

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*SARAH BEPPU ROZANEZ*

Caracterização imunológica de vírus amarílicos recombinantes expressando antígenos  
de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências

**Orientadora:** Prof. Dra. Myrna C. Bonaldo

**RIO DE JANEIRO**  
2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R893 Rozanez, Sarah Beppu

Caracterização imunológica de vírus amarílicos recombinantes expressando antígenos de *Trypanosoma cruzi* / Sarah Beppu Rozanez. – Rio de Janeiro, 2016.

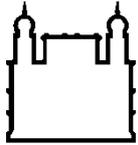
xi, 69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 62-69

1. VFA recombinante. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. ASP-2. I. Título.

CDD 616.9363079



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***Sarah Beppu Rozanez***

Caracterização imunológica de vírus amarílicos recombinantes expressando antígenos  
de *Trypanosoma cruzi*

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Myrna C Bonaldo**

**Aprovada em: 29/04/2016**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra.** Elen Mello de Souza - **Presidente**

**Profa. Dra.** Mirian Claudia de Souza Pereira

**Prof. Dr.** Wagner Baetas da Cruz

**Profa. Dra.** Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

**Prof. Dr.** Tatiana de Castro Abreu Pinto

Rio de Janeiro, 18 de Abril de 2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, ao meu pai Gilmar Rozanez e a minha mãe Célia Beppu Rozanez por me proporcionarem os melhores caminhos, as melhores possibilidades e completo apoio as minhas escolhas. Obrigada pelo amor, pelas palavras de apoio, pelo colo e por me guiarem sempre na direção do nosso Deus.

Obrigada à minha orientadora Myrna Bonaldo pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e pela orientação durante o mestrado.

Obrigada a toda equipe do Lab. Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF) pelo trabalho em conjunto, pelos ensinamentos, amizades e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável.

À Dra. Mirian Pereira, ao Dr. Alan e sua equipe do Lab. Ultraestrutura Celular pela colaboração.

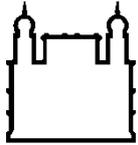
Ao Dr. Josué Lima pela ajuda e orientações no decorrer do trabalho.

À Dra. Elen Souza pela ajuda e revisão do trabalho.

Aos integrantes da banca por disponibilizarem tempo e dedicação ao estudo dessa dissertação.

Às plataformas de Bioensaio e de Elispot.

Ao programa de Biologia Parasitária.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DE VÍRUS AMARÍLICOS RECOMBINANTES EXPRESSANDO ANTÍGENOS DE *Trypanosoma cruzi*

#### Dissertação de mestrado

#### RESUMO

A doença de Chagas é considerada uma doença infecciosa negligenciada que causa, anualmente cerca de 15.000 mortes na América Latina, causando impactos econômicos e redução da produtividade em países endêmicos. A expansão da infecção por *Trypanosoma cruzi* tem induzido avanços científicos na prevenção da doença por meio da vacinação. A principal resposta contra o parasito é celular de perfil Th1 com ativação de linfócitos T CD8+ e produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . A construção de vírus recombinantes utilizando o vírus vacinal da febre amarela (VFA) 17DD como vetor para expressão da proteína ASP-2 de *T. cruzi*, constitui uma promissora abordagem para protótipos vacinais para Doença de Chagas, já estudada por nosso grupo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imunológica induzida por vírus recombinante expressando um fragmento de ASP-2 através da imunização de camundongos C57BL/6 e A/J. Visando melhorar a imunogenicidade, novas construções virais foram realizadas e testadas neste trabalho. Esses vírus recombinantes diferem entre si quanto à plataforma de expressão e quanto ao inserto. O primeiro, VFA Tc1, possui um fragmento maior da proteína ASP-2<sub>296-560</sub> expresso na plataforma I, entre as proteínas E/NS1 do VFA 17DD. O segundo possui epítomos imunodominantes para linfócitos T CD8+, TEWETGQI ou VNHRFTLV, expressos entre as proteínas NS2B/NS3 do VFA. Análises da expressão do inserto heterólogo nesses vírus indicaram a capacidade de expressar o fragmento inserido, então foi realizada uma predição de epítomos imunodominantes restritos a MHC classe I. Epítomos foram selecionados e testados, através da técnica de ELISPOT, em esplenócitos de camundongos imunizados com os vírus recombinantes. A imunização promoveu aumento de células produtoras de IFN- $\gamma$  responsivas ao inserto de ASP-2. A resposta humoral também foi avaliada, para o vírus da Febre Amarela e para a ASP-2. A maioria dos camundongos obtiveram soroconversão para o vírus FA pela técnica de PRNT, mas não foram detectados anticorpos anti-ASP2 por ELISA, no entanto quando realizada imunofluorescência com os soros dos camundongos imunizados em ninhos de amastigotas, houve marcação, indicando que há anticorpos anti-ASP2 nesses soros. Ensaio de desafio sugerem indução de resposta protetora, indicando tendências de redução de pico parasitêmico assim como retardo na morte de camundongos imunizados.

## ABSTRACT

Chagas disease is considered an infectious neglected tropical disease that causes, annually, around 15.000 deaths in Latin America, decreasing productivity and causing an economic impact in endemic countries. The expansion of *Trypanosoma cruzi* infection has led to scientific advances, as new therapies and vaccine candidates. It's known that the main response against the parasite is Th1, leading to CD8+ T cell activation and cytokine production as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . The construction of recombinant viruses using the Yellow Fever 17DD vaccine strain as a vector for *T. cruzi* ASP-2 protein expression is considered a promising approach for a novel Chagas disease vaccine, which our laboratory has been investigating. This study aim was to evaluate the immune response induced by recombinant viruses expressing an ASP-2 fragment, a protein well known to induce cellular and humoral responses in animal model, through C57BL/6 and A/J mice immunization. Aiming to improve the immunogenicity, new viral constructions were obtained and tested in this study. These recombinant viruses differ in the expression platform and the insert. One of the recombinant virus has the ASP-2<sub>296-560</sub> fragment inserted between E/NS1, while the other one has immunodominant CD8+ T cell epitope TEWETGQI or VNHRFTLV, inserted between NS2B/NS3 proteins. The heterologous protein expression was evaluate by different assays, and the results showed the recombinant viruses were capable of expressing ASP-2. Thereafter, a MHC class I epitope prediction was performed, and immunodominant epitopes were selected and tested by ELISPOT, using splenocytes from immunized mice. This assay showed that the immunization was able to increase the number of IFN- $\gamma$  producing cells. The humoral response was also evaluated for 17DD virus and ASP-2. Results from PRNT assay, showed that the majority of the mice, from both lineages, presented serum-conversion for YFV, but anti-ASP-2 antibodies were not detected by ELISA. However, immunofluorescence using cells infected with amastigotes and serum obtained from immunized mice, detected antibodies anti-ASP2. Challenge assays results suggested a protective response in immunized mice, indicating a possible reduction in the parasitemic peak as well a delay in mortality.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ALP	Fosfatase alcalina
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASP-2	Proteína 2 de superfície de amastigotas
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comitê de ética e uso de animais
CMC	Carboxi-metil-celulose
CEMIB	Centro multidisciplinar para investigação biológica
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPE	Efeito citopático
DAPI	4,3-Diamidino-2-Fenilindol
DP	Desvio padrão
dpi	Dias pós infecção
EIA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ELISPOT	Ensaio imunoenzimático por detecção de spots
FA	Febre Amarela
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GPI	Glicosilfosfatidil-inusitol
h	Horas
IEDB	Banco de dados de epítomos imunes
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDa	Quilo daltons
LABMOF	Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus
LUC	Laboratório de Ultraestrutura Celular
M	Molar
MASP	Proteína de superfície associada a mucina

MG	Média geométrica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	minutos
MOI	Multiplicidade de infecção
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	o-phenylenediamine
PBS	Tampão salina fosfato
PDTIS	Programa de desenvolvimento tecnológico em insumos para saúde
PFU	Unidade formadora de placa
PRNT	Teste de neutralização por redução de plaques
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
pH	Potencial hidrogeniônico
RIA	Rádio-imuno ensaio
RJ	Rio de Janeiro
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel poliacrilamida em tampão dodecil-sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SMM	Método matriz de estabilização
T	Tween
T.A	Temperatura ambiente
TBS	Tampão salina tris
TCR	Receptores de células T
TLR	Receptores tipo-Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TS	Transialidases
TSSA	Pequeno antígeno de superfície de <i>T. cruzi</i>
v	Volts
VFA	Vírus da Febre Amarela
WHO	Organização Mundial de Saúde
YF 17D	Cepa 17 D da vacina contra Febre Amarela (do Inglês Yellow Fever 17D)

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Organização genômica dos Flavivírus.....	3
<b>Figura 2.</b> Ciclo de replicação dos Flavivírus.....	5
<b>Figura 3.</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Processamento da poliproteína e construções virais.....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema da metodologia.....	18
<b>Figura 6.</b> Imunofluorescência para detecção da proteína ASP-2 pelos vírus recombinantes.....	31
<b>Figura 7.</b> Western blot para detecção da proteína ASP-2 pelos vírus recbominantes..	32
<b>Figura 8.</b> Detecção do número de células produtoras de IFN- $\gamma$ (camundongos C57BL/6) .....	39
<b>Figura 9.</b> Detecção do número de células produtoras de IFN- $\gamma$ (camundongos A/J).....	42
<b>Figura 10.</b> Imunofluorescência em ninho de amastigotas (camundongos A/J).....	47
<b>Figura 11.</b> Imunofluorescência em ninho de amastigotas (camundongos C7BL/6).....	49
<b>Figura 12.</b> Sobrevivência após desafio.....	51
<b>Figura 13.</b> Acompanhamento da parasitemia.....	51

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Metodologias utilizadas para vacinação experimental contra doença de Chagas.....	13
<b>Tabela 2.</b> Características físico-químicas dos cassetes ASP-2 expressos pelo VFA....	29
<b>Tabela 3.</b> Predição de epítomos.....	34
<b>3.1.</b> Epítomos preditos a partir do fragmento ASP-2 <sub>296-560</sub> para camundongos C57BL/6.....	34
<b>3.2.</b> Epítomos preditos a partir do fragmento ASP-2 <sub>296-560</sub> para camundongos A/J.....	34
<b>3.3.</b> Epítomos preditos a partir da proteína NS3 do VFA para camundongos C57BL/6.....	35
<b>3.4.</b> Epítomos preditos a partir da proteína NS3 do VFA para camundongos A/J.....	36
<b>Tabela 4.</b> Representação dos grupos de camundongos C57BL/6 imunizados.....	37
<b>Tabela 5.</b> Estímulos utilizados em esplenócitos de camundongos C57BL/6.....	38
<b>Tabela 6.</b> Representação dos grupos de camundongos A/J imunizados.....	40
<b>Tabela 7.</b> Estímulos utilizados para camundongos A/J.....	41
<b>Tabela 8.</b> Grupos de camundongos utilizados nos experimentos de PRNT.....	44
<b>Tabela 9.</b> Dados obtidos no experimento de PRNT em camundongos C57BL/6.....	44
<b>Tabela 10.</b> Dados obtidos no experimento de PRNT em camundongos A/J.....	45

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Febre Amarela.....	1
1.1.2. Genoma do vírus da Febre Amarela e replicação viral.....	2
1.1.3. A vacina para Febre Amarela e a resposta imunológica para o vírus FA.....	5
1.2. Doença de Chagas.....	7
1.2.1. Resposta imune contra infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
1.2.2. Evasão da resposta imune por <i>T. cruzi</i> .....	11
1.2.3. Estratégias de vacinação experimental contra doença de Chagas..	12
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Vírus utilizados neste trabalho.....	19
3.2. Avaliação da expressão da proteína recombinante.....	19
3.2.1. Imunofluorescência.....	19
3.2.2. Western blot.....	20
3.3. Camundongos.....	22
3.3.1. Processamento do sangue.....	22
3.3.2. Processamento do baço.....	23
3.4. Avaliação da imunogenicidade dos vírus recombinantes em camundongos imunizados.....	23
3.4.1. ELISPOT.....	23
3.5. Produção de anticorpos contra ASP-2.....	24
3.5.1. PRNT.....	24
3.5.2. ELISA.....	25

3.5.3. Imunofluorescência em células infectadas com <i>T. cruzi</i> .....	26
3.6. Ensaio de proteção em camundongos A/J desafiados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Caracterização dos vírus FA recombinantes.....	28
4.1.1. Análise físico-química dos cassetes ASP-2 nos vírus recombinantes.....	28
4.2. Avaliação da expressão da proteína recombinante.....	30
4.2.1. Imunofluorescência.....	30
4.2.2. Western blot.....	32
4.3. Avaliação da imunogenicidade dos vírus recombinantes em camundongos imunizados.....	33
4.3.1. Predição de epítomos.....	33
4.3.2. Resposta imune celular.....	37
4.3.3. Resposta imune humoral.....	43
4.3.3.1. Produção de anticorpos neutralizantes contra o VFA.....	43
4.3.3.2. Produção de anticorpos contra ASP-2.....	46
4.4. Ensaio de proteção em camundongos A/J desafiados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	50
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	61

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela foi o primeiro descrito do gênero *Flavivirus* e o primeiro vírus reconhecido como agente etiológico de uma doença em humanos, transmitido por mosquitos. A descrição mais antiga sobre a doença é de um manuscrito maia de 1648 (Monath, 1996), mas análises filogenéticas mostram uma relação evolutiva com outros vírus transmitidos por mosquitos de até 3000 anos atrás, provavelmente na África (Zanotto et al., 1996).

Em 1881, o cubano Carlos Finlay, propôs que o vírus era transmitido em humanos pelo vetor *Aedes aegypti*, mas isto só foi confirmado em 1902 por Reed & Carrol. Algumas décadas depois, Stokes, Bauer e Hudson, mostraram que macaco *Rhesus* eram susceptíveis à doença, quando inoculados com sangue de pessoas infectadas. O estabelecimento do modelo animal e o isolamento do vírus possibilitaram o desenvolvimento da vacina YF 17D, através de vírus atenuados, para Febre Amarela.

A Febre Amarela possui um ciclo urbano, em que apenas o homem é hospedeiro, e o ciclo silvestre, ocorrendo naturalmente em animais selvagens e com infecções acidentais em humanos. A forma clínica da doença é idêntica em ambos os casos de transmissão. Nas Américas, incluindo o Brasil, o vírus circula predominantemente pelo ciclo silvestre, resultando em centenas de novos casos de trabalhadores das florestas, não imunes, por ano. Casos de FA transmitida através do ciclo urbano não são reportados desde 1954, devido às campanhas da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) de erradicação do mosquito vetor (Monath, 2001). Na África a transmissão ocorre por ambos os ciclos, ocasionando grandes surtos da doença.

A doença da febre amarela caracteriza-se por febre hemorrágica aguda, com danos hepáticos e icterícia. Os sintomas associados são febre, dores de cabeça e mialgia e pode ser seguido por um período de remissão em que o sistema imunológico do paciente infectado consegue combater a infecção resultando no desaparecimento dos sintomas. Em alguns casos pode ocorrer recidivas com o reaparecimento dos sintomas além de fotofobia, artralgias, dor epigástrica, anorexia, vômito e desidratação (Quaresma et al., 2013). Em casos mais graves podem ocorrer sérios danos hepáticos, renal e miocárdica, hemorragia severa, confusão mental, convulsões e coma, podendo

levar a óbito (Monath, 2001). O índice de mortalidade dos casos graves é estimado entre 20 e 60% dependendo da zona endêmica (Monath & Vasconcelos, 2015).

No Brasil, a última epidemia registrada foi no Rio de Janeiro, em 1929. Porém, mais recentemente, entre novembro de 2008 e março de 2009, o estado do Rio Grande do Sul registrou 8 casos de febre amarela silvestre, com 5 óbitos, enquanto em São Paulo confirmou-se 22 casos, com 9 óbitos. São consideradas áreas de risco para a doença os estados do Norte, Centro-Oeste e áreas específicas do Nordeste, Sudeste e Sul.

### 1.1.2. Genoma do vírus da Febre Amarela e replicação viral

O vírus da Febre Amarela (VFA), assim como outros flavivírus, possui cerca de 50 nanômetros de diâmetro, são esféricos e com simetria icosaédrica (Lindenbach & Rice, 2003). É um vírus envelopado, envolto por bicamada lipídica procedente da célula hospedeira, onde estão inseridos dois tipos de proteínas, a proteína de Envelope (E) e a proteína de Membrana (M), ou sua precursora (prM). O nucleocapsídeo é constituído por várias cópias da proteína de capsídeo (C) que envolvem uma molécula de RNA de aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Chambers et al., 1990; Rice, 1996), fita simples e de polaridade positiva (+ssRNA). O RNA genômico viral possui regiões não codificantes (UTR) nas extremidades 3', onde não há cauda poliadenilada, e 5' onde possui uma sequência de reconhecimento ribossomal. Nessas extremidades estão presentes estruturas secundárias em forma de alça e regiões com sequências complementares responsáveis pela ciclização do RNA, essencial no processo de replicação viral.

O RNA do vírus possui apenas uma fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína de, aproximadamente, 3.411 aminoácidos. O processamento dessa poliproteína ocorre simultaneamente à tradução e após por proteases virais e celulares do hospedeiro. A porção N-terminal do genoma viral codifica para três proteínas estruturais (capsídeo (C), prM e envelope (E)). O restante do genoma codifica sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que atuam na coordenação dos processos de replicação viral, empacotamento e mecanismos de modulação da resposta imune do hospedeiro (Kuhn et al., 2002). A figura 1 esquematiza o genoma do vírus.

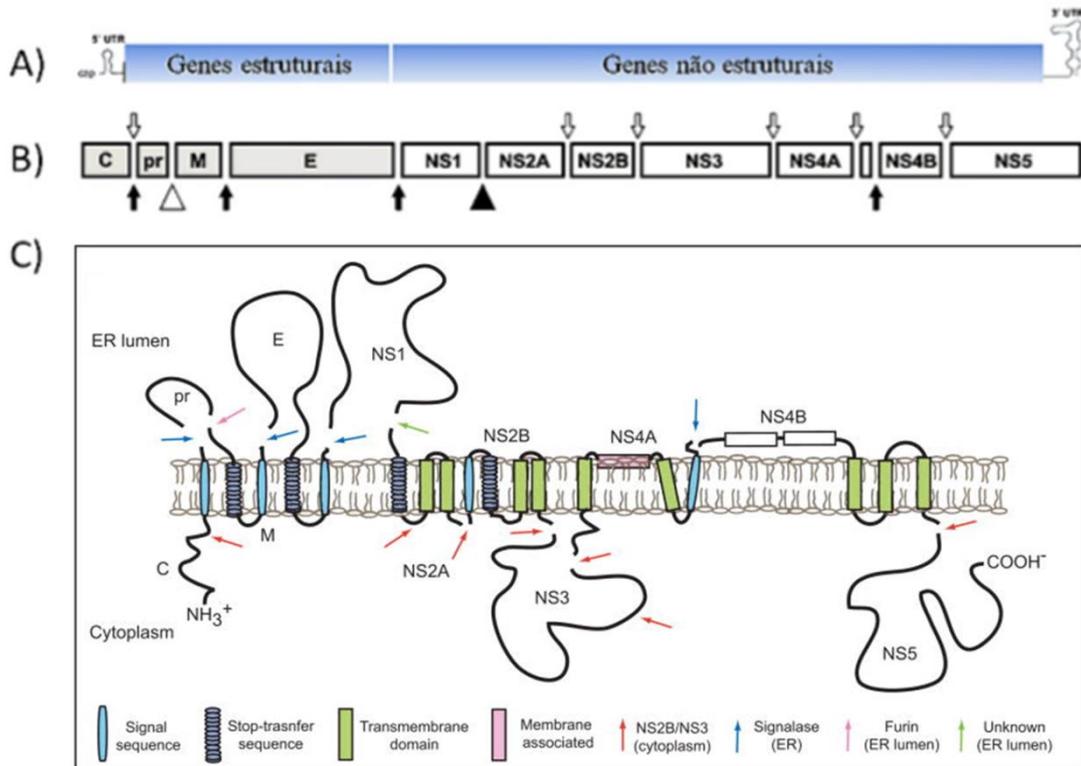


Figura 1. Organização genômica dos flavivírus. (A) Representação da fita simples positiva de RNA (ssRNA+) com duas sequências não traduzidas (UTR) 5' e 3', flanqueando regiões traduzidas em proteínas estruturais e não-estruturais. (B) Representação da poliproteína precursora onde as setas brancas indicam sítios de clivagem por protease viral NS2B/NS3, para geração de proteínas virais do lado citoplasmático da célula. Setas escuras indicam sítios de clivagem pela peptidase sinal (signalase) do hospedeiro. Triângulo aberto, indica sítio de clivagem por furina e triângulo escuro, sítio de clivagem por protease desconhecida do hospedeiro. (C) Topologia das proteínas virais na membrana do retículo endoplasmático indicando o ancoramento das proteínas estruturais (C e E) à membrana. Durante a maturação, prM é clivada pela furina, gerando o peptídeo pr e a proteína M. NS2A/2B e NS4A/4B estão ancoradas na membrana do RE como proteínas transmembranas enquanto que ocorre a liberação das proteínas não-estruturais NS1, NS3 e NS5 no citosol por proteases, conforme descritas acima. Adaptado de Perera & Kuhn, 2008.

