específico para MHC-II H2-Kb VNHFRITLV (aqui chamado de PA8). Os anticorpos extracelulares utilizados foram Tetrâmero-VNHFRITLV-PE; anti-CD8-PerCP. Então, os esplenócitos foram fixados e permeabilizados e marcados com anti-IL-10-APC; anti-IFN-γ-PeCy7 e; anti-TNF-α-FITC. As

janelas de análise foram tamanho *versus* granulosidade para seleção de linfócitos; CD8+ *versus* Tetrâmero+ e; cada citocina em separado. O gráfico (A) apresenta cada citocina avaliada e a % de células tetrâmero-específicas antes e depois da estimulação. Os gráficos (B), (C), (D) e (E) são correspondentes aos pontos estimulados com PA8 da figura A. A figura E é a média de três análises distintas, uma para CD95L (não mostrada), uma para memória (não mostrada) e outra para as citocinas analisadas aqui. As análises foram realizados no software FlowJo X.



**Figura 26 – Perfil polifuncional dos esplenócitos dos camundongos infectados cronicamente e vacinados.** Os esplenócitos obtidos e marcados como descritos na legenda da figura após análise booleana entre as janelas de análise das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e/ou IL-10.

Como consideração final, o objetivo desta tese foi a construção, caracterização e o estudo de vírus influenza recombinante como vetor vacinal contra doenças parasitárias. Este objetivo foi alcançado quando demonstramos com sucesso que estes vírus em combinação com adenovírus recombinantes são capazes de proteger camundongos altamente susceptíveis com uma dose 10 vezes a dose letal de *Trypanosoma cruzi*. Também demonstramos que há a necessidade de melhoria do vetor em sua resposta de memória imunológica. E, por fim, demonstramos o potencial terapêutico do uso deste protocolo de vacinação, mesmo que ainda como uma perspectiva.

## **5 Artigos desenvolvidos durante o doutorado**

**a) Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against Trypanosoma cruzi Infection**

# Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection

Rafael Polidoro Alves Barbosa<sup>1</sup>, Bruno Galvão Filho<sup>1</sup>, Luara Isabela dos Santos<sup>1</sup>, Policarpo Ademar Sales Junior<sup>4</sup>, Pedro Elias Marques<sup>3</sup>, Rafaela Vaz Sousa Pereira<sup>3</sup>, Denise Carmona Cara<sup>3</sup>, Oscar Bruña-Romero<sup>2</sup>, Maurício Martins Rodrigues<sup>5</sup>, Ricardo Tostes Gazzinelli<sup>1,4,6</sup>, Alexandre Vieira Machado<sup>4\*</sup>

**1** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **2** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **3** Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **4** Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **5** Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol), Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil, **6** Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America

## Abstract

In the present study we evaluated the protection raised by immunization with recombinant influenza viruses carrying sequences coding for polypeptides corresponding to medial and carboxi-terminal moieties of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein 2 (ASP2). Those viruses were used in sequential immunization with recombinant adenovirus (heterologous prime-boost immunization protocol) encoding the complete sequence of ASP2 (Ad-ASP2) in two mouse strains (C57BL/6 and C3H/He). The CD8 effector response elicited by this protocol was comparable to that observed in mice immunized twice with Ad-ASP2 and more robust than that observed in mice that were immunized once with Ad-ASP2. Whereas a single immunization with Ad-ASP2 sufficed to completely protect C57BL/6 mice, a higher survival rate was observed in C3H/He mice that were primed with recombinant influenza virus and boosted with Ad-ASP2 after being challenged with *T. cruzi*. Analyzing the phenotype of CD8+ T cells obtained from spleen of vaccinated C3H/He mice we observed that heterologous prime-boost immunization protocol elicited more CD8+ T cells specific for the immunodominant epitope as well as a higher number of CD8+ T cells producing TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  and a higher mobilization of surface marker CD107a. Taken together, our results suggest that immunodominant subpopulations of CD8+ T elicited after immunization could be directly related to degree of protection achieved by different immunization protocols using different viral vectors. Overall, these results demonstrated the usefulness of recombinant influenza viruses in immunization protocols against Chagas Disease.

**Citation:** Barbosa RPA, Filho BG, Santos LI, Junior PAS, Marques PE, et al. (2013) Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. PLoS ONE 8(4): e61795. doi:10.1371/journal.pone.0061795

**Editor:** Dario S. Zamboni, University of São Paulo, Brazil

**Received:** October 8, 2012; **Accepted:** March 13, 2013; **Published:** April 24, 2013

**Copyright:** © 2013 Barbosa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from FIOCRUZ/PDTIS-Vacinas, and National Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq/FAPEMIG N° 015/2008; <http://www.cpqrr.fiocruz.br/inctv/>), CNPq/MAPA/SDA N° 064/2008, and Universal FAPEMIG (<http://www.fapemig.br>). Fellowships were provided by CNPq (<http://www.cnpq.br/>) to all authors. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors declare that Dr. Maurício Martins Rodrigues is a PLOS ONE Editorial Board member, and this does not alter their adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: amarok@cpqrr.fiocruz.br

## Introduction

Over a hundred years after its first description, Chagas Disease remains as an important public health problem, mostly in Latin America. Nonetheless, the infection rate is increasing in other continents, mostly by blood transfusion [1,2]. Accordingly to WHO, there are currently over 10 million people infected in Latin America and more than 100 million people live at risk areas in endemic countries. Moreover, this disease kills approximately 13 thousand people every year, due to the clinical complications and to the poor efficacy of the pharmacological treatment which is highly toxic and effective mostly during the acute phase of disease [3,4]. In addition, the resistance of parasites to chemotherapy is

another major drawback to the pharmacological treatment [5,6,7]. Thus, the development of vaccines is an important approach to be used in therapy and prophylaxis of Chagas disease [3,8].

Many vaccination studies against Chagas' disease already provided evidence that CD8<sup>+</sup> T cells play pivotal role on the development of protective immunity [9,10,11,12]. Mechanisms used by these cells to eliminate the parasite include directly killing of infected cell or secretion of cytokines such as IFN- $\gamma$  [13,14]. Among the antigens that have been studied as potential candidates for vaccine development, the surface amastigote protein 2 (ASP2) has been found as one of the most promising [15,16]. In addition, different strategies have already been tested to deliver this antigen in mice, including the use of recombinant protein, plasmid DNA

and recombinant viruses [17,18,19,20]. For instance, our group demonstrated that two sequential immunizations with recombinant HuA5 adenovirus encoding ASP2 were able to significantly reduce the parasitemia and improve the survival of vaccinated mice, when they were challenged with Y strain of *T. cruzi* [18]. However, in spite of these very promising results, a drawback in use the same viral vector in sequential immunizations rely on the risk that anti-vector antibodies generated after the priming could neutralize the vector when it is used in further immunizations and, consequently, hurdle the boost of heterospecific immune response [21,22]. The limitation of anti-vector response elicited by homologous prime-boost immunization could be surpassed by different strategies, such as the use of two different recombinant viruses on prime and boost immunizations [23,24].

Live recombinant influenza viruses have some features that make them attractive to be used in vaccination protocols against protozoan infections, as we can mention: They are well known inductors of Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) by direct infection of immature dendritic cells (DCs) and monocytes, facilitating antigen (Ag) presentation both local and systemically [25,26,27]; It is feasible to generate recombinant influenza viruses by reverse genetics techniques [28]; There are different influenza A strains and subtypes, which could be used in sequential immunizations to overcome previous immune responses directed to the vector [29].

Therefore, in the present study we exploited the use of recombinant influenza viruses carrying truncated sequences of ASP2 in sequential immunization with adenovirus encoding ASP2. This immunization protocol elicited potent anti-ASP2 cellular immune response, reduced the parasite burden and improved the survival of vaccinated mice when they were challenged with *T. cruzi*.

## Materials and Methods

### Mice and Ethics

Male of eight- to ten-weeks-old C57BL/6 and C3H/He mice were obtained from René Rachou Research Institute's (CPqRR) animal facility center (Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil) and housed according to institutional standard guidelines. All animal studies were approved by the Ethical Commission on Animals' Use (CEUA) at Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), license LW-9-09, and performed following institutional Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Cells and Parasites

MDCK and 293T cells (obtained from Pasteur Institut, FR) were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in complete Dulbecco modified Eagle Medium (DMEM; SIGMA) with 1 mM sodium pyruvate, 4.5 mg/ml L-glucose, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (herein called complete DMEM medium) and respectively supplemented with 5% or 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS; CULTILAB) [30]. Trypomastigotes from *T. cruzi* Y Strain were maintained as previously described [17] and challenge infections were performed by inoculating the mice with 1000 (C57BL/6) or 500 (C3H/He) bloodstream trypomastigotes by intraperitoneal route. Mice survival was monitored daily and parasite development was monitored by counting the number of bloodstream trypomastigotes in 5 µl of fresh blood collected from the tail vein [31].

### Plasmids for Influenza Reverse Genetics

Wild type (pPRNA) and dicistronic (pPRNA38) plasmids from neuraminidase (NA) segments of A/WSN/33 virus (H1N1) were constructed as previously described [30,32,33]. Due the size

constraints, we constructed plasmids encoding 660 nucleotides corresponding respectively to medial (M-ASP2) and carboxi-terminal (C-ASP2) segments of ASP2 (figure 1A). These sequences were obtained by PCR using the plasmid pAdCMV-ASP2 as template [18] and specific primers for each ASP2 portion. The amplicons were cloned into *KpnI* and *NheI* digested pIgSP plasmid in frame to the sequence coding for κ chain of mice immunoglobulin that allows the secretion of the foreign sequence [17]. Those constructs were used as PCR templates to generate IgSP-M or C-ASP2 segments which were site directed cloned into *XhoI* and *NheI* digested pPRNA38 vector (Figure 1B). All primers sequences are available under request and the respective presenting haplotype were referenced within the correspondent portion (Figure 1A) [34,35]. The generated plasmids (pPRNA38-M-ASP2 and pPRNA38-C-ASP2) were analyzed using Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT<sup>®</sup> (AMERSHAM) and a Megabace 1000 automatic sequencer (AMERSHAM).

Influenza segments transfer plasmids pPOLI-HA, M, NS, PB2, PB1, PA and NP and the expression plasmids pcDNA-PA, NP, PB1 and PB2 were kindly provided by Dr George Brownlee (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom) [36].

### Generation of Recombinant Viruses

Recombinant adenovirus harboring the entire ASP2 coding region (Ad-ASP2), recombinant adenovirus (Ad-CT) and influenza (Flu-CT) virus, which encode unrelated sequences were generated as previously described [18,30,37]. Recombinant influenza viruses carrying dicistronic NA38-ASP2 segments were generated by the twelve plasmid-driven genetic reverse technique, as described by Fodor and co-workers with modifications [30,36]. Briefly, co-cultures of HEK 293T and MDCK cells were simultaneously transfected with plasmid coding the dicistronic NA segment (pPRNA38-M-ASP2 or pPRNA38-C-ASP2; 0.5 µg), the expression plasmids (pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-NP and pcDNA-PA; 0.5 µg of each plasmid) and the other seven transfer plasmids of influenza A/WSN/33 segments (0.5 µg of each plasmid) using Fugene 6 Reagent<sup>®</sup> (ROCHE). Three days after incubation, infectious viral particles of recombinant vNA38-M-ASP2, vNA38-C-ASP2 (herein named respectively Flu-M-ASP2, Flu-C-ASP2) were recovered, amplified, plaque purified and titrated on MDCK as previously described [30].

### Viral RNA Extraction, RT-PCR Analysis

Viral RNA (vRNA) extraction from cell-free supernatants of infected MDCK cultures and RT-PCR analysis were performed as previously described [33]. Amplicons were analyzed on 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. RT-PCR products were purified and presence of mutations was determined by sequencing using Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT<sup>®</sup> (AMERSHAM) and a Megabace 1000 automatic sequencer (AMERSHAM).

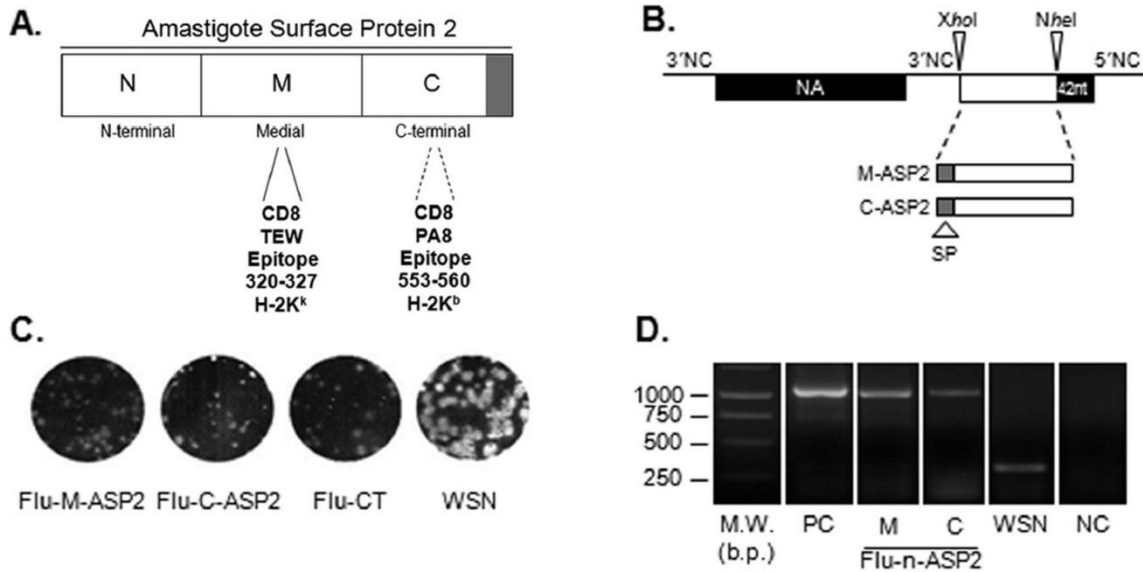
### Peptides

Peptides VNHRFTLV and TEWETGQI were purchased from Genscript (Piscataway, NJ). Peptide purity was in higher than 90%. Their identities were confirmed by Q-TOF Micro equipped with an electrospray ionization source (Micromass, United Kingdom).

### ELISPOT and Intracellular Cytokine Staining

ELISPOT assay was performed essentially as previously described [37]. Splens cells of immunized mice were obtained





**Figure 1. Construction and characterization of recombinant influenza viruses.** Schematic representation of primary sequence of Amastigote Surface Protein 2 and its corresponding moieties, highlighting the mapped CD8 T cells epitopes (A). Schematic representation of the neuraminidase dicistronic segment. NA38 segment contains an A/WSN/33 (WSN) derived recombinant neuraminidase (NA) segment followed by a duplicated 3' non coding (NC) sequence, *XhoI* and *NheI* cloning sites, a duplication of the last 42 nucleotides of NA (dark box) and the original 5' NC sequence (28 nucleotides). The foreign sequences (open boxes) were cloned between *XhoI* and *NheI* cloning sites (B). The plaque phenotype of the wild type WSN and recombinant influenza viruses were assessed by standard agarose plaque assay in MDCK cells after 3 days of incubation at 35°C and 5% CO<sub>2</sub> (C). The NA segments of recombinant influenza viruses were analyzed by RT-PCR, using a set of primers that allows the amplification of the region containing the inserted foreign sequence. Corresponding plasmids DNAs were amplified in parallel as positive control. The amplified products were analyzed on a 1% agarose and visualized by ethidium bromide staining. The values depicted at the weight marker lane are (D). W.M: weight marker; M: medial moiety of ASP2, C: carboxi-terminal moiety of ASP2; b.p.: base pairs. doi:10.1371/journal.pone.0061795.g001

three weeks after boost immunization. They were treated with ACK buffer for erythrocytes lysis and washed twice in RPMI containing 5% FBS before to be resuspended in cell culture medium consisting of RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 mM HEPES, 0.2% sodium bicarbonate, 59 mg of penicillin/liter, 133 mg of streptomycin/liter, and 10% fetal bovine serum (CULTILAB) containing recombinant IL-2 (100 U/ml). The viability of the cells was evaluated by using 0.2% trypan blue exclusion dye to discriminate between live and dead cells. The number of spleen cells was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells per well in cell culture medium and stimulated with specific peptides at final concentration of 10 µg/ml of VNHRFTLV (aa 553–560; for C57BL/6 splenocytes) or TEWETGQI (aa 320–327; for C3H/He splenocytes). The spots were counted on a S5 Core ELISPOT Analyser (CTL).

For Intracellular Cytokine Staining, the cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells per well in cell culture medium containing GolgiStop™ and GolgiPlug™ (according to manufacturer instructions; BD Pharmingen) and -phycoerythrin (PE) anti-CD107a (BD Pharmingen). In half of the cultures, a final concentration of 10 µg/ml of VNHRFTLV (for C57BL/6 splenocytes) or TEWETGQI (for C3H/He splenocytes) peptide was added. The cells were cultivated in U-bottom 96-well plates (Corning) in a final volume of 200 µl at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humid atmosphere. After 12 hour-incubation, cells were stained for surface markers fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextramer TEWETGQI (Immudex), after 10 minutes incubation, cells were also stained with peridinin chlorophyll protein complex (PerCP) anti-CD8, avidin-phycoerythrin (PeCy7) anti-CD8, or

FITC-labeled anti-CD3 (in samples without dextramer) antibodies (BD Pharmingen). The cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm kit (BD, Biosciences) according to manufacturer's recommendations. Cells were then stained for intracellular markers allophycocyanin (APC) anti-IFN-γ, APC-Cy7 anti-TNF-α, or PE Cy7 anti-TNF-α (BD Pharmingen). Finally, the cells were fixed in 2% PBS-paraformaldehyde and at least 100,000 cells were acquired on a FacsCanto, LSRFortessa or FacsAria II (BD, Biosciences) flow cytometers and then analyzed with FlowJo software (ThreeStar). The ancestry gates are represented in Figure S1.

**ELISA and Western Blot**

Recombinant ASP2 (rASP2) protein was produced in *Escherichia coli* as previously described [17]. The presence of sera specific anti-ASP2 antibodies were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on immunized mice sera obtained fourteen days after the boost immunization. Briefly, plates (Maxisorb, NUNC) were coated with 4 µg/mL (His65KDa, rASP2) and incubated at 4°C overnight. Mice sera were diluted 1:100 in blocking buffer and incubated for 2 hours at 37°C. Plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (SIGMA) one hour at room temperature, and reactions were developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) reagent (SIGMA) and read at 450 nm.

Alternatively, 0.5 µg of His65KDa, rASP2 were loaded on 12% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked and incubated with individual sera of mice immunized with recombinant viruses. After extensive washes, membranes were incubated with peroxidase-conjugated

goat anti-mouse IgG (SIGMA) and detection was performed by membrane exposure to X-ray films after a standard chemoluminescent reaction (ECL Detection System, Amersham Biosciences).

To measure IFN- $\gamma$  production, spleen cells were obtained as described above and incubated for 72 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The IFN- $\gamma$  concentration was determined in cell culture supernatant with DuoSet ELISA Development System mouse IFN- $\gamma$  kit (R&D Systems) according to manufacturer's recommendations.

### Immunizations

Heterologous prime-boost immunizations were performed as previously described [30]. Briefly, the animals were lightly anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine and inoculated by intranasal route (IN) with 10<sup>3</sup> plaque-forming unit (pfu) of recombinant influenza viruses (Flu-CT or Flu-nASP2) diluted in 25  $\mu$ l of PBS. Four weeks later, the animals were boosted with 5  $\times$  10<sup>7</sup> pfu of recombinant Ad-ASP2 or Ad-CT in 100  $\mu$ l of PBS by subcutaneous route (SC). Alternatively, some animals received two immunizations with 5  $\times$  10<sup>7</sup> pfu of recombinant Ad-ASP2 or AdCT by SC route four weeks apart (homologous prime-boost immunization protocol). Finally some mice received only one immunization with 5  $\times$  10<sup>7</sup> pfu of recombinant Ad-ASP2 by SC route.

### Statistical Analysis

Data are expressed as  $\pm$  SEM and analyzed using GraphPad Prism ver.5 Software. Statistic significance for ELISA, ELISPOT and cytokine staining assays were evaluated using One-Way ANOVA and non-parametric test followed by Bonferroni post-test. Statistical significance for parasitemia was evaluated by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. The Gehan-Breslow-Wilcoxon test was performed to compare mouse survival curves.

## Results

### Generation and Characterization of Recombinant Influenza Viruses

Recombinant influenza viruses harboring the medial or the carboxi-terminal sequence of ASP-2 protein were recovered using the 12 plasmid driven reverse genetics as previously described [30]. These recombinant viruses, which were respectively named Flu-M-ASP2 and Flu-C-ASP2, displayed lysis plaques in MDCK cells similar in size than those found in cells infected with the recombinant Flu-CT. In contrast, those viruses displayed lysis plaques that were slightly smaller than those of the wild type WSN virus (Figure 1C). In addition, their infectious titers (1.4  $\times$  10<sup>6</sup> pfu/ml Flu-M-ASP2 and 2.8  $\times$  10<sup>6</sup> pfu/ml Flu-C-ASP2) were significantly lower than those of WSN virus (1  $\times$  10<sup>8</sup> pfu/ml).

As shown in figure 1D, amplifications products of expected size (~1000 bp) were found for each recombinant influenza virus assayed. Moreover, when these amplicons were analyzed by sequencing, we found no mutations, demonstrating that those recombinant influenza viruses were genetically stable in cell culture (data not shown).

