

Paulo José Cunha Miranda

**Caracterização da Resposta Imune Humoral e Celular em
Camundongos Imunizados com o Antígeno Recombinante
CRA de *Trypanosoma cruzi***

Recife, 2002

Paulo José Cunha Miranda

**Caracterização da Resposta Imune Humoral e Celular em
Camundongos Imunizados com o Antígeno Recombinante
CRA de *Trypanosoma cruzi***

Dissertação que apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Patologia para obtenção do título de Mestre em Anatomia Patológica, Área de Concentração Imunologia, do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.

Orientadores: Prof^a. Dra. Yara de Miranda Gomes, PhD (CPqAM/FIOCRUZ)
Prof^a. Dr. Aggeu Godoy Magalhães Filho, Livre Docente (UFPE)

Recife – 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Mozart Neves Ramos

VICE-REITOR

Prof. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Paulo Roberto Freire Cunha

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Éfren de Aguiar Maranhão

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

CHEFE

Prof. Luciano Tavares Montenegro

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MESTRADO EM MEDICINA (ANATOMIA PATOLÓGICA)**

COORDENADOR

Prof. . Roberto José Vieira de Melo

VICE-COORDENADOR

Prof^a. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima

DEDICATÓRIA

À você meu Pai, dedico este trabalho. Foi com você que aprendi que a vida é uma longa, imprevisível, porém formidável caminhada. Quando trilhada com Obstinação, Bondade, Solidariedade, Amor ao Próximo e acima de tudo com Fé, as flores no caminho brotarão. Isto me fortalece . Pai, sempre sigo com você, no meu pensamento e no meu coração, obrigado por tudo que me ensinou.

Miranda, Paulo José Cunha

Caracterização da resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados com o antígeno recombinante CRA de *Trypanosoma cruzi* / Paulo José Cunha Miranda. – Recife : O Autor, 2002.

viii, 46 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Anatomia Patológica, 2002.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Doença de Chagas – Resposta imune – Estudo experimental. 2. Imunização. 3. Antígeno recombinante. I. Título.

**616.937
616.9363**

**CDU (2.ed.)
CDD (21.ed.)**

**UFPE
BC2002-306**

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Lane, pelo incentivo, companheirismo, trabalho, compreensão, e carinho, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Às minhas filhas Anna Paula, Patrícia e Mariana, pela feliz convivência, incentivo e por terem cedido um pouco dos seus preciosos tempos que passamos juntos.

À meu pai “in memoriam” por tudo que representou para mim.

À minha mãe, pelo amor, dedicação, carinho e solidariedade, em todos os momentos da minha vida.

Ào Professor Roberto Vieira de Melo, Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE, pelo exemplo de profissionalismo, incentivo e dedicação à vida acadêmica.

À Dra. Yara de Miranda Gomes, Pesquisadora Titular do CPqAM/FIOCRUZ, pela sua dedicação, competência e oportunidade que me deu para realizar e concluir o presente projeto, sempre me incentivando e orientando em todas as fases do trabalho.

À Dra. Valéria Pereira, Tecnologista do CPqAM/FIOCRUZ, pela realização de experimentos com animais, coleta de dados e orientação nos procedimentos metodológicos.

Ào Dr. Adonis Reis Lira de Carvalho, Professor Titular da UFPE, pelo constante incentivo, competência profissional, dedicação acadêmica e pioneirismo na criação do Mestrado em Patologia da UFPE e da sub-área de Patobiologia.

Ào Dr. Aggeu de Godoy Magalhães Filho, Professor Adjunto Livre Docente, pela dedicação a pesquisa, orientação e incentivo durante toda minha vida acadêmica.

À Sra. Sonia Maria Lopes de Carvalho, Secretária do Curso de Mestrado em Anatomia Patológica da UFPE, pela sua dedicação, empenho, e incentivo para com o crescimento e reconhecimento do Mestrado na UFPE.

Ào Dr. Rômulo Maciel Filho e a Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro, Diretor e Vice-Diretora do CPqAM/FIOCRUZ, pela disponibilização dos Laboratórios e apoio na confecção da Dissertação.

À Dra. Elizabeth Malagueño pela disponibilização do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/UFPE, sem a qual não seria possível a realização do presente trabalho.

Àos Drs. Antônio Gomes Pinto Ferreira e Edimilson Domingos da Silva, Tecnologistas de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, pela produção e disponibilização da preparação antigênica CRA de *Trypanosoma cruzi* utilizada no presente trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o projeto se tornasse realidade.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BFA – Brefeldina
CD4 + – Linfócitos T auxiliares
CD8 + – Linfócitos T citotóxicos
Con-A – Concanavalina A
CO₂ – Dióxido de carbono
CRA – “Cytoplasmic repetitive antigen”
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”
FACS – “Fluorescent activated cytometry sorter”
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FRA – “Flagellar repetitive antigen”
IFN- γ - Interferon gama
IgG – Imunoglobulina G
IgG1 – Imunoglobulina G1
IgG2a – Imunoglobulina G2a
IgG2b – Imunoglobulina G2b
IgG3 – Imunoglobulina G3
IONO – Ionomicina
KDa - Kilodáltons
MFF – Fixador MACS FACS
PBS- Salina tamponada com fosfato
PE – Ficoeritrina
pH – Potencial hidrogeniônico
PMA – Phorbol 12-myristate 13-acetate
RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
SAPA – “Shed acute phase antigen”
SFB – Soro fetal bovino
TA – Temperatura ambiente
Th1 – Linfócitos T auxiliar do tipo 1
THT – Teste de hipersensibilidade tardia
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa
TS – Proteína recombinante trans-sialidase
Tw – Tween 20
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
Ag-Rec – Antígeno recombinante
WHO – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida do Ag-Rec CRA de <i>T. cruzi</i> purificados no Laboratório de Reativos de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.....	22
Figura 2 Cinética do perfil isotípico das imunoglobulinas G expresso pelo soro de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de <i>T. cruzi</i> através do ELISA.....	24
Figura 3 Teste de hipersensibilidade cutânea.....	26
Figura 4 Resposta ao teste de hipersensibilidade cutânea.....	26
Figura 5 Resposta proliferativa associada aos linfócitos T das células esplênicas de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de <i>T. cruzi</i>	27
Figura 6 Percentagem de linfócitos T CD4+ das células esplênicas de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de <i>T. cruzi</i> , secretando IFN- γ	28
Figura 7 Expressão de linfócitos T CD4 em células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com o Ag-Rec CRA, secretando IFN- γ	28
Figura 8 Percentagem de linfócitos T CD8+ das células esplênicas de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de <i>T. cruzi</i> , secretando TNF- α	29
Figura 9 Expressão de linfócitos T CD4 em células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com o Ag-Rec CRA, secretando TNF- α	29

RESUMO

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* resulta no desenvolvimento de intensa produção de anticorpos e resposta imune celular durante as fases aguda e crônica da doença. O presente trabalho investigou o grau de estimulação da resposta imune, humoral e celular em camundongos BALB/c imunizados com o Ag-Rec CRA de *T. cruzi*, visando sua utilização em ensaios de imunoproteção. Foram avaliados o perfil isotípico das imunoglobulinas IgG, a reação de hipersensibilidade cutânea, a resposta proliferativa de linfócitos esplênicos e a produção de citocinas intracitoplasmáticas. Os resultados mostraram que o Ag-Rec CRA induziu: 1) um aumento significativo na produção de anticorpos de isotipos IgG2a e IgG3; 2) a produção de IFN- γ por células CD4⁺ indicando que o CRA induz uma resposta celular tipo Th1 e 3) a produção de TNF- α por células CD8⁺. Não foi observada diferença significativa na resposta proliferativa associada aos linfócitos T esplênicos frente ao Ag-Rec CRA, quando comparado ao grupo controle sem estimulação. Os animais imunizados com Ag-Rec CRA manifestaram reações de hipersensibilidade imediata, alcançando um pico máximo e, 2 h após a injeção do antígeno, diminuindo lentamente em 24 h. Estes resultados mostraram que o Ag-Rec CRA ativa mecanismos imunes envolvidos na eliminação do parasita e poderá ser importante em induzir a imunidade protetora.

ABSTRACT

Infection with *Trypanosoma cruzi* results in development of high antibody production and cellular immune response during acute and chronic phases of the disease. The present work investigated the degree of stimulation of the humoral and cellular immune responses from BALB/c mice immunized with CRA Rec-Ag of *T. cruzi*, aiming their use in protection assays. The isotypic profiles of IgG immunoglobulins, the cutaneous hypersensitivity reaction, lymphoproliferative response of splenocytes and production of intracytoplasmic cytokines, were evaluated. The results showed that the Rec-Ag CRA induced: 1) high levels of IgG antibodies being IgG2a and IgG3 the predominant isotypes; 2) production of IFN- γ by CD4⁺ T -cells that indicate that CRA induce cellular response type Th1 and 3) production of TNF- α by CD8⁺ T cells. No significant difference in proliferative response associated to T splenic lymphocytes stimulated with CRA Rec-Ag was observed when compared to the control group without stimulation. CRA-immunized animals showed a significant immediate-type reaction that reached the maximum at 2hr after antigen challenge and faded slightly by 24 h. These results showed that CRA Rec-Ag active immune mechanisms involved in parasite elimination and can be important for inducing protective immunity.