A proteína E (Envelope), com aproximadamente 55 kDa, é o principal componente do envelope viral, contém 2 domínios transmembranares e um ectodomínio, organizado em homodímeros que recobre toda superfície viral. Cada subunidade do ectodomínio é formada por três domínios, ricos em fitas  $\beta$ -pregueadas: domínio I, que contém o N-terminal e é o domínio central da proteína E; domínio II, constitui uma estrutura alongada responsável pela dimerização, que apresenta o

peptídeo de fusão em sua extremidade; domínio III, possui uma estrutura semelhante a imunoglobulina onde estão os sítios de ligação a receptores celulares (Mukhopadhyay et al., 2005). Esta proteína desempenha um papel importante na penetração do vírus na célula hospedeira, pois é responsável pela ligação a receptores celulares e fusão à proteínas da membrana (Lindenbach et al., 2007) além da fusão da partícula viral em vesículas lisossomais, montagem da partícula viral e indução de resposta imune, sendo o principal alvo para indução de anticorpos neutralizantes. Epítomos envolvidos na neutralização foram mapeados nos três domínios da proteína E, mas há evidências de que o domínio III possui uma maior capacidade de neutralização do que os demais (Heinz & Stiasny, 2012). A proteína não-estrutural NS1 também foi capaz de produzir proteção por anticorpos em modelo animal (Diamond, et al. 2008).

Os flavivírus penetram a célula hospedeira via interação com receptores celulares. O baixo pH do microambiente endossomal resulta em mudanças conformacionais na proteína E, expondo o peptídeo de fusão que se liga à membrana do endossomo, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma. A proteína C (nucleocapsídeo) dissocia-se da fita de RNA no início da replicação do genoma e da montagem de novas partículas virais (Lindenbach & Rice, 2001; 2003). Assim que o genoma é liberado no citoplasma, o RNA é traduzido em uma poliproteína que é processada co e pós-traducionalmente por proteases virais e celulares. Através de sequências-sinais, algumas proteínas virais são translocadas ao retículo endoplasmático e ancoradas à membrana. A proteína C possui uma sequência-sinal que transloca a proteína prM para o lúmen do RE, para onde outras proteínas como a NS1 e a E também são translocadas (Falgout et al., 1989). As partículas imaturas são transportadas pelo trans-Golgi (TGN), onde a clivagem por furina da prM em pr e M leva a formação de partículas infecciosas, que deixam a célula por exocitose. Este ciclo de replicação é mostrado na figura 2.

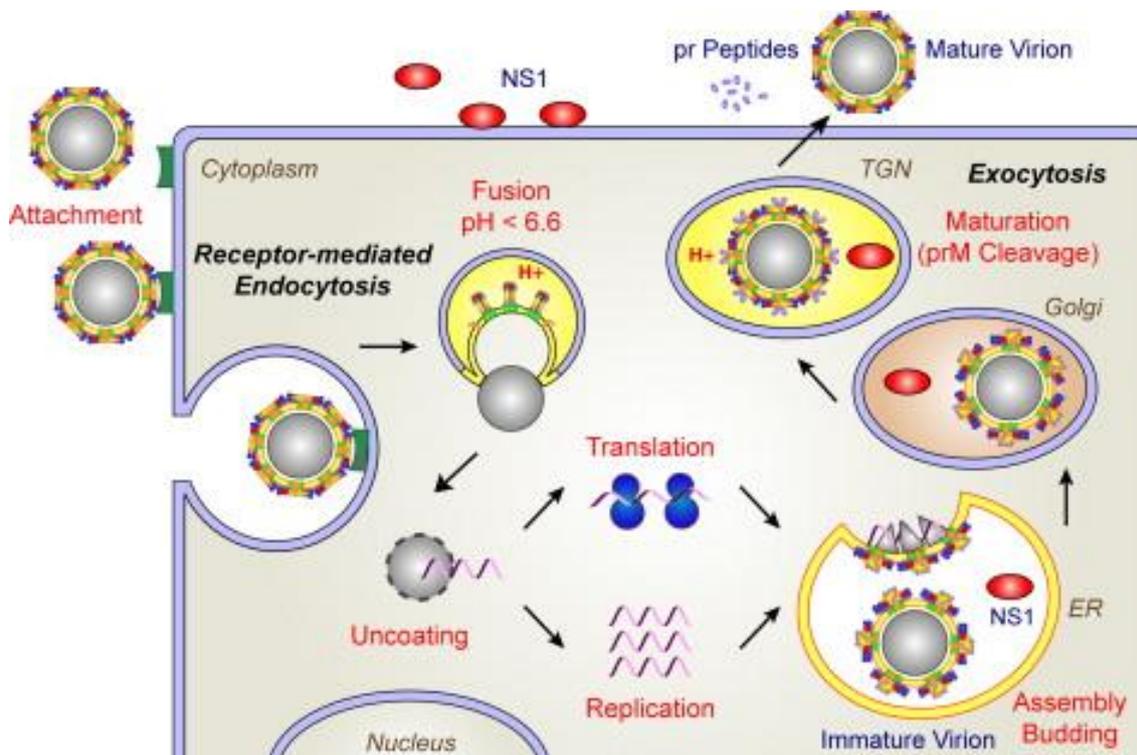


Figura 2. Ciclo de replicação dos Flavivírus. As partículas virais penetram na célula hospedeira por endocitose mediada por receptores. A acidificação do endossoma resulta na mudança conformacional da proteína E, levando à fusão do envelope viral com a membrana da vesícula. O RNA genômico é liberado no citoplasma e traduzido nas proteínas virais. A replicação do RNA genômico gera novas cópias do RNA, que são empacotadas em nucleocapsídeos no citoplasma da célula. O nucleocapsídeo brota para o interior do retículo endoplasmático, formando a partícula viral envelopada imatura, que é transportada pela via secretora da célula. Na rede do trans-Golgi (TGN) ocorrem a clivagem da proteína prM por furina e a formação da partícula viral madura, que é então liberada da célula por exocitose. A proteína não estrutural NS1 é liberada para meio extracelular em associação à membrana plasmática ou secretada (Heinz & Stiasny, 2012).

### 1.1.3. A vacina para Febre Amarela e a resposta imunológica para o vírus FA

A cepa Asibi, identificada como a linhagem selvagem virulenta do vírus da febre amarela, foi isolada através de sucessivas passagens em macacos *Rhesus* a partir de uma amostra de sangue de um homem infectado (Stokes et al., 1928). A cepa YF 17D originou-se após sucessivas passagens da cepa Asibi, sendo 18 em tecidos embrionários de camundongo, 58 em tecido embrionário de galinha e 128 passagens em tecidos embrionários de galinha desnervados, na tentativa de reduzir o neurotropismo e o viscerotropismo viral (Theiler & Smith, 1937). A cepa 17D originou os genótipos 17DD

na passagem 195 e 17D-204 na passagem 204 (Galler et al., 1998). Ambas as subcepas foram ainda cultivadas em ovos embrionários de galinha, onde são produzidas as vacinas atuais, as quais estão na passagem 235-240 e 287-289, respectivamente. A 17DD é utilizada no Brasil, produzida por Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ, enquanto a 17D-204 é usada no resto do mundo (Monath, 1999).

A vacina contra febre amarela (FA 17D) é uma das vacinas mais seguras e eficazes já administradas em humanos (Monath, 2001). É capaz de induzir uma resposta imune polivalente e duradoura com apenas uma dose. Além disso, atende a alguns requisitos necessários para novos candidatos vacinais, pois possuem eficácia e segurança comprovada e condição de produção em larga escala. A proteção em indivíduos vacinados é mediada principalmente por anticorpos específicos a proteína E e à proteína NS1 do vírus FA, mantendo-se por mais de 35 anos (Polland et al., 1981; Brandriss et al., 1990). Estudos comprovaram que a imunização com a proteína E e NS1 do vírus FA ou uma imunização passiva com anticorpos monoclonais dirigidos a estas proteínas, foram capazes de proteger camundongos e macacos contra um desafio letal com os VFA (Schlesinger et al., 1985).

A resposta imune inata possui um papel fundamental no mecanismo de defesa contra o vírus. Ao infectar o organismo, em um primeiro momento, as células dendríticas reconhecem o patógeno através de receptores tipo Toll (TLR 2, 7, 8 e 9) seguindo a via de processamento e apresentação via MHC classe I para linfócitos T CD8+. A ativação das células dendríticas também promove a liberação de citocinas que mediarão a resposta adaptativa, como IL-2, IL-6 e IFN tipo I (Barba-Spaeth et al., 2005). As células natural killer (NK) também atuam na indução da resposta imune adaptativa através da secreção de citocinas (Moretta et al., 2002). A vacinação com FA 17D também ativa células NK em até dois dias após a vacinação, demonstrado pela presença de marcadores de superfície como CD69 e antígenos leucocitários humanos (Neves et al., 2009). Essa ativação é dependente do reconhecimento via TLR 3 e TLR9 do RNA de fita dupla, ou seja, o RNA intermediário replicativo viral, tornando as células NK fortemente citotóxicas e produtoras de IFN- $\gamma$ , delineando um perfil de resposta prevalentemente Th1. Além disso, há também aumento de ativação de fagócitos mononucleares que também contribuem para eliminação do vírus (Martins et al., 2008).

## 1.2. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma tripanossomíase causada pelo parasita intracelular obrigatório flagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberto por Carlos Chagas, em 1909 (Chagas, 1909). A doença, considerada negligenciada, é endêmica nos países das Américas sul e central e provoca mais de 15.000 mortes anuais, cerca de 8 milhões de indivíduos permanecem infectados, representando um dos mais significativos problemas das Américas, nos quesitos de saúde humana, impacto socioeconômico e distribuição geográfica (WHO, 2013). O ciclo de *T. cruzi* permaneceu nas Américas como uma enzootia, mantida em animais e em ambientes selvagens, por milhões de anos até o início do século XX e era restrita a áreas rurais e pobres. A ocupação humana e a consequente modificação destes ambientes agravaram o problema do ponto de vista epidemiológico (Coura et al., 2007; Alárcon et al., 2010). Outro fator agravante foi o fluxo de imigração, propagando a doença para áreas não-endêmicas como Canadá, Europa, Austrália e Japão, onde a transmissão pode ocorrer por transfusão sanguínea, da mãe para o feto e transplantes, já que não há o vetor invertebrado de transmissão. No entanto, nos EUA já houve erradicação da transmissão transfusional devido ao controle rigoroso dos bancos de sangue. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, em 2005, 20 % da população latino-americana (109 milhões de indivíduos) estavam sob risco de infecção, com cerca de 7,7 milhões de indivíduos infectados (OPAS, 2009).

No Brasil, estudos indicam que há cerca de três milhões de portadores da doença de Chagas. Nos anos 70 a área endêmica incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, em 711 destes municípios o vetor principal, *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro, estava presente (Brasil, 2012). Houve, no entanto, em 1991, uma iniciativa da Organização Pan-Americana de Saúde, chamada Cone Sul que previa a eliminação do vetor bem como a triagem de bancos de sangue e o controle dos doadores, reconhecendo a importância da transmissão transfusional da doença de Chagas (Schofield et al., 2006). Com o apoio dos governos envolvidos, conseguiu-se através de campanhas de saúde pública, investimentos financeiros, e ações de controle da endemia, resultados satisfatórios na epidemiologia da transmissão chagásica. A região amazônica apresenta o maior número de casos da doença e é considerada uma região endêmica da doença. Entre 1997 e 2008, foram registrados 617 casos, representando um pequeno surto, associado a transmissão oral, através da ingestão de frutas regionais (Barbosa-Ferreira et al, 2010). De 2000 a 2011, segundo o

Ministério da Saúde, foram registrados 1.252 casos da doença de Chagas no Brasil, sendo que 70% ocorreram por transmissão oral e apenas 7% a transmissão foi via vetorial, outros casos não tiveram a forma de transmissão identificada (Brasil, 2012).

A transmissão natural do *T. cruzi* ocorre pelo hospedeiro invertebrado do gênero *Triatoma spp* (família Reduviidae), popularmente conhecido como barbeiro. A figura 1 representa o ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, abordando tanto a passagem do parasita no hospedeiro invertebrado quanto no hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca e urina na pele do hospedeiro vertebrado, transmitindo as formas tripomastigotas metacíclicas do parasita. Ao penetrarem na pele ou mucosas, esses parasitas invadem as células, adquirindo formas amastigotas intracelulares e replicativas. As células infectadas podem ser lisadas liberando tanto formas amastigotas quanto tripomastigotas que infectam novas células e podem entrar na corrente sanguínea e colonizar outros tecidos. *T. cruzi* possui tropismo pelo tecido muscular e nervoso, onde formam ninhos de amastigotas. Quando o inseto se alimenta do sangue de vertebrados infectados, ingere sangue contendo tripomastigotas, no trato digestivo há diferenciação para formas epimastigotas, que se replicam assexuadamente colonizando o reto do vetor, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos infectivos, completando o ciclo de vida do parasito (de Souza et al. 2010).

A doença de Chagas pode seguir diferentes cursos clínicos, alguns fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro são determinantes para o desencadeamento da doença, como a carga parasitária inicial e a linhagem do parasito, a rota de infecção e o status imune do hospedeiro. Após o primeiro contato com o *T. cruzi*, o hospedeiro desenvolve a fase aguda da doença que pode durar em torno de dois meses. Durante esta fase um alto número de parasitos podem ser encontrados no sangue e tecidos, assim como altos níveis de citocinas plasmáticas e proteínas de fase aguda, levando a uma intensa ativação de linfócitos B e T, caracterizando um processo inflamatório intenso nos tecidos infectados. Cerca de 30% dos indivíduos infectados progridem para fase crônica sintomática, desenvolvendo complicações cardíacas, neurológicas e gastrointestinais, ou na maioria dos casos, assintomática, na qual o paciente pode permanecer até por décadas (fase indeterminada). Nesta fase, pouco ou nenhum parasito é encontrado na corrente sanguínea, mas pode ocorrer reativação da doença em casos de imunossupressão (Rodrigues et al., 2012).

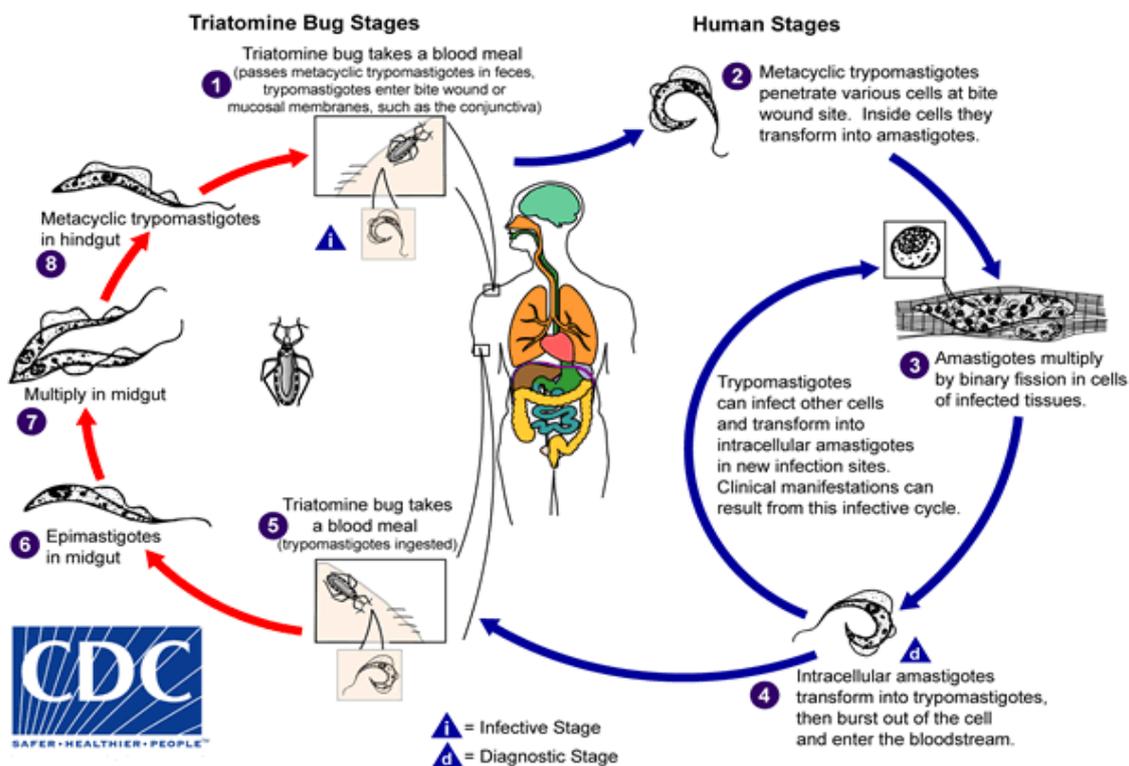


Figura 3. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

O único tratamento aprovado para pacientes infectados com *T. cruzi* é realizado pelas drogas benzonidazol e nifurtimox. Apesar de ser utilizado há mais de 40 anos, o uso contínuo desses medicamentos podem ser altamente tóxico a crianças e adultos, não são efetivos durante a fase crônica tardia de infecção e pode induzir a resistência do parasito, além da ocorrência de cepas naturalmente resistentes.

O complexo ciclo de vida do *T. cruzi*, sua ocorrência em diferentes ambientes, silvestre, rural e urbano, além dos fatores ambientais e relacionados aos hospedeiros interferem no desenvolvimento e curso da doença. Dessa maneira, o estudo sobre tratamento e estratégias de vacinação contra a doença de Chagas trazem grandes desafios para a medicina tropical (Bermudez et al.,2016).

### 1.2.1 Resposta imune contra a infecção por *Trypanosoma cruzi*

Na fase inicial da infecção, o *T. cruzi* ativa células natural killers (NK) e macrófagos que induzirão uma cascata de citocinas, principalmente IL-12 que atuará na produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, que por sua vez induzirá a produção de mais IL-

12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, contribuindo para eliminação do parasita. Ao mesmo tempo citocinas regulatórias da inflamação, como IL-10 e IL-4, são liberadas para reduzir os efeitos danosos da resposta intensa (Camargo et al., 1997; Sathler-Avelar et al., 2009). Essa resposta inicial deve-se aos componentes do *T. cruzi*, como DNA e glicoconjugados da membrana (proteínas e componentes da âncora de GPI – glicosilfosfatidil-inusitol), que induzem receptores Toll-like (TLR 2, 4 e 9) em células dendríticas e macrófagos, tornando-as ativas produtoras de citocinas e quimiocinas, induzindo a endocitose e morte intracelular do parasito (Cunha-Neto et al., 2009). Assim como em humanos, em modelos murinos o reconhecimento do parasita também ocorre via TLR, produzindo citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e espécies reativas de oxigênio como NO, caracterizando um perfil de resposta TH1, essencial na proteção contra *T. cruzi* (Aliberti et al., 2001; Silva et al., 2005; Basso, 2013). No entanto, a IL-17 possui papel importante no balanceamento dessa resposta em tecido cardíaco infectado, regulando o recrutamento de células TH1 e induzindo a produção de IL-4 e IL-10 por células TH2, que estão envolvidas na resposta humoral (da Matta Guedes et al., 2010).

As células T CD8+ são importantes efetoras da resposta imune adaptativa contra infecções causadas por protozoários como *T. cruzi*, *Leishmania sp.* e *Plasmodium sp* (Rodrigues et al., 2003). Além de secretar IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , linfócitos T CD8+ que matam as células parasitadas via liberação de granzimas e perforinas (Muller et al., 2003). Além da resposta celular, a resposta humoral desempenha um papel muito importante no controle da infecção. Modelos experimentais com produção deficiente de anticorpos apresentaram baixa taxa de sobrevivência e alta parasitemia (Kumar & Tarleton, 1998). Camundongos da linhagem C57BL/6 são conhecidos pela sua resistência à infecção por *T. cruzi*, isto pode estar associado ao fato de que a resposta humoral específica e policlonal nesses animais é bastante baixa, prevalecendo a resposta celular de perfil TH1 com produção de IFN- $\gamma$  (Bryan et al., 2010). Estudos recentes mostram que *T. cruzi* induz ativação policlonal de linfócitos B, os quais não sintetizam anticorpos específicos nos primeiros dias da infecção, mas sim no final da fase aguda, podendo resultar em uma hipergamaglobulinemia e possivelmente desencadear um quadro autoimune mediado por anticorpos auto-reativos (Bermejo et al., 2010).

### 1.2.2. Evasão da resposta imune por *T. cruzi*

A evasão da resposta imune por *T. cruzi* é dependente de uma combinação de fatores que incluem a modulação da resposta por citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- $\beta$ , a variabilidade de seus antígenos de superfície, o mimetismo molecular e a resistência ao sistema complemento (dos Reis, 2011).

A ativação de células T CD8<sup>+</sup> depende da densidade e da afinidade dos antígenos que são apresentados para o MHC-I pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), via receptores de células T (TCR). Sendo assim, a variabilidade de proteínas distintas que são liberadas por *T. cruzi*, durante o processamento via MHC-I, poderiam contribuir para uma resposta menos específica, além da apresentação simultânea de moléculas homólogas levando a depleção de células T naive e efetoras.

