

Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho” - UNESP
Instituto de Biociências de Botucatu

**Geração e análise da imunogenicidade de plasmídeos contendo
epítomos CD8 sub-dominantes expressos em *Trypanosoma cruzi***

Mariana Ribeiro Dominguez

Orientador: Prof. Dr. Maurício M. Rodrigues
Co-orientador - MSc. Eduardo Lani Volpe da Silveira
Supervisor de estagio: Alexandrina Sartori

Monografia realizada no CINTERGEN pelo
Depto. Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia da Unifesp-Universidade
Federal de São Paulo, apresentada à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas Modalidade Médica.

Botucatu

2008

Departamento de Micro/Imunologia
Do Instituto de Biociências de Botucatu

**Geração e análise da imunogenicidade de plasmídeos contendo
epítomos CD8 sub-dominantes expressos em *Trypanosoma cruzi***

Estudante: Mariana Ribeiro Dominguez
Orientador: Prof. Dr. Maurício M. Rodrigues
Co-orientador - MSc. Eduardo Lani Volpe da Silveira
Supervisor de estagio: Alexandrina Sartori

Dezembro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Dominguez, Mariana Ribeiro.

Geração e análise da imunogenicidade de plasmídeos contendo epítomos CD8 sub-dominantes expressos em *Trypanosoma cruzi* / Mariana Ribeiro Dominguez. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Mauricio M. Rodrigues

Co-orientador: Eduardo Lani Volpe da Silveira

1. Imunologia 2. Resposta imune - Estudos experimentais 3. Infecção experimental

Palavras-chave: Epítomos subdominantes; Inodominância; Plasmídeos; Vacina gênica; *T.cruzi*;

Os experimentos descritos nesta monografia foram integralmente realizados nas dependências da Universidade Federal de São Paulo – *Campus* São Paulo, no Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos meus pais, por todo amor que sempre me deram, pelos exemplos de trabalho e persistência. A minha irmã e amigos por compreenderem minhas ausências e ao Raphael e a família Kudaka por todo apoio em todas as decisões importantes de minha vida.

Agradecimentos

Minha enorme gratidão ao Prof. Dr. Mauricio Martins Rodrigues pela oportunidade e a todos aqueles que, assim como ele, encheram minha mente com boas idéias. A todos os professores que me conduziram nessa jornada, aos colegas de laboratório que contribuíram com longas e longas explicações, tendo sempre enorme paciência em me ensinar, mas principalmente aqueles que sempre exigiram de mim que fizesse sempre melhor, mesmo quando eu achava que já estava bom. Todos fizeram isso com enorme generosidade. Incluem Dra.Carla Claser (que me conduziu nos meus primeiros passos no lab. e uma pena que não pudemos passar mais tempo juntas), Dra.Fanny Tzelepis (cujo trabalho gerou o meu e idem a Carlinha), Eduardo Lani Volpe da Silveira (que me ensinou tudo o que eu sei de molecular e me adotou como estagiaria quando a Carlinha saiu pro pós-doc., obrigaduuiu), Filipe Haolla (pelo auxílio nos experimento de imunologia, pelos conselhos, pelas muitas explicações e pelas risadas que demos), Bruna Alencar e Daniel Bargieri (pelos bons exemplos, pelas explicações, pela solicitude, pelas experiências extra projeto e também pelas risadas), Samanta Mello (pelo auxílio nos experimento de imunologia, pelas explicações, discussões, pelas muitas risadas, baladas e cafés) e ao mais novo antigo membro do laboratório José Ronnie Vasconcelos, sei que ainda vou aprender muito com estes quatro últimos com quem ainda terei a oportunidade de conviver por um bom tempo.

Ao Dr. Hugo Monteiro e pelas risadas nos corredores do CINTERGEN e pelos seminários e simpósios dos quais eu tive a oportunidade de participar. Aos colegas de CINTERGEN as I.C.s do prof. Sang, Priscila e Roberta, a outra Priscila do lab. Do prof. Sang, ao Daniel, Eduardo e Bianca do mesmo laboratório, a Karina, Fernanda e Helena do lab. Do prof. Esper e a Wagner e Marli do lab. Do prof. Hugo, pela agradável convivência. Aos funcionários do CINTERGEN: Ivanete, Magali, Ivone, Roseli, Adauto e Elieser, pelo respeito e solicitude e em especial Ivanete que sempre me ajudou.

Aos alunos da disciplina de Parasitologia: Vanessa, Daniela, Charles, Rafael, Scheila, Fernando Real, Fernando Maeda e Adréia, pelas agradáveis conversas.

Sou muito grato àqueles que fizeram da minha jornada até aqui um prazer, aos meus melhores amigos de faculdade, Ivelise Mariana Pinheiro, Natália Prearo Moço, Gabriel Capela Machado e Henrique Aldar (não sei se a faculdade teria tido tanta influencia sobre mim não fossem essas pessoas, foram meus cúmplices em tudo, são meu alicerce nessa vida de biomédica)

Aos meus melhores amigos de colegial que me acompanham de longe dès do início de tudo, quando nem sabia se deveria ou não fazer biomedicina(eles tentaram me avisar): Jordana, Claudia, Diogo(que me levou até o laboratório da primeira vez que estive lá), Victor Medeiros (quem primeiramente me falou do laboratório do prof.Mauricio) e Victor Domingues.

Ao meu namorado Raphael por me apoiar em todas as minhas decisões, por acreditar na minha capacidade, por me acompanhar e me esperar pacientemente, mas principalmente por compreender.

E, finalmente, a minha família: meu pai, Alvaro Dominguez Veiga, minha mãe, Maria do Carmo Ribeiro Dominguez e a minha irmã, Isabela Ribeiro Dominguez, o alicerce de toda a minha vida, minha segurança e também pelo suporte financeiro, juntamente com a FAPESP e o CNPQ.

Sumário

Resumo	X
Introdução.....	1
1. Doença de Chagas.....	2
2. <i>T. cruzi</i> e seu ciclo de vida.....	3
3. Resposta CD8 ⁺ contra <i>T.cruzi</i>	5
4. Imunodominância na resposta imune mediada por linfócitos T CD8 ⁺	7
5. Implicações do estudo de linfócitos T CD8 ⁺	11
Objetivos	14
Material e Métodos	17
1. Desenho e seqüências dos oligonucleotídeos utilizadas nas reações de mutagênese sítio dirigida	18
2. Composição das soluções e tampões utilizados	19
3. Meios de cultura para bactérias	19
4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	20
5. Eluição de DNA do gel de agarose 1% - Kit Qiaex.....	20
6. Quantificação de DNA por eletroforese	21
7. Clonagem (ligação) das <i>asp-2</i> mutadas em plasmídeo pMOS(2885 pb)	22
8. Transformação de bactérias com DNA plasmidial.....	22
8.1.Preparação de bactérias competentes	22
8.2.Transformação de bactérias competentes com produtos de ligação	23
9. Mini-Prep: Extração de DNA plasmidial por Lise Alcalina	23
10. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição para verificação da presença do inserto e sua respectiva orientação	25
11. Seqüenciamento do DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	25
11.1.Análise computacional das seqüências obtidas	26
12. Crescimento em larga escala de bactérias da cepa DH5α e método de lise alcalina (maxi-prep)	27
13. Purificação de plasmídeo produzido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl)	28
14. Camundongos e parasitas.....	29
15. Imunização	29
15.1.Obtenção do soro, desafio e quantificação da resposta protetora	29
16. Análise da resposta imune celular.....	30

16.1.ELISPOT <i>ex vivo</i> para produção de IFN- γ	30
16.2.Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	31
17. Análise estatística	32
Resultados	34
Discussão	55
Conclusão	58
Bibliografia.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: EPÍTOPOS RECONHECIDOS POR LINFÓCITOS T CD8+ DURANTE A INFECÇÃO NATURAL COM PARASITAS DE DIFERENTES CEPAS DE *T. cruzi*.....**17**

TABELA 2: OLIGONUCLEOTÍDIOS PRODUZIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DOS QUATRO PLASMÍDEOS, NA TABELA CONSTA AS SEQUÊNCIAS ORIGINAIS DOS EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES SEGUIDA DAS SEQUÊNCIAS DOS OLIGOS (COM AS MUTAÇÕES).....**18**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2 – Hierarquia da resposta restrita ao H-2K ^d de camundongos BALB/c infectados com PR8.	10
Figura 3: ESQUEMA DE MUTAGÊNESE DÍTIO DIRIGIDA	35
Figura 4: Foto representativa do gel de agarose com os produtos das duas primeiras PCRs (Fragmentos maior e menor do inserto VNHRATLA)	36
FIGURA 5: Foto da eletroforese dos 24 clones de VHNHRATLA em pMOS digeridos com KpnI e Xba I	38
FIGURA 6: Foto representativa da quantificação dos clones 12, 15 e 20 do plasmídeo plgSP-VNHRATLA.	40
FIGURA 7- SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DOS PLASMÍDEOS CONSTRUIDOS POR MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA COMPARADAS A SEQUENCIA DE AMINOACIDOS DA ASP-2	47
FIGURA 8: Esquema representando os quatro plasmídeos construídos a partir do plgSP-clone 9 (Boscardin <i>et al.</i> 2003) por mutagênese sítio dirigida	48
FIGURA 9: Citotoxicidade e produção de IFN- γ específica em camundongos F1(C57BL/6 x B10.A) imunizados com pRE-P4P7 e infectados com <i>T. cruzi</i>	51
FIGURA10: Citotoxicidade e produção de IFN γ específica em camundongos CB10 imunizados com plgSP-VNHRATLA e infectados com <i>T. cruzi</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	-	Deoxi-nucleotídeos
DO	-	Densidade óptica
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	-	“enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
INF- γ	-	Interferon gama
IPTG	-	Isopropilbeta de tiogalactopiranosídeo
KO	-	“knockout”
L	-	Litro
M	-	Molar
mA	-	Miliampére
mg	-	Miligrama
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
N	-	Normal
ng	-	Nanograma
Pb	-	Pares de bases
PMSF	-	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
RNA	-	Ácido ribonucleico
RNase	-	Ribonuclease
rpm	-	Rotação por minuto
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
TAE	-	Tampão tris acetato EDTA
TEMED	-	n',n',n',n' tetrametil etileno diamida
U	-	Unidade
V	-	Volt
X-gal	-	5-bromo-4-cloro-3-indolil - β - d - galactopiranosídeo

μL - Microlitro

Resumo

Resumo

Durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, a resposta imune adaptativa mediada por células CD8⁺ é direcionada a poucos epítomos imunodominantes e subdominantes. Em estudos anteriores, foi demonstrado que, em diferentes linhagens de camundongos, a imunização com plasmídeos ou proteínas recombinantes, que expressam epítomos CD8 imunodominantes, antecipa a resposta imune após o desafio e proporciona resposta imune protetora contra infecções letais com *T.cruzi*.

Em nosso estudo atual, desenvolvemos a hipótese que também é possível gerar resposta imune protetora a partir de imunizações com plasmídeos que expressam epítomos subdominantes. Neste caso, esta resposta poderia se somar a resposta imune dominante ampliando o espectro da resposta imuno-protetora.

Para testar nossa hipótese, nós tivemos que construir diferentes plasmídeos contendo a ORF do gene da proteína 2 de superfície de amastigota (*asp-2*) de *T.cruzi* contendo mutações que: i) retiraram os epítomos imunodominantes CD8 (VNHRFTLV para H-2K^b ou TEWETGQI para H-2K^k); ii) trocaram o epítomo imunodominante por epítomos sub-dominantes (TsKb-18 ANYDFTLV ou TsKb-20 ANYKFTLV). Além disso, também foi construído um plasmídeo contendo somente a porção P4-P7 (261° a 500° aminoácidos) da *asp-2*.

Após a construção destes plasmídeos, testamos a imunogenicidade de dois deles, denominados pRE-P4P7 e o plgSP-VNHRATLA, foram testados individualmente na vacinação de camundongos F1(C57BL/6 x B10.A) (H-2K^b e H-2K^k) ou de CB10 (H-2K^b), respectivamente, e desafiados com tripomastigotas da cepa Y de *T.cruzi*.

A vacinação de camundongos F1 (C57BL/6 x B10.A) com o plasmídeo pré-P4-P7 aumentou significativamente a resposta imune de células CD8⁺ específicas ao epítomo sub-dominante TEWETGQI, restrito ao MHC H-2k^k, porém não diminuiu a resposta ao epítomo dominante PA8 restrito ao MHC H-2k^b. Após o desafio, o pico de parasitemia foi reduzido significativamente nos animais imunizados em relação ao grupo controle. Este experimento confirmou em parte nossa hipótese inicial de que a resposta imune contra epítomos subdominantes pode induzir imunidade protetora contra a infecção experimental.

Resumo

A vacinação de camundongos CB10 (H2-K^b) foi feita com o plasmídeo plgSP-VNHRATLA no qual o epítipo imundominante foi mutado. A imunização com este plasmídeo não induziu resposta específica para o epítipo original, VNHRFTLV. A construção destes plasmídeos nos proporcionará a oportunidade de estudar a imunogenicidade induzida contra os epítipos subdominantes em maior detalhe. Esta informação pode ser pertinente para o desenvolvimento de vacinas recombinantes.

Introdução

1. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Este protozoário hemoflagelado unicelular pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e é um parasita digenético.

Após quase um século de sua descoberta, a doença de Chagas ainda é um grande problema econômico e de saúde pública em muitos países da América Latina. Estimativas recentes divulgadas pela Organização Mundial da Saúde indicam que há cerca de 9,8 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, e que, a cada ano, ocorrem 300.000 novos casos de infecção, sendo que cerca de 20 mil pessoas vão a óbito (WHO, 2007).

A doença de Chagas é caracterizada por apresentar um curso clínico variável, que inclui uma fase aguda inicial, que pode ser assintomática ou sintomática, com febre, adenomegalia, conjuntivite unilateral (Sinal de Romana), parasitemia no sangue periférico, miocardite e meningoencefalite. A fase inicial pode ser fatal em até 10% dos casos mais graves, com alta mortalidade em crianças abaixo de três anos de idade em consequência da meningoencefalite (COURA, 2003).

Anos ou décadas após o contato com o parasita, cerca de 30% dos indivíduos infectados desenvolvem sintomas da fase crônica que podem ser comprometimento cardíaco, gastrintestinais e/ou neuronais. Cerca de 10% dos pacientes chagásicos tem um acometimento do mega-esôfago e o restante, não desenvolve sintomas, mas continua a transmitir a doença (VIOTTI *et al.*, 1994; revisado por ANDRADE & ANDREWS, 2005; COURA, 2007). A maioria dos indivíduos na fase crônica da doença de Chagas é resistente ao tratamento quimioterápico e continua infectado por toda a vida (VIOTTI *et al.*, 1994; COURA, 2007).

O tratamento com as drogas nifurtimox (Lampit), introduzida em 1967 pela Bayer, e benzonidazol (Rochagan, Radanil) possui uma certa eficiência em parte das crianças infectadas. Nestes casos, os indivíduos se tornam sorologicamente negativos e não apresentam sintomas da doença. Entretanto, o quadro é bem mais complicado em adultos cronicamente infectados. Nestes, só uma parcela reduzida (~30%) responde ao tratamento, se tornando negativos sorologicamente (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2003). Não se sabe, ao certo, quais os fatores que impedem o tratamento eficiente da maioria dos pacientes. Há a descrição de cepas que são

resistentes às drogas, o que seria a explicação mais plausível para a falha no tratamento.

O diagnóstico da doença de Chagas pode ser feito através da presença do parasita no sangue periférico pelo exame direto a fresco. A hemocultura é indicada para a fase aguda e o xenodiagnóstico apresenta-se positivo em 50% e 100% dos pacientes em fases crônica e aguda, respectivamente. O diagnóstico da infecção crônica é feito, geralmente, por ensaios como ELISA, hemaglutinação e por fixação do complemento para detectar anticorpos específicos circulantes. Técnicas mais refinadas, como a de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), são atualmente utilizadas para detectar o DNA do protozoário nos tecidos do paciente (WHO, 2006).

Em virtude da ausência de tratamento adequado, a doença de Chagas é considerada a doença parasitária mais importante das Américas, representando uma perda econômica para os países americanos de US\$1 bilhão por ano (WHO, 2002). Por isso, a necessidade de se desenvolver novas drogas quimioterápicas e estratégias eficazes de vacinação ou terapia gênica e, desta forma, evitar uma eventual transmissão desta doença tão negligenciada pelos países desenvolvidos.

2. Ciclo de vida do *T. cruzi*

Este parasita apresenta um complexo ciclo de vida com dois hospedeiros, sendo um intermediário (vertebrado - homem, animais silvestres e domésticos) e, o outro, um definitivo (invertebrado – insetos triatomíneos como o *Triatoma infestans*, conhecido popularmente no Brasil como “barbeiro”, o *Rhodnius prolixus* e o *Panstrongylus megistus*). Seus diferentes estágios de desenvolvimento (tripomastigotas-metacíclicos ou sangüíneos, amastigotas e epimastigotas) podem ser identificados por meio da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e também pela região emergente do flagelo (Figura 1).