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	1
1.1. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e clínicos.....	1
1.2. Aspectos imunológicos.....	3
1.3. Vacinas.....	5
1.4. Vacinas com antígenos recombinantes.....	7
1.5. Antígenos recombinantes CRA e FRA.....	9
2. Objetivos	12
2.1. Geral	12
2.2. Específicos	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Antígeno recombinante.....	13
3.2. Eletroforese.....	13
3.3. Animais.....	13
3.4. Imunização dos camundongos.....	14
3.5. Obtenção de soro.....	14
3.6. Perfil isotópico.....	14
3.7. Teste de hipersensibilidade cutânea.....	16
3.8. Obtenção de células esplênicas.....	16

3.9. Ensaios de proliferação celular.....	17
3.10. Determinação de citocinas intracitoplasmáticas.....	18
3.11. Análise por citometria de fluxo.....	20
3.12. Análise estatística.....	21
4. Resultados	22
4.1. Perfil eletroforético do Ag-Rec CRA.....	22
4.2. Perfil isotípico das imunoglobinas G.....	22
4.3. Caracterização da reação de hipersensibilidade cutânea.....	25
4.4. Resposta proliferativa dos linfócitos.....	25
4.. Avaliação das citocinas intracitoplasmáticas.....	25
5. Discussão	30
6. Conclusão	34
7. Referências bibliográficas	35
8. Anexos	43
Resumo 1. Publicado nos Anais do XXVI Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2001.....	44
Resumo 3. Publicado nos Anais do XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, 2002.....	45
Artigo. Specific Humoral and Cellular Immune Response in Mice Immunized with CRA and FRA Recombinant Antigens of <i>Trypanosoma cruzi</i> (manuscrito em preparação).....	46

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e clínicos

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana, descoberta em 1909 pelo cientista Carlos Chagas em Lassance (Minas Gerais), é circunscrita ao continente americano, particularmente às regiões tropicais e subtropicais da América Latina. A doença, que foi detectada em múmias chilenas datadas de 4000 a.C. (GUHL, et al., 1999), começou a expandir-se no final do século XIX, atingindo um pico na metade do século XX, com uma estimativa de 23.000 mortes a cada ano (PRATA, 2001). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) estima que a prevalência da infecção humana em 15 países endêmicos é de 18 milhões de casos e que cerca de 70 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção. A incidência da doença de Chagas está estimada em 700.000 casos novos por ano e 45 000 mortes/ano são devido à forma cardíaca. A OMS ressalta que as lesões ocorrem em 1/3 dos indivíduos infectados, 10 - 20 anos após a fase aguda inicial e incluem: cardiopatia crônica (27%), lesões digestivas crônicas (6%) e distúrbios neurológicos (3%), tornando a doença a um grande problema de saúde pública (WHO, 1996). No Brasil um estudo imunoepidemiológico Nacional realizado em 1975, revelou que 4.2% das

peças infectadas viviam em zona rural e que a mortalidade devido à doença foi de 5.1 por 100.000 habitantes.

A doença, que apresenta uma fase aguda e uma fase crônica, é transmitida por insetos hematófagos da família Reduviidae, vulgarmente conhecidos pelo nome de “barbeiros” (WHO, 1996). A transmissão também pode ocorrer sem a intervenção do vetor, por via transfusional, congênita, oral, e por transplantes de órgãos contaminados.

Não há quimioterapia segura disponível para o tratamento ou para prevenção da doença, o que resulta em alta morbidade dos indivíduos infectados. Os tradicionais antiparasitários, Nifurtimox e Benzonidazol, são parcialmente eficazes apenas na fase aguda da infecção (CANÇADO, 1985). Além disso, a sua ação depende do tipo de cepa que produziu a infecção (ANDRADE et al., 1985). A prevenção da doença é feita pelo controle de vetores, triagem de sangue parasitado nos serviços de transfusão sanguínea e educação sanitária.

Vários estudos confirmaram a baixa eficácia do tratamento convencional com Nifurtimox ou Benzonidazol (DE ANDRADE et al., 1996). Em crianças com infecções recentes, o tratamento mostrou-se eficiente em 55,8%, já em adultos infectados por vários anos foi apenas

19,1% (VIOTTI et al., 1994). A maioria dos indivíduos na fase crônica da infecção é resistente ao tratamento com a quimioterapia convencional e mantém a infecção por toda a vida. Aproximadamente 1/3 deles evolui lentamente para formas sintomáticas da doença caracterizadas por cardiomiopatia e/ou síndromes mega-gastrointestinais (RODRIGUES et al., 1999). Indivíduos que não desenvolvem sintomas representam uma ameaça para doação de sangue, podendo transmitir a doença por transfusão sangüínea. Segundo COSTA et al. (1998), a falta de perspectiva de tratamento leva à possibilidade de que intervenções imunes, tais como imunização, poderão ser uma arma adicional para aumentar a eficácia do tratamento em pacientes que não respondem à quimioterapia convencional.

Diante destes fatos, vários grupos de pesquisa têm envidado esforços, através de várias abordagens, para elucidar as respostas imunes em animais de experimentação e em humanos infectados com *T. cruzi*, de maneira que intervenções imunes sejam realizadas com segurança.

1.2. Aspectos imunológicos

Trabalhos publicados sobre a imunidade na doença de Chagas, envolvendo animais de experimentação, documentam a existência de

uma resposta imune específica contra *T. cruzi* que incluem mecanismos efetores como o bloqueio da interação parasita célula-hospedeira por anticorpos (ALVES et al., 1986; GONZÁLEZ et al., 1991; GOMES et al., 1995), efeito do óxido nítrico (MILLAR & KAHN, 2000) lise mediada pelo complemento (KRETTLI & BRENER, 1982; YOSHIDA, 1986; GOMES et al., 1995), ação de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T CD4+ e CD8+) (MINOPRIO et al., 1986, 1989; RUSSO & STAROBINAS, 1991; TARLETON, 1991, GAZZINELLI et al., 1992; BUCHOVSKY et al, 2001), além da ação de citocinas como IFN γ , TNF, IL-2, IL-10 (REED et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1996; ABRAHAMMSOHN & COFFMAN, 1996; DUTRA et al., 1997; MILLAR et al., 1999; GALVÃO & ABRAHAMMSOHN, 2001; MULLER et al, 2001; KUMMAR & TARLETON, 2001).

Com relação a doença de Chagas humana, trabalhos têm demonstrado o envolvimento da imunidade celular em todas as suas formas clínicas. Neste contexto, estudos suportam um papel para os mecanismos imunes citotóxicos no desenvolvimento das formas clínicas severas da doença de Chagas (REIS et al., 1993; CUNHA-NETO et al., 1998; UMEZAWA et al., 2000; PRATA, 2001).

Apesar desses estudos demonstrarem a importância da resposta imune no desenvolvimento da lesão cardíaca severa, pouco é conhecido sobre o papel dos fatores solúveis no desenvolvimento desta patologia.

Estudos recentes sobre a avaliação do papel de várias citocinas, através de estimulação *in vitro* das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes chagásicos com antígenos solúveis do parasita, mostram que a secreção de IFN- γ pode estar relacionada com a forma cardíaca severa. Já a secreção de IL-10 apresenta uma direta correlação com a forma indeterminada sugerindo um papel no controle da morbidade (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999). Os níveis de produção dessas duas citocinas seriam preditivos da evolução clínica da doença.

1.3. Vacinas

Os conhecimentos da complexidade da estrutura antigênica do parasita e da imunopatologia do processo infeccioso (PETERSON et al. 1986, CHOROMANSKI & KUHN 1987, REED, 1988, MINOPRIO et al., 1988, 1989; CORDEIRO DA SILVA et al, 1998; ANDRADE, 1999) têm contribuído para novas abordagens de pesquisa sobre vacinas na

doença de Chagas. Vários trabalhos demonstraram que proteção parcial de camundongo pode ser induzida pela imunização com parasitas mortos (MENEZES 1968; BASOMBRI, 1990), atenuados (MCHARDY & ELPHICK 1978; BASOMBRI, 1982; PAIVA et al., 1999), ou quimicamente inativados (ANDREWS et al. 1985). Antígenos mais definidos como glicoproteínas isoladas de membrana de epimastigotas (SNARY, 1983; GOMES et al., 1999), fração flagelar (SEGURA et al., 1977; WRIGHTSMAN et al., 1995), exoantígenos (GRUPPI et al., 1994, 1995) e moléculas quimicamente definidas (BUA et al., 1991), têm apresentado potencial efeito protetor.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante vários genes que codificam proteínas antigênicas de *T. cruzi* têm sido clonados. Os segmentos dos genes clonados têm sido usados para produzir porções das proteínas antigênicas em bactéria, e várias destas, únicas ou isoladas, têm sido usadas como antígenos alvos em ensaios de sorodiagnóstico (KRIEGER et al., 1992; UMEZAWA et al., 1999; GOMES et al., 2001) ou em estudos de imunoproteção (SANTORI et al., 1996, PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 1999).

1.4. Vacinas com antígenos recombinantes

Recentemente, ênfase tem sido dada ao potencial imunoprotetor de proteínas recombinantes (antígenos recombinantes – Ag-Rec) (NASSER et al., 1997; PEREIRA-CHIOCCOLA, et al., 1999) e material genético (DNA ou RNA) (WIZEL et al., 1998; COSTA, et al., 1998; RODRIGUES et al., 1999).