### Evaluation of Humoral Immune Response

Immunization protocols were carried out according to the schedule depicted at figure 2A. Two weeks after the boost immunization, specific anti-ASP2 IgG serum antibodies were measured by ELISA and western blot, using the recombinant ASP2 (His65KDa) protein as capture antigen. Western blot results showed that specific anti-ASP2 IgG antibodies could be found in sera of all C57BL/6 mice primed with Flu-C-ASP2 and boosted with Ad-ASP2 (figure 2B), whereas only one animal that received a

single immunization with Ad-ASP2 displayed detectable levels of specific anti-ASP2 antibodies. In addition, we detected higher levels of specific anti-ASP2 antibodies in the sera of mice primed with recombinant influenza than those found in animals that received only one immunization with Ad-ASP2 (Figure 2C). Interesting, neither by Western blot (data not shown) nor ELISA (figure 2D), we were able to detect specific anti-ASP2 antibodies in sera of C3H/He mice immunized with recombinant viruses, irrespective the immunization protocol used in vaccination. It is noteworthy that previous studies demonstrated that B epitopes are located in C-terminal moiety of ASP-2 protein and humoral immune response against intra-cellular amastigote proteins is not essential for protection [34,38].

### Specific Cellular Immune Response Against Protective Epitopes

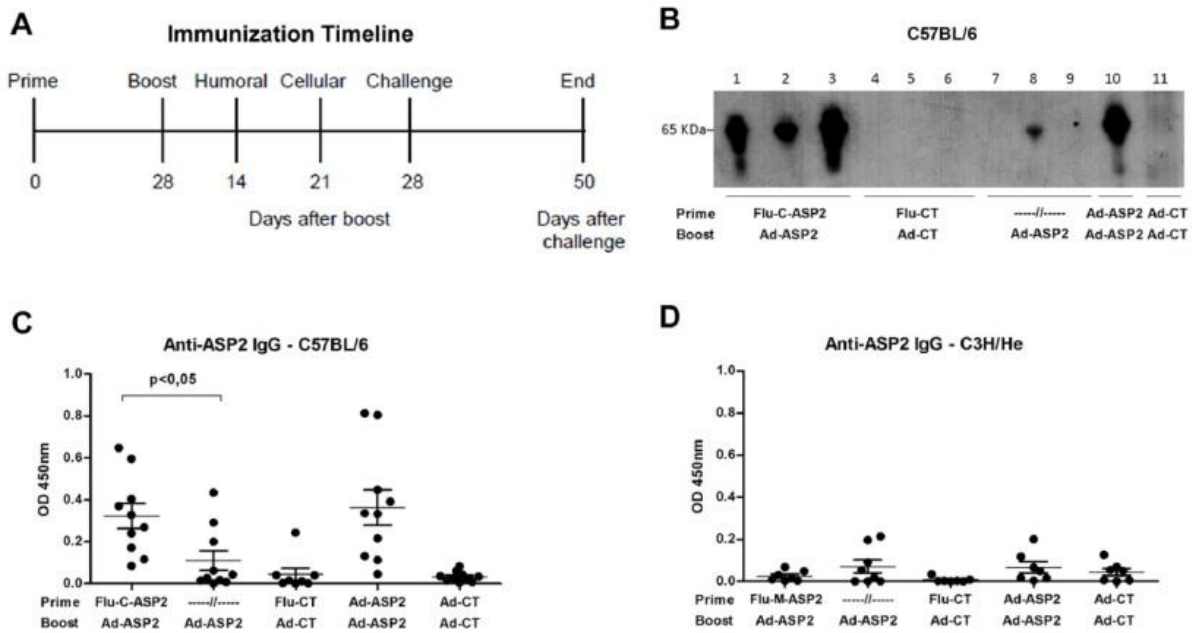
The activation of specific anti-ASP2 CD8+ T cell response was evaluated in spleen of immunized mice by stimulating their splenocytes with VNHRFTLV (H-2K<sup>b</sup>-restricted, C57BL/6) or TEWETGQI (H-2K<sup>k</sup>-restricted, C3H) peptides, three weeks after the boost immunization. As depicted in figure 3, specific IFN- $\gamma$  producing CD8+ T cells could be found in spleen cells of mice primed with Flu-C-ASP2 or Flu-M-ASP2 and boosted with Ad-ASP2 (figure 3A and C). In addition, high amounts of IFN- $\gamma$  could be measured in spleen cell culture supernatants stimulated *ex-vivo* with their respective peptides (Figure 3B and D). Interesting, in both cases, there was a clear improvement in the prime-boost immunization, as we could find a significant increase in IFN- $\gamma$  production on prime-boosted groups compared to single Ad-ASP2 immunized mice (Figure 3).

### Protection Against Experimental Infection

The protection afforded by the vaccination protocols was evaluated by challenging the vaccinated mice with 500 (C3H/He) or 1000 (C57BL/6) bloodstream Y strain trypomastigotes. Regarding the resistant mice strain, C57BL/6, a single immunization with Ad-ASP2 sufficed to reduce the parasitemia and to completely protect the animals comparing to control immunized groups (Figure 4A, p<0.05; and 4B, p<0.001).

Regarding the C3H/He mice, which display remarkable susceptibility to *T. cruzi*, infection groups that received at least a single immunization with recombinant adenovirus-ASP2 were able to reduce the peak of parasitemia (Figure 4C, p<0.001), control tissue pathology (Figure S2) and prolong survival compared to the groups immunized with control recombinant viruses (Figure 4D p<0.0005). Remarkably, a higher survival rate was found in mice that were primed with Flu-M-ASP2 and boosted with Ad-ASP2 as close to 80% of vaccinated mice survived, comparing to mice that were primed with Flu-C-ASP2 and boosted with Ad-ASP2 (p=0.0019). They also showed significant improvement of survival when compared to single or prime-boosted Ad-ASP2 immunized mice (p=0.05, single and 0.08 homologous groups; Figure 4D).

In order to verify if the improvement of survival rate induced by the Flu-Ad protocol could be due to recombinant influenza properties, we tested the usefulness of a homologous intranasal prime subcutaneous-boost immunization using Flu-M-ASP2 virus in C3H/He mice strain. As demonstrated in Figure S3, we could not observe the production of specific immune response under stimulation neither by ELISPOT (Figure S3) nor intracellular staining for IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (data not shown) in splenocytes derived from homologous immunized mice. This could be expected since a single immunization with recombinant influenza



**Figure 2. Immunization Schedule and Induction of specific anti-ASP2 humoral immune response in mice vaccinated with recombinant viruses.** Timeline representation of immunization schedule and experimental procedures (A). C57BL/6 mice were immunized as described in Material and Methods. Two weeks after the boost immunization, the animals were bled and the presence of specific anti-ASP2 total IgG antibodies in mice sera was evaluated by incubating individual (lanes 1–9) or pooled (lanes 10 and 11) sera of C57BL/6 mice with nitrocellulose membranes loaded with recombinant ASP2 protein (His65KDa) as capture antigen blot (B). Alternatively, the antibodies levels were measured by ELISA using individual sera of C57BL/6 (C) or C3H/He (D) mice sera diluted 1:100 and recombinant ASP2 protein as capture antigen. Optical Density (OD) was measured at 450 nm. doi:10.1371/journal.pone.0061795.g002

is known to elicit neutralizing antibodies that can prevent a proper boost against the heterologous M-ASP2 polypeptide [30,32].

### Cellular Immune Response Profile Elicited by Different Immunization Protocols

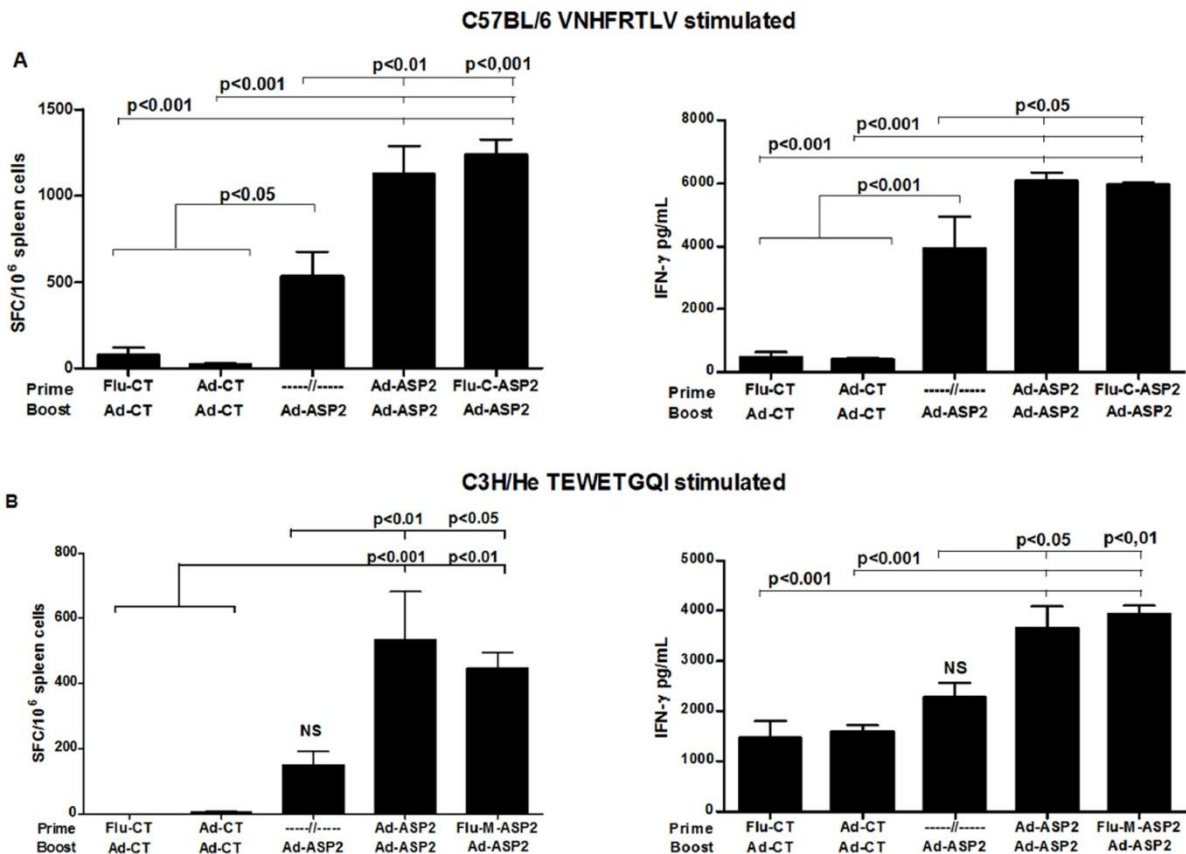
The survival results found in C3H/He mice prompted us to study more deeply the cellular immune profile elicited by the immunization protocols. To this aim, C3H/He mice were immunized as previously described and three weeks after the boost immunization, spleen CD8+ T cells were evaluated for intracellular staining of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  cytokines and for the surface mobilization of CD107a upon *ex vivo* stimulation with peptide TEWETGQI, as described in Material and Methods section. As depicted in figure 5A, the percentage of CD8+T cells positive for at least one of the parameters evaluated were similar in mice that received two immunizations with recombinant viruses, irrespective the immunization strategy employed.

Regarding the phenotype of subpopulations of CD8+ T cells found in vaccinated mice, triple (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD107a) and double (IFN- $\gamma$ +CD107a+, and IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ ) positive cells are the major populations that were found after immunization with recombinant viruses encoding ASP2 (Figure 5B). Interestingly, mice immunized with recombinant viruses encoding ASP2 displayed similar percentage of CD8+ T cell subpopulations, irrespective if they were immunized according to heterologous or homologous immunization protocols, and similar to IFN- $\gamma$  production seen by ELISPOT and ELISA, there was a clear impact of boost immunization in the frequency of specific effector

CD8+ T cells comparing prime-boosted groups with Ad-ASP2 single immunized group (Figure 5A and 5B).

In order to perform a more accurate analysis on CD8+ T cells elicited by immunization, we used a specific H-2K<sup>d</sup>/TEWETGQI dextramer. Mice were immunized as previously described and the phenotype of specific CD8+ T cells was assessed in TEWETGQI stimulated pooled spleen cells of vaccinated mice three weeks after the last immunization. As depicted in figure 5C, mice vaccinated with Flu-ASP2/Ad-ASP2 displayed the highest number of total dextramer positive CD8+ T cells. The main subpopulation of dextramer positive CD8+ T cells that were found in mice immunized irrespective the tested protocols were triple positives (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD107), followed by single (CD107+) positives CD8+ T cells (Figure 5D). On the other hand, we could observe a higher frequency of single IFN- $\gamma$ +TEWETGQI+ CD8+ T cells (CD107a- TNF- $\alpha$ -) in heterologous (19%) and Ad-ASP2 single (12.5%) immunized groups compared to Ad-ASP2/Ad-ASP2 group (2,9%).

Accordingly, Table 1 shows that besides heterologous Flu-Ad immunization elicited higher numbers of CD8+TEWETGQI+ T cells, also the frequency of CD8+TEWETGQI+ CD107a and/or IFN- $\gamma$  and/or TNF- $\alpha$  positive cells increase above two fold compared to homologous or single immunized groups. We could also find a significant increase of perforin production under stimulation only in the heterologous vaccinated group (Figure S4). This results suggest the importance of those effector factors on protection and could also indicate that the improvement of survival by heterologous could be due to a higher number of effector specific CD8+ T cells.



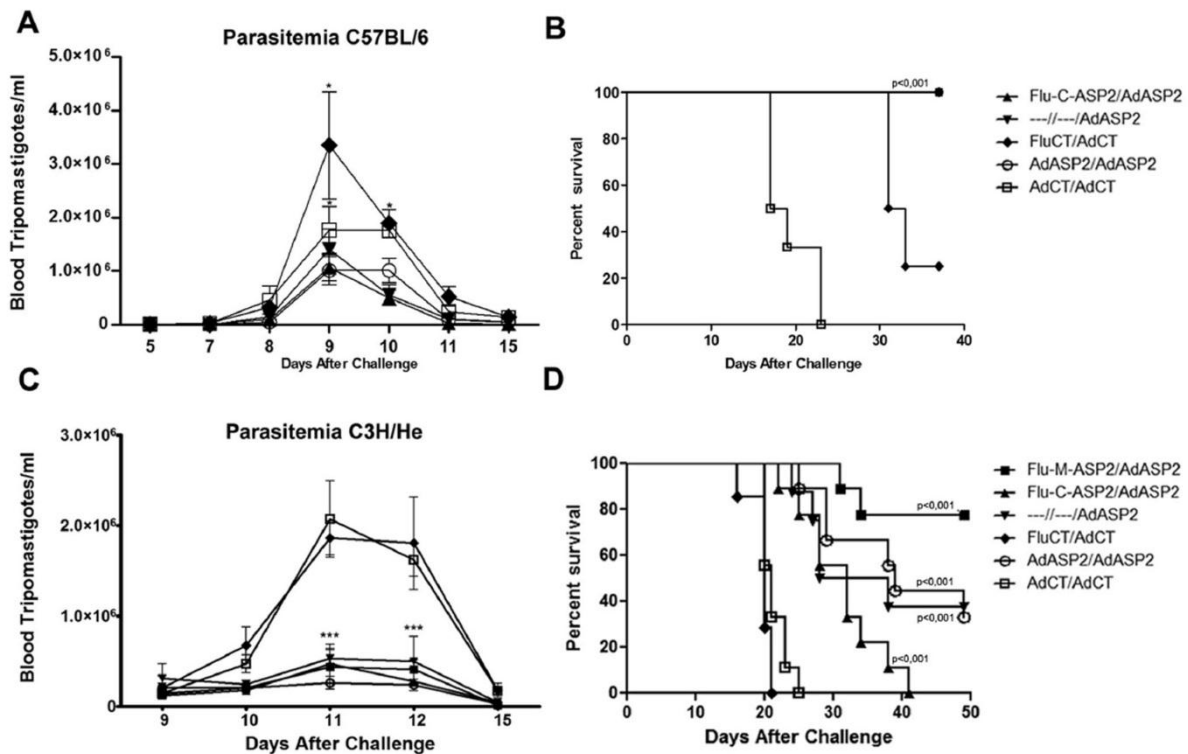
**Figure 3. Cellular responses to immunodominant epitopes from ASP2 in mice immunized with recombinant viruses.** C57BL/6 and C3H/He mice were immunized as described in Material and Methods. Three weeks after the boost immunization, the presence of ASP-2 specific IFN- $\gamma$  producing T cells in spleen cells of C57BL/6 (A) or C3H/He (B) mice were assessed by ELISPOT and culture supernatant ELISA (n=8). To this aim, the spleen cells of individual mice were stimulated 18 hours (ELISPOT) or 72 hours (ELISA) *ex vivo* with VNHFRFTLV (aa 553–560; for C57BL/6) or TEWETGQI (aa 320–327; for C3H/He) specific ASP2 peptides. Optical Density (OD) was measured at 450 nm. doi:10.1371/journal.pone.0061795.g003

**Discussion**

Recombinant viruses carrying foreign sequences have been proven to be useful tools as vaccines against many pathogens, including those which require the induction of potent type I T cell immune responses, such as *Leishmania s.p.*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* [39]. Studies carried out by our group demonstrated that two immunizations with recombinant adenovirus carrying *T. gondii* or *T. cruzi* antigens were able to elicit specific humoral and cellular immune response and to protect different mouse lineages after challenge with those protozoan parasites [18,37]. In spite of these very promising results, two immunizations with recombinant adenovirus (homologous immunization protocol) raises some concerns, mostly due to the elicited anti-vector immune response, which could hurdle the immune response directed against the foreign sequence in subsequent vaccinations. This problem could be surpassed by using two different vectors for each immunization [24]. Therefore, we evaluated the use of recombinant influenza viruses encoding ASP2 derived polypeptides as a tool for priming the specific anti-ASP2 immune response, followed by sequential immunization with a recombinant adenovirus encoding ASP2. Regarding the naturally resistant C57BL/6 mice, the

prime with recombinant influenza virus encoding the carboxi-terminal portion of ASP2 was as useful as recombinant adenovirus in priming specific anti-ASP2 immune response. Indeed, antibodies levels and the number IFN- $\gamma$  producers CD8+ T cells specific for ASP2 were similar in mice primed with recombinant influenza or adenovirus. Interesting, regarding C57BL/6 mice strain, a single immunization with recombinant adenovirus suffice to control parasitemia and to completely protect the animals after challenge. Similar findings were obtained by Duan and collaborators using recombinant Sendai virus encoding ASP2, which was able to significantly reduce the parasitemia and to completely protect C57BL/6 mice after the challenge with Tulahuén strain [19].

Regarding the susceptible strain C3H/He, all immunizations protocols employing Ad-ASP2 in our study were able to significantly reduce the parasitemia, control at certain extent tissue pathology and prolong survival of challenged animals. Considering Y strain of *Trypanosoma cruzi*, there is a variable correlation between blood parasitemia and survival rate, as demonstrated in different mice strains [40,41]. However, we could observe a correlation of parasitemia control with prolonged survival in our model. Notwithstanding, an improvement on the survival rate was observed in mice primed with



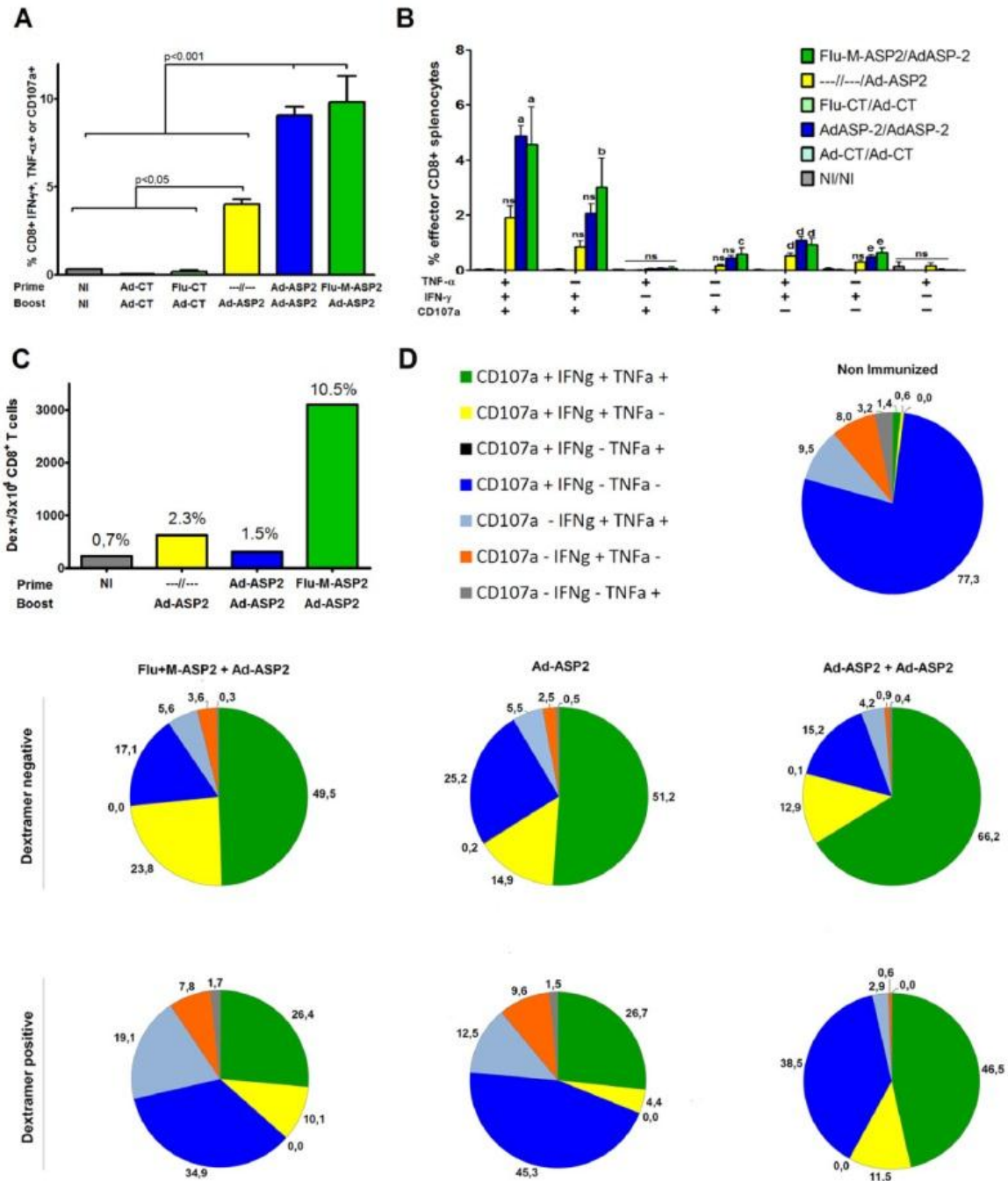
**Figure 4. Parasitemia and survival curves of immunized mice challenged with *T. cruzi*.** B6 and C3H/He mice were immunized as described in Material and Methods. Four weeks after boost immunization, they were challenged intraperitoneally with 1000 and 500, respectively, *T. cruzi* Y strain bloodstream trypomastigotes. Parasitemia was monitored on blood and depicted as the number of bloodstream trypomastigotes per milliliter of blood (A, n=4; C, n=8). The survival of vaccinated C57BL/6 (B, n=7) and C3H/He (D, n=7–9) mice was followed during 50 days and showed as Kaplan-Meier curves. \* p<0.05, \*\*\* p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0061795.g004

recombinant influenza-M-ASP2 and boosted with recombinant adenovirus even when compared to the survival of the animals that were immunized once or twice with recombinant adenovirus, or primed using Flu-C-ASP2 which does not contain an immunodominant epitope to C3H/He MHC-I haplotype. These results seemed quite surprising because the specific anti-ASP2 cellular immune response, measured by the number of specific CD8+ T as well as by production of IFN- $\gamma$  was similar in mice that were submitted either to the homologous or heterologous prime and boost immunization protocols.