O genoma do *T. cruzi* contém aproximadamente 12.000 genes, no entanto, apenas uma parte demonstrou conter epítomos de classe I, que são em sua maioria expresso pela super-família de antígenos de superfície denominadas trans-sialidades (TS). A ASP-2 pertence à sub-família II das trans-sialidades. Essas proteínas desempenham funções biológicas essenciais ao parasito, como passagem do parasita pelo inseto vetor, adesão e invasão às células de mamíferos, interação e modulação do sistema imune do hospedeiro, sobrevivência, replicação e manutenção do *T. cruzi* no organismo, além da determinação do curso da patologia nas fases aguda e crônica da doença de Chagas (Dc-Rubin & Schenkman, 2012). As TS estão associadas a caudas de GPI na superfície da membrana do parasito e possuem como função hidrolisar e transferir ácido siálico de glicoconjugados da superfície do hospedeiro a aceptores do tipo mucina na membrana do parasito (Schenkman & Eichinger, 1993). A superfamília das TS compreendem mais de 800 famílias de genes, assim milhares de proteínas antigênicas podem ser liberadas no citosol de células infectadas para o processamento via MHC I, assim esses epítomos podem competir pela apresentação na superfície da célula hospedeira ou ainda atuando como antagonista de células T específicas (Martin & Tarleton, 2004). Além disso, um estudo de proteção cruzada entre diferenças cepas de *T. cruzi* mostrou que poucas cepas podem expressar isoformas diferentes de ASP-2, que não compartilham epítomos protetores, tornando esse antígeno um importante alvo para estudos de vacinação (Claser & Espindola et al., 2007).

O efeito da imunodominância é um dos mecanismos de evasão do sistema imune mais eficazes em *T.cruzi*, a identificação desses epítomos tornou possível compreender melhor esse fenômeno e aplica-lo a novos e desafiadores estudos de estratégias de vacinação contra a doença de Chagas (Rodrigues et al., 2009).

### 1.2.3. Estratégias de vacinação experimental contra a Doença de Chagas

Os primeiros estudos foram baseados no uso do parasita morto ou atenuado, inoculado em animais experimentais. No entanto, apesar de ter havido baixa na parasitemia e, em alguns casos, menor mortalidade, as cardiopatias e complicações da fase crônica da doença permaneceram (Rodriguez-Morales et al., 2015).

Através de estudos moleculares dos antígenos de *T. cruzi* foi possível utilizar proteínas recombinantes baseadas no reconhecimento específico desses antígenos, principalmente aqueles derivados das proteínas trans-sialidases. Vasconcelos et al. (2003), mostraram que a imunização de camundongos susceptíveis à infecção por *T. cruzi* com plasmídeos codificando genes de TS induziu uma resposta do tipo TH1. Enquanto que a imunização com proteínas recombinantes de TS induziram um perfil de resposta TH2. Quando esses animais foram inoculados com plasmídeo e proteína recombinante associados, foi visto uma maior taxa de resposta TH1, com aumentos de produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  por células T CD8+ e CD4+.

Além das TS, outras proteína também são estudadas como indutoras de resposta imune específicas, como a proteínas paraflagelares (Luhrs et al., 2003) e cruzipaína (Cazorla et al., 2010). No entanto, as trans-sialidases constituem os maiores alvos de células T CD8+ específicas para *T. cruzi* (Tarleton, 2007). A tabela 1, descrita por Beaumier et al. (2016), resume e apresenta os sistemas estudados que estão em fase de testes pré-clínica para vacinação contra a doença de Chagas.

<b>Candidato Nome /Identificação</b>	<b>Desenvolvedor</b>	<b>Plataforma/ Antígenos</b>	<b>Referências</b>
Tc24	UADY, CINVESTAV, Sabin Vaccine Institute- PDP	DNA, proteína recombinante	Matínez-Campos et al., 2015; Quijano-Hernandez et al., 2013
TSA-1	UADY, CINVESTAV, Sabin Vaccine Institute- PDP	DNA, proteína recombinante	Quijano-Hernandez et al., 2013; Knight et al., 2014
<i>Trypanosoma cruzi</i> vivo atenuado	Universidad Nacional de Salta	Parasita vivo atenuado	Perez Brandam et al., 2012; Sanchez-Valdez et al., 2015
<i>T. rangeli</i> vivo	Universidad Nacional de Córdoba	Parasita vivo	Basso & Marini, 2014; Basso et al., 2014
ASP-2	Universidade Federal de São Paulo	Vetor Adenovírus	Araújo et al., 2014; Barbosa et al., 2013; Rampazzo et al., 2015
TS	Universidad Nacional del Litoral	Proteína recombinante	Bontempi et al., 2015
Cruzipain	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad de Buenos Aires	Vetor Salmonella	Carzola et al., 2015; Duschak & Couto, 2009
GP83	University of Alabama at Birmingham	Vetor Adenovírus	Farrow et al., 2014
EpítopoTSSA CD8 <sup>+</sup>	Universidade de São Paulo	Proteína recombinante	Balouz et al., 2015; De Marchi et al., 2014
Tc52	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad de Buenos Aires	Vetor Salmonella	Carzola et al., 2015; Matos et al., 2014
TcG1, TcG2, TcG4, TcVac2, TcVac4	University of Texas Medical Branch	Prime-boost DNA-proteína recombinante	Gupta & Garg, 2010; Gupta et al., 2014; Aparicio-Burgos et al., 2014
MASP	University of Texas at El Paso	Peptídeo	Serna et al., 2014
TS, ASP-2	Universidade Federal de Minas Geral e FIOCRUZ- MG	Vetor Adenovírus e Influenza	Barbosa et al., 2013

Tabela 1. Resumo das metodologias utilizadas em ensaios de vacinação experimentais contra *Trypanosoma cruzi* (Adaptado de Beaumier et al., 2016).

A proteína de superfície de amastigota 2 (ASP-2), purificada e parcialmente sequenciada por Pan e McMahon-Pratt (1989) foi descrita como uma TS inativa, reconhecida em soro humano de pacientes chagásicos, sugerindo seu potencial uso no diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (Wrightsmann et al., 1994; Low & Tarleton, 1997). ASP-2 possui 83 kDa, possui um motivo de ácido aspártico (ASP box), presente nas sialidases bacterianas e um motivo altamente conservado, característico do módulo do tipo três de fibronectina, o que a classifica como pertencente a subfamília II da superfamília das trans-sialidades de *T. cruzi* (Cross & Takle, 1993). Essa proteína possui múltiplos epítomos restritos a MHC I, reconhecidos por células T CD8<sup>+</sup> de camundongos e do homem (Low et al., 1998; Wizel et al., 1998).

Vários estudos evidenciam a importância da resposta imune dirigida a ASP-2, mostrando que a imunização com genes ou domínios proteicos da proteína é capaz de induzir resposta específica de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de perfil TH1, levando a redução da parasitemia na fase aguda e a redução da mortalidade em camundongos desafiados com *T. cruzi* (Boscardin et al., 2003; Vasconcelos et al., 2004; Barbosa et al., 2013; Nogueira et al., 2013; Vasconcelos et al., 2014) além de reduzir a inflamação tecidual em fase crônica da infecção (Araújo et al., 2005).

Uma estratégia muito promissora utilizada nos estudos de vacinação é a utilização de vírus recombinantes que carregam fragmentos de proteínas heterólogas. Machado et al. (2006), utilizaram adenovírus recombinantes para expressar antígenos de *T. cruzi* e inocularam camundongos BALB/C, os quais tiveram a imunidade protetora aumentada em até 100%. Outro estudo mostrou que a imunização de camundongos C57BL/6 e C3H/He com vírus influenza e adenovírus recombinantes, resultaram em aumento das células T CD8<sup>+</sup> específicas a epítomos imunodominantes de ASP-2 e aumento da sobrevivência em camundongos vacinados e desafiados com *T. cruzi* (Barbosa et al., 2013).

Nogueira et al. (2011; 2013) obtiveram dois vírus vacinal da Febre Amarela 17D (FA 17D) recombinantes para ASP-2 da cepa Y de *T. cruzi*. O primeiro expressa um fragmento de ASP-2, compreendendo os resíduos de aminoácidos de 261 a 380 entre as proteínas E e NS1. Nos outros construtos, os epítomos imunodominantes TEWETGQI e

VNHRFTLV são expressos entre as proteínas não-estruturais NS2B e NS3 e também na proteína E do envelope viral, gerando três vírus recombinantes que diferem quanto a sua plataforma de expressão. Neste fragmento de ASP-2<sub>296-560</sub> expresso, estão contidos epítomos imunodominantes para células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, e tanto a resposta celular quanto a humoral foram avaliadas. Foi visto que a imunização de camundongos utilizando os três diferentes vírus isolados ou combinados entre si, também foi capaz de aumentar a resposta específica de células T CD8<sup>+</sup>, com aumento de produção de IFN- $\gamma$  e aumento da sobrevivência em camundongos desafiados. Porém, foi observado que esses vírus expressando o peptídeo TEWETGQI e o fragmento ASP-2<sub>261-380</sub> apresentaram-se mais atenuados *in vivo* do que o vírus FA 17D, controle vacinal, quando comparados a capacidade de indução de anticorpos neutralizantes para o VFA. Uma possível causa poderia ser o caráter ligeiramente hidrofóbico do fragmento inserido, o que poderia impedir ou perturbar a correta orientação estrutural do cassete heterólogo. Diante disso, novos vírus foram construídos, como representado na figura 4, utilizando as metodologias descritas anteriormente: (1) vírus expressando o fragmento de 265 aminoácidos de ASP-2, posição de aminoácidos de 296 a 560, cujo gene codante foi inserido na região E/NS1 do vírus FA. Para expressão nessa região foi duplicada um fragmento de 9 aminoácidos da proteína NS1 e o domínio haste-âncora da proteína E, conforme descrito por Bonaldo e colaboradores (2007), totalizando um cassete de expressão de 349 aminoácidos para o vírus recombinante Tc1; (2). Foram realizadas modificações no cassete de expressão (em processo de pedido de proteção intelectual), onde foi inserido o mesmo fragmento de ASP-2 de 265 aminoácidos, resultando no vírus chamado Tc2, que contém 398 aminoácidos, inseridos na região E/NS1. Estes vírus recombinantes contêm na sequência do fragmento ASP-2, além do epítipo imunodominante TEWEGQI, que é utilizado para caracterização da resposta imune em camundongos A/J (alelo H-2K<sup>k</sup>), o epítipo imunodominante, VNHRFTLV, de haplótipo H-2K<sup>b</sup> que servirá como epítipo repórter para a avaliação de resposta imune celular em camundongos C57BL/6; (3) Vírus que expressa o epítipo VNHRFTLV ou TEWETGQI na região NS2B-NS3 do vírus FA17D, chamados vírus NS2B3vnh e NS2B3tew, respectivamente. Ambos os epítomos são imunodominantes para camundongos C57BL/6. Estes novos vírus recombinantes foram utilizados neste trabalho para avaliação da indução da imunidade protetora em camundongos C57BL/6 e A/J.

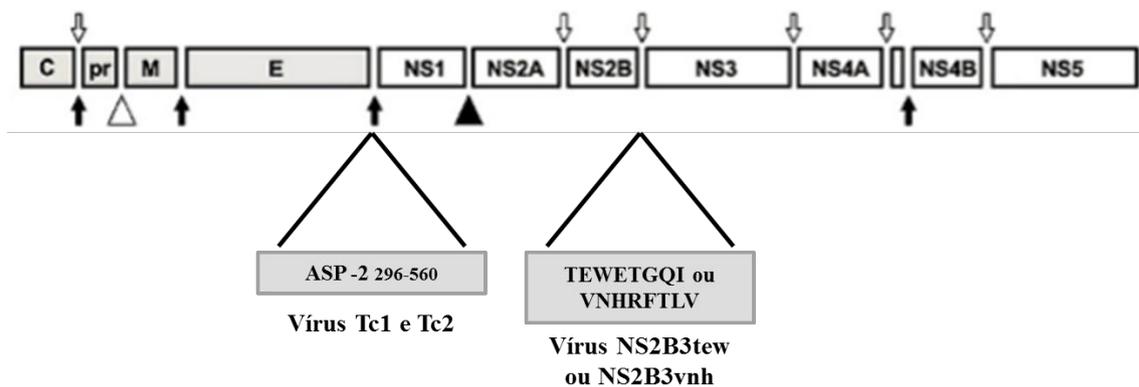


Figura 4. Processamento da poliproteína e construções virais. Representação da poliproteína do vírus da Febre Amarela precursora, com aproximadamente 3400 aminoácidos. As setas brancas indicam os sítios de clivagem por proteases virais, que geram proteínas virais no lado citoplasmático da célula. Setas escuras indicam clivagem pela peptidase sinal do hospedeiro. O triângulo claro indica sítio de clivagem por furina e o escuro indica clivagem por protease desconhecida do hospedeiro. Entre as regiões E/NS1 está representado a inserção do cassete recombinante dos vírus Tc1 e Tc2, entre as regiões NS2B/NS3 estão inseridos os peptídeos imunodominantes originando os vírus NS2B3tew e NS2B3vnh.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver o vírus vacinal da febre amarela 17D como um vetor vacinal usando como modelo a expressão de antígenos de *Trypanosoma cruzi*, e a caracterização da resposta imunológica celular e humoral induzida pelo vírus vacinal da febre amarela 17DD e pelos protótipos vacinais recombinantes em camundongos C57BL/6 e A/J.

### 2.2. Objetivos específicos

- Análises físico-químicas comparativas dos vírus FA Tc1, FA Tc2, FA NS2B3tew, FA NS2B3vnh e expressão da ASP-2 recombinante por esses vírus.
- Avaliação funcional de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e indução de resposta celular específica a ASP-2, através da técnica de ELISPOT para detecção de IFN- $\gamma$ , em camundongos imunizados com os vírus recombinantes.
- Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes dirigidos ao vírus da FA induzidos pela imunização de camundongos com os vírus recombinantes.
- Avaliação de produção de anticorpos, pela técnica de ELISA, dirigidos a ASP-2 em camundongos imunizados com os vírus recombinantes.
- Ensaio de desafio com *Trypanosoma cruzi* para avaliação da imunidade protetora induzida por camundongos imunizados, através da verificação de parasitemia e mortalidade.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF) na unidade IOC da Fiocruz e no biotério do pavilhão Leônidas Deane, nessa mesma unidade. Os ensaios de desafio foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular (LUC), IOC-Fiocruz, sob a liderança da Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira. Todos os experimentos foram regulamentados e autorizados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) sob a licença LW-0047/11 da FIOCRUZ.

A Figura 5 mostra, resumidamente, as etapas realizadas neste trabalho.

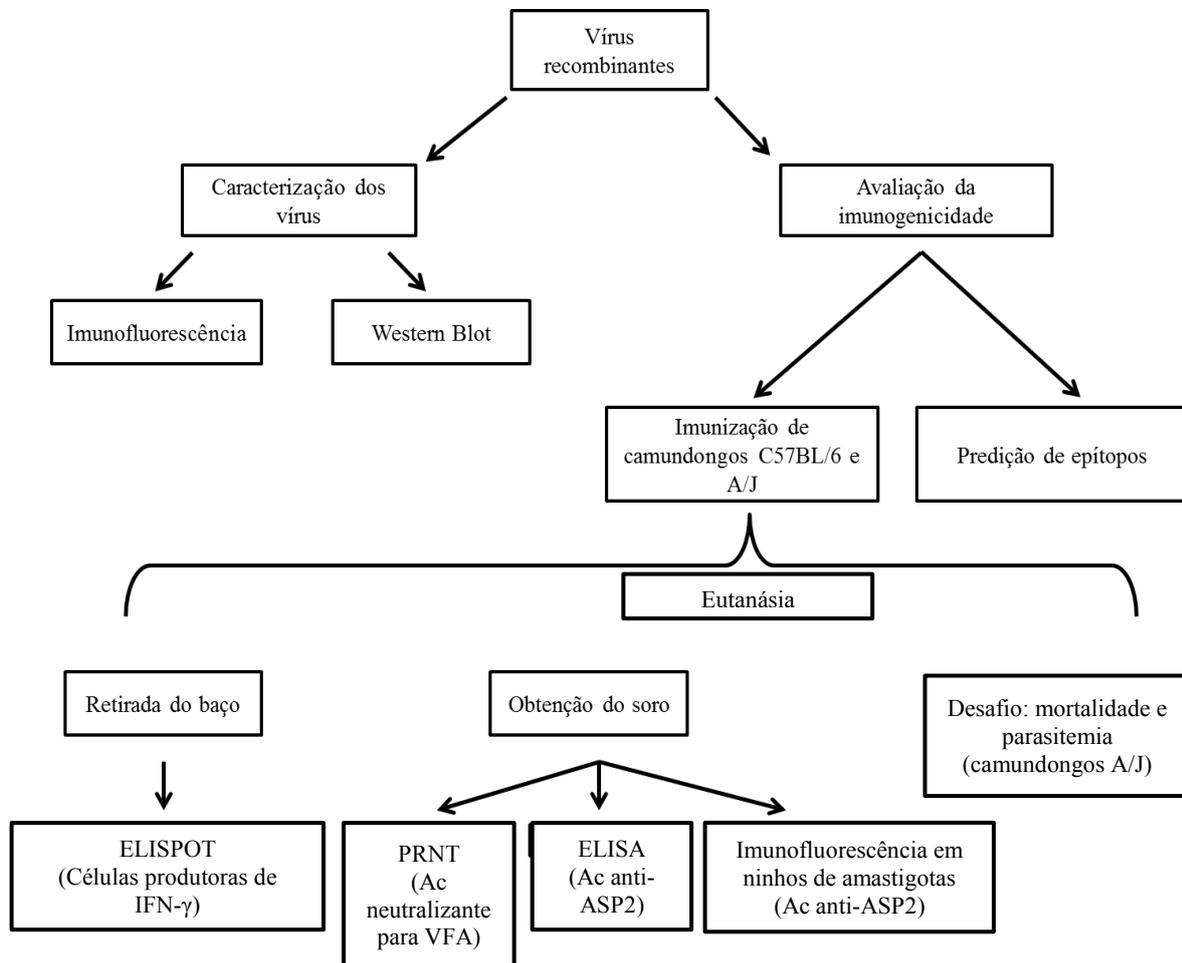


Figura 5. Esquema das etapas realizadas neste trabalho para caracterização dos vírus recombinantes e avaliação da resposta imunológica induzida por camundongos imunizados com esses vírus.

### 3.1. Vírus utilizados neste trabalho

<b>Vírus</b>	<b>Descrição</b>
<b>FA 17DD</b>	Vírus vacinal da Febre Amarela, obtido de Bio-Manguinhos, Fiocruz.
<b>FA Tc1</b>	Vírus recombinante (plataforma I) expressando o inserto da proteína ASP-2 <sub>296-560</sub> , entre as proteínas E/NS1 do genoma viral.
<b>FA Tc2</b>	Vírus recombinante (plataforma II) expressando o inserto da proteína ASP-2 <sub>296-560</sub> , entre as proteínas E/NS1 do genoma viral.
<b>FA NS2B3tew</b>	Vírus recombinante expressando o epítipo imunodominante TEWETGQI (camundongo A/J, alelo H-2K <sup>k</sup> ) entre as proteínas NS2B/NS3 do genoma viral.
<b>FA NS2B3vnh</b>	Vírus recombinante expressando o epítipo imunodominante VNHRFTLV (camundongo C57BL/6, alelo H-2K <sup>b</sup> ) entre as proteínas NS2B/NS3 do genoma viral.

### 3.2. Avaliação da expressão da proteína recombinante

#### 3.2.1. Imunofluorescência.

Para os experimentos de microscopia de fluorescência, células Vero foram semeadas na véspera em lâminas de vidro de 8 poços (Lab-Tec Chamber Slide System – Nunc) com densidade de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e infectadas com os vírus 17DD e recombinantes (como descritos no tópico 1, desta seção) com MOI de 0,02. Após 72 h de infecção, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de novas lavagens com PBS. As células fixadas foram permeabilizadas com solução de 0,5% de Triton X-100 em PBS com incubação à temperatura ambiente por 15 min, seguido de lavagem

com tampão de bloqueio (PBS + 1% BSA) e incubação por 10 min à T.A com este tampão. O tampão foi então removido e adicionou-se o anticorpo primário para proteína ASP-2 (Purified antibody-ASP-2 fragment 30kDa, GenScript) diluído 1:1000 e incubado por 1 h à T.A. Após lavagens com tampão de bloqueio, foi adicionado o anticorpo secundário anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), diluído 1:500 em tampão de bloqueio e incubado por 1 h à T.A, seguido de lavagens com tampão de bloqueio. Para montagem das lâminas, as divisórias dos poços foram descoladas com auxílio do carrossel provido pelo fabricante das lâminas e foram adicionadas duas gotas de SlowFade Antifade DAPI (Molecular Probes) para marcação do núcleo das células. A seguir, a lâmina foi coberta com uma lamínula de vidro e selada com esmalte. As análises de fluorescência foram realizadas no microscópio invertido IX51 (Olympus) com filtros: U-MWG2 (Rodamina e Alexa Fluor 546), comprimento de onda 510-550; U-MWU2 (DAPI) (330-385), objetiva de 40X, e as imagens adquiridas através do programa DP Controller e visualizadas através do programa DP Manager (DP-BSW v3.1 - Olympus). As fotos foram posteriormente exportadas para o formato TIFF e as pranchas foram montadas com auxílio do programa PowerPoint (Microsoft Office).

### 3.2.2. Western blot

Células Vero foram preparadas na véspera em placas de 6 poços com densidade de 62.500 células/cm<sup>2</sup>. O sobrenadante foi removido e as células infectadas com MOI de 0,02 com os vírus descritos no tópico 1. Para obtenção do sobrenadante celular, as células infectadas foram cultivadas com meio VP-SFM (Gibco) suplementado somente com glutamina, sem soro fetal bovino. Após 72 h de infecção, quando as células apresentavam CPE intenso, o sobrenadante da cultura foi transferido para tubos Falcon, clarificado por centrifugação a 2000 x g por 10 min e filtrado em membrana de 0,22 µm. Aliquotas de 1 mL do sobrenadante filtrado foram congeladas a -80° C para posterior análise. Para concentração destas amostras foi feita precipitação com 25% de ácido tricloroacético seguida de duas lavagens com 200 µL de acetona 100% ou através de centrifugação em colunas Amicon Ultra 0,5 (Millipore) com limite de 30 kDa. A monocamada de células infectadas foi lavada com PBS e em cada poço foi adicionado 500 µL de tampão Complete Lysis-M (Roche) contendo coquetel de inibidores

proteolíticos provido pelo fabricante. A lise celular se deu por incubação com este tampão por 5 min à T.A, com agitação ocasional leve. Após este período, o lisado foi homogeneizado com a pipeta, transferido para tubos Eppendorf, clarificado por centrifugação a 14000 x g por 10 min e congelado em alíquotas a -80° C.