Apesar dos Ag-Rec apresentarem a desvantagem do elevado custo na sua produção, eles são considerados ferramentas adequadas para analisar as respostas imunes contra o parasita uma vez que, eles apresentam as vantagens de serem quimicamente definidos e fáceis de produzir, permitindo ensaios com vários adjuvantes e utilização de vários protocolos de imunização. Entretanto, poucas investigações têm sido realizadas sobre a possibilidade de Ag-Rec induzirem reações imune celular ou protegerem contra *T. cruzi*.

Trabalho de NASSER et al. (1997) mostra que camundongos imunizados com o Ag-Rec SAPA (shed acute phase antigen) apresentaram redução na parasitemia e mortalidade. O recombinante SAPA foi capaz de ativar mecanismos imunológicos capazes de controlar apenas parcialmente uma infecção letal, mas de uma maneira

reproduzível (NASSER et al., 1997). O SAPA é um antígeno circulante produzido por tripomastigotas, que é especificamente reconhecido pelo soro de pacientes agudos (AFFRANCHINO et al., 1989). PEREIRA-CHIOCCOLA et al. (1999) realizaram um estudo comparativo da resposta imune protetora entre um grupo de camundongos imunizados com a proteína recombinante TS (*trans*-sialidase) e outro grupo imunizado com o plasmídeo contendo o gene da TS. A imunização de camundongos com a proteína TS resultou em uma forte resposta anticórpica ou inibição da atividade enzimática da TS. O mais relevante é que esta imunização reduziu a mortalidade na infecção aguda: 60% dos camundongos imunizados sobreviveram a infecção aguda. Contrariamente, todos os animais imunizados com plasmídeos contendo o gene da TS morreram.

Em estudos recentes, utilizando-se a proteína TS como antígeno, pela técnica de ELISA, foi possível detectar 60% de positividade, em amostras testadas por métodos convencionais com resultados negativos, confirmando a capacidade imunogênica desse antígeno (BUCHOVSKY et al, 2001).

1.5. Antígenos recombinantes CRA e FRA

A clonagem e caracterização de dois genes de *T. cruzi* que codificam proteínas contendo epitopos repetitivos foi realizada por LAFAILLE et al. (1989). O estudo posterior destes genes revelou que ambos apresentavam uma estrutura onde havia a repetição de um mesmo motivo (epitopo) reconhecido por anticorpo. Um dos antígenos apresentava uma localização difusa no citoplasma enquanto o outro era flagelar. Em função de sua estrutura em epitopos repetitivos e sua localização, esses antígenos foram denominados de CRA (“cytoplasmic repetitive antigen” ou antígeno citoplasmático repetitivo) e está presente nas formas epimastigotas e amastigotas e FRA (“flagelar repetitive antigen” ou antígeno flagelar repetitivo) presente nas formas epimastigotas e amastigotas do *T. cruzi*.

Estudos posteriores demonstraram que estes genes são altamente polimórficos (KRIEGER et al., 1990). No entanto apesar de polimórficos em diferentes cepas, estes antígenos foram reconhecidos por mais de 95% dos soros chagásicos quando individualmente testados por radioimunoensaio, indicando que os determinantes antigênicos são bem conservados (GOLDENBERG et al., 1991). Estes antígenos revelaram-

se importantes no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, quando testados em conjunto pelo método ELISA, uma vez que a sensibilidade e especificidade foram de 100% (KRIEGER et al., 1992).

Esses antígenos foram desenvolvidos pelo grupo do Dr. Samuel Goldenberg do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/FIOCRUZ e atualmente são produzidos na forma de “kit” para diagnóstico da doença de Chagas por Bio-Manguinhos, uma das Unidades da FIOCRUZ, que detém a patente dos mesmos. O referido “kit” (EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos) tem sido usado com sucesso no diagnóstico e no acompanhamento de pacientes chagásicos submetidos a quimioterapia (GOMES ET AL., 2001; SILVA et al., 2002).

IBANEZ et al. (1988) aponta várias possibilidades a serem consideradas para proteínas que contêm estruturas repetitivas, como o CRA e o FRA: 1) podem ser componentes da superfície do parasita que devido a sua localização e abundância induz uma forte resposta anticórpica, 2) são proteínas geralmente muito imunogênicas, e 3) parecem desempenhar um importante papel entre o parasita e sistema imune do hospedeiro. Ainda segundo IBANEZ et al. (1988) se esses antígenos são essenciais para a sobrevivência do parasita, anticorpos

contra eles podem interferir no mecanismo de invasão da célula-hospedeira. Portanto, esses antígenos poderiam ser considerados potenciais candidatos para uma vacina contra *T. cruzi*.

Não encontramos na literatura pesquisada nenhum dado relacionado às propriedades imunogênicas dos antígenos CRA e FRA. As características moleculares do CRA e do FRA, acima citadas, associadas à resposta anticórpica dos pacientes chagásicos justificam uma avaliação de suas propriedades imunogênicas.

O presente trabalho está inserido dentro de uma das linhas de pesquisas do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, que visa a caracterização das propriedades imunogênicas de antígenos recombinantes do *T. cruzi*.

2. Objetivos

2.1. Geral

Investigar o grau de estimulação da resposta imune, humoral e celular, em camundongos imunizados com o antígeno recombinante CRA de *T. cruzi*, visando sua utilização em ensaios de imunoproteção.

2.2. Específicos

1. Avaliar o grau de pureza do antígeno recombinante (Ag-Rec) CRA obtido de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, através de eletroforese em gel de poliacrilamida.
2. Imunizar camundongos com o Ag-Rec CRA.
3. Avaliar a resposta anticórpica dos camundongos imunizados analisando o perfil isotípico das imunoglobulinas G, através do ELISA.
4. Avaliar a resposta celular dos camundongos imunizados através do teste de hipersensibilidade tardia, de ensaios de proliferação celular, tipagem das células esplênicas e determinação de citocinas intracitoplasmáticas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Antígeno recombinante – O antígeno recombinante (Ag-Rec) CRA foi proveniente do Laboratório de Reativos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da FIOCRUZ, de acordo com o seguinte fluxograma: crescimento de *E. coli* modificadas → indução para produção de proteína recombinante → rompimento celular → centrifugação → purificação → controle de qualidade.

3.2. Eletroforese – A preparação antigênica contendo o Ag-Rec CRA foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI et al., 1970) na concentração de 12%, e corado pela prata segundo MORRISEY (1981).

3.3. Animais – Trinta e seis camundongos BALB/c machos com 9-10 semanas de idade foram separados em 2 grupos (Grupo 1 - G1 e Grupo 2 - G2), cada um deles contendo 18 animais. Os camundongos foram provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ e mantidos no biotério experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). O protocolo utilizado no presente

trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA da FIOCRUZ.

3.4. Imunização dos camundongos – O esquema de imunização foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Gomes et. al. (1999). Os camundongos do G1 foram imunizados três vezes, por via sub-cutânea, em intervalos de 20 dias com 20 µg do Ag-Rec CRA diluído em 50 µl de PBS filtrado (membrana=0,45 µm). Na primeira injeção a proteína foi emulsificada com 50 µl de adjuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO). As duas últimas imunizações foram associadas com o adjuvante incompleto. O grupo 2 (controle), recebeu apenas 50 µl de PBS associados com 50 µl de adjuvante.

3.5. Obtenção de soro – Cinco camundongos de cada grupo, 14 dias após cada imunização foram anestesiados com éter. O sangue foi coletado através do plexo retroorbitário e o soro utilizado para determinação dos isotipos das imunoglobulinas

3.6. Perfil isotípico – O perfil isotípico das imunoglobulinas foi determinado através do ELISA utilizando soro de camundongos 14 dias após cada imunização. Placas de microtitulação (Nunc-Immuno Plates,

MaxiSorp, 96 wells, Nalge Nunc International Corporation) foram sensibilizadas com 100 µl/poço da solução de Ag-Rec CRA na concentração de 1 µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 e incubadas “overnight” a 4°C. As placas foram lavadas com uma solução de PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-Tw) e incubadas com uma solução de leite desnatado (5% em PBS-Tw) por 2h a 37°C. Após lavagens com PBS-Tw, 100 µl de soro dos camundongos diluído 1:100 em PBS-Tw foram adicionados em duplicata e as placas incubadas por 2h a temperatura ambiente (TA). Os poços foram lavados com PBS-Tw e os anticorpos conjugados a peroxidase (Caltag, Burlingame, CA) foram adicionados (100 µl): αIgG1 (1:1500), αIgG3 (1:1500), αIgG2a (1:2000), e αIgG2b (1:2000) diluídas em PBS-Tw e incubadas a TA por 1 h e 30 min. Após lavagens os imunocomplexos foram detectados com a utilização de 100 µl da solução reveladora (o-fenilenodiamino, Sigma, St. Louis, MO), 04%, H₂O₂ 0,01% e tampão citrato pH 5,0) durante 30 min. A reação foi bloqueada com 100 µl H₂SO₄ 2,5 N e a leitura foi realizada no espectrofotômetro (BIO-RAD, 2550), a 490 nm.

