

KARLA VELOSO GONÇALVES RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO E PROTETOR DE
DUAS ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA DOENÇA DE
CHAGAS: DNA CODIFICANDO NTPDASE-1 E NTPDASE-1
RECOMBINANTE EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R484a
2018
Ribeiro, Karla Veloso Gonçalves, 1982-
Avaliação do potencial imunogênico e protetor de duas
estratégias vacinais contra doença de Chagas : DNA codificando
NTPDase-1 e NTPDase-1 recombinante em fêmeas de
camundongos Balb/c / Karla Veloso Gonçalves Ribeiro. –
Viçosa, MG, 2018.

xi, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-47.

1. Imunologia. 2. Chagas, Doença de - Vacina. 3.
Trypanosoma cruzi. 4. DNA recombinante. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

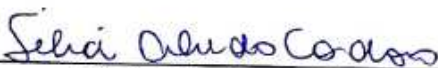
CDD 22. ed. 616.079

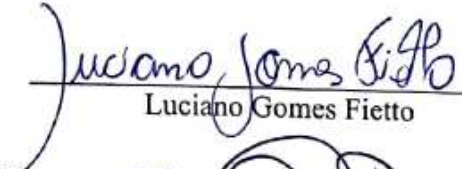
KARLA VELOSO GONÇALVES RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO E PROTETOR DE
DUAS ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA DOENÇA DE
CHAGAS: DNA CODIFICANDO NTPDASE-1 E NTPDASE-1
RECOMBINANTE EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de novembro de 2018.


Silvia Almeida Cardoso
(Coorientadora)


Luciano Gomes Fietto


Michelle Dias de Oliveira Teixeira


Gustavo Costa Bressan


Leandro Licursi de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Qualquer forma de agradecimento não será o bastante para o imenso apoio que recebi nestes quase quatro anos.

A todas as formas de energias positivas e crenças por me concederem coragem, confiança, resistência e fé. Por não ter me faltado amigos, esperança e alegrias. Por terem minimizado angústias, medos e ansiedades.

A minha filha Ana Júlia por ser minha luz e força para tentar fazer o melhor e superar meus limites, corrigir os erros e seguir em frente... Obrigada por ser tão igual e tão diferente de mim.

Ao meu parceiro há mais de quinze anos Cleberson que tem sido meu companheiro e amigo e que ainda foi meu professor e colaborador nesta caminhada. Obrigada por sonhar os mesmos sonhos, dividir os fardos do dia a dia e estar comigo na missão de ser feliz hoje, porque o amanhã nem sabemos se existirá... Obrigada por ter sido pai e mãe em momentos que precisei estudar e trabalhar... Essa vitória é tão minha quanto sua!

A minha mãe Dorinha por não ter desistido de estudar em uma fase difícil, com muito trabalho, três filhas pequenas e muita abdicção. Sua trajetória me mostra a importância de ter foco, objetivo e força. É meu exemplo de garra e vitória!

Ao meu pai Lilico que trabalhou literalmente e incansavelmente todos os dias da sua vida... Que não mede esforços pelas filhas... Que sempre mostrou sua admiração. Que respeita o caminho que escolhi seguir e que tem um orgulho enorme das minhas conquistas! É meu exemplo de simplicidade!

As minhas irmãs Kamila e Karine que me permitiram cuidar enquanto crianças e que agora me ajudam na busca de uma convivência cada dia mais respeitosa, sincera e com amor.

Aos sobrinhos mais amados do mundo Gabriel e Iasmim! Obrigada por, juntamente com a Juju, preencherem as nossas vidas com alegria e pureza!

Aos meus tios que mostraram que a dedicação aos estudos te proporciona uma vida jamais imaginada!

A equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise. Carlota, Cristiane, Michele e

Rosângela pelo empenho e distrações nos momentos difíceis. Ao coordenador Prof. José Eduardo Serrão pelo apoio e compreensão. Ao meu querido Gilmar, ao qual obviamente não poderia faltar um agradecimento especial. Obrigada pela confiança e por ser um dos grandes responsáveis pela conclusão desta etapa. Não haverá tempo nesta vida para que eu te agradeça o bastante. Já são oito anos de amizade, nos quais pude contar com seu apoio incondicional. Obrigada pelo incentivo, carinho e compreensão imensuráveis. Sem falar dos lanches deliciosos, com direito a biscoito de polvilho frito, coxinha e coca-cola! Embora a vida tenha seus percalços e dificuldades do dia a dia, eu recebi a bênção de ter você como meu braço direito, para ouvir meus desabafos, me oferecer um conselho franco e “puxar a orelha” como um amigo de verdade deve ser... Obrigada por me proteger e fazer o trabalho duplicado quando estive ausente... Obrigada por me proporcionar paz, segurança e conforto para que eu pudesse estudar e chegar até aqui! Se houverem tantas outras vidas, eu peço a Deus que me permita estar com você de novo meu amigo!

Aos meus orientadores e amigos Leandro e Sílvia que me permitem ensinamentos muito além do laboratório. Obrigada pelo incentivo, apoio imensurável e parceria! Vocês são demais!

Aos membros da banca pelas colaborações no trabalho.

A colega de laboratório Alessandra pela parceria na realização deste projeto.

A querida Beth pela dedicação e carinho com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Aos queridos coorientadores e amigos Janice de Almeida Engler e Gilbert Engler pela confiança e acolhimento durante a temporada no Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica, INRA, França, na qual pude desenvolver um trabalho importante para o Doutorado e também para minha vida profissional. Obrigada pela motivação, incentivo e valiosos ensinamentos.

Ao querido amigo Olivier Pierre, engenheiro de pesquisa da Plataforma de Microscopia, INRA, pelos ensinamentos em ciência, história e cultura. Obrigada por me acolher com carinho e respeito. “I would like to thank my dear friend Olivier Pierre, Research Engineer at Microscopy Platform, INRA, for all the lessons in science, history and culture. Thank you for hosting me with care and respect.”

Aos amigos Danila, Kercya e Joaquin que fiz no INRA e cuja amizade diminuiu a saudade de casa... Especialmente a Danila por ter me ajudado nos preparativos que antecederam a minha ida e durante toda a minha estadia.

Aos amigos-agregados Julien e Andrea.

A querida Renata, uma brasileira linda e forte, que faz história e é amada muito longe da sua terra natal. Minha admiração e carinho sempre! Obrigada pela amizade!

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo apoio, em especial ao Prof. Luciano Gomes Fietto.

A Pró-Reitoria de Gestão de Pessoas, em especial a Martha Pacheco pelo carinho e dedicação com meu processo de capacitação.

A Universidade Federal de Viçosa pelo apoio, especialmente aos diretores do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Prof^a Maria Goreti de Almeida Oliveira e Prof. João Marcos de Araújo.

A CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche no exterior para realização de estágio no INRA, França.

A FAPEMIG e ao CNPq.

Aos demais que fizeram parte dessa caminhada e àqueles que torceram por mim, em especial aos meus amigos Larissa, Gustavo, Janaina e Philipe.