Phenotype analyses performed on total CD8+ T cells obtained from vaccinated C3H/He showed that most effector CD8+ T cells were polyfunctional and mostly triple (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CD107a) and double (IFN- $\gamma$ , CD107a) positives. These results were similar to those obtained previously in C57BL/6 mice that were immunized with naked DNA and adenovirus encoding ASP2 [42]. Our results also showed that mice that received one immunization with Ad-ASP2 displayed similar CD8+ T cells phenotype than those observed in mice that received two immunizations with recombinant viruses encoding ASP2, suggesting that just one immunization with Ad-ASP2 suffice for shaping the CD8+ T cells phenotype. Thus, our observations indicate that a single immunization using Ad-ASP2 suffice to stimulate a significant production of effector cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and mobilize CD107a, elicit an immunodominant effector population which can control para-

sitemia, reduce tissue pathology and prolong survival when compared to control immunized mice even in a susceptible model. This is particularly important because often, studies using different recombinant viruses or other vaccine vectors, mice models and *Trypanosoma cruzi* strains without the single immunized group could be overestimating their protection using prime-boost protocols.

Remarkably, C3H/He mice that were primed with Flu-M-ASP2 displayed higher number of dextramer positives CD8+ T cells than mice that were immunized with Ad-ASP2. Moreover, our results showed that a boost immunization with Ad-ASP2 did not augment the number of TEWETGQI dextramer positive CD8+ T cells in mice primed with Ad-ASP2. To discuss the reason by which the heterologous prime-boost protocol could improve protection and enhance the frequency of TEWETGQI CD8+ T cells we hypothesized that immunization with Flu-M-ASP2, which encodes only the medial moiety of ASP2, primed the immunodominant CD8+ response towards TEWETGQI epitope resulting in the expansion of this population after boosting with Ad-ASP2. In contrast, priming with Ad-ASP2, which carries the entire sequence of ASP2, could possibly elicit immune response also against subdominant epitopes of ASP2, resulting in a lower secondary response against TEWETGQI immunodominant epitope after boost [34,38,42,43,44]. Accordingly, previous results of our group suggest that immunization with plasmids or adenovirus encoding



**Figure 5. Phenotype of anti-ASP2 specific CD8+ T cells elicited by vaccination with recombinant viruses.** C3H/He mice were immunized with recombinant viruses as described in Material and Methods. Two weeks after the last immunization, the spleen cells were harvested and cultivated *ex vivo* with specific TEWETGQI CD8+ T peptide and incubated with anti-CD3, anti-CD8, permeabilized and fixed and stained with anti-CD107a, anti-IFN- $\gamma$  and anti-TNF- $\alpha$  antibodies and assessed by flow cytometry. Percentage of effector CD8+ T cells reacting to the presence of TEWETGQI peptide obtained from spleen cells of mice immunized with recombinant viruses (A). Percentage of CD8+ T cells which produces IFN- $\gamma$  or/and TNF- $\alpha$  or/and mobilizes the degranulation marker CD107a after stimulation with TEWETGQI (B), the statistics depicted are compared to groups of mice immunized with control recombinant viruses. The number and frequency of dextramer positive CD8+ T found in  $3 \times 10^4$  CD8+ T (C). Functional profile of CD8+ T cells subpopulations obtained from mice immunized with recombinant viruses (D). Response were depicted with different color patterns according to the number of assessed functions (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CD107a) displayed by each dextramer negative or dextramer positive CD8+ T cells subpopulations.

doi:10.1371/journal.pone.0061795.g005

**Table 1.** Percentage of effector CD8+ T cells in splenocytes of immunized mice.

% of effector CD8+ T cells in mice immunized with recombinant viruses								
Immun. Protocol	%Total	% CD8+ T cell Dex. Neg.			%Total	% CD8+ T cell Dex. Pos.		
	CD8+ T cell Dex. Neg.	CD107+	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	CD8+ T cell Dex. Pos.	CD107+	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
Flu-ASP2+ Ad-ASP2	89.5	9.9	9.0	6.1	10.5	2.1	1.8	1.3
---+Ad-ASP2	97.7	5.1	4.1	3.2	2.3	0.5	0.4	0.3
Ad-ASP2+ Ad-ASP2	98.5	11.5	10.3	8.7	1.5	0.6	0.4	0.3
Non infected	99.3	1.1	0.3	0.2	0.7	0.2	0.0	0.0

doi:10.1371/journal.pone.0061795.t001

ASP2 subdominants epitopes afforded lower degree of protection when compared to that observed in animals immunized with vectors encoding the immunodominant epitope [42]. A reinforcement to this hypothesis could be found in the low number of proteins encoded by influenza when compared to adenovirus, which potentially reduces the number of viral antigens that could compete with the heterologous antigen for presentation by antigen-presenting cells [45,46]. The correlation between TEWETGQI (present in medial portion of ASP2, M-ASP2) immunodominant frequency and protection is reinforced by the result of C3H/He mice that were immunized using recombinant influenza encoding the C-terminus portion of ASP2 as prime and Ad-ASP2 as boost presented a survival curve similar to single immunized or homologous prime-boost using Ad-ASP2 after infection ( $p = 0.46$ ).

Another finding of our study was that the number of dextramer stained CD8+ T cells producing IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  or the surface marker CD107a found in animals primed with Flu-M-ASP2 were approximately three times higher than those observed in other vaccinated groups. However, while the role of different T cell subpopulation to control the infection with some viruses, bacteria and Plasmodium was already well documented [47,48,49,50], the biological relevance of CD8+ T cells subpopulations phenotypes to control the infection with *T. cruzi* remains elusive [51]. The IFN- $\gamma$  production itself is known to be important for protection against *Trypanosoma cruzi* infection in many previous work of our and other groups [14,52,53,54,55]. On the other hand, other factors as the effector phenotype of specific CD8+ T cells, the production of perforin, the recirculation of those cells out of spleen [56], their presence in the heart [57,58], apoptosis of specific immunodominant anti-ASP2 CD8+ T cells [59], and the type of memory cells involved are important to be considered [51]. Recently a group has elegantly shown that multiple redundant effector CD8+ T cells factors deriving from transferred Tc1 and Tc17 populations are capable of protecting mice against viral infection [60], and as CD8+ T cells have a major role in protection against *Trypanosoma cruzi* infection, this statement is an interesting subject of research. Thus, if the improvement of protection observed in mice primed with recombinant influenza-M-ASP2 virus was only due to the higher number of CD8+T specific for the immunodominant epitope or could also be due to other factors remains to be solved.

In summary, we demonstrated that recombinant influenza viruses encoding an ASP2 derived polypeptide would be useful in heterologous prime-boost studies aiming the development of vaccines against Chagas Disease. The priming with recombinant influenza virus followed by boost with recombinant adenovirus could properly augment the number of effector CD8+ T cells

specific for ASP2 immunodominant epitope, whose displayed unique phenotype and resulted in increased survival of vaccinated C3H/He mice challenged with *T. cruzi*.

## Supporting Information

**Figure S1 Representative of ancestry gates for flow cytometry experiments.** Correspondent ancestry gates for the figure 5 analysis.

(TIF)

**Figure S2 Histopathological analyses of liver, spleen and heart derived from infected mice.** Male C3H/He mice were primed and boosted according different immunization protocols and infected with 500 bloodstream trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*. Fifteen days after the infection, mice were euthanized and spleen, liver and heart were harvested, fixed and processed for histopathology. The organ sections were stained using hematoxylin-eosin and the degree of tissue inflammation was evaluated (scale bar - 100  $\mu$ m).

(TIF)

**Figure S3 Cellular responses to immunodominant epitope from ASP2 in mice immunized twice using Flu-M-ASP2.** ELISPOT of stimulated splenocytes taken from C3H/He mice immunized with the depicted protocols. The prime-boost was performed within an interval of 28 days and the experiment was performed 21 days post boost. The splenocytes were incubated 18 h in the presence of 10  $\mu$ g of TEWETGQI peptide ( $n = 5$  for all groups except non-immunized group NI/NI,  $n = 3$ ).

(TIF)

**Figure S4 Perforin production in splenocytes derived from C3H/He immunized mice.** Splenocytes derived from immunized C3H/He mice were *ex vivo* stimulated or not in the presence of Brefeldin A and Monesin A and the immunodominant peptide TEWETGQI for 12 hours, prepared, labeled and submitted to flow cytometry ( $n = 4$ ). N.I. Non-immunized/Non-infected. Their staining profiles were analyzed using FlowJo and statistical analysis performed was 2-Way ANOVA with Bonferroni post-test using GraphPad Prism 5.0 Software.

(TIF)

## Acknowledgments

We thanks to Dr George Brownlee, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom who kindly provided most of plasmids use in reverse genetics experiments; We thanks to Msc Thais Boccia, from University of São Paulo who kindly made spell checks and other recommendations.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RPAB DCC OBR MMR RTG AVM. Performed the experiments: RPAB BGF LIS PASJ RVSP PEM

## References

- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ (2012) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115: 22–27.
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP (2011) Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 24: 655–681.
- Vazquez-Chagoyan JC, Gupta S, Garg NJ (2011) Vaccine development against Trypanosoma cruzi and Chagas disease. *Adv Parasitol* 75: 121–146.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402.
- Camandaroba EL, Reis EA, Goncalves MS, Reis MG, Andrade SG (2003) Trypanosoma cruzi: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 201–209.
- Le Loup G, Paloux G, Lescuré FX (2011) Update in treatment of Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 24: 428–434.
- Urbina JA (2001) Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis* 14: 733–741.
- Bethony JM, Cole RN, Guo X, Kamhawi S, Lightowers MW, et al. (2011) Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol Rev* 239: 237–270.
- Rodrigues MM, Boscardin SB, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Salay G, et al. (2003) Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *An Acad Bras Cienc* 75: 443–468.
- Parodi C, Padilla AM, Basombrio MA (2009) Protective immunity against Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 288–294.
- Miyahira Y (2008) Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8+ T cell immunity—an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int* 57: 38–48.
- Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, et al. (2010) The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 12: e29.
- Muller U, Sobek V, Balkow S, Holscher G, Mullbacher A, et al. (2003) Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of Trypanosoma cruzi from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol* 33: 70–78.
- de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, et al. (2009) Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, Trypanosoma cruzi, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* 77: 4383–4395.
- Wizel B, Palmieri M, Mendoza C, Arana B, Sidney J, et al. (1998) Human infection with Trypanosoma cruzi induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Clin Invest* 102: 1062–1071.
- Garg N, Tarleton RL (2002) Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in Trypanosoma cruzi infection. *Infect Immun* 70: 5547–5555.
- Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM (2003) Immunization with cDNA expressed by amastigotes of Trypanosoma cruzi elicits protective immune response against experimental infection. *Infect Immun* 71: 2744–2757.
- Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, et al. (2006) Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* 17: 898–908.
- Duan X, Yonemitsu Y, Chou B, Yoshida K, Tanaka S, et al. (2009) Efficient protective immunity against Trypanosoma cruzi infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. *Vaccine* 27: 6154–6159.
- Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, et al. (2011) Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing a Trypanosoma cruzi Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Viol J* 8: 127.
- Schneider J, Gilbert SC, Hamann CM, Degano P, Prieur E, et al. (1999) Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol Rev* 170: 29–38.
- Ramshaw IA, Ramsay AJ (2000) The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21: 163–165.
- Lu S (2009) Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol* 21: 346–351.
- Radošević K, Rodriguez A, Lemckert A, Goudsmit J (2009) Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. *Expert Rev Vaccines* 8: 577–592.
- Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, et al. (2010) Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11531–11536.
- Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF (2011) Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res* 162: 19–30.
- Johnson S, Zhan Y, Sutherland RM, Mount AM, Bedoui S, et al. (2009) Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells. *Immunity* 30: 218–227.
- Horimoto T, Kawaoka Y (2009) Designing vaccines for pandemic influenza. *Curr Top Microbiol Immunol* 333: 165–176.
- Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D, et al. (2001) Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol* 75: 8899–8908.
- Machado AV, Caetano BC, Barbosa RP, Salgado AP, Rabelo RH, et al. (2010) Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the Toxoplasma gondii surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 28: 3247–3256.
- Kretzli AU, Brener Z (1976) Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. *J Immunol* 116: 755–760.
- Vieira Machado A, Naffakh N, Gerbaud S, van der Werf S, Escriou N (2006) Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice. *Virology* 345: 73–87.
- Machado AV, Naffakh N, van der Werf S, Escriou N (2003) Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. *Virology* 313: 235–249.
- Araujo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, et al. (2005) CD8+ T-cell-dependent control of Trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun* 73: 6017–6025.
- Low HP, Santos MA, Wizel B, Tarleton RL (1998) Amastigote surface proteins of Trypanosoma cruzi are targets for CD8+ CTL. *J Immunol* 160: 1817–1823.
- Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, et al. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 73: 9679–9682.
- Caetano BC, Bruna-Romero O, Fux B, Mendes EA, Penido MI, et al. (2006) Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of toxoplasma gondii induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther* 17: 415–426.
- Tzelepis F, de Alencar BC, Penido MI, Gazzinelli RT, Persechini PM, et al. (2006) Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with Trypanosoma cruzi in naive or vaccinated mice. *Infect Immun* 74: 2477–2481.
- Liniger M, Zuniga A, Naim HY (2007) Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines* 6: 255–266.
- Roffe E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino AP, Ribeiro-Gomes FL, et al. (2012) IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* 188: 649–660.
- Goncalves da Costa SC, Calabrese KS, Zaverucha do Valle T, Lagrange PH (2002) Trypanosoma cruzi: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol Histopathol* 17: 837–844.
- Dominguez MR, Silveira EL, de Vasconcelos JR, de Alencar BC, Machado AV, et al. (2011) Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS One* 6: e22011.
- Rosenberg CS, Martin DI, Tarleton RL (2010) CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of Trypanosoma cruzi infection but are not required for resistance. *J Immunol* 185: 560–568.
- Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S, Kreppel F (2008) The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther* 16: 1609–1616.
- Kastenmuller W, Gasteiger G, Gronau JH, Baier R, Ljapoci R, et al. (2007) Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *J Exp Med* 204: 2187–2198.
- Yewdell JW, Bennink JR (1999) Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17: 51–88.
- Gomez CE, Najera JL, Perdiguero B, Garcia-Arriaza J, Sorzano CO, et al. (2011) The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J Virol* 85: 11468–11478.
- Tan AC, Eriksson EM, Kedzierska K, Deliyannis G, Valkenburg SA, et al. (2012) Polyfunctional CD8(+) T cells are associated with the vaccination-induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. *Antiviral Res* 94: 168–178.
- Rodriguez D, Gonzalez-Aseguinolaza G, Rodriguez JR, Vijayan A, Gherardi M, et al. (2012) Vaccine efficacy against malaria by the combination of porcine parvovirus-like particles and vaccinia virus vectors expressing CS of Plasmodium. *PLoS One* 7: e34445.
- Elyang T, Christensen JP, Billeskov R, Thi Kim Thanh Hoang T, Hokst P, et al. (2009) CD4 and CD8 T cell responses to the M. tuberculosis Ag85B-TB10.4



- promoted by adjuvanted subunit, adenovector or heterologous prime boost vaccination. *PLoS One* 4: e5139.
51. Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araujo AF, Ersching J, Tararam CA, et al. (2012) Relevance of long-lived CD8(+) T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination. *Front Immunol* 3: 358.
  52. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, et al. (2001) Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 159: 1723–1733.
  53. Rodrigues AA, Saosa JS, da Silva GK, Martins FA, da Silva AA, et al. (2012) IFN-gamma plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1598.
  54. Takayama E, Ono T, Carnero E, Umamoto S, Yamaguchi Y, et al. (2010) Quantitative and qualitative features of heterologous virus-vector-induced antigen-specific CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Parasitol* 40: 1549–1561.
  55. Marinho CR, Nunez-Apaza LN, Martins-Santos R, Bastos KR, Bombeiro AL, et al. (2007) IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scand J Immunol* 66: 297–308.
  56. Dominguez MR, Ersching J, Lemos R, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. (2012) Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 30: 2882–2891.
  57. Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, et al. (2012) CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog* 8: e1002645.
  58. Silverio JC, de-Oliveira-Pinto LM, da Silva AA, de Oliveira GM, Lannes-Vieira J (2009) Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol* 91: 72–86.
  59. Vasconcelos JR, Bruna-Romero O, Araujo AF, Dominguez MR, Ersching J, et al. (2012) Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8+ T-cell response: reversal by adenoviral vaccine. *PLoS Pathog* 8: e1002699.
  60. Hamada H, Bassity E, Flies A, Strutt TM, Garcia-Hernandez Mde L, et al. (2013) Multiple redundant effector mechanisms of CD8+ T cells protect against influenza infection. *J Immunol* 190: 296–306.

## **b) Protective Immunity and Safety of a Genetically Modified Influenza Virus Vaccine**

# Protective Immunity and Safety of a Genetically Modified Influenza Virus Vaccine

Rafael Polidoro Alves Barbosa<sup>1,2,3</sup>, Ana Paula Carneiro Salgado<sup>1,3</sup>, Cristiana Couto Garcia<sup>3,4</sup>, Bruno Galvão Filho<sup>1</sup>, Ana Paula de Faria Gonçalves<sup>1</sup>, Braulio Henrique Freire Lima<sup>3,4</sup>, Gabriel Augusto Oliveira Lopes<sup>3,4</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>5</sup>, Andriara Cristina Cardoso Peixoto<sup>3,4</sup>, Danilo Bretas de Oliveira<sup>6</sup>, Marco Antônio Ataíde<sup>2</sup>, Carla Aparecida Zirke<sup>1</sup>, Tatiane Marques Cotrim<sup>1</sup>, Érica Azevedo Costa<sup>1</sup>, Gabriel Magno de Freitas Almeida<sup>6</sup>, Remo Castro Russo<sup>3,4</sup>, Ricardo Tostes Gazzinelli<sup>1,2,7</sup>, Alexandre de Magalhães Vieira Machado<sup>1,4</sup>

**1** Laboratório de Imunopatologia, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **2** Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **3** Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **4** Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **5** Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **6** Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **7** Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America

## Abstract

Recombinant influenza viruses are promising viral platforms to be used as antigen delivery vectors. To this aim, one of the most promising approaches consists of generating recombinant viruses harboring partially truncated neuraminidase (NA) segments. To date, all studies have pointed to safety and usefulness of this viral platform. However, some aspects of the inflammatory and immune responses triggered by those recombinant viruses and their safety to immunocompromised hosts remained to be elucidated. In the present study, we generated a recombinant influenza virus harboring a truncated NA segment (vNA-Δ) and evaluated the innate and inflammatory responses and the safety of this recombinant virus in wild type or knock-out (KO) mice with impaired innate (Myd88 <sup>-/-</sup>) or acquired (RAG <sup>-/-</sup>) immune responses. Infection using truncated neuraminidase influenza virus was harmless regarding lung and systemic inflammatory response in wild type mice and was highly attenuated in KO mice. We also demonstrated that vNA-Δ infection does not induce unbalanced cytokine production that strongly contributes to lung damage in infected mice. In addition, the recombinant influenza virus was able to trigger both local and systemic virus-specific humoral and CD8<sup>+</sup> T cellular immune responses which protected immunized mice against the challenge with a lethal dose of homologous A/PR8/34 influenza virus. Taken together, our findings suggest and reinforce the safety of using NA deleted influenza viruses as antigen delivery vectors against human or veterinary pathogens.