3.7. Teste de hipersensibilidade cutânea – O teste de hipersensibilidade cutânea foi realizado 10 dias após a última imunização. Ao teste foram submetidos 5 camundongos do G1 e do G2. Na almofada plantar da pata traseira direita foram injetados 25 μ l de PBS contendo 5 μ g do Ag-Rec CRA. A pata esquerda recebeu o mesmo volume de PBS sem o antígeno. A espessura de cada pata foi medida 1 h antes e 6, 12, 24 e 48 h após a injeção com um paquímetro (Mitutoyo-Japan). Os resultados foram reportados como a diferença entre a espessura da pata injetada com o antígeno e a espessura da pata injetada só com PBS, e expressos como a média das espessuras \pm o desvio padrão.

3.8. Obtenção de células esplênicas – Camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os baços removidos em condições estéreis, cortado em pequenos fragmentos e macerados através de uma peneira de malha fina de aço inoxidável. Suspensões celulares foram preparadas em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com glutamina 2 mM-GIBCO, penicilina e estreptomicina-Sigma, St. Louis, MO- (100 U/ml e 100 μ g/ml, respectivamente), 2-mercaptoetanol 2mM (Merck), e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma, St. Louis, MO), denominado meio RPMI completo. Uma alíquota de 50 de cada suspensão foi removida, adicionada

a um mesmo volume de Azul de Trypan (Merck) 0.1% em PBS e colocada em câmara de Neubauer para quantificação das células e verificação da viabilidade .

3.9. Ensaio de proliferação celular – Suspensões de células esplênicas de 5 animais de cada grupo (G1 e G2) foram obtidas como descrito no item 3.7. 100µl das suspensões contendo $4,5 \times 10^5$ células foram depositadas em cada poço de microplacas de 96 poços de fundo plano (NUNC, Dinamarca) já contendo 100µl da Ag-Rec CRA com concentrações finais de 0,25, 0,625, 1,25 e 2,5 µg/ml. Concanavalina A - Con A (Tipo IV, Sigma, St. Louis, MO) foi usada como controle positivo da proliferação a uma concentração final de 2,5 µg/ml. Suspensão celular cultivada apenas em meio RPMI 1640 completo, sem nenhum estímulo, foi usada como controle negativo da proliferação. Cada determinação foi realizada em triplicata e as culturas incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 h quando foi adicionado aos poços 1 µCi de timidina (³H) (Amersham, U.K.) e incubadas por mais por 16 horas. Ao final do período de incubação as células foram coletadas em papel de fibra de vidro (Whatman 934.AH, Whatman INC., Clifton, NJ-USA) com o auxílio de um coletor automático de células. O papel contendo as células radioativas

foi submetido a secagem em estufa e colocados em frascos de cintilação contendo 3.5 mL da solução de cintilação. A radioatividade incorporada foi determinada em um cintilador de emissão beta (LKB, Sweden). Os ensaios foram realizados em triplicata e o índice de estimulação foi calculado pela divisão da média aritmética da contagem por minuto (c.p.m.) obtida das culturas estimuladas, pela média aritmética da c.p.m. obtida das culturas controles, sem estimulação.

3.10. Determinação de citocinas intracitoplasmáticas – Células esplênicas de três camundongos (pool) de cada grupo foram obtidas, conforme descrito no item 3.7, 20 dias após a última imunização. Após a contagem na câmara de Neubauer, 5×10^6 células foram depositadas em tubos de cultura e estimuladas com duas concentrações (0,625 e $2\mu\text{g/ml}$) da Ag-Rec CRA diluída em meio RPMI completo. Nos tubos do controle positivo foram adicionados $50\mu\text{l}$ de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate - $10\mu\text{g/ml}$) e $2\mu\text{l}$ de IONO (Ionomicina - 1ng/ml). Os tubos foram levados à estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 por 6 horas quando $20\mu\text{l}$ de BFA (Brefeldina - $10\mu\text{g/ml}$) foram adicionados, permanecendo os tubos na estufa por mais 4h. Em seguida as células foram transferidas para tubos

Falcons de 15 ml, e 220 μ l de EDTA 20 mM (1:10 em PBS estéril) foram adicionados para bloquear a produção de citocinas pelas células. Após 15 min os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente (T.A.), 330 x g por 10 min, e o sobrenadante removido cuidadosamente. As células foram ressuspendidas seguindo-se a adição de 3 ml de PBS Wash (PBS + Albumina) e de 8 ml de PBS P (PBS Wash + Saponina), homogeneizando por inversão. Em placas de cultura de fundo em “U” de 96 poços, foram adicionadas 5×10^5 células/poço com os anticorpos monoclonais (AcM) anti- $\text{INF-}\gamma$, anti-TNF- α , anti- CD4^+ e anti- CD8^+ por 45 min. a T.A. Dupla marcação foi realizada apenas com as seguintes combinações CD4^+ - $\text{INF-}\gamma$ e CD8^+ -TNF- α . Os AcM foram todos adquiridos da Caltag Burlingame, CA-USA, e conjugados a Ficoeriteina (PE), com máxima excitação em 495, 564 nm, e máxima emissão em 576 nm, ou ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), com máxima excitação em 495nm e máxima emissão em 520 nm. Após incubação, os poços foram lavados com 150 μ l de PBS P e a placa submetida à centrifugação (T.A. 330 x g por 10 min.). Em seguida o sobrenadante foi descartado e 200 μ l de Macs Facs Fix (MFF) foram aplicados aos poços. A placa foi colocada em ambiente escuro a 4°C. O

conteúdo de cada poço foi transferido para tubos do FACS, quando mais 200 µl de MFF foram adicionados.

3.11. Análise por Citometria de Fluxo – Para análise das subpopulações de linfócitos T, (CD4⁺ e CD8⁺) e citocinas intracitoplasmáticas, foi utilizado um FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA-USA, que analisa em meio líquido, propriedades físicas e biológicas das células. O FACScan era equipado com lâmpada de Argônio-Laser 488nm, que permitia a avaliação de 4 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e fluorescência do tipo I (FL1) e Florescência do tipo 2 (FL2). Os sinais luminosos (FL1 e FL2) correspondiam a excitação do FITC e PE. A luz emitida teve sua intensidade quantificada através de fotomultiplicadores, que avaliou a dispersão, após atingir cada célula separadamente assim como seu volume e granulosidade. Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada tubo.

A identificação das populações celulares de interesse, bem como a produção de citocinas, foi realizada através de um sistema de computação e o software Cell Quest interligado ao citometro

3.12. Análise estatística - Para a análise da resposta específica de IgG e do teste de hipersensibilidade cutânea, os grupos foram comparados usando o teste de Mann-Whitney. Para a análise da resposta linfoproliferativa foi aplicado o teste de Wilcoxon. Diferenças na expressão de marcadores dos linfócitos e na expressão das citocinas intracitoplasmáticas foram avaliadas pelo teste X^2 .

4. Resultados

4.1. Perfil eletroforético do Ag-Rec CRA

O procedimento para purificação do Ag-Rec CRA se mostrou eficaz. Nenhum contaminante foi evidenciado no gel corado pela prata (Figura 1).

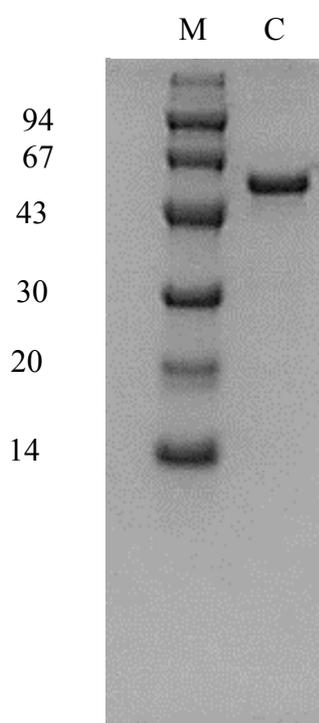


Figura 1- Eletroforese em gel de poliacrilamida do Ag-Rec CRA de *T. cruzi* purificados no Laboratório de Reativos de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). M=peso molecular em kDa (94=fosforilase b; 67=BSA; 43=ovalbumina; 30=anidrase carbônica; 20=inibidor triptico de soja; 14=alfa-lactoalbumina). Em cada poço foram depositados 2 μ g do Ag-Rec CRA (C). O gel foi corado pela prata segundo MORISSEY (1981).

4.2. Perfil isotípico das imunoglobulinas G

A cinética do perfil isotípico das imunoglobulinas G expresso pelo soro de Camundongos imunizados com o Ag-Rec-CRA mostrou uma predominância dos isotipos IgG2a e IgG3 (Figura 2).

Quatorze dias após a 1^a imunização observou-se um aumento significativo nos níveis de IgG3 ($p < 0,05$) em relação aos outros isotipos (IgG1, IgG2a, e IgG2b) dos animais imunizados com CRA ou com o Adjuvante (controle). Quatorze dias após a 2^a imunização detectou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de IgG2a em relação aos demais isotipos, tanto nos camundongos imunizados com CRA como nos controles. Os níveis de IgG3 permaneceram semelhantes ao observado na 1^a imunização. A avaliação realizada 14 dias após a 3^a imunização evidenciou uma elevação significativa ($p < 0,05$) dos níveis de IgG3 em relação àqueles observados nas imunizações anteriores. Por outro lado, os níveis de IgG2a mostraram uma leve diminuição (não significativa) permanecendo quase nos mesmos níveis da imunização anterior. Os níveis de IgG1, desde a primeira imunização mostrou-se elevado apenas em relação ao seu controle e, nenhuma alteração foi detectada durante o período de imunização. Já os níveis de IgG2b foi semelhante ao seu controle durante todo período de imunização (Fig. 2).