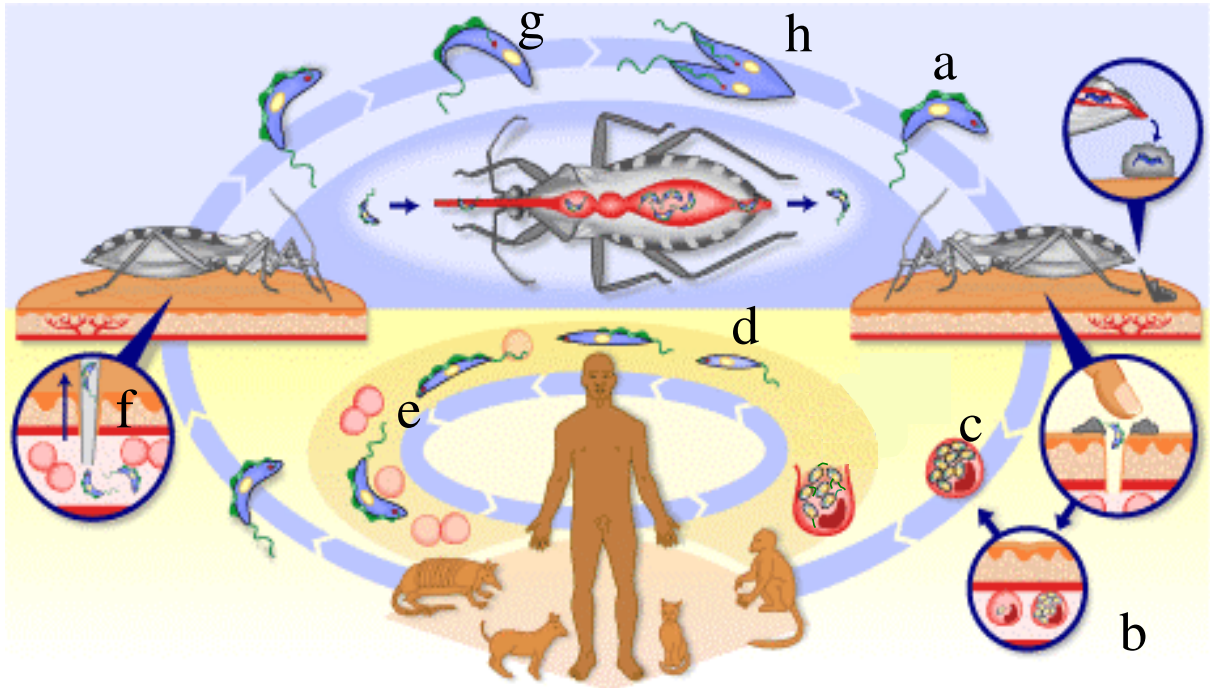


Figura 1 - Ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi*. A infecção é transmitida pelo inseto triatomíneo que pica o indivíduo, defecando próximo ao local da picada. Nas fezes e urina do inseto encontram-se formas tripomastigotas metacíclicas (a) que penetram pela lesão causada no momento da picada em que o indivíduo começa coçar a região. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células das camadas subjacentes à pele (b) e, no citoplasma dessas células, diferenciam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão binária (c). Os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sangüíneos (d), os quais são liberados para a corrente sangüínea com a lise da célula hospedeira, o que facilita sua migração para diferentes órgãos e tecidos (e). Se o hospedeiro vertebrado for novamente picado por um inseto triatomíneo, este ingere as formas tripomastigotas sangüíneas, reiniciando o ciclo (f). No tubo digestório do inseto ocorre a diferenciação dos tripomastigotas sangüíneos em epimastigotas (g) que se multiplicam por fissão binária (h). Na porção terminal do tubo digestório do hospedeiro invertebrado ocorre a diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes do hospedeiro vertebrado (a) (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>).

No hospedeiro vertebrado, pode-se observar no local da picada, o chagoma de inoculação, um processo inflamatório local acompanhado de dor, hiperemia e tumoração cutânea. Quando o local da picada é a conjuntiva pode-se observar uma conjuntivite caracterizando o sinal de Romana (revisado por PRATA, 1999).

3. Resposta CD8⁺ contra *T. cruzi*

A importância dos linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental pelo *T. cruzi* foi demonstrada através da infecção de camundongos geneticamente deficientes (CD8KO, β -2 microglobulina KO) ou tratados com anticorpos anti-CD8, os quais apresentaram parasitemia e susceptibilidade aumentada em relação aos controles (TARLETON *et al.*, 1992; ROTTENBERG *et al.*, 1993 e TARLETON, 1990). Os mecanismos anti-parasitários mediados por essas células são múltiplos, incluindo secreção de citocinas e citotoxicidade direta contra células infectadas (MARTIN & TARLETON, 2004; MULLER *et al.*, 2003, TZELEPIS *et al.*, 2006).

Em 2007, Cardillo *et al.* sugeriram que os linfócitos B têm um importante papel na geração e manutenção de células T CD8⁺ efectoras/memória. Foi observado que camundongos deficientes de linfócitos B infectados com tripomastigotas da cepa Tulahuén, apresentaram um número total de células T CD8⁺ menor que os animais controle, menor produção de citocinas inflamatórias (IFN- γ e IL-12) e menor infiltrado inflamatório, o qual também possuía menor porcentagem de células T CD8⁺ ativadas/memória. Um maior parasitismo nos tecidos e maior parasitemia também foram observados.

Tanto as formas amastigotas como as tripomastigotas são alvos da resposta de linfócitos T CD8⁺. No fim da década de noventa, foi demonstrado que as proteínas ASP-1 (proteína 1 da superfície de amastigotas), ASP-2 (proteína 2 da superfície de amastigotas), presentes nas formas amastigotas, TSA-1 (antígeno 1 de superfície de tripomastigotas) e TS (*trans*-sialidase de *T. cruzi*), presentes nas formas tripomastigotas, continham epítomos reconhecidos por células T CD8⁺ restritas para moléculas de MHC Ia (LOW *et al.*, 1998; WIZEL *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1999).

Apesar do conhecimento da importância dos linfócitos T CD8⁺, as sequências de aminoácidos reconhecidas por estes eram desconhecidas até recentemente. Este

fato impedia que se estudasse a cinética do aparecimento dessas células durante a infecção, por exemplo. Em trabalhos recentes feitos em diferentes laboratórios, identificaram epítomos reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção experimental com parasitas de diferentes cepas de *T. cruzi*, em camundongos de diferentes linhagens (TZELEPIS *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2006 TZELEPIS *et al.*, 2007). Os epítomos descritos, reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com parasitas da cepa Y ou G de *T. cruzi* são o PA8 (VNHRFTLV, da proteína 2 da superfície de amastigotas), TsKb-18 (ANYDFTLV, do antígeno TSA) e TsKb-20 (ANYKFTLV do antígeno TSA) (TZELEPIS *et al.*, 2006; TZELEPIS *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2006, TZELEPIS *et al.*, 2008). Por outro lado, no caso de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas CL e Brazil foram observadas respostas aos epítomos TsKb-18 (ANYDFTLV) e TsKb-20 (ANYKFTLV), mas não ao epítomo VNHRFTLV (MARTIN *et al.*, 2006, TZELEPIS *et al.*, 2008). Os animais BALB/c, infectados com a cepa Y, reconhecem o epítomo da *trans*-sialidase (TS) IYNVGQVSI e os camundongos B10.A, infectados com essa mesma cepa, reconhecem o epítomo TEWETGQI (TZELEPIS *et al.*, 2006, TZELEPIS *et al.*, 2008).

A descrição desses epítomos permitiu o estudo da cinética do aparecimento das células T CD8⁺ específicas capazes de mediar atividade citotóxica *in vivo*, assim como a de células T CD8⁺ específicas capazes de produzir IFN- γ *ex vivo*, durante a infecção experimental (TZELEPIS *et al.*, 2006).

A importância da resposta imune, mediada por linfócitos T CD8⁺, na resistência à infecção pelo *T. cruzi* fez com que vários grupos iniciassem uma busca pela indução dessas células específicas. De fato, a imunização de camundongos, com diferentes protocolos capazes de induzir linfócitos T CD8⁺ específicos contra alguns dos epítomos descritos acima conferiu uma proteção contra a infecção letal. Esses protocolos incluem vacinação com DNA plasmidial, vetores virais, proteínas e adenovírus recombinantes (COSTA *et al.*, 1998, WIZEL *et al.*, 1998, SEPULVEDA *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2004; FUJIMURA *et al.*, 2001, GARG & TARLETON, 2002, KATAE *et al.*, 2002, FRALISH & TARLETON, 2003, BOSCARDIN *et al.*, 2003, DUMONTEIL *et al.*, 2004, ARAÚJO *et al.*, 2005; MIYAHIRA *et al.*, 2005, MACHADO *et al.*, 2006; HOFT *et al.*, 2007; de ALENCAR *et al.*, 2007, SANCHEZ-BURGOS *et al.*, 2007). Em conjunto, esses trabalhos reforçam a idéia de um papel essencial para as células T CD8⁺ no controle da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

4. Imunodominância na resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺

Como já mencionado, linfócitos T CD8⁺ são componentes críticos na imunidade contra patógenos intracelulares. Embora os patógenos apresentem milhares de possíveis epítomos, a resposta de células T CD8⁺ é focada em apenas poucos. O foco da imunidade celular para estes epítomos também ocorre durante a resposta imune contra microorganismos complexos e é denominado imunodominância. Apesar de estabelecida experimentalmente, o significado evolutivo e implicações biológicas da imunodominância da resposta imune ainda estão longe de serem compreendidos.

Para melhorar a compreensão desse fenômeno básico da resposta imune, estudos sobre imunodominância estão sendo realizados após infecções com diferentes patógenos. Até pouco tempo, estudos mais detalhados só podiam ser feitos em vírus com genomas relativamente pequenos. Entretanto, mais recentemente, os estudos de imunodominância realizados em vírus com genomas maiores, como o citomegalovírus e vaccinia, têm sido executado com sucesso (TSCHARKE *et al.*, 2005, MUNKS *et al.*, 2006, MOUTAFTSI *et al.*, 2006, revisto por YEWDELL 2006).

O estudo da imunodominância durante a resposta imune contra um patógeno complexo como o *T. cruzi* foi inicialmente considerado difícil devido ao grande número de proteínas potencialmente expressas por este. Embora o *Trypanosoma cruzi* apresente, pelo menos, doze mil genes (EL SAYED *et al.*, 2005), trabalhos recentes sugerem que a resposta de células T CD8⁺ seja altamente focada em poucos epítomos expressos por diferentes membros da super-família das *trans*-sialidases (TZELEPIS *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2006, TZELEPIS *et al.*, 2007; TZELEPIS *et al.*, 2008).

Devido a sua simplicidade estrutural, o patógeno mais bem estudado até o momento, do ponto de vista da imunodominância da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺, é o vírus influenza, causador da gripe. Neste modelo, o padrão de imunodominância observado em camundongos BALB/c, infectados com a cepa PR8, é caracterizado pela resposta imune contra os epítomos ilustrados na figura 2, todos restritos pelo MHC-Ia H-2K^d. Este modelo, relativamente simples, permitiu a análise dos possíveis mecanismos responsáveis pelas discrepâncias nas frequências de

linfócitos T específicos, observados durante a resposta imune, e foi ilustrativo em demonstrar seu caráter multifatorial (CHEN *et al.*, 2000).

Após a infecção, o epítopo *NP147* é imunodominante, pois apresenta o maior número de linfócitos T CD8⁺ específicos. A análise detalhada dos diferentes passos do processo de apresentação desse antígeno revelou que este epítopo não é o mais abundante no citoplasma da célula infectada, nem apresenta o mais lento “Off rate” após a ligação ao H-2K^d, e seu processamento e liberação para o RE é apenas melhor do que a média. Sua imunodominância, só pode assim ser explicada, pelo maior número de precursores específicos, ou pela melhor eficiência destes na multiplicação ou capacidade de exercer imuno-dominação sobre os demais clones.

O epítopo *HA518*, o segundo mais reconhecido, apresenta o segundo mais lento “Off rate” após a ligação ao H-2K^d. Apesar de apresentar quantidade intermediária no citoplasma da célula infectada e aumento de disponibilidade, isso pouco influencia a resposta imunológica. Assim, sua limitação fundamental parece ser o restrito número de precursores de linfócitos T CD8⁺ específicos disponíveis (Figura 2).

O epítopo *NP39* é um exemplo interessante de falta adequada de processamento antigênico. Seu “Off rate”, após a ligação ao H-2K^d, é o mais lento e na presença de epítopo já processado, sua resposta se eleva ao nível do epítopo imunodominante *NP147*. Demonstrando assim, a presença de grande número de precursores de linfócitos T CD8⁺ específicos, que só não são ativados, pela limitação do complexo peptídeo-MHC-Ia na superfície da APC após a infecção por influenza.

O epítopo *NP218* apresenta a menor afinidade para a molécula de MHC-Ia, a qual correlaciona com sua baixa imunogenicidade. Por fim, o epítopo *HA462* é um exemplo de que mesmo sendo o epítopo mais abundante no citoplasma da célula e produzindo o maior número de complexos peptídeo-MHC-Ia na superfície da APC infectada, apresenta a resposta imune mais fraca. Isso significa, também, ausência de significativo número de precursores de linfócitos T CD8⁺ específicos.

Pela simplicidade, esse modelo gerou as regras principais que influenciam a geração de imunodominância entre peptídeos restritos pelo mesmo MHC-Ia. A primeira e mais importante regra é uma afinidade mínima entre o peptídeo e a molécula de MHC-Ia. A importância deste fator levou a construção de modelos teóricos de ligação que podem guiar o mapeamento de epítopos CD8. A segunda

regra é a disponibilidade de antígeno e seu processamento no citoplasma da APC. A terceira regra é a presença de linfócitos T específicos no repertório de linfócitos T CD8⁺. Esta última pode ser influenciada pelo número, pela afinidade e pela capacidade proliferativa desses precursores. Por último, pode haver a competição de diferentes clones de linfócitos T CD8⁺ (imunodominância).

Diversos trabalhos, publicados recentemente, re-enfatzaram a importância desses mecanismos de geração de imunodominância específicos para um determinado alelo utilizando, por exemplo, vírus influenza recombinantes. No modelo de infecção com o vírus influenza A, a comparação da resposta de células T CD8⁺ específicas para D^bNP₃₆₆ e D^bPA₂₂₄ demonstrou que no desafio secundário, a resposta específica para D^bNP₃₆₆ é maior que a resposta específica para D^bPA₂₂₄. Vírus recombinantes contendo os peptídeos NP₃₆₆ ou PA₂₂₄ inseridos na neuraminidase viral (NA) foram construídos, tal que as diferenças na apresentação dos epítomos D^bNP₃₆₆ e D^bPA₂₂₄ foram eliminadas. Foi mostrado que no desafio primário e secundário a carga de antígeno, assim como o número de células T precursoras teve um papel importante em determinar a hierarquia de imunodominância (La GRUTA *et al.*, 2006).

Apesar dos diferentes mecanismos descritos acima serem, possivelmente, os mais freqüentes responsáveis pela imunodominância da resposta imune, o mais potente mecanismo parece ser a competição entre células T específicas para diferentes complexos peptídeo-MHC-Ia. Durante este tipo de competição, a resposta imunodominante de uma célula T CD8⁺, específica para um determinado epítomo, “interfere” na expansão da resposta imune de outras células T CD8⁺, específicas para quaisquer outros epítomos ligados a quaisquer outras moléculas de MHC-Ia, gerando assim forte padrão de imunodominância.

Este mecanismo que age impedindo a expansão de linfócitos T CD8⁺ de diferentes especificidades foi demonstrado em diferentes modelos de imunizações experimentais (WILLIS *et al.*, 2006; VAN DER MOST *et al.*, 2003; GRUFMAN *et al.*, 1999; KEDL *et al.*, 2000; KEDL *et al.*, 2002). Sua importância durante infecções é ainda motivo de controvérsia. Por um lado, há trabalhos que demonstram que epítomos sub-dominantes podem tornar-se imunodominantes através da eliminação do epítomo dominante (VAN DER MOST *et al.*, 2003) ou que na ausência do epítomo imunodominante, a resposta global de linfócitos T CD8⁺ se encontra somente um

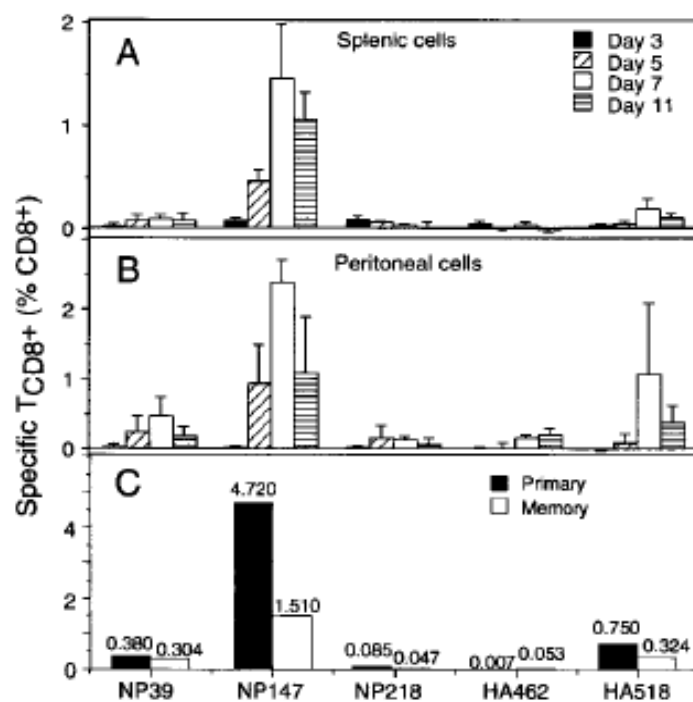


Figura 2 – Hierarquia da resposta restrita ao H-2K^d de camundongos BALB/c infectados com PR8. (CHEN *et al.*, 2000).

pouco reduzida (STOCK *et al.*, 2006). Na mesma linha, há evidências que, no caso da infecção pelo vírus influenza, respostas imunes compensatórias se desenvolvem na ausência de epítomos imunodominantes (THOMAS *et al.*, 2007).

Por outro lado, um estudo com *Listeria monocytogenes* demonstrou que a eliminação dos epítomos imunodominantes não altera a resposta aos epítomos subdominantes (VIJH *et al.*, 1999) e na infecção com o vírus LCMV, a interferência não foi observada em distintos enfoques experimentais (BUTZ & BEVAN, 1998, PROBST *et al.*, 2002).

Para tornar esta matéria ainda mais desafiante, um trabalho recente demonstrou que a competição entre células T de diferentes especificidades pode ocorrer durante a resposta imune secundária, após infecção com o vírus vaccinia, mesmo quando esta não ocorre durante a resposta imune primária (KASTENMULLER *et al.*, 2007). Neste caso, os autores correlacionaram a competição cruzada com a expressão precoce do gene do antígeno imunodominante na resposta imune secundária. De qualquer forma, a competição de linfócitos T CD8⁺ durante a resposta imune a diferentes patógenos ainda é assunto em debate.

5. Implicações do estudo de linfócitos T CD8⁺

Os conhecimentos básicos adquiridos sobre a resposta imune mediada pelos linfócitos T CD8⁺ podem representar passos importantes para a compreensão da imunopatologia das doenças agudas e crônicas e para o tratamento e prevenção de doenças (infecciosas e cânceres).

Do ponto de vista da prevenção de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e parasitas intracelulares, até hoje não há nenhuma vacina comercial baseada na indução de linfócitos T CD8⁺. Entretanto, já foi visto que algumas das vacinas vivas atenuadas são capazes de induzir linfócitos T CD8⁺ específicos (varíola, BCG, adenovírus, gripe, etc.). Baseados na possibilidade de se induzir esse tipo de imunidade, inúmeros estudos vêm sendo realizados, principalmente em modelos experimentais, para o desenvolvimento dessas vacinas preventivas. Devido ao volume de trabalho realizado nesta área nos últimos 10 anos, seria impossível citar todos os trabalhos feitos em modelos experimentais para os diversos patógenos. No caso específico do *Trypanosoma cruzi*, já foram citados anteriormente

diversos trabalhos utilizando DNA, proteínas e vírus recombinantes com intuito de vacinação experimental.