“É melhor tentar e falhar que ocupar-se em ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que nada fazer. Eu prefiro caminhar na chuva a, em dias tristes, me esconder em casa. Prefiro ser feliz, embora louco, a viver em conformidade. Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Doença de Chagas.....	1
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Tratamentos disponíveis e desenvolvimento de vacinas	4
Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases)	7
Infecção e mecanismo de escape de <i>T. cruzi</i>	9
Resposta imune inata e adaptativa	10
Referências.....	16
OBJETIVOS.....	29
Objetivo Geral.....	29
Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO 1.....	30
Abstract.....	30
Introduction.....	30
Material and methods.....	32
Experimental animals	32
Expression and purification of rTcNTPDase-1.....	32
Construction of recombinant DNA vaccine.....	32
Transfection assay	33
Animal immunization and infection protocol.....	33
Evaluation of antibody responses	34
Detection of nitric oxide (NO)	34
Cytokine determination.....	34
Flow cytometry analysis.....	35
Cardiac parasite burden.....	35
Statistical analysis.....	35
Results.....	35
Discussion.....	41
Conclusion	43

Acknowledgments	44
References.....	44

RESUMO

RIBEIRO, Karla Veloso Gonçalves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2018. **Avaliação do potencial imunogênico e protetor de duas estratégias vacinais contra doença de Chagas: DNA codificando NTPDase-1 e NTPDase-1 recombinante em fêmeas de camundongos BALB/c.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientadoras: Sílvia Almeida Cardoso e Eliziária Cardoso dos Santos.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Hospedeiros mamíferos são normalmente infectados através do contato de fezes contaminadas do vetor triatomíneo com feridas na pele, conjuntiva e membranas mucosas oral e nasal. O Benznidazol é o único medicamento para tratamento da doença no Brasil, entretanto apresenta diversos efeitos colaterais e é eficiente apenas na fase aguda. Embora a transmissão vetorial seja o mecanismo predominante, a transmissão oral tornou-se comum no Brasil. Tendo em vista o crescimento do número de casos não vetoriais de transmissão da doença, além do tardio ou ausente diagnóstico e toxicidade do medicamento disponível, é de extrema importância desenvolver uma vacina eficaz e segura para controle da doença. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a resposta imune induzida pela vacina de DNA recombinante codificando NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* (DNA/NTPDase-1) e pela vacina de NTPDase-1 recombinante (rNTPDase-1) em camundongos BALB/c. A imunização com a proteína recombinante induziu produção mais rápida de IgG total específica e níveis mais elevados de IgG1 e IgG2a em comparação a vacina de DNA/NTPDase-1. O perfil de células T revelou frequência similar de CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ entre os grupos proteína, DNA e controle. Houve aumento na frequência de células T ativadas (CD4⁺/CD44⁺ e CD8⁺/CD44⁺) no grupo vacinado com rNTPDase-1 em comparação aos grupos controle e DNA/NTPDase-1. O nível de citocinas Th1 (TNF- α e IFN- γ) não diferiu entre os grupos vacinados, enquanto o nível de citocinas Th2 (IL-6 e IL-10) foi menor nos grupos DNA e proteína recombinante em relação ao controle. O nível de óxido nítrico (NO) aumentou em camundongos imunizados com a proteína recombinante. Após o desafio, observamos que a imunização com DNA/NTPDase-1 reduziu a carga parasitária no tecido cardíaco quando comparada aos grupos controle e rNTPDase-1. Além disso, observamos sobrevivência de 100% nos dois grupos vacinados, enquanto 50% dos animais morreram no grupo controle. Dessa forma, o estímulo para produção

de anticorpos específicos, a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺, a redução na produção de citocinas anti-inflamatórias e o aumento da produção de NO obtidos no esquema vacinal usando proteína rNTPDase-1 e a redução da carga parasitária no tecido cardíaco induzido por DNA/NTPDase-1 demonstram a potencialidade desse antígeno para o desenvolvimento de vacina para o controle da doença de Chagas.

ABSTRACT

RIBEIRO, Karla Veloso Gonçalves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2018. **Evaluation of the immunogenic and protective potential of two vaccine strategies against Chagas disease: DNA encoding NTPDase-1 and recombinant NTPDase-1 in BALB/c female mice.** Advisor: Leandro Licursi de Oliveira. Co-advisors: Sílvia Almeida Cardoso and Eliziária Cardoso dos Santos.

Chagas disease is caused by haemoflagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*. Mammal hosts are ordinarily infected through of contact of the triatomine vector-contaminated feces with skin breaks, conjunctiva, oral and nasal mucosa. Benznidazole is the only drug to treat the disease in Brazil however it has several side effects and is effective only in the acute phase. Although vector transmission is the predominant mechanism, oral transmission has become common in Brazil. In view of the increase in the number of non-vector cases of disease transmission, in addition to the late or absent diagnosis and toxicity of the available drug, it is extremely important to develop an effective and safe vaccine for disease control. Thus, the aim of the work was to evaluate the immune response induced by recombinant DNA vaccine encoding *T. cruzi* NTPDase-1 (DNA/NTPDase-1) and recombinant NTPDase-1 vaccine in BALB/c mice. The immunization with the recombinant protein induced faster production of total specific IgG and higher levels of IgG1 and IgG2a compared to DNA/NTPDase-1 vaccine. The T cell profile showed a similar frequency of CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ between the protein, DNA and control groups. There was an increased frequency of activated T cells (CD4⁺/CD44⁺ e CD8⁺/CD44⁺) in rNTPDase-1 vaccinated group compared to the control and DNA/NTPDase-1 groups. The level of Th1 cytokines (TNF- α and IFN- γ) did not differ between the vaccinated groups, while the level of Th2 cytokines (IL-6 and IL-10) was lower in the DNA and recombinant protein groups compared to the control. The nitric oxide (NO) level increased in immunized mice with recombinant protein. After the challenge, we observed immunization with DNA/NTPDase-1 reduced parasite burden in cardiac tissue when compared to the control and rNTPDase-1 groups. Moreover we observed 100% survival on both vaccinated groups, while 50% of the animals died in the control group. Therefore, the stimulus for specific antibody production, the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, reduction in the production of anti-inflammatory cytokines and increase of NO production in the vaccine scheme

using rNTPDase-1 protein and the reduction of parasitic load in the cardiac tissue induced by DNA/NTPDase-1 demonstrate the potential of this antigen for the development of vaccine for the control of Chagas's disease.

INTRODUÇÃO GERAL

Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma das 17 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde que afetam mais de um bilhão de pessoas em 149 países e ameaçam a vida de outros milhões (PAHO 2016). As DTNs estão altamente associadas à pobreza e concentradas em países em desenvolvimento da África, Ásia e Américas (WHO 2011). Também conhecida como tripanossomíase americana, esta doença é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e a mais comum DTN nas Américas (GBD 2015; PAHO 2016). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* no mundo, principalmente na América Latina (Frade et al., 2013; WHO 2013; Hotez et al., 2014; WHO 2018). Além disso, 30.000 novos casos da doença e 14.000 pessoas morrem anualmente e mais de 70 milhões vivem em áreas de risco (WHO/PAHO 2018).

Embora seja uma doença, preferencialmente, carregada por vetor triatomíneo e, portanto, endêmica em regiões que favorecem sua instalação, especialmente Brasil, México e Argentina, a doença se expandiu para áreas não endêmicas incluindo América do Norte, Europa, Austrália e Japão (Gascon et al., 2010; Schmunis e Yadon, 2010). O aumento da migração de indivíduos entre estas áreas é uma preocupação para outras formas de transmissão, tais como, infecção congênita e através de transfusões sanguíneas e transplante de órgãos (Schmunis e Yadon, 2010). Embora relativamente limitados, dados epidemiológicos estimam cerca de 59.000 a 108.000 casos na Europa, com maiores números na Espanha e Itália (Angheben et al., 2011). Nos EUA estima-se mais de 300.000 pessoas infectadas, e embora seja a maioria de imigrantes, transmissão autóctone foi reportada (Bern et al., 2011; Cantey et al., 2012; Garcia et al., 2015). Assim, uma doença tradicionalmente contida na América Latina atravessou suas fronteiras e tornou-se um problema de saúde global (Andrade et al., 2014).

A transmissão da doença através do contato de fezes contaminadas do vetor triatomíneo com feridas na pele, conjuntiva e membrana mucosa oral e nasal é o mecanismo predominante e ocorre exclusivamente nas Américas (Bern et al., 2011). Vários programas governamentais de controle têm reduzido a transmissão vetorial no Brasil e em outros países da América do Sul (Bastos et al., 2010). A transmissão através da transfusão sanguínea e transplante de órgãos e a transmissão congênita são

reportadas esporadicamente, enquanto a transmissão oral tem se tornado extremamente comum (Andrade et al., 2014). Vários surtos no Brasil e Venezuela têm sido atribuídos à ingestão de açaí (*Euterpe oleraceae*) ou caldo de cana-de-açúcar contaminados com triatomíneos ou suas fezes (Valente et al., 2009; de Noya et al., 2010; Ministério da Saúde 2014). A transmissão acidental através da ingestão de leite materno, relação sexual e acidentes laboratoriais já foram reportados (Dias et al., 2011; Pérez-Molina et al., 2012; Araújo et al., 2017).