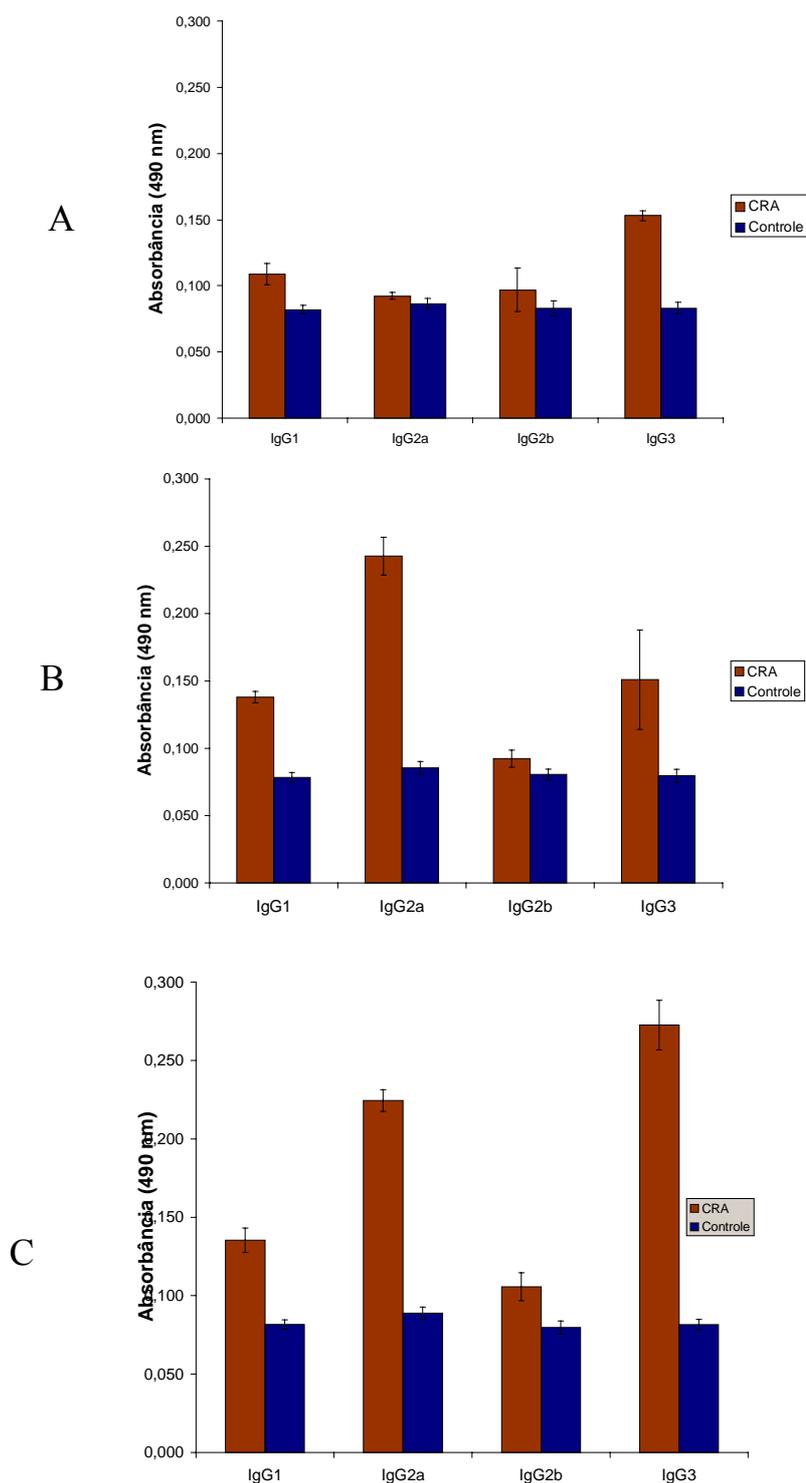


Figura 2 – Cinética do perfil isotípico das imunoglobulinas G expresso pelo soro de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de *T. cruzi* através do ELISA. A: 14 dias após a primeira imunização; B: 14 dias após a segunda imunização e C: 14 dias após a terceira imunização. Os resultados são expressos como a média de 5 camundongos \pm o desvio padrão.

4.3. Caracterização da reação de hipersensibilidade cutânea

Os camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA mostraram uma reação de hipersensibilidade tipo imediata (Figura 3), alcançando um pico máximo 2 h ($p < 0,05$) após o desafio e diminuindo lentamente em 48 h (Figura 4).

4.4. Resposta proliferativa dos linfócitos

O estudo revelou que não ocorreu variação significativa da resposta proliferativa das células esplênicas dos animais imunizados ao Ag-Rec CRA, em nenhuma das concentrações usadas (0,25 μ g/ml, 0,625 μ g/ml, 1,25 μ g/ml e 2,25 μ g/ml), em comparação ao grupo controle não imunizado (Figura 5).

4.5. Avaliação das citocinas intracitoplasmáticas

A determinação de clones de linfócitos envolvidos na resposta proliferativa secretando citocinas foi analisada através da abordagem da citometria de fluxo. A percentagem de linfócitos T CD4⁺ secretando IFN- γ (Figura 6 e 7) foi maior quando comparada ao controle ($p < 0,05$) principalmente na concentração de 2 μ g/ml de CRA (Figura 5). A análise da presença de células T CD8⁺ secretando TNF- α também mostrou-se superior nesta mesma concentração de antígeno quando comparada ao controle ($p < 0,05$) (Figura 8 e 9).



Figura 3 – Teste de hipersensibilidade cutânea. Aspecto da pata esquerda do camundongo após estímulo com o Ag-Rec CRA de *T. cruzi*

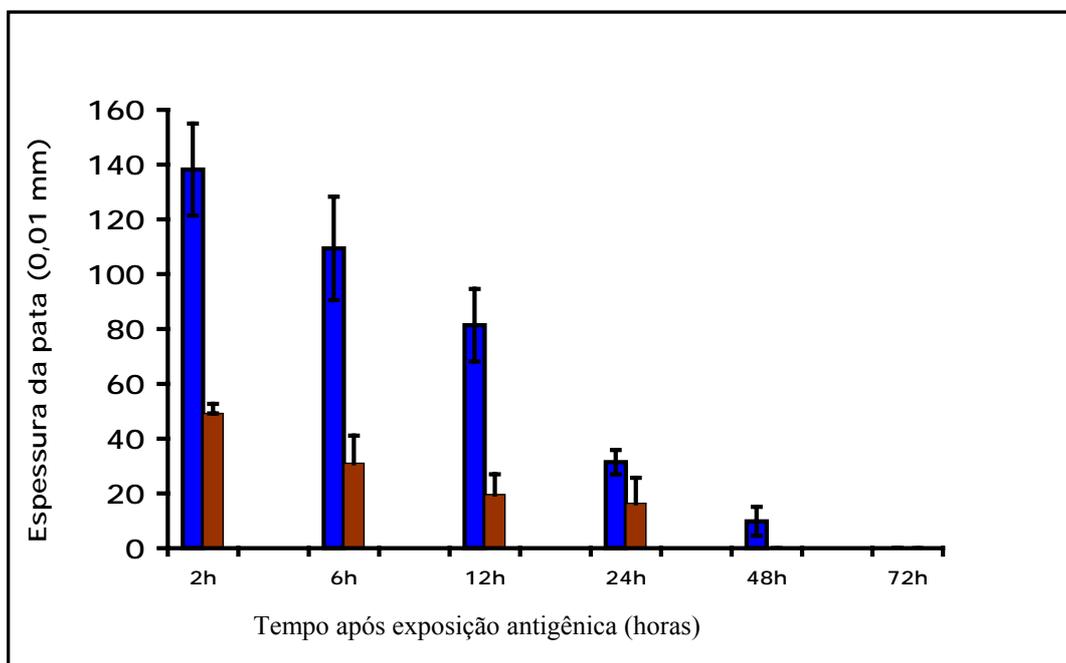


Figura 4 - Resposta ao teste de hipersensibilidade cutânea. Os resultados representam o valor da média obtida da espessura da pata de cinco camundongos \pm o desvio padrão.

■ animais imunizados com CRA, ■ animais que receberam adjuvante de Freund (controle).

