

Bruna Mattioly Valente

Dissertação de Mestrado

Antígenos contendo repetições de
aminoácidos como fatores de virulência
na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

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

2014

Bruna Mattioly Valente

Antígenos contendo repetições de
aminoácidos como fatores de virulência
na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

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

Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Co-orientador: Ricardo Tostes Gazzinelli

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

2014

Agradecimentos

À professora Santuza pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela dedicação e apoio.

Ao professor Ricardo Gazzinelli pela co-orientação.

Ao aluno de doutorado Bruno Galvão pelo auxílio nos experimentos e por estar sempre disposto a ajudar.

À aluna de doutorado Gabriela de Assis por me ensinar a trabalhar com os camundongos.

À Nailma por me ajudar nos ensaios de ELISA.

A todos meus amigos do laboratório pelos incentivos, pelos momentos de alegria e descontração, pelas conversas e por toda a força que me deram nos momentos mais difíceis. Em especial para Juli, Rita, Mari, Fê, Gabi e Vivi meu muito obrigado.

À todos do LAIM, por terem me recebido e por me ajudarem sempre que precisei.

À professora Patiu pelas discussões de resultados.

Ao Elimar que a todo momento esteve disposto a ajudar.

À toda minha família, em especial aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado, que sempre esteve ao meu lado me apoiando incondicionalmente em todos os momentos.

I. RESUMO

Clones de cDNA de uma biblioteca de formas amastigotas foram selecionados após incubação com soro de pacientes com doença de Chagas. Entre os clones reconhecidos pelos anticorpos presentes no soro desses pacientes foram identificadas sequências codificadoras de proteínas homólogas à proteína ribossômica eucariótica L7a. Diferentemente das proteínas L7a de outros eucariotos, a proteína L7a de *T. cruzi* contém um domínio com repetições dos aminoácidos Ala-Lys-Pro na sua porção N-terminal. Para avaliar o papel de repetições de aminoácidos presentes em antígenos de *T. cruzi*, foram geradas as versões recombinantes da proteína completa (TcL7a), bem como versões truncadas contendo apenas o domínio repetitivo (TcL7aRep) ou a região não repetitiva (TcL7aDeltaRep), as quais foram usadas para imunizar camundongos. Animais imunizados com a TcL7a completa produzem anticorpos IgG contra essa proteína, bem como contra o domínio repetitivo, mas produzem baixos níveis de anticorpos contra a região não repetitiva. Por outro lado, animais imunizados com a TcL7aRep não geram anticorpos contra nenhum destes antígenos. Em relação a resposta imune celular, animais imunizados com TcL7a produzem altos níveis de IFN- γ e IL-10, enquanto que níveis muito baixos de IFN- γ foram detectados em animais imunizados com TcL7aRep e TcL7aDeltaRep. Após o desafio com tripomastigotas do clone Cl Brener, observou-se uma proteção parcial nos animais imunizados com a proteína completa, enquanto que a imunização com TcL7aDeltaRep não alterou os níveis de parasitemia em relação aos animais controles. Em contraste, a imunização com TcL7aRep resultou em uma exacerbação da parasitemia em comparação com os outros grupos. A imunização de animais com o domínio repetitivo, seguida da imunização com a proteína completa ocasiona uma diminuição da produção de IgG2a contra a TcL7a completa e contra a TcL7aRep mas não interfere na produção de IgG1, IFN- γ e IL-10. Nossos resultados sugerem portanto que os domínios repetitivos presentes em antígenos de *T. cruzi* podem regular negativamente a resposta Th1 capaz de conferir proteção contra o parasito.

II. ABSTRACT

Using an immunoscreening approach, several antigens derived from a *Trypanosoma cruzi* amastigote cDNA library that react with sera from chronic chagasic patients were isolated. One such antigen, homologous to the eukaryotic L7a ribosomal protein and containing an Ala-Lys-Pro rich repetitive domain at its N-terminus, was characterized. To evaluate the role of amino acid repeats present in *T. cruzi* antigens, we generated recombinant versions of the complete antigen (TcL7a) as well as truncated versions containing only its repetitive (TcL7aRep) or the non-repetitive domain (TcL7aDeltaRep) and used them to immunize mice. Animals immunized with TcL7a produced IgG antibodies against the complete protein as well as against the repetitive domain. On the other hand, mice immunized with TcL7aRep and TcL7aDeltaRep did not generate antibodies against any of these antigens respectively. Regarding cellular immune responses, whereas mice immunized with TcL7a produced high levels of IFN- γ and IL-10, only very low levels of IFN- γ were detected in mice immunized with TcL7aRep and TcL7aDeltaRep. After challenging immunized mice with trypomastigotes, we observed a partial protection in mice immunized with the complete protein whereas immunization with TcL7aDeltaRep did not alter parasitemia levels compared to controls. In contrast, immunization with TcL7aRep resulted in an exacerbation of the parasitemia compared to the other groups. Immunization with the repetitive domain followed by immunization with full length L7a protein results in a decreased production of IgG2a against TcL7a and TcL7aRep but does not alter the production of IgG1, IFN- γ or IL-10. Our results suggest that repetitive domains present in *T. cruzi* antigens may be used by the parasite to downregulate the Th1 response against the infection.

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	5
Figura 3: Seleção de clones de uma biblioteca de cDNA após incubação com soro de pacientes chagásicos	7
Figura 4: Alinhamento da proteína TcL7a com a proteína L7a de outros organismos.....	8
Figura 5: Especificidade da proteína TcL7a completa e do domínio repetitivo para pacientes com doença de Chagas.....	8
Figura 6: Predição de epítomos para linfócitos B, MHC de classe I e MHC de classe II.....	9
Figura 7: Desenho esquemático da construção das três proteínas recombinantes	13
Figura 8: Indução das proteínas TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep em <i>E. coli</i>	20
Figura 9: Lise da cultura de bactéria.....	20
Figura 10: Gráfico da eluição das proteínas.....	21
Figura 11: Purificação das proteínas recombinantes.....	22
Figura 12: Análise das proteínas recombinantes antes e após a diálise.....	22
Figura 13: Proteínas recombinantes.....	23
Figura 14: Representação esquemática do protocolo de imunização.....	23
Figura 15: Produção de anticorpos após a imunização com a proteína TcL7a.....	24
Figura 16: Produção de anticorpos após a imunização com a proteína TcL7aDeltaRep.....	25
Figura 17: Produção de anticorpos após a imunização com a proteína TcL7aRep.....	26
Figura 18: Imunização com a proteína TcL7a produz anticorpos contra o domínio repetitivo.....	27

Figura 19: Imunização com a proteína TcL7aDeltaRep produz anticorpos contra a proteína TcL7a.	27
Figura 20: Imunização com o domínio repetitivo não produz anticorpos contra a proteína TcL7a.....	28
Figura 21: Produção de IFN- γ pelos animais imunizados.....	29
Figura 22: Produção de IL-10 pelos animais imunizados.....	30
Figura 23: Parasitemia e mortalidade.....	31
Figura 24: Representação esquemática do protocolo de imunização.....	32
Figura 25: Anticorpos produzidos por animais imunizados.....	33
Figura 26: Produção de IFN- γ pelos animais imunizados.....	34
Figura 27: Produção de IL-10 pelos animais imunizados.....	35
Figura 28: Parasitemia e mortalidade.....	36
Figura 29: Produção de anticorpos contra a proteína completa 15 e 22 dias após o desafio.....	37
Figura 30: Produção de anticorpos contra a o domínio repetitivo 15 e 22 dias após o desafio.....	38
Figura 31: Produção de IFN- γ e IL-10 15 e 22 dias após o desafio.....	39
Figura 32: Representação esquemática do protocolo de imunização.....	40
Figura 33: Anticorpos contra a proteína TcL7a completa produzidos pela imunização com a TcL7aRep seguida pela imunização com a TcL7a.....	41
Figura 34: Anticorpos contra a proteína TcL7aRep produzidos pela imunização com a TcL7aRep seguida pela imunização com a TcL7a.....	42
Figura 35: Produção de IFN- γ pela imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela imunização com a proteína TcL7a.....	43
Figura 36: Produção de IL-10 pela imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela imunização com a proteína TcL7a.....	44

IV.ABREVIATURAS

BSA: Albumina de soro bovino

°C: graus centígrados

cDNA: DNA complementar

ConA: Concanavalina A

CpG: Citosina-fosfato-Guanina

DNA: Acido desoxiribonucléico

ELISA: Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática

g: Gramas

GPI : Glicosilfosfatidilinositol

IFN- γ : Interferon-gamma

Ig: Imunoglobulina

IgG: Imunoglobulina de cadeia gamma

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IPTG: Isopropiltio- β -galactosídeo

LPS: Lipopolissacarídeo

M: Molar

MASP: Proteínas de superfície associadas à mucinas

mg: Miligramas

MHC: Principal complexo de histocompatibilidade

Min: Minutos

mM: Milimolar

ng: Nanogramas

nm: Nanômetros

NK: Natural killer

OD: Densidade óptica

ODN: Oligonucleotídeos imunoestimulatórios

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Salina tamponada com fosfato

PBST: Salina tamponada com fosfato e tween

pH: Potencial hidrogeniônico

RpL7a: Proteína ribossômica L7a

RPM: Rotações por minuto

SDS: Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio

Seg: Segundos

TcL7a: Proteína L7a de *Trypanosoma cruzi*

TcL7aDeltaRep: Região não repetitiva da proteína L7a de *T. cruzi*

TcL7aRep: Domínio repetitivo da proteína L7a de *T. cruzi*

Th1: Resposta auxiliadora do tipo 1

Th2: Resposta auxiliadora do tipo 2

TLR: Receptores do tipo Toll-like

TMB: Tetrametilbenzidina

µl: Microlitro

µm: Micrometros

xg: Gravidade

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	1
1.2 Diagnóstico e vacina contra a doença de Chagas	3
1.3 Resposta imunológica na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	4
1.4 Antígenos de <i>T. cruzi</i> contendo repetições de aminoácidos	6
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1 Animais	12
3.2 Parasitos.....	12
3.3 Sequências de DNA das proteínas TcL7a, TcL7aRep e TcL7aDeltaRep	12
3.4 Expressão em bactérias, purificação e extração do LPS das proteínas recombinantes	13
3.4.1 Expressão em bactéria e preparação dos extratos protéicos.....	13
3.4.2 Purificação, diálise, extração do LPS e quantificação das proteínas ...	14
3.5 Imunização com as três formas das proteínas recombinantes e desafio com <i>T. cruzi</i>	15
3.6 Avaliação das respostas humoral e celular após o desafio de animais previamente imunizados com as proteínas TcL7a e TcL7aRep	16
3.7 Imunização com TcL7aRep seguida de imunização com TcL7a completa....	16
3.8 Dosagem de anticorpos por ELISA.....	16
3.9 Cultura de esplenócitos.....	17
3.9.1 Dosagem de citocinas	18
3.10 Desafio e parasitemia	18

3.11 Análises estatísticas	18
4. Resultados	18
4.1 Expressão em bactérias e purificação proteínas recombinantes	18
4.2 Imunização com as três proteínas recombinantes e desafio com <i>T. cruzi</i>	23
4.2.1 Análise da resposta humoral	24
4.2.2 Análise da resposta celular	28
4.2.3 Desafio dos animais imunizados	30
4.3 Avaliação das respostas humoral e celular após o desafio de animais previamente imunizados as proteínas TcL7a e TcL7aRep	31
4.3.1 Resposta humoral após a imunização	32
4.3.2 Resposta celular após a imunização	33
4.3.3 Análise da parasitemia	35
4.3.4 Resposta humoral após o desafio	36
4.3.5 Resposta celular após o desafio	38
4.4 Imunização com TcL7aRep seguida de imunização com TcL7a completa	39
4.4.1 Análise da resposta humoral	40
4.4.2 Análise da resposta celular	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde que estima haver, ainda, no mundo de 7 a 8 milhões de pessoas infectadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo a América Latina considerada uma área endêmica (WHO 2013). O *T. cruzi* é transmitido, principalmente, durante o repasto sanguíneo de várias espécies de Triatomíneos dentre os quais *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* se destacam por fazerem parte do ciclo doméstico da doença (Coura e Dias 2009). Sabe-se que a transmissão pode ocorrer ainda durante a gestação, por transfusão de sangue, transplante de órgãos, ingestão de comidas e bebidas contaminadas com o inseto vetor ou com as fezes de triatomíneos contaminados (Clayton 2010; Pereira et al. 2009). Países considerados não endêmicos possuem em torno de 700.000 pessoas infectadas por este parasito, sendo este fato explicado pela transmissão de sangue e órgãos contaminados (Moncayo e Silveira 2009).

Durante o seu ciclo de vida o *T. cruzi* infecta dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado, apresentando variadas formas em cada um destes hospedeiros como mostrado na figura 1. Durante o repasto sanguíneo o triatomíneo infectado ao defecar e urinar sobre o hospedeiro vertebrado deposita sobre ele as formas tripomastigotas metacíclicas do protozoário que penetram pelo local da picada ao coçar a pele, ou pelas conjuntivas, ao esfregar os olhos. Após invadir diferentes tipos celulares, as formas tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária até se transformarem em tripomastigotas novamente as quais lisam as células e são liberadas na corrente sanguínea. As tripomastigotas presentes na corrente sanguínea infectam outras células dando continuidade ao ciclo celular, ou são ingeridas por triatomíneos durante o hematofagismo reiniciando o ciclo no hospedeiro invertebrado. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas ao atingirem o reto e são eliminadas pelas fezes e urina (Brener 1973).

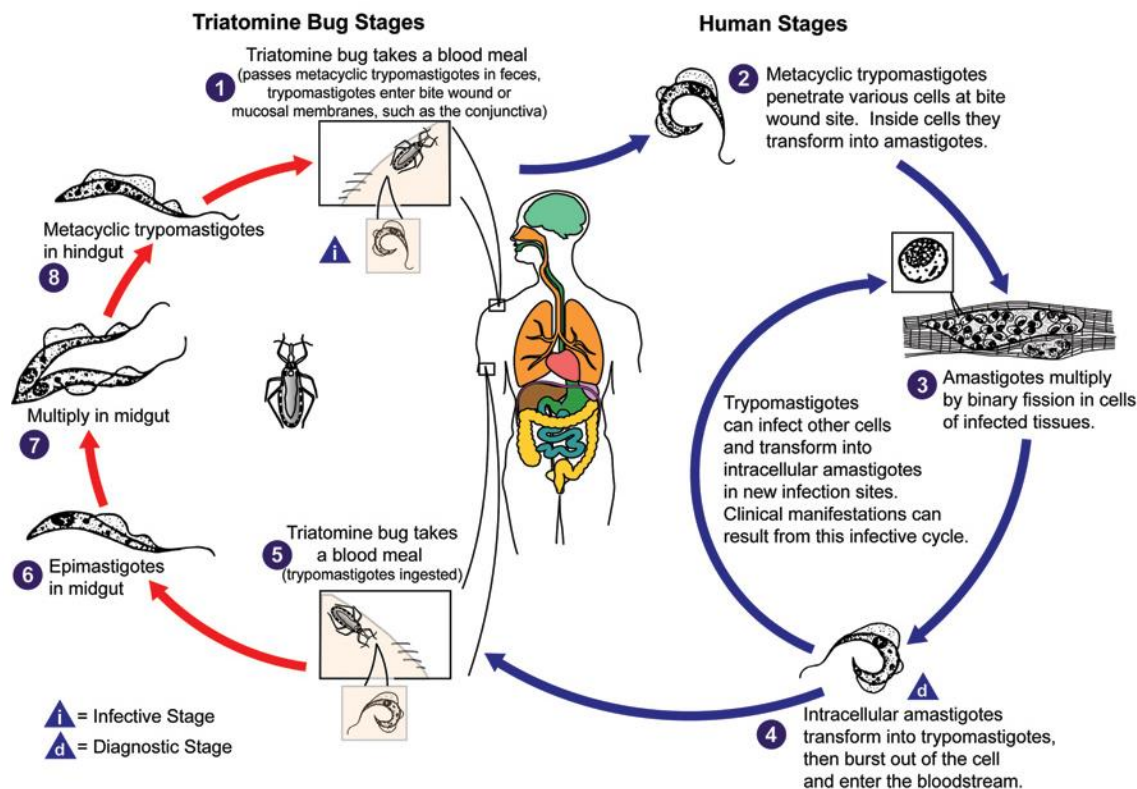


Figura 1: Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) Durante o repasto sanguíneo o triatomíneo deposita fezes contendo tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro que penetram pelo local da picada ou pelas conjuntivas; (2) As formas tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares e se transformam em amastigotas; (3) Amastigotas se multiplicam por divisão binária; (4) Formas amastigotas se transformam em tripomastigotas que vão para a corrente sanguínea; (5) Triatomíneo ingere as formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo; (6 e 7) No estômago se transformam em epimastigotas e se multiplicam por divisão binária; (8) Epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos (Clayton 2010).

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda tem início, aproximadamente, de 2 a 3 semanas após a infecção pelo *T. cruzi* e costuma ser assintomática, podendo haver porém febre, hepatoesplenomegalia e edemas. Esta fase é marcada pela elevada parasitemia e parasitismo tecidual além da forte ativação do sistema imune. Em casos de transmissão vetorial em que a porta de entrada do parasito no hospedeiro vertebrado ocorre pela conjuntiva geralmente é encontrado o sinal de Romanã, e quando ocorre pela pele é possível observar o chagoma de inoculação. Dois ou três meses após a infecção, o hospedeiro vertebrado entra na fase crônica da doença

que tem como característica baixos níveis de parasitemia e parasitismo tecidual. Em torno de 30% a 40% dos indivíduos infectados apresentam, nesta fase, alterações cardíacas ou gastrointestinais, enquanto que a maior parte dos indivíduos não apresentam sintomas clínicos. Os motivos pelos quais alguns hospedeiros desenvolvem a forma sintomática durante esta fase ainda não são conhecidos (Junqueira et al. 2010; Rassi e Marcondes de Rezende 2012), mas certamente fatores relacionados à variabilidade genética tanto do parasito quanto do hospedeiro devem ser considerados.

Atualmente apenas dois medicamentos são utilizados para tratar indivíduos com doença de Chagas, sendo eles o Nifurtimox e o Benzonidazol. Essas drogas possuem sérios efeitos colaterais e são eficazes apenas durante a fase aguda da doença (Tarleton et al. 2007; WHO 2013).

1.2 Diagnóstico e vacina contra a doença de Chagas

Durante a fase aguda o diagnóstico pode ser realizado através da pesquisa e visualização do parasito no sangue, com o auxílio de um microscópio, já que a parasitemia encontra-se alta. Métodos sorológicos como, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ensaios de ELISA, são utilizados no diagnóstico da fase crônica devido a presença de altos níveis de anticorpos contra o *T. cruzi* e a ausência de parasitos na corrente sanguínea (WHO 2013). Reações cruzadas com outros protozoários, principalmente com *Leishmania sp.* podem ocorrer nos exames sorológicos tornando necessário a busca de antígenos mais específicos, a fim de tornar o diagnóstico mais sensível e específico.

A vacinação profilática contra o *T. cruzi* ajudaria a reduzir ou, até mesmo, a eliminar completamente o parasito restringindo o desenvolvimento das formas sintomáticas durante a fase crônica da doença. Diversos antígenos como as proteínas recombinantes juntamente com adjuvantes, DNA plasmidiais e vírus recombinantes estão sendo testados em busca de uma vacina eficaz contra o parasito. Para uma proteção contra este parasito a vacina deve se basear em um antígeno que apresente alta imunogenicidade além de direcionar a resposta imunológica para o perfil Th1 bem como a produção de linfócitos TCD4+ e TCD8+ específicos (Rodrigues et al. 2012; Dumonteil 2009). Devido a ausência de uma

vacina eficaz contra o *T. cruzi*, medidas de profilaxia como o uso de inseticidas, melhores condições de moradia, higiene mais rigorosa no preparo de alimentos e realização de exames diagnósticos durante as transfusões de sangue e os transplantes precisam ser reforçadas (WHO 2013).

1.3 Resposta imunológica na infecção pelo *T. cruzi*

Tendo início a infecção pelo *T. cruzi*, a imunidade inata atua reconhecendo moléculas dos parasitos por meio dos receptores do tipo Toll (TLR), que resulta no recrutamento de fagócitos para o tecido infectado com o objetivo de controlar e até mesmo eliminar o parasito. Receptores do tipo TLR são capazes de reconhecer e responder à padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou seja, à moléculas específicas desses microorganismos. No caso do *T. cruzi* esses PAMPs são, principalmente, âncoras GPI presentes nas mucinas (reconhecidas por receptores heterodiméricos TLR2/TLR6), GPI livres contendo ceramidas em sua composição (reconhecidas por TLR4) e oligonucleotídeos imunoestimulatórios (ODN) contendo CpG de DNA não metilado (reconhecidos pelo receptor TLR9) (Bafica et al. 2006; Hemmi et al. 2000). Participam da imunidade inata os macrófagos e as células dendríticas que reconhecem esses componentes do parasito (Junqueira et al. 2010). No pico da parasitemia há ativação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ que reduzem a parasitemia conduzindo a doença para a fase crônica (Rodrigues et al. 2009).