A exposição a *T. cruzi* resulta no desenvolvimento de uma infecção aguda que se inicia dias após a inoculação do parasito e dura até oito semanas (Beaumier et al., 2016). Geralmente assintomática ou acompanhada por sintomas clínicos inespecíficos e brandos, como febre e indisposição, apenas 1-2% dos casos agudos são diagnosticados (Ribeiro e Rocha, 1998). Sintomas locais de inflamação e inchaço na pele ou conjuntiva, conhecidos como chagoma de inoculação e sinal de Romanã, respectivamente, podem ocorrer devido à reação imune a entrada do parasito (Beaumier et al., 2016). A doença aguda severa pode ocorrer em menos de 1% dos pacientes e tem alto risco de mortalidade, estando mais frequentemente associada à transmissão oral (Bern et al., 2011; de Albuquerque et al., 2018). Durante a fase aguda, há elevada parasitemia e pacientes podem apresentar miocardite semelhante a outras etiologias, como agentes infecciosos, cardiotoxinas e radiação (Benziger et al., 2017). Devido à ausência de diagnóstico e tratamento durante a fase aguda, pacientes evoluem para a fase crônica (Benziger et al., 2017).

A fase crônica é inicialmente chamada de indeterminada porque o paciente não apresenta sinais e sintomas e o parasito se instala em tecidos ricos em macrófagos, fibras musculares esqueléticas e cardiomiócitos, resultando em baixa parasitemia (Brener et al., 2010; Rassi et al., 2010; Camargo et al., 2014). Entretanto, após um período de tempo variável (5 a 30 anos após o início da infecção), estima-se que 20 a 40% destes pacientes progridem para a forma crônica sintomática que pode ser dividida em três grupos: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Rassi et al., 2010; Benziger et al., 2017). Alterações cardíacas incluem falência do coração, arritmias e tromboembolismo que podem levar a morte; e a forma digestiva inclui, principalmente, megaesôfago e megacolon, que podem ser acompanhadas de odinofagia, disfagia, constipação e dor abdominal. A associação de doença cardíaca com megaesôfago ou megacolon, ou

ambos, define a forma cardiodigestiva (Rassi et al., 2010; Bern, 2015; Benziger et al., 2017).

O diagnóstico precoce é estratégico para prevenir a progressão da doença e a ocorrência de limitações funcionais, incapacidade e deficiência. O elevado número de parasitos no sangue na fase aguda pode ser detectado por testes laboratoriais como microscopia (exame direto do sangue periférico ou esfregaço corado com Giemsa) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), enquanto testes sorológicos (IgM anti *T.cruzi*) são frequentemente negativos (Kun et al., 2009; Andrade et al., 2014; Benziger et al., 2017). O diagnóstico da miocardite pode ser realizado pela detecção do parasito em biópsia (Benziger et al., 2017). Na fase crônica, o nível de parasitemia encontra-se abaixo do limite de detecção por microscopia e assim, o diagnóstico se baseia em sorologia para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* ou através de métodos parasitológicos indiretos de amplificação *in vitro* da população de parasitos (hemocultivo e xenodiagnóstico) (Bern et al., 2011). Na forma indeterminada inicial, exames clínicos são normais, enquanto alterações cardíacas e digestivas auxiliam no diagnóstico e confirmam os resultados laboratoriais da forma crônica sintomática.

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas é transmitida para seres humanos, animais domésticos e mamíferos selvagens por insetos hematófagos da subfamília Triatominae. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos tenham sido identificadas, apenas algumas são vetores competentes para *T. cruzi*. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes na transmissão de *T. cruzi* para o homem (Bern et al., 2011).

Durante o ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta diferentes estágios de desenvolvimento morfológicamente distintos no inseto vetor (epigastigotas replicativos e tripomastigotas metacíclicos infectantes) e no hospedeiro mamífero (tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares replicativos) (Fig. 1). Após o vetor se alimentar de sangue contaminado, a maioria dos tripomastigotas é lisada no estômago (Castro et al., 2007). Tripomastigotas sobreviventes se transformam em formas esféricas conhecidas como esferomastigotas ou em epimastigotas. Epimastigotas migram para o intestino onde se dividem intensamente e aderem a membranas celulares (Alves et al.,

2007). No intestino posterior e reto, muitos epimastigotas se desprendem da superfície intestinal e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes, os quais são excretados nas fezes e urina do vetor (Garcia et al., 2007). Ao picar um hospedeiro mamífero, tripomastigotas metacíclicos podem entrar através de feridas na pele ou mucosas intactas e invadir vários tipos de células nucleadas. No citoplasma, tripomastigotas diferenciam em amastigotas intracelulares que replicam a cada 12 horas, por até cinco dias. No final deste período, amastigotas se transformam em tripomastigotas que se acumulam e são liberados na circulação através da ruptura da célula do hospedeiro. Parasitos circulantes podem invadir células adjacentes iniciando novos ciclos replicativos ou disseminar via linfa ou sangue para sítios distantes e serem ingeridas pelo triatomíneo durante um novo repasto sanguíneo (Bern et al., 2011; Lidane et al., 2017).

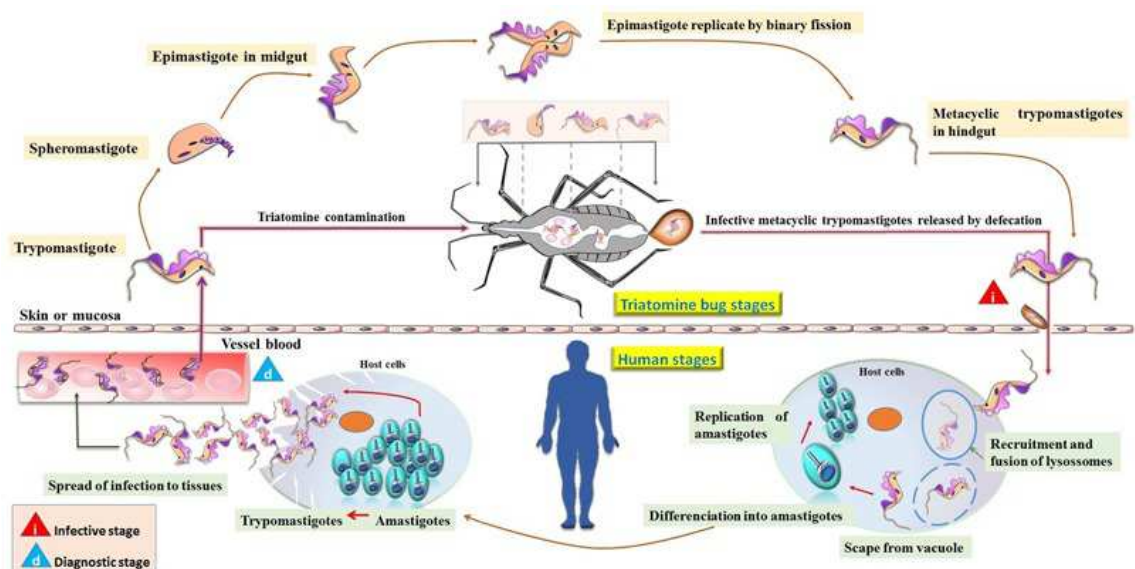


Fig. 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Lidane et al., 2017)

Tratamentos disponíveis e desenvolvimento de vacinas

O tratamento durante a fase aguda é recomendado e associado a uma taxa de cura de aproximadamente 100% com a terapia antitripanossomal (Beaumier et al., 2016). Durante a fase crônica, após a disseminação e instalação do parasito nos órgãos e tecidos do hospedeiro vertebrado, o tratamento não se mostrou efetivo para curar ou prevenir o desenvolvimento da forma sintomática da doença (Teixeira et al., 2002; Rassi et al., 2010). Assim, a eficiência no diagnóstico na fase aguda é um dos grandes desafios na doença (Andrade et al., 2014; Bern 2015; Grando et al., 2017).