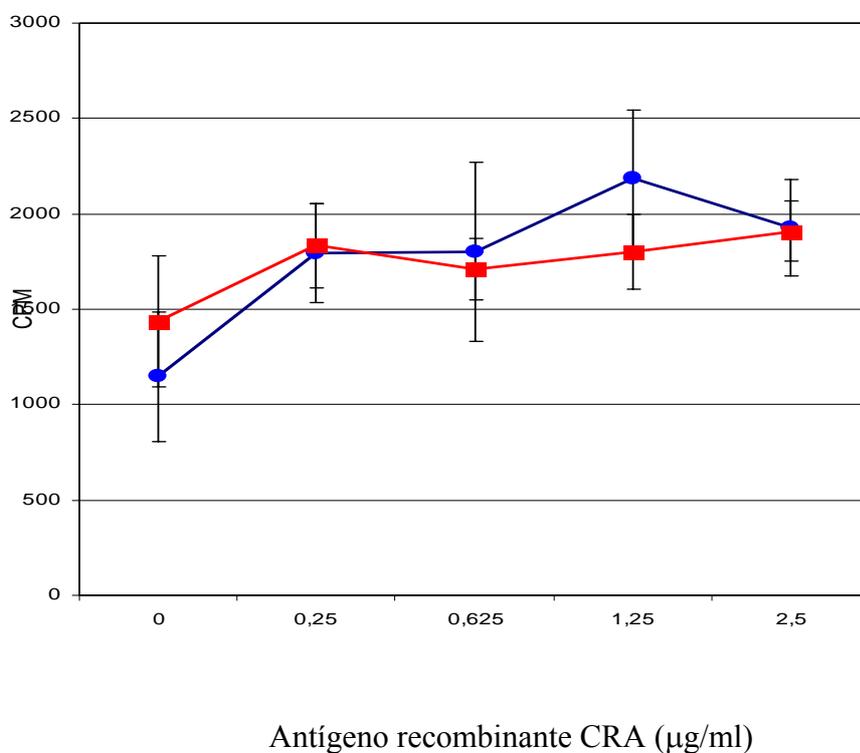


Figura 5 – Resposta proliferativa associada aos linfócitos T das células esplênicas de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de *T cruzi*. Células esplênicas obtidas de camundongos imunizados (●) e de camundongos controle (■) foram estimuladas com diferentes concentrações do Ag-Rec CRA. Cada ponto representa a média aritmética da contagem por minuto (cpm) obtida das culturas estimuladas e sem estimulação \pm o desvio padrão. Como controle positivo da reação células foram estimuladas com Con-A (2,5 $\mu\text{g/ml}$) (dados não mostrados).

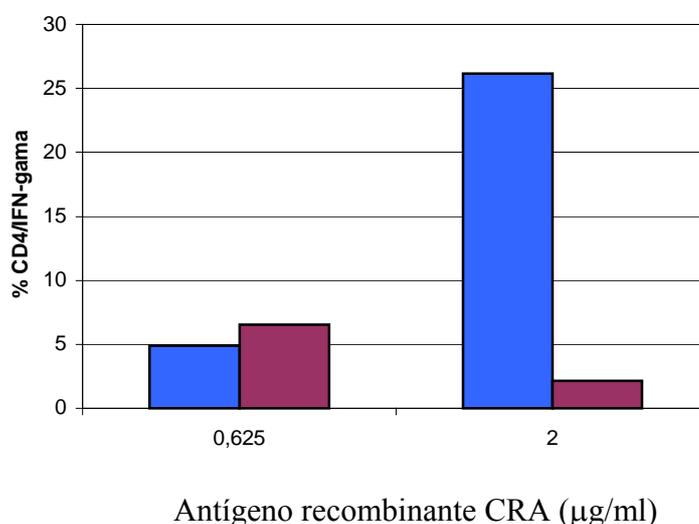


Figura 6 – Percentagem de linfócitos T CD4+ das células esplênicas de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de *T. cruzi*, secretando IFN- γ . Células esplênicas obtidas de camundongos imunizados (■) e de camundongos controle (■) foram estimuladas com diferentes concentrações do Ag-Rec CRA. Como controle positivo da reação, as células foram estimuladas PMA (1mg/ml) (dados não mostrados).

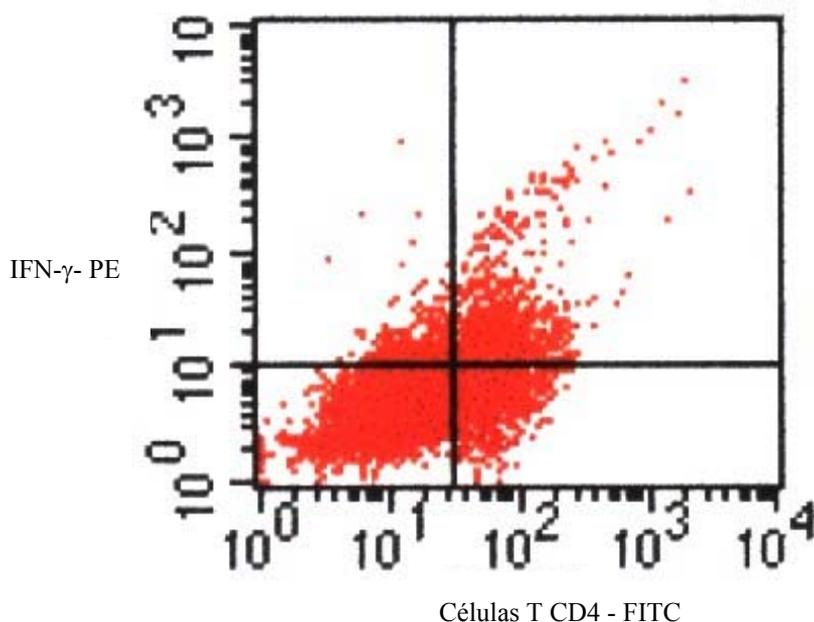


Figura 7 - Expressão de linfócitos T CD4 em células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com o Ag-Rec CRA, secretando IFN- γ . Resultados obtidos de um “pool” de 3 baços.

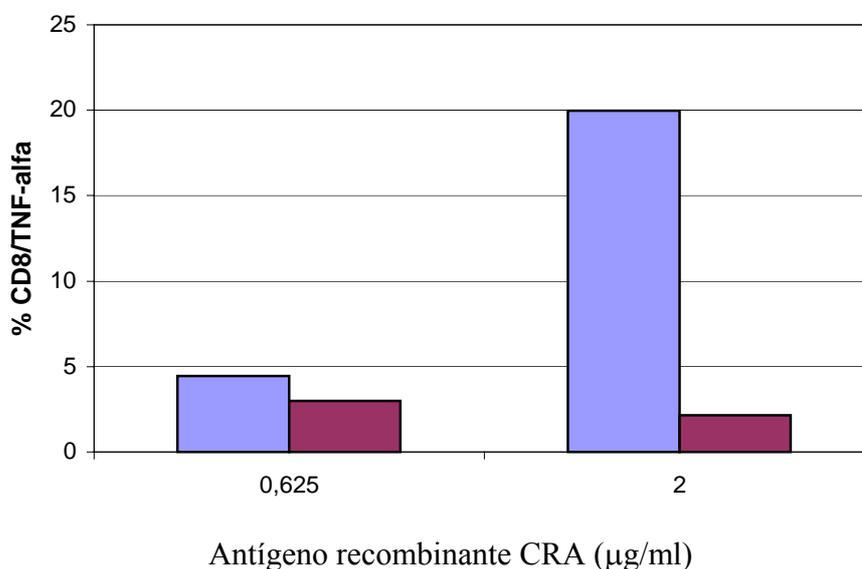


Figura 8 – Percentagem de linfócitos T CD8+ das células esplênicas de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de *T cruzi*, secretando TNF- α . Células esplênicas obtidas de camundongos imunizados (■) e de camundongos controle(■) foram estimuladas com diferentes concentrações do Ag-Rec CRA. Como controle positivo da reação, células foram estimuladas PMA (1mg/ml) (dados não mostrados).

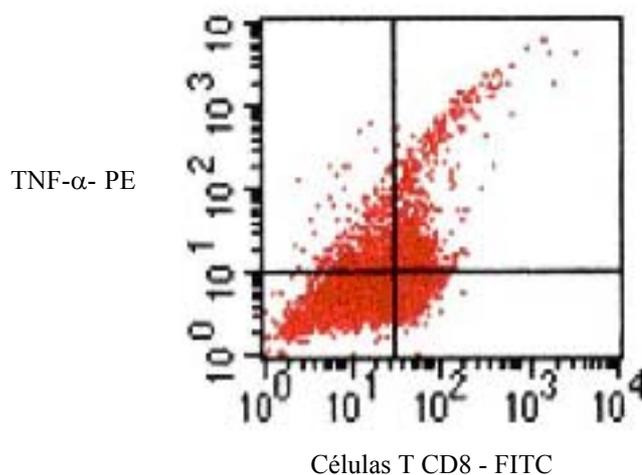


Figura 9 - Expressão de linfócitos T CD8 em células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com o antígeno CRA, secretando TNF- α . Resultados obtidos de um “pool” de 3 baços.

5. Discussão

O presente trabalho avaliou as características da resposta imune, humoral e celular, em camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de *T. cruzi*, visando sua posterior utilização em ensaios de vacinação. Os camundongos imunizados apresentaram elevados níveis de IgG2a e IgG3, hipersensibilidade cutânea do tipo imediato, elevada percentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ secretando IFN- γ e TNF- α , respectivamente. No entanto, o Ag-Rec CRA não induziu a proliferação, *in vitro*, dos linfócitos esplênicos.