No momento da análise por Western-blot, as alíquotas de lisado e sobrenadante foram descongeladas e diluídas em tampão Laemmli (Bio-Rad) contendo 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) e aquecidas a 95° C por 5 a 10 min para desnaturação das proteínas. As proteínas desnaturadas foram aplicadas ao gel de poliacrilamida 12% e submetidas a SDS-PAGE utilizando sistema Mini-PROTEAN II Cell ou Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) em tampão de eletroforese (Tris-glicina contendo 1% de SDS), sob voltagem de 100 a 200 v. Para acompanhamento da corrida e controle dos pesos moleculares, foi aplicado o marcador Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) ou Prestained Broad Range Standards (Bio-Rad) paralelamente às amostras em cada gel. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de PVDF utilizando-se o iBlot Dry Blotting System (Invitrogen) a 20 v por 6:40 min a 7 min, segundo as recomendações do fabricante. A membrana foi cortada com auxílio de uma lâmina de bisturi e bloqueada por incubação com solução de TBS-T (TBS pH 7,4 com 0,1 % Tween 20) com 5% leite desnatado por 45 min à T.A ou durante a noite a 4° C sob agitação constante, seguido de 4 a 6 lavagens com TBS-T. A seguir, as membranas foram cobertas com solução TBS-T com 1% leite desnatado contendo a diluição de 1:500 do anticorpo primário (Purified antibody-ASP-2 fragment 30kDa, GenScript) e incubadas por 2 h à T.A ou durante a noite a 4° C sob agitação constante, seguido de 4 a 6 lavagens com TBS-T. As membranas foram então cobertas com solução de TBS-T com 1% leite desnatado contendo a diluição de 1:1000 do anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase (Amersham Bioscience) por 1 h à T.A sob agitação constante. Após 4 a 6 lavagens, o sinal foi revelado com SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, em câmara escura, e detectado por autorradiografia.

### 3.3 Camundongos

Camundongos fêmeas, com 4 a 6 semanas de idade, das linhagens C57BL/6 e A/J foram fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp (CEMIB, Campinas-SP). Os animais foram mantidos no biotério do Pavilhão Leonidas Deane (FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ) em microisoladores devidamente alimentados e hidratados, sob condições ideais de temperatura, circulação de ar e ciclos de claro e escuro. Os experimentos de imunização, sangria e coleta de baços foram realizados nas salas de experimentação deste biotério.

As imunizações foram realizadas no coxim plantar das duas patas traseiras, injetando 30  $\mu$ L do inóculo em cada pata, através de seringa de insulina com agulha ultrafina de calibre 0,3 mm BD Ultra-fine II (BD Biosciences). Foram dadas duas doses do inóculo, contendo  $10^5$  PFU dos vírus FA 17DD ou recombinantes (descrição dos grupos nas tabelas 4 e 6 dos resultados) com intervalo de 15 dias entre as doses. Após 2 semanas da segunda dose, os camundongos foram anestesiados com aproximadamente 100  $\mu$ L de uma mistura de 75% de cloridrato de dextrocetamina a 50 mg/mL (Ketamin – Cristália) com 25% de cloridrato de xilazina a 20 mg/mL (Xilazin – Syntec) e submetidos à eutanásia para a realização da sangria por punção cardíaca, realizada com auxílio de seringas de insulina com agulha hipodérmica e também para retirada do baço, sob condições estéreis dentro do fluxo biológico. O sangue extraído foi processado como descrito na seção 2.1 para obtenção do soro e dosagem de anticorpos por ELISA e PRNT. Os baços também foram devidamente processados, como descrito na seção 3.3.2, e utilizados para dosagem de IFN-gama por ELISPOT.

#### 3.3.1. Processamento do Sangue

Os soros foram obtidos por dois ciclos de centrifugação do sangue a 540 x g por 10 min e submetidos a aquecimento a 56° C por 20 min para inativação de proteínas do sistema complemento. A seguir, os soros foram aliquotados e estocados a -20° C.

### 3.3.2. Processamento do Baço

Após a punção cardíaca o baço foi coletado, assepticamente em cabine biológica, com o auxílio de material cirúrgico previamente autoclavado e colocados em placas de 6 poços contendo aproximadamente 3 mL de meio RPMI. Ainda dentro da cabine, os baços foram macerados com o auxílio do êmbolo da seringa, separando os debris. A suspensão foi transferida para tubo falcons de 15 mL, completando com meio RPMI 10% SFB até 10mL. Os tubos foram centrifugados a 1700 rpm, a 4°C, por 10 minutos e ressuspendidas em solução de lise ( BD Pharm Lyse, Lysing buffer), incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Logo após foi adicionado 3 mL de RPMI 10% SFB e centrifugadas a 1700 rpm por 6 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio RPMI 10% SFB.

### 3.4. Avaliação da imunogenicidade dos vírus recombinantes em camundongos imunizados.

#### 3.4.1. ELISPOT

Para os ensaios de ELISPOT, grupos de A/J e C57BL/6 foram imunizados (grupos descritos na seção 4.3.2, tabelas 4 e 6). Duas semanas após a segunda imunização, os camundongos foram submetidos à eutanásia e o baço de cada animal foi retirado assepticamente (descrição no tópico 3.3.2, desta seção). Todos os ensaios foram realizados utilizando o kit Mouse IFN- $\gamma$  ELISpot (Mabtech) e recomendações do fabricante. As placas, que vêm previamente sensibilizadas, foram lavadas 4 vezes com PBS e bloqueadas com meio RPMI (Invitrogen) 10% SFB por até 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, os esplenócitos frescos foram plaqueados na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço e incubados por 1 hora a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> 5% . Após a incubação os estímulos eram adicionados, concanavalina A para o controle positivo a 2 $\mu$ g por poço, e os peptídeos no volume de 100 $\mu$ L por poço, seguido de uma incubação overnight a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> 5%.

Após incubação, a placa foi lavada 5x com PBS e incubada com anticorpo de detecção anti-IFN- $\gamma$  biotinizado (fornecido pelo kit), diluído a 1:1000 em PBS 0,05%

SFB por 2 horas, seguido de 5 lavagens com PBS e incubação com estreptavidin-ALP (fornecida pelo kit) diluída a 1:1000 em PBS 0,05% SFB, por 1 hora. Após esse período, as placas foram novamente lavadas 5 vezes com PBS e foi colocado 100µL do substrato filtrado (BCIP/NBT-plus, fornecido pelo kit), incubado a T.A por cerca de 5 minutos até os spots começarem aparecer. Após o aparecimento dos spots a reação foi finalizada com a lavagem exaustiva das placas em água corrente. Células produtoras de IFN- $\gamma$ , que apareceram como pontos (spots) roxos em cada poço foram contadas com o auxílio do leitor automatizado Immunospot (AMBRIEX, Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH), usando o programa de versão 3 da Plataforma de ELISPOT do PDTIS /Fiocruz – Rio de Janeiro (Lima-Junior et al., 2008). Os dados foram plotados no programa Graphpad Prisma 5 e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram verificadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns.

### 3.5. Produção de anticorpos contra ASP-2

#### 3.5.1 PRNT

Testes de neutralização viral por redução de formação de placas de lise (PRNT, Plaque Reduction Neutralization Test) foram executados em células Vero, em placas de 96 poços, como descrito por Stefano et al., 1999. Os soros dos animais foram diluídos nas placas de 96 poços serialmente em 1:10 em meio 199 com sais de Earle completo a 5% SFB. O vírus YF 17DD foi diluído a 1:7000 em uma suspensão viral contendo meio Earle 199 completo a 5% de SFB, em seguida 50 µL desta suspensão viral foi plaqueada na presença dos soros diluídos e foram incubados por 1 h à temperatura ambiente. Após este intervalo de tempo, foram adicionados 50 µL da suspensão de células Vero, com densidade de  $1,0 \times 10^5$  células / mL. As células foram incubadas por 4h a 37° C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e, após esse tempo, o meio foi removido e adicionado 100 µL de CMC 3% em cada poço. As placas foram incubadas por 7 dias em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e então, fixadas com formaldeído 10% e coradas com corante Cristal Violeta a 0,02% para visualização e contagem das placas de lise. O pool de soros de camundongos BALB/C, imunizados e responsivos ao vírus

YF 17DD, foi utilizado como soro controle. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram calculados tomando-se como base a maior diluição de anticorpo (soro) capaz de reduzir 50% de placas de lise virais oriundas da suspensão viral diluída inicial. A porcentagem de soroconversão foi determinada com base nos níveis basais obtidos pelo grupo controle Mock (não soroconvertido). O teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis foi usado para comparar a média dos títulos obtidos para os grupos experimentais e o teste de Dunns foi utilizado como um pós-teste para comparar os pares de grupos. A análise foi realizada pelo programa estatístico GraphPad Prism v. 5.03

### 3.5.2 ELISA

O ELISA foi realizado para detecção de anticorpos específicos para a proteína ASP-2 em soros de camundongos imunizados. Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato de alta afinidade para EIA/RIA (Costar). As placas foram sensibilizadas com 125 ng por poço da proteína recombinante ASP-2 (ASP-2 fragment 30 kDa, Genscript) diluídas em tampão carbonato/bicarbonato, por incubação overnight a 4° C.

Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T (PBS com 0,05% Tween 20) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS-T com 5% leite desnatado) por 2 h à temperatura ambiente. Os soros foram inicialmente diluídos 1:10 e em seguida foi realizada uma diluição seriada com fator 2 em tampão de bloqueio em outra placa de 96 poços com fundo em V. Após o bloqueio, as placas de ELISA foram lavadas novamente com PBS-T e incubadas com as diluições dos soros por 1 h à temperatura ambiente. Para controle, em cada placa incluímos 2 poços de branco, em que somente o tampão de bloqueio foi adicionado, e uma curva padrão com diluições seriadas com fator 2 (diluído paralelamente às amostras) do anticorpo para a proteína ASP-2 (Genscript). As placas foram lavadas com PBS-T e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate diluído 1:2000 em tampão de bloqueio. Após lavagens com PBS-T, foi adicionado o substrato Stable Peroxide Substrate Buffer (Thermo Scientific) diluído em água tipo 2 contendo 1 mg/mL de OPD (Sigma). A reação foi interrompida com solução a 1 M de ácido sulfúrico (Merck) e a absorbância

lida após 15 min. Todas as lavagens foram realizadas com auxílio da lavadora automática de placas AquaMax 4000 (Molecular Devices). A leitura da absorbância foi realizada pelo equipamento SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices) com o auxílio do programa SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices) em comprimento de onda de 490 nm.

### 3.5.3. Imunofluorescência em células infectadas com *Trypanosoma cruzi*.

Células Vero foram infectadas com  $10^6$  tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, em uma relação parasita/célula hospedeira de 10:1. Após incubação de 24 horas, os parasitas que não infectaram a monocamada foram removidos por lavagens sucessivas com PBS e após, a infecção foi acompanhada até 72 horas até alcançar o pico intracelular de formas amastigotas. Após esse período, a monocamada de células foi fixada por 20 min a 4°C com paraformaldeído 4% em PBS. Após a fixação, a monocamada foi lavada três vezes por 10 min em PBS, seguido de lavagens com PBS contendo 0.5% de Triton X-100 (Sigma), para permeabilização da membrana plasmática. Em seguida, a monocamada foi incubada em PBS contendo 4% de BSA por 15 min para bloqueio de sítios inespecíficos. Posteriormente, as células foram incubadas a 4 °C por 12 a 18 h com os soros obtidos de camundongos C57BL/6 e A/J imunizados com os vírus recombinantes FA Tc1 e FA Tc2, diluídos a 1:50. Após lavagens com PBS/BSA 4%, as células foram incubadas por 1 h a 37° C em câmara úmida com o anticorpo secundário apropriado (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 546 (Sigma Chemical Co.) diluído a 1:200. Em seguida, as células foram lavadas três vezes por 10 min em PBS/BSA 2% e incubadas por 5 min à temperatura ambiente com 0,2 µg/mL de DAPI para detecção do DNA e montadas em PBS contendo 2,5% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO) e 50% de glicerol, pH 7,2.

As análises de fluorescência foram realizadas no microscópio invertido IX51 (Olympus) com filtros: U-MWG2 (Rodamina e Alexa Fluor 546), comprimento de onda 510-550; U-MWU2 (DAPI) (330-385), objetiva de 40X, e as imagens adquiridas através do programa DP Controller e visualizadas através do programa DP Manager (DP-BSW v3.1 - Olympus). As fotos foram posteriormente exportadas para o formato TIFF e as pranchas foram montadas com auxílio do programa PowerPoint (Microsoft Office).

3.6. Ensaios de proteção em camundongos A/J desafiados com cepa Y de *T. cruzi*.

Grupos de 4 camundongos fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade (conforme descrito no tópico 4.4 dos resultados), da linhagem A/J (H-2K<sup>k</sup>) receberam um inóculo, via intraperitoneal, contendo 10<sup>3</sup> parasitas/mL de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), duas semanas após a segunda imunização, para ensaios de sobrevivência e determinação de parasitemia.

Para determinação da sobrevivência, os animais desafiados foram monitorados quanto aos sintomas e a morte foi anotada diariamente até o 20º dia pós-infecção (dpi). A curva de parasitemia foi determinada pelo acompanhamento diário dos animais utilizando-se o método de Pizzi-Brener (Brener, 1962), onde 5 µl de sangue foram recolhidos da cauda de cada animal, colocados entre lâmina e lamínula (18 x 18 mm) e o número de parasitas quantificado em 50 campos no microscópio ótico Zeiss utilizando-se objetiva de 40x. O número aproximado de parasitas por mL foi calculado pela seguinte razão:

$$\text{n}^\circ \text{ parasitas em } 5\mu\text{L} =$$

$$\text{n}^\circ \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} / \text{área de } 50 \text{ campos} \times \text{área total da lamínula}$$

$$\text{- Área total da lamínula} = 18 \times 18 \text{ mm} = 324 \text{ mm}^2$$

$$\text{- Área de } 50 \text{ campos} = 50 \pi R^2, \text{ Onde: } \pi = 3,14, R = \text{raio do campo da objetiva de } 40x = 0,25 \text{ mm}$$

$$\text{Logo a área de } 50 \text{ campos} = 50 \times 3,14 \times (0,25)^2 = 9,81 \text{ mm}^2$$

Assim:

$$\text{- n}^\circ \text{ parasitas em } 5\mu\text{L} = \text{n}^\circ \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} / 9,81 \text{ mm}^2 \times 324 \text{ mm}^2$$

$$\text{- n}^\circ \text{ parasitas em } 5\mu\text{L} = \text{n}^\circ \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} \times 33,02$$

Logo,

$$\text{n}^\circ \text{ parasitas/mL} = \text{n}^\circ \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} \times 33,02 \times 200$$

$$\text{n}^\circ \text{ parasitas/mL} = \text{n}^\circ \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} \times 0,66 \times 10^4$$

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prisma 5, a diferença entre os grupos foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunns.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Caracterização dos vírus FA recombinantes

#### 4.1.1. Análise físico-química dos cassetes ASP-2 nos vírus recombinantes.

Nogueira et al., (2011;2013), utilizaram o vírus recombinante VFA ENS1/Tc, como descrito no tópico 1.2.3 da introdução. Foi observado que estes vírus eram consideravelmente mais atenuado que o controle vacinal VFA 17DD, provavelmente isto foi relacionado à hidrofobicidade da proteína recombinante que poderia perturbar o correto processamento da poliproteína viral. Assim, foram realizadas mudanças no cassete de expressão que derivaram novas construções virais, descritos nesse trabalho. Então, apresentamos neste tópico uma comparação das propriedades físico-químicas dos vírus antigos e novos, mostrando que houve mudanças nesses parâmetros, representados na Tabela 2.

Há uma diferença entre o tamanho e a posição dos fragmentos da ASP-2 inseridos no vírus utilizados anteriormente, VFA ENS1/Tc (227 aa) e aqueles utilizados neste trabalho, os vírus VFA Tc1 e VFA Tc2 (349 aa). O vírus VFA ENS1/Tc compreendia apenas o epítipo imunodominante TEWETGQI para camundongos A/J (haplótipo H-2K<sup>k</sup>), já nos vírus VFA Tc1 e VFA Tc2 está inserido também o epítipo imunodominante VNHRFTLV para camundongos C57BL/6 (haplótipo H-2K<sup>b</sup>). Nos vírus VFA NS2B3 estão inseridos apenas os epítipos imunodominantes, ao invés do fragmento da proteína, VFA NS2B3vnh expressa o peptídeo VNHRFTLV, de camundongos C57BL/6 (haplótipo H-2K<sup>b</sup>), e o vírus VFA NS2B3tew expressa TEWETGQI, para camundongos A/J (haplótipo H-2K<sup>k</sup>).

O vírus FA Tc1 e VFA Tc2 expressam o mesmo fragmento de ASP-2<sub>296-560</sub> e diferem quanto ao número de aminoácidos do cassete de expressão. Essa diferença ocorre porque a plataforma II de expressão (vírus VFA Tc2) possui um maior número de aminoácidos no cassete de expressão. Além do tamanho, essa construção do vírus VFA Tc2 na plataforma II permite que a proteína heteróloga seja direcionada a compartimentos celulares, como lisossomo e complexo de Golgi, para ser secretada do interior celular. Já a construção na plataforma I (vírus VFA Tc1), mantém a proteína

heteróloga no interior retículo endoplasmático, podendo ser apresentada na superfície celular por meio de moléculas de MHC classe I.

O fragmento inserido no vírus VFA ENS1/Tc foi descrito como ligeiramente hidrofóbico (índice de GRAVY da tabela 2), um fator que foi melhorado nos vírus VFA Tc1 e VFA Tc2, pois esse parâmetro pode afetar a qualidade de expressão da proteína recombinante.

	<b>YF17D/ ENS1/Tc</b>	<b>Tc1</b>	<b>Tc2</b>	<b>NS2B3 vnh</b>	<b>NS2B3 Tew</b>
Região ASP-2	261-380	296-560	296-560	553-560	320-327
Aminoácidos (n)	227	349	398	8	8
Peso Molecular (daltons)	24680	38240	43320	963	963
Ponto Isoelétrico	7,83	7.14	9.03	9.73	3.79
Hidropaticidade (GRAVY)	0,292	-0.056	-0.165	0,388	-1.087

Tabela 2. Características físico-químicas dos cassetes ASP-2 expressos pelo VFA. Parâmetros físico-químicos obtidos pela análise da sequência do cassete heterólogo analisada pela ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

## 4.2. Avaliação da expressão da proteína recombinante.

### 4.2.1 Imunofluorescência

Com o propósito de comprovar a expressão da proteína recombinante ASP-2 nos vírus VFA Tc1, VFA Tc2, VFA NS2B3tew e VFA NS2B3vnh, realizamos uma imunofluorescência indireta utilizando um anticorpo policlonal anti-ASP-2, para detecção da proteína recombinante.

Como observado na figura 6, houve detecção da proteína expressa pelos vírus VFA Tc1, VFA Tc2 e VFA NS2B3tew, enquanto no mock não houve detecção, mostrando a especificidade do anticorpo de detecção. Não houve reconhecimento do epítipo VNHRFTLV expresso pelo vírus VFA NS2B3vnh.