A resposta imune durante a fase aguda da doença é direcionada pelo reconhecimento do parasito por células dendríticas e pelos macrófagos que produzem a interleucina 12 (IL-12) que por sua vez estimula a liberação de interferon-gama (IFN- γ) por células “natural killer” (NK). Essas células irão produzir mais IFN- γ , ativando macrófagos que produzem intermediários reativos de nitrogênio que tentam destruir o parasito presente no interior dessas células. A ligação entre a imunidade inata e a adquirida ocorre por meio das células dendríticas produtoras de IL-12 que atuam na diferenciação das células Th1CD4+, TCD8+ e das células B. As células TCD8+ possuem uma atividade citotóxica capaz de lisar células contendo formas intracelulares, enquanto que os anticorpos produzidos pelas células B são direcionados para a lise dos parasitos extracelulares (Figura 2) (Junqueira et al.

2010; Machado et al. 2012). A resposta por células B, TCD4+ e TCD8+ ocorre durante a fase crônica da doença, sendo as células TCD8+ as principais responsáveis pela eliminação do parasito. O escape do parasito ocorre quando estas células não são capazes de reconhecer antígenos do parasito por meio do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe 1 (Rodrigues et al. 2009).

Durante a fase crônica da doença de Chagas a presença de uma resposta inflamatória exacerbada, gerada por linfócitos TCD4+ e TCD8+ e pelos macrófagos, assim como a presença das citocinas IFN- γ , IL-4 e TNF- α podem causar alterações cardíacas que podem ser responsáveis pelo aparecimento de sintomas em alguns pacientes que se encontram nesta fase (Machado et al. 2012).

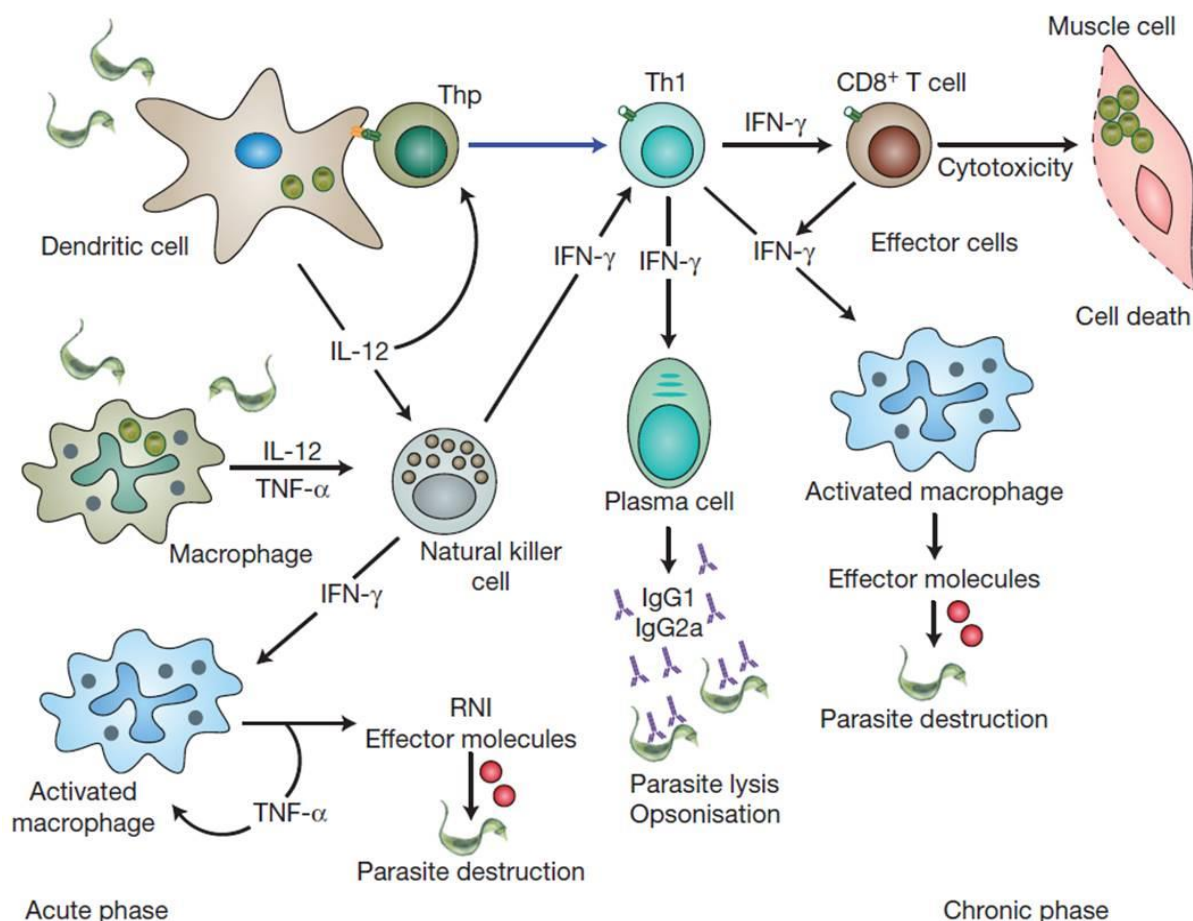


Figura 2: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*. Citocinas e células envolvidas na resposta imune ao protozoário *Trypanosoma cruzi* durante as fases aguda e crônica (Junqueira et al. 2010).

1.4 Antígenos de *T. cruzi* contendo repetições de aminoácidos

Sequências codificadoras de proteínas contendo repetições de aminoácidos estão presentes no genoma de todos os organismos, sendo mais frequentes nos eucariotos (Kalita et al. 2006). Quando comparadas as proporções de repetições no proteoma de parasitos extracelulares, intracelulares e protozoários de vida livre observa-se uma maior proporção destas repetições nos parasitos intracelulares. Isso indica que essas repetições possam influenciar na invasão do parasito na célula hospedeira, ajudando na sobrevivência e na evasão do parasito ao sistema imune (Mendes et al. 2013). O genoma do *T. cruzi* é composto por mais de 50% de repetições (El-Sayed et al. 2005; Arner et al. 2007), destacando três grandes famílias de genes que codificam proteínas contendo motivos repetitivos, sendo elas: as trans-sialidase, as mucinas e as proteínas de superfície associadas à mucinas (MASP) (El-Sayed et al. 2005). A quantidade de repetições é variável nas diversas cepas de *T. cruzi*, que estão divididas em 6 grupos (Cerqueira et al. 2008; Pais et al. 2008). Estudos com a trans-sialidase mostram que cepas pertencentes ao grupo 2 apresentam maior virulência quando comparadas as cepas do grupo 1, fortalecendo a hipótese de que há uma relação entre as repetições e o estabelecimento dos parasitos no hospedeiro (Risso et al. 2004). Anticorpos voltados contra as regiões repetitivas são encontrados em soros de pacientes com doença de Chagas sendo os motivos repetitivos potentes antígenos alvos da resposta humoral nesses pacientes (Goto et al. 2008).

A partir de uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas do *T. cruzi*, o nosso grupo iniciou a busca por antígenos que pudessem ser utilizados para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico mais específicos para a doença de Chagas. Esta biblioteca foi incubada com soros de pacientes com doença de Chagas e com soros de indivíduos não infectados. Como pode ser observado na figura 3, uma grande parte dos clones positivos codificam proteínas flagelares, ribossômicas, de choque térmico, entre outras, sendo as proteínas ribossômicas as mais frequentemente detectadas, correspondendo a mais de 50% dos clones que reagiram com o soro de pacientes chagásicos. Nesse experimento verificou-se também que a maior parte destas proteínas possui repetições de aminoácidos na sua cadeia peptídica (DaRocha et al. 2002).

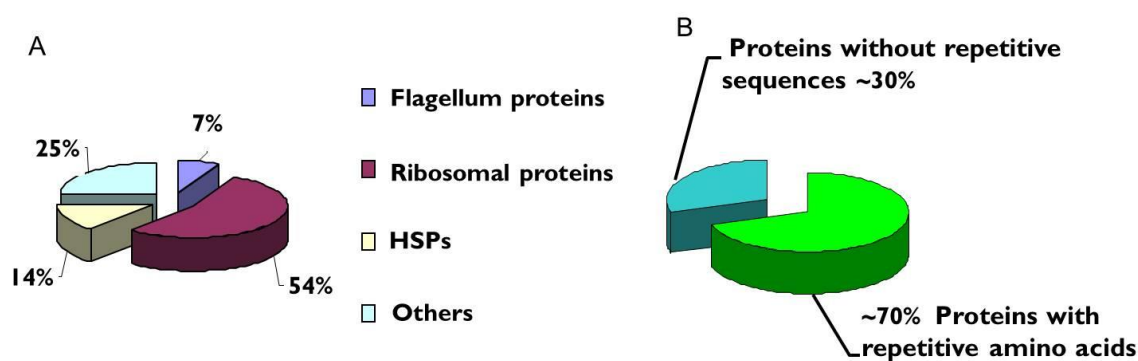


Figura 3: Seleção de clones de uma biblioteca de cDNA após incubação com soro de pacientes chagásicos. 50 clones que reagiram foram caracterizados, determinando parcialmente sua sequência: (A) 54% destes clones pertencem a proteínas ribossômicas e (B) 70% são compostos de repetições de aminoácidos (DaRocha et al. 2002).

Um clone positivo que codifica para uma proteína ribossômica e que contém repetições de aminoácidos foi identificado como a proteína L7a de *Trypanosoma cruzi* (TcL7a). Esta proteína apresenta alta similaridade com a proteína ribossômica L7a (Ribosomal protein L7a) presente na subunidade 60S dos ribossomos de eucariotos. Entretanto, como mostrado na figura 4, somente a proteína TcL7a de *T. cruzi* apresenta em sua extremidade N-terminal uma sequência repetitiva rica nos aminoácidos alanina, prolina e lisina (DaRocha et al. 2002). A quantidade de repetições presentes na proteína TcL7a varia nas diversas cepas de *T. cruzi*, (Pais et al. 2008), sendo que as cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* II, as quais apresentam um grau de virulência maior em infecções experimentais (Risso et al. 2004), possuem um número maior de repetições quando comparada às cepas classificadas como *T. cruzi* I. Estudos posteriores mostraram que soro de pacientes chagásicos reconhecem a proteína na sua forma completa e uma versão truncada da proteína contendo somente o domínio repetitivo (Pais et al. 2008). Este mesmo trabalho mostrou, por meio de ensaios de ELISA, a especificidade desta proteína assim como do domínio repetitivo para anticorpos presentes no soro de pacientes com doença de Chagas (Figura 5). Esses resultados indicam que as repetições poderiam ser alvos do sistema imune do hospedeiro contra o parasito e que elas poderiam servir como antígenos para o diagnóstico sorológico dessa doença (Pais et al. 2008).

TcRpL7a	MFGKEVKK	AAKPAAKTAAKTAAPAAKSAAPAAKPAAKPAAKPAAKPAAKTAAKPAKKP	AVKPTVFPAAKAAAPYKKE-	79
G. gallus	MPFGKK-		AKGKKMAPAPAVVKKQEAEK	26
A. thaliana	MAPK		FGVVAARKKTAEK	18
T. brucei	MAGKEVKK		AVKPTK	AGVEYKKEE
TcRpL7a		AAISFFVARPKNFQIGHDPYARDLSRFMRWPTFVTMQRKKRVLQRRLLKVPALHOFKTVLDRSSRNELL		149
G. gallus		VVNPLFEKRPKNFGIGODIOPKRDLTREVKWPYRIQLQRORSILYKRLKVPAINQFSOALDRQATATOLL		96
A. thaliana		VSNPLFERRPKQFGIGGALBPKKDLSRYIKWPKSIRLQRQKRIKQRLKVPALNQTFTLDRKNLATSIF		88
T. brucei		VTQKKAKASAAAPSPFFVARPKDFGIGRDPYARDLSRFMRWPTFVTMQRKKRVLQRRLLKVPALNQTFTVLDRSSRNELL		
TcRpL7a		KLVKKYPSETRRRRORLFDVATEKKKNP-EAASKKAPLSVVTGLQEVTRTIEKKTARLVMIANNVDPIELVLMPTLCH		228
G. gallus		KLAKKVRPETKQEKQRLLARAEORAAGKGDTPK-RPPVLRAGVNTVTLVENKKAQLVVIADHDVPIELVVFLBALCR		175
A. thaliana		KVLLKVRPEDKAAKKERLVKKAQAAEG-KPSESKP-PIVVKYGLNHVTYLIBQNKALVVIADHDVPIELVVFLBALCR		166
T. brucei		KLVKKYAPETRKARRDRLTKVAPEKKKNEKGTVSTKAPLCVVSGLQEVTRTIEKKTARLVLIANNVDPIELVLMPTLCH		
TcRpL7a		ANKVPYAIVKDKARLGDVGRKTATCVAITDVAEAEAALEKNLIRSVNARFLARSDVIRRWGGGLQLSLRSRAELRKKRA		308
G. gallus		KMGVPPYCIIEKSKARLGRVHRKTCTCVAFTOVNPEKDALAKLVEAVKTNYNDRYDEIRRHGGNVLGPKSVARIAKLEK		255
A. thaliana		KMEVPPYCIIVKGRSLGAVVHQKTASCLCLTTVKNEDKLEFSKILEAIKANENDKYEEYRKKWGGGIMGSKSQAKTKAEE		246
T. brucei		ANKIPYAIVKDKARLGDVGRKTATCVAITDVAEAEAALEKN		
TcRpL7a	RNAGKDAAAVM*	319		
G. gallus	AKAKELATKLG*	266		
A. thaliana	VIAKE-PAQRMN*	257		

Figura 4: Alinhamento da proteína TcL7a com a proteína L7a de outros organismos. BLAST da sequência correspondente a proteína TcL7a foi alinhada a proteína L7a de outros organismos mostrando que apenas a TcL7a apresenta o motivo repetitivo, em destaque (DaRocha et al. 2002).

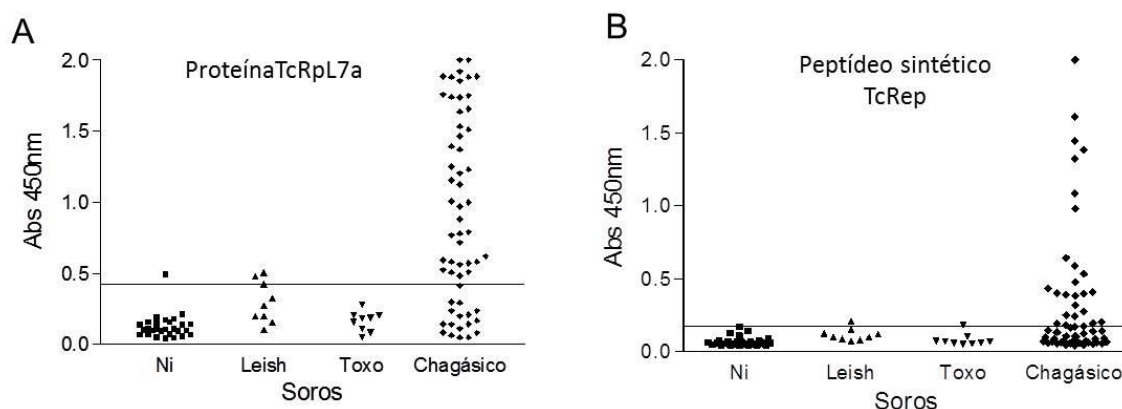


Figura 5: Especificidade da proteína TcL7a completa e do domínio repetitivo para pacientes com doença de Chagas. Ensaios de ELISA mostrando que (A) proteína TcL7a e (B) peptídeo sintético contendo a repetição são especificamente reconhecidas por soro de pacientes Chagásicos quando incubadas com soro de indivíduos não infectados, com Toxoplasmose, com Leishmaniose e com doença de Chagas (Pais et al. 2008)

Recentemente, o nosso grupo avaliou a proteção conferida pela imunização com a proteína TcL7a, na sua forma completa como também em uma versão truncada contendo apenas o domínio repetitivo (TcL7aRep), ambas fusionada com cauda de histidina. Após o desafio com formas tripomastigotas sanguíneas do clone CL Brener, foi observada proteção parcial nos animais imunizados com a proteína TcL7a completa e uma exacerbação da parasitemia quando a imunização foi realizada com a TcL7aRep quando comparados com o grupo controle (Gabriela de Assis Burle-Caldas 2012). Análises de predição de epítomos desta proteína

apontaram a presença de 2 epítomos lineares para linfócitos B (um na parte repetitiva e outro na parte não repetitiva) e de 4 epítomos com ligação ao MHC de classe II (um na região repetitiva, um entre as duas regiões e dois na região não repetitiva) não sendo predito nenhum epítomo para MHC de classe I (Figura 6, extraído de Gabriela de Assis Burle Caldas 2012).



Figura 6: Predição de epítomos para linfócitos B, MHC de classe I e MHC de classe II. Epítomos presentes na proteína TcL7a com destaque em vermelho para a região repetitiva. Em azul estão os epítomos lineares preditos para linfócitos B (os números embaixo das linhas correspondem a afinidade sendo maior quanto mais próximo de 2 for) e em verde para MHC de classe II (Gabriela de Assis Burle Caldas 2012)

Com base nesses dados, este trabalho teve o objetivo de continuar investigando o papel da proteína TcL7a, em especial da sua região rica em repetições de aminoácidos, visto que essa repetição parece ter influência sobre o sistema imunológico do hospedeiro. Uma vez que os experimentos de Gabriela de Assis Burle Caldas indicam que as repetições causam um descontrole da parasitemia, podendo estar de alguma forma facilitando o escape do parasito, nosso objetivo foi verificar se podemos reproduzir esses dados e, sendo esse o caso, tentar entender os mecanismos pelos quais a imunização com essa repetição de aminoácido resulta na exacerbação da infecção. Esses dados são de grande importância para os estudos voltados para a busca de antígenos imunoprotetores e que possam resultar no desenvolvimento de uma vacina. Para isso, nós produzimos as três formas da proteína recombinante fusionadas com histidina, sendo elas:

completa (TcL7a), contendo apenas o domínio repetitivo (TcL7aRep) e contendo a região não repetitiva (TcL7aDeltaRep). Essas proteínas recombinantes foram utilizadas em vários ensaios de imunizações de camundongos seguidos de diversas análises da resposta imunológica e do desafio com um clone virulento de *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do domínio repetitivo presente na proteína TcL7a na infecção pelo *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

1 – Expressar e purificar as proteínas recombinantes na sua forma completa (TcL7a), contendo apenas o domínio repetitivo (TcL7aRep) e contendo a região não repetitiva (TcL7aDeltaRep).

2 – Avaliar as respostas humoral e celular conferidas pela imunização com as três formas das proteínas recombinantes.

3 – Avaliar a proteção conferida pela imunização com as três formas das proteínas após o desafio com cepa virulenta (CL Brener) de *T. cruzi*.

4 – Avaliar se a imunização com o domínio repetitivo influencia na resposta dos animais imunizados posteriormente com a proteína completa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O uso dos animais foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA). Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO).

3.2 Parasitos

Foi utilizada a cepa CLBrener do *T. cruzi*. As formas tripomastigotas sanguíneas foram mantidas por passagem em camundongos BALB/c em intervalos de 15 dias.

3.3 Sequências de DNA das proteínas TcL7a, TcL7aRep e TcL7aDeltaRep

DNA correspondente a sequência das três proteínas foram amplificadas e clonadas no vetor de expressão pET21a pelo doutor Fabiano Sviatopolk-Mirsk Pais (Pais 2008), da seguinte maneira: iniciadores (Oligo 4.0) contendo sítio de restrição artificial na extremidade, de acordo com a sequência do gene TcL7a (número de acesso no Genbank: AF316150), foram utilizados para clonagem do inserto TcL7a e das regiões N-terminal (TcL7aRep) e C-terminal (TcL7aDeltaRep) no plasmídeo pET21a (Novagen). Para amplificar a sequência referente a TcL7a foram utilizados os iniciadores 5'-CCGCTAGCCCCGGCAAGGAAGTGAAA-3' (NheI) e 5'-ATGTCGACCATTACGGCGGCAGCATC-3' (Sal I), que corresponde a um produto de 960 pares de bases. A região N-terminal foi amplificada usando os iniciadores 5'-CCGCTAGCCCCGGCAAGGAAGTGAAA-3' (NheI) e 5'-GGCTCGAGCACAAAAGGTGAGATGGC-3' (XhoI), gerando um produto de 280 pares de bases. Para amplificação da região C-terminal foram utilizados os iniciadores 5'-GGGCTAGCATCTCACCTTTTGTGGCGC-3' (NheI) e 5'-ATGTCGACCATTACGGCGGCAGCATC-3' (Sal I), que gerou um produto de 720 pares de bases (Figura 7). A temperatura de anelamento dos iniciadores para todas as três sequências foi de 65°C. Após a amplificação os produtos foram digeridos com duas enzimas de restrição específicas para cada iniciador e ligados ao vetor

pET21a previamente digerido com enzimas compatíveis utilizando DNAligase (Pais et al. 2008).