**Citation:** Barbosa RPA, Salgado APC, Garcia CC, Filho BG, Gonçalves APdF, et al. (2014) Protective Immunity and Safety of a Genetically Modified Influenza Virus Vaccine. PLoS ONE 9(6): e98685. doi:10.1371/journal.pone.0098685

**Editor:** Adrianus CM Boon, Washington University School of Medicine, United States of America

**Received:** August 8, 2013; **Accepted:** May 7, 2014; **Published:** June 13, 2014

**Copyright:** © 2014 Barbosa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from FIOCRUZ/PDTIS-Vacinas, and National Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq/FAPEMIG N° 015/2008), CNPq/MAPA/SDA N° 064/2008, and Universal FAPEMIG. CNPq provided fellowships to RPAB, APCS, CCG, BHFL, GAOL, MAR, ACCP, DBO, MAA, CAZ, TMC, EAC, RCR, RTG and AMVM. CAPES provided fellowship to GMFA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: amarok@cpqrr.fiocruz.br

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

## Introduction

Influenza A viruses (*Orthomyxoviridae*) have two glycoproteins anchored on the viral envelope: hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Hemagglutinin mediates viral entry into the lung epithelial cell by binding the viral particle to cell surface receptors (the sialic acid units), while the neuraminidase cleaves the sialic acid allowing the release of the newly formed viral particles [1].

Recombinant influenza viruses have been proven to be very efficient as antigen delivery vectors [2,3]. Although some strategies have already been developed to generate recombinant influenza viruses, most of them are hampered by retention of their original virulence [4,5]. To bypass this, Fuji and colleagues generated recombinant influenza viruses harboring a partially deleted neuraminidase segment, where its catalytic region was replaced by a foreign sequence [6,7]. Although influenza viruses lacking functional neuraminidase have been found to be highly attenuated

in wild type mice, the inflammatory response triggered by those viruses, as well as their safety in immunocompromised hosts remains to be evaluated. [6,7,8].

The pro-inflammatory milieu is important for counteracting the viral infection before the development of acquired immunity. It is also responsible for the influenza-induced injury [7,9,10,11]. The unbalanced cytokine and chemokine production by cells from the lung parenchyma is a significant pathological component which plays a major role in amplification of pulmonary damage and collapse in mortality in influenza infected patients [12,13,14,15,16,17]. Thus, it is important to improve our knowledge about how recombinant influenza viruses lacking functional neuraminidase modulate the inflammatory immune response in lungs and impact the lung physiology.

Therefore, in the present study, we evaluated the immunopathogenic profile induced by a recombinant influenza virus harboring a truncated neuraminidase segment and its safety for wild type mice and those lacking the innate or the acquired branches of immune response. Our results show that recombinant influenza viruses without functional neuraminidase induce discrete pulmonary inflammatory response and lung damage. In addition, vaccination with this recombinant virus elicits local and systemic acquired specific immune responses which are able to protect mice challenged with homologous highly virulent wild type virus A/PR8/34. Moreover, the recombinant influenza virus harboring a truncated neuraminidase are attenuated even in MyD88 <sup>-/-</sup> and Rag <sup>-/-</sup> mice. Overall, our results support the safety of using such genetically engineered influenza vectors carrying heterologous sequences as live bivalent vaccines.

## Results

### Generation and characterization of recombinant viruses

Wild type A/PR8/34 virus (herein named PR8) and recombinant influenza (vNA-Δ) harboring a spacer sequence of 660 nucleotides (figure 1A) were generated by eight plasmid driven reverse genetics, as described by de Goede [10]. The recombinant vNA-Δ virus displayed lysis plaques on MDCK cells smaller than those of the reverse genetics generated PR8 virus (figure 1B) and its infectious titer was 10-fold lower (10<sup>7</sup> PFU/ml vNA-Δ).

To assert if the generated virus is able to trigger immune response in human epithelial cells we evaluated the induction of type I and III interferons in A549 cells infected with PR8 or recombinant vNA-Δ virus in the presence of exogenous neuraminidase or incubated with the same media without virus (vNA treated control). At different time points, total cellular RNA was extracted and mRNA levels of human (hu) IFN-β (type I) and hu IFN-λ2/3 (type III) were evaluated by qRT-PCR. The results depicted in figure 1C show that both PR8 and recombinant vNA-Δ viruses were able to induce type I and III interferons, which attained their maximal fold induction at 24 hours post-infection.

### Reduced viral loads and attenuated pulmonary inflammatory response in mice inoculated with vNA-Δ virus

Mice were anesthetized and inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of PR8 (corresponding to approximately 20 LD<sub>50</sub>) or 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ virus. As depicted in figure 2A, the animals inoculated with PR8 lose around 25% of body weight and approximately 75% of animals died by 7 days post inoculation (dpi). By contrast, the animals inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ showed neither weight loss nor death (figure 2A and 2B), corroborating the results obtained in previous studies [6,10]. In addition, animals inoculat-

ed with PR8 virus displayed detectable virus in lungs 1, 4 and 7 dpi, whereas the viral titers in lungs of mice inoculated with vNA-Δ dropped dramatically at day 4 and became virtually undetectable 7 dpi (figure 2C).

It is well established that inflammatory response plays a pivotal role in immunopathology during influenza infection [7]. To evaluate the inflammatory response triggered by recombinant vNA-Δ, we inoculated mice with 10<sup>5</sup> PFU of PR8 virus or recombinant vNA-Δ virus and measured inflammatory parameters at different time points after infection.

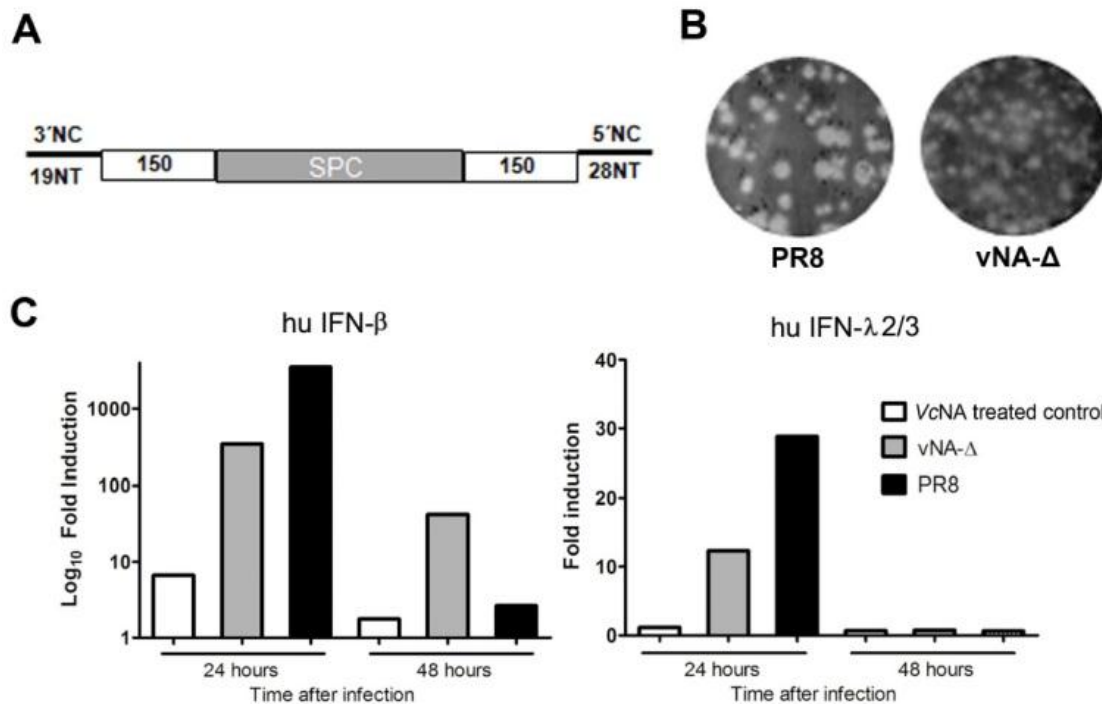
Histopathological analysis showed that mice inoculated with wild type PR8 virus displayed macroscopic signs of pneumonia such as petechiae and even hepatization of lungs at 4 and 7 dpi. By contrast, no macroscopic lesions were found in lungs of animals inoculated with vNA-Δ at any time point (data not shown). Moreover, the grading scores demonstrated that inflammatory lesions in lung parenchyma, vessels, airways and epithelial injury in mice inoculated with PR8 virus were significantly higher than those found in animals inoculated with vNA-Δ or inoculated with PBS (mock) at 4 and 7 dpi (figure 2D). Importantly, histopathological analysis demonstrated that PR8 inoculation resulted in higher injury due to the inflammatory response (figure 2E-G), whereas inoculation with vNA-Δ resulted in only a mild inflammatory response (figure 2H-J), similar to PBS inoculated mice (figure 2K). Overall, increased inflammatory response in mice inoculated with PR8 virus resulted in a higher pathology score (figure 2L), while this parameter was highly reduced in mice inoculated with vNA-Δ.

Accordingly, histopathological analysis of classical inflammatory parameters showed that there was a high neutrophilic and mononuclear cell infiltrate in the lungs of mice infected with PR8 virus (figure 3A). This result was correlated with myeloperoxidase (MPO) activity (figure 3B), and with increased levels of N-acetylglucosaminidase (NAG, figure 3C), which are markers for lesions mediated by neutrophils and macrophages, respectively. By contrast, those parameters were reduced in mice inoculated with vNA-Δ and comparable to those in PBS inoculated mice (mock). The only exception was the level of NAG, which were increased in the lungs of mice inoculated with vNA-Δ, suggesting an elevation in macrophage accumulation into lung tissue after infection with vNA-Δ (figure 3C).

Consistently, analysis performed on bronchoalveolar lavage (BAL) and fluid (BALF) demonstrated that the overall number of leukocytes, total protein and nitric oxide levels were significantly reduced in vNA-Δ compared with wild-type inoculated mice (figure 3D-F). Interestingly, the levels of chemoattractants for neutrophils (KC/CXCL1), monocytes (MCP-1/CCL2), lymphocytes (MIG/CXCL9) and eosinophils (CCL11) were found to be significantly higher in BAL of mice inoculated with PR8, which was correlated with increased cell infiltrate in BAL of animals inoculated with PR8 (figure S1). Overall, this data suggests that vNA-Δ inoculation cause mild inflammation in the lung.

### Reduced inflammatory cytokine levels in lungs of mice inoculated with vNA-Δ

In order to evaluate if the lack of inflammation could be related to decreased levels of pro-inflammatory cytokines we analyzed the lung tissue of mice inoculated with PR8 or vNA-Δ. By qRT-PCR we detected an increase in muIFN-β and mu IFN-λ2/3 gene expression in the lung of mice inoculated with PR8 virus at all evaluated timepoints. This increase could not be detected in mice inoculated with vNA-Δ virus except by muIFN-β at 1dpi (figure 4A). In addition, ELISA performed on lung homogenates showed the production of IFN-γ only in mice inoculated with PR8



**Figure 1. Generation and characterization of recombinant viruses harboring truncated neuraminidase.** Deleted neuraminidase segments displaying deletions at 3' and 5' extremities were generated as described in Material and Methods. The remaining neuraminidase coding regions are shown in white squares. A spacer sequence was inserted between the 3' and 5' moieties (A). Wild type PR8 virus and recombinant vNA-Δ influenza viruses were generated by reverse genetics as described in Material and Methods. The plaque phenotypes of these viruses were assessed by standard agarose plaque assay in MDCK infected cells after 3 days of incubation (B). Confluent monolayers of A549 cells were cultured with DMEM media containing BSA, Trypsin and neuraminidase (VcNA treated control) or infected with wild type PR8 virus or recombinant vNA-Δ at M.O.I of two. The induction of hu-IFN-β (type I, A) and hu-IFN λ2/3 (type III, B) was assessed at different time points by quantitative PCR using lightcycler Real Time PCR Machine (Applied Biosystems; C). Analysis was performed using SDS 2 software. All data are expressed as a ratio relative to VcNA treated control. doi:10.1371/journal.pone.0098685.g001

(figure 4B). Consistently, the pro-inflammatory cytokines TNF-α (figure 4C), IL-1β (figure 4D) and IL-6 (figure 4E) were augmented in mice inoculated with PR8. By contrast, the levels of all measured pro-inflammatory cytokines found in the lungs of mice inoculated with vNA-Δ were similar to those found in PBS (mock) inoculated mice (figure 4A-E). Finally, the same cytokine production profile could be observed in BALF of inoculated mice (figure S2).

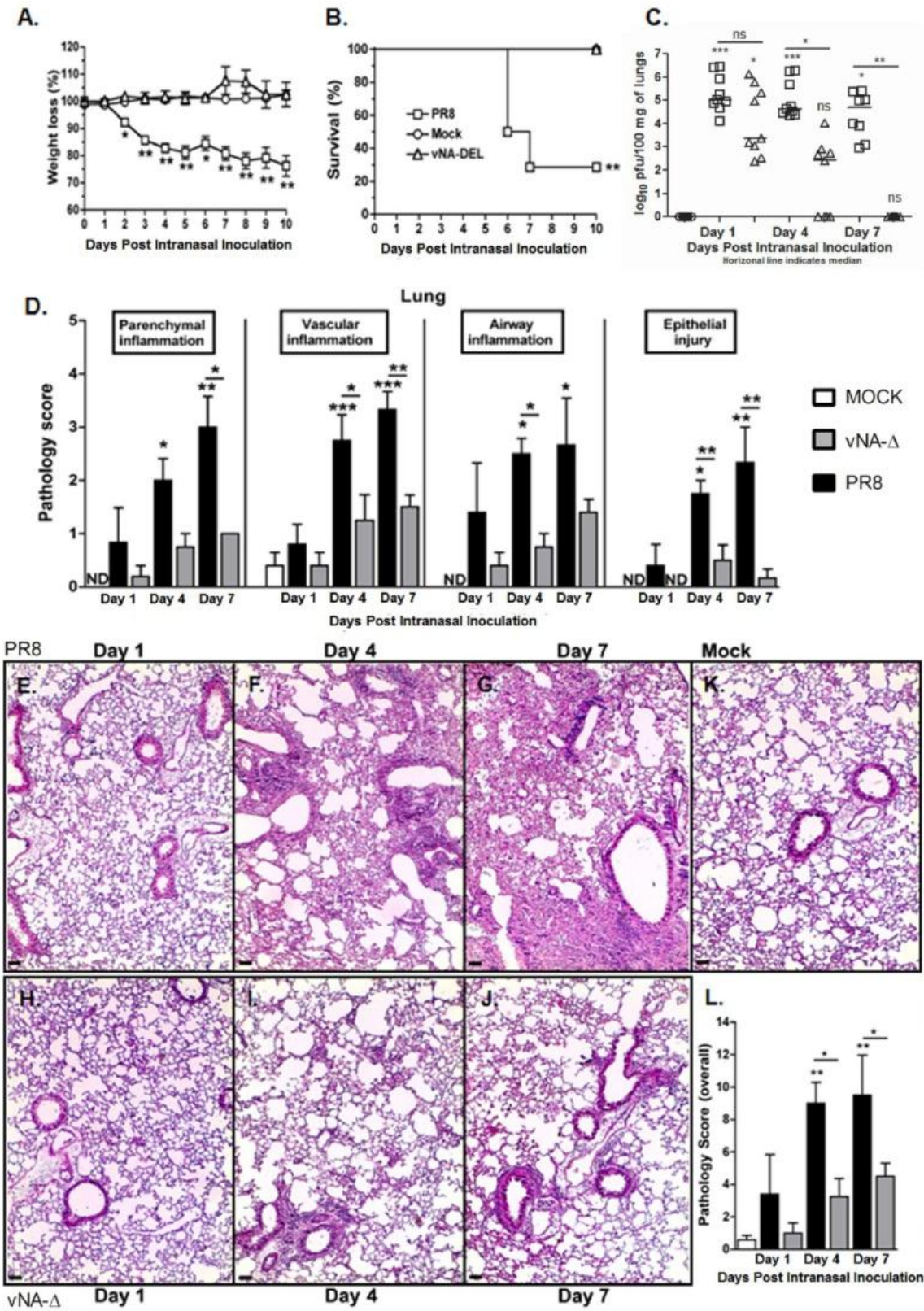
Interestingly, the levels of counter-regulatory cytokines interleukin 4 (IL-4) and IL-10 in lungs of mice infected with PR8 were reduced at day 4 and 7, whereas the levels of those cytokines in the lungs of mice inoculated with the attenuated vNA-Δ were unaltered or slightly increased when compared to PBS (mock) inoculated mice (figure 4F and G).

Finally, we assessed the systemic levels of inflammatory or regulatory cytokines in serum collected from inoculated mice at 1, 4 or 7 dpi by Cytometric Bead Array (CBA). No significant cytokine production was detected in sera of mice inoculated with vNA-Δ virus compared to PBS inoculated mice ( $p > 0.05$ , Figure 5). In mice inoculated with PR8 virus, increased levels of IFN-γ and CCL2/MCP-1 were detected at 7 dpi (figure 5A and 5B). Increased levels of IL-6 (figure 5C) were found only at 1 dpi and TNF-α (figure 5D) at days 4 and 7. No significant increase in levels of IL-12p70, and IL-10 were found in serum of animals inoculated with any virus (data not shown). Collectively, these data suggest that PR8 induces a robust local and systemic

inflammatory response and reduced levels of counter-regulatory cytokines, which result in increased lung injury when compared to that found in vNA-Δ.

#### Evaluation of adaptive immune response elicited by vNA-Δ

Next, we evaluated if the attenuated recombinant influenza virus is able to induce a proper acquired immune response and protect mice against homologous lethal challenge. For this purpose, C57BL/6 mice were anesthetized and inoculated intranasally with PBS (mock inoculation), vNA-Δ or PR8 virus ( $10^3$  or  $10^5$  PFU). Mice inoculated with  $10^3$  PFU of PR8 displayed remarkably weight loss and died, whereas most of the animals inoculated with  $10^3$  PFU of PR8 survived the inoculation in spite of their weight loss (figure 6A). As expected, the animals inoculated with vNA-Δ survived the inoculation without weight change, irrespective of the inoculum used (figures 6A and 6B). Three weeks after the first inoculation, mice were challenged with a lethal dose ( $10^5$  PFU) of PR8 virus. Weight change and mortality was followed over two weeks (figures 6A and 6B). As expected, the animals that were previously inoculated with PBS and further challenged with a lethal dose of PR8 displayed abrupt weight loss and high mortality (87%,  $n = 8$ ). Most of the mice inoculated previously with sub lethal dose of pathogenic PR8 survived the challenge (78%,  $n = 14$ ). Remarkably, the mice inoculated with  $10^3$  PFU of vNA-Δ showed significant weight loss (figure 6A) and



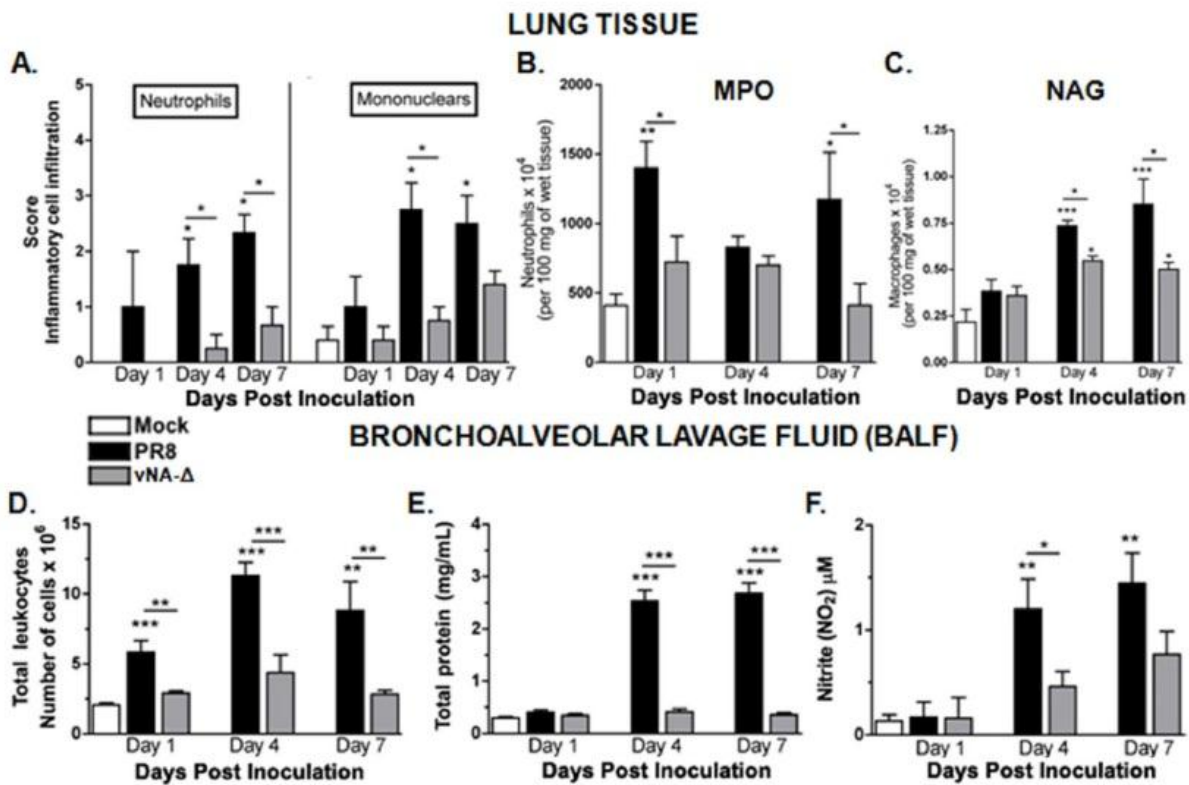
**Figure 2. Characterization of virulence and lung inflammation in mice inoculated vNA-Δ.** C57BL/6 mice were infected intranasally with 10<sup>5</sup> PFU Influenza PR8, vNA-Δ or PBS (mock) inoculated (n = 4–6 in each group). Weight loss (A) and lethality (B) were evaluated over 10 days. Mice were euthanized 1, 4 and 7 dpi and virus titers were quantified in lung (C). The figure shows one representative experiment. Lung pathologic score after infection with influenza PR8 virus or vNA-Δ was assessed in lung slices stained with H&E by a pathologist showing parenchyma, vascular and airway inflammation, and epithelial injury (D). Representative slides of PR8 virus (E, F and G), vNA-Δ (H, I and J) and mock (K) inoculated mice at 1, 4 and 7 dpi. The pathology overall score was determined (L). n = 5 for all groups. Data are presented as mean ± SEM. \* and \*\* for p<0.05 and p<0.01, respectively, when compared to mock or indicated groups (one-way ANOVA, Newman-Keuls). doi:10.1371/journal.pone.0098685.g002

two of twelve mice died (figure 6B). Differently, the animals that were inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ showed no weight loss (figure 6A) and all the animals survived the challenge (figure 6B).