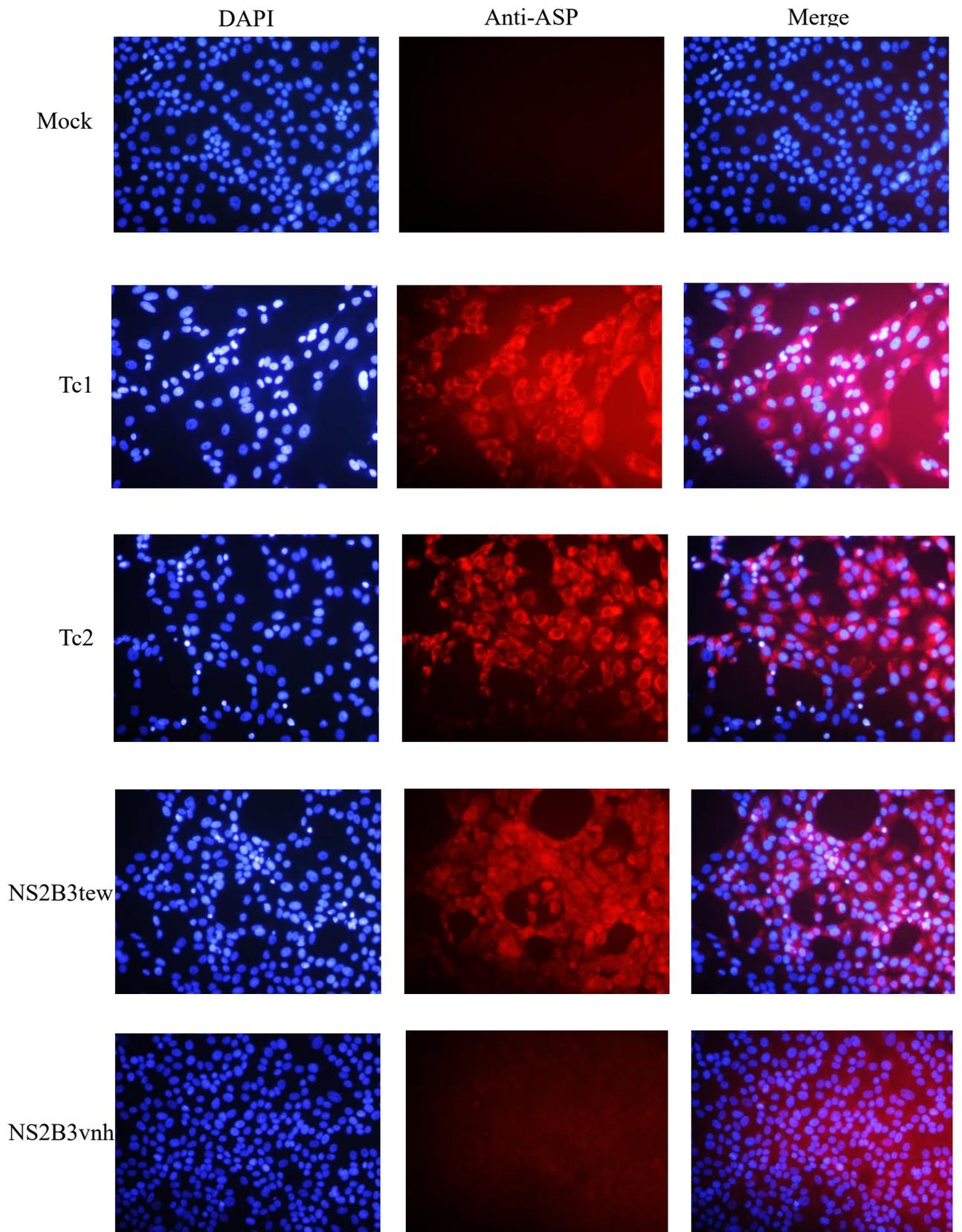


Figura 6. Imunofluorescência para detecção da proteína ASP-2 pelos vírus recombinantes. Imunofluorescência indireta para detecção da proteína ASP-2 expressa pelos vírus recombinantes em células Vero infectadas ou mock (Meio Earle's 199), marcados com anticorpo policlonal Anti-ASP-2 (Aumento de 100x).

#### 4.2.2. Western blot

A expressão da proteína recombinante foi também comprovada pelo ensaio de Western blot em lisados e sobrenadantes de cultura celular infectada com os vírus VFA Tc1, Tc2, NS2B3tew e NS2B3vnh, os resultados estão indicados na figura 7.

A técnica não foi capaz de reconhecer os peptídeos de ASP-2 inseridos nos vírus VFA NS2B3tew e VFA NS2B3vnh. Nas amostras de lisado dos vírus VFA Tc1 e VFA Tc2 foram observadas bandas próximas às alturas esperadas para o peso molecular dos cassetes recombinante nesses vírus: VFA Tc1, 38 kDa e VFA Tc2, 43 kDa (Tabela 2 características físico-químicas).

Não houve detecção da proteína recombinante nos sobrenadantes das culturas infectadas demonstrando que ASP-2 recombinante não é secretada para o meio extracelular.

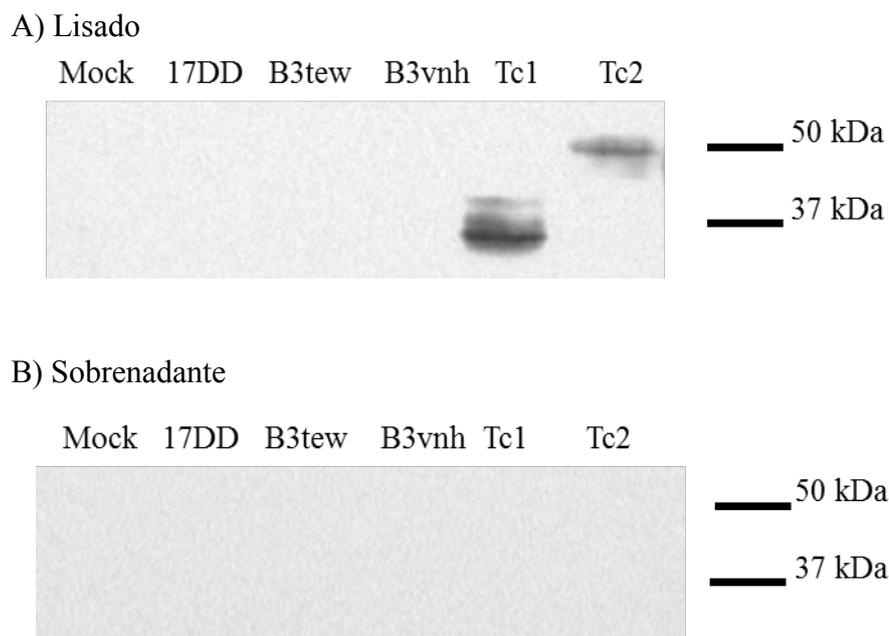


Figura 7. Western blot para detecção da expressão da proteína recombinante ASP-2 em lisados (A) e sobrenadantes (B) de culturas celulares infectadas com os vírus VFA Tc1, Tc2, NS2B3vnh e NS2B3tew, marcado com anticorpo policlonal anti-ASP-2.

### 4.3. Avaliação da imunogenicidade dos vírus recombinantes em camundongos imunizados.

#### 4.3.1. Predição de epítomos

Após a caracterização dos vírus recombinantes construídos e as análises de expressão da proteína recombinante inserida, nosso objetivo foi avaliar a resposta imune dirigida a esses vírus. Nesta primeira etapa de análise imunológica foi feita uma predição de epítomos imunodominantes para serem utilizados nos estudos de imunização de camundongos C57BL/6 e A/J.

Através do Banco de Dados de Epítomos Imunes (IEDB) realizamos uma nova predição de epítomos, tanto para confirmar a imunogenicidade dos já descritos quanto para descobrir novos epítomos imunodominantes. Os parâmetros escolhidos no momento da predição foram o tamanho da sequência de oito aminoácidos e o alelo do animal, H-2-Kb representa C57BL/6 e H-2-Kk para A/J. Os resultados, mostrados nas tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, confirmaram a alta imunogenicidade dos epítomos já descritos, pois foram os que apresentaram menor Score, ou seja, maior afinidade a molécula de MHC de classe I. De acordo com as predições realizadas, resolvemos sintetizar novos epítomos, com score próximo aos conhecidos e testá-los quanto a sua imunogenicidade. Nas tabelas de predição de epítomos, estes estão organizados do maior para o menor score, foram selecionados aqueles peptídeos que obtiveram maiores scores. Para camundongos C57BL/6 foram escolhidos os peptídeos KIFRVGAL e VNHRFTLV da proteína ASP-2, e ATLYRML da proteína NS3 do VFA. Para camundongos A/J foram escolhidos TEWETGQI e NETLANAL da proteína ASP-2, e GEEEVQLI e SENNAHHV da proteína NS3 do VFA.

Tabela 3. Predição de epítomos.

3.1. Epítomos preditos a partir do fragmento 296-560 de ASP-2, para camundongos C57BL/6.

	<b>Peptídeo</b>	<b>Tamanho (n° aa)</b>	<b>Começo</b>	<b>Fim</b>	<b>Score</b>	<b>SMM IC50</b>	<b>Alelo</b>
<b>1</b>	<b>VNHRFTLV</b>	<b>8</b>	<b>258</b>	<b>265</b>	<b>0.3</b>	<b>59.53</b>	<b>H-2-Kb</b>
<b>2</b>	<b>KIFRVGAL</b>	<b>8</b>	<b>76</b>	<b>83</b>	<b>0.35</b>	<b>58.71</b>	<b>H-2-Kb</b>
<b>3</b>	RTFHVGPL	8	120	127	0.5	72.57	H-2-Kb
<b>4</b>	SSTPTAGL	8	191	198	1.85	503.20	H-2-Kb
<b>5</b>	VLSTWAKL	8	177	184	1.9	694.61	H-2-Kb
<b>6</b>	EAISLARL	8	160	167	2.4	754.64	H-2-Kb
<b>7</b>	LLYSDGAL	8	141	148	3.15	868.44	H-2-Kb
<b>8</b>	DNRQYSFV	8	251	258	3.35	681.93	H-2-Kb
<b>9</b>	RQYSFVNH	8	253	260	3.35	870.44	H-2-Kb
<b>10</b>	MSQPGVRL	8	67	74	3.7	913.57	H-2-Kb
<b>11</b>	RLYKIFRV	8	73	80	4.15	1602.29	H-2-Kb
<b>12</b>	ATALYLWV	8	108	115	4.45	1020.33	H-2-Kb
<b>13</b>	SVFESRDM	8	43	50	4.6	1405.21	H-2-Kb
<b>14</b>	KVMLYTQR	8	92	99	6.2	2121.97	H-2-Kb
<b>15</b>	IFRVGALI	8	77	84	6.2	2310.68	H-2-Kb
<b>16</b>	YSFVNHRF	8	255	262	6.35	1408.45	H-2-Kb
<b>17</b>	STPTAGLV	8	192	199	6.4	3011.20	H-2-Kb
<b>18</b>	TAGLVGFL	8	195	202	6.7	2017.16	H-2-Kb
<b>19</b>	VNETLANA	8	133	140	6.95	1617.11	H-2-Kb
<b>20</b>	ETLANALL	8	135	142	7.45	2289.50	H-2-Kb

3.2. Epítomos preditos a partir do fragmento 296-560 de ASP-2, para camundongos A/J.

	<b>Peptídeo</b>	<b>Tamanho (n° aa)</b>	<b>Começo</b>	<b>Fim</b>	<b>Score</b>	<b>SMM IC50</b>	<b>Alelo</b>
<b>1</b>	NETLANAL	<b>8</b>	<b>134</b>	<b>141</b>	<b>0.5</b>	<b>5.23</b>	<b>H-2-Kk</b>
<b>2</b>	TEWETGQI	<b>8</b>	<b>25</b>	<b>32</b>	<b>0.95</b>	<b>17.48</b>	<b>H-2-Kk</b>
<b>3</b>	TEAIGTLS	8	55	62	2.7	19.84	H-2-Kk
<b>4</b>	STPTAGLV	8	192	199	4.3	4.62	H-2-Kk
<b>5</b>	TEELNTIK	8	168	175	6.05	68.18	H-2-Kk
<b>6</b>	KEATALYL	8	106	113	7.85	284.86	H-2-Kk
<b>7</b>	ETGQILMI	8	28	35	8.15	96.52	H-2-Kk
<b>8</b>	IFRVGALI	8	77	84	8.2	115.78	H-2-Kk
<b>9</b>	LTEELNTI	8	167	174	8.75	164.30	H-2-Kk
<b>10</b>	GEKEATAL	8	104	111	8.8	340.12	H-2-Kk
<b>11</b>	TAGLVGFL	8	195	202	9.5	19.62	H-2-Kk
<b>12</b>	WETGQILM	8	27	34	9.75	410.80	H-2-Kk

<b>13</b>	ETLANALL	8	135	142	9.8	14.28	H-2-Kk
<b>14</b>	SDGALHLL	8	144	151	10.7	342.48	H-2-Kk
<b>15</b>	ELNTIKSV	8	170	177	10.7	163.17	H-2-Kk
<b>16</b>	IEGRKVML	8	88	95	11.1	523.15	H-2-Kk
<b>17</b>	SRDMGKTW	8	47	54	11.15	49.96	H-2-Kk
<b>18</b>	YRCVHASV	8	216	223	11.6	300.35	H-2-Kk
<b>19</b>	SESSTPTA	8	189	196	12.25	397.77	H-2-Kk
<b>20</b>	LEDNVNET	8	129	136	12.3	515.98	H-2-Kk

### 3.3. Epítópos preditos a partir da proteína NS3 do VFA, para camundongos C57BL\6.

	<b>Peptídeo</b>	<b>Tamanho (nº aa)</b>	<b>Começo</b>	<b>Fim</b>	<b>Score</b>	<b>SMM IC50</b>	<b>Alelo</b>
<b>1</b>	ATLTYRML	8	268	275	0.2	36.62	H-2-Kb
<b>2</b>	ANVMAASL	8	373	380	1.5	512.55	H-2-Kb
<b>3</b>	VSPGEMRL	8	522	529	2.05	397.87	H-2-Kb
<b>4</b>	GIFQSTFL	8	26	33	2.3	409.02	H-2-Kb
<b>5</b>	LIPSWASV	8	67	74	2.35	744.29	H-2-Kb
<b>6</b>	IAEMGANL	8	415	422	2.35	487.24	H-2-Kb
<b>7</b>	VFHTMWHV	8	47	54	2.65	928.41	H-2-Kb
<b>8</b>	VSSDQSAL	8	605	612	2.85	545.43	H-2-Kb
<b>9</b>	RGGMVAPL	8	505	512	3.2	846.72	H-2-Kb
<b>10</b>	VIGLYGNG	8	149	156	3.35	259.86	H-2-Kb
<b>11</b>	PSIRAANV	8	368	375	3.55	1226.70	H-2-Kb
<b>12</b>	VALDYPSG	8	129	136	3.6	451.59	H-2-Kb
<b>13</b>	DAMCHATL	8	263	270	3.65	1041.69	H-2-Kb
<b>14</b>	VNWEVIIM	8	281	288	3.7	1370.06	H-2-Kb
<b>15</b>	ASMLLDNM	8	495	502	4.05	1105.96	H-2-Kb
<b>16</b>	TAFKPVLV	8	432	439	4.05	1373.22	H-2-Kb
<b>17</b>	TILDFHPG	8	194	201	4.25	323.40	H-2-Kb
<b>18</b>	MKEAFHGL	8	236	243	4.7	556.85	H-2-Kb
<b>19</b>	IMDEAHFL	8	287	294	4.85	1716.88	H-2-Kb
<b>20</b>	DSYYYSEP	8	474	481	5.1	1006.33	H-2-Kb

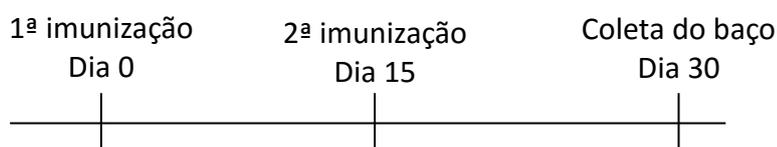
3.4. Epítópos preditos a partir da proteína NS3 do VFA, para camundongos A/J.

	<b>Peptídeo</b>	<b>Tamanho (n° aa)</b>	<b>Começo</b>	<b>Fim</b>	<b>Score</b>	<b>SMM IC50</b>	<b>Alelo</b>
<b>1</b>	<b>GEEEVQLI</b>	<b>8</b>	<b>93</b>	<b>100</b>	<b>0.75</b>	<b>11.29</b>	<b>H-2-Kk</b>
<b>2</b>	FEREYPTI	8	395	402	2.0	42.13	H-2-Kk
<b>3</b>	<b>SENNAHHV</b>	<b>8</b>	<b>483</b>	<b>490</b>	<b>2.15</b>	<b>47.82</b>	<b>H-2-Kk</b>
<b>4</b>	CEHLEDGI	8	17	24	2.75	59.11	H-2-Kk
<b>5</b>	SEMKEAFH	8	234	241	3.15	2.24	H-2-Kk
<b>6</b>	HEILNDSG	8	574	581	3.9	4.45	H-2-Kk
<b>7</b>	SEFIKFAE	8	613	620	4.1	3.50	H-2-Kk
<b>8</b>	WEVIIMDE	8	283	290	5.3	28.82	H-2-Kk
<b>9</b>	IEECEHLE	8	14	21	5.7	37.73	H-2-Kk
<b>10</b>	EEEVQLIA	8	94	101	6.45	111.85	H-2-Kk
<b>11</b>	AEMGANLC	8	416	423	6.6	181.82	H-2-Kk
<b>12</b>	EEVQLIAA	8	95	102	6.65	128.42	H-2-Kk
<b>13</b>	HFLDPASI	8	292	299	6.9	46.63	H-2-Kk
<b>14</b>	KEDLVAYG	8	75	82	7.1	10.96	H-2-Kk
<b>15</b>	KEAFHGLD	8	237	244	7.55	47.49	H-2-Kk
<b>16</b>	MEVRGGMV	8	502	509	7.65	286.17	H-2-Kk
<b>17</b>	GEVIGLYG	8	147	154	8.05	173.63	H-2-Kk
<b>18</b>	LEASMLLD	8	493	500	8.25	96.97	H-2-Kk
<b>19</b>	EEHEILND	8	572	579	8.5	31.02	H-2-Kk
<b>20</b>	SEPWNTGH	8	346	353	8.95	81.03	H-2-Kk

Tabela 3. (3.1, 3.2, 3.3, 3.4): os peptídeos foram preditos através do Banco de Dados de Epítópos Imunes (IEBD). Tamanho (n°aa), número de aminoácidos que compõem o peptídeo; Começo e Fim, localização do peptídeo no fragmento da proteína ASP-2 ou NS3 do VFA. Score, representa o grau de imunogenicidade do peptídeo, quanto menor o valor mais imunogênico. SMM IC50, representa a capacidade de ligação do peptídeo aos seus alelos específicos.

#### 4.3.2. Resposta imune celular

Após obtermos os epítomos imunodominantes para cada linhagem de camundongos, avaliamos os candidatos vacinais através da técnica de ELISPOT. Nosso objetivo com este experimento foi estudar a resposta celular direcionada aos epítomos do inserto de ASP-2 e do VFA dos vírus recombinantes, através do número de células produtoras de IFN- $\gamma$  em camundongos imunizados, como representado na linha do tempo abaixo.



Os peptídeos preditos (tabela 3) foram utilizados para estimular esplenócitos retirados de camundongos C57BL/6 e A/J imunizados com os vírus 17DD, recombinantes isolados e combinados. Os grupos de imunização bem como os peptídeos utilizados para o estímulo dos esplenócitos, estão representados nas tabelas 4 e 5 para camundongos C57BL/6 e nas tabelas 6 e 7 para camundongos A/J. Os vírus foram inoculados isolados ou formulados, gerando grupos de 10 camundongos. Após as imunizações foram retirados os esplenócitos e cada grupo recebeu os estímulos descritos na tabela 5.

Linhagem	Grupo de imunização	Nº de animais
C57BL/6	Mock	10
	17DD	10
	NS2B3vnh	10
	Tc1	10
	Tc2	10
	NS2B3vnh + Tc1	10
	NS2B3vnh + Tc2	10
	Tc1 + Tc2	10
	NS2B3vnh + Tc1 + Tc2	10

Tabela 4. Representação dos grupos de camundongos imunizados

Camundongo	Estímulos	Origem do peptídeo
C57BL/6	ConA	
	sem estímulo	
	ATLYRML	VFA
	VNHRFTLV	ASP-2
	KIFRVGAL	ASP-2

Tabela 5. Estímulos utilizados em esplenócitos de camundongos C57BL/6

Como representado no gráfico 8A, os esplenócitos controles positivos, estimulados com ConA, obtiveram altas respostas em todos os grupos, indicando que todas as células estão aptas a produzirem IFN-gama quando estimuladas. No controle negativo (gráfico 8B), esplenócitos não estimulados, houve apenas uma resposta muito baixa, indicando a produção basal da citocina, que foi subtraída dos demais valores durante as análises.

O gráfico 8C mostra o resultado dos experimentos em camundongos C57BL/6 estimulados com o peptídeo ATLYRML do VFA. Nos grupos 17DD, NS2B3vnh, NS2B3vnh+Tc1, NS2B3vnh+Tc2 e Tc1+Tc2, foi observado diferença estatisticamente significativa do número de células produtoras de IFN- $\gamma$ , em relação ao mock (Kruskal-Wallis e Dunns,  $P < 0,05$ ). Quando comparados ao grupo 17DD, não há diferença significativa entre os grupos para este estímulo, assim como entre os grupos que contém vírus recombinantes, mantendo a resposta de produção de IFN- $\gamma$  em torno de 1000 células. Isto nos mostra que os vírus recombinantes são igualmente capazes de induzir resposta celular para o vírus da Febre Amarela de modo similar ao vírus controle vacinal VFA 17DD.

Quanto à resposta dirigida a ASP-2, células estimuladas com o peptídeo KIFRVGAL (figura 8E) apresentaram resposta inespecífica, com produção de IFN- $\gamma$  próximo ao mock em todos os grupos, inclusive no 17DD, aparentando não ser um bom estímulo para esse experimento. Os grupos de camundongos imunizados com os vírus VFA Tc1, Tc2, NS2B3+Tc2 e Tc1+Tc2 apresentaram resposta imune específica ao epítipo VNHRFTLV (figura 8D) significativamente mais alta que o grupo mock. A resposta aos camundongos imunizados com VFA 17DD foi bastante baixa, próximo ao mock, assim como esperado, já que o estímulo foi para ASP-2. Em relação a esse controle vacinal, houve diferença estatística nos grupos VFA Tc1, Tc2 e Tc1+Tc2, indicando que esses vírus foram capazes de produzir resposta celular específica a ASP-2.