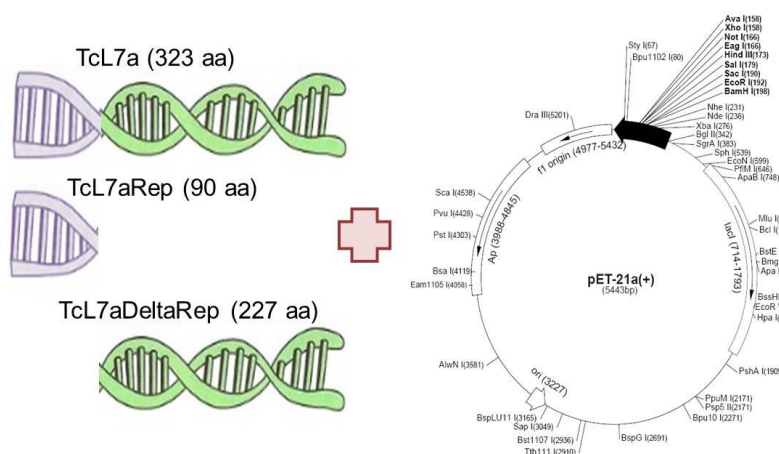


Figura 7: Desenho esquemático da construção das três proteínas recombinantes. Sequências de DNA correspondente às proteínas TcL7a, TcL7aRep e TcL7aDeltaRep, após serem amplificadas, foram clonadas no vetor pET21 para adição da cauda de hsitidina.

3.4 Expressão em bactérias, purificação e extração do LPS das proteínas recombinantes

3.4.1 Expressão em bactéria e preparação dos extratos protéicos

Aproximadamente 10ng dos vetores de expressão pET21a contendo as sequências referentes às proteínas TcL7a, TcL7aRep e TcL7aDeltaRep foram utilizados para transformar bactérias quimiocompetentes BL21 Star™(DE3). As células e os plasmídeos foram incubadas no gelo por 30 min e em seguida recebiam choque térmico a 42°C por 50 seg. Um minuto após o choque térmico foi adicionado 400µl de meio de cultura 2XYT (0,4g Tripitona; 0,25g Extrato de levedura; 0,125g NaCl) e incubado a 37°C por 1 hora sob agitação (37°C a 180 rpm - C25 Incubator). Foram plaqueados 100 µL do transformado em placas contendo meio de cultura 2XYT com 1,5% de ágar e antibiótico ampicilina (100 mg/mL) cobrindo toda a área disponível. As placas foram mantidas durante a noite em estufa a 37°C para crescimento das colônias de bactérias contendo o DNA de interesse.

Para o pré-inóculo várias colônias foram adicionadas em 25 mL de meio 2XYT com ampicilina, ficando sob agitação a 37° até atingir a densidade óptica (OD) de 0,4 unidades por análise espectrofotométrica a 600 nm. Para o inóculo, foi

realizado uma diluição do pré-inóculo na proporção de 1:20 no total de 500 mL de meio 2XYT com ampicilina e incubados sob agitação até a OD de 0,6 a 600 nm. Uma alíquota de 1 mL (não induzido) foi coletado para posterior análise da indução e no restante do crescido foi adicionado 1mM de IPTG, que então foi deixado sob agitação durante 3 horas para indução das proteínas recombinantes. Após 3 horas foi coletada uma alíquota de 1 mL (induzido) para análise da indução. As alíquotas e o restante do meio foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* referente a 500 mL de cultura foi armazenado a -80°C. Para confirmação da indução das proteínas, o *pellet* das alíquotas foram ressuspensos em 60µl de água e 20µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,00125%), fervidos por 5 min e separadas por eletroforese em SDS-PAGE.

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

3.4.2 Purificação, diálise, extração do LPS e quantificação das proteínas

As três formas das proteínas foram purificadas em coluna de níquel (His Trap GE HealthCare), utilizando o programa *Histidine-tagged protein purification, step elution* do cromatógrafo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). A eluição das proteínas foi realizada com solução contendo 20 mM de fosfato de sódio, 500 mM NaCl e 500 mM de imidazol, pH 7,4. As purificações foram analisadas em SDS-PAGE em diferentes concentrações, sendo as proteínas TcL7a e TcL7aDeltaRep analisadas em SDS-PAGE 12,5% e a proteína TcL7aRep em 14%. As frações consideradas puras foram unidas, dialisadas em cassetes de diálise (Slide-ALyser/Thermo Scientific) e concentradas no neofilizador.

As três proteínas recombinantes foram submetidas ao processo de extração de LPS com Triton X-114. Para isso, foi adicionado Triton X-114 10% (Sigma) em concentração final de 1% às proteínas e em seguida os tubos foram incubados em gelo por 30 min, vortexando-os a cada 10 min. Os tubos foram aquecidos por 5 min a 37°C e centrifugados a 13.000xg por 5 min a temperatura ambiente para separação das fases. A fase aquosa, correspondente a proteína, foi removida, transferida para um novo tubo e o processo foi repetido por 6 vezes. A proteína TcL7aDeltaRep precipitou durante a extração do LPS, sendo removida as duas fases após cada centrifugação, e o *pellet*, correspondente a proteína, foi lavado 6 vezes com PBS preparado com água de injeção. Testes utilizando o kit LAL-Gel-Clot (Charles River Endosafe) foram realizados com todas as proteínas, para detectar a presença de LPS, de acordo com as instruções do fabricante.

As proteínas foram quantificadas por gel SDS-PAGE com o auxílio de concentrações conhecidas de BSA.

3.5 Imunização com as três formas das proteínas recombinantes e desafio com *T. cruzi*.

Camundungos fêmeas com 4 a 6 semanas de vida, da linhagem BALB/c, foram divididos em 4 grupos, onde o grupo I foi o controle e os grupos II, III e IV foram imunizados com 10µg das proteínas recombinantes TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep respectivamente. Todos os grupos receberam 18µg de CpG B344 (Alpha DNA) e 30% v/v de alúmem. Os animais receberam 3 imunizações subcutâneas, volume total de 100µl, em intervalo de 14 dias, sendo que nove dias após cada

imunização foi realizado coleta de sangue para dosagem de anticorpos. Vinte e um dias após a última imunização, parte dos animais foram sacrificados para retirada do baço e o restante foi desafiado com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL Brener do *T. cruzi* sendo a parasitemia acompanhada durante 35 dias. O sangue coletado foi centrifugado a 5.000 rpm durante 10 min e em seguida o soro foi coletado.

3.6 Avaliação das respostas humoral e celular após o desafio de animais previamente imunizados com as proteínas TcL7a e TcL7aRep

Camundongos BALB/c fêmeas receberam duas imunizações com 10µg das proteínas TcL7a e TcL7aRep juntamente com CpG e alumínio. O protocolo foi realizado da mesma maneira como descrito no item 3.5. Coletas de sangue foram realizadas 15, 22 e 29 dias após a imunização para avaliar a resposta humoral, pela dosagem de anticorpos, e a resposta celular, pela dosagem das citocinas IFN-γ e IL-10.

3.7 Imunização com TcL7aRep seguida de imunização com TcL7a completa

Fêmeas BALB/c foram separadas em cinco grupos e imunizadas com 3 doses, contendo 10µg das proteínas TcL7a e TcL7aRep, 18µg de CpG e 30% v/v de alumínio. As imunizações se deram em intervalos de 14 dias sendo coletado sangue nove dias após cada imunização. Vinte e um dias após a última imunização todos os animais foram sacrificados para retirada do baço.

3.8 Dosagem de anticorpos por ELISA

Os antígenos TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep foram adsorvidos durante 18 horas a 4°C em placas de 96 poços (Nunc). Para isso eles foram diluídos em tampão carbonato 0,1M (NaHCO₃ e Na₂CO₃; pH 9.6) na concentração final de 10µg/mL.

O conteúdo foi retirado e a placa foi lavada uma vez com PBST (PBS 1X + 0,05% Tween 20) e uma vez com PBS 1X, secada e bloqueada com tampão de

bloqueio (PBS 1X acrescido de 3% de leite em pó desnatado) durante 2 horas a 37°C. Após o tempo de bloqueio, o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada novamente uma vez com PBST e uma vez com PBS 1X. As amostras de soro foram diluídas 1:50 no tampão de bloqueio, aplicadas nos poços e incubadas por 1 hora a 37°C. O conteúdo foi retirado e a placa foi lavada três vezes com PBST e três vezes com PBS 1X e após seca foi aplicado os anticorpos IgG1, IgG2a e IgG total diluídos 1:2000 em tampão de bloqueio. A placa foi mantida a 37°C por uma hora. Após este tempo a placa foi lavada cinco vezes com PBST e cinco vezes com PBS 1X e logo em seguida foi revelada com 30ul de H₂O₂ e 100µg de TMB diluídos em 10 mL de tampão citrato 0,1M (Na₃C₆H₅O₇ e NaH₂PO₄; pH 5.0) a temperatura ambiente e protegidos da luz, até o aparecimento da cor azul. Solução de H₂SO₄ diluída 1:20 foi usada para parar a solução. A absorvância foi quantificada em leitor de ELISA (Spectra Max 340) a 450nm.

3.9 Cultura de esplenócitos

Baços de animais imunizados foram coletados em placas de 24 wells com 3 mL de meio de cultura completo (RPMI com 5% de SFB). Os baços foram transferidos para filtro 100µm (Cell Strainer BD Falcon) e macerados com 3mL de meio completo com auxílio do êmbolo da seringa. Os macerados foram recolhidos em falcon de 50 mL e centrifugados a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C. Após descartar o sobrenadante, bateu-se nos tubos para em seguida acrescentar 3 mL de tampão de lise de eritrócitos (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 0,1M e Na₂EDTA 0,1M), que ficaram incubados em gelo durante 5 minutos. Foi adicionado 3 mL de meio completo para neutralizar a reação, e os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de esplenócitos foi ressuspensionado em 3 mL de meio RPMI com 10% de SFB e as cracas foram removidas. Foram preparadas diluições de 1:100 dos esplenócitos em azul de tripam e as células foram contadas em câmaras de Neubauer. A densidade dos esplenócitos foi ajustada para 10⁷ células/mL com meio RPMI contendo 10% de SFB e transferidas para as placas junto com os estímulos na concentração de 20µg/mL. As placas contendo as culturas de esplenócitos foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Após este período as placas foram centrifugadas a 2.000

rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante da cultura de esplenócitos foi transferido para novas placas.

3.9.1 Dosagem de citocinas

As citonas IFN- γ e IL-10 foram dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos usando kits R&D Systems de acordo com as instruções do fabricante.

A dosagem destas citocinas, com estes kits, também foram realizadas no soro de animais imunizados e desafiados.

3.10 Desafio e parasitemia

Os animais foram desafiados intraperitonealmente com 5.000 formas tripomastigostas sanguíneas da cepa CL-Brener no volume total de 200 μ l. Sete ou oito dias após o desafio a parasitemia começou a ser acompanhada, retirando 5 μ l de sangue da cauda e contando o número de parasitos presentes em 50 campos. Cálculos foram realizados para obter a quantidade de parasitos presentes em 1mL de sangue. A parasitemia foi acompanhada por 35 dias após o desafio.

3.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo método Two Way ANOVA e pelo teste de Turkey utilizando o método One Way ANOVA no programa Prisma 5.0. Como pós teste foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão em bactérias e purificação proteínas recombinantes

Como descrito na sessão de materiais e métodos as clonagens das seqüências de DNA das proteínas foram realizadas pelo doutor Fabiano Pais. Alíquotas de culturas de bactérias coletadas antes e após a indução com IPTG das proteínas recombinantes, foram analisadas em SDS-PAGE. Na figura 8 é possível observar as bandas correspondentes à indução das proteínas TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep, após a separação em eletroforese em SDS-PAGE corado com Azul de Comassie.

Testes de solubilidade haviam mostrado que somente a TcL7aRep foi obtida na forma solúvel na bactéria. A proteína TcL7a completa apesar de apresentar uma solubilidade parcial nos extratos bacterianos preparados com tampão PBS, teve sua solubilidade aumentada com a adição de 4M de uréia. A proteína TcL7aDeltaRep mostrou-se totalmente insolúvel quando os extratos protéicos foram preparados com tampão PBS sendo necessária a adição de 8M de úreia para solubilizar esta proteína (dados não mostrados).

Para a purificação das proteínas, 500 mL de cultura de bactérias expressando cada uma das três proteínas foram centrifugados, as bactérias foram lisadas e o extrato protéico contendo TcL7aRep na fração solúvel foi utilizado para purificação por cromatografia. À fração insolúvel dos extratos protéicos referentes as proteínas TcL7a completa e TcRpL7aDeltaRep foram adicionados 4M ou 8M de uréia, respectivamente, a fim de obter essas proteínas em frações solúveis para serem utilizadas nas cromatografias (Figura 9).

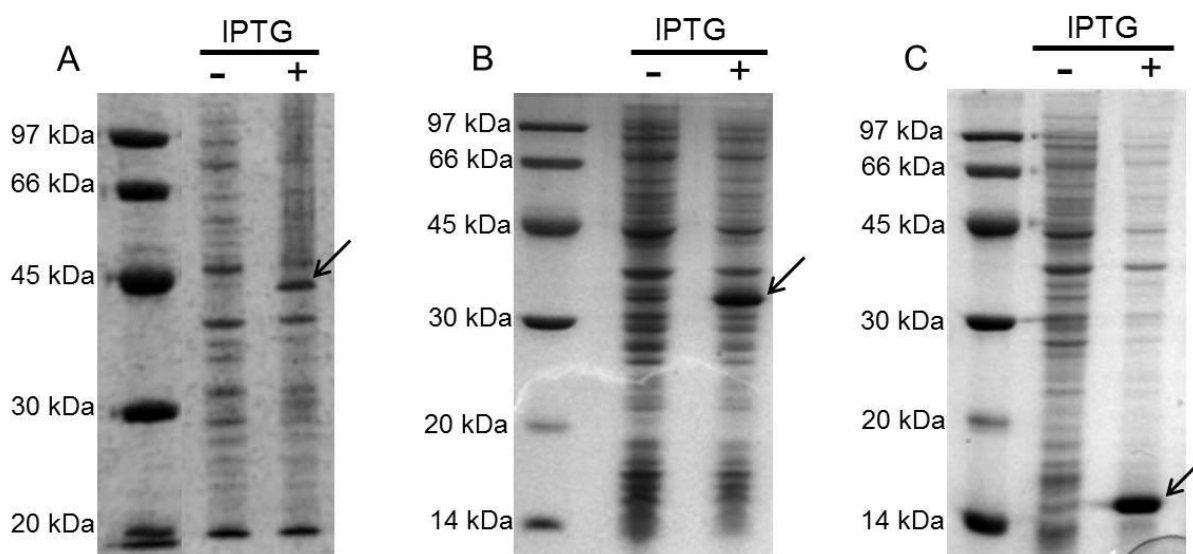


Figura 8: Indução das proteínas TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep em *E. coli*. Gel de poliácridamida corado com Azul de Comassie, contendo extratos protéicos de culturas de bactérias antes (-) e após (+) a indução com 1mM de IPTG por 3 horas. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes sendo: (A) TcL7a com peso teórico de 35kDa em SDS-PAGE 12,5%; (B) TcL7aDeltaRep com peso teórico de 27kDa em SDS-PAGE 12,5%; (C) TcL7aRep com peso teórico de 10kDa em SDS-PAGE 14%.

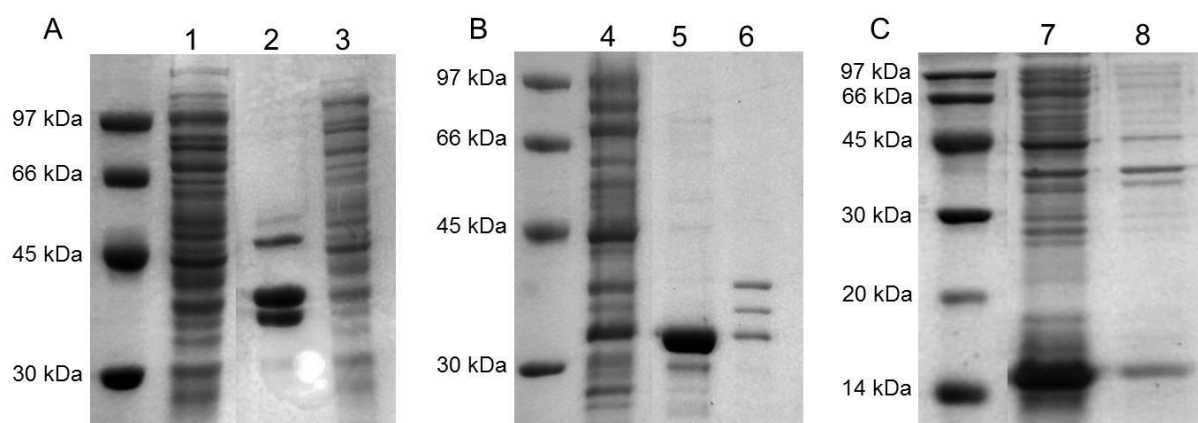


Figura 9: Lise da cultura de bactéria. Gel de poliácridamida corado com Azul de Comassie, mostrando o extrato total de proteínas e as proteínas recombinantes (A) TcL7a em SDS-PAGE 12,5%, (B) TcL7a DeltaRep em SDS-PAGE 12,5% e (C) TcRPL7aRep em SDS-PAGE 14%. Nas canaletas (1) foram aplicadas as proteínas solubilizadas após a lise em PBS, (2) solubilizadas em 4M de uréia e (3) insolúvel após a adição de 4M de uréia; (4) solubilizada em PBS, (5) solubilizada em 8M de uréia e (6) insolúvel após adição de 8M de uréia; (7) solubilizada em tampão de ligação HisTrap e (8) insolúvel após a adição de tampão de ligação HisTrap.

Frações contendo as proteínas foram purificadas no cromatógrafo ÄKTA Prime Plus com colunas de níquel. A eluição das proteínas de interesse foi feita pela adição de concentrações crescentes de imidazol (Figura 10). Quando analisada a pureza das amostras referentes as frações eluídas, em SDS-PAGE, verificou-se que todas as três formas das proteínas recombinantes foram eluídas com alto grau de pureza, como pode ser observado na figura 11. Somente para proteína TcL7aDeltaRep observamos um padrão indicativo de degradação.

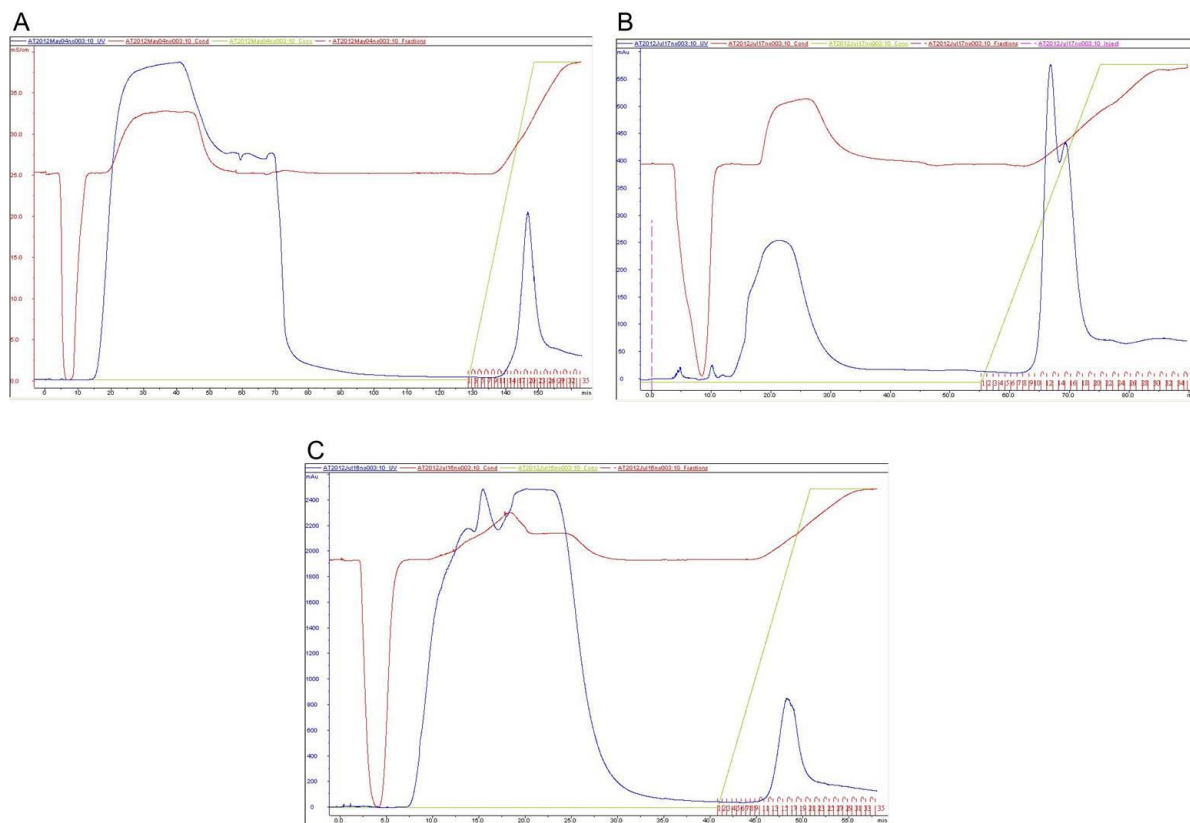


Figura 10: Gráfico da eluição das proteínas. Gráfico gerado pelo programa *Histidine-tagged protein purification* do cromatógrafo ÄKTA Prime Plus com absorvância a 280 nm no eixo Y e o tempo no eixo X. A linha azul representa a absorvância da proteína na coluna, a vermelha mostra a condutância e a verde as concentrações crescentes de imidazol: (A) TcL7a; (B) TcL7aDeltaRep; (C) TcL7aRep.