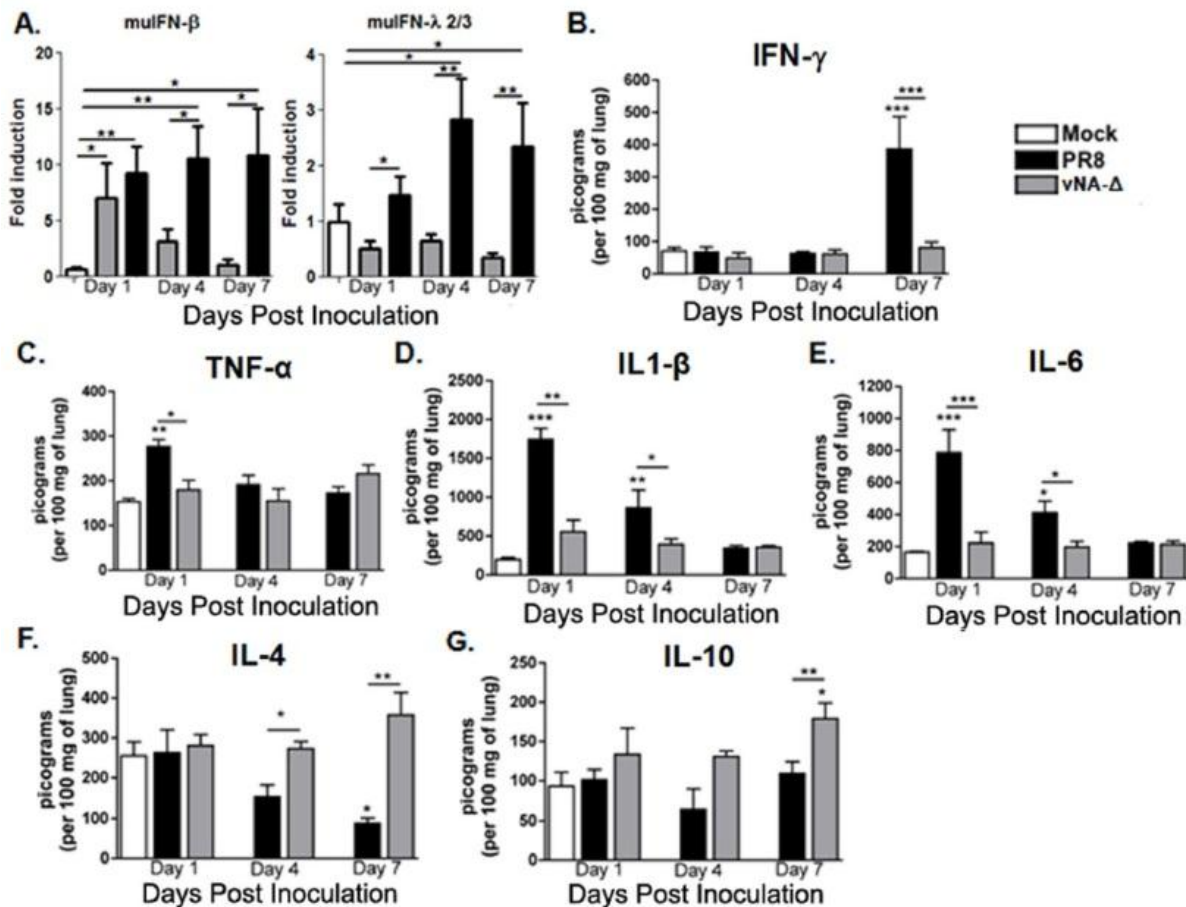
Next, we assessed specific antibodies against influenza in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) and sera, as well as CD8+ T cells specific for nucleoprotein (NP) in the spleen of mice inoculated with vNA-Δ or PR8, after the prime inoculation and the challenge infection. Measured by ELISA, significantly higher levels of both IgG and IgA were found in the BALF of mice inoculated with PR8 virus (figure 6C and 6D). The IgA levels found in mice inoculated with either dose of vNA-Δ were similar. Differently, higher levels of IgG were found in BALF of mice inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ when compared to those found in BALF of animals inoculated with 10<sup>3</sup> PFU of vNA-Δ (figure 6C). In contrast to BALF, anti-influenza total IgG levels

in sera derived from mice inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ were similar to those found in mice inoculated with PR8, but higher than those inoculated with vNA-Δ 10<sup>3</sup> (figure 6E). Interestingly, the levels of antibodies found in sera (total IgG and IgA) and in BALF (IgA; figures 6C-E) of mice inoculated with vNA-Δ were similar to those found in mice inoculated with PR8 after the challenge infection.

Serum hemagglutinin inhibition (HI) titers of PR8 vaccinated mice (log<sub>2</sub> 7.47±4.85) were similar to those found in sera of mice inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ (log<sub>2</sub> 6.92±4.85) and higher than those found in BALF of mice inoculated with 10<sup>3</sup> PFU of vNA-Δ (log<sub>2</sub> 6.17±4.17; figure 6F). In line with these results, we found that all the animals (n = 5) inoculated with 10<sup>3</sup> PFU of vNA-Δ harbored virus in the lung after challenge with PR8. By contrast, only one among five animals inoculated with 10<sup>5</sup> PFU of vNA-Δ



**Figure 3. Leukocyte recruitment to the lungs and BAL following vNA-Δ infection.** C57BL/6 mice were inoculated with PBS (mock) or infected intranasally with influenza 10<sup>5</sup> PFU of PR8 virus or vNA-Δ (n=5). Mice were euthanized and lungs removed 1, 4 and 7 dpi. The recruitment of neutrophils and macrophages/mononuclear (A) cells to the lungs was assessed in lung H&E stained slides. Frozen lungs sections were assessed for Myeloperoxidase (B) and N-acetylglucosaminidase (C) contents, indirect measurements for neutrophils and macrophages, respectively. Mice were euthanized (n = 6–8 in each group) 1, 4 and 7 dpi and bronchoalveolar lavage was performed. Absolute numbers of airways leukocytes after infection with 10<sup>5</sup> PFU (D). Total proteins (E) and nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; F) were also determined in BALF. Data are presented as mean ± SEM. \*, \*\* and \*\*\* for p<0.05, p<0.01 and p<0.001, respectively, when compared to mock or indicated groups (one-way ANOVA, Newman-Keuls). doi:10.1371/journal.pone.0098685.g003



**Figure 4. Measurement of cytokines in the lung.** C57BL/6 mice were inoculated with PBS (mock) or infected intranasally with  $10^5$  PFU influenza PR8 virus or vNA-Δ ( $n=5$ ) and euthanized 1, 4 and 7 dpi. The induction of murine IFN-β and IFN-λ2 (A) was measured in lungs by qRT-PCR as described in Material and Methods. The levels of cytokines IFN-γ (B), TNF-α (C), IL-1β (D), IL-6 (E), IL-4 (F) and IL-10 (G) were measured in lung tissue by ELISA.  $n = 5$  for all groups at days 1 and 4,  $n = 5, 4, 6$  for mock, PR8 and vNA-Δ viruses at day 7. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* and \*\*\* for  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively, when compared to mock or indicated groups (one-way ANOVA, Newman-Keuls or unpaired t test (qRT-PCRs)).

doi:10.1371/journal.pone.0098685.g004

had detectable virus in lungs after challenge and the viral load was lower than that found in mice inoculated with PBS and further challenged with PR8 virus ( $p < 0.01$ , **figure S3**).

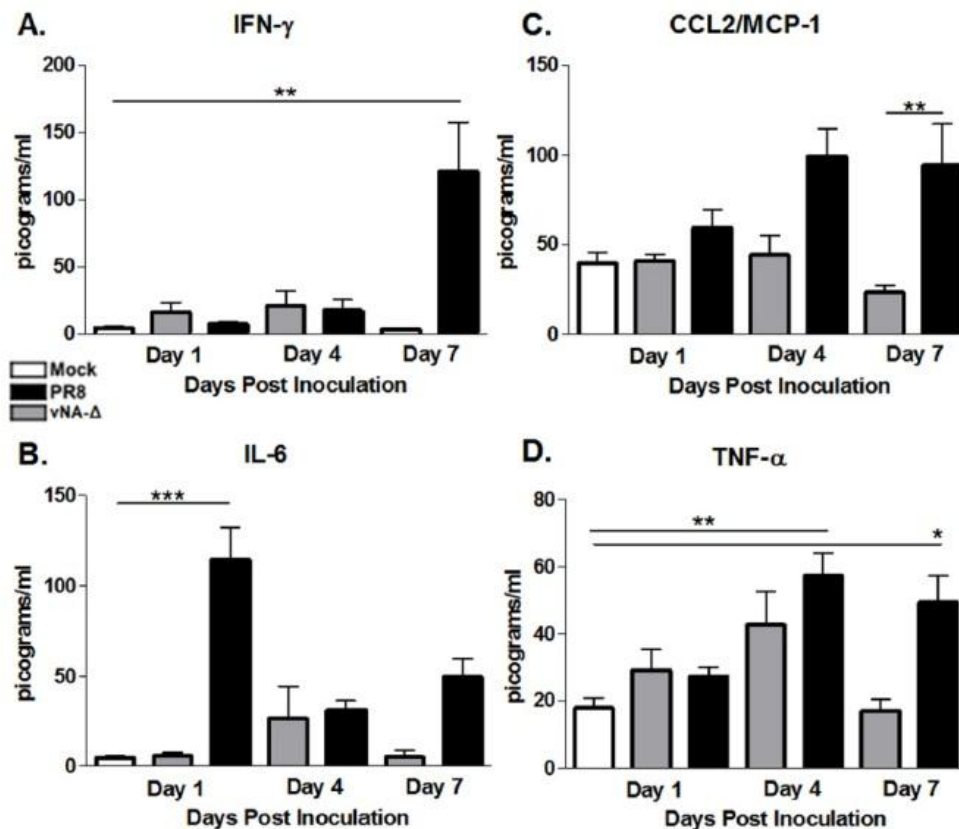
Examining the cellular immune response, we found significantly higher number of NP specific CD8+T cells in the spleen of mice inoculated with PR8 virus than those found in mice inoculated with  $10^3$  PFU of vNA-Δ after the prime inoculation (**figure 6G**). Differently, two weeks after challenge the number of NP specific CD8+ T cells in spleen of mice inoculated with  $10^3$  PFU or  $10^5$  PFU of vNA-Δ was significantly higher than those found in spleens of mice inoculated with PR8 virus (**figure 6G**).

Taken together, our results showed that vaccination using recombinant influenza harboring a neuraminidase deficient segment elicits humoral and cell-mediated immune responses. Moreover, the antibody levels, the HI levels and the number of specific CD8+ T cells elicited by inoculation with vNA-Δ are inoculum dependent, resulting in different degrees of protection against the challenge infection.

### Recombinant vNA-Δ is highly attenuated in knock-out mice for innate or acquired branches of immune response

One drawback of the use of recombinant viruses is the potential hazard of such vectors to immunocompromised hosts [18,19,20]. Thus, we evaluated the virulence of recombinant vNA-Δ in mice lacking innate (MyD88 -/-) or acquired (RAG -/-) branches of immune response. To this aim, KO mice and WT C57BL/6 mice were anesthetized and inoculated with PBS (mock) or infected intranasally with a sub lethal inoculum of  $5 \times 10^3$  PFU of PR8 or with a higher inoculum of  $5 \times 10^4$  PFU of vNA-Δ. Weight loss and mortality of inoculated mice were tracked during the experiment (**figure 7**). C57BL/6 mice inoculated with PR8 virus displayed dramatic weight loss and one out of ten inoculated mice died. In addition, all the Myd88 -/- ( $n=11$ ) and RAG -/- ( $n=7$ ) mice inoculated with PR8 virus displayed abrupt weight loss (**Figure 7A and 7B**) and died (**figure 7C**). In sharp contrast, 87% of Myd88 -/- ( $n=13$ ) and 100% RAG -/- ( $n=10$ ) mice inoculated with vNA-Δ survived to the challenge (**figure 7C**). Taken together,





**Figure 5. Measurement of cytokines in sera of inoculated mice.** C57BL/6 mice were inoculated with PBS (mock; n=9) or infected intranasally with  $10^5$  PFU of influenza PR8 (n=10-12) or vNA-Δ (n=9-11) viruses. By CBA, the levels of IFN- $\gamma$  (A), CCL2/MCP-1 (B), IL-6 (C) and TNF- $\alpha$  (D) were measured in the sera collected from mice at days 1, 4 and 7 after inoculation. Data represents two independent experiments and are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* and \*\* for p<0.05, p<0.01 and p<0.001, respectively, when compared to mock or indicated groups (one-way ANOVA, Newman-Keuls). doi:10.1371/journal.pone.0098685.g005

these results suggest that recombinant viruses lacking functional neuraminidase are attenuated *in vivo*, even in mice severely handicapped in innate or acquired branches of immune response.

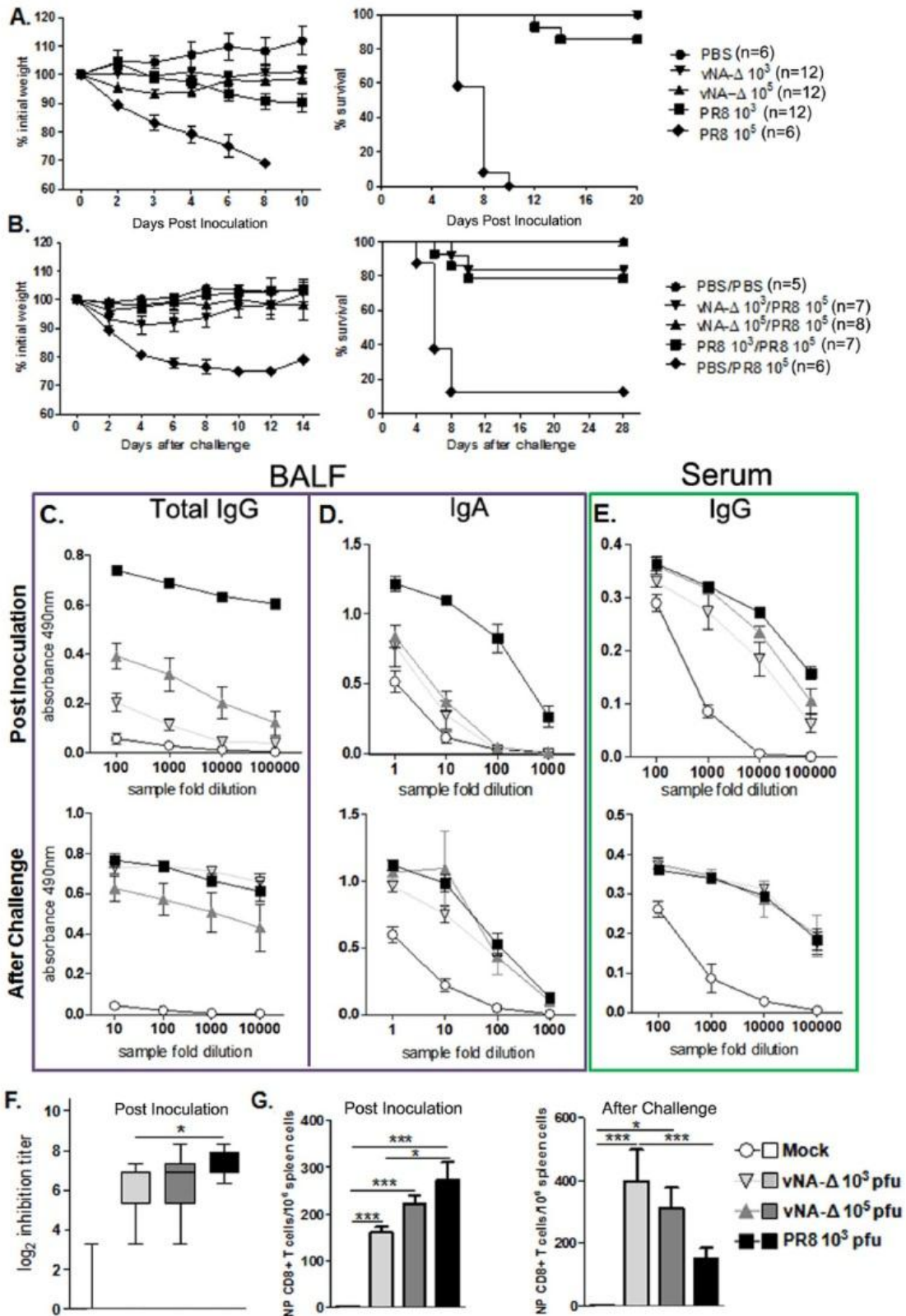
## Discussion

Recombinant influenza viruses have been proven to be valuable tools for vaccine development against infectious agents and tumors [21,22,23]. Therefore, some strategies to generate recombinant influenza viruses attenuated or defective for multiplication, such as replacing the part of the neuraminidase sequence by a foreign sequence have already been developed [2,24]. However, questions about the lung and systemic inflammations triggered by those recombinant viruses as well as their potential virulence in immunodeficient hosts remain unclear. To better study these questions, we used eight plasmid driven reverse genetics to generate a recombinant influenza virus carrying only the first and the last 150 nucleotides of neuraminidase coding region, flanking a spacer, truncated neuraminidase and evaluated this recombinant virus in an experimental mouse model. Our results demonstrate the safety of this vector, which causes mild lung pathology in wild type mice and is attenuated in immunocompromised hosts. Furthermore, vaccination with the vNA-Δ induced robust T cell

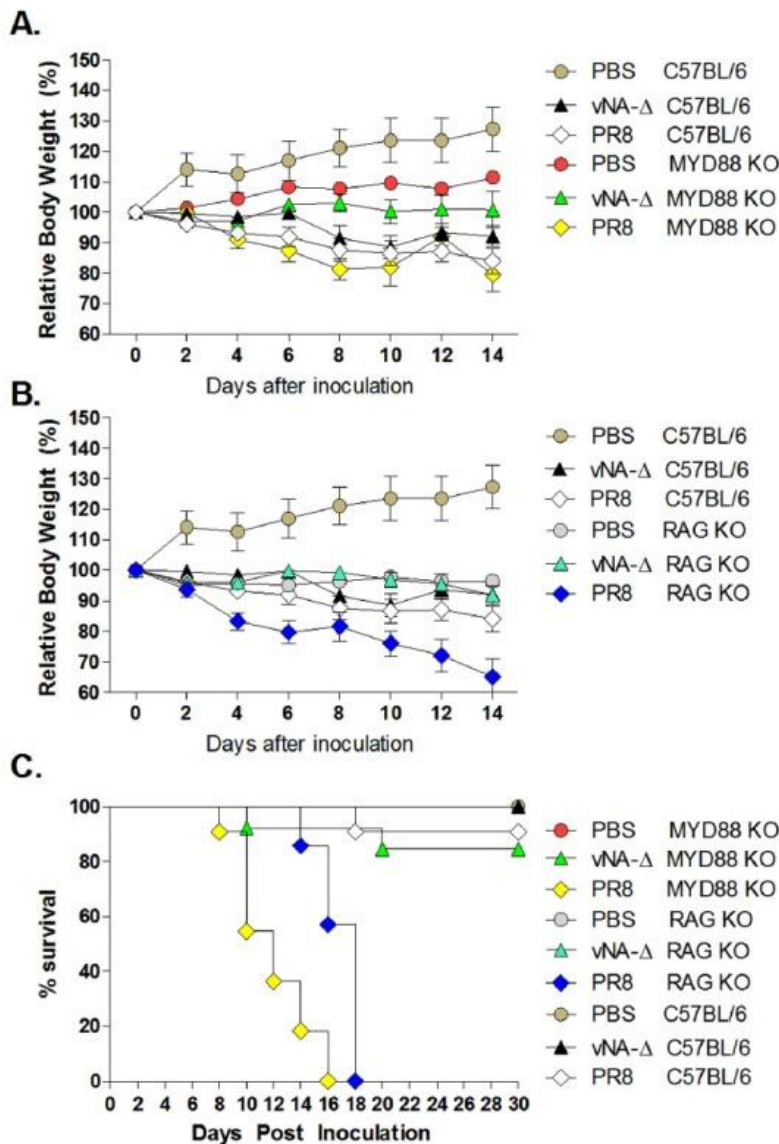
and humoral mediated immunity, protecting mice against the highly virulent PR8 virus influenza strain.

The first antiviral response in infected epithelial cells is type I and III interferons, which are of pivotal importance to control influenza infection and modulate immune response [25]. The inoculation with vNA-Δ elicited reduced and short lived production of IFN- $\beta$  and undetectable production of IFN- $\lambda$  in lungs of inoculated mice. Interestingly, we were able to detect both interferons in A549 cells infected with vNA-Δ. This apparently contradictory results could probably be explained by the fact that the A549 cells were infected in the presence of *V. cholera* neuraminidase in culture medium, which allowed full multiplication of vNA-Δ, whereas the infection of cells in mice lungs were abortive.