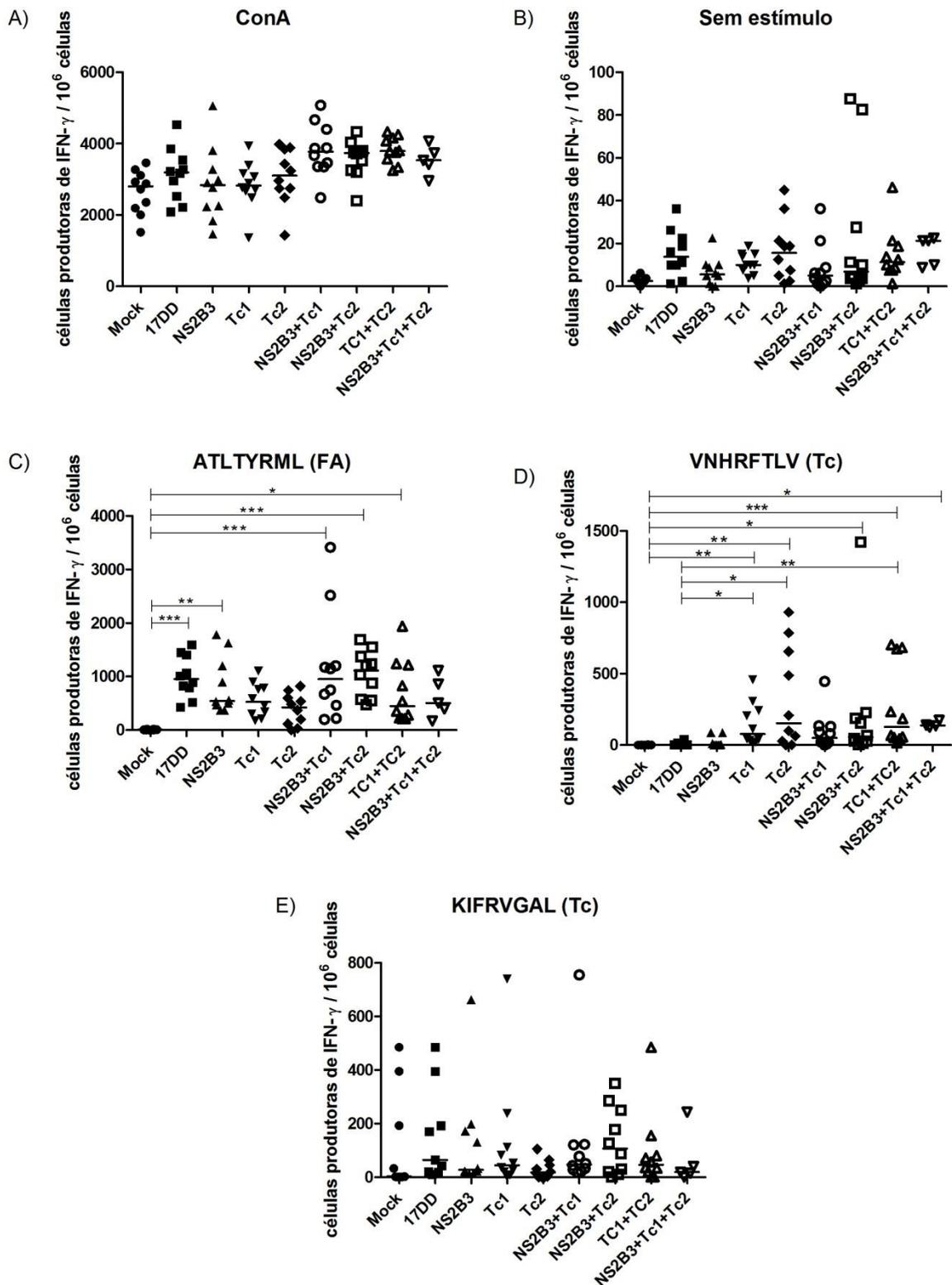


Figura 8. Gráficos representando as frequências de células produtoras de IFN- $\gamma$  em ensaio de ELISPOT após estímulo com epítopos de VFA e da proteína ASP-2 de *T. cruzi*, pelos grupos de camundongos C57BL/6 imunizados. (A) Células estimuladas com ConA, controle positivo. (B) Células não estimuladas, controle negativo. (C)

células estimuladas com o epítipo ATLYRML do vírus de Febre Amarela. (D) células estimuladas com o epítipo VNHRFTLV de ASP-2 de *T. cruzi*. (E) células estimuladas com o epítipo KIFRVGAL de ASP-2 de *T. cruzi*. O eixo Y indica o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  e o eixo X os grupos de camundongos imunizados. Está representado a mediana em cada grupo e a barra horizontal representa a diferença estatística entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunns, \* P < 0,05, \*\* P < 0,005, \*\*\* P < 0,0005.

Assim como em camundongos C57BL/6, ELISPOT foi realizado com esplenócitos de camundongos A/J imunizados a fim de avaliar a resposta celular dirigida ao fragmento de ASP-2 inserido nos vírus recombinantes e ao VFA. Decidimos também utilizar esses camundongos pois esta linhagem é susceptível a infecção por *T. cruzi*, sendo um modelo amplamente utilizado nos estudos de vacinação. Os vírus foram inoculados isolados ou formulados, gerando grupos de 6 camundongos. Após as imunizações foram retirados os esplenócitos e cada grupo de imunização recebeu os estímulos descritos na tabela 7.

As tabelas 6 e 7 representam os grupos de imunização dos camundongos A/J e os estímulos utilizados nos esplenócitos dos camundongos de cada grupo, respectivamente.

Linhagem	Grupo de imunização	Nº de animais
A/J	Mock	6
	17DD	6
	NS2B3tew	6
	Tc1	6
	Tc2	6
	NS2B3tew + Tc1	6
	NS2B3tew + Tc2	6
	Tc1 + Tc2	6
	NS2B3tew + Tc1 + Tc2	6

Tabela 6. Representação dos grupos de camundongos imunizados.

Camundongo	Estímulos	Origem do peptídeo
A/J	ConA	
	sem estímulo	
	GEEEVQLI	VFA
	SENNAHHV	VFA
	TEWETGQI	ASP-2
	NETLANAL	ASP-2

Tabela 7. Estímulos utilizados para camundongos A/J.

Os resultados desse experimento com camundongos A/J estão representados na figura 9. O gráfico 9A e 9B mostram os controles positivo e negativo, respectivamente. Quando estimulados com ConA todos os esplenócitos são estimulados a produzirem IFN- $\gamma$  e quando não estimulados não há produção dessa citocina.

A frequência de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$  por estimulação com o peptídeo GEEEVQLI (gráfico 9C) do VFA não apresentou diferença estatística entre o mock e os grupos imunizados (Kruskal-Wallis e Dunns,  $P < 0,05$ ) não se apresentando como um bom estímulo para esse experimento. Outro peptídeo do vírus da Febre Amarela foi testado, SENNAHHV (gráfico 9D), onde houve diferença estatística significativa entre os grupos VFA 17DD, NS2B3+Tc1 e NS2B3+Tc2, em relação ao mock (Kruskal-Wallis e Dunns,  $P < 0,05$ ). Entre os grupos com vírus recombinantes e esses grupos em relação ao controle vacinal 17DD não houve diferença, mostrando que todos os vírus foram capazes de responder de maneira semelhante ao estímulo do VFA.

Foram testados também os peptídeos de ASP-2. A frequência de esplenócitos secretores de IFN-gama estimulados com TEWETGQI (gráfico 9E) apresentou diferença estatística entre os grupos imunizados com VFA Tc1, Tc2, NS2B3+Tc2 e Tc1+Tc2, em relação ao mock (Kruskal-Wallis e Dunns,  $P < 0,05$ ). Em relação ao VFA 17DD, apesar de não apresentar diferença estatística significativa, há uma clara tendência de maior resposta nesses mesmos grupos, sugerindo que também há produção de IFN- $\gamma$  direcionado a este epítipo nesses camundongos. Apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos de vírus recombinantes, percebemos que, principalmente o vírus Tc2 e a formulação Tc1+Tc2, gerou um maior número de células produtoras de IFN- $\gamma$  nos camundongos imunizados. Observação semelhante pode ser feita nos esplenócitos estimulados com o peptídeo NETLANAL (gráfico 9F), também de ASP-2, onde, apesar de não ter havido diferença estatística, a resposta no grupo Tc1+Tc2 foi mais evidente que nos demais grupos.

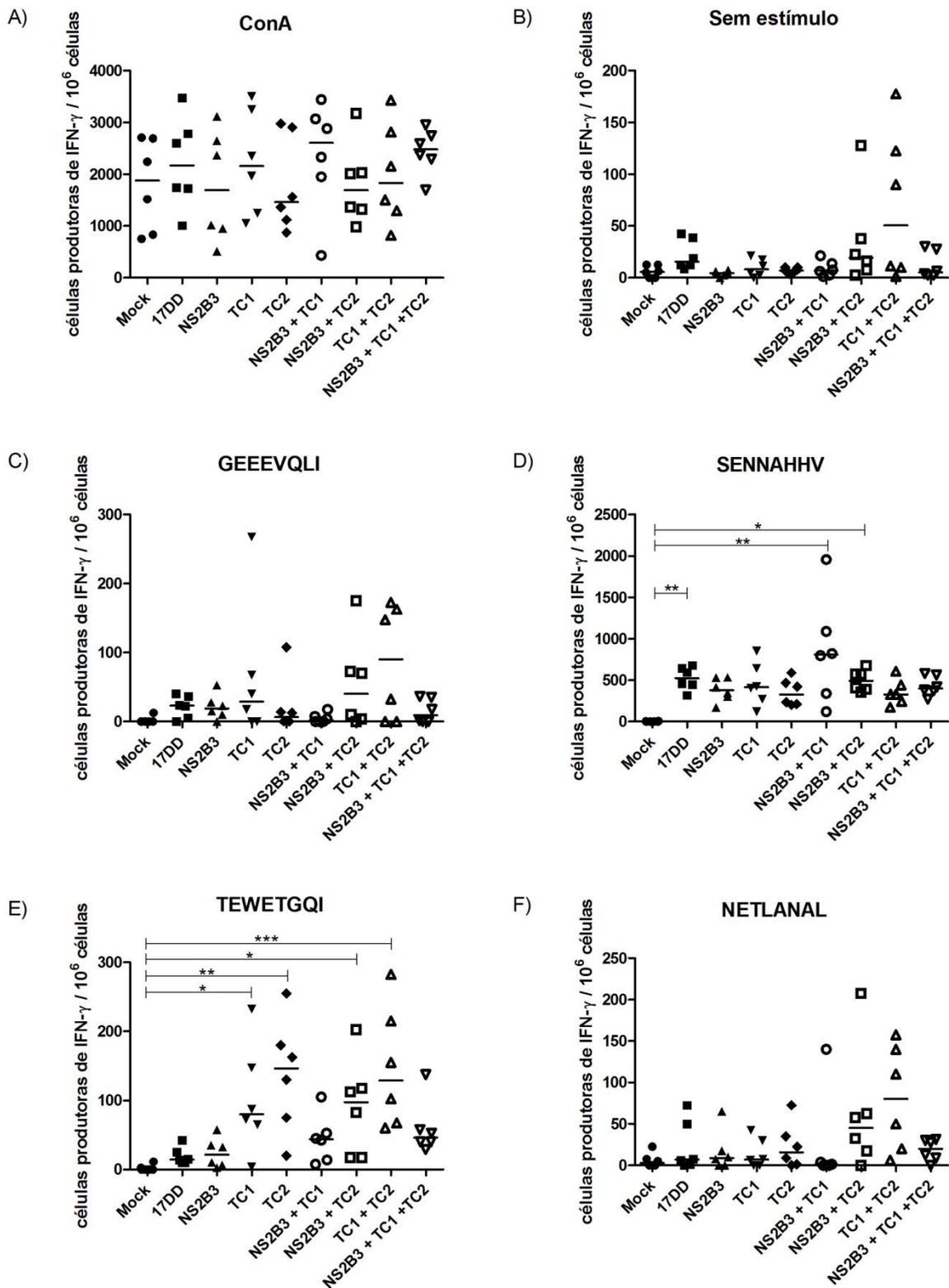


Figura 9. Gráficos representando as frequências de células produtoras de IFN- $\gamma$  em ensaio de ELISPOT após estímulo com epítopos de VFA e da proteína ASP-2 de *T. cruzi*, pelos grupos de camundongos A/J imunizados. (A) Células estimuladas com ConA, controle positivo. (B) Células não estimuladas, controle negativo. (C) células

estimuladas com o epítipo GEEEVQLI do vírus de Febre Amarela. (D) células estimuladas com o epítipo SENNAHHV do vírus da Febre Amarela. (E) células estimuladas com o peptídeo TEWETGQI de ASP-2 de *T. cruzi*. (F) células estimuladas com o epítipo NETLANAL de ASP-2 de *T. cruzi*. O eixo Y indica o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  e o eixo X os grupos de camundongos imunizados. No gráfico está representado a mediana em cada grupo e a barra horizontal mostra a diferença estatística entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunns, \* P < 0,05, \*\* P < 0,005, \*\*\* P < 0,0005.

#### 4.3.3. Resposta Imune Humoral

##### 4.3.3.1 Produção de anticorpos neutralizantes contra o VFA.

Foi visto que os vírus recombinantes induzem resposta celular dirigida a ASP-2 e ao vírus da febre amarela. Com o objetivo de ampliarmos a avaliação da indução de resposta imunogênica dos vírus recombinantes, nesta etapa, realizamos o teste de PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test) para obtenção de anticorpos neutralizantes para o vírus da Febre Amarela. Foram utilizados soros de camundongos C56BL/6 e A/J imunizados (tabela 8) incubados com células Vero infectadas com o vírus 17DD, depois calculado os títulos em função da contagem de plaques.

Linhagem	Grupo de imunização	Nº de animais	Linhagem	Grupo de imunização	Nº de animais
C57BL/6	17DD	8	A/J	17DD	11
	NS2B3vnh	7		NS2B3tew	3
	Tc1	8		Tc1	3
	Tc2	7		Tc2	3
	NS2B3vnh + Tc1	8		NS2B3tew + Tc1	3
	NS2B3vnh + Tc2	8		NS2B3tew + Tc2	13
	Tc1 + Tc2	7		Tc1 + Tc2	13
	NS2B3vnh + Tc1 + Tc2	8		NS2B3tew + Tc1 + Tc2	3

Tabela 8. Representação dos grupos de camundongos, por linhagem, utilizados nos experimentos de PRNT.

Para os cálculos de PRNT<sub>50</sub>, foram incluídos apenas camundongos que soroconverteram. A porcentagem de soroconversão foi determinada baseada em poços com células infectadas com 17DD e incubadas apenas com soro fetal bovino. A tabela 9 apresenta os dados obtidos no experimento de PRNT com camundongos C57BL/6. De maneira geral, não houve diferença estatística significativa (segundo o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido de Dunns), para uma maior produção de anticorpos neutralizantes entre os grupos de vírus recombinantes, nem em relação ao grupo 17DD. Ainda que a grande maioria dos camundongos tenham soroconvertido em todos os grupos, os títulos plotados na tabela indicam que os vírus recombinantes testados, e suas formulações, produzem anticorpos neutralizantes com títulos menores que o controle vacinal 17DD, nesses camundongos.

Grupo	Animais (n)	Soroconversão (%)	PRNT <sub>50</sub>		
			MG	DP	Título
17DD	8	100	486,4	277,7	68 – 795
NS2B3vnh	7	87,5	78,2	60,0	15,3 - 209,3
Tc1	8	100	140,0	187,0	10,2 – 600
Tc2	8	100	116,3	142,6	17 – 376
NS2B3vnh+Tc1	7	87,5	117,8	78,5	15,5 – 239
NS2B3vnh+Tc2	8	100	98,8	74,5	16,5 – 235
Tc1+Tc2	8	100	58,9	35,3	16,4 - 108,3
NS2B3vnh+Tc1+Tc2	7	87,5	98,6	107,1	15,5 – 281

Tabela 9. Representação dos dados obtidos no experimento de PRNT em camundongos C57BL/6. Grupo, são os grupos de imunização; Soroconversão, são os camundongos que produziram anticorpos neutralizantes para VFA após a imunização, apenas os positivos foram utilizados para os cálculos de PRNT<sub>50</sub>; MG, média geométrica dos títulos dos camundongos positivos; DP, desvio padrão; Título, faixa de título na qual estão inseridos os títulos dos camundongos do grupo.

Em camundongos A/J (Tabela10), os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos por vírus recombinantes e suas formulações, também apresentou-se mais baixo do que o grupo controle vacinal 17DD, apesar da soroconversão de 100% dos animais nos grupos imunizados com vírus recombinantes.

Grupo	Animais (n)	Soroconversão (%)	PRNT50		
			MG	DP	Faixa de título
17DD	9	81,81	326,6	361,6	37,5 – 1124
Tc1	3	100	34,2	50,2	19,4 - 106,3
Tc2	3	100	50,2	33,2	36,7 - 94,1
NS2B3tew+Tc1	3	100	57,1	126,0	19,4 - 246,7
NS2B3tew+Tc2	11	100	44,9	56,4	13,7 - 207,5
Tc1+Tc2	11	100	30,6	334,3	10,5 – 23,27
NS2B3tew+Tc1+Tc2	3	100	114,2	104,2	39 – 247

Tabela 10. Representação dos dados obtidos no experimento de PRNT em camundongos A/J. Grupo, são os grupos de imunização; Soroconversão, são os camundongos que produziram anticorpos neutralizantes para VFA após a imunização, apenas os positivos foram utilizados para os cálculos de PRNT<sub>50</sub>; MG, média geométrica dos títulos dos camundongos positivos; DP, desvio padrão; Título, faixa de título na qual estão inseridos os títulos dos camundongos do grupo.

#### 4.3.3.2. Produção de anticorpos contra ASP-2

Além da indução de anticorpos neutralizantes contra o VFA, era importante testar também a produção de anticorpos específicos contra o fragmento de ASP-2<sub>296-560</sub> inserido nos vírus recombinantes. Assim, o soro de cada um dos camundongos C57BL/6 e A/J coletados dos mesmos grupos de imunização utilizados no ELISPOT (vide tabelas 4 e 6 do tópico de resposta imune celular), foram testados por ELISA em placas sensibilizadas com a proteína ASP-2 recombinante. Neste experimento, nenhum soro de nenhum camundongo testado foi positivo, ou seja, não houve reação de possíveis anticorpos Anti-ASP-2 contidos nos soros dos camundongos com a proteína utilizada para sensibilizar a placa. Os valores de OD (densidade óptica) nos soros testados foi igual ao controle negativo. Erros da técnica foram descartados pois, no controle positivo realizado com anticorpo comercial Anti-ASP-2 obtido de coelho imunizado com a proteína recombinante respectiva, houve reação positiva. Então, imaginamos que poderia estar ocorrendo um desajuste na conformação da proteína recombinante utilizada para sensibilizar a placa e a forma com que os possíveis anticorpos presente no soro reconhecessem essa proteína.

Com essa possibilidade em mente, resolvemos realizar uma imunofluorescência indireta testando esses soros em células infectadas com amastigotas de *T. cruzi*. Assim, poderíamos ver se havia anticorpos específicos anti-ASP-2 nos soros dos camundongos imunizados. Por ser uma técnica mais trabalhosa, não foi possível testar todos os camundongos de todos os grupos de imunização, como foi feito no ELISA, então foram feitos pools de soros de camundongos imunizados com o vírus VFA Tc1 e imunizados com vírus VFA Tc2.

A figura 10, apresenta a imunofluorescência indireta para detecção de ASP-2, em células infectadas com *T. cruzi*, em camundongos A/J. As figuras do lado esquerdo estão marcadas com DAPI, onde observamos células com amastigotas em seu interior (setas brancas), as figuras do lado direito mostram as células marcadas ou não com anticorpos anti-ASP-2. Observamos que soros de camundongos imunizados com VFA 17DD, não apresentam marcação específica anti-ASP em células infectadas com amastigotas. Já em camundongos imunizados com os VFA Tc1 e Tc2 essa marcação torna-se evidente, indicando assim, que há produção de anticorpos específicos anti-ASP-2 em camundongos A/J imunizados com os vírus recombinantes Tc1 e Tc2.