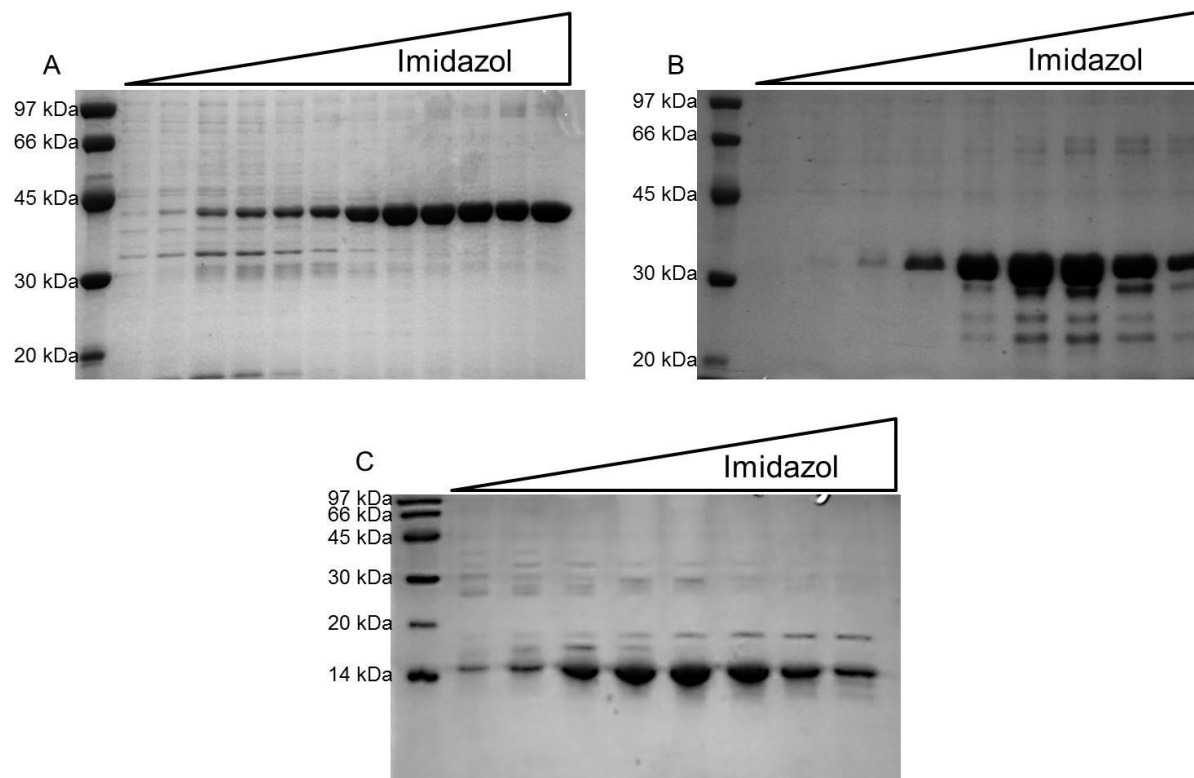


Figura 11: Purificação das proteínas recombinantes. SDS-PAGE com frações da purificação que foram eluídas com aumento gradativo de imidazol: (A) TcL7a; (B) TcL7aDeltaRep; (C) TcL7aRep.

As frações consideradas puras foram reunidas e dialisadas. Como mostrado na figura 15 não houve grande perda das proteínas TcL7a e TcL7aDeltaRep durante este processo.

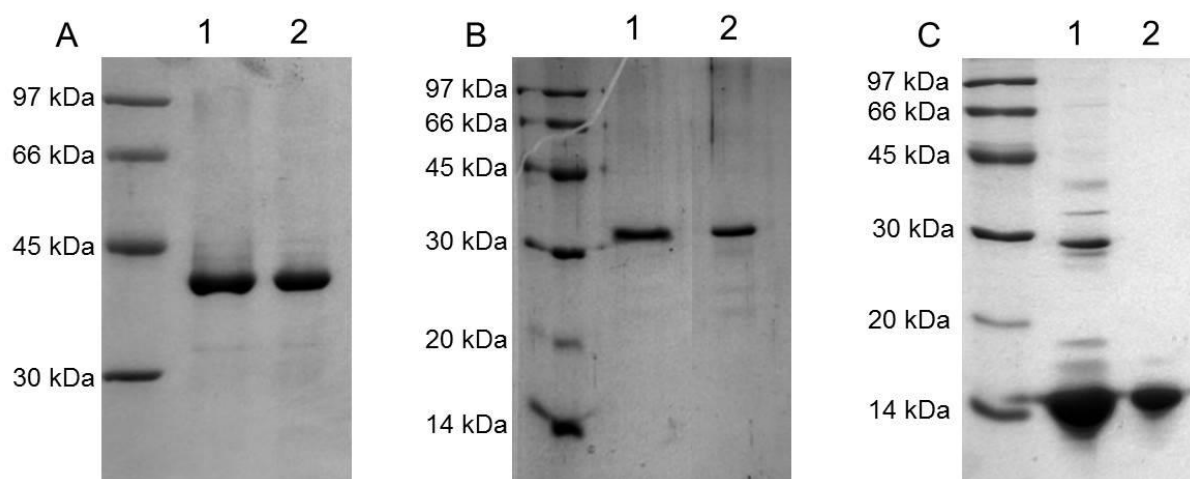


Figura 12: Análise das proteínas recombinantes antes e após a diálise. Aliquotas das proteínas recombinantes antes (1) e após o processo de diálise (2): (A) TcL7a; (B) TcL7aDeltaRep;

(C) TcL7aRep foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida que foi então corado com Azul de Comassie

Como mostrado na figura 13 foram obtidos, após a purificação e a extração de LPS, um total de 2,5 mg, 3,2 mg, 1 mg das proteínas TcL7a, TcL7aRep e TcL7aDeltaRep, respectivamente, a partir de 500 mL de culturas de bactérias.

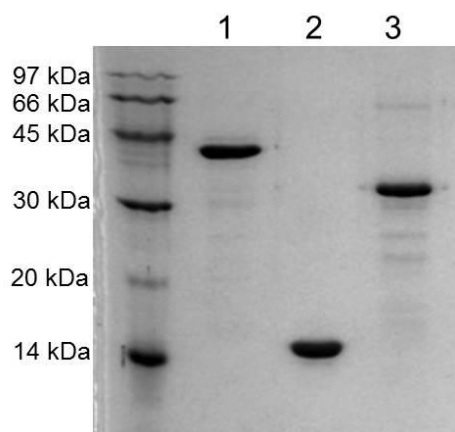


Figura 13: Proteínas recombinantes. Após a purificação e a extração de LPS as protepinas recombinantes (1) TcL7a, (2) TcL7aRep e (3) TcL7aDeltaRep foram obtidas de forma pura.

4.2 Imunização com as três proteínas recombinantes e desafio com *T. cruzi*.

Como demonstrado em materiais e métodos e representado na figura 14 camundongos foram imunizados seguindo o protocolo 1^a dose – reforço - reforço .

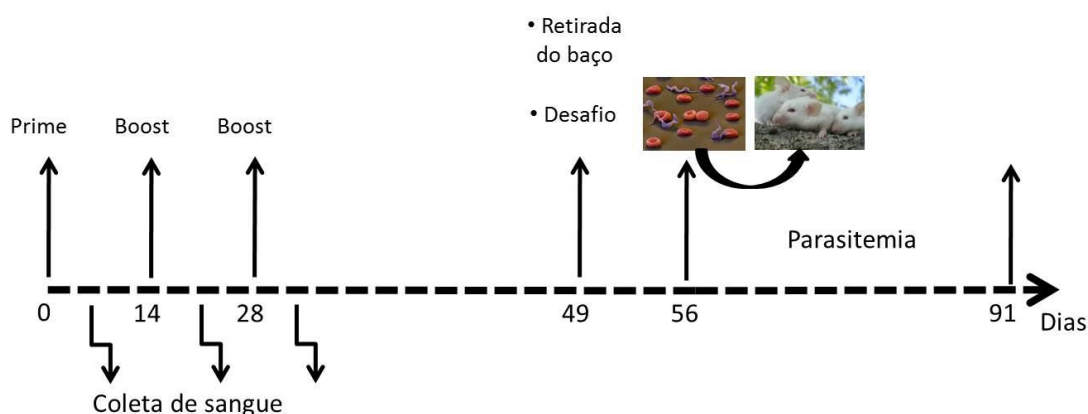


Figura 14: Representação esquemática do protocolo de imunização. Fêmeas BALB/c receberam uma dose e dois reforços. Coleta de sangue para dosagem de anticorpos foram realizadas

nove dias após cada imunização. Vinte e um dias após a última imunização foram retirados baços para a dosagem de citocinas e os animais foram desafiados com *T. cruzi*.

4.2.1 Análise da resposta humoral

Soros dos animais imunizados com as proteínas TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep foram utilizados em ensaios de ELISA para avaliação da resposta humoral através da dosagem de anticorpos IgG total e de duas sub-classes: IgG1 e IgG2a. Animais imunizados com a proteína recombinante TcL7a produziram altos níveis de anticorpos IgG1, IgG2a e IgG total logo após o 1º boost (Figura 15) contra esta proteína. Por outro lado, não foram observados níveis significativos de IgG total ou das duas subclasses de IgG contra estas proteínas nos animais imunizados com TcL7aDeltaRep e TcL7aRep como mostram as figuras 16 e 17.

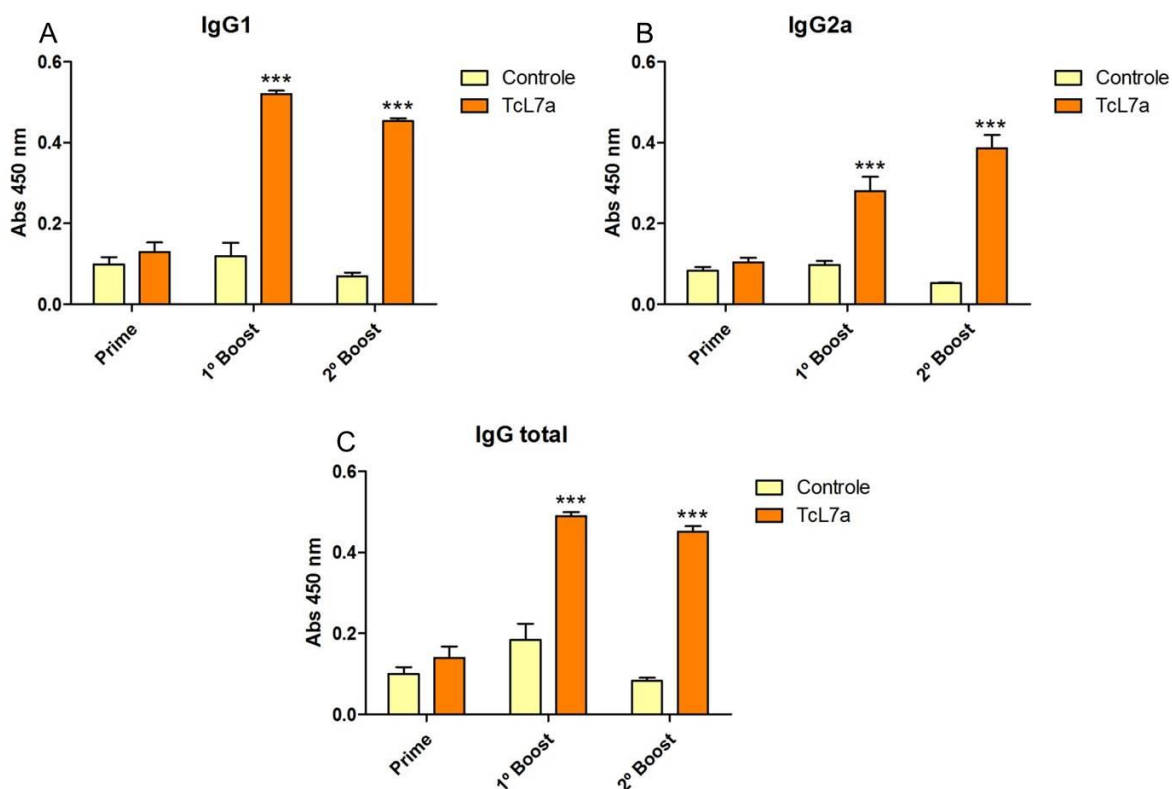


Figura 15: Produção de anticorpos após a imunização com a proteína TcL7a. Ensaios de ELISA mostrando os anticorpos produzidos por animais imunizados com a TcL7a contra esta proteína: (A) IgG1; (B) IgG2a; (C) IgG total. Como controle foram utilizados animais que receberam apenas Alúmen e CpG. Os asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle e os animais imunizados.

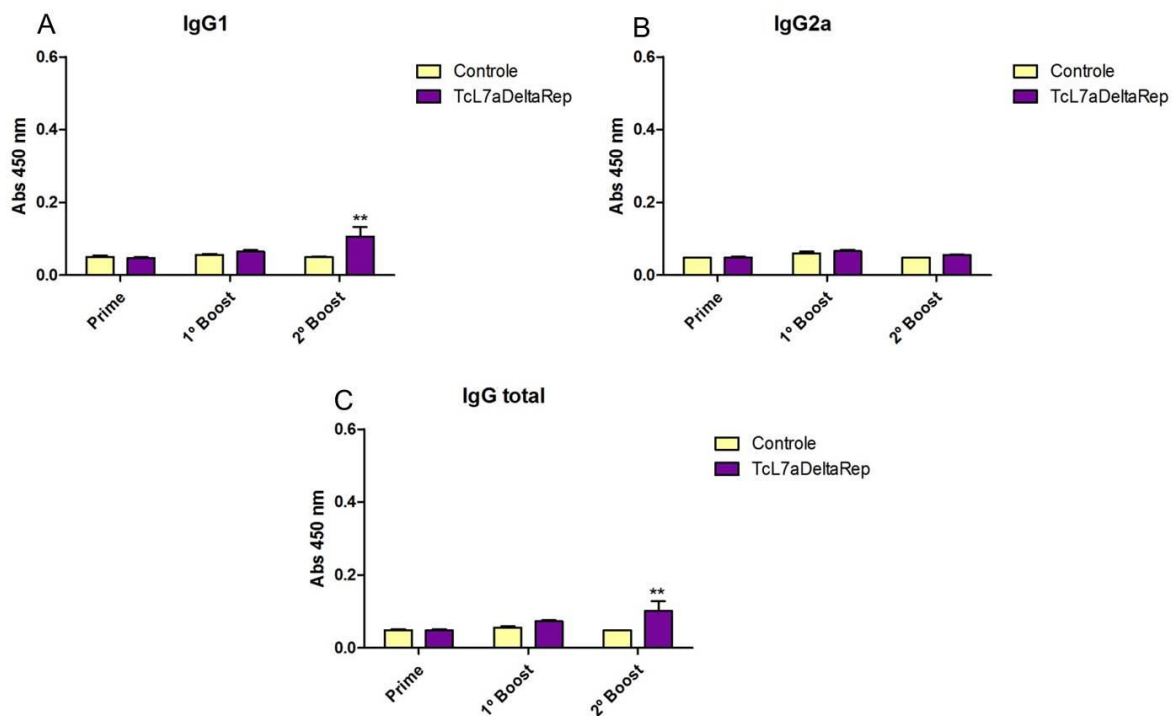


Figura 16: Produção de anticorpos após a imunização com a proteína TcL7aDeltaRep. Ensaios de ELISA mostrando os anticorpos produzidos por animais imunizados com a TcL7aDeltaRep contra esta proteína: (A) IgG1; (B) IgG2a; (C) IgG total. Como controle foram utilizados animais que receberam apenas Alúmen e CpG. Dois asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,01$, entre o grupo controle e os animais imunizados.

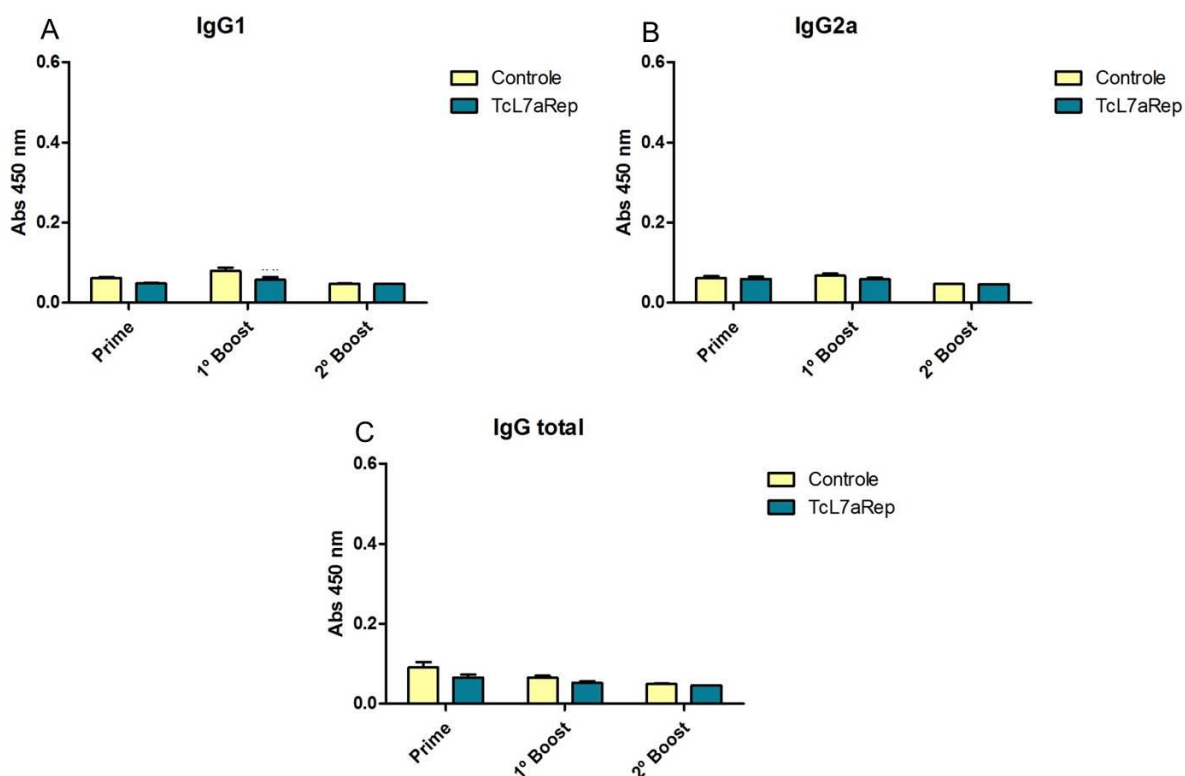


Figura 17: Produção de anticorpos após a imunização com a proteína TcL7aRep. Ensaio de ELISA mostrando os anticorpos produzidos por animais imunizados com a TcL7aRep contra esta proteína: (A) IgG1; (B) IgG2a; (C) IgG total. Como controle foram utilizados animais que receberam apenas Alúmen e CpG.

Soros de animais imunizados com a proteína TcL7a completa quando incubados com as proteínas TcL7aDeltaRep e TcL7aRep, foram capazes de reconhecer a região repetitiva da proteína como observado na figura 18. Esse reconhecimento é mais significativo quando anticorpos da sub-classe IgG1 foram avaliados. Por outro lado, um reconhecimento bem menos significativo foi observado quando soros de animais imunizados com a proteína completa foram incubados com a proteína contendo a deleção da porção repetitiva.