Os medicamentos benznidazol (Radanil®, Rochagan®, Benzonidazol®) e nifurtimox (Lampit®) foram disponibilizados para tratamento da doença de Chagas na década de 70 (Sosa-Estani et al., 2012). Atualmente o benznidazol é a única droga clinicamente prescrita para tratamento de pacientes chagásicos no Brasil (Munõz et al., 2011). Este medicamento tem efeito tripanocida e atua inibindo a síntese proteica de formas amastigotas e tripomastigostas (Bern et al., 2011). Apesar da sua eficácia durante a fase aguda, o benznidazol possui elevada toxicidade com vários efeitos adversos como reações de hipersensibilidade na pele, alterações sanguíneas e neuropatia periférica. Além disso, parasitos resistentes à quimioterapia já foram encontrados na América Latina (Camandaroba et al., 2003).

Tendo em vista o crescimento do número de casos em áreas não endêmicas e de formas não vetoriais de transmissão da doença, além do tardio ou ausente diagnóstico e toxicidade da droga de escolha, é de extrema importância desenvolver uma vacina eficaz e segura (Quijano-Hernandez et al., 2013; Serna et al., 2014; Beaumier et al., 2016) para controle da doença de Chagas.

Atualmente existem dois potenciais perfis de vacinas contra a doença de Chagas. A vacina profilática poderia prevenir potencialmente a infecção aguda, especialmente em áreas altamente endêmicas, mas provavelmente não interromperia a transmissão da doença devido ao grande número de reservatórios e hospedeiros zoonóticos nestas áreas. A vacina terapêutica, associada ou não a fármacos, seria útil para tratamento de pacientes soroconvertidos e que estão na fase indeterminada da doença (Quijano-Hernandez e Dumonteil, 2011; Beaumier et al., 2016).

Uma ampla diversidade de formulações vacinais, que varia do parasito inteiro atenuado a proteínas purificadas ou recombinantes, além de DNA codificando antígenos de *T. cruzi* e regimes de vacinação heteróloga “prime-boost” (Tabela 1), tem mostrado potencial para o desenvolvimento de vacinas contra *T. cruzi* em testes pré-clínicos, apresentando proteção contra infecção e aumento da sobrevivência em modelos murinos (Quijano-Hernandez e Dumonteil, 2011; Rigato et al., 2011; Dumonteil et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Beaumier et al., 2016). A variabilidade genética na sequência de aminoácidos dos antígenos entre as sete linhagens de *T. cruzi* já identificadas é um dos grandes desafios para o desenvolvimento da vacina (Dumonteil et al., 2012).

Tabela 1. Candidatos a vacina preventiva

Formulação	Antígeno	Referências
Parasito inteiro	<i>T. cruzi</i> vivo atenuado	Basombrio e Arredes, 1987 Basombrio et al., 1993 Collins et al., 2011 Brandan e Basombrio et al., 2012 Sanchez-Valdez et al., 2015
	<i>T. rangeli</i> não patogênico	Basso et al., 2008 Basso e Marini, 2014 Basso et al., 2014
Vetor viral carreando sequência de DNA que codifica antígeno de <i>T. cruzi</i>	TSSA	Miyahira et al., 2005
	TS e ASP2	Machado et al., 2006
	ASP2	Barbosa et al., 2013; Farrow et al., 2016
	Gp83	Farrow et al., 2014
	Tc52	Matos et al., 2014
	Cruzipaína, Tc24 e Tc52	Cazorla et al., 2015
Peptídeo	MASP	Serna et al., 2014
Proteína recombinante	TcSP	Salgado-Jimenez et al., 2013
	TSA-1	Knight et al., 2014
	Trans-sialidase (Ts)	Bontempi et al., 2015
	Tc24	Martinez-Campos et al., 2015
Vacina de DNA	Trans-sialidase	Fujimura et al., 2001
	TSA-1, ASP-1 e ASP-2+IL12+GM-CSF	Garg e Tarleton, 2002
	TcG2 and TcG4	Gupta e Garg, 2013
	TSA-1 e Tc24	Quijano-Hernandez et al., 2013
	TcSP	Salgado-Jimenez et al., 2013
	TcG1, TcG2, and TcG4	Gupta et al., 2014
“Prime-boost heterólogo”	DNA- “Prime/proteína-boost” (TcVac2)	Gupta e Garg, 2010
	DNA-“Prime/Adenovirus-boost” (ASP-2+Ts)	Araújo et al., 2014
	DNA-“Prime/ <i>T. rangeli</i> -boost” (TvVac4)	Aparício-Burgos et al., 2015
	DNA- “Prime/proteína-boost” (TcG2/TcG4)	Gupta e Garg, 2015

O sucesso da estratégia vacinal, preventiva ou terapêutica, depende da sua

habilidade em induzir uma resposta imune celular com perfil Th1 e ativar linfócitos T citotóxicos (CT CD8⁺) que desempenham papel crucial no desenvolvimento de imunidade protetora para o controle da infecção, aumentando a sobrevivência dos pacientes e minimizando as complicações cardíacas (Quijano-Hernandez e Dumonteil, 2011; Rodrigues et al., 2012; Konduri et al., 2017). Estudos tem mostrado que vacinas de proteína recombinante combinadas com adjuvantes podem induzir resposta imune com padrão Th1 com elevados níveis de IgG2a e IFN- γ sintetizados por esplenócitos, reduzindo a parasitemia e aumentando a sobrevivência (Quijano-Hernandez e Dumonteil, 2011; Serna et al., 2014). Vacinas com DNA plasmideal podem transfectar diretamente células estromais, tais como células musculares e células dendríticas, ativando o receptor de DNA localizado no retículo endoplasmático e endossomas (“Toll like receptor” 9, TLR9), o que induz uma cascata de sinalização que resulta na produção de IFNs tipo 1 (IFN- α e IFN- β) (Yang e Seki, 2012). Os antígenos codificados no DNA podem ainda ser expressos em células dendríticas e apresentados através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I a CT CD8⁺ (Camargo et al., 2014). Concomitantemente, antígenos liberados no meio extracelular podem ser fagocitados por células dendríticas e macrófagos e então apresentados a linfócitos T CD4⁺ *naive* via MHC de classe II, auxiliando na sua ativação, proliferação e diferenciação. Um microambiente contendo IFN- γ e IL-12 favorece a diferenciação em Th1, um padrão de resposta celular fundamental para infecções causadas por parasitos intracelulares (Desmet e Ishii, 2012). Assim, vacinas de DNA podem ser mais efetivas que proteínas recombinantes em induzir resposta imune tipo Th1 com ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Dumonteil, 2007).

Além disso, vacinas com tecnologia de DNA recombinante apresentam menor custo de produção em larga escala quando comparadas às formas clássicas de vacinação. Além disso, elas são estáveis à temperatura ambiente ou se liofilizadas permitindo sua comercialização e distribuição em regiões endêmicas de difícil acesso comumente afetadas pela doença de Chagas (Glenting e Wessels, 2005).

Ecto-Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases)

Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), ectonucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases, fosfatases alcalinas e ecto-5' nucleotidases pertencem a

família de ectonucleotidases (Zimmermann 2011).

NTPDases e ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases hidrolisam nucleosídeos 5'-tri e/ou difosfatos a NDP e NMP (Braun 2000; Fietto et al., 2004; Zimmermann 2006). NTPDases são ubíquas e foram descritas em protozoários de vários gêneros, incluindo *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Plasmodium* e *Trypanosoma* (Fietto et al., 2004; de Souza et al., 2007; Santos et al., 2009). Estas enzimas são as principais biomoléculas envolvidas no controle da sinalização purinérgica através da regulação das concentrações extracelulares de nucleotídeos/nucleosídeos e têm sido estudadas quanto a sua importância como moduladores da infectividade e virulência de *T. cruzi* (Sansom et al., 2008; Gorini et al., 2013).