Because innate immunity plays a pivotal role in infection and inflammatory mechanisms, we evaluated parameters regarding neutrophils and monocytes in lungs of mice inoculated with vNA-Δ and wild type (PR8) virus. Neutrophils are important in killing infected cells through neutrophil extracellular traps (NET) and myeloperoxidase (MPO) activities [26,27,28]. However, the inflammatory mediators released by this cell type also relate to the immunopathology in experimental and natural influenza infection [29,30]. Although monocytes play an important role in controlling viral infection by release of proinflammatory cytokines,



**Figure 6. Evaluation of protection and acquired immune response elicited by inoculation with vNA-Δ.** C57BL/6 mice were inoculated with PBS (mock) or infected intranasally with  $10^5$  PFU Influenza A/PR8 virus,  $10^3$  or  $10^5$  PFU of vNA-Δ virus. Twenty-one days after the prime-inoculation the animals were challenged with a lethal dose of  $10^5$  PFU of PR8. The weight loss and survival were determined after the prime-inoculation (A) and the challenge (B) infection (data represents two independent experiments). Blood and BALF were collected fourteen days after prime-inoculation and challenge infections. Tenfold dilutions of BALF samples were used to determine total IgG (C) and IgA (D) in BALF and total IgG in serum by ELISA (E)(Data depict one representative experiment). Two fold serial dilution of serum was used for the hemagglutinin-inhibition assay (F). n = 4 for BALF IgA and IgG measures after inoculation. n = 4, 7, 7, 6 for mock, vNA-Δ  $10^3$ , vNA-Δ  $10^5$ , PR8  $10^3$  for serum IgG. n = 4, 5, 6, 5 for mock, vNA-Δ  $10^3$ , vNA-Δ  $10^5$ , PR8  $10^3$  for hemagglutinin-inhibition assay (Data represents two independent experiments). Splens of mice (n = 4) were obtained two weeks after the inoculation or challenge infection. Specific NP CD8+ T cells were assessed by ELISPOT using nucleoprotein (NP) of PR8 ASNEMETM peptide (NP; aa 366–374) as stimulus (G) Data represents two (inoculum) or three (challenge) independent experiments. Data were evaluated by Mann-Whitney test \*, \*\* and \*\*\* for  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively. doi:10.1371/journal.pone.0098685.g006



**Figure 7. Characterization of recombinant vNA-Δ virus in immunodeficient mice.** C57BL/6 mice, MyD88  $-/-$  and RAG  $-/-$  mice were anesthetized and inoculated with PBS (mock) or  $5 \times 10^3$  PFU of the PR8 or  $5 \times 10^4$  PFU of the recombinant vNA-Δ virus. The weight loss (A and B) and mortality (C) were followed (n = 9–12 in each group; data represents two independent experiments). Results depicted in figure A and B were obtained from the same experiment. doi:10.1371/journal.pone.0098685.g007

they are also involved in tissue injuries triggered by influenza infection [18,31,32]. Importantly, vNA-Δ infection only induced low level of type I interferons and chemokines CXCL1/KC and CCL2/MCP-1 in epithelial cells, leading to a reduced influx of leukocytes and pulmonary injury. Reduced inflammatory infiltration in the lungs of mice inoculated with vNA-Δ could be also related to lower levels of IL-6 and TNF-α. Both cytokines have been associated with exacerbated inflammation and poor prognosis during influenza infection by allowing excessive recruitment of neutrophils and macrophages to the site of infection [33]. Nitric oxide, which is another hallmark of lung damage caused by influenza infection was absent in respiratory airways of vNA-Δ infected mice, reinforcing the mild character of inflammation triggered by this virus [34,35].

In addition, we found augmented expression/production of pro-inflammatory cytokines such as type I IFN, IL-1β, IL-6, IFN-γ and TNF-α in airways of mice inoculated with PR8 virus. These cytokines are known to contribute to lung inflammation, injury and lethality [36,37] and were barely detected in airways of mice inoculated with vNA-Δ. Interestingly, we have also found decreased levels of the counter-regulatory cytokines IL-4 and IL-10 in lungs of PR8 infected mice, whereas in lungs of vNA-Δ inoculated mice the levels of those cytokines were not altered or slightly increased, which may have contributed to the reduced inflammation found in lungs of mice inoculated with vNA-Δ. Consistently with lung results, inoculation with vNA-Δ did not increase the serum levels of TNF-α, IL-6, IFN-γ and CCL2/MCP-1, cytokines related to poor prognosis when their production is unbalanced [18,19,20,38].

Another finding of our study was that inoculation with vNA-Δ resulted in the production of specific IgA and IgG antibodies in BALF and serum. Antibody levels and the antibody mediated hemagglutination inhibition were inoculum dependent. Moreover, the number of specific anti-NP CD8+ T cells in spleen elicited by inoculation with vNA-Δ was also found dependent on virus inoculum. This is particularly important since the CD8+ T cell response is known to play a pivotal role in controlling primary influenza infection [18,19,20,38,39].

Although vaccination with  $10^3$  and  $10^5$  PFU of vNA-Δ was able to protect the inoculated mice against the challenge infection with PR8 virus, only the group that received the higher vNA-Δ dose ( $10^5$  PFU) was completely protected. Therefore we believe that both higher levels of neutralizing antibodies and CD8+ T cells elicited by the higher dose of vNA-Δ could be an explanation for the full protection that we observed after challenge with PR8 virus. This explanation is reinforced by the recent demonstration of cooperativity among neutralizing antibodies and CD8+ T cells resulting in a robust protective immunity against influenza infection [40,41].

Interestingly, after challenge infection we found a significantly higher number of specific anti-NP CD8+ T cells in mice vaccinated with vNA-Δ. These results could be due to the reduced amounts of IgA and IgG elicited by inoculation with vNA-Δ, which were unable to completely neutralize PR8 influenza virus during challenge, triggering a more robust cell mediated response in the lungs of those animals. Indeed, most of the animals inoculated with PR8 or  $10^5$  PFU of vNA-Δ virus displayed no viral load in the lungs after challenge infection whereas all animals inoculated with  $10^3$  PFU of vNA-Δ harbored virus in the lungs after challenge.

One of the most important aspects in the vaccine development field is safety in immunocompromised hosts. Thus, we also evaluated the safety of influenza virus without an enzymatically active neuraminidase in severely immunocompromised mice.

vNA-Δ was attenuated in MyD88 -/- and RAG -/- mice, which are unable to trigger toll-dependent (with exception of TLR3) innate immune responses [41] and lack B and T lymphocytes, respectively [42]. Remarkably, all the RAG -/- mice inoculated with vNA-Δ survived the challenge, whereas some degree of virulence was maintained in Myd88 -/- mice since 13% died. Overall, our results suggest that although vNA-Δ would be safe for hosts with a functional adaptive immune response. Further studies should be done to better understand the role of vaccination in severely immunocompromised hosts especially those with compromised innate immunity. It is important to note that vNA-Δ elicits an abortive infection, therefore precluding the risk of vaccinated people shedding and spreading this virus.

In conclusion, we have demonstrated that vaccination with recombinant influenza viruses truncated in neuraminidase gene causes mild infection with reduced lung inflammation in wild type mice and the virus is attenuated even in severely immunocompromised mice. In addition, vNA-Δ elicited strong humoral and cellular viral immune responses, protecting vaccinated mice against challenge with a highly virulent strain of influenza virus. Hence, considering that the vNA-Δ virus expressing a heterologous protein is viable and induces a strong protection against influenza, our study gives support to the use of such recombinant influenza viruses in development of safe bivalent vaccines against influenza and other pathogens.

## Material and Methods

### Ethical Statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br/>) and the Federal Law 11.794 (October 8, 2008). All animal studies were approved by the Ethical Commission on Animals Use (CEUA/Fiocruz, license L-001/09).

### Mice

MyD88-/-, Rag -/- mice and their respective control mice (C57BL/6) matched by sex and age (8–12 weeks old) were obtained from the animal facilities of the Federal University of Minas Gerais (Centro de Bioterismo [CEBIO], Belo Horizonte, Brazil) and Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) and were housed according to standard institutional guidelines.

In all infection procedures, animals were anesthetized and kept under observation until they completely recovered. We anesthetized mice before euthanasia procedures for all *in vivo* experiments.

For weight loss and survival measures the animals were monitored at different times after inoculation. For survival curves, the animals were anesthetized and euthanized by cervical dislocation when they reached certain degree of weight loss (25%), except for differentiation of innate and adaptive immune response, in which we used a different weight loss endpoint to better differentiate the mortality curves (35%).

### Cells

MDCK and A549 cells were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; SIGMA) with 1 mM sodium pyruvate, 4.5 mg/ml L-glucose and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin; MDCK; 20 μg/ml of gentamicin and 5 μg/ml of amphotericin B; A549), herein called complete DMEM medium and supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; CUTILAB).

293T cells were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in complete DMEM supplemented with 10% FBS.

#### Plasmids for influenza reverse genetics

The pPRNA plasmid was constructed as previously described and encodes the wild type neuraminidase and segments of the A/WSN/33 (H1N1, herein named WSN) [43]. Plasmid pPRNA38 codes for a recombinant WSN NA segment where the entire NA ORF is followed by a duplicated 3' promoter, a *XhoI/NheI* linker, a duplication of the last 42 nucleotides (nt) of the NA ORF and the original 5' promoter [44]. In order to construct the truncated neuraminidase segment, PCR amplified products were generated using the pPRNA plasmid as template. These generated amplicons contained the sequence of hepatitis δ ribozyme followed by 19nt of 3' non-coding region and the first 150nt of NA coding region. To generate the plasmid pPR150×42nt, a PCR amplification product, herein named NA150REV was cloned into the pPRNA38 vector digested with *SacI* and *XhoI* restriction enzymes. Next, we generated another PCR product, using pPRNA as template which contained the last 150nt of the NA coding region, which were followed by the 28nt of 5' non-coding region and the truncated human RNA polymerase I promoter. This amplicon was cloned into pPR150×42nt digested by *XhoI* and *HindIII* enzymes resulting in transfer plasmids carrying truncated NA sequence named pPRNA169×178 (figure 1A). All transfer plasmids were first analyzed by digestion profile using the appropriated restriction enzymes and then sequenced using Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT (AMERSHAM) and a Megabace 1000 automatic sequencer (AMERSHAM). The sequence of 660 nucleotides which encodes for no protein was cloned into the plasmid pPR169×178 and digested as described above to construct the plasmid pPR169-SPC-178. Influenza A/PR8/34 bidirectional transfer plasmids pHW2000-HA, NA, M, NS, PB2, PB1, PA and NP were kindly provided by Dr. Ron Fouchier (Erasmus of Rotterdam Institute, Netherlands) [44].

#### Generation of recombinant viruses

Wild type PR8 were generated by eight plasmid driven reverse genetics as described by de Wit [45]. Briefly, recombinant influenza viruses harboring a truncated NA segment and carrying the spacer sequence (herein named vNA-Δ) were generated as described by de Goede and co-workers with modifications [45], using the transfection reagent Fugene HD (ROCHE). Infectious viral particles were recovered from cell culture supernatants and they were cloned twice by limit dilution technique on MDCK cells. Viral work stocks were prepared by infecting MDCK cells cultivated in complete DMEM supplemented with 2 μg of Trypsin-TPCK, 0.3% of bovine serum (BSA) and 500 μU/ml of type III *Vibrio cholerae* neuraminidase (SIGMA). Viral stocks were titrated on MDCK cell monolayers, in standard plaque assays under agarose overlay.

#### Viral RNA extraction and RT-PCR analysis

Viral RNA (vRNA) extraction from cell-free supernatants of infected MDCK cells and Reverse Transcriptase-PCR analysis were performed as previously described [10]. Amplicons were analyzed on 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. RT-PCR products were purified using QiaEXII kit (Qiagen). The presence of mutations was determined by sequencing using Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT (AMERSHAM) and a Megabace 1000 automatic sequencer (AMERSHAM).

#### Measurement of type I and III interferons in cell culture

In order to evaluate the induction of interferon beta (IFN-β; a type I IFN) and interferon lambda 28a (IFN-λ<sub>2</sub>; a type III IFN) genes by recombinant influenza virus, A549 cells were seeded in 6-well plates (5×10<sup>5</sup> cells/well). Twenty-four hours later cells were infected with two M.O.I of PR8 or recombinant vNA-Δ or incubated with the same culture media containing BSA, Trypsin and *Vibrio cholerae* neuraminidase described above without virus (VcNA treated control). At different time points, the cells were harvested and total cellular RNAs were extracted with RNeasy kit (QIAGEN), according to manufacturer recommendations and RT-PCR reactions were performed as previously described [46]. Quantitative PCRs were done using a Lightcycler Real Time PCR Machine (Applied Biosystems). Result analysis was performed using SDS 2 software. All data were normalized by the respective beta-actin levels and expressed as a ratio relative to non-infected cells (VcNA treated control) cultured using the same conditions as the infected ones (*in vitro* assays) or PBS inoculated (mock) mice (*in vivo* assays). PCR primers used for human genes were previously described [47].

#### Influenza challenge and immunizations

Mice (wild type, MyD88<sup>-/-</sup> or RAG<sup>-/-</sup>) were anesthetized with 15 mg/kg of ketamine and 0.6 mg/kg of xylazine and inoculated intranasally with PBS (mock), vNA-Δ or PR8 virus in 25 μl of PBS. For survival, weight loss, lung histological and inflammatory assessments wild type mice were inoculated using 10<sup>5</sup> PFU of either recombinant or PR8 virus. For challenge and acquired immune response one group prime immunized using 10<sup>3</sup> PFU of recombinant vNA-Δ was included. For infection of immunocompromised mice (RAG<sup>-/-</sup> or MyD88<sup>-/-</sup>) or wild type control (C57BL/6 mice), the animals were inoculated with either 5×10<sup>3</sup> PFU of PR8 or 5×10<sup>4</sup> PFU of vNA-Δ. The weight of inoculated animals was assessed at indicated time points. Survival of inoculated animals was followed over 10–30 days.

To evaluate influenza multiplication in mouse lungs, the animals were euthanized at defined time points after infection and lung homogenates were prepared in 3 ml of PBS. Viral loads in lungs were assessed by standard titration under agarose overlay on MDCK cells.

#### Harvest of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) measurement

At the indicated time points after infection, mice were euthanized with an overdose of ketamine/xylazine solution. Subsequently, BAL was harvested by washing the lungs twice with two 1mL aliquots of PBS [47]. After centrifugation, the pellet was used for total and differential leukocytes counts of stained slides. The supernatant (BAL) was used for cytokines, chemokines, total protein and nitrite measurements. After BALF harvesting lungs were perfused with 5 ml of PBS to remove circulating blood and frozen. A hundred mg of tissue was homogenized in PBS with anti-proteases to perform ELISA, MPO and NAG assays, as previously described [48].

#### Measurement of cytokines in mice BALF, serum and tissues

At the indicated time points, PR8 virus, vNA-Δ and PBS (mock) inoculated mice were anesthetized and blood was collected from brachial plexus. After death, BALF samples were harvested as described above. The levels of the cytokines IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, TNF-α and MCP-1 in serum were assessed by BD CBA

Mouse Inflammation Kit (Becton Dickinson) according to manufacturer's instructions. The levels of CCL2, CCL11, CXCL1 and CXCL9 in BALF, and the lung levels of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  were assessed by ELISA according to manufacturer's instructions (R&D systems, Minneapolis) as previously described [49]. The induction of IFN- $\beta$  and muIFN- $\lambda$ 2/3 genes was measured by qRT-PCR, after lung tissue total RNA extraction and reverse transcription using primers specific for murine samples.

#### Assessment of protein and Nitrite levels in BALF

Total protein levels were measured in BALF using the Bio-Rad Protein Assay kit, using a BSA standard curve, according to manufacturer's instructions [38]. The product of Nitric Oxide oxidation, nitrite, was measured by adding 100  $\mu$ L of BALF and 100  $\mu$ L of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamide in 5% phosphoric acid) and comparing to the absorbance at 550 nm to a standard curve of sodium nitrite [50].

#### Histopathological analysis

Histopathological changes induced by infection in the lungs of mice inoculated with either PR8 virus or vNA- $\Delta$  were analyzed by a pathologist blind to the experiment, using lungs of PBS inoculated mice as control. Lung left lobes were fixed in formalin and further dehydrated gradually in ethanol, embedded in paraffin and cut into 4-mm sections. Slides preparations containing the processed tissue were stained with H&E and examined under light microscopy and scored by the pathologist. The score system was performed as previously described [50]. Briefly, airway, vascular and parenchyma inflammation, neutrophilic and mononuclear infiltration and epithelial injury were assessed in 27 points of score. Photomicrography was performed using an optical microscope with a MotiCam Digital camera with a built-in 3.0 MegaPixel sensor.

#### Detection of anti-influenza antibodies

Blood and BAL of mice infected with recombinant vNA- $\Delta$  or PR8 virus were collected at pre-determined time points after inoculation. Serial dilutions of serum samples were used to determine flu-specific antibodies titers by ELISA using PR8 virus as antigen. Briefly, 96-well ELISA plates (NUNC Maxisorp) were coated with 0.5  $\mu$ g of detergent-disrupted purified PR8 virus per well in 0.2 M Na-carbonate buffer, pH 9.6 (overnight at 4°C). Bound antibody was detected with anti-mouse total IgG (H+L; Amersham) and IgA antibodies (SouthernBiotech) carrying the Horseradish Peroxidase and revealed by the addition of TMB peroxidase substrate (KPL) as indicated by the supplier.

Serum was used for hemagglutinin inhibition (HI) assay, and to this aim, serial dilutions (2 fold) of mice sera were incubated with 4 hemagglutinin units (HU)/25  $\mu$ L of PR8 virus and 1% turkey red blood cells. HI titers were determined as the highest serum dilution able to completely inhibit hemagglutination.

#### ELISPOT

Spleens of immunized mice were obtained two weeks after the inoculation with PR8 virus or vNA- $\Delta$  ( $10^3$  or  $10^5$  PFU) or two weeks after the challenge with  $10^5$  PFU of PR8. Single cell suspensions from mice spleens were prepared as previously described [51,52]. Spleen cells were adjusted to  $1 \times 10^6$  cells per well in cell culture medium. For stimulation, a final concentration of 10  $\mu$ g/ml of nucleoprotein (NP) of PR8 ASNEMETM peptide (NP; amino acids 366-374; for H-2K<sup>b</sup>) was added. ELISPOT assay were performed essentially as

previously described [53]. The spots were counted on ImmunoSpot S5 Core Analyzer (CTL).

#### Statistical analysis

Statistical significance for ELISA and ELISPOT assays were evaluated using Mann-Whitney test (non-parametric data). The survival distributions were analyzed by *log-rank* test. Inflammatory profile in lungs and BAL were evaluated by one-way ANOVA, with post-test Newman-Keuls. We performed the ESD method (extreme studentized deviate; or Grubbs' test), to determine whether one of the values in the list is a significant outlier from the rest. The software GraphPad Prism 5 was used to analyze data and make graphs.

#### Supporting Information

**Figure S1 Inflammatory profile in BAL following infection with PR8 or vNA- $\Delta$  virus.** C57BL/6 mice were inoculated with PBS (mock) or infected intranasally with  $10^5$  PFU PR8 or vNA- $\Delta$ . Mice were euthanized ( $n = 6-8$  in each group) 1, 4 and 7 dpi and bronchoalveolar lavage was performed. Each cell type was counted (BAL) and the respective chemokine measured in BALF by ELISA. Neutrophils and CXCL1 (A), macrophages/monocytes and CCL2/MCP-1 (B), lymphocytes and MIG/CXCL9 (C), eosinophils and Eotaxin/CCL11 (D) levels were determined. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*, \*\* and \*\*\* for  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively, when compared to mock or indicated groups (one-way ANOVA, Newman-Keuls). (RAR)

**Figure S2 Measurement of cytokines in BALF.** C57BL/6 mice were inoculated with PBS (mock) or infected intranasally with  $10^5$  PFU of influenza PR8 or vNA- $\Delta$ . Mice were euthanized 1, 4 and 7 dpi ( $n = 5$ ). The levels of the cytokines IFN- $\gamma$  (A), MCP-1 (B), IL-6 (C) and TNF- $\alpha$  (D) were assessed in BALF samples by BD CBA Mouse Inflammation Kit (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions. Data were evaluated by Mann-Whitney test \*, \*\* and \*\*\* for  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively. (RAR)

**Figure S3 Evaluation of PR8 virus titer in the lungs of vaccinated mice after challenge.** C57BL/6 mice were inoculated intranasally (25  $\mu$ L of inoculum) with  $10^3$  PFU of / PR8,  $10^3$  or  $10^5$  PFU of vNA- $\Delta$ , or PBS (mock;  $n = 5-7$  in each group). Twenty-one days after the prime-inoculation the animals were challenged with a lethal dose of  $10^5$  PFU of PR8. Mice were euthanized 4 dpi and virus titers were quantified in the lungs. Data were evaluated by Mann-Whitney test \*, \*\* and \*\*\* for  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively. (RAR)

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Ron Fouchier, Erasmus of Rotterdam Institute, Netherlands, who kindly provided most of plasmids used in reverse genetics experiments. Also, we are grateful to BS Sheena Shah-Simpson, Harvard School of Public Health, United States, for suggestions and recommendations. Finally, we are thankful to the Animal Facility team for all dedicated promptness and efficacy.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RPAB APCS RCR RTG AMVM. Performed the experiments: RPAB APCS CCG BGF APFG BHF L GAOL MAR ACCP DBO MAA CAZ TMC EAC GMFA.