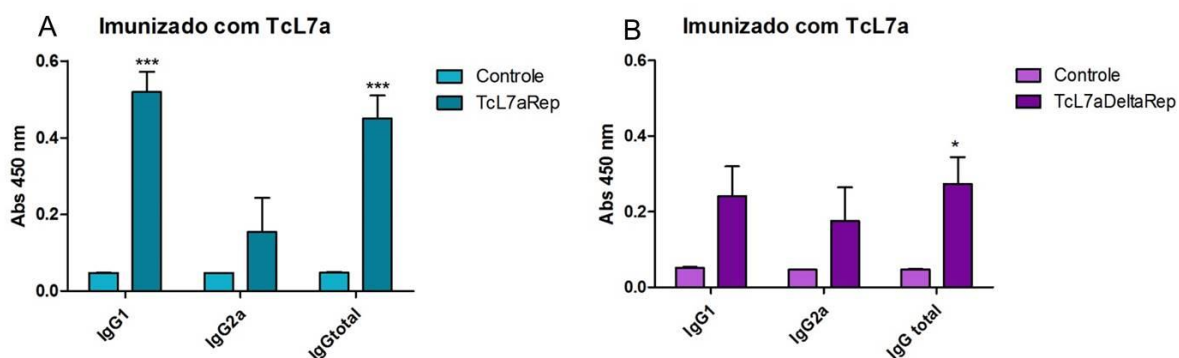


Figura 18: Imunização com a proteína TcL7a produz anticorpos contra o domínio repetitivo. Soro de animais imunizados com a proteína completa, após o 2º boost, foi incubado com (A) região repetitiva e (B) não repetitiva em ensaios de ELISA. Um asterisco indica diferença significativa com $p < 0,05$, dois asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,01$ e três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle e as imunizações.

Soros de animais imunizados com a proteína TcL7aDeltaRep e incubados com a proteína TcL7a contêm altos níveis de anticorpos IgG1, IgG2a e IgGtotal (Figura 19), reconhecendo a proteína completa TcL7a. Por outro lado quando soros de animais imunizados com a proteína TcL7aRep foram incubados com a proteína TcL7a não se observou a presença de níveis significativos de anticorpos de nenhuma das duas subclasses capazes de reconhecer a proteína completa, como mostrado na figura 20.

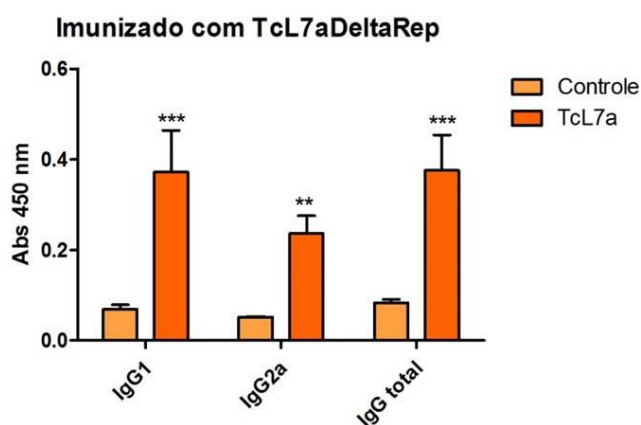


Figura 19: Imunização com a proteína TcL7aDeltaRep produz anticorpos contra a proteína TcL7a. Produção de anticorpos por animais imunizados com a TcL7aDeltaRep quando incubados com TcL7a em ensaios de ELISA. Dois asteriscos indicam diferença significativa com

$p < 0,01$ e três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle e o grupo imunizado com TcL7a.

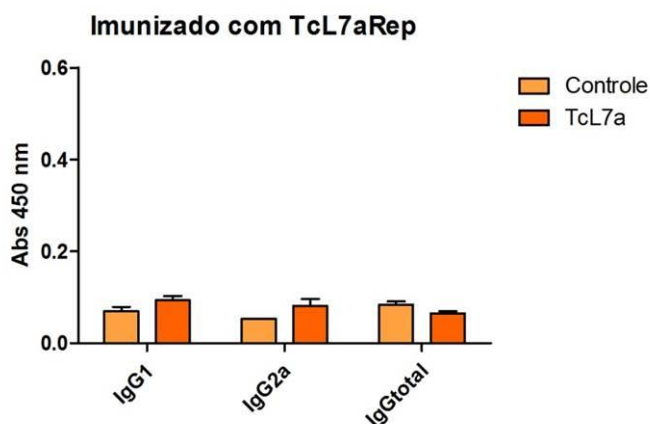


Figura 20: Imunização com o domínio repetitivo não produz anticorpos contra a proteína TcL7a. Ensaios de ELISA mostrando a produção de anticorpos por animais imunizados com a TcL7aRep quando incubados com TcL7a.

4.2.2 Análise da resposta celular

A partir do sobrenadante de culturas de esplenócitos obtidos dos animais imunizados, foi avaliada a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por esses animais após a reestimulação *in vitro* com as proteínas TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep. ConA foi utilizada como controle positivo e RPMI como controle negativo.

Animais imunizados com a proteína TcL7a produziram níveis significativos de IFN- γ quando reestimulados com esta mesma proteína ou com a proteína TcL7aDeltaRep (Figura 21). Nesta mesma figura observamos que a imunização com a proteína TcL7aDeltaRep resultou na produção de níveis similares desta citocina quando os esplenócitos foram reestimulados com a proteína TcL7a. Entretanto níveis menores de IFN- γ foram produzidos quando esplenócitos de animais imunizados com a proteína TcL7aRep foram reestimulados com a proteína TcL7a completa.

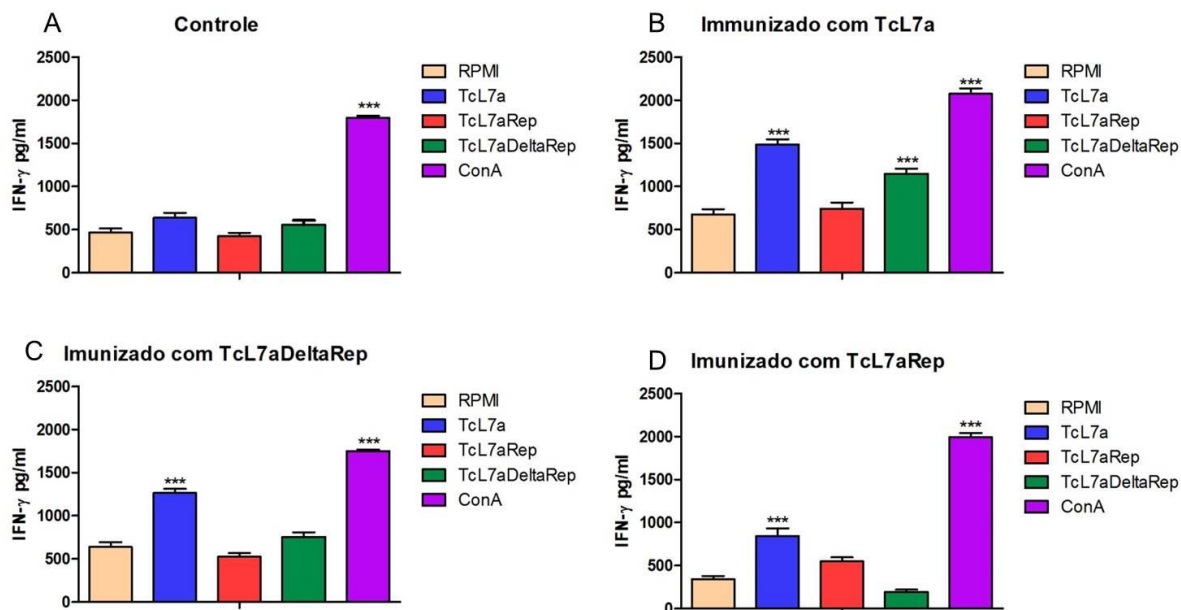


Figura 21: Produção de IFN- γ pelos animais imunizados. Através de ensaios de ELISA IFN- γ foi dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos 72 horas após a incubação dos esplenócitos com os estímulos. Animais imunizados com: (A) PBS; (B) TcL7a; (C) TcL7aDeltaRep; (D) TcL7aRep e reestimulados com RPMI, TcL7a, TcL7aDeltaRep, TcL7aRep e ConA. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre os esplenócitos reestimulados com RPMI e os demais reestímulos.

Quando avaliada a produção da citocina IL-10 em animais imunizados com as proteínas TcL7a e TcL7aDeltaRep observamos perfis similares aos encontrados nos ensaios de dosagem de IFN- γ . Novamente esplenócitos de animais imunizados com a proteína TcL7aRep se destacam por não apresentarem uma produção de IL-10 após nenhum dos estímulos aplicados (Figura 22).

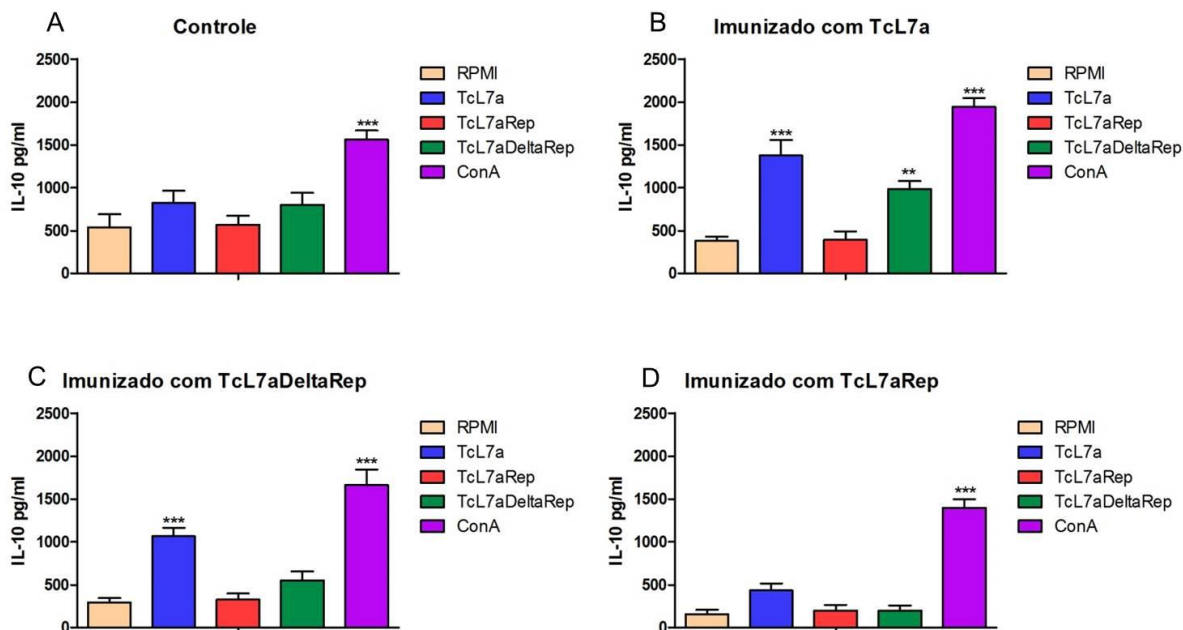


Figura 22: Produção de IL-10 pelos animais imunizados. Através de ensaios de ELISA IL-10 foi dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos 72 horas após a incubação dos esplenócitos com os estímulos. Animais imunizados com: (A) PBS; (B) TcL7a; (C) TcL7aDeltaRep; (D) TcL7aRep e reestimulados com RPMI, TcL7a, TcL7aDeltaRep, TcL7aRep e ConA. Dois asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,01$ e três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre os esplenócitos reestimulados com RPMI e os demais reestímulos.

4.2.3 Desafio dos animais imunizados

Com o acompanhamento da parasitemia foi possível observar se houve proteção conferida pela imunização com as proteínas TcL7a, TcL7aDeltaRep e TcL7aRep. A figura 23 mostra que a imunização com a proteína TcL7a foi capaz de proteger parcialmente os animais enquanto que a imunização com a proteína TcL7aDeltaRep não altera a parasitemia quando comparamos os animais imunizados com essas proteínas aos animais do grupo controle, apesar de matar mais animais. Por outro lado, a imunização com a proteína TcL7aRep resultou na exacerbação da parasitemia quando comparada ao grupo controle, levando todos os animais a óbito em 28 dias.

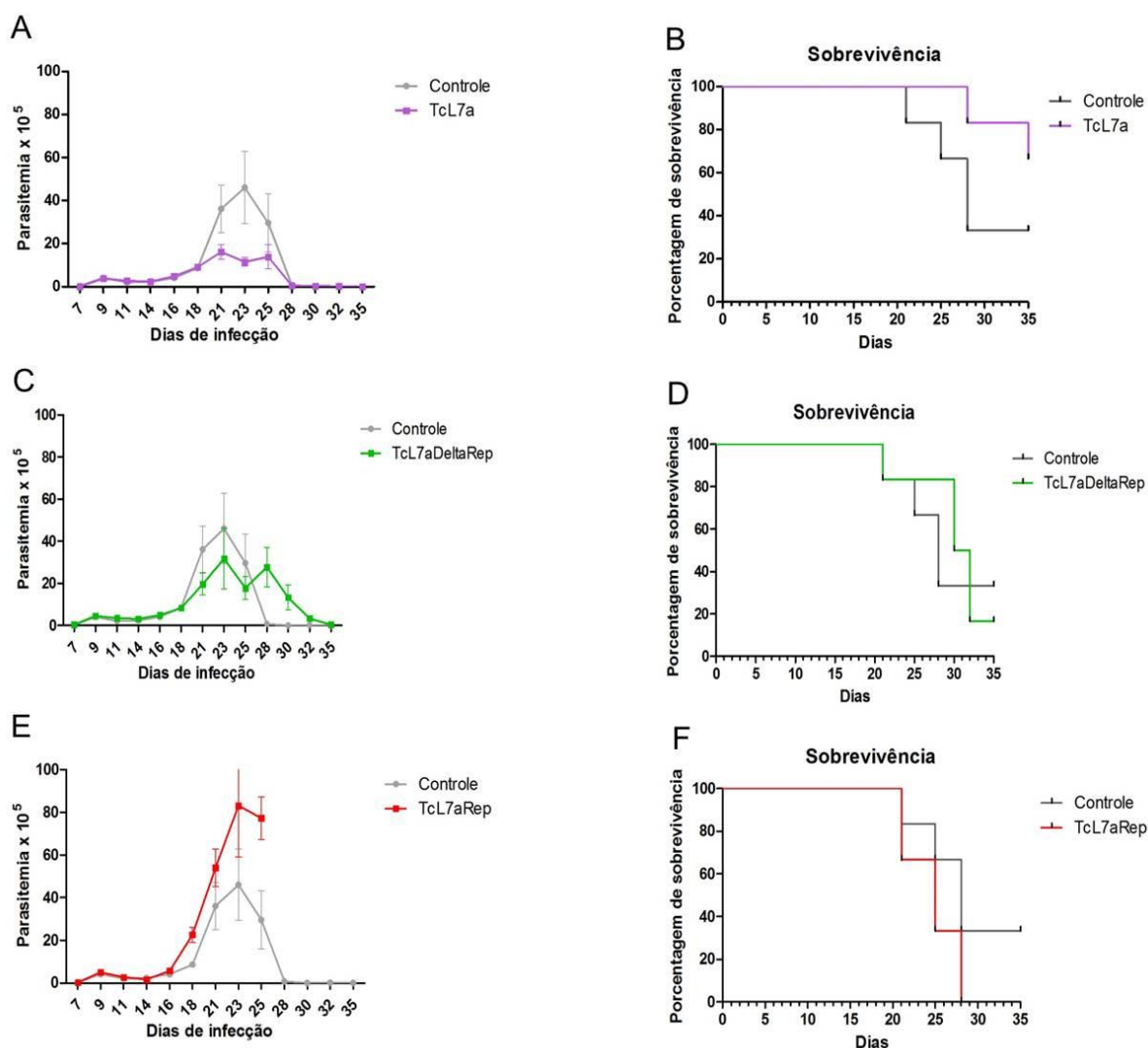


Figura 23: Parasitemia e mortalidade. Parasitemia (A,C,E) e mortalidade (B,D,F) de animais imunizados com as proteínas (A e B) TcL7a; (C e D) TcL7aDeltaRep; (E e F) TcL7aRep após o desafio com cepa virulenta de *T. cruzi*.

4.3 Avaliação das respostas humoral e celular após o desafio de animais previamente imunizados as proteínas TcL7a e TcL7aRep

Ao observar que a imunização com o domínio repetitivo não é capaz de induzir uma resposta humoral ou celular contra a TcRpL7a e ainda resulta em um aumento na parasitemia, nós nos perguntamos se haveria uma alteração na resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi*, nos animais imunizados com as repetições. Para isso os animais receberam duas doses das proteínas TcL7a e TcL7aRep (10µg), juntamente com CpG e alúmem, com 14 dias de intervalo.

Coletas de sangue foram realizadas nove dias após imunização. Parte dos animais foram sacrificados para retirada do baço e vinte e um dias após a última imunização o restante dos animais foi desafiado com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL-Brener do *T. cruzi* sendo a parasitemia acompanhada durante 34 dias. Coletas de sangue foram realizadas 15, 22 e 29 dias após o desafio dos animais imunizados, para avaliar as respostas humoral e celular como mostrado na figura 24.

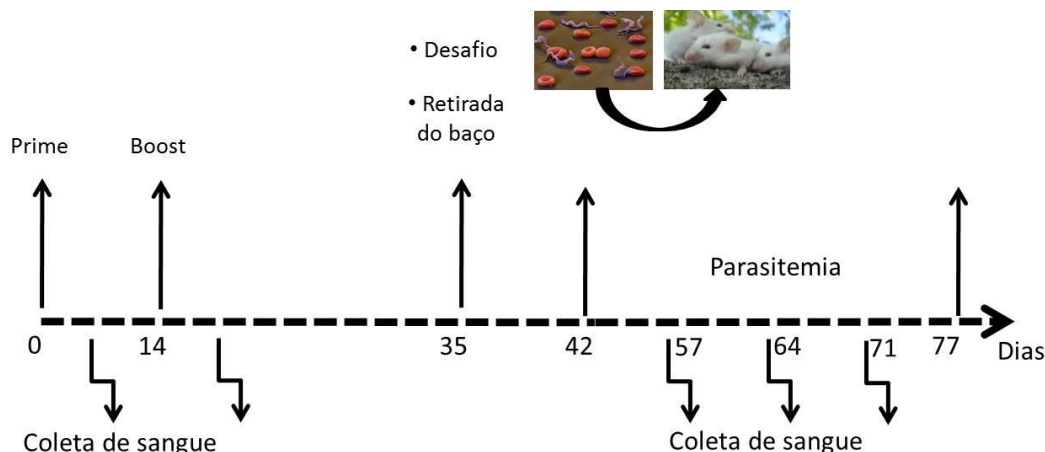


Figura 24: Representação esquemática do protocolo de imunização. Fêmeas BALB/c receberam um prime e um boost. Coleta de sangue para dosagem de anticorpos foram realizadas nove dias após cada imunização. Vinte e um dias após a última imunização foram retirados baços de de alguns animais, enquanto o restante foi desafiado com tripomastigotas. Três coletas de sangue foram realizadas após a infecção, que foi acompanhada por 35 dias.

4.3.1 Resposta humoral após a imunização

Como observado no experimento descrito anteriormente, os animais imunizados com a proteína recombinante TcL7a produzem níveis significativos de anticorpos IgG1 e IgG total contra ela mesma, após receberem duas doses de imunização, mas a Imunização com a proteína TcL7aRep não resulta em produção de anticorpos contra esse antígeno (Figura 25).

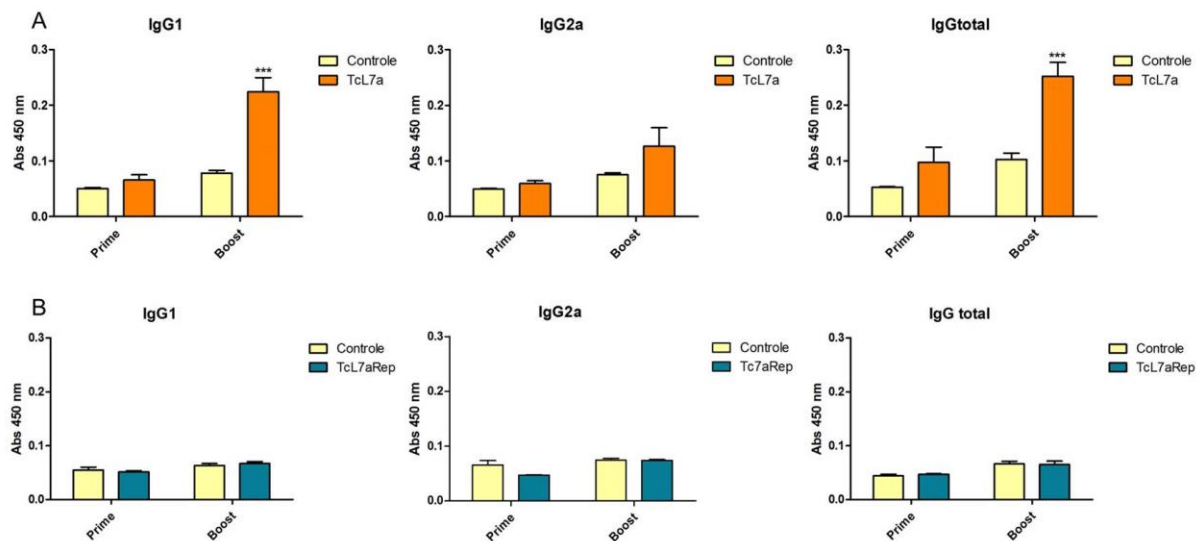


Figura 25: Anticorpos produzidos por animais imunizados. Produção de anticorpos após duas doses de imunização com as proteínas (A) TcL7a e (B) TcL7aRep. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o prime e o grupo boost.