ATP e outros nucleotídeos, tais como UDP e UTP, podem ser liberados de células de mamíferos ativadas, estressadas, lesionadas ou infectadas por patógeno, resultando em aumento da concentração extracelular (Gorini et al., 2013). Nucleotídeos extracelulares funcionam como sinalizadores de perigo para o sistema imune e ativam receptores purinérgicos P2 disparando diferentes eventos celulares, tais como, proliferação, diferenciação, quimiotaxia de monócitos e macrófagos, liberação de citocinas e geração de espécies reativas de nitrogênio (NOS) e oxigênio (ROS) (Di Virgilio et al., 2001). Em particular, a concentração de ATP extracelular controla a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-2, IL-12 e IFN- γ (Langston et al., 2003), a produção de ROS, a atividade de linfócitos e a agregação plaquetária (Hasko e Cronstein, 2004; Eltzschig et al., 2004). ADP interage com receptores P2, desencadeando uma cascata de sinalização celular que culmina com alterações na forma das plaquetas, acelerando a agregação e, conseqüentemente, a remoção de parasitos opsonizados da circulação (Gorini et al., 2013). Ecto-5' nucleotidase catalisa a hidrólise de adenosina monofosfato (AMP) exógena gerando adenosina que interage com receptores purinérgicos P1. A ativação destes receptores modula negativamente a resposta imune, suprimindo a produção de citocinas inflamatórias e aumentando a produção de IL-10 por monócitos e macrófagos, facilitando o estabelecimento da infecção pelo parasito (Hasko e Cronstein, 2004). Além disso, a adenosina inibe a agregação paquetária induzida por ADP, sendo um mecanismo de escape do *T. cruzi* (Sansom et al., 2008).

TcNTPDase-1 é uma NTPDase identificada na superfície externa de

tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, capaz de hidrolisar ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP (Fietto et al., 2004). Uma vez que a TcNTPDase-1 controla os níveis extracelulares de nucleotídeos, reduzindo a concentração de nucleosídeos di e trifosfatados e contribuindo para o aumento da concentração de adenosina, é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro e favorecer a infecção. Considerada uma importante biomolécula de virulência de *T. cruzi*, além de influenciar na via de resgate de purinas e ser importante para o parasito se evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Fietto et al., 2004; Santos et al., 2009), a TcNTPDase-1 destaca-se como potencial candidato para o desenvolvimento de terapias e estratégias vacinais contra *T. cruzi*.

Infecção e mecanismo de escape de *T. cruzi*

Uma vez no interior do hospedeiro vertebrado, tripomastigotas metacíclicos aderem à célula do hospedeiro através de glicoproteínas e proteínas de superfície ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), tais como trans-sialidasas, mucinas e outras (de Pablos e Osuna, 2012; Bartolomeu et al., 2014). Após adesão, tripomastigotas podem invadir rapidamente uma ampla variedade de células nucleadas e ainda serem englobados por fagócitos através de duas rotas diferentes (Cardoso et al., 2016). Na rota dependente de lisossomo, a ligação de glicoproteínas, como por exemplo gp82 do parasito, ao receptor específico na célula do hospedeiro dispara a ativação de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e fosfolipase C (PLC). A PLC ativada atua sobre fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂] da membrana formando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) solúvel e diacilglicerol. IP₃ se difunde rapidamente no citosol e se liga a canais de cálcio controlados por IP₃ no retículo endoplasmático resultando em liberação de Ca²⁺ (Maeda et al., 2012). A elevação da concentração citoplasmática de Ca²⁺ dispara o recrutamento de lisossomos para a membrana plasmática no sítio de entrada do parasito permitindo rápido acesso ao compartimento lisossomal (Andrade e Andrews, 2004). A segunda rota ocorre em células fagocíticas profissionais como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Quando moléculas do parasito interagem com receptores do fagócito, ocorre ativação de PI cinases locais, especialmente PI3K. PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol gerando os fosfoinositídeos PI(3)P, PI(3,4)P₂ e PI(3,4,5)P₃. O acúmulo de PIP₂ induz polimerização inicial da actina com remodelamento da membrana plasmática e formação dos pseudópodes. A conversão de

PIP2 em PIP3 induz despolimerização da actina e fechamento do fagossomo, que é seguida pela fusão intracelular com lisossomos (Andrade e Andrews 2004; Bonfim-Melo et al., 2018).

Neste caso, a internalização do parasito forma um compartimento ligado à membrana conhecido como vacúolo parasitóforo que, ao se fundir aos lisossomos, origina o fagolisossomo. No interior do fagolisossomo, a sobrevivência do parasito é mediada por uma série de enzimas, tais como peroxidases (POX) e superóxido dismutase (SOD) que o protege das ROS e NOS (Piacenza et al., 2008). No ambiente ácido do fagolisossomo, a enzima trans-sialidase, secretada exclusivamente pelo parasito, torna-se ativa e transfere ácido siálico das proteínas de membrana associadas aos lisossomos (LAMP) para mucinas da superfície do parasito e esta desialização das proteínas LAMP torna a membrana do fagolisossomo mais susceptível a ruptura (Albertti et al., 2010). A seguir, as formas tripomastigotas secretam uma proteína formadora de poro o qual lisa a membrana do fagolisossomo e libera os parasitos no citosol onde diferenciam em amastigotas replicativas. Após vários ciclos de duplicação, amastigotas se diferenciam em tripomastigotas infectivos circulantes que são liberados após a ruptura da membrana da célula do hospedeiro e infectam células vizinhas ou entram na circulação (Cardoso et al., 2016).

Resposta imune inata e adaptativa

Moléculas altamente conservadas compartilhadas por diferentes microrganismos, incluindo *T. cruzi*, são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) localizados no soro, superfície celular, no lumen de vesículas intracelulares, tais como endossomas e lisossomas, e no citoplasma (Botos, et al., 2011; Cardoso et al., 2016).

Os “Toll-like receptors” (TLRs) ou receptores semelhantes à *Toll* são o tipo de PRRs melhor caracterizados e estão localizados na membrana celular e interior dos endossomas. Estes receptores são mais abundantes em células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, mas também tem sido descritas em linfócitos T e células somáticas (Akira et al., 2006; Kulkarni et al., 2011). TLRs são capazes de diferenciar PAMPs de tecidos próprios tendo papel importante no

sistema imune inato envolvido na etapa inicial de defesa do hospedeiro (Campos e Gazzinelli, 2004; Yang e Seki, 2012) e conferindo certo grau de especificidade a resposta (Rodrigues et al., 2012).

Nos seres humanos, dez TLRs (TLR1-TLR10) respondem a uma variedade de PAMPs, incluindo lipopolissacarídeos (TLR4), lipopeptídeos (heterodímeros TLR2/1, TLR2/6 e TLR2/10), RNA fita dupla (dsRNA) viral (TLR3), flagelina bacteriana (TLR5), RNA fita simples (ssRNA) viral ou bacteriano (TLR7 e TLR8) e DNA não metilado rico em CpG (TLR9) (Guan et al., 2010; Botos, et al., 2011; Yang e Seki, 2012; Cardoso et al., 2016). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos sobre a superfície celular, enquanto TLR3, TLR7/8 e TLR9 estão localizados no retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos e endolisossomos (Takeuchi e Akira, 2010; Yamamoto e Takeda 2010).