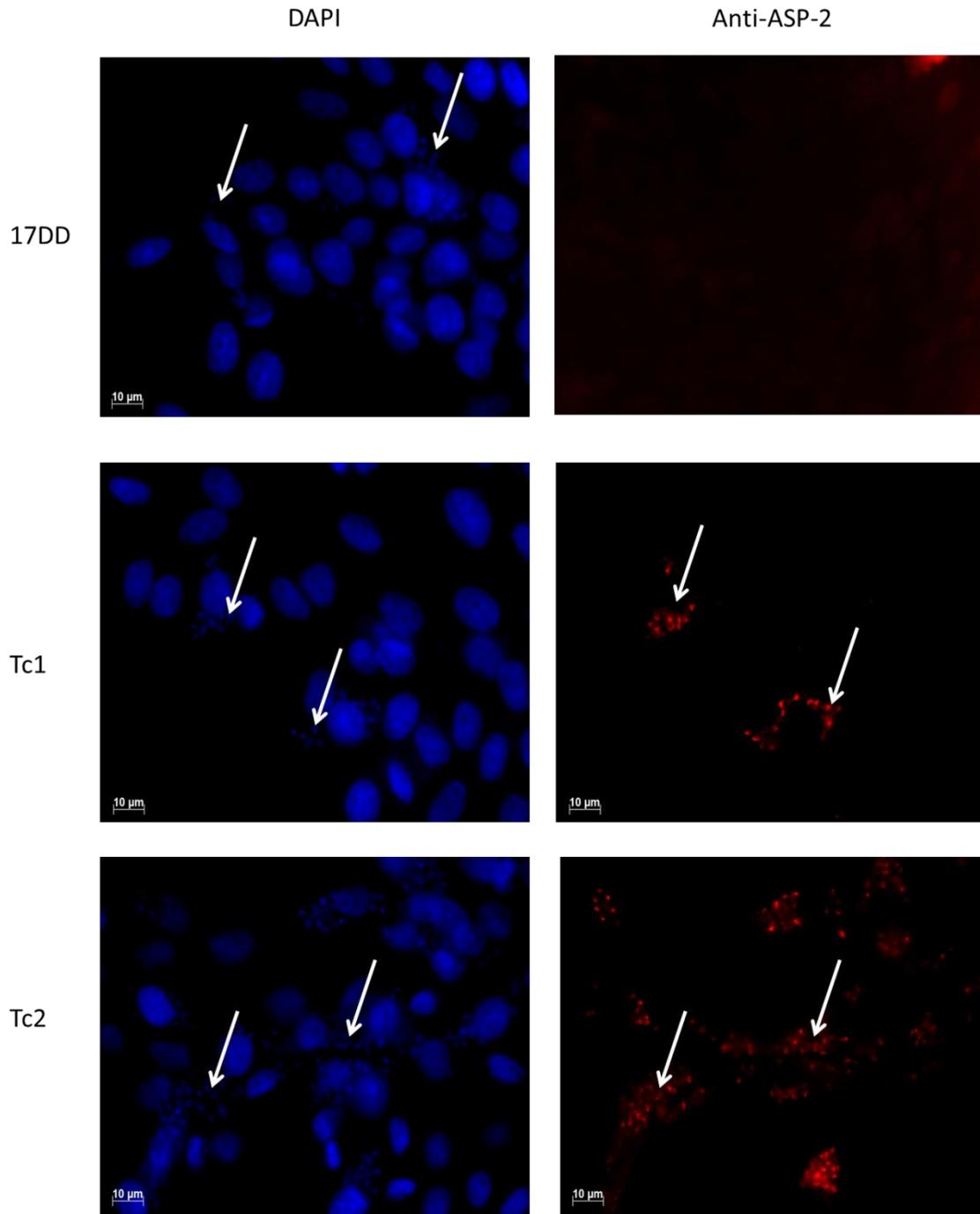


Figura 10. Imunofluorescência em ninhos de amastigotas. Imunofluorescência indireta em células VERO infectadas com amastigotas de *T. cruzi* e incubadas com soros de camundongos A/J imunizados com os vírus Tc1 e Tc2. As setas brancas indicam a presença de amastigotas no interior das células Vero (aumento de 100x).

A figura 11 mostra a imunofluorescência indireta realizada em células infectadas com *T. cruzi* incubadas com soro de camundongos C57BL/6 imunizados com os vírus recombinantes Tc1 e Tc2. É interessante observar que, nessa linhagem de camundongos, não há evidência de produção de anticorpos específicos anti-ASP-2, já que parece não haver marcação. As setas brancas indicam células infectadas com amastigotas, evidente nas figuras do lado direito, marcadas com DAPI, mas não aparecem nas figuras do lado esquerdo. Os anticorpos específicos Anti-ASP-2 induzidos pela imunização com os vírus recombinantes Tc1 e Tc2, parecem estar presentes nos soros de camundongos A/J mas não nos soros de camundongos C57BL/6.

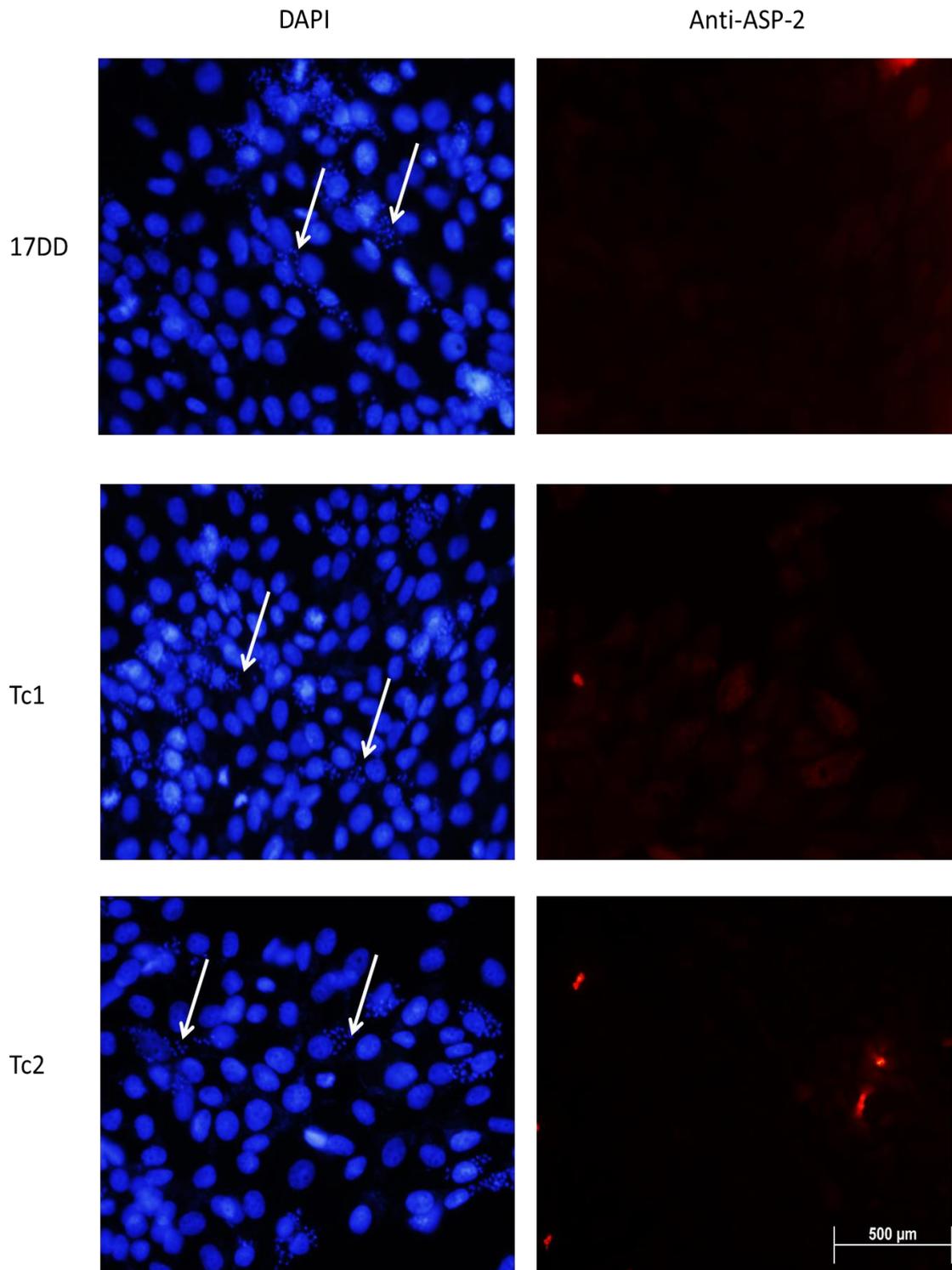


Figura 11. Imunofluorescência indireta em células VERO infectadas com amastigotas de *T. cruzi* e incubadas com soros de camundongos C57BL/6 imunizados com os vírus Tc1 e Tc2. As setas brancas indicam amastigotas de *T. cruzi* no interior das células VERO

#### 4.4. Ensaios de proteção em camundongos A/J desafiados com cepa Y de *T. cruzi*.

Foi visto que os vírus recombinantes avaliados neste trabalho foram capazes de induzir resposta celular e humoral dirigidas ao fragmento de ASP-2<sub>296-560</sub>. Assim, decidimos avaliar se as imunizações foram capazes de gerar resposta protetora em camundongos A/J desafiados com a cepa Y de *T. cruzi*. Para isso foram analisadas a parasitemia e a mortalidade dos animais.

Os grupos utilizados nesse experimento foram: Mock (G1/ camundongos imunizados com Meio 199 com sair de Earle), VFA 17DD (G2), VFA NS2B3tew+Tc2 (G3) e VFA Tc1+Tc2 (G4), com 4 animais por grupo. Sabemos que é um número baixo de camundongos, porém houve grande dificuldade de obter animais com idade homogênea de 4 a 6 semanas, então realizamos o experimento conforme a disponibilidade dos animais com idade adequada, da maneira mais homogênea possível.

As figuras 12 e 13 representam mortalidade e parasitemia, respectivamente. Observamos que os camundongos do grupo mock morreram antes de 3 a 6 dias antes dos demais grupos, no 14º dia de infecção, porém esses dados não são estatisticamente significativos. A parasitemia foi aferida diariamente após o inóculo com  $10^3$  tripomastigotas de *T. cruzi*. O pico da parasitemia ocorreu no 9º dia após o inóculo. Nos grupos Mock e 17DD houve um maior número de parasitas, tanto no pico da parasitemia quanto no decorrer dos dias analisados. Apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa, pode ser que a imunização induza menores números de parasitos no decorrer na infecção. Para obtermos maior acurácia desses resultados, os experimentos devem ser repetidos com maior número de camundongos e repetições.

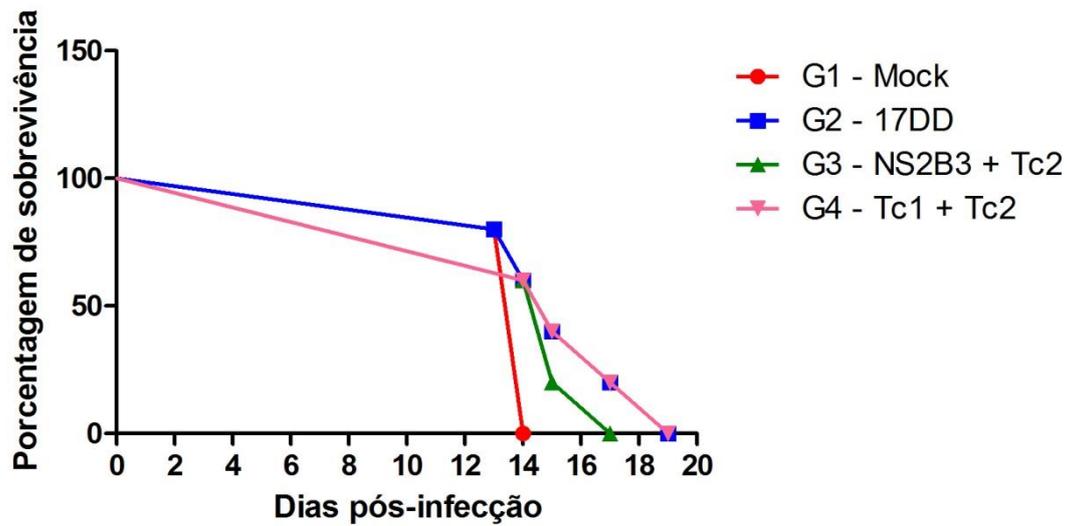


Figura 12. Gráfico representando a porcentagem de sobrevivência de camundongos A/J desafiados com *T. cruzi*.

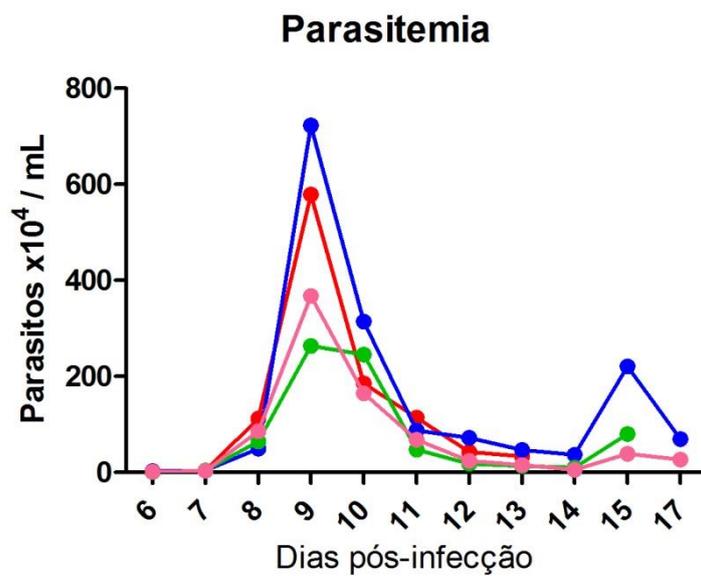


Figura 13. Gráfico representando o número de parasitos aferidos diariamente após a infecção.

## 5 DISCUSSÃO

Nosso laboratório utiliza o vírus vacinal da Febre Amarela 17D como vetor para expressão de antígenos heterólogos. Anteriormente, foram construídos dois vírus FA recombinantes para antígenos da proteína ASP-2 de formas amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Nogueira *et al.*, 2011; 2013). O primeiro expressava um fragmento de 119 aminoácidos correspondente às posições 261-380 desta proteína, entre as proteínas E/NS1 do VFA. No segundo, o epítipo TEWETGQI foi inserido e expresso entre as proteínas NS2B e NS3 do VFA. Na primeira abordagem o inserto heterólogo expresso entre E/NS1 é clivado por peptidases celulares, presentes no lúmen do retículo endoplasmático, durante o processamento da poliproteína e a proteína recombinante ficaria restrita ao retículo endoplasmático da célula, devido à sua retenção à membrana do RE conforme descrito por Bonaldo e colaboradores (2007). Enquanto que na segunda abordagem o inserto heterólogo, inserido entre as proteínas NS2B e NS3 do VFA, é flanqueado por sítios de proteases virais e clivado por essas proteases durante o processamento da poliproteína viral, liberando o inserto no citoplasma celular, enquanto o processamento das outras proteínas e a replicação viral procede normalmente (MacAllister *et al.*, 2000). Um estudo expressando epítipo imunodominante da proteína M1 de influenza nessa região do vírus FA 17DD, permitiu elucidar que a inserção de epítopos imunodominantes nessa região do vírus é capaz de induzir células T CD8+ específicas devido à sua capacidade de infectar células dendríticas (CD) do hospedeiro, permitindo o processamento e apresentação desses antígenos para linfócitos T CD8+, via MHC classe I (Barba-Spaeth *et al.*, 2005). Além disso, VFA recombinantes também são capazes de induzir células T CD4+ específicas ao inserto heterólogo. Esse mecanismo foi estudado por Paluden e colaboradores (2005), onde observaram a infecção experimental de células pelo vírus Epstein-Barr seguido do processamento de suas proteínas via proteossoma, resultando em um processo de autofagia e consequente apresentação desses antígenos via MHC classe II.

Dessa maneira, espera-se que essas duas estratégias de construções virais (vírus NS2B3Tc e E/NS1Tc, construídos por Nogueira e cols (2013) e descritos acima) resultem em diferentes maneiras de apresentação do antígeno levando a uma resposta imune mais protetora contra *T. cruzi*, pois tanto a via de linfócitos T CD8+ quanto CD4+, além da resposta humoral, seriam ativadas contra a proteína ASP-2, expressa em

diferentes abordagens nos vírus recombinantes. Diante disso, foi avaliada a resposta induzida por esses vírus inoculados de maneira isolada ou formulados. Nestes trabalhos originais, foi visto que, embora parcial, houve proteção evidenciada pelo aumento de sobrevivência em camundongos vacinados com esses protótipos vacinais e redução do pico de parasitemia quando desafiados com o parasita, especialmente nos grupos que receberam a formulação. Além disso, ambos os vírus e a formulação entre eles foram capazes de induzir resposta celular de células TCD8<sup>+</sup> específicas aos epítomos imunodominantes.

Diante desses resultados anteriores, neste trabalho foi proposta uma abordagem de melhoramento da imunogenicidade dos vírus recombinantes através de modificações no inserto de ASP-2 e também no vetor FA 17D, que pudessem resultar, além do aumento da imunogenicidade, uma maior proteção em modelos experimentais. Em relação ao inserto, decidiu-se clonar um fragmento maior da proteína ASP-2, de 264 aminoácidos (ASP-2<sub>296-560</sub>), contendo não apenas o epítomo imunodominante TEWETGQI (específico ao haplótipo 2H-K<sup>k</sup>) mas também o epítomo imunodominante para haplótipo 2H-K<sup>b</sup>, VNHRFTLV. Em relação ao vetor, ASP-2<sub>296-560</sub> foi expressa na plataforma I e também na plataforma II (sob processo de patente), que também utiliza o sítio de clonagem entre E/NS1, mas com o intuito de que a proteína seja liberada do retículo endoplasmático e siga a via secretória para o meio extracelular.

O vírus YF17D/ENS1/Tc, construído anteriormente por Nogueira e cols (2013), possuía o fragmento ASP-2<sub>261-380</sub>, que se caracteriza por ser ligeiramente hidrofóbico. Esta hidrofobicidade poderia comprometer a topologia da poliproteína precursora em relação a esta membrana do retículo endoplasmático e, conseqüentemente provocar diminuição do fitness viral (figura 1 da introdução), devido a efeitos deletérios no processamento desta poliproteína e a replicação viral. Os novos vírus contruídos, VFA Tc1 e VFA Tc2, foram melhorados quanto ao parâmetro físico-químico considerado relevante, isto é o de hidrofobicidade. Entretanto, o tamanho da inserção heteróloga aumentou nos vírus VFA Tc1 e Tc2, em relação ao vírus Tc, o que poderia resultar em uma maior dificuldade de expressão da proteína no VFA Tc2. No entanto, sabe-se que é possível expressar, entre E/NS1, antígenos heterólogos de até 2 kb de tamanho, pois trata-se de uma região de mudança de genes estruturais e não estruturais, podendo acomodar melhor o inserto sem perturbar o ciclo viral como em outras regiões (Bonaldo et al., 2014). Nogueira e cols (2013) viram que os vírus NS2B3Tc e E/NS1Tc foram

capazes de se replicarem com títulos semelhantes ao VFA 17DD e foram geneticamente estáveis, mantendo o inserto heterólogo, até a oitava passagem em células VERO. Seria interessante comparar estes três vírus recombinantes para ASP-2 em termos de capacidade proliferativa em culturas celulares, de modo a se verificar se há diferenças significativas entre eles. No entanto, dados obtidos por nosso grupo de pesquisa apontam para uma maior capacidade de proliferação desta nova geração de plataformas virais (dados não publicados).

Outro ponto importante foi a expressão da ASP-2, que foi evidenciada por diferentes metodologias de detecção desta proteína nos vírus VFA Tc1 e Tc2 em células e lisados celulares. Esperava-se que a expressão no VFA Tc2 promovesse sua secreção, porém ASP-2 não foi detectada no sobrenadante de células infectadas com o vírus Tc2.

Os vírus NS2B3tew e NS2B3vnh foram construídos em uma outra plataforma de expressão que consiste em clonar pequenos epítomos (8-15 aminoácidos) entre as regiões NS2B/NS3 do genoma do VFA 17D, como discutido anteriormente, não interferindo consideravelmente na maturação das proteínas virais (MacAllister et al., 2000; Tao et al., 2005; Nogueira et al., 2011, 2013). A restrição do tamanho de insertos nesta região inserção nessa região deve-se ao fato de que NS2B é co-fator de NS3, assim inserções grandes poderiam intervir no processamento da poliproteína e impedir a replicação do vírus caso haja inserções muito grandes nessa região. Essa metodologia baseia-se em prover à proteína heteróloga dois sítios de clivagem de proteases virais, liberando a peptídeo para o citoplasma da célula (Bonaldo et al., 2014). Dessa maneira espera-se que estes peptídeos sejam originados pela clivagem do complexo proteolítico viral (NS2B/NS3). Entretanto, sua detecção por *western blotting* em extratos proteicos de células infectadas com VFA NS2B3tew e NS2B3vnh, não é possível devido de vido a seu baixo peso molecular. Por outro lado, houve a detecção da expressão do epítopo TEWETGQI, inserido no vírus NS2B3tew, por imunofluorescência. Já foi visto anteriormente que o epítopo TEWETGQI é um indutor de anticorpos em camundongos imunizados com esse peptídeo expresso em vírus anteriormente construídos por Nogueira e colaboradores (2013). Assim, o anticorpo policlonal utilizado na detecção por imunofluorescência, já poderia conter anticorpos específicos para esse epítopo.

Após a avaliação da expressão da proteína recombinante pelos vírus recombinantes, foi avaliada a indução de resposta imune desses vírus específicas ao inserto de ASP-2 em camundongos C57BL/6 e A/J. Optamos por analisar os vírus

nesses dois modelos experimentais, pois a maioria dos estudos utilizam C57BL/6, uma linhagem resistente à infecção por *T. cruzi*, para avaliação de uma resposta celular. Camundongos A/J são susceptíveis à infecção, constituindo um bom modelo para avaliação de imunidade protetora contra a doença (Vasconcelos et al., 2004). Ainda não estão bem definidas as bases dessa susceptibilidade, mas sugere-se que seja pela presença de alelos recessivos ou devido a ação conjunta de múltiplos genes (Graefe et al., 2003). Além disso, sabe-se que essa susceptibilidade não está ligada ao alelo MHC, já que camundongos B10.A, que possuem o mesmo alelo 2H-K<sup>K</sup> que A/J, são resistentes à infecção por *T. cruzi*. Outro aspecto interessante da diferença entre esses camundongos está relacionado à resposta imune. Em camundongos A/J a resposta é principalmente Th2, com alta produção de citocinas como IL-4 e IL-5 e baixa produção de IFN- $\gamma$ , citocina chave na resolução de infecções por parasitas intracelulares (Liew et al., 1991).