Os resultados obtidos em modelos experimentais, também chamados de testes pré-clínicos, serviram de base para os testes clínicos no homem. Vacinas recombinantes, visando à indução de imunidade mediada por linfócitos T CD8⁺, estão sendo testadas, por exemplo, em associação com adjuvantes sintéticos como o Iscomatrix (revisto por DRANE *et al.*, 2007), como vírus recombinantes (revisto por YANG *et al.*, 2007) ou como bactérias atenuadas (SZTEIN, 2007). Alternativamente, outros grupos estão usando a estratégia denominada “priming-boosting” heterólogo, no qual dois imunonógenos distintos, contendo o mesmo epítipo CD8, são utilizados seqüencialmente, visando uma maior expansão dos clones de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ contra os transgenes, muito acima do obtido com doses seqüenciais dos mesmos antígenos (revisto por SANDER & MCSHANE, 2007). Este tipo de estratégia foi demonstrada primeiramente em modelos experimentais e, posteriormente, no homem, como sendo capaz de induzir uma resposta imune celular consideravelmente mais alta (MCSHANE *et al.*, 2004).

Assim como as vacinas profiláticas, dezenas de vacinas terapêuticas estão sendo testadas contra as mais diversas formas de cânceres em modelos experimentais. Estas vacinas são constituídas também de plasmídeos, proteínas e vírus recombinantes, além de peptídeos sintéticos. Algumas dessas formulações já foram selecionadas para testes clínicos em pacientes com essa enfermidade. Os testes clínicos, ainda em fase I, têm demonstrado que é possível induzir resposta imune específica mediada por linfócitos T CD8⁺, em pacientes vacinados com peptídeos sintéticos ou proteína recombinante emulsificados em adjuvantes comerciais, na presença de um ativador de TLR-9 (SPEISER *et al.*, 2005; VALMORI *et al.*, 2007; SPEISER *et al.*, 2008).

Além da vacinação de pacientes com plasmídeos, proteínas ou vírus recombinantes e etc., uma linha que está sendo desenvolvida em muitos laboratórios é a de vacinação com células dendríticas (DC) pulsadas com antígenos específicos. Recentemente, SANTIN *et al.*, 2008 obtiveram sucesso na indução de imunidade contra o antígeno E7 do vírus do papiloma humano usando esta estratégia. Esse tipo de vacinação, apesar de pouco prático e caro, pode vir a se tornar uma alternativa para o tratamento de determinados cânceres.

Introdução

Além da vacinação, a transferência adotiva de linfócitos T CD8⁺ específicos já vem sendo usada em testes clínicos no homem. Em algumas circunstâncias, respostas objetivas de regressão de tumores foram descritas (MORGAN *et al.*, 2006 e revisto por GATTINONI *et al.*, 2006 e BLATTMAN & GREENBERG, 2004).

Durante doenças virais crônicas, um estado de exaustão é observado nos linfócitos T CD8⁺ específicos, o qual impede a completa eliminação viral. Pela comparação dos genes expressos nestas células exauridas com linfócitos T CD8⁺ de memória, observou-se que as primeiras expressavam altos níveis de PD-1, um receptor inibitório da família CD28 e receptor para a molécula PD-L1. O bloqueio da interação PD-1/PD-L1 foi capaz de restaurar a função dessas células CD8⁺. Desta forma, elas voltaram a apresentar capacidade de proliferação, secreção de citocinas e citotoxicidade, levando a uma diminuição significativa na carga viral (BARBER *et al.*, 2006). Este trabalho apresentou uma nova estratégia alvo para o desenvolvimento de tratamentos. A importância do PD-1 foi confirmada pela presença deste receptor em linfócitos T CD8⁺ específicos para antígenos do HIV (DAY *et al.*, 2006, PETROVAS *et al.*, 2006) e hepatite C (URBANI *et al.*, 2006, GOLDEN-MASON *et al.*, 2008). Futuros tratamentos com moléculas capazes de bloquear a interação PD-1/PD-L1 poderão melhorar o desempenho funcional destes linfócitos T CD8⁺ em estado de exaustão, promovendo a melhora dos indivíduos. Bem recentemente, foi observado que no modelo experimental da infecção crônica por LCMV, a vacinação terapêutica com um vírus vaccinia recombinante pode ser melhorada pelo bloqueio combinado da ligação PD-1/PD-L1 (HA *et al.*, 2008).

Objetivos

Objetivos

A base deste projeto foi definida através de trabalhos anteriores, feitos pelo nosso grupo e por outro laboratório, que descreveram epítomos reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção natural com parasitas de diferentes cepas de *T. cruzi*, em camundongos de diferentes linhagens (TZELEPIS *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2006; TZELEPIS *et al.*, 2007). Estes epítomos, seu *status imunológico* e o antígeno ao qual pertencem estão descritos na tabela 1.

Este projeto tem o intuito de, no longo prazo, testar a hipótese de qual seria o potencial de dos epítomos sub-dominantes reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ em diversas linhagens de camundongos durante as vacinações experimentais.

Para que esta hipótese geral seja testada seguimos os objetivos específicos abaixo:

- A) Gerar plasmídeos no qual o epítomo CD8 imunodominante foi removido;
- B) Gerar plasmídeos no qual o epítomo CD8 imunodominante foi trocado por um epítomo sub-dominante do parasita;
- C) Analisar por seqüenciamento se as mutações foram introduzidas com sucesso;
- D) Produzir estes plasmídeos em larga escala;
- E) Realizar imunizações experimentais com um plasmídeo já construído denominado pRE-P4P7 que contém somente o epítomo TEWETGQI, mas não o epítomo VNHRFTLV da ASP-2;
- F) Testar a imunogenicidade dos novos plasmídeos em modelos experimentais.

TABELA 1: Epítomos reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção natural com parasitas de diferentes cepas de *T. cruzi* e seu status imunológico.

<i>Cepa de camundongo</i>	<i>Epítopo</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Status imunológico</i>
BALB/C	IYNVGQVSI	TS	Imunodominante
C57Bl/6	VNHRFTLV	ASP-2	Imunodominante
C57Bl/6	ANYDFTLV	TSA	Sub-dominante
C57Bl/6	ANYKFTLV	TSA	Sub-dominante
B10.A, A/Sn	TEWETGQI	ASP-2	Imunodominante
C57Bl/6 X BALB/C	VNHRFTLV	ASP-2	Imunodominante
C57Bl/6 X BALB/C	IYNVGQVSI	TS	Sub-dominante
C57Bl/6 X B10.A	VNHRFTLV	ASP-2	Imunodominante
C57Bl/6 X B10.A	TEWETGQI	ASP-2	Sub-dominante

Materiais e Métodos

1. Desenho e seqüências dos oligonucleotídeos utilizadas nas reações de mutagênese sítio dirigida:

Inicialmente foram estabelecidas algumas condições para desenho dos oligonucleotídeos: i) os primers devem conter a mutação desejada e anelar na mesma seqüência em fitas opostas do plasmídeo; ii) os primers devem ter entre 25 e 45 bases, com $T_m \geq 78^\circ\text{C}$; iii) a mutação desejada deve ser no meio do primer, contendo de 10 a 15 bases corretas em cada lado da mutação; iv) o conteúdo mínimo de bases GC ideal no primer é 40% e deverá terminar em um ou mais C e G (Tabela 2). Assim, os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com o auxílio de um programa disponível on line no site: www.stratagene.com/qcprimerdesign.

TABELA 2: Oligonucleotídios produzidos para a construção dos quatro plasmídeos, na tabela consta as seqüências originais dos epítomos imunodominantes seguida das sequencias dos oligos (com as mutações).

Plasmídeos (pIgSP)	Epítopo CD8	Oligonucleotídeos
clone9	VNHRFTLV	GTG AAC CAC AGA TTC ACT CTT GTG
VNHRATLA	VNHRATLA	FORWARD: TTT GTG AAC CAC AGA GCA ACT CTT GCA GCA ACG GTG ACC
	VNHRATLA	REVERSE: GGT CAC CGT TGC TGC AAG AGT TGC TCT GTG GTT CAC AAA
ANYDFTLV	ANYDFTLV	FORWARD: CAG TAC AGC TTT GCA AAC TAC GAC TTC ACT CTT GTG GCA ACG
	ANYDFTLV	REVERSE: CGT TGC CAC AAG AGT GAA GTC GTA GTT TGC AAA GCT GTA CTG
ANYKFTLV	ANYKFTLV	FORWARD: CAG TAC AGC TTT GCA AAC TAC AAG TTC ACT CTT GTG GCA ACG
	ANYKFTLV	REVERSE: CGT TGC CAC AAG AGT GAA GTT GTA GTT TGC AAA GCT GTA CTG
TEWETGQI	TEWETGQI	ACC GAA TGG GAG ACG GGA CAA ATT
TAWETGQA	TAWETGQA	FORWARD: GAT CCC CGC ATC ACC GCA TGG GAG ACG GGA CAA GCA CTC ATG ATC GTT C
	TAWETGQA	REVERSE: G AAC GAT CAT GAG TGC TTG TCC CGT CTC CCA TGC GGT GAT GCG GGG ATC

2. Composição das soluções e tampões utilizados

- Gel de agarose: agarose 1% (Life Technologies), TAE (1X), brometo de etídio (0,5µg/ml, Sigma).
- Solução A: Tris-HCl 25mM, pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0.
- Solução B: NaOH 200mM, SDS 1%.
- Solução C: acetato de potássio 3M, ácido acético 5M.
- TAE (1X): Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8,0.
- Tampão ACK: NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 1mM, EDTA 0,1mM, pH 7,0.
- Tampão de amostra para eletroforese de DNA (6X): azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%, glicerol 30%.
- TE (Tris-HCl pH8,0, 10mM e EDTA 1mM).

3. Meios de cultura para bactérias

- LB (Luria Bertani): triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, pH 7,0.
- LB sólido: LB, ágar (Difco) 1,5%.
- LB/AMP: LB acrescido de ampicilina 100µg/ml (Sigma).
- LB/AMP/TETRA: LB acrescido de ampicilina 100µg/ml (Sigma) e tetraciclina 30µg/ml.
- SOC: bactotriptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 0,5g/L e 10mL de KCl 250mM, pH 7,0 acrescido de glicose 20mM e MgCl₂ 10mM.
- TB: bactotriptona 12g, extrato de levedura 24g e glicerol 4mL em 900mL, acrescido posteriormente com 100mL de uma solução de KH₂PO₄ 0,17M e K₂HPO₄ 0,72M.
- TB/AMP: TB acrescido de ampicilina 100µg/mL.
- FB: glicerol 10%, KCl 100mM, CaCl₂.2 H₂O 50mM, acetato de potássio 10mM, pH 6,2.

4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os genes utilizados neste trabalho foram amplificados pela técnica de PCR utilizando-se a enzima Pfx Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e seguindo seu protocolo:

Reação de 25 μ L

- 10x Pfx plat. Buffer	2,5 μ L
- 10mM dNTP mix	0,75 μ L
- 50mM MgSO ₄	0,5 μ L
- Primer FOR (10 μ M)	0,75 μ L
- Primer REV (10 μ M)	0,75 μ L
- DNA (cerca de 100ng)	
- Pfx platinum	0,2 μ L
- H ₂ O	qsp 25 μ L

Condições:

94°C- 2min

94°C- 30s

50°C- 30s (alterar temperatura conforme primer) } 35x

68°C- 2min

68°C- 7min

4 °C – infinito

5. Eluição de DNA do gel de agarose 1% - Kit Qiaex

1- Remover a banda do gel;

2- Adicionar 3x o volume de Buffer QX1 (aumenta a concentração de sal que rompe as pontes de hidrogênio entre os açúcares no polímero de agarose, ajudando a dissolver) comparado com o volume da banda cortada;

3- Ressuspender o QX1 no vortex por 30 segundos e adicioná-lo à amostra da seguinte forma:

≤ 2 μ g DNA ----- 10 μ L QX1

Materiais e Métodos

2-10µg DNA ----- 30µL QX1

4-Incubar a 50°C por 10 minutos. (Misturar no vortex a cada 2 minutos para manter o QX1 em suspensão. Checar se a suspensão apresenta coloração amarelada.);

5-Centrifugar à 10000rpm por 30 segundos e remover o sobrenadante com a pipeta;

6-Lavar o pellet com 500µL de Buffer QX1 até dissolvê-lo por completo (usar o vortex – essa etapa remove os resíduos de agarose);

7-Centrifugar por 30 segundos e remover o sobrenadante;

8-Lavar 2x com 500µL de Buffer PE (com etanol) até dissolvê-lo por completo (usar o vortex – essa etapa remove os resíduos de sal);

9-Secar o pellet por 10-15 minutos à temperatura ambiente;

10-Eluir o DNA com 20µL de água bidestilada autoclavada e incubar a 50°C por 5-12 minutos;

11-Centrifugar à 10000 rpm por 30 segundos e coletar o sobrenadante;

12-Fazer eletroforese em gel de agarose 1% com 1µL de cada amostra e quantificar as bandas por comparação com as bandas do fago λ digerido com *HindIII*(PM).

Quantidade ideal de DNA para ligação no plasmídeo plgSP: 40ng/µL

6. Quantificação do produto eluído por eletroforese

Faz-se uma digestão de um microlitro do material a ser quantificado, o volume final deve ser de pelo menos 20 microlitros para que o produto de digestão mais o tampão possam ser divididos em ao menos três poços com volumes seriados. No caso, os 20 microlitros mais 4 microlitros do tampão de amostra 5X , 24 microlitros totais, podem ser depositados da seguinte forma: 12, 6 e 3 microlitros. Estes volumes finais correspondem a 0,5; 0,25 e 0,125 microlitros do 1 microlitro do DNA plasmidial digerido. Comparando quantidades diferente do mesmo material com as quantidades já conhecida do peso molecular, pode-se visualmente inferir mais exatamente a concentração da amostra.

7. Clonagem (ligação) das *asp-2* mutadas em plasmídeo pMOS (2885pb)

As ligações foram feitas utilizando-se o “pMOSBlue blunt-ended cloning kit” (Amersham-GE Healthcare), seguindo-se as instruções do fabricante. Sempre foi utilizada uma proporção de inserto para vetor de 2,5 para 1 (2,5:1) com a quantidade fixa do vetor pMOS (50 ng). Inicialmente, os produtos de PCR foram fosforilados por meio de proteína kinase da seguinte maneira: a cada reação de 10µL final foi adicionado 1µL de tampão pK, 0,5µL de DTT 0,1M, 1µL da mistura enzimática (“pK enzyme mix”), a quantidade desejada do produto de PCR e água. Estas reações foram incubadas a 22°C por 40 minutos, e em seguida, a enzima foi inativada por incubação a 75°C por 10 minutos. Logo, as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e posteriormente, foi acrescentado 1µL do vetor pMOS (50 ng) e 1µL da enzima T4 DNA ligase. Por fim, as amostras foram incubadas por período *overnight* (14 a 18 horas) a 15 °C.

8. Transformação de bactérias com DNA plasmidial

8.1.Preparação de bactérias competentes

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* (cepas DH5α, BL21 ou proveniente do kit de clonagem “pMOS Blue blunt-ended cloning kit”) foi inoculada em 3mL de meio de cultura LB (Sigma), seguindo-se incubação por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio LB na proporção de 1:50 e incubado a 37°C sob agitação constante até que a DO₆₀₀ estivesse em torno de 0,6. Posteriormente, o recipiente contendo as bactérias foi incubado em gelo por 60 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.000 X g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as bactérias, ressuspendidas em 1/3 do volume inicial em meio FB e incubadas em gelo por 60 minutos. Foi feita uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e, após desprezar-se o sobrenadante, o precipitado bacteriano foi ressuspendido em 1/12,5 do volume inicial

em meio FB. As bactérias foram, então, dispensadas em alíquotas de 100µL e guardadas no freezer a – 70 °C até o uso.

8.2. Transformação de bactérias competentes com produtos de ligação

Alíquotas de 100µL de bactérias competentes foram descongeladas e a cada uma foi acrescentado cerca de 5µL dos produtos de ligação (plasmídeo e inserto), seguindo-se com incubação por 30 minutos no gelo. Após esse período, os tubos foram incubados a 42°C por exatamente 2 minutos e recolocados no gelo por mais 5 minutos. A cada tubo acrescentou-se 412µL de meio SOC e os mesmos foram incubados a 37°C sob agitação constante por 1 hora a 200 rpm. O volume total da suspensão bacteriana foi então semeado em placas de LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina, as quais foram mantidas em estufa a 37 °C por período “overnight” para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

No caso de transformações com construções contendo o plasmídeo pMOS, a semeadura das bactérias foi feita em placas de LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina (Sigma) e 30µg/mL de tetraciclina (Sigma). Porém, antes da semeadura, as placas foram tratadas com 35µL de X-gal 50mg/mL (USB) e 20µL de IPTG 100mM (Life Technologies). Neste caso, este procedimento é realizado porque como o plasmídeo pMOS contém o gene da β-galactosidase no *polylinker*, as bactérias transformadas com o plasmídeo selvagem (vazio) são capazes de degradar o X-gal como substrato e ficam azuis. Se algum gene é inserido no *polylinker* do vetor, ele rompe o gene da β-galactosidase, e consequentemente, as bactérias transformadas perdem a capacidade de degradar o X-gal, ficando brancas. Desta forma, pode-se distinguir por um método colorimétrico as colônias que contêm ou não insertos. As placas foram então incubadas por período *overnight* em estufa a 37 °C.

9. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina em pequena escala

1) Uma colônia de bactéria contendo o plasmídeo de interesse foi incubada em 3,5mL de meio LB líquido contendo 100µg/mL de ampicilina.

2) Deixou-se crescer “overnight” a 37°C sob agitação constante sob rotação de 200 a 500 rpm no shaker.