Os receptores TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs de *T. cruzi* pela célula do hospedeiro vertebrado. A ativação destes receptores por glicoproteínas tipo mucina ancoradas a GPI, glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs, subgrupo de âncoras de GPI), RNA e DNAs metilados ricos em CpG, respectivamente, induz mudança conformacional em seu domínio citoplasmático (domínio do receptor Toll-IL-1 ou domínio TIR). O domínio TIR ativado recruta moléculas adaptadoras que leva a uma cascata de sinalização dependente de MyD88 e culmina com a produção de citocinas proinflamatórias (Akira et al., 2006; Takeuchi e Akira, 2010). Inicialmente, MyD88 recruta e se liga a cinase IRAK-4, que por sua vez ativa IRAK1 e IRAK2. IRAKs ativadas dissociam de MyD88 e interagem com a ubiquitina ligase TRAF6. TRAF6 e outras enzimas catalizam a síntese de cadeias de poliubiquitinas sobre TRAF6 e IRAK1 que ativa o complexo de cinase 1 ativada por TGF- β (TAK1), proteína 2 de ligação a TAK1 (TAB2) e TAB3. Em seguida o complexo TAK1 ativado ativa as cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ERK1/2, p38 e JNK levando a ativação de AP-1 (Yang e Seki, 2012). Simultaneamente, TAK1 ativa o complexo IKK formado pelas proteínas NEMO (IKK γ), IKK α e IKK β . A ubiquitinação de NEMO permite ativação de IKK β por uma quinase. IKK β ativa fosforila I κ B α que se dissocia de NF- κ B. NF- κ B transloca para o núcleo juntamente com AP-1 onde induzem a transcrição de citocinas inflamatórias tais como IL-6, IL-12 e TNF- α (Yang e Seki, 2012). Em células dendríticas plasmocitóides, sinalização via TLR7/8 e TLR9 forma um complexo com

MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF6, TRAF3, IRF7 e TAK1. TAK1 ativa o complexo que fosforila IKK α . IRF7 dissocia-se e transloca para o núcleo induzindo a transcrição de IFN tipo I (Takeuchi e Akira, 2010; Yamamoto e Takeda, 2010).

Assim, a ativação de TLR2/6, TLR4, TLR7/8 e TLR9 em macrófagos, células natural killer (NKs) e linfócitos T $\gamma\delta$ resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IFN tipo 1 (Sardinha et al., 2006). Além disso, a ativação de TLR2/6 em células dendríticas ativa a produção de TNF- α enquanto reduz a produção de IL-12, atuando como um imunoregulador da resposta imune (Rodrigues et al., 2012; Cardoso et al., 2016). Citocinas pró-inflamatórias recrutam monócitos, linfócitos e neutrófilos para o local da infecção e participam da ativação e diferenciação de CT *naive* (Gerondakiset al., 2014). IFN tipo I atua no desenvolvimento e ativação de NKs, que em resposta a IL-12, intensifica a produção de IFN- γ (Gorini et al., 2013).

Macrófagos e neutrófilos fagocitam *T. cruzi* e utilizam da maquinaria enzimática composta de lisozima e hidrolases ácidas para degradar a parede celular e as proteínas do parasito. IFN- γ intensifica a ativação e estimula a expressão de citocinas inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-12), quimiocinas, coestimuladores de moléculas do MHC e enzimas oxidase e sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) em macrófagos (Gutierrez et al., 2009). Juntamente com lisozima e hidrolases ácidas, a produção de compostos tóxicos e reativos (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) por complexos NADPH-oxidase presentes na membrana do fagolisossomo, SOD e iNOS levam a morte do parasito (Piacenza et al., 2012). Simultaneamente, células dendríticas ativadas pelo patógeno via TLR produzem elevados níveis de moléculas do MHC, expressam o receptor (CCR7) das quimiocinas CCL19 e CCL21 produzidas em vasos linfáticos e zonas de CT dos linfonodos, perdem sua capacidade de adesão aos epitélios e migram para os linfonodos. CT imaturas também expressam CCR7 e migram para as mesmas regiões aumentando as chances de CT com receptor para o antígeno específico encontrá-lo expresso em células dendríticas (Rudulier et al., 2012).

Parasitos e antígenos do meio extracelular fagocitados e localizados em vacúolos parasitóforos e endossomos são degradados enzimaticamente por proteases (Murphy et al., 2010). No RE, moléculas do MHC de classe II são sintetizadas e associadas a um trímero, conhecido como cadeia invariante, que ocupa a fenda de ligação ao peptídeo da

molécula de MHC. Assim, peptídeos que se encontram no RE se associam exclusivamente a moléculas do MHC de classe I. O complexo MHC II-cadeia invariante é transportado para os endossomas e lisossomos tardios onde se encontra com os antígenos internalizados. As mesmas enzimas proteolíticas que degradam proteínas internalizadas atuam sobre a cadeia invariante formando um remanescente de 24 aminoácidos chamado peptídeo de cadeia invariante associado à classe II (CLIP). Peptídeos que apresentam maior afinidade pela molécula do MHC de classe II deslocam o CLIP numa reação mediada pela molécula HLA-DM. Estes peptídeos se ligam às fendas abertas de moléculas do MHC de classe II e são, então, clivados enzimativamente ao seu tamanho final. Lisossomos se fundem a membrana plasmática expondo os complexos peptídeo-MHC de classe II. Uma vez na superfície celular, os complexos são reconhecidos por células T CD4⁺ específicas para peptídeos antigênicos através de seus receptores (TCR) (Blum et al., 2013).

Após ligação ao complexo antígeno-MHCII e ativação do TCR, CT helper (CD4) *naive* podem se diferenciar em três principais subconjuntos Th, tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) e Th produtores de IL-17 (Th17) (Fang e Zhu, 2017). O destino das CT *helper* imaturas ativadas por antígenos é determinado por citocinas presentes no meio extracelular (Yamane e Paul, 2012; Yamane e Paul, 2013). Quando citocinas se ligam ao receptor específico associado à tirosina cinases citoplasmáticas, denominadas Janus cinases ou JAKs, induz mudança conformacional, formando dímeros ou trímeros de receptores, e aproxima as JAKs associadas (JAK1, JAK2, JAK3 ou Tyk2). As JAKs se transfosforilam, aumentando assim a atividade cinase de seus domínios tirosina cinase. As JAKs fosforilam as tirosinas dos receptores de citocinas criando sítios de ancoragem para o domínio SH2 de reguladores gênicos denominados STATs (transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição). O domínio SH2 de um monômero de STAT é capaz de se ligar a um resíduo de fosfotirosina de uma proteína STAT adjacente. Os dímeros de STAT se dissociam do receptor e migram para o núcleo. Em combinação com outras proteínas reguladoras gênicas, os dímeros se ligam a sequências específicas em regiões promotoras de genes estimulando a transcrição de genes específicos, incluindo citocinas, receptores, entre outras moléculas que definirão o fenótipo da célula T *helper* (Hirahara et al., 2010; Ahlers, et al., 2010). Desta forma, cada subgrupo de CT possui um conjunto único de transdutores de sinal e ativadores de transcrição bem como de

citocinas. IFN- γ sintetizado por NKs ativa os fatores de transcrição STAT1 e T-bet em CT CD4⁺ imaturas e ativadas por antígeno, que por sua vez, induzem a síntese de IFN- γ , configurando uma amplificação positiva que conduz a diferenciação de CT em perfil Th1. A citocina IL-12, produzida por macrófagos e células dendríticas, ativa o fator de transcrição STAT4 que também polariza para um perfil Th1 aumentando a produção de IFN- γ . Por outro lado, IL-6, IL-1 e IL-23, além de TGF- β , podem ser produzidas por células dendríticas e ativar STAT3 e ROR γ t que conduzem a diferenciação do subgrupo Th17 produtor das citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22 (Zhu et al., 2010; Fang e Zhu, 2017). A citocina IL-17 parece essencial para controle da inflamação na infecção por *T. cruzi* atuando como regulador negativo da produção de IFN- γ e citocinas e modulando as lesões cardíacas imune-mediadas encontradas em pacientes chagásicos (Gutierrez et al., 2009). TGF- β ainda estimula a expressão de FoxP3 em CT CD4 *naive* que se diferenciam em CT regulatórias em órgãos linfóides periféricos (Fang e Zhu, 2017). Tais CT produzem IL-10 que atua inibindo a produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos, e, conseqüentemente, regulando a polarização Th1 e a produção de IFN- γ . Conseqüentemente, baixos níveis das citocinas IL-17 e IL-10 e altos níveis de IFN- γ e TNF- α tem sido relacionados à severidade da doença de Chagas (Teixeira et al., 2002; Guedes et al., 2012).