4.3.2 Resposta celular após a imunização

Após duas imunizações com a proteína TcL7a foi possível observar produção das citocinas IFN- γ e IL-10 quando os esplenócitos foram reestimulados com a proteína na sua forma completa. Em contraste com os resultados do experimento anterior, mostrado na figura 21, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IFN- γ em animais imunizados com TcL7aRep e reestimulados com a proteína completa ou com o domínio repetitivo, quando comparados aos níveis produzidos pelos animais do grupo controle (Figuras 26 e 27), ou seja, não foram produzidas quantidades detectáveis de IFN- γ nesses animais.

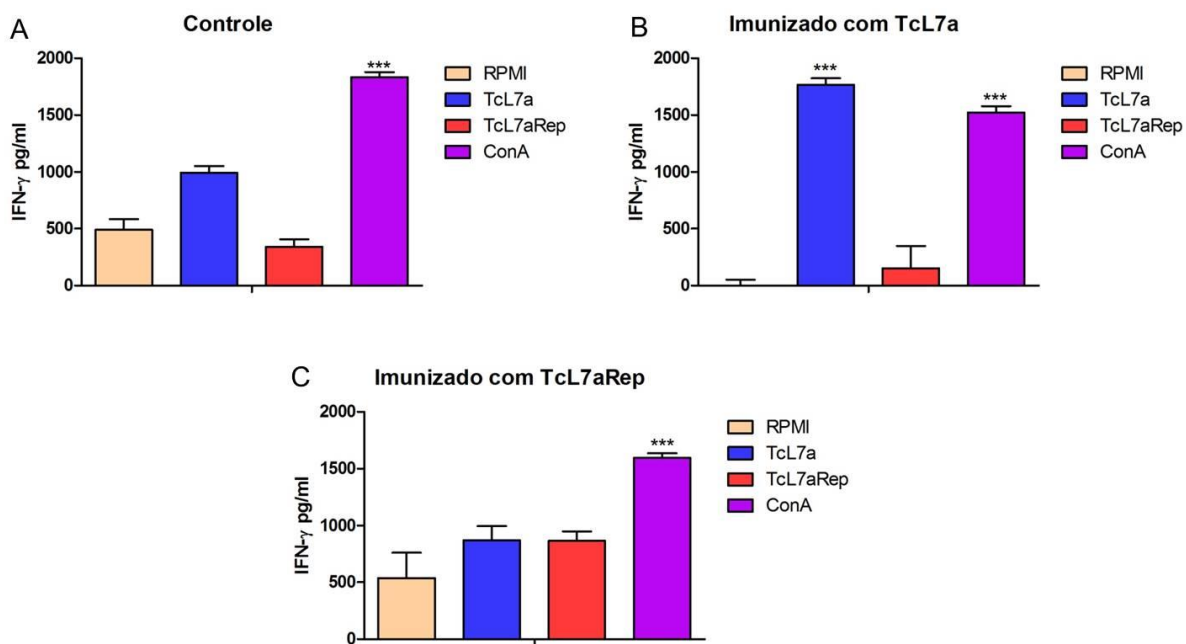


Figura 26: Produção de IFN- γ pelos animais imunizados. Através de ensaios de ELISA IFN- γ foi dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos 72 horas após a incubação dos esplenócitos com os estímulos. Animais imunizados com: (A) PBS; (B) TcL7a; (C) TcL7aRep e reestimulados com RPMI, TcL7a, TcL7aRep e ConA. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle reestimulado com TcL7a e os demais grupos imunizados e reestimulados.

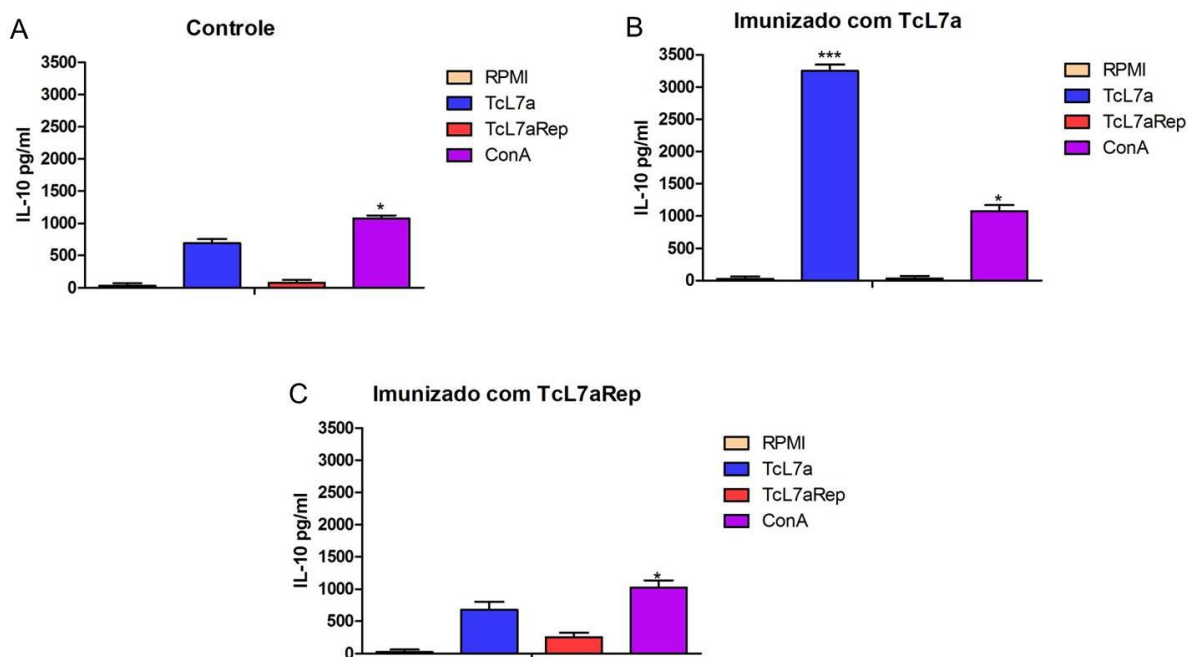


Figura 27: Produção de IL-10 pelos animais imunizados. Através de ensaios de ELISA IL-10 foi dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos 72 horas após a incubação dos esplenócitos com os estímulos. Animais imunizados com: (A) PBS; (B) TcL7a; (C) TcL7aRep e reestimulados com RPMI, TcL7a, TcL7aRep e ConA. Um asterisco indica diferença significativa com $p < 0,05$ e três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle reestimulado com TcL7a e os demais grupos imunizados e reestimulados.

4.3.3 Análise da parasitemia

Animais que receberam duas doses de imunizações com as proteínas TcL7a e TcL7aRep apresentaram o mesmo comportamento observado com três doses de imunização dessas proteínas. Imunização com a proteína completa protegeu parcialmente os animais em relação ao grupo controle enquanto que a imunização com o domínio repetitivo exacerbou a parasitemia e ocasionou 100% de mortalidade (Figura 28).

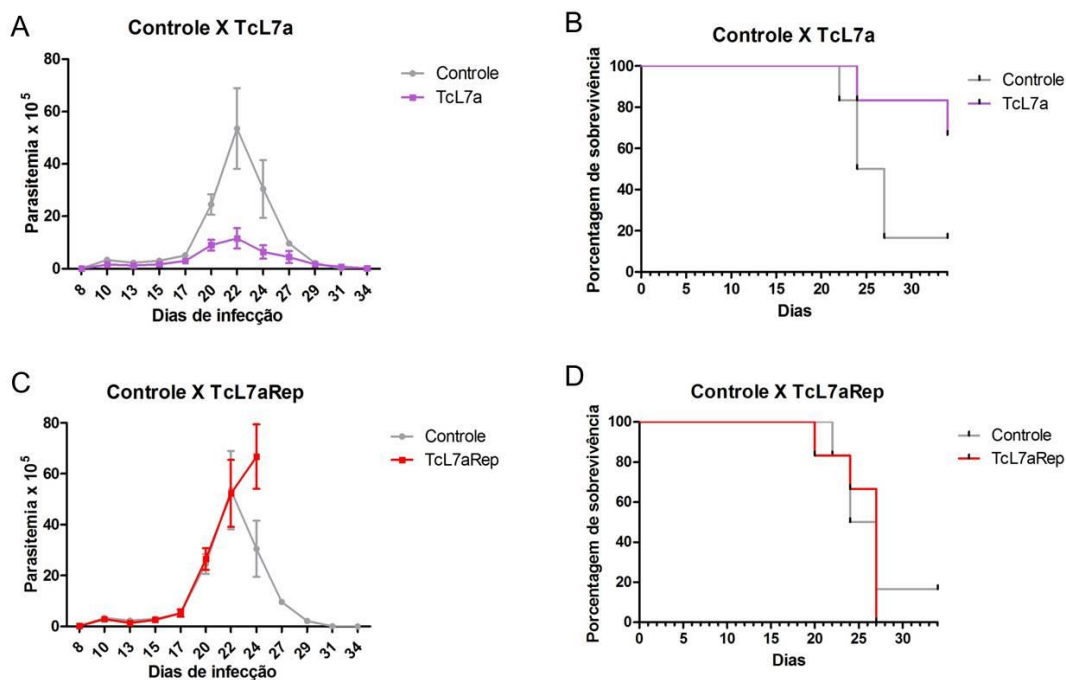


Figura 28: Parasitemia e mortalidade. Parasitemia e mortalidade dos animais que receberam duas doses de imunização com as proteínas (A e B) TcL7a; (C e D) TcL7aRep após o desafio com tripomastigotas.

4.3.4 Resposta humoral após o desafio

Quando avaliada a produção de anticorpos contra a proteína completa, 15 e 22 dias após o desafio, observa-se que os animais do grupo controle produzem baixos níveis de IgG2a, enquanto que os animais imunizados com a TcL7a completa continuam produzindo altos níveis de IgG1, IgG2a e IgG total (Figura 29). Por outro lado animais do grupo controle e imunizados com a proteína TcL7aRep não produzem anticorpos, 15 e 22 dias após a infecção, de nenhuma das duas subclasses contra o domínio repetitivo (Figura 30). Não foi possível realizar dosagem de anticorpos 29 dias após o desafio devido a mortalidade dos animais dos grupos controle e imunizados com a proteína TcL7aRep como observado no item 4.3.3.

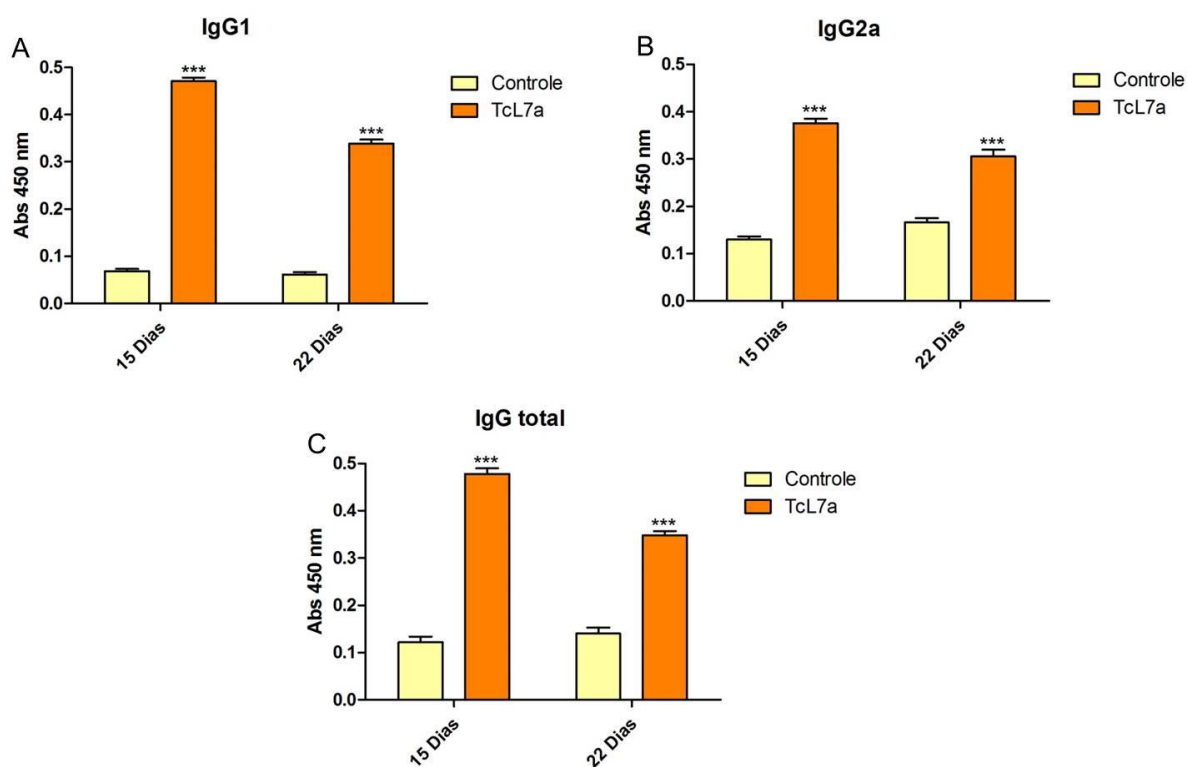


Figura 29: Produção de anticorpos contra a proteína completa 15 e 22 dias após o desafio.

Animais do grupo controle e os imunizados com a proteína TcL7a foram desafiados 21 dias após a última imunização. Coletas de sangue foram realizadas e 15 e 22 dias após o desafio para dosagem dos anticorpos: (A) IgG1; (B) IgG2a; (C) IgG total. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle e os grupos de animais imunizados.

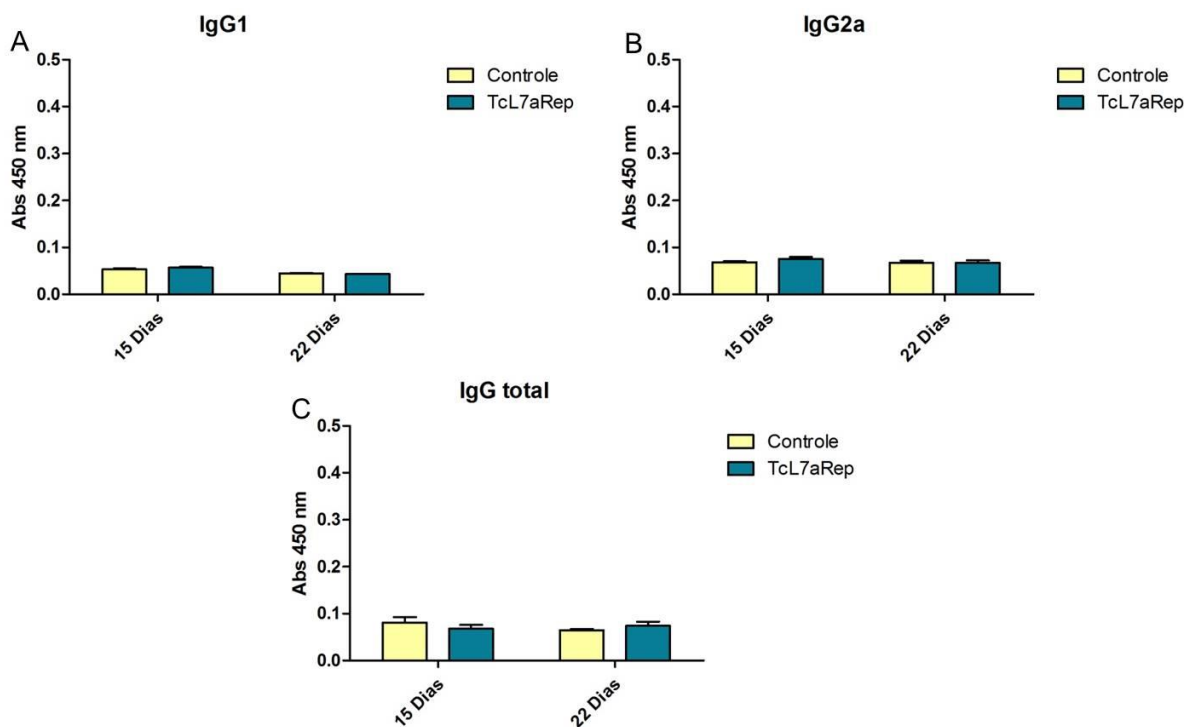


Figura 30: Produção de anticorpos contra a o domínio repetitivo 15 e 22 dias após o desafio.

Animais do grupo controle e os imunizados com a proteína TcL7aRep foram desafiados 21 dias após a última imunização. Coletas de sangue foram realizadas e 15 e 22 dias após o desafio para dosagem dos anticorpos: (A) IgG1; (B) IgG2a; (C) IgG total. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o grupo controle e os grupos de animais imunizados.

4.3.5 Resposta celular após o desafio

Após o desafio com cepa virulenta, ensaios para dosagem das citocinas IFN- γ e IL-10 foram realizados no soro dos animais do grupo controle bem como nos imunizados com as proteínas TcL7a e TcL7aRep. Níveis similares de IFN- γ foram observados em todos os grupos 15 dias após o desafio. Uma queda brusca na produção desta citocina ocorreu 22 dias após a infecção (Figura 31A). Por outro lado níveis de IL-10 permaneceram elevados 15 e 22 dias após a infecção em todos os grupos (Figura 31B).

Imunização com a proteína completa, se destaca, por apresentar níveis ligeiramente mais altos de IFN- γ e relativamente mais baixos de IL-10 22 dias após a infecção, quando comparado aos níveis que foram detectados nos animais dos grupos controle e imunizado com o domínio repetitivo.

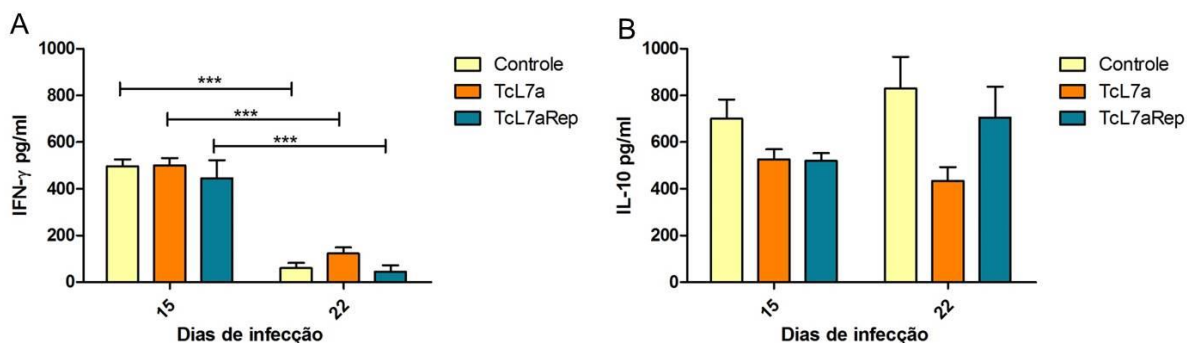


Figura 31: Produção de IFN- γ e IL-10 15 e 22 dias após o desafio. Vinte e um dias após a última imunização com as proteínas TcL7a e TcL7aRep os animais foram desafiados. Coletas de sangue foram realizadas 15 e 22 dias após o desafio e níveis de (A) IFN- γ e (B) IL-10 foram dosados no soro através de ensaios de ELISA. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre 15 e 22 dias.

4.4 Imunização com TcL7aRep seguida de imunização com TcL7a completa

Com base nos resultados nos quais observamos que a imunização com o domínio repetitivo não induz uma resposta imune celular eficaz e resulta na exacerbação da parasitemia, nós levantamos a hipótese de que as repetições poderiam de alguma maneira estar influenciando na resposta imunológica gerada pelo hospedeiro contra o parasito.

Para verificar se a imunização inicial com a TcL7aRep exerceria alguma influência sobre a produção de anticorpos em resposta à uma imunização subsequente com a proteína completa, animais foram divididos em 5 grupos: o grupo controle (grupo 1) recebeu três doses de PBS; o grupo 2 recebeu uma dose de PBS, seguida de duas doses da proteína TcL7a completa; o grupo 3 recebeu como “prime” uma dose de TcL7aRep e em seguida dois reforços com a proteína TcL7a completa; o grupo 4 foi imunizado com três doses da proteína completa; o grupo 5 recebeu uma dose de PBS seguida de duas doses de TcL7aRep (Figura 32). Nove dias após as imunizações, ensaios de ELISA foram conduzidos para avaliar se a imunização inicial com a proteína contendo somente as repetições poderia interferir de forma negativa na produção de anticorpos contra a proteína completa.