Materiais e Métodos

- 3) Acrescentou-se 1,5mL desta cultura de bactérias em um tubo de eppendorf de 1,5mL.
- 4) Centrifugou-se os tubos sob rotação de 10000rpm por 2 minutos.
- 5) Desprezou-se o sobrenadante.
- 6) Acrescentou-se mais 1,5mL da cultura de bactérias em cada tubo e centrifugar novamente a 10000rpm por 2 minutos.
- 7) Desprezou-se o sobrenadante e drenar bem os tubos.
- 8) Acrescentou-se 100μL da solução A (Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH8.0, EDTA 10mM). (Esta solução fica estocada na geladeira)
- 9) Homogeneizou-se completamente a amostra no vortex.
- 10) Adicionou-se 200μL de solução B (NaOH 0.2M e SDS 1%) e misturar por inversão 2x.
- 11) Incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. (Esse tempo é suficiente para que o DNA genômico seja liberado.)
- 12) Adicionou-se 200μL da solução C (Kac 3M e HAc5M) e misturar por inversão 8x.
- 13) Fes-se nova incubação, em gelo por 20 a 30 minutos.
- 14) Centrifugou-se os tubos a 13000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 15) Colocou-se 300μL de isopropanol em tubos eppendorfs novos.
- 16) Transferiu-se 400μL do sobrenadante destes tubos para outros tubos eppendorf que continham 300μL de isopropanol.
- 17) Os tubos foram misturados por inversão 10x.
- 18) Colocou-se os tubos a -20°C por 2 a 3 horas.
- 19) Centrifugou-se os tubos a 13000rpm por 15 minutos a 4°C.
- 20) Desprezou-se o sobrenadante.
- 21) Acrescentou-se 500μL de etanol 70% gelado e passar no vortex até que o pellet desgrude.
- 22) Centrifugou-se 13000rpm por mais 5 minutos e a 4°C.
- 23) O sobrenadante foi descartado e deixou-se o pellet secar a temperatura ambiente (estufa a 37°C).
- 24) Ressuspendeu-se o pellet em um volume que pode variar de 10μL a 50μL de água bidestilada contendo RNase (60μg/mL), dependendo da quantidade de DNA.

10. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição para verificação da presença do inserto e sua respectiva orientação

Os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição específicas para cada ORF com o intuito de saber quais deles liberariam o inserto. No caso da presença deste, uma nova digestão foi feita pra que se verificasse sua orientação. Os constituintes da digestão foram: 1µg de DNA a ser analisado, 10% de tampão (específico para cada enzima), 2 unidades por enzima de restrição e água bidestilada autoclavada, totalizando um volume de 10µL. As amostras foram incubadas em banho-maria por cerca de 3 horas e, depois, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a eletroforese, foi adicionado às amostras tampão TAE 6x. O procedimento aconteceu durante 30 minutos e sob 80V. Como padrão de peso molecular, foram utilizados fragmentos do bacteriófago λ digeridos com Hind III.

11. Seqüenciamento do DNA plasmidial dos clones recombinantes

Após verificação da presença do inserto (ORF) dentro dos plasmídeos pMOS, estas construções foram submetidas à reações de seqüenciamento através de PCRs. Algumas reações de seqüenciamento foram realizadas no centro de estudos do genoma humano, USP, onde é oferecido o serviço de seqüenciamento de DNA utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare (antiga Amersham Biosciences). As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As seqüências são analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12 que não só fornece as seqüências mas também o eletroferograma. No nosso laboratório, as seqüências puderam então ser analisadas e alinhadas através do software DNASTAR que não só permite a visualização da seqüência de bases mas também permite visualizar o eletroferograma, a seqüência de aminoácidos e as ORFs(open reading frames), entre outras funções. Todas as reações devem ser realizadas pelo menos em duplicata, e

em regiões onde o não existir um consenso entre as reações e o eletroferograma não for conclusivo, devem ser feitas mais reações.

Outras reações foram feitas no próprio CINTERGEN na UNIFESP, no laboratório do Prof. Dr. Sang Won Han e outras através do serviço de seqüenciamento do laboratório do prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (USP). Nestes dois outros locais o serviço de seqüenciamento é diferente. Em ambos o serviço de seqüenciamento de DNA utilizam o ABI PRISM 3130/3130XL Genetic Analyzer um sistema de análise de DNA de 4(3130) ou 16(3130XL) capilares com a tecnologia Applied Biosystems. As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo descrito a seguir: Deve-se fazer PCRs de 25 ciclos sob as seguintes condições: 96°C por 5 minutos, 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos. Para cada ORF, foram utilizados 1µL de DNA (cerca de 200ng), 2µL de Big Dye (Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit – Applied Biosystems), 3µL de Primer (1µM), 1µL de Tampão “Save money” e 10µL de água bidestilada autoclavada. Se possível, o termociclador deve ser ajustado para que a sua rampa de temperatura esteja 17% (1°C/seg.), isto para evitar perda na fluorescência. Finalizada a PCR, o DNA deve ser precipitado com cerca de 40µL de isopropanol 65% (MERCK) e incubado cerca de 15 minutos protegido da luz à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra é centrifugada por 45 minutos sob 2250g à temperatura ambiente. O sobrenadante é descartado e, ao *pellet* de DNA, deve-se adicionar 150µL de etanol 60% (MERCK). Após nova centrifugação de 5 minutos sob 2250g à temperatura ambiente, a amostra é concentrada em *speed-vac* por 15 minutos. Finalmente a amostra é estocada a -20°C e enviada para seqüenciamento no laboratório do Prof. Dr. Sang Won Han (UNIFESP) ou do prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (USP). Neste caso, as sequências são analisadas pelo software Sequencing Analysis v5.2.

11.1. Análise computacional das seqüências obtidas

Todos os clones obtidos e seqüenciados foram analisados utilizando-se o pacote DNASTAR versão 5.00 (DNASTAR Inc.). As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos destes genes foram alinhadas utilizando-se o alinhamento Clustal W.

12. Crescimento em larga escala de bactérias da cepa DH5 α e método de lise alcalina (maxi-prep)

Constatada a presença, integridade e correta orientação da sequência do inserto no plasmídeo plgSP, esta construção foi produzida em larga escala para futuro uso nos experimentos de imunização. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo a partir de 5-8 colônias de bactérias DH5 α transformadas com clones oriundos de diferentes plasmídeos. Estas foram inoculadas em 100mL de SOB (bactotripton 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 0,5g/L, KCl 250mM, glicose 20mM e MgCl₂ 10mM) acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina (AMP), incubando-se, a seguir, por 16 horas a 37°C sob agitação constante. No dia seguinte, a partir de 50mL do pré-inóculo, foram feitos dois inóculos separados em 450mL de meio TB, cada qual continha (bactotripton 6g, extrato de levedura 12g e glicerol 2mL). Posteriormente, foram acrescidos, a cada um, 50mL de uma solução de KH₂PO₄ 0,17M e K₂HPO₄ 0,72M e incubadas novamente a 37°C, sob agitação por mais 16 horas.

As bactérias foram centrifugadas em centrífuga Sorvall a 5000 rpm 15 minutos a 4°C. O precipitado resultante de 250mL de cultura foi ressuspendido em 21mL de solução A (Tris 25mM pH 8,0, glicose 50mM e EDTA 10mM) com auxílio do vortex e agitação manual até que a solução ficasse completamente solúvel. A seguir, adicionou-se 19,5mL de uma solução B (NaOH 200mM e SDS 1%) e o material foi homogeneizado levemente. Posteriormente, acrescentou-se ainda à suspensão bacteriana mais 15 mL de uma solução de acetato de potássio 3M e ácido acético 5M, seguindo-se incubação em gelo por 25 minutos. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C e filtrou-se o sobrenadante caso houvesse restos sólidos. Adicionou-se 1 volume de álcool isopropílico e incubou-se por período “overnight” a 4°C em geladeira.

No dia seguinte, a solução contendo DNA precipitado foi centrifugada a 12500 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de cada tubo foi ressuspendido em 2mL de tampão TE (Tris-HCl pH8,0, 10mM e EDTA mM). Em seguida, foi adicionado a cada tubo 1 volume de solução gelada de LiCl 5M para precipitação de moléculas de RNA. Após uma breve homogeneização por inversão, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, que

continha o DNA, foi transferido a outro tubo e precipitado novamente com 1 volume de álcool isopropílico por período *overnight* a 4°C em geladeira.

No dia seguinte, o “pellet” de DNA foi ressuspendido em 1mL de tampão TE. Logo, este material foi incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos. Foi acrescentado 10µL de RNase (10mg/mL) e ele foi incubado por 15 minutos a 37°C. Após esta etapa, cerca de 500µL do material foram transferidos para tubos eppendorf de 1,7mL. Em seguida, cada tubo recebeu 1 volume de uma solução de PEG 6000 / NaCl 1,6M para nova precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente e o “pellet” de DNA de cada tubo foi finalmente ressuspendido em 500µL de tampão TE e armazenado em geladeira a 4°C.

13. Purificação de plasmídeo produzido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl)

Antes do uso de plasmídeos, produzidos em larga escala, nas imunizações, é necessário que eles sejam purificados. Para isso, cerca de 6 a 7mg do plasmídeo foram adicionados a uma solução de CsCl 1g/mL mais 200µL de uma solução de brometo de etídio (10mg/mL). O material foi homogeneizado, transferido para tubos de ultracentrifugação de 5,1mL (Beckman) e centrifugado por 14 horas a 80000 rpm em ultracentrífuga L8-M (Beckman) a 22°C com aceleração máxima e sem desaceleração. No dia seguinte, o DNA plasmidial foi coletado com auxílio de seringas e agulhas e transferido para tubo de 50mL (Falcon). Para o que brometo de etídeo fosse completamente eliminado da solução de DNA plasmidial, esta foi lavada diversas vezes com solução de butanol-1 saturado em água por centrifugação de 1 minuto a 2000 rpm. Logo, foi acrescentada água bidestilada autoclavada obedecendo a seguinte regra: para cada 1,5mL de DNA retirados dos tubos após ultracentrifugação, acrescentou-se água bidestilada autoclavada de modo a se obter um volume final de 4mL. Em seguida, este DNA plasmidial foi precipitado utilizando-se 2,5 volumes de etanol absoluto. O material foi armazenado em geladeira a 4°C por período *overnight*. No dia seguinte, este foi centrifugado a 3750 rpm por 30 minutos a 4°C para formação de “pellet”. Posteriormente, o “pellet” de DNA foi lavado com aproximadamente 10mL de etanol 70% e submetido novamente à centrifugação a

3750 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e ressuspendido em 1mL de água bidestilada autoclavada.

14. Camundongos e parasitas

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens CB10 e F1(C57BL/6xB10.A) de 5 a 8 semanas de idade, adquiridos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os parasitas para os desafios experimentais dos animais foram as formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y, gentilmente cedidos pelo Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese.

15. Imunização

No dia zero, cada animal recebeu uma dose de 7µg de cardiotoxina (Sigma - diluídos para 100µL de PBS) via intramuscular, a qual foi aplicada diretamente no músculo *Tibialis anterioris*, sendo metade da dose em cada uma das coxas. No dia 5, foi dada a primeira dose das vacinas de DNA, a segunda dose no dia 26 e a terceira dose no dia 40. Todas as 3 doses consistiam na administração de 150µg de DNA (diluídos para 100µL de PBS) por via intramuscular no músculo *Tibialis anterioris*, sendo metade da dose em cada uma das coxas, as quais foram realizadas por meio de seringas de insulina U-100 e uma agulha de calibre 27G.

15.1. Obtenção do soro, desafio e quantificação da resposta protetora

No dia 47 do protocolo de imunização, os camundongos tiveram cerca de 200µL de sangue retirados pela veia caudal ou plexo ocular para obtenção do soro e posterior análise da resposta imune humoral destes animais. Para isso, as amostras de sangue foram incubadas por 6 a 8 horas à temperatura ambiente e, em seguida,

centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Os soros foram separados e armazenados em tubos de 500 µL a -20 °C.

Os animais foram desafiados, via intraperitoneal, com 10^4 formas de tripomastigotas sangüíneas das cepa Y de *T. cruzi*. Quando a quantidade de parasitas no sangue foi monitorada, a parasitemia foi feita do 7° ao 15° dia após o desafio através de microscopia óptica, por contagem do número de formas tripomastigotas em 5 µL de sangue coletados da cauda dos camundongos.

16. Análise da resposta imune celular

16.1. ELISPOT *ex vivo* para produção de IFN-γ

Para o ensaio de ELISPOT, foram utilizadas placas de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA, Millipore) cobertas com 60µl por poço de PBS estéril contendo 10µg/ml do anticorpo monoclonal anti-IFN-γ de camundongo (R4-6A2, Pharmingen). Após incubação por período *overnight* à temperatura ambiente, a solução contendo o anticorpo monoclonal foi removida por aspiração em ambiente estéril e as placas foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura RPMI. As membranas das placas foram bloqueadas por incubação com 100µl do meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (R10%) (GIBCO) por, pelo menos, 2 horas a 37°C.

As células respondedoras foram obtidas do baço de camundongos imunizados com DNA plasmidial e infectados com *T.cruzi*. Estas células foram lavadas 3 vezes em meio RPMI e ressuspendidas em meio RPMI completo na concentração de 5×10^5 células viáveis por mL. O meio completo consiste em 1% de NEAS, L-glutamina, vitaminas e piruvato, 0.1% 2-ME, 10% de soro fetal bovino (Hyclone) e 30 U/mL de interleucina-2 humana recombinante (cedida por Hoffman-La Roche).

As células apresentadoras de antígeno (APCs) foram obtidas do baço de camundongos CB10 normais. O mesmo procedimento descrito acima foi feito, sendo que a concentração destas foi de 3×10^6 células viáveis por mL.

Cem microlitros da suspensão contendo células respondedoras e 100 µl da contendo APCs foram adicionadas em cada poço. Em alguns dos poços foram adicionados 10 µg/ml dos peptídeos PA8 ou TsKb-18 ou TsKb-20. A placa foi incubada em condições estáticas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera

contendo 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram desprezadas. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS-T20. Cada poço recebeu então 75 µl do anticorpo monoclonal anti-camundongo biotilado XMG1.2 (Pharmingen) diluído em PBS-T20 na concentração final de 2µg/ml. As placas foram incubadas por período *overnight* a 4°C. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem das placas por 6 vezes com PBS-T20. Adicionamos então, estreptoavidina-peroxidase (KPL) na proporção de 1:800 em PBS-T20 em volume final de 100 µl/poço. As placas foram incubadas por 1 a 3 horas a temperatura ambiente e, então, lavadas de 3 a 5 vezes com PBS-T20 e mais 3 vezes com PBS.

As placas foram reveladas adicionando-se 100µl por poço do substrato da peroxidase (50mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 1mg/ml de DAB e 1µl/ml de 30% de peróxido de hidrogênio, ambos da SIGMA). Depois de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente, a reação foi parada descartando-se a solução substrato e lavando-se as placas com água corrente. As placas foram secas a temperatura ambiente e os “spots” foram contados com a ajuda de uma lupa.

16.2. Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

Suspensões de células foram preparadas do baço de camundongos CB10 normais (*naïves*). Os eritrócitos foram lisados usando tampão de lise (0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1Mm Na EDTA, pH 7.2-7.3). Depois de duas lavagens com meio RPMI, as células foram ressuspensas em meio RPMI contendo 1% de soro fetal bovino (GIBCO). A viabilidade das células foi avaliada utilizando o corante Azul de Tripán (0,05%) como discriminante entre células vivas e mortas. A concentração das células foi estimada por contagem em câmara de Neubauer. Parte dos esplenócitos (350 x 10⁶ células) foram corados com 1µM (CFSE^{low}), outra parte (350 x 10⁶ células) com 10 µM (CFSE^{high}) de CFSE (Molecular Probes) em PBS por 15 minutos a 37°C e mais uma parte igual (350 x 10⁶ células) corados com 10µM PKH em diluente C (PKH26GL-kit, Sigma) por 3 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 5 minutos a 1700 rpm, as células foram ressuspensas em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO) pré-aquecido. No tubo com CFSE as células foram pulsadas com 1 µg/mL do peptídeo PA8. No outro tubo, elas foram pulsadas com 1 µg/mL do peptídeo TsKb-18. Depois da adição do respectivo peptídeo em cada tubo,

Materiais e Métodos

as células foram incubadas por 40 minutos a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas por 3 vezes com meio RPMI contendo 2 a 4% de soro fetal bovino (GIBCO), ressuspensas em meio RPMI contendo 2 a 4% de soro fetal bovino (GIBCO) e contadas novamente. As populações foram misturadas na concentração de 1:1:1, centrifugadas, ressuspensas em 200µL de meio RPMI e injetadas intravenosamente (via retro-orbital) em camundongos normais ou imunizados com DNA plasmidial e infectados com *T. cruzi* na concentração de 2 a 4 x10⁷ células por camundongo. Depois de 20 a 24 horas, os baços dos camundongos que receberam as células marcadas foram retirados, e as suspensões de células únicas foram feitas como descrito acima. No final, as células foram fixadas em PBS contendo 3.7% de paraformaldeído por 5 minutos à temperatura ambiente e após uma lavagem com PBS, foram ressuspensas em tampão de FACS. Cada grupo experimental consistiu de três animais, e cada camundongo foi analisado individualmente. As populações de linfócitos CFSE^{low}, CFSE^{high} e PKH foram detectadas no baço via citometria de fluxo, usando o FACScallibur e analisadas com o software CellQuest (Becton Dickinson). A porcentagem de lise específica para o peptídeo foi determinada pela fórmula:

$$\frac{\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ infectado} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ infectado}}{\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ naíve} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ naíve}} \times 100\%.$$

17. Análise estatística

A análise que apontou diferenças significativas entre os números de parasitas no pico das infecções dos camundongos imunizados e desafiados, capacidade de citotoxicidade e número de células produtoras de IFN-γ de camundongos *naíves* ou imunizados e infectados após estímulo com peptídeos, foi realizada através do teste de variância (ANOVA) de uma via e posteriormente utilizando-se o teste Tukey HSD, disponíveis na página <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>.

Resultados

Resultados

A partir da ORF do gene da *asp-2* (Genbank Acession Number: [AY186572](#)), nós construímos uma série de plasmídeos, com base no plasmídeo plgSP-clone 9 (Boscardin *et al.* 2003), que apresentavam mutações nos seus respectivos epítomos CD8. Nestas mutações realizadas, foram trocados aminoácidos críticos no reconhecimento dos epítomo por linfócitos CD8 específicos.

Inicialmente, produzimos um plasmídeo no qual o epítomo CD8 imunodominante PA8 (VNHRFTLV para moléculas H-2K^b) foi alterado. Este epítomo, que possuía originalmente a seqüência de aminoácido VNHRETLV, teve a seqüência modificada para VNHRATLA. Os aminoácidos alterados são supostamente os aminoácidos ancoras e, por tanto, com esta alteração não haveria apresentação deste antígeno.