CT Th1 ativadas secretam IFN- γ , IL-2 e TNF e sua principal função é ativação de macrófagos. Macrófagos ativados por IFN- γ produzido por CT Th1 e NKs fagocitam e destróem os parasitos fagocitados, além de sintetizar quimiocinas e as citocinas TNF, IL-1 e IL-12. TNF, IL-1 e quimiocinas recrutam leucócitos, enquanto IL-12, juntamente com IFN- γ , tem novamente efeito na polarização da resposta Th1 (Rodrigues et al., 2012). IL-2 estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de CT ativadas por antígeno (induz proteína anti-apoptótica Bcl-2). Por outro lado, proteínas antigênicas fagocitadas por células dendríticas podem escapar do fagolisossomo e, no citosol são ubiquitinadas e destinadas à degradação em proteassomas. IFN- γ induz a transcrição e síntese de três diferentes subunidades catalíticas do proteassoma resultando em mudança em sua especificidade pelo substrato (Blum et al., 2013). O processamento de antígenos protéicos por aminopeptidases residentes do RE (ERAP) no proteassoma gera fragmentos de peptídeos com tamanho apropriado para transporte através da proteína transportadora TAP (transportador associado ao processamento de antígenos) e

contendo aminoácidos hidrofóbicos (leucina, valina, isoleucina e metionina) carboxiterminais ou resíduos básicos (lisina e arginina) típicos de peptídeos transportados associados a moléculas do MHC da classe I (Rock et al., 2004). Na face luminal da membrana do retículo endoplasmático, TAP se associa a proteína tapasina que recruta dímeros $\beta 2m$ de MHC de classe I formando o complexo de carregamento de peptídeo (Oancea et al., 2009). Quando o peptídeo se liga a fenda de moléculas do MHC de classe I adjacentes, estas se dissociam de tapasina, de modo que o peptídeo pode ser transportado para o complexo de Golgi e daí para a superfície celular através de vesículas exocíticas. Uma vez expressos na superfície celular, os complexos peptídeo-MHC I podem ser reconhecidos por CT $CD8^+$ específicas (Camargo et al., 2014). CT $CD8^+$ produzem $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ e ainda induzem morte por apoptose de células infectadas por meio da exocitose de grânulos contendo perforinas, granzimas e granulinas (Chávez-Galán L., 2009; Rodrigues et al., 2012). Assim, a polarização Th1 com ativação de macrófagos e a ativação de CT $CD8^+$ tem papel crucial no controle da parasitemia e do parasitismo tecidual na doença de Chagas (Padilla et al., 2009; Serna et al., 2014).

Além de linfócitos T, linfócitos B participam da imunidade contra *T. cruzi*. A maioria dos linfócitos B maduros virgens são células B foliculares que circulam continuamente entre sangue e órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos e tecidos linfóides de mucosa). As células B foliculares entram nos tecidos linfóides secundários através de vasos sanguíneos localizados nas zonas de CT e, em seguida, migram para os folículos (zonas de células B). O movimento para os folículos é guiado pela quimiocina CXCL13 secretada por células dendríticas foliculares que se liga ao receptor CXCR5 na superfície das células B imaturas circulantes (Rudulier et al., 2012). Antígenos são reconhecidos pelo receptor BCR (complexo formado pela IgM ou IgD e as moléculas invariantes $Ig\beta$ e $Ig\alpha$) com a cooperação de TLR5, TLR7 e TLR9. O reconhecimento do antígeno inicia a ativação das células B que proliferam e podem diferenciar em células de memória circulantes ou em plasmócitos secretores de anticorpos (IgM) residentes na medula óssea. As células B podem ainda internalizar o antígeno em vesículas endossomais e apresentá-los via MHC de classe II para CT auxiliares *naive* ou efetoras. Anticorpos produzidos nos linfonodos, baço e medula óssea podem entrar na circulação e atuar em todo corpo. Anticorpos IgM ativam a via clássica do complemento, enquanto

IgG tem as funções de opsonização de antígenos para fagocitose por macrófagos e neutrófilos, ativação da via clássica do complemento e citotoxicidade mediada por NKs dependente de anticorpos. CT Th1 secretam IFN- γ que atua sobre as células B promovendo mudanças para subclasse de IgG2a demonstrada ser uma importante Ig para eliminação de formas sanguíneas do parasito (Rodrigues et al., 2012).

Referências

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783–801.

Albertti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO (2010). Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes and Infection*, 12(10): 784–789.

Ahlers JD, Belyakov IM (2010). Molecular pathways regulating CD4+ T cell differentiation, anergy and memory with implications for vaccines (2010). *Trends in Molecular Medicine*, 16(10): 478–488.

Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF, Bourguignon SC, de Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS (2007). *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 116(1): 44–52.

Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO (2014). Acute Chagas Disease: New global challenges for an old neglected disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(7): e3010, 1–10.

Andrade LO, Andrews NW (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *Journal of Experimental Medicine*, 200(9): 1135–43.

Angheben A, Anselmi M, Gobbi F, Marocco S, Monteiro G, Buonfrate D, Tais S, Talamo M, Zavarise G, Strohmeyer M, Bartalesi F, Mantella A, Di Tommaso M, Aiello KH, Veneruso G, Graziani G, Ferrari MM, Spreafico I, Bonifacio E, Gaiera G, Lanzafame M, Mascarello M, Cancrini G, Albajar-Viñas P, Bisoffi Z, Bartoloni A (2011). Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. *Euro Surveillance*, 16(37): 1–8.

Aparicio-Burgos JE, Zepeda-Escobar JA, Oca-Jimenez RM, Estrada-Franco JG, Barbabosa-Pliego A, Ochoa-García L, Alexandre-Aguilar R, Rivas N, Peñuelas-Rivas G, Val-Arreola M, Gupta S, Salazar-García F, Garg NJ, Vásquez-Chagoyán JC (2015). Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(4): e0003625.

Araujo AF, Oliveira G, Vasconcelos JF (2014). Genetic vaccination against experimental infection with myotropic parasite strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mediators of inflammation*, 2014: 605023.

Araújo PF, Almeida AB, Pimentel CF, da Silva AR, Sousa A, Valente SA, Valente VC, Britto MM, Rosa AC, Alves RM, Hagström L, Teixeira ARL (2017). Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(6): 437–446.

Barbosa RPA, Filho BG, Santos LI, Sales-Junior PA (2013). Vaccination using 12 recombinants Influenza and Adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS One*, 8(4): e61795.

Bartholomeu DC, de Paiva RM, Mendes TA, DaRocha WD, Teixeira SM (2014). Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites. *PLoS Pathogens*, 10(12): e1004399, 1–9.

Basombrío MA, Arredes H (1987). Long-term immunological response induced by attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice. *Journal of Parasitology*, 73(1): 236–238.

Basombrio MA, Segura MA, Mora MC, Gomez L (1993). Field trial of vaccination against American trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1): 143–151.

Basso B, Moretti E, Fretes R (2008). Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(4): 370–374.

Basso B, Marini V (2014). Experimental Chagas disease. Innate immune response in Balb/c mice previously vaccinated with *Trypanosoma rangeli*. I. The macrophage shows immunological memory: Reality or fiction? *Immunobiology*, 219(4): 275–284.

Basso B, Moretti E, Fretes R (2014). Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces

resistance of guinea pigs to virulent *Trypanosoma cruzi*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 157(1–2): 119–123.

Bastos CJC, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi MFR (2010). Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(6):e711, 1–6.