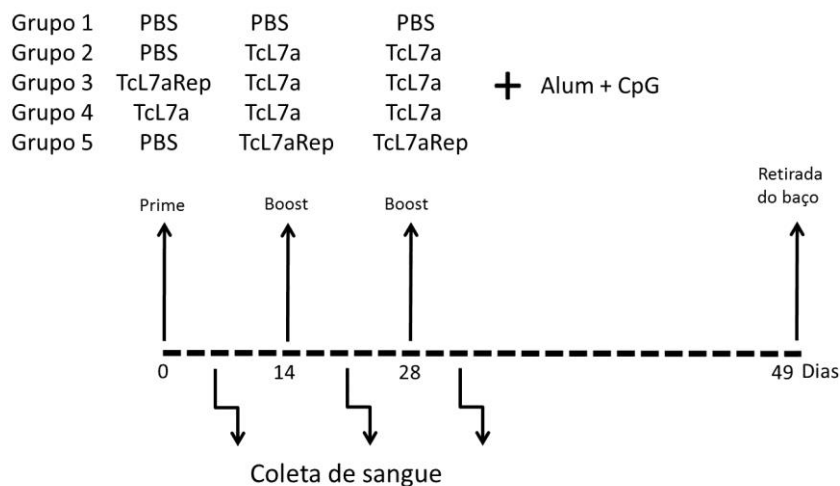


Figura 32: Representação esquemática do protocolo de imunização. Animais receberam três doses de imunização. Coleta de sangue para dosagem de anticorpos foram realizadas nove dias após cada imunização. Vinte e um dias após a última imunização foram coletados os baços para a dosagem de citocinas.

4.4.1 Análise da resposta humoral

Os resultados mostrados nas figuras 33 e 34 revelaram haver uma diminuição na produção de IgG2a contra a proteína completa e contra o domínio repetitivo nos animais do grupo 3 quando comparado aos animais do grupo 2, ou seja, a imunização inicial com TcL7aRep interferiu de maneira negativa na resposta humoral contra a proteína completa. Ainda mais interessante, essa redução só foi observada nos níveis de IgG2a, sendo que os níveis de IgG1 não foram alterados. Como já observado, a imunização com TcRpL7aRep (grupo 5) não é capaz de gerar anticorpos contra esse antígeno ou contra a proteína TcRpL7a completa.

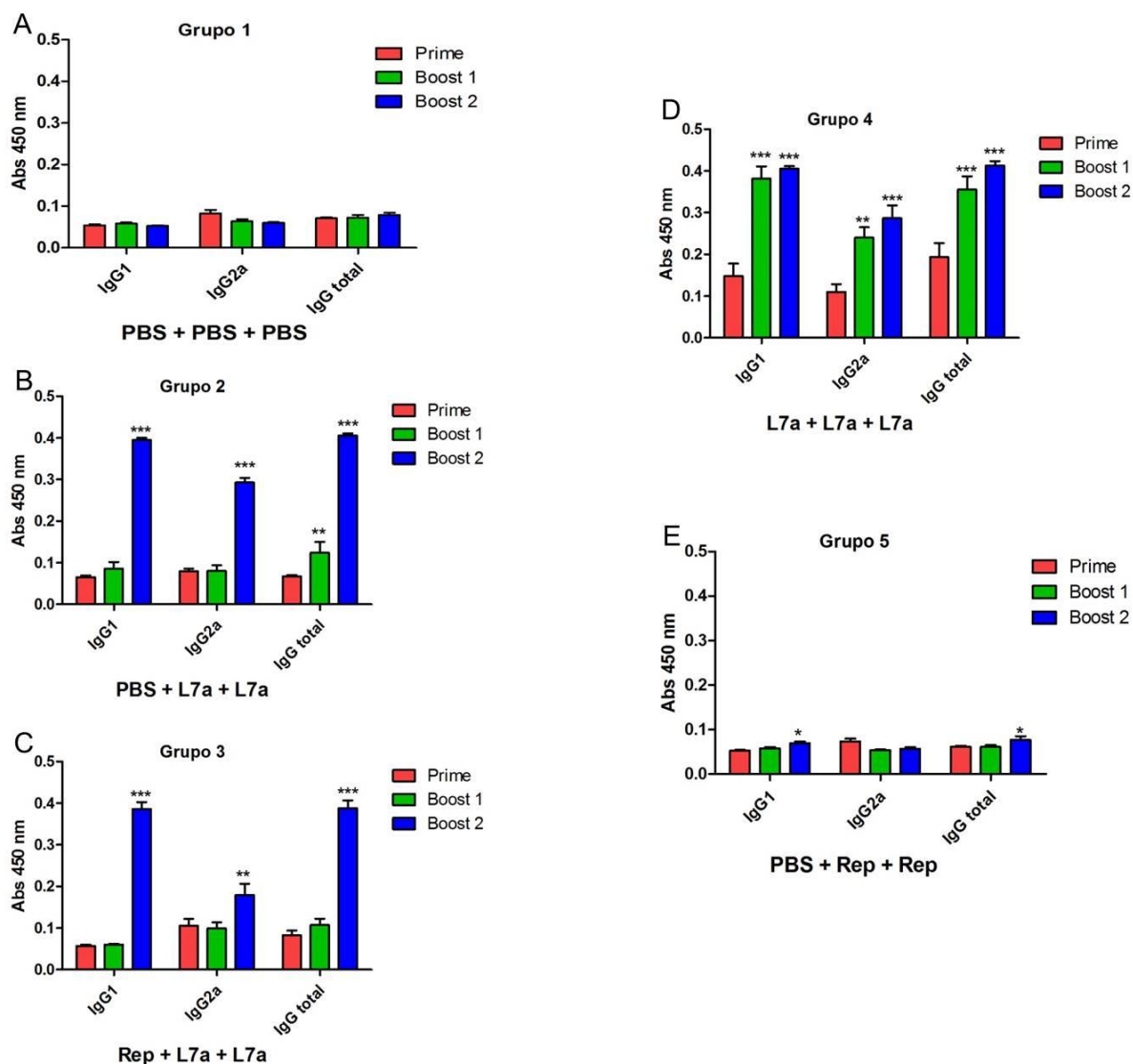


Figura 33: Anticorpos contra a proteína TcL7a completa produzidos pela imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela imunização com a proteína TcL7a. Produção de anticorpos, avaliada por ensaios de ELISA, após a imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela proteína TcL7a da seguinte maneira: (A) PBS + PBS + PBS; (B) PBS + TcL7a + TcL7a; (C) TcL7aRep + TcL7a + TcL7a; (D) TcL7a + TcL7a + TcL7a; (E) PBS + TcL7aRep + TcL7aRep. Dois asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,01$ e três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o prime e os boosts.

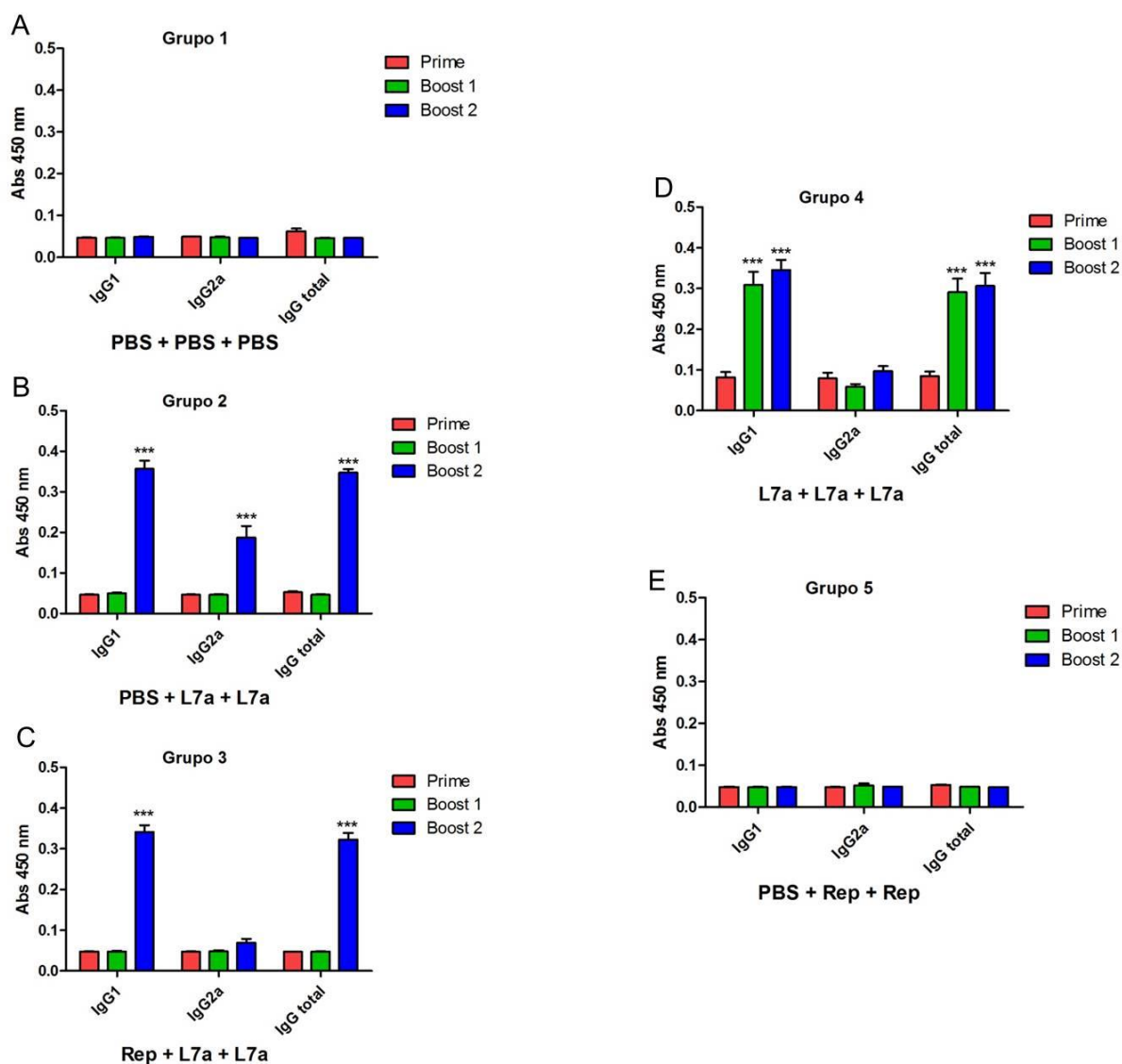


Figura 34: Anticorpos contra a proteína TcL7aRep produzidos pela imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela imunização com a proteína TcL7a. Produção de anticorpos, avaliada por ensaios de ELISA, após a imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela proteína TcL7a da seguinte maneira: (A) PBS + PBS + PBS; (B) PBS + TcL7a + TcL7a; (C) TcL7aRep + TcL7a + TcL7a; (D) TcL7a + TcL7a + TcL7a; (E) PBS + TcL7aRep + TcL7aRep. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$, entre o prime e os boosts.

4.4.2 Análise da resposta celular

O perfil das citocinas IFN- γ e IL-10 não foi afetada pela imunização previa com TcL7aRep, sendo observado a produção de IL-10 pelos animais que receberam uma dose de PBS e por aqueles que receberam o “prime” com o domínio repetitivo, quando estes grupos foram reestimulados com a proteína TcL7a completa. Não foi

observada produção de IFN- γ por esses dois grupos quando comparado aos níveis produzidos por animais do grupo controle quando reestimulado com a proteína TcL7a completa. Como observado anteriormente esplenócitos de animais do grupo imunizado com TcL7a completa apresentaram uma produção significativa das duas citocinas quando reestimulados com a proteína completa (Figuras 35 e 36).

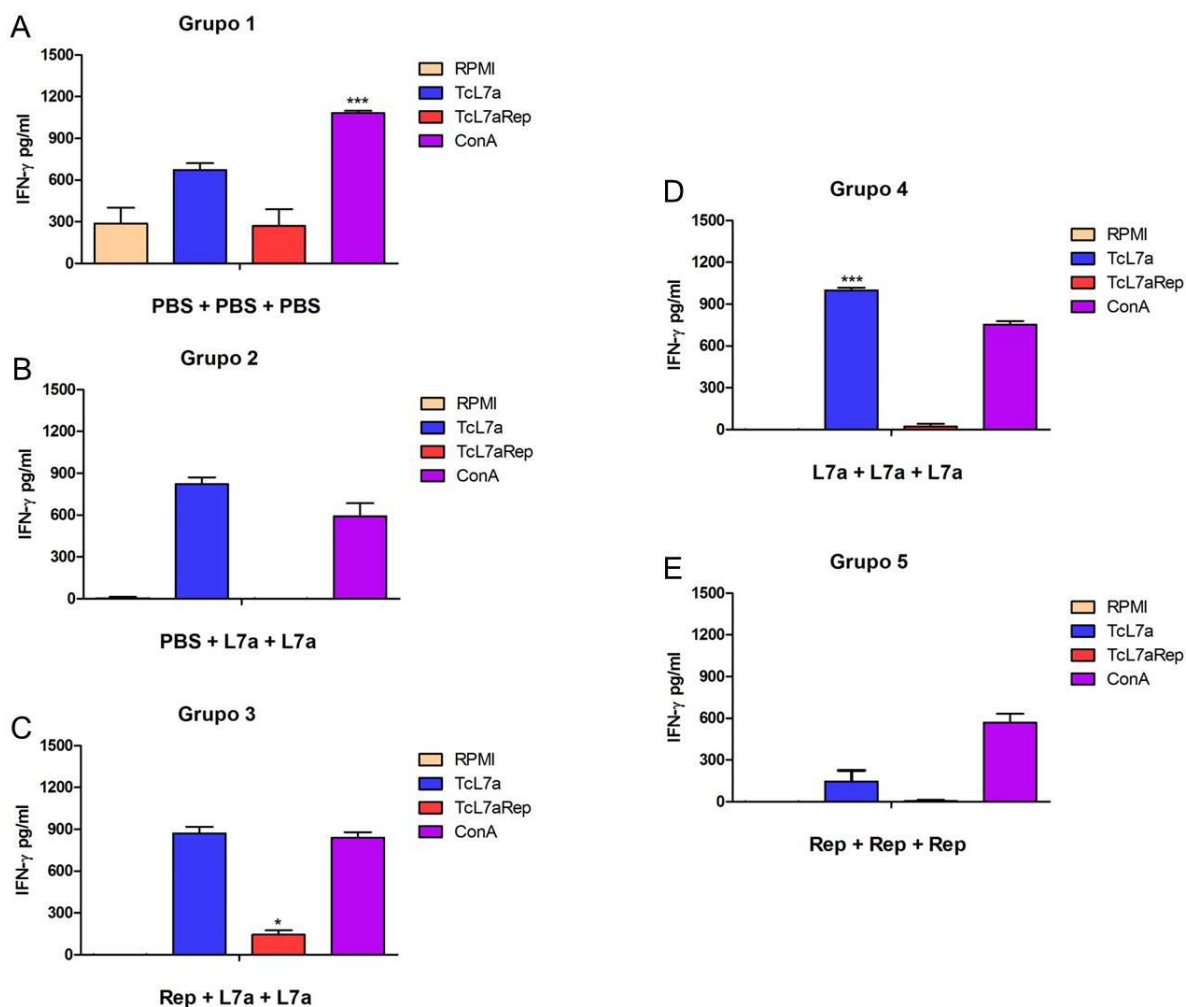


Figura 35: Produção de IFN- γ pela imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela imunização com a proteína TcL7a. IFN- γ dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais imunizados com: (A) PBS + PBS + PBS; (B) PBS + TcL7a + TcL7a; (C) TcL7aRep + TcL7a + TcL7a; (D) TcL7a + TcL7a + TcL7a; (E) PBS + TcL7aRep + TcL7aRep. Três asteriscos indicam diferença significativa com $p < 0,001$ entre o grupo controle reestimulado com TcL7a e os demais grupos imunizados e reestimulados.

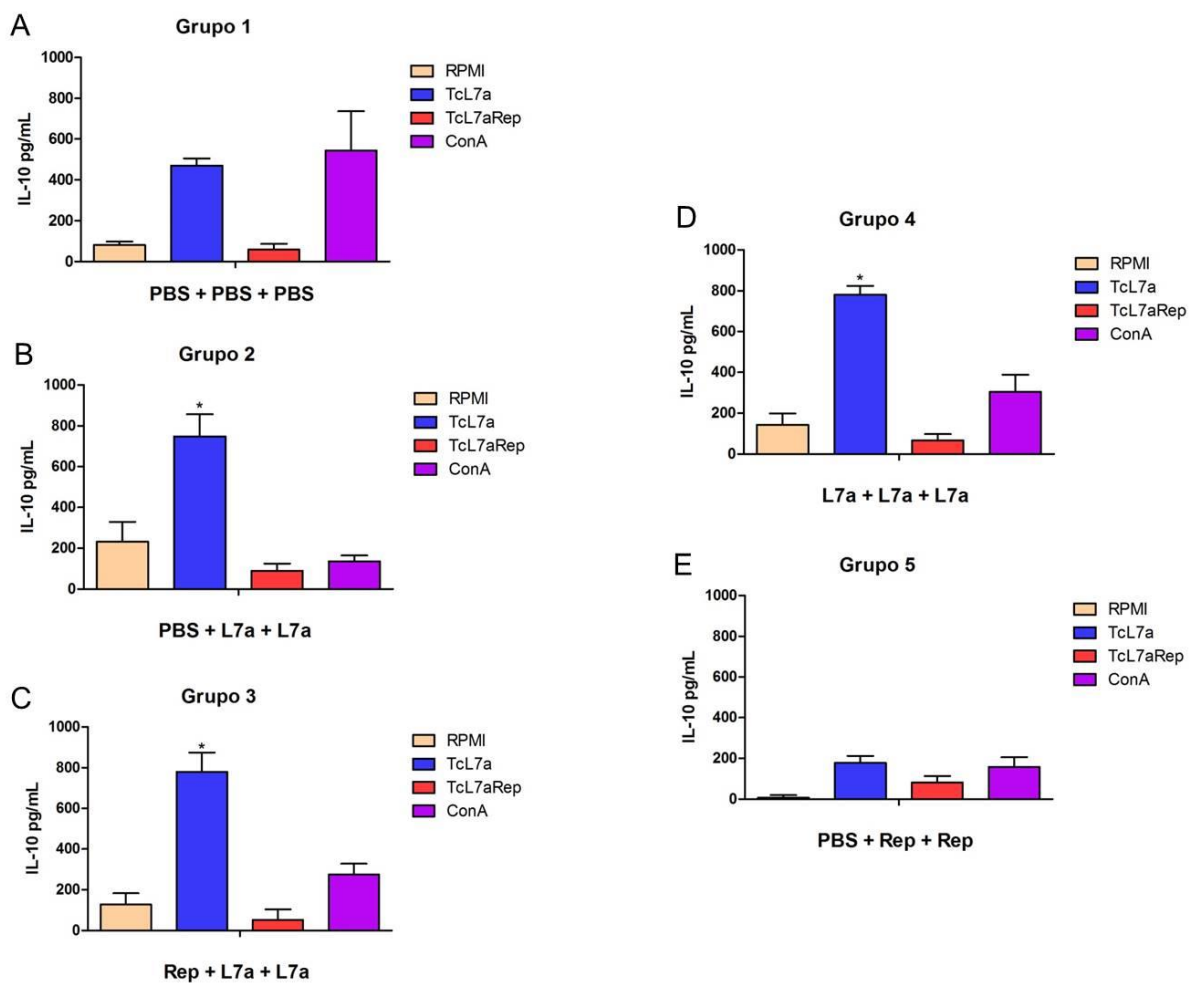


Figura 36: Produção de IL-10 pela imunização com a proteína TcL7aRep seguida pela imunização com a proteína TcL7a. IL-10 dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais imunizados com: (A) PBS + PBS + PBS; (B) PBS + TcL7a + TcL7a; (C) TcL7aRep + TcL7a + TcL7a; (D) TcL7a + TcL7a + TcL7a; (E) PBS + TcL7aRep + TcL7aRep. Um asterisco indica diferença significativa com $p < 0,05$ entre o grupo controle reestimulado com TcL7a e os demais grupos imunizados e reestimulados.

5. DISCUSSÃO

Proteínas contendo repetições de aminoácidos são frequentemente encontradas no genoma de *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, porém sua função ainda é desconhecida. Estas proteínas, por serem reconhecidas especificamente por anticorpos presentes no soro de pacientes com doença de Chagas, podem ainda auxiliar no desenvolvimento de novos testes diagnósticos para doença de Chagas diminuindo as chances de ocorrer reações cruzadas com outros parasitos (Da Rocha et al. 2002; Pais et al. 2008).

Alguns autores sugerem que as repetições, por serem potentes epítomos de células B, possam funcionar como fatores de virulência (Osorio et al. 2012) e participar de mecanismos que ajudam no escape do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro (Goto et al. 2008), mecanismo esse conhecido como “smoke screen”, ou cortina de fumaça. A vacinação eficaz contra o *T. cruzi* deve conter em sua composição antígenos e/ou substâncias capazes de gerar uma forte resposta imune celular direcionada para o perfil Th1, em que há predomínio de IgG da subclasse 2 assim como das citocinas IFN- γ e TNF- α (Michailowsky et al. 2001; Quijano-Hernandez e Dumonteil 2011). Para isso a seleção cuidadosa de antígenos como componentes de vacinas deve levar em conta vários aspectos da reação gerada no hospedeiro contra esses antígenos.