Para realizar esta mutação, foi utilizada uma estratégia que consistia de 3 etapas. Na 1ª etapa, foram utilizados os oligonucleotídeos VNHRETLV reverse e o ASP-2F, além do plasmídeo plgSP-clone 9 como DNA molde, para amplificar a porção inicial da *asp-2* até o final da seqüência VNHRATLA (1694 pb). Na 2ª etapa, foram utilizados os oligonucleotídeos VNHRETLV forward e o ASP-GR e o mesmo DNA molde para amplificação da porção final da *asp-2*, do início da seqüência VNHRATLA até o final da *asp-2* (415 pb). Por fim, fizemos mais uma PCR com os primers ASP-2F e ASP-GR e como DNA molde os 2 produtos de PCR acima citados para gerar uma única seqüência da *asp-2* contendo a desejada mutação (2082 pb) (Figuras 3 e 4).

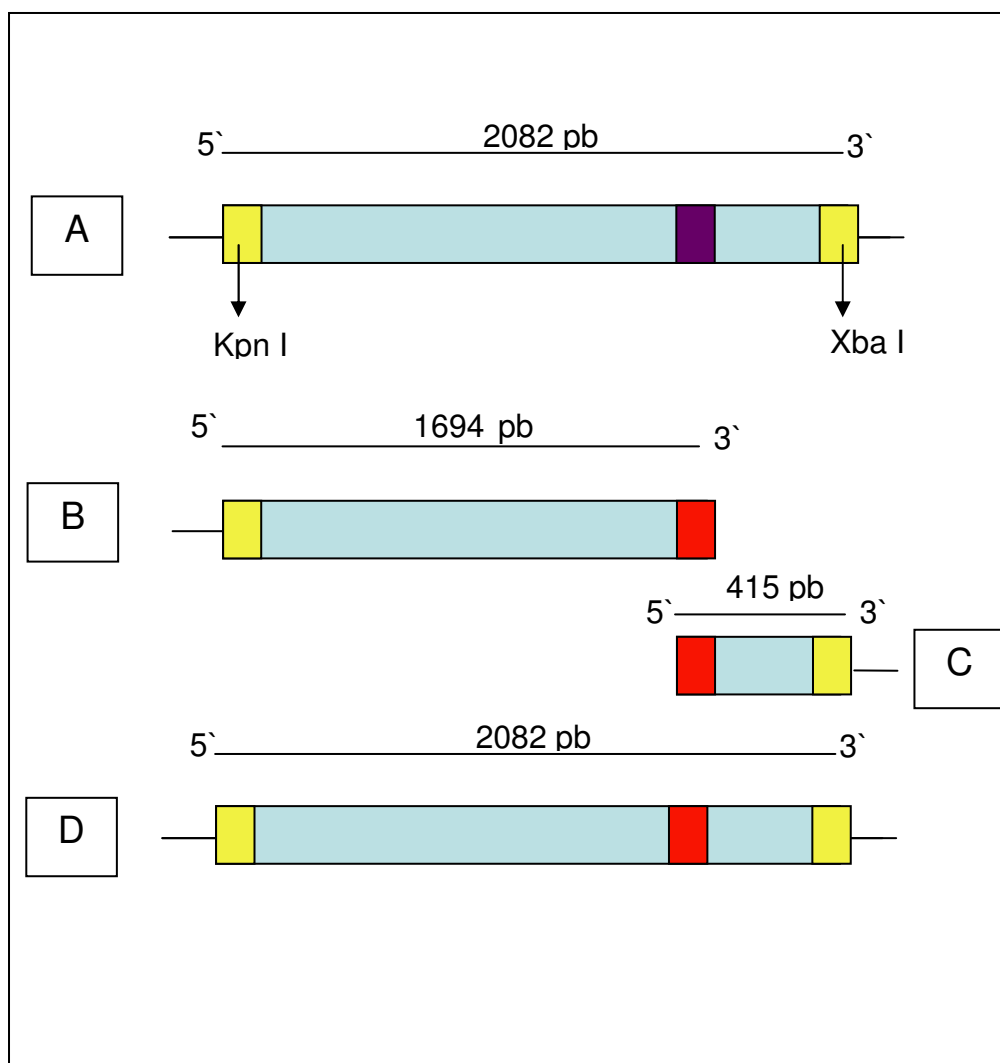


Figura 3: Esquema representativo da construção dos plasmídeos. No topo há a representação da sequência da *asp-2* original com o epítipo imunodominante PA8 destacada em roxo (letra A), posteriormente há a representação dos produtos da primeira (letra B), da segunda (letra C) e da terceira PCRs (letra D).

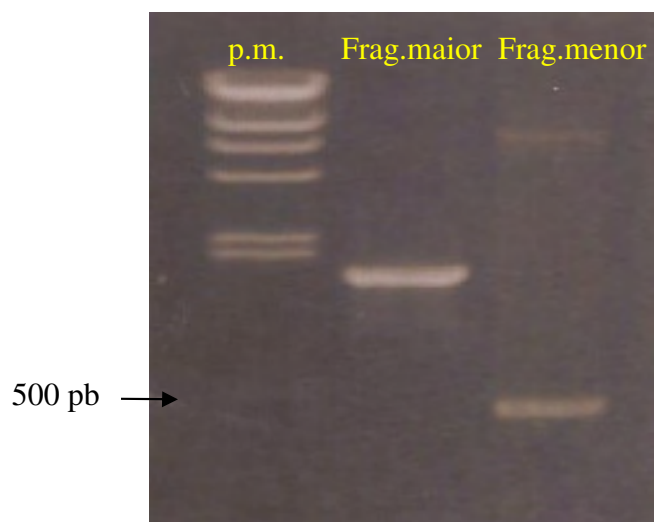


Figura 4: Foto do gel de agarose com os produtos das duas primeiras PCRs (Fragmentos maior e menor do inserto VNHRATLA), todo o produto destas PCRs foi colocado no gel para se fazer a eluição dos mesmos. O p.m. (peso molecular) utilizado é o DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição Hind III, as bandas que resultam desta digestão são conhecidas (23130pb, 9416pb, 6557pb, 4361pb, 2322pb, 2027pb e 564pb).

Resultados

Antes de utilizar os fragmentos maior (1ª etapa) e menor (2ª etapa) para geração da mutação, estes foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e, em seguida, foram eluídos através do Kit de eluição da QIAGEN, QIAEX II. Após a eluição, os 2 fragmentos foram quantificados também por corrida eletroforética em gel de agarose 1%.

Após a realização da PCR (3ª etapa), a partir de quantidades equivalentes dos produtos de PCR (1ª e 2ª etapas) como DNA molde, o produto completo também teve de ser eluído e quantificado para ser ligado no vetor de clonagem pMOS *Blue Blunt Ended* (Amersham Biosciences). Esta clonagem foi feita segundo instruções do fabricante. Por se tratar de um plasmídeo com extremidades cegas (*blunt*) no sítio da enzima EcoRV, não foi necessário fazer previamente a digestão do vetor e do inserto com quaisquer enzimas de restrição. Para esta clonagem, foram utilizadas bactérias pMOS (do próprio Kit de clonagem) que permitem, a partir de análise colorimétrica, a identificação de colônias com inserto (coloração branca). Em seguida, foi feita uma extração em pequena escala (mini-prep) por lise alcalina das bactérias contendo o plasmídeo com inserto. O DNA plasmidial de cada clone foi analisado a partir de digestão com as enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI* (Invitrogen), pois há um sítio específico para cada uma delas nas extremidades da sequência da *asp-2* (FIGURA 3), e corrida eletroforética em gel de agarose 1% (FIGURA 5).

Os clones que apresentaram 2 bandas, com peso molecular de 2082 pb, (referente ao inserto) e 2887 pb (correspondente ao pMOS) foram catalogadas e utilizadas posteriormente. Para verificar a orientação em que os insertos foram inseridos dentro do plasmídeo pMOS, estes respectivos clones foram digeridos só com *KpnI* ou só com *XbaI*. Saber a orientação é importante para assim determinar qual primer utilizar nas reações de seqüenciamento para analisar ou a porção inicial ou final do inserto.

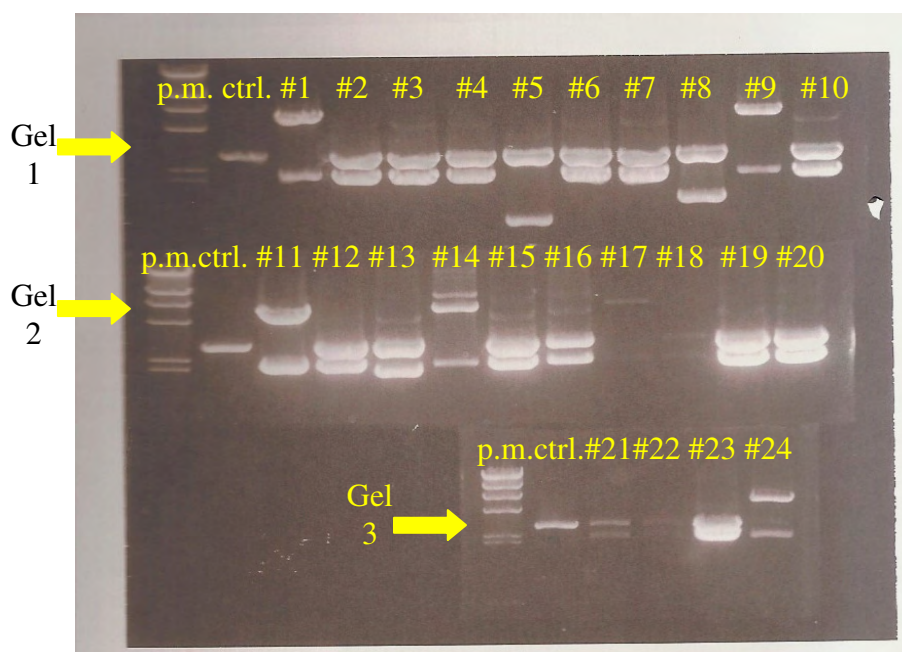


FIGURA 5: Foto da eletroforese em gel de agarose 1% dos 24 clones pMOS-VHNRATLA digeridos com *KpnI* e *XbaI*. Em cada gel foi colocado no primeiro poço o peso molecular (DNA de fago lambda digerido com *Hind III*, já descrito anteriormente na legenda da figura 4) e no segundo o controle (pMOS vaziao-2882pb). No primeiro gel estão os clones de 1 a 10, no segundo os de 11 a 20 e no terceiro os clones de 21 a 24.

Resultados

Dos clones positivos (que possuíam o inserto) foram escolhidos inicialmente 3 clones para serem analisados por sequenciamento: # 12, 15 e 20. Estes clones foram escolhidos por serem dos clones positivos os que possuíam maior concentração de DNA, apesar dos três terem seus respectivos insertos com a orientação invertida no vetor de clonagem, o que não acarreta em qualquer problema na análise e utilização.

Antes do seqüenciamento destes clones, a concentração de DNA plasmidial de cada um deles foi quantificada através de digestão com a enzima de restrição *Xba*I e analisada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo, cada poço, diluição seriada do DNA. Digerindo o DNA com apenas uma enzima facilita a quantificação, pois, por eletroforese, só se pode quantificar sequências lineares, uma vez que plasmídeos fechados formam estruturas chamadas *coil* e *super-coiled*, que correm separadamente uma vez que possuem tamanhos diferentes, e como a quantificação é feita visualmente por comparação com o peso molecular (DNA de fago lambda digerido com a enzima de restrição *Hind*III, Gibco) é importante que todo o material forme uma banda única. Os clones 12, 15 e 20 estavam a uma concentração de 800 ng/μl, 1 μg/μl e 800 ng/μl respectivamente (FIGURA 6).

Para realizar o seqüenciamento dos clones foi utilizados os primers T₇ e U₁₉, os quais flanqueiam o inserto. Com eles foi possível não só se verificar a inserção da *asp-2* no plasmídeo, mas também a integridade da porção seqüenciada, o que inclui seus respectivos sítios enzimáticos. Outro primer utilizado foi o *primer 200* que é reverso e anela na região do 1887° nucleotídeo da *asp-2* (a seqüência de nucleotídeos que codifica o VNHRFTLV fica de 1656° a 1680° nucleotídeo). Portanto a região mutada, poderia ser “lida” com este primer, dessa forma, verificou-se que a mutação estava presente. Estas reações de sequenciamento foram realizadas no centro de estudos do genoma humano, USP. Uma vez estas regiões verificadas, fizemos outras reações com os *primers 452* (forward), *800* (forward), *593* (reverso) e *511* (reverso) até que toda a seqüência da *asp-2* fosse completamente verificada e sua integridade, constatada. Todas as reações foram realizadas em duplicata, e em regiões onde o não existia um consenso entre as reações e o eletroferograma não era conclusivo, foram feitas mais reações.



FIGURA 6: Foto representativa da quantificação dos clones 12, 15 e 20 do plasmídeo plgSP-VNHRATLA. No caso, fez-se uma digestão só com Kpn I cujo volume final era de 20 microlitros aos quais foi adicionado 4 microlitros do tampão de amostra 5X , por tanto, 24 μ l finais os quais foram depositados da seguinte forma: 12, 6 e 3 microlitros. Estes volumes finais correspondem a 0,5 μ l; 0,25 μ l e 0,125 μ l microlitros de DNA (foi digerido 1 μ l de cada clone). Comparando quantidades diferentes do mesmo material com as quantidades já conhecida do peso molecular(DNA de fago lambida digerido com *Hind*III, já descrito anteriormente nesta seção) pode-se visualmente inferir mais exatamente a concentração da amostra. No caso, o clone 12 (poços 1, 2 e 3) estava a 800 ng/ μ l, o clone 15 (poços 4, 5 e 6) estava a 1mg/ μ l e o 20 (poços 7, 8 e 9) a 800 ng/ μ l.

Resultados

Uma vez que toda a seqüência do inserto foi analisada e confirmada a fase aberta de leitura, o inserto estava pronto para ser inserido no vetor de expressão, plgSP (o qual contém seqüência de peptídeo sinal da cadeia Kappa de imunoglobulina de camundongo, além da estrutura do pcDNA3). Assim, o pMOS-VHNRATLA clone 15 e o plgSP foram digeridos com as mesmas enzimas citadas anteriormente, *KpnI* e *XbaI*, ambos foram eluidos e quantificados para que fosse feita a ligação entre eles. Esta reação de ligação foi feita com auxílio da enzima *T₄* DNA ligase (Gibco). Em seguida, bactérias competentes DH5 α foram transformadas com o produto desta ligação. Após busca por colônia positiva para a construção plgSP-VHNRATLA, por análise a partir de digestão do DNA plasmidial de várias colônias com enzimas de restrição, uma delas foi escolhida para ser utilizada para crescimento do plasmídeo em larga escala. Após o crescimento em larga escala da colônia transformada com a construção plgSP-VHNRATLA, foi feita a extração do DNA plasmidial por lise alcalina seguida da purificação deste material por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio. Em seguida, este material foi quantificado para posterior uso nos experimentos de imunização.

Com base nesta mesma estratégia, outras construções foram realizadas, além deste plasmídeo plgSP-VNHRATLA: i) a ORF do gene da *asp-2* que possuía originalmente a seqüência de aminoácidos do epítipo imunodominante PA8 (VNHRFTLV para moléculas H-2K^b), teve a seqüência modificada para ANYKFTLV ou ANYDFTLV. Um outro plasmídeo construído que possuía originalmente a seqüência de aminoácidos do epítipo imunodominante TEWETGQI (para moléculas H-2K^K), teve a seqüência modificada para TAWETGQA. Para a construção desses quatro plasmídeos foram utilizados oligonucleotídios, descritos na tabela a seguir (TABELA 2). As seqüências de aminoácidos dos quatro plasmídeos construídos por mutagênese sítio dirigida: a)plgSP-VNHRATLA, b)plgSP-ANYDFTLV, c)plgSP-ANYKFTLV, d)plgSP-TAWETGQA, estão especificadas na figura 7. Na figura 8, há uma representação esquemática desses plasmídeos.

a)