A doença de Chagas aguda, causada experimentalmente em modelo murino, é caracterizada por uma ativação policlonal de linfócitos B com produção aumentada de imunoglobulinas, dependentes de linfócitos T CD4 auxiliares (MINOPRIO et al., 1986). Esta hiperprodução envolve todos os isotipos, estando IgG1, IgG2a e IgG2b envolvidos na eliminação de formas sangüíneas do parasita (BRODSKYN et al., 1989). Segundo TORRICO et al. (1991) a predominância de IgG2a sobre os outros isotipos pode estar relacionada com uma síntese preferencial de IgG2a, estimulada pela produção endógena de IFN- γ . Essas observações realizadas em camundongos infectados experimentalmente mostram a participação da resposta imune

humoral na eliminação do parasita no sangue. A produção de IgG2a e IgG3 nos animais imunizados com o Ag-Rec sugere que esses isotipos possam atuar no controle da parasitemia numa posterior infecção.

A reação de hipersensibilidade imediata é o resultado do reconhecimento do antígeno, interação macrófago-linfócito, liberação de citocinas e troca na permeabilidade vascular (STITES, 1994). Uma forte reação de hipersensibilidade imediata foi observada nos camundongos imunizados e desafiados com o Ag-Rec CRA. Essa resposta manifestou-se nas seis primeiras horas e manteve-se em níveis menores nas 42 h restantes. Estudos histológicos são necessários para esclarecimento dessa reação.

A habilidade dos linfócitos T de camundongos imunizados com o Ag-Rec CRA de reconhecer e responder a estímulos “in vitro” foi determinada através da quantificação da timidina incorporada no material genético celular. A análise da proliferação das células esplênicas mostra que este antígeno em diferentes concentrações não induziu respostas de células de memória, quando comparado ao controle. Estes resultados podem estar relacionados com o fato do Ag-Rec CRA ter sensibilizado poucos clones de linfócitos nos camundongos imunizados. A literatura mostra que enquanto mitógenos estimulam grande número de linfócitos, antígenos estimulam poucas células que são sensibilizadas com o antígeno em questão (STITES, 1994). Uma

outra explicação para os resultados obtidos poderá estar relacionada com a cinética da resposta tempo de cultura X dose do estímulo. Para confirmar essa hipótese, uma curva dose-resposta associada ao tempo de cultura, deverá ser realizada.

A percentagem de linfócitos T CD4 secretando IFN- γ e de T CD8 secretando TNF- α nos camundongos imunizados com Ag-Rec CRA, foi bastante elevada em relação ao controle, quando as células foram estimuladas com o referido antígeno na concentração de 2 $\mu\text{g/ml}$. Estes resultados mostram que o Ag-Rec CRA foi capaz de sensibilizar clones de linfócitos, que ativados, induziram a produção de citocinas.

As células T CD4, como também as T CD8 têm um papel protetor por participarem no controle da parasitemia e mortalidade durante o curso natural da infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1995). Vários estudos têm mostrado que esta resistência contra a infecção pelo *T. cruzi* está relacionada com a resposta imune celular contra o parasita, principalmente de uma população viável de linfócitos T CD4 (ARAÚJO, 1989). Além disso, populações de linfócitos T CD8 capazes de lisar células infectadas por parasitas também contribuem a favor desta resistência contra a infecção (NICKELL et al., 1993).

O papel da TNF- α secretada na resposta inata do hospedeiro pode levar a efeitos tanto deletérios como protetores. Durante a infecção por *T. cruzi*, camundongos susceptíveis apresentam altos níveis desta citocina quando comparados a animais de linhagens resistentes (RUSSO et al., 1989). Por outro lado, animais deficientes de TNF- α apresentam alta parasitemia e mortalidade quando infectados pelo parasita (SANTOS LIMA, 1997). Da mesma forma que o TNF- α , a citocina IFN- γ tem sido identificada como um fator de resistência na infecção chagásica por apresentar uma função no controle da parasitemia em camundongos infectados com *T. cruzi* (MINOPRIO et al., 1986, REED, 1988; TORRICO et al., 1991).

O fato do Ag-Rec CRA induzir a produção de citocinas TNF- α e IFN- γ nos animais imunizados leva-nos a supor que este Ag-Rec poderá exercer um papel protetor em camundongos infectados com *T. cruzi*. Uma avaliação desses mecanismos em animais imunizados e desafiados com o parasita se faz necessário.

6. Conclusão

1. O antígeno recombinante CRA induziu em camundongos BALB/c, a produção de anticorpos IgG2a e IgG3 indicando que esse antígeno induz mecanismos imunológicos dependentes de fagocitose e citotoxicidade.
2. A resposta celular observada na reação de hipersensibilidade cutânea manifestou-se nas seis primeiras horas e manteve-se em níveis menores nas 42 h restantes, indicando que estes antígenos induzem reação de hipersensibilidade tipo imediato.
3. A imunização de camundongos BALB/c com CRA levou a produção de IFN- γ , direcionando a resposta celular para o Tipo Th1 o que sugere um possível efeito imunoprotetor na infecção chagásica.
4. A imunização com o Ag-Rec CRA ativa mecanismos imunes celulares e humorais envolvidos na eliminação do parasita e, portanto na resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

7. Referencias bibliográficas

- ABRAHAMSOHN IA, COFFMAN RL. *Trypanosoma cruzi* : IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.** 84:231-244, 1996.
- AFFRANCHINO JL, IBANEZ CF, LUQUETTI AO, RASSI A, RYES MB, MACINA RA, ASLUND L, PETERSON U, FRASCH ACC. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas`disease. **Mol. Biochem. Parasitol.** 34: 221-228, 1989.
- ALVES MJM, ABUIN G, KUWAJIMA VY, COLLI WALTER. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Mol.Biochem.Parasitol.** 21: 75-82, 1986.
- ANDRADE SG, MAGALHÃES JB, PONTES AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull WHO.** 63: 721-726, 1985.
- ANDRADE ZA. Immunopathology of chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 (I): 71-80, 1999.
- ANDREWS NW, ALVES MJM, SCHUMACHER RI, COLLI W. *Trypanosoma cruzi*: protection in mice immunized with 8-methoxy-psoralen inactivated trypomastigotes. **Exp. Parasit.** 60: 255-262, 1985.
- ARAÚJO, FG. Development of resistance to *Trypanosoma Cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) lymphocytes. **Infect. Immun.** 57: 2246-2248, 1989.
- BAHIA-OLIVEIRA LMG, GOMES JAS, ROCHA MOC, MOREIRA MCV, LEMOS EM, LUZ ZMP, PEREIRA MÊS, COFFMAN RL, DIAS JCP, CANÇADO JR, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. IFN- γ in human Chagas` disease: protection or pathology? **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31:127-135, 1998.
- BASOMBRÍO MA, BESUSCHIO S, COSSIO M. Side effects of immunization with live attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. **Infect. Immun.** 36: 342-350, 1982.

- BASOMBRÍO MA. *Trypanosoma cruzi*: Partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. **Exp. Parasitol.** 71: 1-8, 1990.
- BÚA J, BONTEMPI E, LEVIN M, ORN A, VELASCO D, MORENO M, LEVI-YEYATI, ENGSTROM A, SEGURA EL, RUIZ A. *Trypanosoma cruzi*: cellular and antibody response against the parasite in mice immunized with a 19 aminoacid synthetic peptide. **Exp. Parasitol.** 72:54-62, 1991.
- BUCHOVSKY AS, CAMPETELLA O, RUSSOMANDO G, FRANCO G, ODDONE R, CANDIA N, LUQUETTI A, GONZALES CAPPA SM, LEGUIZAMON MS. Trans-Sialidase inhibition assay, a highly sensitive and specific diagnostic test for Chagas` Disease. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** 8 :187-189, 2001.
- CANÇADO JR. 1985. Tratamento específico. In: Chuster M. Cardiopatia Chagásica, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas.
- CHOROMANSKI L, KUHN RE. Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.** 55: 403-408, 1999.
- CORREA-OLIVEIRA R, GOMES JAS, LEMOS EM, CARDOSO GM, REIS DB, ADAD S, GREMA E, MARTINS-FILHO O, ROCHA MOC, GAZZINELLI G, BAHIA-OLIVEIRA MG. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94(Suppl. I):253-255, 1999.
- COSTA F, FRANCHIN G, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, RIBEIRÃO M, SCHENKMAN S, RODRIGUES MM. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine** 16(8): 768-774, 1998.
- CUNHA-NETO E, RIZZO LV, ALBUQUERQUE F, ABEL L, GUILHERME L, BOCCHI E, BACAL CARRARA D, IANNI B, MADY C, KALIL J. Cytokine production profile of heart -infiltrating T cells in Chagas disease cardiomiopathy. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31:133-141, 1998.
- DE ANDRADE AL, ZICKER F, DE OLIVEIRA RM, ALMEIDA SILVA S, LUQUETTI A, TRAVASSOS LR. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet** 348: 1407-1413, 1996.