Inicialmente realizamos uma predição de epítomos MHC classe I imunodominantes através da plataforma IEBD. Os peptídeos imunodominantes VNHRFTLV e TEWETGQI (haplótipos H2-Kb e H2-Kk, respectivamente) já foram descritos na literatura como indutores de células T CD8<sup>+</sup> específicas, restritos a MHC classe I e produtoras de IFN- $\gamma$  (Machado et al., 2006; Haolla et al., 2009; Nogueira et al., 2011, 2013), sendo associados à indução de proteção pela proteína de superfície de amastigota 2, ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*. Os peptídeos preditos foram capazes de estimular esplenócitos de camundongos C57BL/6 e A/J imunizados com os vírus recombinantes VFA Tc1, VFA Tc2, VFA NS2B3tew, VFA NS2B3vnh e as formulações entre eles. Foi observada a indução de resposta celular com produção de IFN- $\gamma$  por células TCD8<sup>+</sup> específicas ao epítomo VNHRFTLV e TEWETGQI, como já descrito em trabalhos que utilizaram esses peptídeos (Haolla et al., 2009; Nogueira et al., 2011, 2013; Barbosa et al., 2013; Farrow et al., 2016). Além desses epítomos já conhecidos, decidimos testar outros epítomos de Febre Amarela e de *T. cruzi* com bons *scores*, segundo a ferramenta. A literatura nos mostra que outros epítomos já testados não foram bons indutores de resposta imune, quanto àqueles já descritos, assim como podemos evidenciar nos nossos resultados. Epítomos de ASP-2, reconhecidos por MHC classe I (haplótipo H-2K<sup>d</sup>) foram testados em ensaios de ELISPOT após vacinação de camundongos BALB/c com plasmídeo de DNA contendo gene de ASP-2, no entanto nenhum deles foram capazes de induzir produção de IFN-gama (Boscardin et al., 2003).

Outro experimento realizado com camundongos A/Sn (mesmo haplótipo de A/J, H2-K<sup>k</sup>), onde foram testados sete peptídeos MHC classe I, apenas TEWETGQI foi capaz de induzir um aumento no número de células produtoras de IFN- $\gamma$  (Araújo et al., 2005). O epítipo VNHRFTLV é descrito como altamente conservado e ligante de células T CD8<sup>+</sup> do haplótipo H2-K<sup>b</sup> de camundongos C57BL/6, assim como o epítipo DNRVYSFV (Boscardin et al., 2003; Araújo et al., 2014; Farrow et al., 2016), que aparece em oitavo lugar na lista de predição de epítopos realizada neste trabalho, enquanto o VNHRFTLV aparece em primeiro com melhor score (tabela 3.1 dos resultados).

Outro trabalho desenvolvido por nosso grupo, utilizando o VFA como vetor para expressão de antígenos de SIV, utilizou o vírus 17DD inativado para estímulo de esplenócitos de camundongos imunizados em ensaio de ELISPOT. A média de células produtoras de IFN- $\gamma$  foi entre 100 e 150x10<sup>6</sup> células (Neves et al., 2014). Quando estimulamos os esplenócitos com peptídeo ATLYRML (haplótipo H2-K<sup>b</sup>) da proteína NS3 do VFA, nos experimentos de ELISPOT (descrito nas figuras 8C dos resultados), vimos que o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  é em média 5 vezes maior, em torno de 500 a 1000 x10<sup>6</sup> células. Isto pode ocorrer porque durante o processamento e apresentação de antígenos do vírus inteiro pelas APCs há maior competição de epítopos, já quando as células são incubadas apenas com o peptídeo de interesse, essa apresentação é muito mais específica. Na predição de epítopos que realizamos, outro epítipo da proteína NS3 do VFA foi determinado com um bom score, o SENNAHHV (haplótipo H2-K<sup>k</sup>), que foi tão eficaz na estimulação dos esplenócitos quanto o já descrito ATLYRML (Neves et al., 2013).

Além de determinarmos epítopos do VFA e T. cruzi eficientes na indução de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , vimos que os vírus recombinantes utilizados neste trabalho são igualmente capazes de promover resposta imune celular, assim como o VFA 17DD, já visto também por Nogueira e equipe (2013), reafirmando a promissora utilização desse vetor para expressar antígenos de *T. cruzi*.

Barbosa e colaboradores (2013) utilizaram vírus adenovírus recombinantes, viram que esplenócitos de camundongos imunizados e estimulados com esses peptídeos foram capazes de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  detectada, assim como nos resultados apresentados neste trabalho (Figuras 8 e 9). A imunização de camundongos A/J com o vírus Tc (Nogueira et al., 2013) foi capaz de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  em

esplenócitos estimulados com o peptídeo TEWETGQI mas proporcionou apenas uma proteção parcial aos camundongos, o que poderia estar associado à baixa imunogenicidade do vírus recombinante (Tc) (Nogueira et al., 2013). Após modificações no vetor e no inserto de ASP-2 (discutidos anteriormente), esperava-se que VFA Tc2 induzisse melhor resposta (celular e humoral), pois a proteína recombinante não estaria mais ancorada à membrana do retículo endoplasmático, mas seria liberada para o trans-Golgi seguindo a via de secreção celular. A utilização desse vírus isolado e as formulações que o contém, parece estar associado a uma tendência de maior resposta de IFN-  $\gamma$ . Para definirmos melhor essa resposta será necessário um estudo mais aprofundado de outros perfis de citocinas, além de ensaios de proteção.

Os vírus NS2B3 foram fracos indutores de resposta celular, contrastando com os achados de Nogueira e colaboradores (2013) em que o vírus que contém o epítipo TEWETGQI expresso entre NS2B/NS3 foi capaz de induzir um maior número de células produtoras de IFN-  $\gamma$ , quando comparado aos resultados obtidos nessa dissertação, embora ainda inferior ao vírus Tc, que tem o fragmento de ASP-2 expresso entre E/NS1 do VFA 17DD. Este resultado pode estar relacionado às diferenças entre as plataformas VFA de expressão, já que o inserto é o mesmo.

Desde os anos 90, foram testadas várias abordagens para criação de uma vacina contra a doença de Chagas. Os primeiros estudos utilizaram o parasito vivo, atenuado ou morto para imunização. Resultados significativos de redução na parasitemia foram obtidos, porém outros problemas foram observados, como aumento do infiltrado leucocitário no tecido cardíaco, não proteção para a doença crônica e proteção contra apenas a cepa testada, já que antígenos relacionados à proteção são diferentes entre as cepas (Basso et al., 2008). A imunização com frações celulares foram importantes para elucidar a importância da resposta imune celular, Th1 principalmente, na resolução da infecção por *T. cruzi*, indicando maiores níveis de IFN- $\gamma$  e IL-12 em grupos de camundongos onde houve maior proteção (Miller et al., 1996). Vacinas de DNA, utilizando proteínas recombinantes do parasita, como trans-sialidases e proteína purificadas do flagelo também estão sendo estudadas. O grande desafio para esse tipo de abordagem é a necessidade da utilização de adjuvantes que sejam seguros para humanos (Bontempi et al., 2015). Vacinas que utilizaram antígenos das formas extracelulares tripomastigotas de *T. cruzi*, como as proteínas trans-sialidases, não mostraram a mesma magnitude de proteção, em camundongos suscetíveis, quanto às realizadas com

antígenos de amastigotas ASP-2 (Vasconcelos et al., 2004). É possível que antígenos provenientes de formas intracelulares de amastigotas sejam melhores alvos de uma resposta imune celular protetora. Além de que os ninhos de amastigotas estão criticamente envolvidos na patologia crônica de Chagas (Tarleton et al., 2001).

Vários trabalhos evidenciam que a imunização de camundongos com vírus recombinantes expressando inserto de ASP-2 ou com DNA plasmidial com inserto dessa mesma proteína, induz imunidade protetora contra *T. cruzi* (Araújo et al., 2005). Farrow, et al. 2016, realizaram imunizações em camundongos C57BL/6 utilizando adenovírus recombinantes para expressão de um fragmento de ASP-2 contendo o epítopo imunodominante VNHFR TLV. Foi visto que os animais imunizados e desafiados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* foram capazes de produzir resposta humoral específica ao inserto. Em camundongos C57BL/6 e C3/He imunizados com vírus influenza recombinante seguido de adenovírus recombinante com inserto de ASP-2, houve resposta celular de IFN- $\gamma$  específica aos epítomos imunodominantes TEWETGQI e VNHFR TLV e também indícios de proteção quando desafiados com cepa Y de *T. cruzi*, com redução do pico de parasitemia e queda da mortalidade.

Sabe-se que ASP-2 pode induzir, além de resposta celular específica, resposta imune mediada por anticorpos. Barbosa e equipe (2013) viram que camundongos C3H/He imunizados com adenovírus e influenza recombinantes não produziram anticorpos específicos para ASP-2, porém em camundongos C57BL/6, houve detecção de anticorpos específicos. Infelizmente, não se pode detectar anticorpos dirigidos a ASP-2 nas amostras de soro dos camundongos imunizados com os vírus FA Tc1 e Tc2 por ELISA anti-ASP2. Isto poderia ser explicado pela utilização da proteína ASP-2 recombinante feita em *E.coli*, a qual poderia estar em uma conformação diferente da expressa pelos vírus recombinantes. Assim, anticorpos induzidos pela proteína recombinante expressa pelos VFA Tc1 e Tc2 poderiam não reconhecer a proteína similar em sequência, mas não em conformação, expressa em *E.coli*. Outra possibilidade sugere que os epítomos imunodominantes para linfócitos B estão localizados principalmente na porção C-terminal da proteína ASP-2, além de que a resposta humoral contra a forma intracelular amastigota não parece ser essencial para a proteção (Barbosa et al., 2013). Por outro lado, a coleta do soro foi realizada 15 dias após a segunda dose da imunização, que é o período determinado para detecção de resposta celular, mas pode ter sido precoce para detecção de anticorpos. Em

contrapartida, a imunização de camundongos com os genes que codificam trans-sialidase e a proteína TcSSP4 de superfície de amastigota ou suas proteínas recombinantes, seguido do desafio com a cepa H8 de *T. cruzi*, foram capazes de induzir tanto resposta celular Th1 quanto Th2 e humoral. Além disso, a vacinação de cães com doença de Chagas utilizando esses dois genes, induziu anticorpos, proliferação de linfócitos e aumento de IFN- $\gamma$ , resultando na melhora dos danos cardíacos causados na fase crônica da doença (Rodriguez-Morales et al., 2012,2013).

Em camundongos A/J houve uma tendência de redução no tempo de mortalidade e diminuição do pico de parasitemia, representando indícios de uma possível proteção das formulações vacinais testadas nesses camundongos. A formulação utilizada por Nogueira (2013), que consistia nas construções virais anteriores as utilizadas neste trabalho, também foi capaz de reduzir o pico de parasitemia e aumento da sobrevivência de camundongos A/J desafiados. Essas evidências indicam que será necessário refazer nossos experimentos de proteção com um número maior de camundongos, bem como avaliar outros tipos de citocinas para organizarmos um melhor perfil da resposta imune.

Os resultados obtidos neste trabalho, associados a outros trabalhos do nosso grupo, encorajam novos estudos utilizando VFA 17DD recombinante para expressão de epítomos heterólogos. Esses estudos, ainda que preliminares, já mostraram que os vírus FA 17DD recombinantes são capazes de induzir resposta imune celular específica, indução de anticorpos e uma possível proteção em modelo experimental.

## 6 CONCLUSÕES

- A imunização de camundongos com os vírus recombinantes foi capaz de induzir aumento do número de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$ .
- O vírus Tc2, bem como as formulações que o contém, parecem ter induzido de forma mais robusta a produção de IFN- $\gamma$ .
- Houve soroconversão da maioria dos camundongos para o vírus 17DD, indicando que os vírus recombinantes são igualmente capazes de induzir produção de anticorpos.
- A imunofluorescência em ninhos de amastigotas foi capaz de detectar essas formas do parasito, mostrando que havia anticorpos anti-ASP2 no soro dos camundongos imunizados.
- Os resultados, mesmo que preliminares foram promissores para continuação de uma análise mais intensa desses protótipos vacinais, com a detecção de um painel de citocinas mais completo e maior número de camundongos submetidos aos ensaios de desafio.

## 7 REFERÊNCIAS

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 2001; 158(4):1433-1440.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez J, Abate T, Naranjo L, Paiva M, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010, 201:1308-1315.

Araújo AFS, de Alencar BCG, Vasconcelos JRC, Hiyane MI, Marinho CRF, Penido MLO, et al. CD8<sup>+</sup>-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect. Immun.* 2005; 73(9):6017-6025.

Araújo AF, Oliveira G, Vasconcelos JF, Ersching J, Dominguez MR, et al. Genetic Vaccination against Experimental Infection with Myotropic Parasite Strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mediators of Inflammation.* 2014; 605023:1-13

Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J. Exp. Med.* 2005; 202(9):1179-1184.

Barbosa-Ferreira JM, Guerra JAO, Santana FFS, Magalhães BML, Coelho LIARC, Barbosa MG. Acometimento cardíaco em casos de doença de Chagas aguda da Amazônia. *Arq. Bras. Card.* 2010; 94(6):147-149.

Barbosa RPA, Filho BG, Santos LI, Junior PAS, Marques PE, et al. Vaccination using recombinants influenza and adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Plos One.* 2013; 8(4):e61795.

Basso B, Moretti E, Fretes R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(4):370-374.

Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med.* 2013; 3(1):1-10.

Beaumier CM, Gillespie PM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, et al. Status of Vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine.* 2016; 74(3):1-5.

Bermejo DA, Amezcua-Vesely MC, Montes CL, Merino MC, Gehrau RC, et al. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. *Plos Negl Trop Dis.* 2010; 4(5):e679.

- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Pablo Real J, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 2016; 156:1-16.
- Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel A, Duarte AS, Oliveira PJ, Freire MS, Kubelka CF, Galler R. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology Journal* 2007; 4:115.
- Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(5):1256-65.
- Bontempi IA, Vicco MH, Cabrera G, Villar SR, Belén F, et al. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine.* 2015; 33(10):1274-1283.
- Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect. Immun.* 2003; 71(5):2744-2757.
- Brandriss MW, Schlesinger JJ, Walsh EE. Immunogenicity of a purified fragment of 17D yellow fever envelope protein. *J. Infect. Dis.* 1990; 161(6):1134-1139.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. 7 ed. Brasília, DF. 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivo/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivo/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf)>.
- Bryan MA, Guyach SE, Norris KA. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. *Plos Negl Trop Dis.* 2010; 4(7):e733.
- Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J. Immunol.* 1997; 159(12):6131-6139.
- Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, Arnaiz M, Mirkin GA, et al. Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection.
- Chagas CRJ. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1: 159-218.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990; 44:649-688.
- Claser C, Espindola NM. Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2007;9(8): 10111019.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007; 102 Suppl 1:113-122

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:252-258.

Cross GA, Takle GB. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 1993;47:385-411.

Da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(2)e604.

Dc-Rubin SS, Schenkman S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases as a multifunctional enzyme in Chagas disease. Cell Microbiol. 2012;14(10):1522-1530.

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010; 295394:1-18.

Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH. The Structural immunology of antibody protection against West Nile virus. Immunol Ver. 2008; 225:212-225.

Dos Reis, GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Braz J Med Biol Res. 2011;44(2)84-90.

Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. J. Virol. 1989; 63(5):1852-1860.

Farrow AL, Peng BJ, Gu L, Krendelchtchikov A, Matthews QL. A novel vaccine approach for Chagas disease using rare Adenovirus serotype 48 vectors. Viruses. 2016; 78(8)1-18

Galler R, Post PR, Santos CN, Ferreira II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. Vaccine. 1998; 16(9-10):1024-1028.

Graefe SEB, Meyer BS, Müller-Myhsok B, Rüschemdorf F, Drosten C, Laue T, et al. Murine susceptibility to Chagas' disease maps to chromosomes 5 and 17. Genes Immun. 2003; 4(5):321-325.

Haolla FA, Claser C, Alencar BCG, Tzelepis F, Vasconcelos JR, et al. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Vaccine. 2009; 27:5644-5653.

Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. Vaccine. 2012;30(29):4301-6.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002 Mar 8;108(5):717–25.

Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1998; 20(5):207-216.

Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Immunol*. 1991; 21(12):3009-3014.

Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Lippincott-Raven: Filadélfia; 4<sup>a</sup> Ed; 2001. P. 991-1041.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. In: Chambers TJ, Monath TP, editors. *Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, diagnosis and vaccine development*. Elsevier Academic Press: California; vol. 59; 2003. P. 235-289.

Lindenbach B, Thiel H, Rice C. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D, Howley P, editors. *Fields virology*. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1102 - 52.

Low HP, Tarleton RL. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1997; 88(1-2):137-149.

Low HP, Santos MA, Wizek B, Tarleton RL. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. *J. Immunol*. 1998; 160(4):1817-1823.

Luhers KA, Fouts DL, Manning JE. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2003; 21(21-22):1549-1557.

McAllister A, Arbetman AE, Mandl S, Pena-Rossi C, Andino R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *J Virol*. 2000;74(19):9197-205.

Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Longterm protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther*. 2006; 17(9):898-908.

Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev*. 2004; 201:304-317.

Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Longterm protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after

vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* 2006; 17(9):898-908.

Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JGL, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine.* 2008; 26(9):1173-1184.

Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. *Exp Parasitol.* 1996; 84(2):156-167.

Monath TP, Heinz FX. Flavivirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, Raven Press: Filadélfia, 3ª edição; 1996. P.961-1034.

Monath TP. Yellow fever. In: Plotkin S, Orenstein WA, editores. *Vaccines*. 3ª edição. Philadelphia: WB Saunders, 1999. P.815–80.

Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(1):11-20

Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *J Clin Virol.* 2015;64:160-73

Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(12):957–64.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):13-22.

Müller U, Sobek V, Balkow S, Hölscher C, Müllbacher A, Museteanu C, et al. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33(1):70-78.

Neves PCDC, Matos DCDS, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2009; 27(41):5543-5549.

Neves PC, Santos JR, Tubarão LN, Bonaldo MC, Galler R. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptative immune response. *Plos One.* 2013; 8(12):e81953.

Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MCS, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC. Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing a *Trypanosoma cruzi* Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virol. J.* 2011;8:127.

Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MCS, Rodrigues MM, Neves PC da C, Galler R, et al. Recombinant yellow fever viruses elicit CD8+ T cell responses and protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Plos One.* 2013;8(3):e59347.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICA DA SAÚDE. Doença de Chagas: guia pra vigilância, prevenção, controle e manejo da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009.

Paluden C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, et al. Endogenous MHC class II processing of a Viral Nuclear Antigen after Autophagy. *Science*. 2005; 307:593-596.

Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*. 2008 Oct;80(1):11–22.

Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull. World Health Organ*. 1981; 59(6):895-900.

Quaresma JÁ, Pagliari C, Medeiros DB, Duarte MI, Vasconcelos PF. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Ver Med Virol*. 2013; 23(5):305-18.

Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. Raven Press. 1996; 3(2):931-960.

Rodriguez-Morales O, Pérez-Leyva MM, Ballinas-Verdugo MA, Carrillo-Sánchez SC, Rosales-Encina JL, et al. Plasmid DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* genes induces cardiac and clinical protection against Chagas disease in the canine model. *Vet Res*. 2012; 43:79.

Rodriguez-Morales O, Carrillo-Sanchez SC, García-Mendonza H, Aranda-Fraustro A, Ballinas-Verdugo MA. Effect of the plasmid-DNA vaccination on a macroscopic and microscopic damage caused by the experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in the canine model. *Biomed Res Int*. 2013; 826570.

Rodríguez-Morales O, Monteón-Padilla V, Carrillo-Sánchez SC, Rios-Castro M, Martínez-Cruz M, et al. Experimental vaccines against Chagas disease: a journey through history. *J Immunol Res*. 2015; 489758.

Rodrigues MM, Boscardin SB, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Salay G, Soares IS. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *An. Acad. Bras. Cienc*. 2003; 75(4):443-468.

Rodrigues MM, Alencar BCGD, Claser C, Tzelepis F. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2009a; 42(3):220-223.

Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *J Parasitol Res*. 2012; 507874:1-12.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(1):246-251.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. J. Immunol. 1985; 135(4):2805-2809.

Schenkman S, Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. Parasitol. Today (Regul. Ed.). 1993; 9(6):218-222.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006; 22(12):583-588.

Silva EM, Rocha MOC, Silva RC, Paixão GC, Buzzati H, Santos NA, Nunes MCP. Estudo clínico-epidemiológico da doença de Chagas no distrito de Serra Azul, Mateus Leme, centro-oeste do estado de Minas Gerais. Ver Soc Bras Med Trop. 2010; 43(2):178-181.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. Infect. Immun. 1995; 63(12):4862-4867.

Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. 1928. Rev. Med. Virol. 2001; 11(3):141-148.

Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. J Exp Med. 2005; 201(2):201-209.

Tarleton RL. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 2001; 31(5-6):550-554.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Opin. Immunol. 2007; 19(4):430-434.

Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. J. Exp. Med. 1937; 65(6):787-800.

Vasconcelos JRC, Boscardin SB, Hiyane MI, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. Immunol. Cell Biol. 2003; 81(2):121-129.

Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CRF, Claser C, Machado AMV, Gazzinelli RT, et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Hum. Gene Ther. 2004; 15(9):878-886.

Vasconcelos JR, Domingues MR, Neves RL, Ersching J, Araújo A, et al. Adenovirus vector-induced CD8+ T effector memory cell differentiation and recirculation, but not proliferation, are important for protective immunity against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Hum Gene Ther. 2014; 25(4):350-363.

Wizel B, Palmieri M, Mendoza C, Arana B, Sidney J, Sette A, et al. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. J. Clin. Invest. 1998; 102(5):1062-1071.

World Health Organization, 2013. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases.

Wrightman RA, Dawson BD, Fouts DL, Manning JE. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. J. Immunol. 1994; 153(7):3148-3154.

Zanotto PMA. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996; 93:548-553.