A repetição dos aminoácidos, lisina, alanina e prolina, que caracteriza a proteína TcL7a tornando-a específica para o *T. cruzi* poderá nos ajudar a compreender o papel que as repetições, presentes em antígenos do parasito, exercem sobre o sistema imune do hospedeiro vertebrado. Além disso, esses estudos nos ajudarão na busca de antígenos para testes diagnósticos que não geram reações cruzadas com outros protozoários como a *Leishmania sp.* e o *Toxoplasma gondii*. Ainda mais importante, os estudos sobre o antígeno TcL7a poderão fornecer informações relevantes para os grupos de pesquisa envolvidos na seleção de antígenos candidatos a componentes de vacinas contra a doença.

A predição de epítomos para linfócitos B, MHC de classe I e MHC de classe II, realizada com base na sequência da proteína TcL7a, revelaram a presença de dois epítomos lineares para linfócitos B, sendo que o de maior afinidade a este linfócito está situado na região que contêm as repetições, corroborando com a ideia de que

as repetições são alvos de células B. Foram preditos quatro epítomos para MHC de classe II, para o haplótipo H2-D^d, que se encontram: na região repetitiva, entre a região repetitiva e a não repetitiva e dois deles na região não repetitiva, sendo o que se encontra entre as duas regiões é o de maior afinidade. De acordo com os programas de predição não foram encontrados epítomos para ligação ao MHC de classe I, o qual é responsável pela apresentação de antígenos aos linfócitos TCD8+. Considerando que linfócitos TCD8+ são os principais responsáveis pela efetiva eliminação do *T. cruzi* (Barbosa et al. 2013), esses dados sugerem que o papel do antígeno TcL7a na resposta imune contra o parasito estaria limitado à resposta imune humoral.

Para investigar o papel dos antígenos contendo repetições de aminoácidos, camundongos foram imunizados com a proteína TcL7a na sua forma completa, e com versões truncadas contendo apenas o domínio repetitivo e a região não repetitiva. Em seguida foram desafiados com tripomastigotas do clone CL Brener, pelo fato da sequência da proteína usada nas imunizações ser derivada desta cepa.

As proteínas foram produzidas em *E. coli*, uma bactéria gram-negativa, e durante o procedimento de purificação das proteínas recombinantes ocorre a contaminação com LPS. O LPS é uma endotoxina que está presente na parede celular de bactérias gram-negativas (Magalhães et. al 2007) e que precisa ser removido antes de se iniciar os procedimentos de imunização, pois essa molécula pode causar choque séptico e alterar o curso da resposta imune ao se ligar no receptor TLR4 culminando na produção de citocinas (Poncini et al. 2010).

Ao final do processo de purificação foi observado um padrão indicativo de degradação parcial da proteína TcL7aDeltaRep. Essa pequena degradação já havia sido observada em experimentos anteriores e pode ser devido exatamente à ausência da repetição de aminoácidos. Dados da literatura indicam que um dos papéis das repetições de aminoácidos seria o de aumentar a estabilidade da proteína, protegendo-a contra a ação de proteases. Esses dados foram observados quando a proteína Trans-sialidase foi produzida na sua forma recombinante com e sem a região repetitiva presente na extremidade C-terminal, denominada “SAPA repeats”, e injetada na corrente sanguínea de camundongos. Buscaglia et al. (1998)

observaram uma redução na atividade da proteína sem a região repetitiva, mostrando que as repetições são importantes para a estabilização dessa atividade.

A resposta humoral foi avaliada pela dosagem de Ig das subclasses IgG1 e IgG2a bem como IgG total, pois foi demonstrado que camundongos da linhagem BALB/c, após a infecção com *T. cruzi*, produzem altos níveis de Ig destas subclasses (Michailowsky et al. 2001). Ensaio de ELISA mostraram que a imunização com a proteína TcL7a completa resultou na produção de níveis significativos de anticorpos IgG total e das subclasses IgG1, IgG2a, logo após o 1º boost, contra este mesmo antígeno. Nossos dados mostram ainda que IgG1 é o principal subtipo de imunoglobulina, produzido contra o domínio repetitivo pela imunização com a proteína completa, após o 2º boost. Estes dados confirmam os resultados de experimentos realizados anteriormente pelo nosso grupo (Gabriela de Assis Burle Caldas, 2012).

As imunizações com as repetições e com a região sem o domínio repetitivo não foram capazes de gerar anticorpos contra estes antígenos. Dados da literatura mostram que altos níveis de anticorpos são produzidos em animais imunizados com a proteína recombinante referente à repetição presente na proteína TcSP, pertencente a família das trans-sialidases (Salgado-Jiménez et al. 2013). A ausência de anticorpos gerados após a imunização com a proteína TcL7aRep mesmo tendo sido identificado epítipo com grande afinidade para ligação a linfócitos B nessa região da proteína, pode ser resultado da necessidade de uma interação entre os linfócitos B e T para que ocorra expansão clonal e conseqüentemente a produção dos anticorpos. Estudos mostram que a repetição de aminoácido presente na região C-terminal das trans-sialidases seria capaz de ativar células B na ausência de CD40 (Gao et al. 2001), indicando que as trans-sialidases são capazes de ativar células B sem depender dos linfócitos T.

A análise da resposta humoral após o desafio com *T. cruzi* mostrou que animais do grupo controle produzem baixos níveis de IgG2a apenas contra a proteína completa. Em animais imunizados com a proteína TcL7a são detectados níveis significativos de Ig das duas subclasses contra este antígeno, enquanto que não são observados anticorpos contra o domínio repetitivo em animais imunizados com a TcL7aRep. Camundongos na fase aguda apresentaram um comportamento

diferenciado ao observado em indivíduos na fase crônica, que produzem anticorpos direcionados para a proteína na sua forma completa e para o domínio repetitivo (Pais et al. 2008). Estudos mostram que a infecção com o *T. cruzi* produz níveis maiores de IgG1 comparado com IgG2a/c, em camundongos da linhagem BALB/c (Bryan et al. 2010; Michailowsky et al. 2001). Dados semelhantes foram obtidos por Gupta e Garg (2013), que detectaram a presença de anticorpos específicos das subclasses IgG1 e IgG2a, 30 dias após infectar animais que haviam sido imunizados com a TcVac3.

Para avaliar a resposta celular gerada pela imunização com as proteínas recombinantes foram dosadas as citocinas IFN- γ e IL-10 no sobrenadante da cultura de esplenócitos provenientes de animais imunizados. Animais imunizados com a proteína TcL7a apresentaram níveis significativos destas duas citocinas quando tiveram seus esplenócitos reestimulados com esta mesma proteína e com a proteína contendo a região não repetitiva. Estes dados corroboram com a literatura, que mostra a produção de IFN- γ e de IL-10 por esplenócitos de animais previamente imunizados com a proteína SSP₄, uma glicoproteína de superfície de amastigotas que está ligada a membrana plasmática pela âncora GPI (Flores-García et al. 2011).

A imunização com a proteína TcL7aDeltaRep só resultou na produção dessas duas citocinas quando os esplenócitos foram reestimulados com a proteína completa. Da mesma forma, a produção de IFN- γ pelos esplenócitos de animais imunizados com a TcL7aRep, só ocorreu quando estes foram posteriormente estimulados com a proteína completa. Surpreendentemente a imunização com o domínio repetitivo não foi capaz de induzir a produção de IL-10 com nenhum dos estímulos aplicados. A presença de epítomos com baixa afinidade para MHC de classe II situados na região repetitiva e na região não repetitiva somado ao fato de um epítomo de maior afinidade estar localizado entre as duas regiões, indica a necessidade da proteína na sua forma completa ser necessária para estimular a produção de citocinas, já que esta é a única das três formas das proteínas utilizadas que possui este epítomo de maior afinidade.

As análises de soros de animais desafiados com a cepa CL Brener mostraram a produção de IFN- γ 15 dias após o desafio pelos grupos controle e imunizados com as proteínas TcL7a e TcL7aRep. Diminuição nos níveis desta citocina, observada 22

dias após o desafio, pode ter ocorrido devido a elevada produção de IL-10 observada em todos os grupos, 15 e 22 dias após o desafio. Esta produção constante de IL-10 pode ter ocorrido para evitar a excessiva produção de IFN- γ , pelo sistema imune, que pode ser prejudicial ao hospedeiro vertebrado. Salgado-Jiménez (2013) obteve resultados semelhantes ao imunizar animais com a proteína TcSP e com as repetições presentes nesta proteína, detectando níveis de IFN- γ e de IL-10 14 dias após o desafio em ambos os grupos.

Após a infecção pelo *T. cruzi*, IFN- γ tem o papel de limitar a replicação do parasito além de direcionar à resposta com perfil Th1. A ação do IFN- γ sobre a replicação do parasito foi demonstrado pelo aumento do número de parasitos na corrente sanguínea em modelos murinos nocautes para esta citocina, aparentando ser essencial para a resistência ao parasito durante a fase aguda (Michailowsky et al. 2001). A IL-10 é uma citocina antiinflamatória (Gupta e Garg 2012) que direciona à resposta Th2, associada com o aumento da susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Flores-García et al. 2011). Esta citocina também é produzida durante a doença de Chagas, atuando de maneira a regular negativamente a ação do IFN- γ , conduzindo ao equilíbrio das respostas Th1 e Th2 (Silva et al. 1992). Estudos relatam que linfócitos T CD8+ são os principais produtores de IFN- γ (Michailowsky et al. 2001; Gupta 2012), enquanto que a IL-10 é produzida pelas células CD4+, após a infecção pelo *T. cruzi* (Flores-García et al. 2011; Gupta e Garg 2012). Estudos *in vitro* mostram que uma mesma célula CD4+ produz ambas as citocinas (Flores-García et al. 2011).

Considerando que as repetições presentes na proteína TcL7a são exclusivamente encontradas no *T. cruzi* e ainda que soros de pacientes com doença de Chagas reconhecem além da proteína completa o domínio repetitivo, nós esperávamos que esta proteína assim como as repetições seriam capazes de proteger os animais quando esses fossem previamente imunizados. Assim, animais foram imunizados com as três formas das proteínas recombinantes e desafiados. A imunização com a proteína na sua forma completa, como esperado, protegeu parcialmente os animais. Supreendentemente a imunização com o domínio repetitivo exacerbou a parasitemia quando comparamos ao grupo controle. Esses resultados estão de acordo os dados obtidos por Gabriela de Assis Burle Caldas, em sua

dissertação de mestrado (UFMG 2012). Essa exacerbação da parasitemia resultou em 100% de mortalidade. Chuenkova (1995) observou aumento do pico da parasitemia assim como 100% de mortalidade quando injetava trans-sialidase, contendo repetições de aminoácidos, na pata dos camundongos e os desafiava horas depois. A deleção do domínio repetitivo parece não alterar o curso da parasitemia quando comparamos à curva de parasitemia do grupo controle, porém a sobrevivência destes animais é menor do que a encontrada no grupo controle. Salgado-Jiménez (2013) relatou que a imunização com as repetições e com as regiões não repetitivas presentes na proteína TcSP protegem os animais contra o desafio com cepa virulenta de *T. cruzi*, porém leva os animais a óbito.

A ausência das respostas humoral e celular juntamente com o aumento excessivo na quantidade de tripomastigotas observadas na corrente sanguínea de animais imunizados com a proteína TcL7aRep e desafiados com cepa virulenta de *T. cruzi* nos levou a formular a hipótese de que os antígenos do parasito contendo repetições de aminoácidos poderiam estar modulando negativamente o sistema imunológico do hospedeiro. A fim de testar essa hipótese, nós imunizamos os animais inicialmente (“prime”) com o domínio repetitivo e em seguida aplicamos duas imunizações (“boosts”) com a proteína completa. Esse protocolo de imunização resultou em diminuição significativa nos níveis de anticorpos da subclasse IgG2a produzidos contra a proteína completa quando comparado ao protocolo no qual os camundongos receberam uma dose de PBS e duas doses da proteína completa. Este resultado indica que essas repetições de aminoácidos de alguma forma, impede que células B produzam anticorpos contra a proteína completa em uma posterior imunização com a TcL7a. Quando foi analisada a presença e anticorpos contra o domínio repetitivo, no grupo que recebeu o prime com o domínio repetitivo, não foi detectada produção de IgG2a indicando que os anticorpos IgG2a gerados contra a proteína completa devem estar voltados para a região que não contém os aminoácidos repetitivos.

A produção das citocinas IFN- γ e IL-10 pelos esplenócitos destes animais não apresentaram diferenças quando comparado ao grupo que recebeu o prime com PBS e em seguida duas doses da proteína completa, mostrando que o “prime” com o domínio repetitivo parece não interferir na resposta celular. Estes dados precisam

ser confirmados já que este experimento foi realizado uma única vez, mas indicam que de fato, as repetições de aminoácidos levariam à uma modulação negativa somente da resposta imune humoral do hospedeiro.

Considerando que os anticorpos gerados em resposta à imunização com TcL7a são voltados contra domínio repetitivo e que essa proteína encontra-se no ribossomo do parasito, uma resposta gerada por esses anticorpos não seria eficaz para sua completa eliminação. Anticorpos IgG2a poderiam produzir IFN- γ para tentar controlar a infecção pelo *T. cruzi* (Michailowsky et al. 2001). O controle da parasitemia e a parcial proteção conferida pelos animais imunizados com a proteína completa deve ter ocorrido devido a ação de células ativadas pelo IFN- γ . Durante a infecção o parasito estimula, ainda, a liberação de IL-10 para tentar reduzir a forte resposta gerada pelo IFN- γ contra ele e assim conseguir sobreviver no hospedeiro. Ocorrendo a morte e a lise do parasito, as repetições presentes nas proteínas ribossômicas e mesmo em outras proteínas intracelulares, ao serem reconhecidas pelo hospedeiro causariam uma modulação negativa da resposta imune humoral, favorecendo a multiplicação do parasito. Pais et al. (2008) mostraram que outras proteínas presentes no ribossomo do *T. cruzi* contêm motivos repetitivos similares as repetições encontradas na proteína TcL7a, como também motivos repetitivos distintos. Seria interessante verificar se a imunização com outros antígenos do parasito que contem repetições de aminoácidos teriam o mesmo efeito observado com a proteína TcL7a.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O *Trypanosoma cruzi* agente etiológico da doença de Chagas possui vários genes codificadores de proteínas contendo repetições de aminoácidos. A proteína TcL7a presente na subunidade maior do ribossomo apresenta um domínio repetitivo rico nos aminoácidos alanina, lisina e prolina que está presente somente na proteína de *T. cruzi*. A exclusividade dessas repetições na proteína L7a do *T. cruzi* poderia ser utilizada para o desenvolvimento de testes de diagnósticos mais específicos para a doença de Chagas. A submissão de um pedido de patente voltada para a utilização desse antígeno para fins de diagnóstico já encontra-se em andamento.

A imunização com a proteína recombinante TcL7a foi capaz de estimular a resposta humoral do hospedeiro vertebrado com produção de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2a. Dosagens das citocinas IFN- γ e IL-10 mostraram que houve também a ativação da resposta celular. A utilização dos adjuvantes, CpG ODN e Alúmen, durante as imunizações serviram para favorecer ao direcionamento da resposta para o perfil Th1. A presença de IFN- γ e de IgG2a indica que a resposta gerada pela imunização com essa proteína é do tipo Th1, a qual é sabidamente conhecida ser a responsável pela eliminação do parasito.

A imunização com a região não repetitiva da proteína TcL7a não resultou em uma resposta com características da resposta Th1 mesmo com o uso de adjuvantes. Os níveis de parasitos observados na corrente sanguínea parecem não ser diferentes dos observado nos animais do grupo controle, mas apesar disso, um aumento na mortalidade dos animais desafiados foi observada.

A imunização com o domínio repetitivo da proteína TcL7a, por sua vez, levaria a uma tolerização das células B não permitindo a geração de uma resposta imune eficaz do hospedeiro contra o parasito, culminando na exacerbação da parasitemia e morte dos animais. Genes codificando antígenos com repetições de aminoácidos são frequentemente encontrados no genoma do *T. cruzi* e poderiam ter um papel relacionado à evasão do sistema imune do hospedeiro vertebrado, favorecendo a multiplicação do parasito e o estabelecimento da doença. Os mecanismos pelos quais esses antígenos contendo repetições podem gerar essa resposta favorável ao parasito precisam ser investigados. Esses estudos poderão portanto contribuir enormemente para o entendimento da patologia da doença de Chagas e também

para o desenho de estratégias eficazes de vacinação para o controle não somente desta como de outras parasitoses.

Este trabalho tem como perspectivas:

- Imunizar com as proteínas recombinantes TcL7a completa e TcL7aRep e desafiar com uma cepa avirulenta de *T. cruzi* (como o clone CL-14).
- Confirmar os dados gerados pela imunização com a TcL7aRep seguida pela imunização com a TcL7a completa e avaliar o efeito dessas imunizações na resposta ao desafio com o parasito.
- Avaliar o efeito da imunização com outros antígenos contendo repetições de aminoácidos sobre o desafio com cepas virulentas, como por exemplo, a repetição SAPA presente nas trans-sialidases.
- Identificar os mecanismos pelos quais as repetições presentes na proteína TcL7a ou em outras proteínas contendo repetições de aminoácidos afetam a resposta imune e a parasitemia de animais infectados com o *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ARNER, E. et al. (2007). Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20,000 additional gene variants. **BMC Genomics**, 8:39.
- BAFICA, A. 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):3515-9
- BARBOSA, R. P. 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):61795.
- BRENER, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, 27:347-82.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. (1998). The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. **J Infect Dis**, 177(2):431-6.
- BRYAN, M. A et al. (2010). Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, 4(7):733.
- CERQUEIRA, G. C. et al (2008). Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 157(1):65-72.
- CHUENKOVA, M.; PEREIRA, M. E (1995). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. **J Exp Med**, 181(5):1693-703.
- CLAYTON, J. (2010). Chagas disease 101. **Nature**, 465(7301):4-5.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104(1):31-40.
- DAROCHA, W. D. et al. (2002). Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitol Res**, 88(4):292-300.
- DUMONTEIL, E. (2009). Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. **Infect Genet Evol**, 9(6):1075-82.
- EL-SAYED, N. M. et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, 309(5733):409-15.

FLORES-GARCÍA, Y. et al. (2011). IL-10-IFN- γ double producers CD4⁺ T cells are induced by immunization with an amastigote stage specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Int J Biol Sci**, 7(8):1093-100.

GABRIELA DE ASSIS BURLE CALDAS. (2012). Papel de antígenos contendo repetições de aminoácidos na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: imunização com a proteína ribossômica TcRpL7a. **Dissertação de Mestrado** Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

GAO, W. et al. (2001). The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. **Int. Immunol**, 14(3):299-308, Dez 2001.

GOTO, Y.; et al. (2008). Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. **Infect Immun**, 76(9):3967-74.

GUPTA, S.; GARG, N. J. (2012). Delivery of antigenic candidates by a DNA/MVA heterologous approach elicits effector CD8(+)T cell mediated immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, 30(50):7179-86.

GUPTA, S.; GARG, N. J. (2013). TcVac3 induced control of *Trypanosoma cruzi* infection and chronic myocarditis in mice. **PLoS One**, 8(3):59434.

HEMMI, H. et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, 408(6813):740-5.

JUNQUEIRA, C. et al. (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, 12:29.

KALITA, M. K. et al. (2006). ProtRepeatsDB: a database of amino acid repeats in genomes. **BMC Bioinformatics**, 7:336.

MACHADO, F. S. et al. (2012). Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Front Biosci (Elite Ed)**, 4:1743-58.

MAGALHÃES, P. O. et al. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **J Pharm Pharm Sci**, 10(3):388-404.

MENDES, T. A. et al. (2013). Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. **Mol Biol Evol**, 30(4):951-63.

MICHAILOWSKY, V. 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(5):1723-33.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease. in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104 (1):17-30.

OSORIO, L. et al. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes Infect**, 14(15):1390-402.

PAIS, F. S. et al. (2008). Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, 10(7):716-25.

PEREIRA, K. S. et al. (2009). Chagas' disease as a foodborne illness. **J Food Prot**, 72(2):441-6.

PONCINI, C. V. et al. (2010). Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. **Mol Immunol**, 47(11-12):1981-8.

QUIJANO-HERNANDEZ, I.; DUMONTEIL, E. (2011). Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. **Hum Vaccin**, 7(11):1184-91.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, 26(2):275-91.

RISSE, M. G. et al. (2004). Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **J Infect Dis**, 189(12):2250-9.

RODRIGUES, M. M. et al. (2009). Swimming against the current: genetic vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104(1):281-7.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. (2012). The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, 2012:507874.

SALGADO-JIMÉNEZ, B. et al. (2013). Differential immune response in mice immunized with the A, R or C domain from TcSP protein of *Trypanosoma cruzi* or with the coding DNAs. **Parasite Immunol**, 35(1):32-41.

SILVA, J. S. et al. (1992). Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, 175(1):169-74.

TARLETON, R. L. et al. (2007). The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med**, 4(12):332.

WHO (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization.** Disponible en:
http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html