10	20	30	40	50	60	
MLSRVA	AVKAPN	THNRHG	VTGSSG	RREGRE	SEPKRP	NMSRHL
FTSAML	LLLLLV	VIMTCC	A			
pIgSP#9_original						
MLSRVA	AVKAPN	THNRHG	VTGSSG	RREGRE	SEPKRP	NMSRHL
FTSAML	LLLLLV	VIMTCC	A			
pIgSP_VNHRATLA#15						
70	80	90	100	110	120	
TCGAAA	AVESK	SGDAPL	PQWVDI	FVPEKT	QVLPKE	GSKSGV
KKAFAA	PSLVS	SAGGVM	VAF			
pIgSP#9_original						
TCGAAA	AVESK	SGDAPL	PQWVDI	FVPEKT	QVLPKE	GSKSGV
KKAFAA	PSLVS	SAGGVM	VAF			
pIgSP_VNHRATLA#15						
130	140	150	160	170	180	
AESLFV	YIVHE	HNLFGI	KPYEIV	AGYIKAA	ESWPSI	VAEVSNA
TTWRTH	TVIGSR	NGNDRL				
pIgSP#9_original						
AESLFV	YIVHE	HNLFGI	KPYEIV	AGYIKAA	ESWPSI	VAEVSNA
TTWRTH	TVIGSR	NGNDRL				
pIgSP_VNHRATLA#15						
190	200	210	220	230	240	
CYLQRPT	AVARDS	SKVFL	LVGSDT	TRYDSD	DDNMV	KDGDWI
QQLVEG	VATQSK	DGVQSK	LVS			
pIgSP#9_original						
CYLQRPT	AVARDS	SKVFL	LVGSDT	TRYDSD	DDNMV	KDGDWI
QQLVEG	VATQSK	DGVQSK	LVS			
pIgSP_VNHRATLA#15						
250	260	270	280	290	300	
WGEPKS	LCLKQI	LNHTQD	QLRDVV	TAGGSG	IVMQND	TLVFPL
VMVNGQ	NYPFSS	ITYSTD	DKG			
pIgSP#9_original						
WGEPKS	LCLKQI	LNHTQD	QLRDVV	TAGGSG	IVMQND	TLVFPL
VMVNGQ	NYPFSS	ITYSTD	DKG			
pIgSP_VNHRATLA#15						
310	320	330	340	350	360	
NTWVFPE	GISPVG	CLDPRI	TETWET	GQILMI	VQCKDD	QSVFES
RDMDGKT	WTETEA	IGTSLG	VW			
pIgSP#9_original						
NTWVFPE	GISPVG	CLDPRI	TETWET	GQILMI	VQCKDD	QSVFES
RDMDGKT	WTETEA	IGTSLG	VW			
pIgSP_VNHRATLA#15						
370	380	390	400	410	420	
VMSQPG	VRLYKI	FRVGAL	ITATIE	GRKVM	LYTQRG	YTSGEKE
EATALYL	WVTDNN	RRTFHV	G			
pIgSP#9_original						
VMSQPG	VRLYKI	FRVGAL	ITATIE	GRKVM	LYTQRG	YTSGEKE
EATALYL	WVTDNN	RRTFHV	G			
pIgSP_VNHRATLA#15						
430	440	450	460	470	480	
PLFLED	NVNETL	ANALLY	SDGALH	LLKERAN	EKDEAIS	LARLTEE
LNTIKSV	LSTWAK	LD				
pIgSP#9_original						
PLFLED	NVNETL	ANALLY	SDGALH	LLKERAN	EKDEAIS	LARLTEE
LNTIKSV	LSTWAK	LD				
pIgSP_VNHRATLA#15						
490	500	510	520	530	540	
ASFSES	SSTPTA	GLVGFL	SNTSSG	GDWIDD	YRCVHA	SVTKASK
VKNKGF	KFMGPG	SGMATW	P			
pIgSP#9_original						
ASFSES	SSTPTA	GLVGFL	SNTSSG	GDWIDD	YRCVHA	SVTKASK
VKNKGF	KFMGPG	SGMATW	P			
pIgSP_VNHRATLA#15						
550	560	570	580	590	600	
VNSRED	NRQYSF	VNHRFT	LVA	TVTIHQ	VAKGST	PLLGAG
LGDGHG	AKIIIG	LSSHSM	NKTWE			
pIgSP#9_original						
VNSRED	NRQYSF	VNHRFT	LVA	TVTIHQ	VAKGST	PLLGAG
LGDGHG	AKIIIG	LSSHSM	NKTWE			
pIgSP_VNHRATLA#15						
610	620	630	640	650	660	
TVFDGK	KMTSNT	TWELGR	EHQVAL	MLQDGH	KGYVYV	DGVIVG
SPENIRT	PETLGHE	ITHF				
pIgSP#9_original						
TVFDGK	KMTSNT	TWELGR	EHQVAL	MLQDGH	KGYVYV	DGVIVG
SPENIRT	PETLGHE	ITHF				
pIgSP_VNHRATLA#15						
670	680	690				
YFGGGEG	DINSSD	VTVTNV	FLYNRP	LSVGEL	KMV	
pIgSP#9_original						
YFGGGEG	DINSSD	VTVTNV	FLYNRP	LSVGEL	KMV	
pIgSP_VNHRATLA#15						

b)

MLSXVAAVKAPNTHNRHGVGTGSSGRRREGRESEPKRPNMSRHLFTSAMPLLLLVIMTCCATCGAAAIVES	Majority
10 20 30 40 50 60 70	
MLSXVAAVKAPNTHNRHGVGTGSSGRRREGRESEPKRPNMSRHLFTSAMPLLLLVIMTCCATCGAAAIVES	ANYDFTLV#6
MLSRVAAVKAPNTHNRHGVGTGSSGRRREGRESEPKRPNMSRHLFTSAMPLLLLVIMTCCATCGAAAIVES	pIgSP#9_ori
KSGDAPLPQWVDIFVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAFAAPSLVSAGGVMVAFaeslfvYIVHEHNLFGIKPY	Majority
80 90 100 110 120 130 140	
KSGDAPLPQWVDIFVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAFAAPSLVSAGGVMVAFaeslfvYIVHEHNLFGIKPY	ANYDFTLV#6
KSGDAPLPQWVDIFVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAFAAPSLVSAGGVMVAFaeslfvYIVHEHNLFGIKPY	pIgSP#9_ori
EIVAGYIKAAESWPSIVAENVATTWRTHTVIGSRNGNDRLCYLQRPtAVARDSKVFLLVGSDTTRYDSDD	Majority
150 160 170 180 190 200 210	
EIVAGYIKAAESWPSIVAENVATTWRTHTVIGSRNGNDRLCYLQRPtAVARDSKVFLLVGSDTTRYDSDD	ANYDFTLV#6
EIVAGYIKAAESWPSIVAENVATTWRTHTVIGSRNGNDRLCYLQRPtAVARDSKVFLLVGSDTTRYDSDD	pIgSP#9_ori
NMWVKDGDWIDQLVEGVATQSKDGVQSKLVSWGEPKSLKQILNHTQDQLRDVVTAGGSGIVMQNDTLVFP	Majority
220 230 240 250 260 270 280	
NMWVKDGDWIDQLVEGVATQSKDGVQSKLVSWGEPKSLKQILNHTQDQLRDVVTAGGSGIVMQNDTLVFP	ANYDFTLV#6
NMWVKDGDWIDQLVEGVATQSKDGVQSKLVSWGEPKSLKQILNHTQDQLRDVVTAGGSGIVMQNDTLVFP	pIgSP#9_ori
LMVNGQNYFPSSITYSTDKGNTWVFPEGISPVGCLDPRIETWETGQILMIVQCKDDQSVFESRDMGKTWT	Majority
290 300 310 320 330 340 350	
LMVNGQNYFPSSITYSTDKGNTWVFPEGISPVGCLDPRIETWETGQILMIVQCKDDQSVFESRDMGKTWT	ANYDFTLV#6
LMVNGQNYFPSSITYSTDKGNTWVFPEGISPVGCLDPRIETWETGQILMIVQCKDDQSVFESRDMGKTWT	pIgSP#9_ori
EAIGTLSGVWMSQPGVRLYKIFRVGALITATIEGRKVMlyTQRGYTSgeKEATALYLWVTDNNRTFHVg	Majority
360 370 380 390 400 410 420	
EAIGTLSGVWMSQPGVRLYKIFRVGALITATIEGRKVMlyTQRGYTSgeKEATALYLWVTDNNRTFHVg	ANYDFTLV#6
EAIGTLSGVWMSQPGVRLYKIFRVGALITATIEGRKVMlyTQRGYTSgeKEATALYLWVTDNNRTFHVg	pIgSP#9_ori
PLFLEDNVNETLANALLYSDGALHLLKERANEKDEAISLARLTELNTIKSVLSTWAKLDASFSESSTPT	Majority
430 440 450 460 470 480 490	
PLFLEDNVNETLANALLYSDGALHLLKERANEKDEAISLARLTELNTIKSVLSTWAKLDASFSESSTPT	ANYDFTLV#6
PLFLEDNVNETLANALLYSDGALHLLKERANEKDEAISLARLTELNTIKSVLSTWAKLDASFSESSTPT	pIgSP#9_ori
AGLVGFLSNTSSGGDTWIDDYRCVHASVTKASKVKNGFKFMGPGSMATWPNsREDNRQYSFANHDFTLV	Majority
500 510 520 530 540 550 560	
AGLVGFLSNTSSGGDTWIDDYRCVHASVTKASKVKNGFKFMGPGSMATWPNsREDNRQYSFANHDFTLV	ANYDFTLV#6
AGLVGFLSNTSSGGDTWIDDYRCVHASVTKASKVKNGFKFMGPGSMATWPNsREDNRQYSFVNHRTLV	pIgSP#9_ori
ATVTIHQVAKGSTPLLgAGLGDGHGAKIIGLSHSMNKTWETVFDGKKMTSNTTWELGREHQVALMLQDGH	Majority
570 580 590 600 610 620 630	
ATVTIHQVAKGSTPLLgAGLGDGHGAKIIGLSHSMNKTWETVFDGKKMTSNTTWELGREHQVALMLQDGH	ANYDFTLV#6
ATVTIHQVAKGSTPLLgAGLGDGHGAKIIGLSHSMNKTWETVFDGKKMTSNTTWELGREHQVALMLQDGH	pIgSP#9_ori
KGYVYVDGVIVGSPENIRTPETLGHEITHFYFGGEGDINSSDVTVTNVFLYNRPLSVGEXKMV-X	Majority
640 650 660 670 680 690	
KGYVYVDGVIVGSPENIRTPETLGHEITHFYFGGEGDINSSDVTVTNVFLYNRPLSVGEXKMV.X	ANYDFTLV#6
KGYVYVDGVIVGSPENIRTPETLGHEITHFYFGGEGDINSSDVTVTNVFLYNRPLSVGELKMV	pIgSP#9_ori

c)

	10	20	30	40	50	60	
1	MLSRVAAVKAPNTHNRHGVTGSSGRRREGRESEPKRPNMSRHLFTSAML L L L VVI MTCCA						plgSP#9_original
1	MLSRVAAVKAPNTHNRHGVTGSSGRRREGRESEPKRPNMSRHLFTSAML L L L VVI MTCCA						plgSP_ANYK#1
	70	80	90	100	110	120	
61	TCGAAA AVESKSGDAPLPQWWDI FVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAFAPSLVSAGGVMVAF						plgSP#9_original
61	TCGAAA AVESKSGDAPLPQWWDI FVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAFAPSLVSAGGVMVAF						plgSP_ANYK#1
	130	140	150	160	170	180	
121	AESLFVYI VHEHNLFGI KPYEI VAGYI KAAESWPSI VAEVNATTWRTHTVI GSRNGNDRL						plgSP#9_original
121	AESLFVYI VHEHNLFGI KPYEI VAGYI KAAESWPSI VAEVNATTWRTHTVI GSRNGNDRL						plgSP_ANYK#1
	190	200	210	220	230	240	
181	CYLQRPTAVARDSKVFLLVGSDTTRYDSDDNMWKDGWDI QLVEGVATQSKDGVQSKLVS						plgSP#9_original
181	CYLQRPTAVARDSKVFLLVGSDTTRYDSDDNMWKDGWDI QLVEGVATQSKDGVQSKLVS						plgSP_ANYK#1
	250	260	270	280	290	300	
241	WGEPKSL LKQI LNHTQDQLRDVVTAGGSGI VMQN DTLVFPLMVNGQNYPFSSI TYSTDKG						plgSP#9_original
241	WGEPKSL LKQI LNHTQDQLRDVVTAGGSGI VMQN DTLVFPLMVNGQNYPFSSI TYSTDKG						plgSP_ANYK#1
	310	320	330	340	350	360	
301	NTWFP EGI SPVGCLDPRI TEWETGQI LMI VQCKDDQSVFESRDMGKTWTEAI GTLSGVW						plgSP#9_original
301	NTWFP EGI SPVGCLDPRI TEWETGQI LMI VQCKDDQSVFESRDMGKTWTEAI GTLSGVW						plgSP_ANYK#1
	370	380	390	400	410	420	
361	VMSQPGVRLYKI FRVGALI TATI EGRKVMLYTQRGYTSGEKEATALYLWTDNNRTFHV G						plgSP#9_original
361	VMSQPGVRLYKI FRVGALI TATI EGRKVMLYTQRGYTSGEKEATALYLWTDNNRTFHV G						plgSP_ANYK#1
	430	440	450	460	470	480	
421	PLFLEDNVNETLANALLYSDGALHLLKERANEKDEAI SLARL TEELNTI KSVLSTWAKLD						plgSP#9_original
421	PLFLEDNVNETLANALLYSDGALHLLKERANEKDEAI SLARL TEELNTI KSVLSTWAKLD						plgSP_ANYK#1
	490	500	510	520	530	540	
481	ASFSESSTPTAGLVGFLSNTSSGGDTW DDYRCVHASVT KASKVKNGFKFMGP GSMATWP						plgSP#9_original
481	ASFSESSTPTAGLVGFLSNTSSGGDTW DDYRCVHASVT KASKVKNGFKFMGP GSMATWP						plgSP_ANYK#1
	550	560	570	580	590	600	
541	VNSREDNRQYSFVNHRFTLVATVTI HQVAKGSTPLL GAGLGDGHGAKI I GLSHSMNKTWE						plgSP#9_original
541	VNSREDNRQYSF ANYK FTLVATVTI HQVAKGSTPLL GAGLGDGHGAKI I GLSHSMNKTWE						plgSP_ANYK#1
	610	620	630	640	650	660	
601	TVFDGKKMTSNTTWELGREHQVALMLQDGHKGYVYVDGVI VGSPENI RTPETLGHEI THF						plgSP#9_original
601	TVFDGKKMTSNTTWELGREHQVALMLQDGHKGYVYVDGVI VGSPENI RTPETLGHEI THF						plgSP_ANYK#1
	670	680	690				
661	YFGGGE GDI NSSDVTVTNVFLYNRPLSVGELK MV						plgSP#9_original
661	YFGGGE GDI NSSDVTVTNVFLYNRPLSVGELK MV.						plgSP_ANYK#1

d)

10	20	30	40	50	60	
MLSRVA	AVKAPN	THNRH	GV	TGSSG	RRRREG	GRESEPKRPNMSRHLFTSAML
MLSRVA	AVKAPN	THNRH	GV	TGSSG	RRRREG	GRESEPKRPNMSRHLFTSAML
70	80	90	100	110	120	
TCGAAA	AVESK	SGDAP	L	PQWVD	I	FVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAF
TCGAAA	AVESK	SGDAP	L	PQWVD	I	FVPEKTQVLPKEGSKSGVKKAF
130	140	150	160	170	180	
AESLFV	YIV	HEHNL	FGI	KPYEI	VAGYI	KAAESWPSI
AESLFV	YIV	HEHNL	FGI	KPYEI	VAGYI	KAAESWPSI
190	200	210	220	230	240	
CYLQR	PTA	VARD	SKV	FL	LVGSD	TTTRYDSD
CYLQR	PTA	VARD	SKV	FL	LVGSD	TTTRYDSD
250	260	270	280	290	300	
WGEPK	SLLK	QILN	HTQD	QLR	DVVT	AGGSGI
WGEPK	SLLK	QILN	HTQD	QLR	DVVT	AGGSGI
310	320	330	340	350	360	
NTWVF	PEGI	SPVG	CLD	PRI	T	EWETGQIL
NTWVF	PEGI	SPVG	CLD	PRI	T	EWETGQIL
370	380	390	400	410	420	
VMSQP	GVRL	YKIF	RVGAL	I	TATI	EGRKV
VMSQP	GVRL	YKIF	RVGAL	I	TATI	EGRKV
430	440	450	460	470	480	
PLFLE	DNV	NETL	ANALL	YS	DGAL	HLLKER
PLFLE	DNV	NETL	ANALL	YS	DGAL	HLLKER
490	500	510	520	530	540	
ASFSE	SSTP	TAGL	VGFL	SNT	SSGG	DTWI
ASFSE	SSTP	TAGL	VGFL	SNT	SSGG	DTWI
550	560	570	580	590	600	
VNSRE	DN	RQYS	FVNHR	FTL	VAT	VTI
VNSRE	DN	RQYS	FVNHR	FTL	VAT	VTI
610	620	630	640	650	660	
TVFDG	KKMT	SNTT	WEL	GREH	QVAL	MLQDGH
TVFDG	KKMT	SNTT	WEL	GREH	QVAL	MLQDGH
670	680	690				
YFGGG	EGDI	NSSD	VTV	TNV	FLY	NRPL
YFGGG	EGDI	NSSD	VTV	TNV	FLY	NRPL

plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2plgSP#9_original
plgSP_TAWETGQA#2

FIGURA 7 - SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS PLASMÍDEOS CONSTRUIDOS COMPARADAS A SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA ASP-2 . A) Comparação entre as seqüências do Clone 9 original com a construção plgSP-VNHRATLA; **B)** Comparação entre as seqüências do Clone 9 original com a construção plgSP-ANYDFTLV; **C)** Comparação entre as seqüências do Clone 9 original com a construção plgSP-ANYKFTLV; **D)** Comparação entre as seqüências do Clone 9 original com a construção plgSP-TAWETGQA. *Os aminoácidos selecionados (realçados em vermelho) indicam as diferenças observadas nestas comparações.

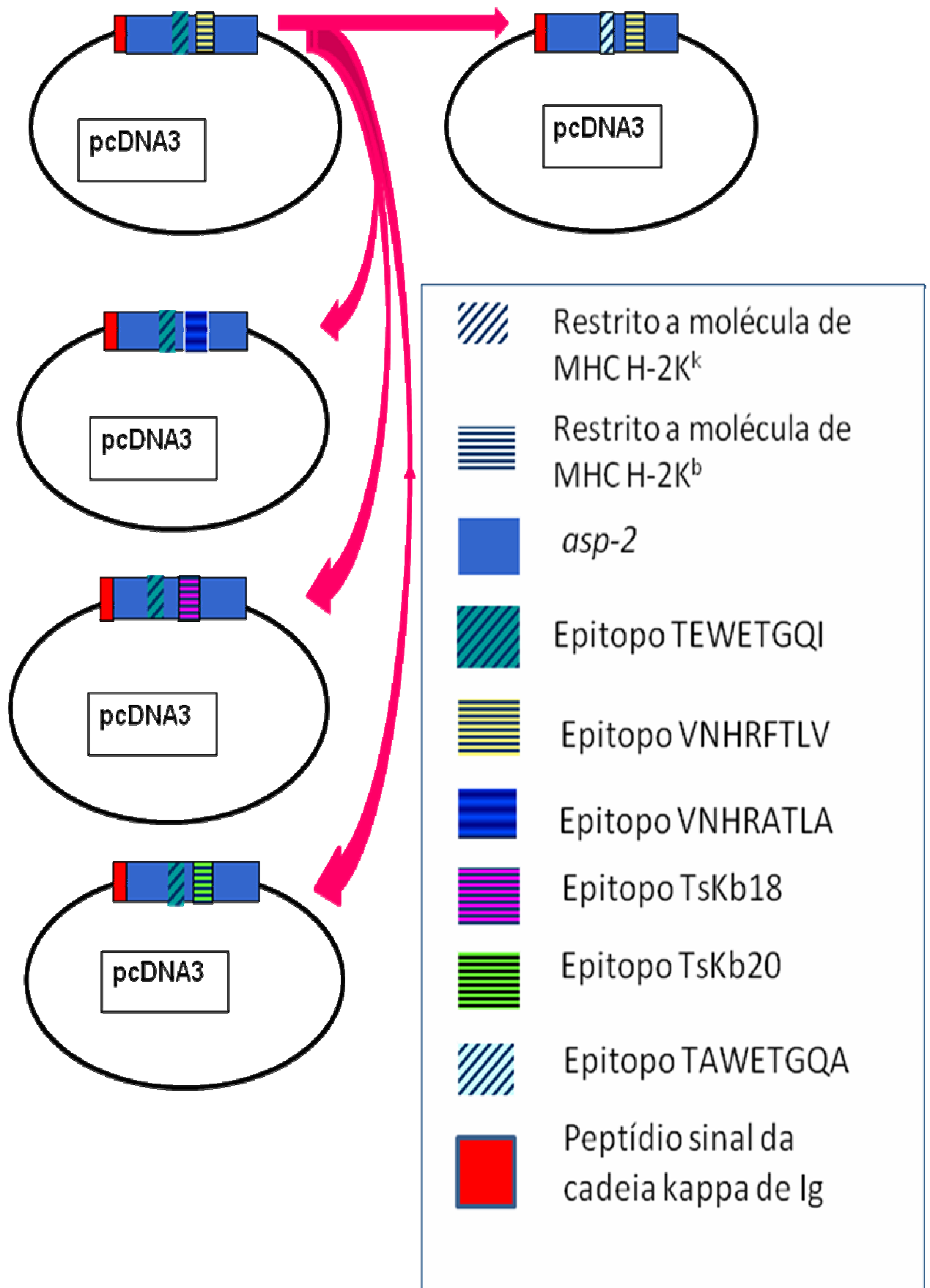


FIGURA 8: Esquema representando os quatro plasmídeos construídos a partir do plgSP-clone 9 (Boscardin *et al.* 2003) por mutagenese sítio dirigida: plgSP-VNHRATLA (plasmídeo com o epítipo CD8 imunodominante PA-8(VNHRFTLV) alterado. Os aminoácidos alterados são supostamente os aminoácidos ancoras, o que acarretaria na não apresentação deste epítipo); plgSP-ANYDFTLV (remoção do PA-8 e substituição deste por TsKb-18,epítipo CD8 sub-dominante, produzido também por mutagenese sítio dirigida); plgSP-ANYKFTLV (remoção do PA-8 e substituição deste por TsKb-20,epítipo CD8 sub-dominante, produzido também por mutagenese sítio dirigida); plgSP-TAWETGQA (alteração dos supostos aminoácidos ancoras do epítipo imunodominante TEWETGQI cuja sequencia original é o próprio nome).