- DUTRA WO, GOLLOB KJ, PINTO DIAS JC, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R, COFFMAN RL, CARVALHO-PARRA JF. **Scand. J. Immunol.** 45: 74-80, 1997.
- GALVÃO DA SILVA AP; ABRAHAMSHON I. 2001. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 104(3): 349-354.
- GAZZINELLI RT, OSWALD LP, HIENY S, JAMES SL, SHER A. The microbicidal activity of interferon-gama – treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involve na L-arginine-dependent, nitrogen oxide – mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.** 22: 2501-2506, 1992.
- GAZZINELLI RT, WYSOCKA M, HIENY S, SCHARTON-KERSTEN T, CHEEVER A, KÜHN, MÜLLER W, TRINCHIERI G, SHER A.. In the absence of endogeneous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response ependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **J. Immunol.** 157: 798-805, 1996.
- GOLDENBERG S, KRIEGER MA, LAFAILLE JJ, ALMEIDA E, OELEMANN W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas`disease. **Mem. Inst. Butantan** 53: 71-76, 1991.
- GOMES YM, ABATH FGC, FURTADO AF, MONTENEGRO LT, VOULDOUKIS I, ALFRED-MORIN C, MONJOUR L. A monoclonal antibody against blood forms of *Trypanosoma cruzi* lyses the parasite in vitro and inhibits host cell invasion. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 50: 57-69, 1995.
- GOMES YM, NAKAZAWA MN, ABATH FGC, MINOPRIO P, VOULDOUKIS I, MONJOUR L. Partial protection of mice against *Trypanosoma cruzi* after immunization with TcY antigenic preparation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94:167-172, 1999.
- GOMES YM, PEREIRA VR, NAKAZAWA M, ROSA DS, BARROS MD, FERREIRA AG, SILVA ED, OGATTA SF, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 96: 497-501, 2001.
- GONZALEZ J, ARAGUTH MF, YOSHIDA N. Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with a

- 90-kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. **Infec. Immun.** 863-867, 1991.
- GRUPPI A, PISTORES-PALENCIA MC, ORDOÑEZ P, CERBÁN F, VOTTERO-CIMA E. Enhancement of natural antibodies in mice immunized with exoantigens of pI 4.5 from *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.** 42:151-159, 1994.
- GUHL F, JURAMILLO C, VALLEJO GA et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in a 4000 years-old mummified human from northern Chile. **Am. J. Phys. Anthropol.** 108:404-407, 1999.
- IBAÑEZ CF, AFFRANCHINO JL, MACINA RA, REYES MB, LEGUIZAMON S, CAMARGO ME, ASLUND L, PETERSSON U, FRASCH ACC. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. **Mol. Biochem. Parasitol.** 30: 27-34, 1988.
- KRETTLI AU, BRENER Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.** 128: 2009-2012, 1982.
- KRIEGER MA, SALLES JM, ALMEIDA E, LINSS J, BONALDO MC, GOLDENBERG S. Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. **Exp. Parasitol.** 70: 247-254, 1990.
- KRIGGER MA, ALMEIDA E, OELEMANN W, LAFAILLE JJ, PEREIRA JB, KRIEGER MA, CARVALHO MR, GOLDENBERG S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 46: 427-434, 1992.
- KUMMAR S, TARLETON RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol.** 166: 4596-4563, 2001.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- LAFAILLE JJ, LINSS J, KRIEGER MA, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W, GOLDENBERG S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 35: 127-136, 1989.

- MCHARDY N, ELPHICK, JP. Immunization of mice against infection with *Trypanosoma cruzi*. Cross-immunization between five strains of the parasite using freeze-thawed vaccines containing epimastigotes of up to five strains. **Int. J. Parasit** 8: 25-31, 1978.
- MENEZES H. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. **Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo** 10: 1-4, 1968.
- MILLAR AE, KAHN. *Trypanosoma cruzi*: the effect of nitric oxide synthesis inhibition on the CD4 T cell response to the trans-sialidase superfamily. *Exp. Parasit.* 94: 84-91, 2000.
- MILLAR AE, WLEKLINSKI-LEE M, KAHN SJ. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized TH1 response that becomes anergic. **J. Immunol.** 162: 6092-6099, 1999.
- MINOPRIO P, BURLIN O, PEREIRA P, GUILBERT B, ANDRADE L, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, COUTINHO A. Most B Cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. **Scand. J. Immunol.** 28: 553-561, 1988.
- MINOPRIO P, EISEN H, FORNIL L, D'IMPERIO-LIMA MR, JOSKOWICZ M, COUTINHO A. Polyclonal Lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantification of both T and B cells responses. **Scand. J. Immunol.** 24: 661, 1986.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C, TONEGAWA S, COUTINHO A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite non-specific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol Rev** 112: 183-207, 1989.
- MULLER U, KOHLER G, MOSSMANN H, SCHAUB GA, ALBERT G, DI SANTOS JP, BROMBACHER F, HOLSCHEER C. IL-12independent IFN-gamma production by T cells in Experimental Chagas Disease Chagas disease is mediated by IL-18. **J. Immunol.** 67(6): 3346-3353, 2001.
- NASSER JR, GÓMEZ LE, SÁNCHEZ D, GUERIN M, BASOMBRIO MA. Immunogenicity of the recombinant sapa protein of *Trypanosoma cruzi* for mice. **J. Parasitol** 83 (1): 76-81, 1997.
- NICKELL SP, STRYKER GA, AREVALO C. Isolation from *Trypanosoma cruzi* -infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.** 150: 1446-1455, 1993.

- PAIVA CN, CASTELO-BARANCO MT, LANNES-VIEIRA J, GATTASS CR. *Trypanosoma cruzi*: protective response of vaccinated mice is mediated by CD8+ cells, prevents signs of polyclonal T lymphocytes activation, and allows restoration of a resting immune state after challenge. **Exp. Parasitol.** 91:7-9, 1999.
- PEREIRA-CHIOCCOLA VL, COSTA F, RIBEIRÃO M, SOARES IS, ARENA F, SCHENKMAN S, RODRIGUES MM. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. **Parasite Immunol.** 21: 103-110, 1999.
- PETERSON DS, WRIGHTSMAN RA, MANNING JE. Cloning of a major surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. **Nature** 322: 566-568, 1986.
- PRATA A.. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet** 1(2): 92-100, 2001.
- REED, SG. In vivo administration of recombinant IFN γ induces macrophage activation and prevents acute disease, immunosuppression and death in experimental *T. cruzi* infection. **J. Immunol.** 140: 4342-4347, 1988.
- REIS DD, JONES EM, TOSTES S, GAZINELLI G, COLLEY DG, MCCURLEY T. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD*+ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 49:192-199, 1993.
- RODRIGUES MM, RIBEIRÃO M, PEREIRA-CHIOCCOLA V, RENIA L, COSTA F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect. Immun.** 67: 3855-3863, 1999.
- RUSSO M, STAROBINAS N, RIBEIRO DOS SANTOS R, MINOPRIO P, EISEN H, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. Suscetible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 11: 385-395, 1989.
- RUSSO M, STAROBINAS N. 1991. Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection.

- SANTORI, F. R.; PARANHOS-BACALLA, G. S.; SILVEIRA, J. F.; YAMAUCHI, L. M.; ARAYA, J. E. ANDYOSHIDA, N. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic Trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. **Infect. Immun.** 64: 1093-1099, 1996.
- SANTOS LIMA EC, GARCIA I, VICENTELLI MH, VASSALLI P, MINOPRIO P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immunol.** 65: 457-465, 1997.
- SEGURA EL, VAZQUES G, BRONZINA A, CAMPOS JM, CERIZOLA JA, GONZALEZ-CAPPA SM. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*: II. Flagellar and membrane fraction. **J. Protozool.** 24: 540-543, 1977.
- SILVA ED, PEREIRA VRA, GOMES JAS, NAKAZAWA M, LORENA VMB, CANÇADO JR, FERREIRA AGP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, CORREA-OLIVEIRA R & GOMES YM. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to Monitor Cure of Human Chagas' Disease. *J Clin Lab Anal* 16:132-136, 2002.
- SNARY D. Cell surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 77: 126-129, 1983.
- STITES, D. Basic & Clinical Immunology. In: _____. *Clinical Laboratory Methods for Detection of Cellular Immunity*, 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Prentice Hall do Brasil Ltd., 1994. cap.13, p. 195-215.
- TARLETON RL. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 130-133, 1991.
- TARLETON. R.L. 1995 The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol. Today.* 11: 7-12.
- TORRICO F., HEREMANS H., RIVERA M., VAN MARCK E., BILLIAU A. & CARLIER Y. 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 146: 3626-3632
- UMEZAWA ES, BASTOS S, CAMARGO ME, YAMAUCHI LM, SANTOS MR, GONZALEZ A, ZINGALES B, LEVIN MJ, SOUSA O, RANGEL-ALDAO, DA SILVEIRA JF. Evaluation of recombinant antigens for

- serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **J. Clin. Microbiol.** 37:1554-1560, 1999.
- UMEZAWA ES, STOLF AMS, CORBETT CEP, SHIKANAI-YASUDA MA. Chagas' Disease. *Lancet.* 357(9258): 797-799, 2000.
- VIOTTI R, VIGLIANO C, ARMENTI H, SEGURA E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up **Am. Heart J** 127:151-162, 1994.
- WHO 1996. Control of Tropical disease. Chagas' disease. A disease whose days are numbered. 16 p., 1996.
- WHO. Chagas disease: multi-governmental strategies. (www.who.int.tdr.research.progress9900/partnership/chagas.html) [capturado em 22/07/2002].
- WIZEL B, GARG N, TARLETON RL. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 66: 5073-5081, 1998.
- WRIGHTSMAN RA, MILLER MJ, SABORIO JL, MANNING JE. Pure paraflagellar rod protein protect mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** 63: 122-125, 1995.
- YOSHIDA N. *Trypanosoma cruzi*: recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistance to acute infection. **Exp. Parasitol.** 61: 184-191, 1986.

Anexos