Analyzed the data: RPAB APCS RCR RTG AMVM. Contributed

reagents/materials/analysis tools: RCR RTG AMVM. Wrote the paper: RPAB CCG GMFA RCR AMVM.

## References

- Lamb RA, Krug RM (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: B.N F, editor. *Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp. 1647–1690.
- Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, Ewer K, Hill AV (2011) Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol* 23: 377–382.
- Li J, Arevalo MT, Zeng M (2013) Engineering influenza viral vectors. *Bioengineered* 4: 9–14.
- Robert-Guroff M (2007) Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol* 18: 546–556.
- Rocha CD, Caetano BC, Machado AV, Bruna-Romero O (2004) Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol* 7: 83–94.
- Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2002–2007.
- Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y (2004) Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J Virol* 78: 3083–3088.
- Kunisaki KM, Janoff EN (2009) Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 9: 493–504.
- Martina BE, van den Doel P, Koraka P, van Amerongen G, Spohn G, et al. (2011) A recombinant influenza A virus expressing domain III of West Nile virus induces protective immune responses against influenza and West Nile virus. *PLoS One* 6: e18995.
- de Goede AL, Boers PH, Dekker IJ, Osterhaus AD, Gruters RA, et al. (2009) Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV-1 p17Gag. *Vaccine* 27: 5735–5739.
- Askovich PS, Sanders CJ, Rosenberger CM, Diercks AH, Dash P, et al. (2013) Differential host response, rather than early viral replication efficiency, correlates with pathogenicity caused by influenza viruses. *PLoS One* 8: e74863.
- Peiris JS, Cheung CY, Leung CY, Nicholls JM (2009) Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe? *Trends Immunol* 30: 574–584.
- Ehrhardt C, Seyer R, Hrinicus ER, Eierhoff T, Wolff T, et al. (2010) Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect* 12: 81–87.
- Lau YF, Tang LH, Ooi EE, Subbarao K (2010) Activation of the innate immune system provides broad-spectrum protection against influenza A viruses with pandemic potential in mice. *Virology* 406: 80–87.
- Maines TR, Belsler JA, Gustin KM, van Hoven N, Zeng H, et al. (2012) Local innate immune responses and influenza virus transmission and virulence in ferrets. *J Infect Dis* 205: 474–485.
- Wang Z, Zhang A, Wan Y, Liu X, Qiu C, et al. (2014) Early hypercytokinemia is associated with interferon-induced transmembrane protein-3 dysfunction and predictive of fatal H7N9 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 769–774.
- Shen Z, Chen Z, Li X, Xu L, Guan W, et al. (2013) Host immunological response and factors associated with clinical outcome in patients with the novel influenza A H7N9 infection. *Clin Microbiol Infect*.
- Perrone LA, Plowden JK, Garcia-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM (2008) H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog* 4: e1000115.
- Tejaro JR, Walsh KB, Cahalan S, Fremgen DM, Roberts E, et al. (2011) Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell* 146: 980–991.
- Walsh KB, Tejaro JR, Wilker PR, Jatzek A, Fremgen DM, et al. (2011) Suppression of cytokine storm with a sphingosine analog provides protection against pathogenic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12018–12023.
- Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P (2004) Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol* 59: 1–15.
- Beck CR, McKenzie BC, Hashim AB, Harris RC, Zanuzdana A, et al. (2011) Influenza vaccination for immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis from a public health policy perspective. *PLoS One* 6: e29249.
- Barbosa RP, Filho BG, Dos Santos LI, Junior PA, Marques PE, et al. (2013) Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS One* 8: e61795.
- Small JC, Ertl HC (2011) Viruses - from pathogens to vaccine carriers. *Curr Opin Virol* 1: 241–245.
- Marsh GA, Hatami R, Palese P (2007) Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J Virol* 81: 9727–9736.
- Julkunen I, Melen K, Nyqvist M, Piirhonen J, Sareneva T, et al. (2001) Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine* 19 Suppl 1: S32–37.
- Garcia-Sastre A (2011) Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res* 162: 12–18.
- Jewell NA, Cline T, Mertz SE, Smirnov SV, Flano E, et al. (2010) Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol* 84: 11515–11522.
- Hufford MM, Richardson G, Zhou H, Manicassamy B, Garcia-Sastre A, et al. (2012) Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8(+) T Cells. *PLoS One* 7: e46581.
- Hashimoto Y, Moki T, Takizawa T, Shiratsuchi A, Nakanishi Y (2007) Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J Immunol* 178: 2448–2457.
- Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, et al. (2011) Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonia. *Am J Pathol* 179: 199–210.
- Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, et al. (2012) Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol* 56: 171–182.
- Fukuyama S, Kawaoka Y (2011) The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* 23: 481–486.
- de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, et al. (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12: 1203–1207.
- Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, et al. (2005) Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol* 79: 14933–14944.
- Suliman HB, Ryan LK, Bishop L, Folz RJ (2001) Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L69–78.
- Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, et al. (1996) Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2448–2453.
- Garcia CC, Russo RC, Guabiraba R, Fagundes CT, Polidoro RB, et al. (2010) Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. *PLoS Pathog* 6: e1001171.
- Kuiken T, Riteau B, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF (2012) Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr Opin Virol* 2: 276–286.
- Hamada H, Bassily E, Flies A, Strutt TM, Garcia-Hernandez Mde L, et al. (2013) Multiple Redundant Effector Mechanisms of CD8+ T Cells Protect against Influenza Infection. *J Immunol* 190: 296–306.
- Laidlaw BJ, Decman V, Ali MA, Abt MC, Wolf AI, et al. (2013) Cooperativity between CD8+ T cells, non-neutralizing antibodies, and alveolar macrophages is important for heterosubtypic influenza virus immunity. *PLoS Pathog* 9: e1003207.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499–511.
- Crompton T, Outram SV, Hager-Theodorides AL (2007) Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. *Nat Rev Immunol* 7: 726–735.
- Vieira Machado A, Naffakh N, Gerbaud S, van der Werf S, Escriou N (2006) Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice. *Virology* 345: 73–87.
- de Wit E, Spronken MI, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, et al. (2004) Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Res* 103: 155–161.
- Machado AV, Naffakh N, van der Werf S, Escriou N (2003) Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. *Virology* 313: 235–249.
- de Oliveira DB, Almeida GM, Guedes AC, Santos FP, Bonjardim CA, et al. (2011) Basal Activation of Type I Interferons (Alpha2 and Beta) and 2'5' OAS Genes: Insights into Differential Expression Profiles of Interferon System Components in Systemic Sclerosis. *Int J Rheumatol* 2011: 275617.
- Narasaraju T, Ng HH, Phoon MC, Chow VT (2010) MCP-1 antibody treatment enhances damage and impedes repair of the alveolar epithelium in influenza pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 732–743.
- Russo RC, Alessandri AL, Garcia CC, Cordeiro BF, Pinho V, et al. (2011) Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 72–80.
- Russo RC, Garcia CC, Barcelos LS, Rachid MA, Guabiraba R, et al. (2011) Phosphoinositide 3-kinase gamma plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Leukoc Biol* 89: 269–282.
- Horvat JC, Beagley KW, Wade MA, Preston JA, Hansbro NG, et al. (2007) Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 556–564.

52. Garcia CC, Weston-Davies W, Russo RC, Tavares LP, Rachid MA, et al. (2013) Complement C5 Activation during Influenza A Infection in Mice Contributes to Neutrophil Recruitment and Lung Injury. *PLoS One* 8: e64443.
53. Machado AV, Caetano BC, Barbosa RP, Salgado AP, Rabelo RH, et al. (2010) Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 28: 3247–3256.



## 6 REFERÊNCIAS

- Abbink, P., A. A. Lemckert, et al. (2007). "Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D." *J Virol* **81**(9): 4654-4663.
- Abuhid, I. M., E. R. Pedroso, et al. (2010). "[Scintigraphy for the detection of myocardial damage in the indeterminate form of Chagas disease.]" *Arq Bras Cardiol*.
- Acosta Rodriguez, E. V., E. I. Zuniga, et al. (2007). "Trypanosoma cruzi infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first?" *Scand J Immunol* **66**(2-3): 137-142.
- Ahi, Y. S., D. S. Bangari, et al. (2011). "Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies." *Curr Gene Ther* **11**(4): 307-320.
- Andrade, Z. A., S. G. Andrade, et al. (1994). "Myocardial changes in acute Trypanosoma cruzi infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy." *Am J Pathol* **144**(6): 1403-1411.
- Araujo, A. F., B. C. de Alencar, et al. (2005). "CD8+-T-cell-dependent control of Trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2." *Infect Immun* **73**(9): 6017-6025.
- Babiuk, L. A. and S. K. Tikoo (2000). "Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces." *J Biotechnol* **83**(1-2): 105-113.
- Bafica, A., H. C. Santiago, et al. (2006). "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection." *J Immunol* **177**(6): 3515-3519.
- Barbosa, R. P., B. G. Filho, et al. (2013). "Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against Trypanosoma cruzi Infection." *PLoS One* **8**(4): e61795.
- Barbosa, R. P., A. P. Salgado, et al. (2014). "Protective immunity and safety of a genetically modified influenza virus vaccine." *PLoS One* **9**(6): e98685.
- Bartholomeu, D. C., C. Ropert, et al. (2008). "Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi." *J Immunol* **181**(2): 1333-1344.
- Ben-Yedidia, T. and R. Arnon (2005). "Towards an epitope-based human vaccine for influenza." *Hum Vaccin* **1**(3): 95-101.
- Bern, C., S. Kjos, et al. (2011). "Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States." *Clin Microbiol Rev* **24**(4): 655-681.
- Biolo, A., A. L. Ribeiro, et al. (2010). "Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years?" *Prog Cardiovasc Dis* **52**(4): 300-316.
- Boscardin, S. B., S. S. Kinoshita, et al. (2003). "Immunization with cDNA expressed by amastigotes of Trypanosoma cruzi elicits protective immune response against experimental infection." *Infect Immun* **71**(5): 2744-2757.
- Brener, Z. (1962). "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **4**: 389-396.
- Bruna-Romero, O., G. Gonzalez-Aseguinolaza, et al. (2001). "Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen." *Proceeding of National Academy of Sciences of United States of America* **98**(20): 11491-11496.
- Bruna-Romero, O., J. J. Lasarte, et al. (1997). "Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus." *Hepatology* **25**(2): 470-477.
- Caetano, B. C., O. Bruna-Romero, et al. (2006). "Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of toxoplasma gondii induces immune response and protection against infection in mice." *Hum Gene Ther* **17**(4): 415-426.

- Campos, M. A. and R. T. Gazzinelli (2004). "Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors." Mediators Inflamm **13**(3): 139-143.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.g., n.s.p., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz(1): 159-218.
- Chiribao, M. L., G. Libisch, et al. (2014). "Early Trypanosoma cruzi infection reprograms human epithelial cells." Biomed Res Int **2014**: 439501.
- Clark, H. F., P. A. Offit, et al. (2006). "The new pentavalent rotavirus vaccine composed of bovine (strain WC3) -human rotavirus reassortants." Pediatr Infect Dis J **25**(7): 577-583.
- Claser, C., N. M. Espindola, et al. (2007). "Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of Trypanosoma cruzi." Microbes Infect **9**(8): 1011-1019.
- Cox, R. J., K. A. Brokstad, et al. (2004). "Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines." Scand J Immunol **59**(1): 1-15.
- Crescenzo-Chaigne, B., N. Naffakh, et al. (1999). "Comparative analysis of the ability of the polymerase complexes of influenza viruses type A, B and C to assemble into functional RNPs that allow expression and replication of heterotypic model RNA templates in vivo." Virology **265**(2): 342-353.
- Davila, D. F., R. O. Rossell, et al. (1989). "Cardiac parasympathetic abnormalities: Cause or consequence of chagas heart disease?" Parasitol Today **5**(10): 327-329.
- de Alencar, B. C., A. F. Araujo, et al. (2007). "Cross-priming of long lived protective CD8+ T cells against Trypanosoma cruzi infection: importance of a TLR9 agonist and CD4+ T cells." Vaccine **25**(32): 6018-6027.
- de Alencar, B. C., P. M. Persechini, et al. (2009). "Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, Trypanosoma cruzi, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination." Infect Immun **77**(10): 4383-4395.
- de Andrade, B. P., R. T. Gazzinelli, et al. (2007). "Protective immunization against murine cytomegalovirus infection using adenoviruses and poxviruses expressing hepatitis B virus chimeras." Int Microbiol **10**(4): 261-269.
- Dominguez, M. R., E. L. Silveira, et al. (2011). "Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite." PLoS One **6**(7): e22011.
- Dos Santos Virgilio, F., C. Pontes, et al. (2014). "CD8(+) T cell-mediated immunity during Trypanosoma cruzi infection: a path for vaccine development?" Mediators Inflamm **2014**: 243786.
- Duan, X., Y. Yonemitsu, et al. (2009). "Efficient protective immunity against Trypanosoma cruzi infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2." Vaccine **27**(44): 6154-6159.
- Dumonteil, E. (2007). "DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges." J Biomed Biotechnol **2007**(6): 90520.
- Dumonteil, E. (2009). "Vaccine development against Trypanosoma cruzi and Leishmania species in the post-genomic era." Infect Genet Evol **9**(6): 1075-1082.
- Eickhoff, C. S., J. R. Vasconcelos, et al. (2011). "Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against Trypanosoma cruzi." PLoS Negl Trop Dis **5**(3): e983.
- Enders, J. F., T. H. Weller, et al. (1949). "Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues." Science **109**(2822): 85-87.
- Fahim, R. E., P. D. Kessler, et al. (2013). "Therapeutic vaccines against tobacco addiction." Expert Rev Vaccines **12**(3): 333-342.
- Fenner, F. (1977). "The eradication of smallpox." Prog Med Virol **23**: 1-21.

- Fenner, F., D. A. Henderson, et al., Eds. (1988). Early efforts at control: variolation, vaccination, isolation and quarantine. History of International Public Health. Geneva, World Health Organization.
- Fernandes, M. C. and N. W. Andrews (2012). "Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence." FEMS Microbiol Rev **36**(3): 734-747.
- Fields, B. N., D. M. Knipe, et al. (2007). Fields virology. Philadelphia ; London, Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins.
- Finco, O. and R. Rappuoli (2014). "Designing vaccines for the twenty-first century society." Front Immunol **5**: 12.
- Fodor, E., L. Devenish, et al. (1999). "Rescue of influenza A virus from recombinant DNA." J Virol **73**(11): 9679-9682.
- Francis, T., Jr., J. E. Salk, et al. (1946). "The protective effect of vaccination against epidemic influenza B." J Am Med Assoc **131**: 275-278.
- Garcia-Sastre, A., T. Muster, et al. (1994). "Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus." J Virol **68**(10): 6254-6261.
- Garulli, B., Y. Kawaoka, et al. (2004). "Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus." Journal of Virology **78**(2): 1020-1025.
- Gascon, J., C. Bern, et al. (2010). "Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries." Acta Trop **115**(1-2): 22-27.
- Gherardi, M. M., J. L. Najera, et al. (2003). "Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes." Journal of Virology **77**(12): 7048-7057.
- Gilbert, S. C., J. Schneider, et al. (2002). "Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes." Vaccine **20**(7-8): 1039-1045.
- Ginsberg, H. S., R. L. Horswood, et al. (1990). "Role of early genes in pathogenesis of adenovirus pneumonia." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6191-6195.
- Ginsberg, H. S., L. L. Moldawer, et al. (1991). "A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1651-1655.
- Giraldo, M., H. Cannizzaro, et al. (2000). "Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis." J Clin Microbiol **38**(4): 1453-1460.
- Gonçalves, T. C. and J. Costa. "Biologia dos vetores da doença de Chagas." Retrieved 01/07/2010.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Y. Nakaya, et al. (2003). "Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8+T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*." J Virol **77**(21): 11859-11866.
- Grisotto, M. G., M. R. D'Imperio Lima, et al. (2001). "Most parasite-specific CD8+ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor- $\alpha$  and CD8 molecules." Immunology **102**(2): 209-217.
- Haggerty, R. J., R. J. Meyer, et al. (1960). "Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VII. Clinical, antigenic and prophylactic effects of vaccine in home-dwelling children." N Engl J Med **263**: 178-180.
- Harrop, R., J. John, et al. (2006). "Recombinant viral vectors: cancer vaccines." Adv Drug Deliv Rev **58**(8): 931-947.
- He, Q., L. Martinez-Sobrido, et al. (2007). "Live-attenuated influenza viruses as delivery vectors for Chlamydia vaccines." Immunology **122**(1): 28-37.

- Hilleman, M. R., E. B. Buynak, et al. (1968). "Live, attenuated mumps-virus vaccine." N Engl J Med **278**(5): 227-232.
- Hoft, D. F., C. S. Eickhoff, et al. (2007). "Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming." J Immunol **179**(10): 6889-6900.
- Hovav, A. H., M. W. Panas, et al. (2007). "The impact of a boosting immunogen on the differentiation of secondary memory CD8+ T cells." J Virol **81**(23): 12793-12802.
- Imler, J. L. (1995). "Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines." Vaccine **13**(13): 1143-1151.
- Jacobs, B. L., J. O. Langland, et al. (2009). "Vaccinia virus vaccines: past, present and future." Antiviral Res **84**(1): 1-13.
- Julkunen, I., K. Melen, et al. (2000). "Inflammatory responses in influenza A virus infection." Vaccine **19 Suppl 1**: S32-37.
- Katz, S. L., C. H. Kempe, et al. (1960). "Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccine." N Engl J Med **263**: 180-184.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso, et al. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med **7**(1): 33-40.
- Kayama, H., R. Koga, et al. (2009). "NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during Trypanosoma cruzi infection." PLoS Pathog **5**(7): e1000514.
- Kayama, H. and K. Takeda (2010). "The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection." Microbes Infect **12**(7): 511-517.
- Kelly, J. M. (2000). "A B-cell activator in Chagas disease." Nat Med **6**(8): 865-866.
- Kierszenbaum, F. (2007). "Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease." Acta Parasitologica **52**(1): 1-12.
- Kim, J. H., S. Rerks-Ngarm, et al. (2010). "HIV vaccines: lessons learned and the way forward." Curr Opin HIV AIDS **5**(5): 428-434.
- Kittel, C., B. Ferko, et al. (2005). "Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment." J Virol **79**(16): 10672-10677.
- Li, S., M. Rodrigues, et al. (1993). "Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(11): 5214-5218.
- Limbach, K. J. and T. L. Richie (2009). "Viral vectors in malaria vaccine development." Parasite Immunol **31**(9): 501-519.
- Liu, J., B. A. Ewald, et al. (2008). "Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys." J Virol **82**(10): 4844-4852.
- Maassab, H. F. and D. C. DeBorde (1985). "Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines." Vaccine **3**(5): 355-369.
- Machado, A., N. Naffakh, et al. (2003). "Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter." Virology **313**(1): 235-249.
- Machado, A. V., B. C. Caetano, et al. (2010). "Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the Toxoplasma gondii surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity." Vaccine **28**(18): 3247-3256.
- Machado, A. V., J. E. Cardoso, et al. (2006). "Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase." Hum Gene Ther **17**(9): 898-908.

- Machado, A. V., N. Naffakh, et al. (2003). "Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter." *Virology* **313**(1): 235-249.
- Maini, M. K., G. Casorati, et al. (1999). "T-cell clonality in immune responses." *Immunol Today* **20**(6): 262-266.
- Marrack, P., A. S. McKee, et al. (2009). "Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium." *Nat Rev Immunol* **9**(4): 287-293.
- Masopust, D. (2009). "Developing an HIV cytotoxic T-lymphocyte vaccine: issues of CD8 T-cell quantity, quality and location." *J Intern Med* **265**(1): 125-137.
- Mesa, C. and L. E. Fernandez (2004). "Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy." *Immunol Cell Biol* **82**(6): 644-650.
- Miyahira, Y. (2008). "Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8+ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine." *Parasitol Int* **57**(1): 38-48.
- Miyahira, Y., Y. Takashima, et al. (2005). "Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control Trypanosoma cruzi infection." *Infect Immun* **73**(11): 7356-7365.
- Mizuguchi, H., M. A. Kay, et al. (2001). "Approaches for generating recombinant adenovirus vectors." *Adv Drug Deliv Rev* **52**(3): 165-176.
- Molinier-Frenkel, V., R. Lengagne, et al. (2002). "Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response." *J Virol* **76**(1): 127-135.
- Monteiro, A. C., V. Schmitz, et al. (2006). "Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by Trypanosoma cruzi." *J Immunol* **177**(9): 6325-6335.
- Muller, U., V. Sobek, et al. (2003). "Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of Trypanosoma cruzi from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway." *Eur J Immunol* **33**(1): 70-78.
- Murata, K., A. Garcia-Sastre, et al. (1996). "Characterization of in vivo primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses." *Cellular Immunology* **173**(1): 96-107.
- Nagajyothi, F., F. S. Machado, et al. (2012). "Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease." *Cell Microbiol* **14**(5): 634-643.
- Nakaya, Y., T. Nakaya, et al. (2004). "Induction of cellular immune responses to simian immunodeficiency virus gag by two recombinant negative-strand RNA virus vectors." *Journal of Virology* **78**(17).
- Nayak, D. P., E. K. Hui, et al. (2004). "Assembly and budding of influenza virus." *Virus Res* **106**(2): 147-165.
- Naz, R. K. (2011). "Antisperm contraceptive vaccines: where we are and where we are going?" *Am J Reprod Immunol* **66**(1): 5-12.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka (2001). "Reverse genetics of influenza virus." *Virology* **287**(2): 243-250.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka (2002). "Generation of influenza A virus from cloned cDNAs--historical perspective and outlook for the new millenium." *Reviews in Medical Virology* **12**(1): 13-30.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka (2004). "Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA." *Current Topics in Microbiology and Immunology* **283**: 43-60.
- Neumann, G., M. Whitt, et al. (2002). "A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned?" *Journal of General Virology* **83**(11): 2635-2662.
- Nicklin, S. A., E. Wu, et al. (2005). "The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy." *Mol Ther* **12**(3): 384-393.
- Nolz, J. C. and J. T. Harty (2011). "Strategies and implications for prime-boost vaccination to generate memory CD8 T cells." *Adv Exp Med Biol* **780**: 69-83.