Resultados

Paralelamente as construções de plasmídeos, fizemos um ensaio de imunização camundongos heterozigotos (C57Bl/6 X B10.A) com um plasmídeo de DNA contendo o epítipo sub-dominante TEWETGQI, o pRE-P4P7 (gerado pelo aluno de mestrado Filipe Augusto Bittencourt Haolla), a fim de verificarmos se a imunodominância observada durante a infecção com *T. cruzi* poderia ser alterada. Nós comparamos a resposta das células T CD8⁺ específicas para o epítipo dominante PA8 (VNHRFTLV) e para o subdominante TEWETGQI após imunização de camundongos heterozigotos seguida de desafio experimental com a cepa Y.

O plasmídeo utilizado para imunização, o pRE-P4P7, possui o mesmo backbone do plasmídeo plgSP-VNHRATLA (ou seja, não possui o epítipo PA-8 imunodominante). Cada camundongo recebeu três doses intramusculares de 50µg – confirmar qtd de DNA plasmidial injetados nas semanas 0, 3 e 5.

A eliminação de células alvo cobertas com o epítipo PA8 foi significativamente maior do que a eliminação de células alvo cobertas com o peptídeo TEWETGQI em animais F1 (C57BL/6 x B10.A) imunizados com o plasmídeo controle e infectados (figura 9 A, $p < 0.05$). Entretanto, nos animais imunizados com o pRE-P4P7 e infectados a eliminação de células alvo cobertas com o peptídeo PA8 foi estatisticamente semelhante à eliminação das células alvo cobertas com o peptídeo TEWETGQI.

De forma semelhante, o número de células produtoras de IFN- γ específicas para o epítipo PA8 nos animais imunizados com o pRE foi significativamente maior do que o número de células produtoras de IFN- γ específicas para o epítipo TEWETGQI (FIGURA 9 B, $p < 0.05$). Entretanto, o número de células produtoras de IFN- γ específicas para o epítipo PA8 nos animais imunizados com o pRE-P4P7, não infectados, foi estatisticamente semelhante ao número de células específicas para o epítipo TEWETGQI. Assim concluímos que a imunização com um DNA plasmidial contendo somente o epítipo sub-dominante da ASP-2 de *T. cruzi* é capaz de abolir o padrão de imunodominância tornando a resposta imune mais abrangente (“broad”).

Quanto à análise da parasitemia, os animais imunizados com o pRE-P4P7 apresentaram um pico de parasitemia significativamente menor que o dos animais imunizados com o plasmídeo controle durante a fase aguda da infecção

experimental ($p < 0.05$), como mostrado nos gráficos da figuras 10 C e D. (Figura 9 na página seguinte)

Uma vez pronta a construção plgSP-VNHRATLA, a utilizamos em um ensaio de imunização.

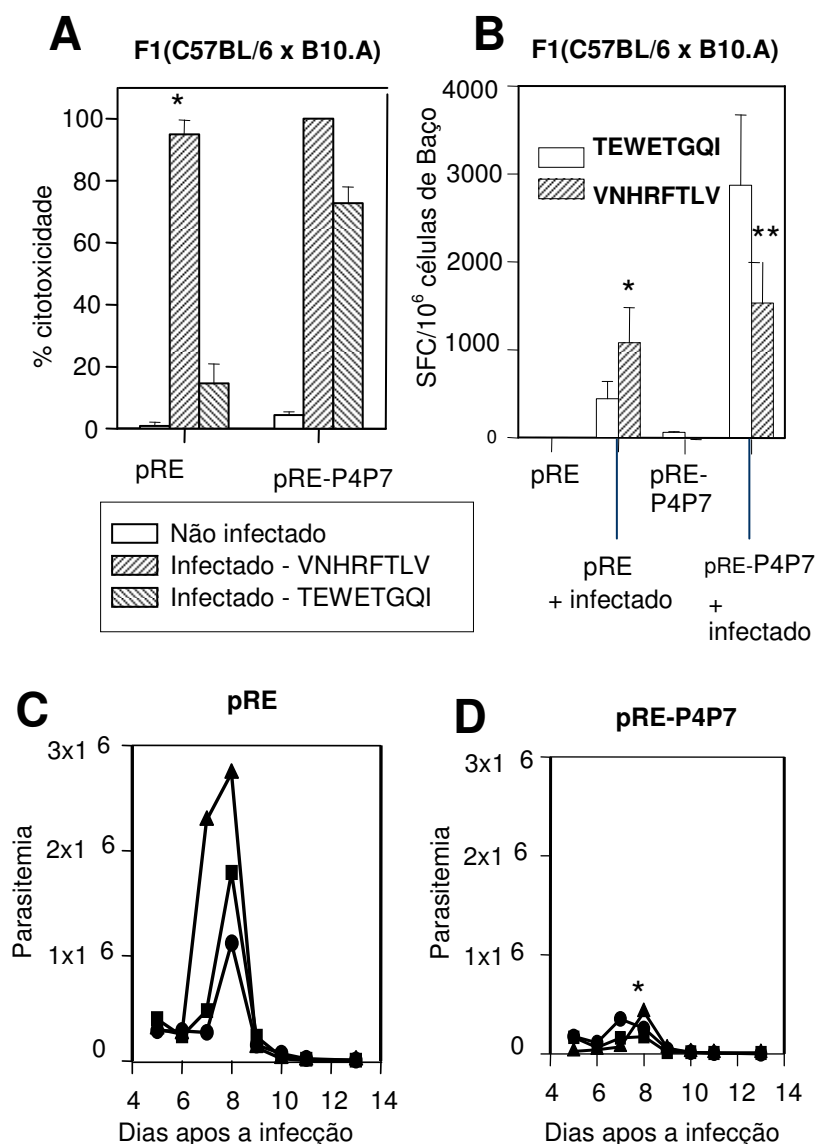


FIGURA 9: Citotoxicidade e produção de IFN- γ específica em camundongos F1(C57BL/6xB10.A) imunizados com pRE-P4P7 e infectados com *T. cruzi*. Painel C e D– Parasitemia foi seguida diariamente do 5º ao 13º dias após o desafio.

Painel A – No 15º dia após a infecção, a atividade citotóxica in vivo contra células alvo cobertas com o epítipo VNHRFTLV (PA8) ou com TEWETGQI foi determinada. Os resultados representam a média de 4 camundongos $\pm$ DP por grupo. (*) $p < 0.05$ para PA8 x TEWETGQI nos animais imunizados com pRE; (**) $p < 0.05$ para TEWETGQI de animais imunizados com pRE-P4P7 x TEWETGQI animais imunizados com pRE.

Painel B – No 15º dia após a infecção, as células produtoras de IFN- γ específicas para o epítipo VNHRFTLV (PA8) ou para o TEWETGQI, foram estimadas por ELISPOT. Os resultados representam a média do número de SFC específico para cada epítipo por 10⁶ esplenócitos $\pm$ DP (n=4). (*) $p < 0.05$ para PA8 x TEWETGQI nos animais imunizados com pRE.

Resultados

A fim de verificarmos se haveria apresentação do epítopo imunodominante e, portanto, verificar se os aminoácidos mutados eram mesmo críticos, nós comparamos a resposta das células T CD8⁺ específicas para o epítopo dominante PA8 (VNHRFTLV) e para o sub-dominante TsKb-18 após imunização de camundongos homozigotos CB10 com um plasmídeo contendo o epítopo imunodominante alterado, plgSP-VNHRATLA, ou com um contendo o original, plgSP-clone 9 (Boscardin *et al.* 2003), seguida de desafio com a cepa y de *T.cruzi*. Nos animais controle deste experimento foram utilizadas alíquotas com quantidades equivalentes do plasmídeo pcDNA3.

A eliminação de células alvo cobertas com o epítopo PA8 foi significativamente maior do que a eliminação de células alvo cobertas com o peptídeo TsKb-18 em animais CB10 imunizados com o plasmídeo plgSP-clone 9 e infectados. Entretanto, não houve eliminação de células alvo cobertas com o epítopo PA8 em animais CB10 imunizados com o plasmídeo plgSP-VNHRATLA e infectados. Já as células cobertas com o peptídeo TsKb-18 foram eliminadas somente nos animais imunizados com a construção plgSP-VNHRATLA e infectados.

De forma semelhante, quando analisado o número de células produtoras de IFN- γ específicas para o epítopo PA8 observou-se que não houve uma tendência para maior número de células específicas para este epítopo do que para os epítopos TsKb-18, TsKb-20, TsKb-89, tanto em animais infectados como nos apenas imunizados com plgSP-VNHRATLA, não houve diferença estatística, nem mesmo nos infectados. Isto, possivelmente se deve ao fato de só se ter sido injetado duas doses, e o alto desvio padrão, foram utilizados 6 grupos com 3 animais, apenas nos permitem observar uma tendência a ser verificada em futuros ensaios de imunização como este mesmo plasmídeo (figura 10).

A Citotoxicidade - CB 10 +
pCDNA3/plgSP9/VNHRATLA

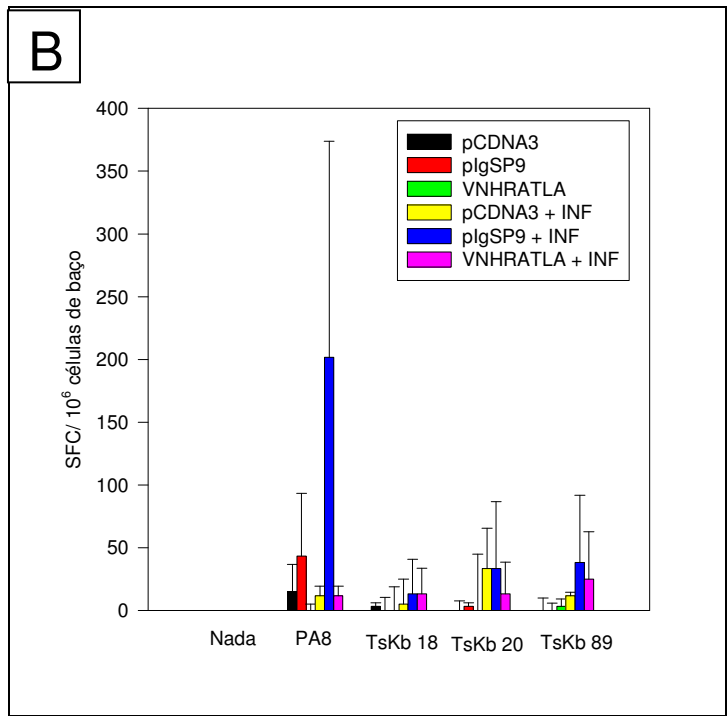
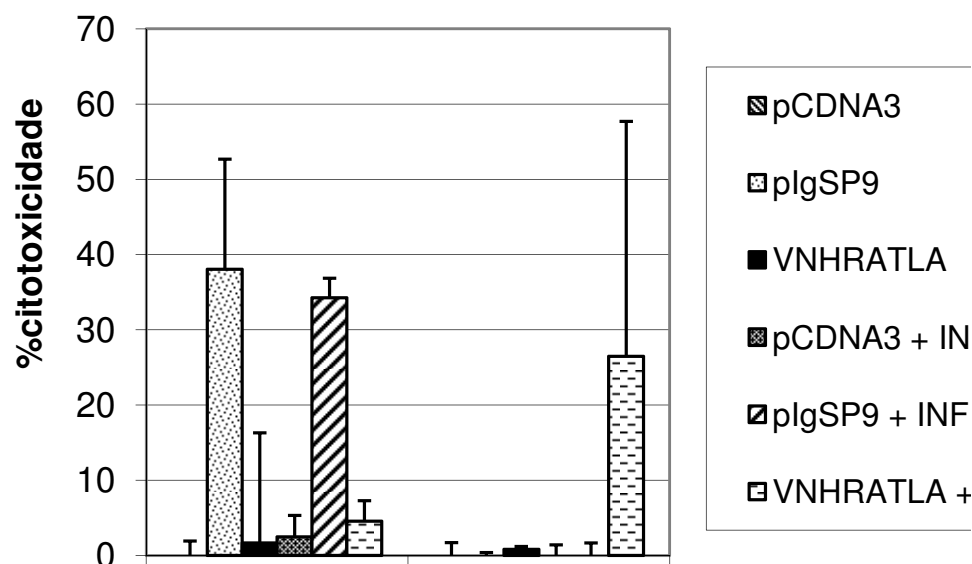


FIGURA 10: Citotoxicidade e produção de IFN γ específica em camundongos CB10 imunizados com plgSP-VNHRATLA e infectados com *T. cruzi*. Painel A – No 7º dia após a infecção, a atividade citotóxica in vivo contra células alvo cobertas com o epítipo VNHRFTLV (PA8), ou TsKb-18, ouTsKb-20, ou TsKb-89 foi determinada. Os resultados representam a média de 3 camundongos $\pm$ DP por grupo. Painel B – No 7º dia após a infecção, as células produtoras de IFN γ específicas para o epítipo VNHRFTLV (PA8), ou TsKb-18, ouTsKb-20, ou TsKb-89 foram estimadas por ELISPOT. Os resultados representam a média do número de SFC específico para cada epítipo por 10⁶ esplenócitos $\pm$ DP (n=3).

DISCUSSÃO

Discussão

Em animais vacinados e subsequentemente desafiados com parasitas da cepa Y, é observada uma significativa expansão de linfócitos T CD8⁺ específicos a poucos epítomos. Mais recentemente, foi demonstrado que estes linfócitos T CD8⁺ específicos não só expandem, mas também inibem com alta eficiência a expansão de linfócitos T CD8⁺ de diferentes especificidades, estabelecendo uma forte imundominância na resposta imune (TZELEPIS *et al.* 2008). Desta forma, ao mesmo tempo que os epítomos imunodominantes são importantes na imunidade protetora, eles impedem que a resposta imune seja induzida eficientemente contra outros epítomos.

Baseado neste fato, nós consideramos importante estudar qual seria o impacto da indução da imunidade à epítomos CD8 sub-dominantes na resposta protetora. Para testar nossa hipótese, construímos plasmídeos contendo estes epítomos sub-dominantes no lugar dos epítomos imunodominantes, os quais serão utilizados em futuros ensaios de imunização. O plasmídeo base, plgSP-clone 9, contém o epítomo CD8 imunodominante PA8 (VNHRFTLV) restrito ao MHC H-2K^b e o epítomo CD8 imunodominante TEWETGQI restrito ao MHC H-2K^k. No caso da construção plgSP-VNHRATLA, este plasmídeo teve o epítomo CD8 imunodominante PA-8 (VNHRFTLV) alterado para VNHRATLA, modificando provavelmente um aminoácido âncora e um que participaria da interação com o MHC-Ia. Com esta alteração, houve uma queda significativa no reconhecimento do epítomo imunodominante PA8 (Figura 10). Ainda não sabemos se não há apresentação deste antígeno ou se simplesmente ele não é reconhecido pelo TCR. Quanto aos plasmídios plgSP-ANYDFTLV e plgSP-ANYKFTLV, que possuem o PA-8 substituído por TsKb-18 e TsKb-20 respectivamente, estes ainda não foram testados em ensaios de imunização. Outro plasmídeo produzido, mas também ainda não utilizado nestes mesmos ensaios de imunização é o plgSP-TAWETGQA, que possui alteração dos supostos aminoácidos âncoras em relação ao epítomo imunodominante da ASP-2, TEWETGQI, para moléculas de MHC H-2K^k.

Como trabalhos anteriores demonstraram que epítomos sub-dominantes podem tornar-se imunodominantes através da eliminação do epítomo imunodominante e nós vimos que a eliminação do epítomo imunodominante não altera a resposta do epítomo sub-dominante, através da imunização com pRE-P4P7 seguida de desafio em camundongos F1 (C57BL/6 X B10.A), nós conseguimos eliminar o padrão de imundominância observada durante a infecção pelo *T. cruzi*. Ainda conseguimos

Discussão

aumentar não só a magnitude da resposta de células T CD8⁺ específicas contra o epítipo sub-dominante, mas também a resposta contra o imunodominante se manteve alta. Nós observamos que a ampliação da resposta contra o epítipo sub-dominante foi benéfica para o controle da infecção, uma vez que o pico de parasitemia nos animais imunizados com pRE-P4P7 foi significativamente menor que a dos animais somente infectados. Este resultado demonstra que a imunização com um vetor contendo isoladamente um epítipo sub-dominante pode diminuir a imunodominância, gerando uma resposta que é também anti-parasitária. Nenhum estudo anterior havia abordado esta questão na imunização experimental pelo *T. cruzi*.

No ensaio de imunização realizado com o plasmídeo plgSP-VNHRATLA, embora os resultados ainda sejam preliminares, se observou algo próximo do predito, ou seja, supostamente construímos um plasmídeo onde o epítipo imunodominante foi removido. No entanto, futuros experimentos para constatar este fato e a perda desta resposta serão realizados.

Conclusão

Conseguimos gerar plasmídeos onde os epítomos CD8 imundominantes PA8 (VNHRFTLV), restrito a molécula de MHC H-2K^b, ou TEWETGQI, restrito a molécula de MHC H-2K^k, foram modificados, e plasmídeos nos quais o PA8 foi trocado por um epítomo sub-dominante (ANYDFTLV ou ANYKFTLV). Por sequenciamento observamos que todas as mutações foram introduzidas conforme o esperado. Fizemos imunizações experimentais com um plasmídeo anteriormente construído em nosso laboratório, o pRE-P4P7, que contém somente o epítomo TEWETGQI e concluimos que a imunização com DNA plasmidial contendo somente o epítomo sub-dominante da ASP-2 de *T. cruzi* é capaz de abolir o padrão de imunodominância, além de diminuir drasticamente na parasitemia dos animais infectados. Ainda, após testarmos a imunogenicidade de um dos novos plasmídeos construídos, plgSP-VNHRATLA, em camundongos homozigotos CB10(MHC H-2K^b), e observamos uma grande possibilidade do epítomo imunodominante ter sido eliminado com a mutação conforme o pretendido. As novas construções de plasmídeos que estão sendo iniciadas juntamente com as construções já realizadas farão parte de novos ensaios de imunização que fazem parte de um novo projeto a ser desenvolvido pelo nosso grupo.

Bibliografia

- ANDRADE LO & ANDREWS NW. (2005) The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Rev Microbiol**, 3:819-23.
- ARAÚJO AFS, DE ALENCAR BCG, VASCONCELO JRC, HIYANE MI, MARINHO CRF, PENIDO MLO, BOSCARDIN SB, HOFT DF, GAZZINELLI RT & RODRIGUES MM. (2005) CD8⁺-T-Cell dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on Amastigote Surface Protein 2. **Infec Immun.**, 73:6017-25.
- BACHMANN MF, WOLINT P, SCHWARZ K, JÄGER P & OXENIUS A. (2005) Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. **J Immunol.**, 175:4686-4696.
- BARBER DL, WHERRY EJ, MASOPUST D, ZHU B, ALLISON JP, SHARPE AH, FREEMAN GJ & AHMED R. (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, 439:682-687.
- BLATTMAN JN & GREENBERG PD. (2004) Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. **Science**, 305:200-205.
- BOSCARDIN SB, KINOSHITA SS, FUJIMURA AE & RODRIGUES MM. (2003) Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. **Infect Immun.**, 71:2744-2757.
- BUTZ EA & BEVAN MJ. (1998) Massive expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells during an acute virus infection. **Immunity**, 8:167-175.
- BUTZ EA & BEVAN MJ. (1998) Dynamics of the CD8⁺ T cell response during acute LCMV infection. **Adv Exp Med Biol.**, 452:111-122.
- CHAGAS C. (1909) Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Cchizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1:159-218.
- CHEN W, ANTÓN LC, BENNINK JR & YEWDELL JW. (2000) Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. **Immunity**, 12:83-93.
- COSTA F, FRANCHIN G, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, RIBEIRÃO M, SCHENKMAN S & RODRIGUES MM. (1998) Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**, 16:768-774.
- COURA JR. (2003) Tripanossomose, doença de Chagas. **Ciênc Cult (São Paulo)**, 55:30-33.

- DAY CL, KAUFMANN DE, KIEPIELA P, BROWN JA, MOODLEY ES, REDDY S, MACKEY EW, MILLER JD, LESLIE AJ, DePIERRES C, MNCUBE Z, DURAISWAMY J, ZHU B, EICHBAUM Q, ALTFELD M, WHERRY EJ, COOVAIDA HM, GOULDER PJ, KLENERMAN P, AHMED R, FREEMAN GJ & WLAKE BD. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, 443:350-354.
- DE ALENCAR BCG, ARAÚJO AFS, PENIDO MLO, GAZZINELLI RT & RODRIGUES MM. (2007) Cross-priming of long lived protective CD8⁺ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: importance of a TLR9 agonist and CD4⁺ T cells. **Vaccine**, 25:6018-27.
- DRANE D, GITTLESON C, BOYLE J & MARASKOVSKY E. (2007) ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. **Expert Rev Vaccines**, 6:761-772.
- DUMONTEIL E, ESCOBEDO-ORTEGON J, REYES-RODRIGUEZ N, ARJONATORRES A & RAMIREZ-SIERRA MJ. (2004) Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. **Infect Immun.**, 72:46-53.
- EL SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC, NILSSON D, AGGARWAL G, TRAN AN, GHEDIN E, WORTHEY EA, DELCHER AL, BLANDIN G, WESTENBERGER SJ, CALER E, CERQUEIRA GC, BRANCHE C, HAAS B, ANUPAMA A, ARNER E, ASLUND L, ATTIPOE P, BONTEMPI E, BRINGAUD F, BURTON P, CADAG E, CAMPBELL DA, CARRINGTON M, CRABTREE J, DARBAN H, DA SILVEIRA JF, DE JONG P, EDWARDS K, ENGLUND PT, FAZELINA G, FELDBLYUM T, FERELLA M, FRASCH AC, GULL K, HORN D, HOU L, HUANG Y, KINDLUND E, KLINGBEIL M, KLUGE S, KOO H, LACERDA D, LEVIN MJ, LORENZI H, LOUIE T, MACHADO CR, McCULLOCH R, McKENNA A, MIZUNO Y, MOTTRAM JC, NELSON S, OCHAYA S, OSOEGAWA K, PAI G, PARSONS M, PENTONY M, PETTERSSON U, POP M, RAMIREZ JL, RINTA J, ROBERTSON L, SALZBERG SL, SANCHEZ DO, SEYLER A, SHARMA R, SHETTY J, SIMPSON AJ, SISK E, TAMMI MT, TARLETON R, TEIXEIRA S, VAN AKEN S, VOGT C, WARD P N, WICKSTEAD B, WORTMAN J, WHITE O, FRASER CM, STUART KD & ANDERSSON B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease. **Science**, 309:409-15.
- FRALISH BH & TARLETON RL. (2003) Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. **Vaccine**. 21:3070-80.
- FUJIMURA AE, KINOSHITA SS, PEREIRA-CHIOCCOLA VL & RODRIGUES MM. (2001) DNA sequences encoding CD4⁺ and CD8⁺-T cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect Immun.**, 69:5477-5486.

- GARG N & TARLETON RL. (2002) Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.**, 70:5547-5555.
- GOLDEN-MASON L, KLARQUIST J, WAHED AS & ROSEN HR. (2008) Programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. **J Immunol.**, 180:3637-3641.
- GRUFMAN P, WOLPERT EZ, SANDBERG JK & KÄRRE K. (1999) T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. **Eur J Immunol.**, 29:2197-2204.
- HA SJ, MUELLER SN, WHERRY EJ, BARBER DL, AUBERT RD, SHARPE AH, FREEMAN GJ & AHMED R. (2008) Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. **J Exp Med.**, 205:543-555.
- HOFT DF, EICKHOFF CS, GIDDINGS OK, VASCONCELOS JR & RODRIGUES MM. (2007) *Trans*-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. **J Immunol.**, 179:6889-900.
- HUANG Y, KRASNITZ M, RABADAN R, WITTEN DM, SONG Y, LEVINE AJ, HO DD, ROBINS H. (2008) A recoding method to improve the humoral immune response to an HIV DNA vaccine. **PLoS ONE**, 3(9) : e 3214.
- KATAE M, MIYAHIRA Y, TAKEDA K, MATSUDA H, YAGITA H, OKUMURA K, TAKEUCHI T, KAMIYAMA T, OHWADA A, FUKUCHI Y, AOKI T. (2002) Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. **Infect Immun.**, 70:4833-4840.
- KEDL RM, REES WA, HILDEMAN DA, SCHAEFER BC, MITCHELL T, KAPPLER JW & MARRACK P. (2000) T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. **J Exp Med.**, 192:1105-1113.
- KEDL RM, SCHAEFER BC, KAPPLER JW & MARRACK P. (2002) T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. **Nat Immunol.**, 3: 27-32.
- LA GRUTA NL, KEDZIERSKA K, PANG K, WEBBY R, DAVENPORT M, CHEN W, TURNER SJ & DOHERTY PC. (2006) A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. **Proc Natl Acad Sci. U S A**, 103:994-999.

- LOW HP, SANTOS MA, WIZEL B & TARLETON RL. (1998) Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8⁺ CTL. **J Immunol.**, 160:1817-1823.
- MACEDO AM, MACHADO CR, OLIVEIRA RP & PENA SDJ. (2004) *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99:1-12.
- MACHADO AV, CARDOSO JE, CLASER C, RODRIGUES MM, GAZZINELLI RT & BRUNA-ROMERO O. (2006) Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amstigote surface protein-2 and trans-sialidade. **Hum Gene Ther.**, 17: 898-908.
- MARTIN DL & TARLETON RL. (2004) Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev.**, 201:304-317.
- MARTIN DL & TARLETON RL. (2005) Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.**, 174:1594-1601.
- MARTIN DL, WEATHERLY DB, LAUCELLA SA, CABINIAN MA, CRIM MT, SULLIVAN S, HEIGES M, CRAVEN SH, ROSENBERG CS, COLLINS MH, SETTE A, POSTAN M & TARLETON RL. (2006) CD8⁺ T cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant *trans*-sialidase epitopes. **Plos Pathog.**, 2(8): e77.
- MCSHANE H, PATHAN AA, SANDER CR, KEATING SM, GILBERT SC, HUYGEN K, FLETCHER HA & HILL AV. (2004) Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85 A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nat Med.**, 10:1240-1244.
- MILES MA, SOUZA A, POVOA M, SHAW JJ, LAINSON R & TOYE PJ. (1978) Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, 272:819-21.
- MILES MA, LANHAM SM, DE SOUZA AA & POVOA M. (1980) Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans R Soc Trop Med and Hyg**, 74:221-42.
- MIYAHIRA Y, TAKASHIMA Y, KOBAYASHI S, MATSUMOTO Y, TAKEUCHI T, OHYANAGI-HARA M, YOSHIDA A, OHWADA A, AKIBA H, YAGITA H, OKUMURA K & OGAWA H. (2005) Immune responses against a single CD8⁺-T cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.**, 73:7356-7365.
- MORGAN RA, DUDLEY ME, WUNDERLICH JR, HUGHES MS, YANG JC, SHERRY RM, ROYAL RE, TOPALIAN SL, KAMMULA US, RESTIFO NP, ZHENG Z,

- NAHVI A, DE VRIES CR, ROGERS-FREEZER LJ, MAVROUKAKIS SA & ROSENBERG SA. (2006) Cancer regression in patients after transfer os fenetically engineered lymphocytes. **Science**, 314: 126-129.
- MOUTAFTSI M, PETERS B, PASQUETTO V, TSCHARKE DC, SIDNEY J, BUI HH, GREY H & SETTE A. (2006) A consensus epitope prediction approach identifies the breath of murine T (CD8+)-cell responses to vaccinia virus. **Nat Biotechnol.**, 24:817-819.
- MULLER U, SOBEK V, BALKOW S, HOLSCHER C, MULLBACHER A, MUSETEANU C, MOSSMANN H & SIMON MM. (2003) Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. **Eur J Immunol.**, 33:70-78.
- MUNKS MW, GOLD MC, ZAJAC AL, DOOM CM, MORELLO CS, SPECTOR DH & HILL AB. (2006) Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. **J Immunol.**, 176:3760-3766.
- PEREIRA-CHIOCCOLA VL, FRAGATA-FILHO AA, LEVY AM, RODRIGUES MM & SCHENKMAN S. (2003) Enzyme-linked immunoassay using recombinant trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. **Clin Diagn Lab Immunol.**, 10:826-830.
- PETROVAS C, CASAZZA JP, BRENCHELEY JM, PRICE DA, GOSTICK E, ADAMS WC, PRECOPIO ML, SCHACKER T, ROEDERER M, DOUEK DC & KOUP RA. (2006) PD-1 is a regulator of vírus specific CD8+ T cell survival in HIV infection. **J Exp Med.**, 203:2281-2292.
- PRATA A. (1999) Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94:81-88.
- PROBST P, STROMBERG E, GHALIB HW, MOZEL M, BADARO R, REED SG & WEBB JR. (2001) Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. **J Immunol**, 166:498–05.
- ROTTENBERG ME, BAKHIET M, OLSSON T, KRISTENSSON K, MAK T, WIGZELL H & ORN A. (1993) Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, 61:5129-33.
- SANCHEZ-BURGOS G, MEZQUITA-VEGA RG, ESCOBEDO-ORTEGON J, RAMIREZ-SIERRA MJ, ARJONA-TORRES A, OUAISSI A, RODRIGUES MM & DUMONTEIL E. (2007) Comparative evaluation of therapeutic vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, 50:333-341.

- SANDER C & MCSHANE H. (2007) Translational mini-review series on vaccines: Development and evaluation of improved vaccines against tuberculosis. **Clin Exp Immunol.**, 147:401-411.
- SANTIN AD, BELLONE S, PALMIERI M, ZANOLINI A, RAVAGGI A, SIEGEL ER, ROMAN JJ, PECORELLI S & CANNON MJ. (2008) Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. **J Virol.**, 82:1968-1979.
- SEPULVEDA P, HONTEBEYRIE M, LIEGEARD P, MASCILLI A & NORRIS KA. (2000) DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.**, 68:4986-4991.
- SPEISER DE, LIÉNARD D, RUFER N, RUBIO-GODOY V, RIMOLDI D, LEJEUNE F, KRIEG AM, CEROTTINI JC & ROMERO P. (2005) Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. **J Clin Invest.**, 115:739-746.
- SPEISER DE, BAUMGAERTNER P, VOELTER V, DEVEVRE E, BARBEY C, RUFER N & ROMERO P. (2008) Unmodified self antigen triggers human CD8 T cells with stronger tumor reactivity than altered antigen. **Proc Natl Acad Sci USA**, 105:3849-3854.
- STOCK AT, JONES CM, HEALTH WR & CARBONE FR. (2006) CTL response compensation for the loss of an immunodominant class I-restricted HSV-1 determinant. **Immunol Cell Biol.**, 84:543-550.
- SZTEIN MB. (2007) Cell-mediated immunity and antibody responses elicited by attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhi strains used as live oral vaccines in humans. **Clin Infect Dis.**, 45 Suppl 1:S15-9.
- TARLETON RL. (1990) Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, 144:717-724.
- TARLETON RL, KOLLER BH, LATOUR A & POSTAN M. (1992) Susceptibility of beta 2-microglobulin- deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, 356: 338-340.
- THOMAS PG, BROWN SA, KEATING R, YUE W, MORRIS MY, SO J, WEBBY RJ, DOHERTY PC. (2007) Hidden epitopes emerge in secondary influenza virus-specific CD8+ T cell responses. **J Immunol.**, 178:3091-3098.

- TSCHARKE DC, KARUPIAH G, ZHOU J, PALMORE T, IRVINE KR, HAERYFAR SM, WILLIAMS S, SIDNEY J, SETTE A, BENNINK JR & YEWDELL JW. (2005) Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. **J Exp Med.**, 201:95-104.
- TZELEPIS F, DE ALENCAR BCG, PENIDO ML, GAZZINELLI RT, PERSECHINI PM & RODRIGUES MM. (2006) Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naïve or vaccinated mice. **Infect Immun.**, 74:2477-2481.
- TZELEPIS F, PERSECHINI PM, & RODRIGUES MM. (2007) Modulation of CD4+ T cell-dependent specific cytotoxic CD8+ T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. **Plos One**, 2(4): e393.
- TZELEPIS F, DE ALENCAR BCG, PENIDO ML, CLASER CL, MACHADO AV, BRUNA-ROMERO O, GAZZINELLI RT & RODRIGUES MM. (2008) Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts repertoire of parasite specific CD8+ T cells leading to immunodominance. **J Immunol.**, 180:1737-1748.
- URBANI S. AMADEI B, TOLA D, MASSARI M, ACHIVAZAPPA S, MISSALE G & FERRARI C. (2006) PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. **J Virol.**, 80:11398-11403.
- VALMORI D, SOULEIMANIAN NE, TOSELLO V, BHARDWAJ N, ADAMS S, O'NEILL D, PAVLICK A, ESCALON JB, CRUZ CM, ANGIULLI A, ANGIULLI F, MEARS G, VOGEL SM, PAN L, JUNGBLUTH AA, HOFFMANN EW, VENHAUS R, RITTER G, OLD LJ & AVVOUR M. (2007) Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104:8947-8952.
- VAN DER MOST RG, MURALI-KRISHNA K, LANIER JG, WHERRY EJ, PUGLIELLI MT, BLATTMAN JN, SETTE A & AHMED R. (2003) Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation. **Virology**, 315:93-102.
- VASCONCELOS JR, HIYANE MI, MARINHO CRF, CLASER C, MACHADO AMV, GAZZINELLI RT, BRUÑA-ROMERO O ALVAREZ JM BOSCARDIN SB & RODRIGUES MM. (2004) Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and *trans*-sialidase. **Hum Gene Ther.**, 15: 878-886.
- VIOTTI R, VIGLIANO H, ARMENTI H & SEGURA E. (1994) Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow up. **Am Heart J**, 127:151-62.
- WHO. (2002) Control of Chagas Disease.

WHO. (2006) Chagas.

WHO. (2007) WHO expands fight against Chagas disease with support from Bayer.

WILLIS RA, KAPPLER JW & MARRACK PC. (2006) CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. **PNAS**, 103:12063–68.

WIZEL B, NUNES M & TARLETON RL. (1997) Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8⁺ Tc1 responses. **J Immunol.**, 159:6120-6130.

WIZEL B, GARG N & TARLETON RL. (1998) Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.**, 66:5073-5081.

YANG TC, MILLAR JB, GRINSHTEIN N, BASSETT J, FINN J & BRAMSON JL. (2007) T-cell immunity generated by recombinant adenovirus vaccines. **Expert Rev Vaccines**, 6:347-356.

ZINGALES B, STOLF BS, SOUTO RP, FERNANDES O & BRIONES MRS. (1999) Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94:159-64.