- Olivieri, B. P., R. Vasconcellos, et al. (2010). "Intravenous immunoglobulin increases survival time in the acute phase of experimental Chagas disease." *Parasite Immunol* **32**(6): 464-469.
- Organization, W. H. (2014). "Vaccines." from <http://www.who.int/topics/vaccines/en/>.
- Padilla, A., D. Xu, et al. (2007). "Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of Trypanosoma cruzi-specific CD8+ T cells." *Infect Immun* **75**(1): 231-235.
- Padilla, A. M., J. M. Bustamante, et al. (2009). "CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection." *Curr Opin Immunol* **21**(4): 385-390.
- Paiva, C. N., M. T. Castelo-Branco, et al. (1999). "Trypanosoma cruzi: protective response of vaccinated mice is mediated by CD8+ cells, prevents signs of polyclonal T lymphocyte activation, and allows restoration of a resting immune state after challenge." *Exp Parasitol* **91**(1): 7-19.
- Pan, A. A. and D. McMahon-Pratt (1989). "Amastigote and epimastigote stage-specific components of Trypanosoma cruzi characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein." *J Immunol* **143**(3): 1001-1008.
- Parada, H., H. A. Carrasco, et al. (1997). "Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study." *Int J Cardiol* **60**(1): 49-54.
- Pasteur, L. (1880). "De l'attenuation du virus du cholera des poules." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*(91): 673-680.
- Pasteur, L. (1881). "Sur la vaccination charbonneuse." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*(92): 1378-1383.
- Pelosi, A., R. Shepherd, et al. (2012). "Delivery of plant-made vaccines and therapeutics." *Biotechnol Adv* **30**(2): 440-448.
- Penney, C. A., D. R. Thomas, et al. (2011). "Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals." *Plant Cell Rep* **30**(5): 789-798.
- Percy, N., W. S. Barclay, et al. (1994). "Expression of a foreign protein by influenza A virus." *Journal of Virology* **68**(7): 4486-4492.
- Plotkin, S. (2014). "History of vaccination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(34): 12283-12287.
- Plotkin, S. A. (2005). "Vaccines: past, present and future." *Nat Med* **11**(4 Suppl): S5-11.
- Radošević, K., A. Rodriguez, et al. (2009). "Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects." *Expert Rev Vaccines* **8**(5): 577-592.
- Rappuoli, R., M. Pizza, et al. (2014). "Vaccines, new opportunities for a new society." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(34): 12288-12293.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. (2000). "Chagas' heart disease." *Clin Cardiol* **23**(12): 883-889.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. (2010). "Chagas disease." *Lancet* **375**(9723): 1388-1402.
- Restifo, N. P., D. R. Surman, et al. (1998). "Transfectant influenza A viruses are effective recombinant immunogens in the treatment of experimental cancer." *Virology* **249**(1): 89-97.
- Rigato, P. O., B. C. de Alencar, et al. (2011). "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." *Infect Immun* **79**(5): 2120-2130.
- Robertson, J. S. (1979). "5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus." *Nucleic Acids Res* **6**(12): 3745-3757.
- Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al. (2004). "Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases." *Int Microbiol* **7**(2): 83-94.
- Rodrigues, E. G., F. Zavala, et al. (1997). "Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria." *Journal of Immunology* **158**(3): 1268-1274.
- Rodrigues, M., S. Li, et al. (1994). "Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity." *Journal of Immunology* **153**(10): 4636-4648.

- Rodrigues, M. M., S. B. Boscardin, et al. (2003). "Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines." *An Acad Bras Cienc* **75**(4): 443-468.
- Rodrigues, M. M., S. B. Boscardin, et al. (2003). "Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines." *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **75**(4): 443-468.
- Rodrigues, M. M., B. C. de Alencar, et al. (2008). "Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease?" *Braz J Med Biol Res*.
- Rodrigues, M. M., M. Riberao, et al. (2000). "CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism." *Immunol Lett* **73**(1): 43-50.
- Roffe, E., A. G. Rothfuchs, et al. (2012). "IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection." *J Immunol* **188**(2): 649-660.
- Sabin, A. B., W. A. Hennesen, et al. (1954). "Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunologic types." *J Exp Med* **99**(6): 551-576.
- Salvatella, R., P. Irabedra, et al. (2014). "Interruption of vector transmission by native vectors and "the art of the possible"." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **109**(1): 122-125.
- Santiago, H. C., C. G. Feng, et al. (2005). "Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth." *J Immunol* **175**(12): 8165-8172.
- Schirmbeck, R., J. Reimann, et al. (2008). "The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens." *Mol Ther* **16**(9): 1609-1616.
- Schofield, C. J., J. Jannin, et al. (2006). "The future of Chagas disease control." *Trends Parasitol* **22**(12): 583-588.
- Shinya, K., Y. Fujii, et al. (2004). "Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine." *J Virol* **78**(6): 3083-3088.
- Shiver, J. W., T. M. Fu, et al. (2002). "Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity." *Nature* **415**: 331-335.
- Silverio, J. C., L. M. de-Oliveira-Pinto, et al. (2009). "Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection." *Int J Exp Pathol* **91**(1): 72-86.
- Silverio, J. C., I. R. Pereira, et al. (2012). "CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy." *PLoS Pathog* **8**(4): e1002645.
- Simpson, D. A. M. a. L. (1995). "Evolution of Parasitism in Kinetoplastid Protozoa." *Parasitology Today* **11**(1): 30-32.
- Smaill, F., M. Jeyanathan, et al. (2013). "A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity." *Sci Transl Med* **5**(205): 205ra134.
- Small, J. C. and H. C. Ertl (2011). "Viruses - from pathogens to vaccine carriers." *Curr Opin Virol* **1**(4): 241-245.
- Souza, A. P., L. Haut, et al. (2005). "Recombinant viruses as vaccines against viral diseases." *Braz J Med Biol Res* **38**(4): 509-522.
- Stech, J., H. Garn, et al. (2005). "A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin." *Nature Medicine* **11**(6): 683-689.
- Takasuda, N., S. Enami, et al. (2002). "Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice." *Vaccine* **20**: 1579-1585.

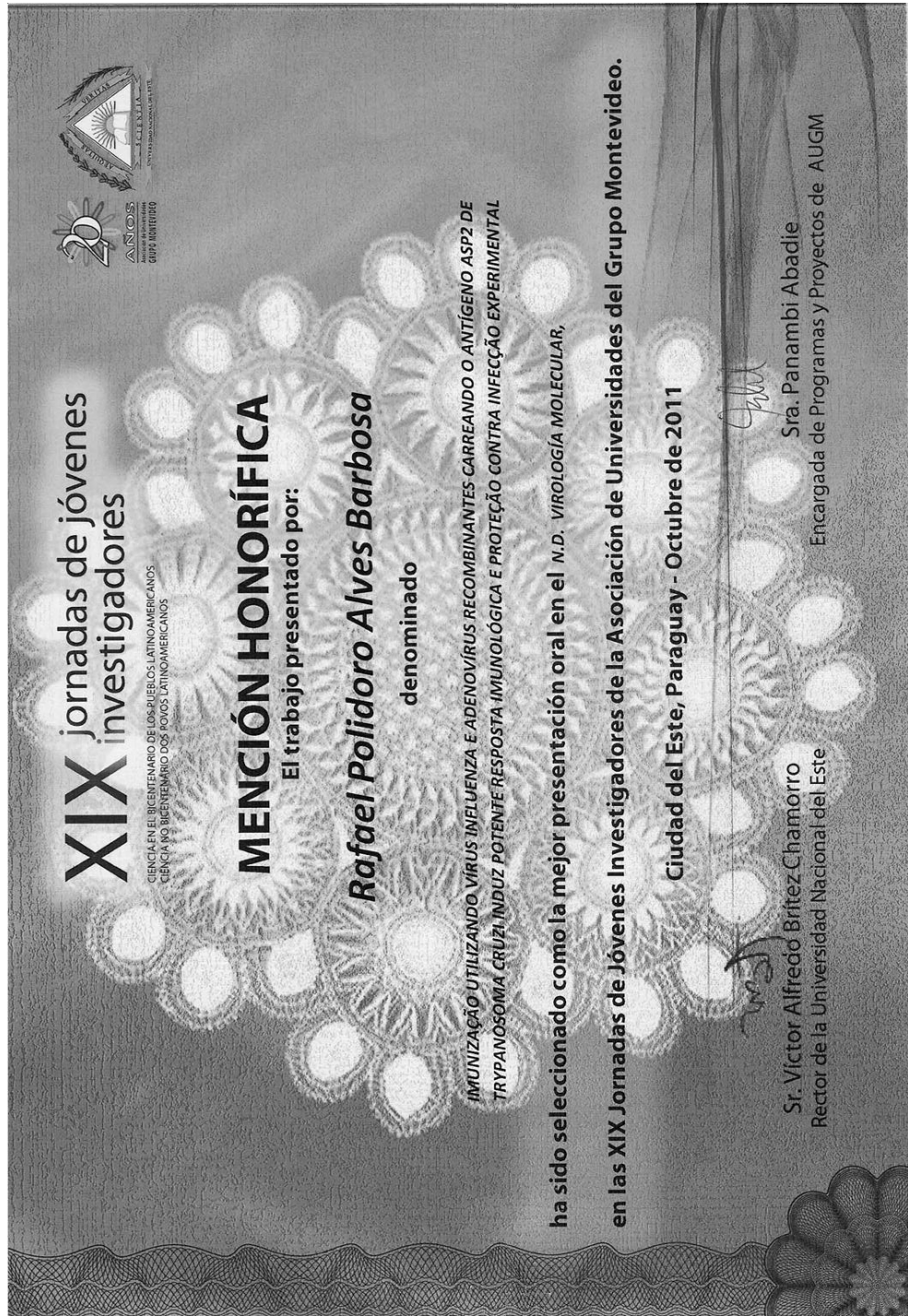
- Takayama, E., T. Ono, et al. (2010). "Quantitative and qualitative features of heterologous virus-vector-induced antigen-specific CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection." Int J Parasitol **40**(13): 1549-1561.
- Tarleton, R. L., M. J. Grusby, et al. (1996). "Trypanosoma cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease." Int Immunol **8**(1): 13-22.
- Tarleton, R. L., R. Reithinger, et al. (2007). "The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope." PLoS Med **4**(12): e332.
- Tatsis, N. and H. C. Ertl (2004). "Adenoviruses as vaccine vectors." Mol Ther **10**(4): 616-629.
- Teixeira, A. R., N. Nitz, et al. (2006). "Chagas disease." Postgrad Med J **82**(974): 788-798.
- Tsuji, M., C. Bergmann, et al. (1998). "Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice." Journal of Virology **72**(8): 6907-6910.
- Tyler, K. M. and D. M. Engman (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." Int J Parasitol **31**(5-6): 472-481.
- Tzelepis, F., B. C. de Alencar, et al. (2008). "Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance." J Immunol **180**(3): 1737-1748.
- Umekita, L. F. and I. Mota (2000). "How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*?" Braz J Med Biol Res **33**(3): 253-258.
- Varadarajan, N., B. Julg, et al. (2011). "A high-throughput single-cell analysis of human CD8+ T cell functions reveals discordance for cytokine secretion and cytolysis." J Clin Invest.
- Vasconcelos, J. R., M. I. Hiyane, et al. (2004). "Protective immunity against trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase." Hum Gene Ther **15**(9): 878-886.
- Vazquez-Chagoyan, J. C., S. Gupta, et al. (2011). "Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease." Adv Parasitol **75**: 121-146.
- Vieira Machado, A., N. Naffakh, et al. (2006). "Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice." Virology **345**(1): 73-87.
- Watanabe, T., S. Watanabe, et al. (2003). "Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes." Journal of Virology **77**(19): 10575-10583.
- WHO (2009). Chagas disease: control and elimination. Sixty-second World Health Assembly. **A62/17**: 4.
- Wizel, B., M. Palmieri, et al. (1998). "Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses." J Clin Invest **102**(5): 1062-1071.
- Wortmann, A., S. Vohringer, et al. (2008). "Fully detargeted polyethylene glycol-coated adenovirus vectors are potent genetic vaccines and escape from pre-existing anti-adenovirus antibodies." Mol Ther **16**(1): 154-162.
- Yang, Y., Z. Xiang, et al. (1995). "Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7257-7261.



## 7 ANEXOS







# XIX jornadas de jóvenes investigadores

CIENCIA EN EL BICENTENARIO DE LOS PUEBLOS LATINOAMERICANOS  
CIENCIA NO BICENTENARIO DOS POVOS LATINOAMERICANOS



## MENCIÓN HONORÍFICA

El trabajo presentado por:


**Rafael Polidoro Alves Barbosa**  
denominado

IMUNIZAÇÃO UTILIZANDO VIRUS INFLUENZA E ADENOVÍRUS RECOMBINANTES CARRANDO O ANTÍGENO ASP2 DE TRYPANOSOMA CRUZI INDUZ POTENTE RESPOSTA IMUNOLÓGICA E PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

ha sido seleccionado como la mejor presentación oral en el N.D. VIROLOGÍA MOLECULAR,  
en las XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo.

Ciudad del Este, Paraguay - Octubre de 2011

  
Sr. Victor Alfredo Brites Chamorro  
Rector de la Universidad Nacional del Este

  
Sra. Panambi Abadie  
Encargada de Programas y Proyectos de AUGM

## **CONGRATULATIONS TO THE WHIP SCHOLARSHIP AWARDEES**

Names of scholarship attendees:

Rafael Barbosa  
Olga Fernandez  
Samarchith Kurup  
Tyler Landrith  
Caline Matar  
Wiebke Nahrendorf  
Victoria Pelly  
David Sabin  
Anja Schermann  
Susmita Roy

Scholarship awards provided from NIAID grant 1R13AI112120.

### **PARASITE IMMUNOLOGY WOODS HOLE PRIZE Awarded to:**

Ricardo-Carter C, Favila M, Polando RE, Cotton RN, Bogard Horner K, Condon D, Ballhorn W, Whitcomb JP, Yadav M, Geister RL, Schorey JS, McDowell MA

*Leishmania major* inhibits IL-12 in macrophages by signaling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription.

*Parasite Immunology*. 2013 Dec; 35(12):409-20. doi: 10.1111/pim.12049

## **WOODS HOLE IMMUNOPARASITOLOGY CONFERENCE WOODS HOLE, MA**

SUNDAY, APRIL 27, 2014 – WEDNESDAY, APRIL 30, 2014

- » Capa
- » A democracia "Tiririca"
- » Eu, famoço
- » ICB desenvolve vacina contra chagas a partir de colagem genética
- » Vida nova
- » Acontece
- » A vida e obra contra o espetáculo
- » Expediente
- » Edições Anteriores

## ICB desenvolve vacina contra chagas a partir de colagem genética

Gerada a partir de modificação do vírus influenza, ela também protege contra a gripe

Ana Rita Araújo



**M**odificar o vírus da influenza para desenvolver vacina bivalente que proteja contra a doença de chagas e a gripe. A ideia, que resultou em depósito de patente para a UFMG, já tem eficácia comprovada em modelo animal.

"Ambas são doenças infecciosas que induzem uma resposta imunológica do tipo inflamatória", explica o doutorando Rafael Polidoro Alves Barbosa, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), autor de trabalho sobre o tema, vencedor do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia, na categoria Jovem Pesquisador.

O projeto consiste em alterar um vírus influenza H1N1, que funciona como vetor vacinal e carrega um gene do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de chagas. Embora o modelo trabalhe especificamente com o vírus A/WSN/33, a vacina pode ser adaptada à linhagem da gripe prevalente a cada ano.

"O influenza é relativamente fácil de ser usado geneticamente, pois tem só oito genes e normalmente codifica dez proteínas. Assim, precisamos mudar pouca coisa para transformá-lo em uma ferramenta viável", descreve Polidoro. Ele acrescenta que a possibilidade de gerar vírus influenza recombinantes pela técnica de genética reversa faz deles "alvos atraentes de estudos de vetores para doenças causadas por protozoários".

O estudo é orientado na UFMG pelo imunologista Ricardo Gazzinelli e na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo virologista Alexandre Vieira Machado. Também recebe contribuições do professor Maurício Martins Rodrigues, da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), especialista em *T. cruzi*, e do pesquisador Oscar Bruña-Romero, especialista em adenovírus, da Universidade Federal de Santa Catarina. O projeto é parte

EM DIA

biologia

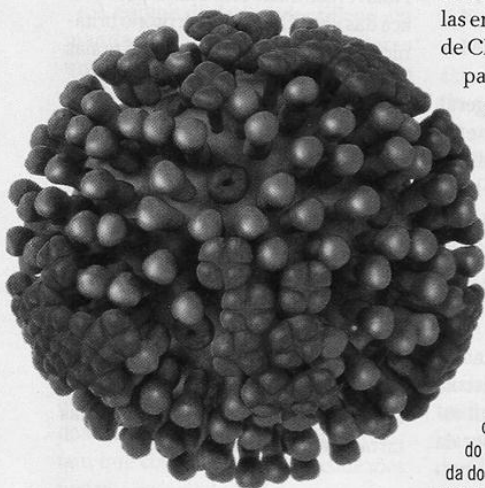
# DUAS DOENÇAS, UMA CAJADADA

VACINA DUPLA CONTRA GRIPE E DOENÇA DE CHAGAS  
ESTÁ MAIS PERTO DA REALIDADE

Imagine ser vacinado contra a gripe e ficar imunizado também contra a doença de Chagas. Essa pode ser a realidade no futuro graças a uma pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Centro de Pesquisa René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz, também em Minas Gerais. Os pesquisadores inseriram o gene da proteína ASP-2 do *Trypanosoma cruzi*, agente infeccioso da doença de Chagas, no vírus influenza, causador da gripe, e testaram a vacina em camundongos, obtendo uma taxa de sobrevivência de 75% em animais infectados com um volume de parasitas cinco vezes maior do que o letal.

O projeto, que faz parte do programa de pesquisa do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas (INCTV), é continuação de uma pesquisa realizada em 2006 que tentava usar a mesma proteína de *T. cruzi* em um vírus diferente, o adenovírus. Como essa via de estudo apresenta

FOTO DAN HIGGINS, CDC



limitações, optou-se por usar o vírus influenza H1N1 adaptado a camundongos. “O vírus da gripe é fácil de manipular”, conta o biólogo Rafael Polidoro Alves Barbosa, cujas dissertação de mestrado e tese de doutorado, realizadas no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, tiveram como tema a produção dessa vacina bivalente.

Segundo Barbosa, a ASP-2 é uma proteína presente na membrana da forma amastigota (sem flagelo) do *Trypanosoma cruzi*, em seu ciclo de replicação. Não se sabe ao certo qual a sua função, mas acredita-se que estaria envolvida na adesão celular (interação entre o parasito e o hospedeiro). A sequência genética que a codifica está preservada nas seis famílias de *T. cruzi*. “Isso significa que ela é importante para o parasita e por isso é um bom alvo para gerar uma resposta imunológica”, explica o biólogo.

**PARCERIA VIRAL** Após concluir os testes iniciais em culturas de células em 2009 (ver ‘Gripe contra doença de Chagas?’, na *CH On-line*), Barbosa partiu para os experimentos com camundongos. Os animais recebiam duas doses do influenza modificado e, 21 dias depois, o biólogo retirava o baço dos camundongos para análise. “Constatamos que o vírus da gripe, mesmo com duas

aplicações, não conseguia gerar uma quantidade razoável de células imunes”, observa Barbosa.

O biólogo decidiu então adicionar o adenovírus modificado com o gene da ASP-2 do projeto anterior e observou uma grande melhora. O teste seguinte foi, após aplicar as doses de influenza e adenovírus, infectar os camundongos com o parasita, só que com uma dose cinco vezes maior que a letal. “Embora a resposta imunológica no baço não tenha sido diferente, quando comparado ao projeto somente com adenovírus, o influenza/adenovírus no teste de sobrevivência se mostrou bastante eficaz”, afirma Barbosa. Posteriormente, em um teste mais preciso, observou-se que usando dois vírus diferentes o número de células anti-*T. cruzi* chegava a 10% do total de células, enquanto no protocolo somente com adenovírus essa quantidade não passou de 2%.

Entender por que houve essa discrepância é um dos próximos passos na pesquisa, que também testará o efeito memória do sistema imune, vacinando agora e infectando o animal com o parasita seis meses depois. Outro tópico de estudo é testar a eficiência da vacina quando aplicada de forma subcutânea – atualmente, Barbosa aplica o vírus influenza por via nasal. “Vamos procurar desenvolver ainda uma vacina terapêutica para aquelas pessoas que já estão infectadas com o *T. cruzi*, de modo a reverter os danos cardíacos causados por ele”, revela o biólogo. A fase atual de testes deve estar concluída até setembro.

O vírus influenza H1N1, causador da gripe, modificado com o gene ASP-2 do *Trypanosoma cruzi*, agente infeccioso da doença de Chagas, consegue proteger contra as duas doenças

FRED FURTADO | CIÊNCIA HOJE | RJ