Beaumier CM, Gillespie PM, Strych U, Haywardd T, Hoteza PJ, Bottazzi ME (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*, 34: 2996–3000.

Benziger CP, do Carmo GAL, Ribeiro ALP (2017). Chagas Cardiomyopathy Clinical Presentation and Management in the Americas. *Cardiology Clinics*, 35: 31–47.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 24(4): 655–681a.

Bern, C (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373: 456–466.

Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annual Review Immunology*, 31: 443–473.

Bonfim-Melo A, Ferreira ÉR, Mortara RA (2018). Rac1/WAVE2 and Cdc42/N-WASP participation in actin-dependent host cell invasion by extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*, 9 (360): 1–14.

Bontempi IA, Vicco MH, Cabrera G, Villar, SR, Gonzáles FB, Roggero EA, Ameloot P, Callewaert N, Pérez AR, Macipar IS (2015) Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*, 33(10): 1274–1283.

Botos I, Segal DM, Davies DR (2011). The structural biology of Toll-Like Receptors. *Structure*, 19(4): 447–459.

Brandan CP, Basombrío MA (2012). Genetically attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as a potential vaccination tool. *Bioengineered*, 3(4): 242–246.

Braun N, Âvigny JS, Robson SC, Enyoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann H (2000). Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain.

European Journal of Neuroscience, 12: 4357–4366.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (2010). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 431p.

Camandaroba EL, Reis EA, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG (2003). *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 201–209.

Camargo R, Faria LO, Kloss A, Favali CBF, Kuckelkorn U, Kloetzel P-M, de Sa CM, Lima BD (2014). *Trypanosoma cruzi* Infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC Class I cell surface expression in HeLa cells. *PLoS One*, 9(4): e95977.

Campos MA, Gazinelli RT (2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators of Inflammation*, 13(3): 139–143.

Cantey PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, Todd CW, Currier M, Hand S, Varnado W, Dotson E, Hall C, Jett PL, Montgomery SP (2012). The United States *Trypanosoma cruzi* infection study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion*, 52: 1922–1930.

Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC (2016). Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology*, 6(659), 1–15.

Castro DP, Seabra SH, Garcia ES, de Souza W, Azambuja P (2007). *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Experimental Parasitology*, 117(2): 201–207.

Cazorla SI, Matos, MN, Cerny, N, Ramirez, C, Alberti, AS, Bivona, AE, Morales, C, Guzmán, CA, Malchiodi, EL (2015). Oral multicomponent DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella* elicited immunoprotection against American trypanosomiasis. *The Journal of infectious diseases*, 211(5): 698–707.

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(1): 15–25.

Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL (2011). Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8+ T cell response and protection against heterotopic challenge. *Infection and Immunity*, 79(8): 3397–3406.

de Albuquerque JB, dos Santos DS, Stein JV, de Meis J (2018). Oral versus intragastric inoculation: similar pathways of *Trypanosoma cruzi* experimental infection from target tissues, parasite evasion, and immune response. *Frontiers in Immunology*, 9: 1–9.

de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *The Journal Infectious Diseases*, 201(9): 1308–1315.

de Pablos LM, Osuna A (2012). Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infection and Immunity*, 80(7): 2258–2264.

Desmet CJ, Ishii KJ (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nature Reviews, Immunology*, 12: 479–491.

de Souza LM, Thomaz R, Fonseca FV, Panizzutti R, Vercesi AE, Meyer-Fernandes JR (2007) *Trypanosoma brucei brucei*: biochemical characterization of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Experimental Parasitology*, 115: 315–323.

di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, 97(3): 587–600.

Dias JCP, Neto VA, Luna EJA (2011). Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(3): 375–379.

Dumonteil E (2007). DNA vaccines against protozoan parasites: advances and challenges. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, 2007: 1–11.

Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela JG, Kamhawi S, Ortega, Rosales SPL, Lee BJ, Bacon KM, Fleischer B, Slingsby B, Cravioto MB, Tapia-Conyer R, Hotez PJ (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Review of Vaccines*, 11(9): 1043–1055.

- Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JCR, Robson SC, Colgan SP (2004). Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*, 104(13): 3986–3992.
- Fang D, Zhu J (2017). Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(7): 1861–1876.
- Farrow AL, Peng BJ, Gu L, Krendelchtchikov A, Matthews QL (2016). A novel vaccine approach for Chagas disease using rare adenovirus serotype 48 vectors. *Viruses*, 8(3): 78.
- Farrow AL, Rachakonda G, Gu L, Krendelchtchikova V, Nde PN, Pratap S, Lima MF, illalta F, Matthews QL (2014). Immunization with hexon modified adenoviral vectors integrated with gp83 epitope provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(8): e3089.
- Fietto JLR, DeMarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TMU, de Souza W, Bahia MT, Alves MJM, Verjovski-Almeida, S (2004). Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 454–460.
- Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG, Borges AM, Buck P, Dias F, Baron M, Ferreira LRP, Schmidt A, Marin-Neto JA, Hirata M, Sampaio M, Fragata A, Pereira AC, Donadi A, Kalil J, Rodrigues V, Cunha-Neto E, Chevillard C (2013). Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infectious Diseases*, 13(587): 1–17.
- 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. *Infection and Immunity*, 69(9): 5477–5486.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 53(1): 11–21.

Garcia MN, Murray KO, Hotez PJ, Rossmann SN, Gorchakov R, Ontiveros A, Woc-Colburn L, Bottazzi ME, Rhodes CE, Ballantyne CM, Aguilar D (2015). Development of chagas cardiac manifestations among Texas blood donors. *The American journal of cardiology*, 115(16):113–117.

Garg N, Tarleton RL (2002). Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*, 70(10): 5547–5555.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*, 115(1-2): 22–27.

Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ (2014). NF- κ B control of T cell development. *Nature Immunology*, 15: 15–25.

Glenting J, Wessels S (2005). Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial cell factories*, 4(26): 1–5.

Global Burden Disease Study 2013 Collaborators, GBD, (2015). Global, regional, and national incidence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 386(9995): 743–800.

Gorini S, Gatta L, Pontecorvo L, Vitiello L, la Sala A (2013). Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides. *American Journal Blood Research*, 3(1): 14–28.

Grando TH, Baldissera MD, de Sá MF, do Carmo GM, Porto BCZ, Aguirre GSV, Azevedo MI, de Jesus FPK, Santurio JM, Sagrillo MR, Stefani LM, Monteiro SG (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of immunological methods*, 449: 56–61.

Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J, Tapping RI (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *The Journal of Immunology*, 184: 5094–5103.

Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Rassi-Jr A, Rassi A, Schmidt A, Maciel BC, Marin Neto JÁ, Silva JS (2012). Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 6(4): e1630.

- Gupta S, Garg NJ (2010). Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8): e797.
- Gupta S, Garg NJ (2013). TcVac3 induced control of *Trypanosoma cruzi* infection and chronic myocarditis in mice. *PLoS One*, 8(3): e59434.
- Gupta S, Garg NJ (2015) A Two- Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination Strategy for eliciting long-term, protective T cell immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens* 11(5): e1004828.
- Gupta S, Silva TS, Osizugbo JE, Tucker L, Spratt HM, Garg NJ (2014). Serum-mediated activation of macrophages reflects TcVac2 vaccine efficacy against Chagas disease. *Infection and Immunity*, 82(4): 1382–1389
- Gutierrez FR, Guedes SPM, Gazzinelli RT (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, 31:673–685.
- Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS (2009). The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (Suppl.1): 236–245.
- Hasko G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, 25: 33–39.
- Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Kanno Y, O’Shea JJ (2010). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21:425–434.
- Hotez PJ, Alvarado M, Basanez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, Brooker SJ, Brown AS, Buckle G, Budke CM, Carabin H, Coffeng LE, Fèvre EM, Fürst T, Halasa YA, Jasrasaria R, Johns NE, Keiser J, King CH, Lozano R, Murdoch ME, O’Hanlon S, Pion SD, Pullan RL, Ramaiah KD, Roberts T, Shepard DS, Smith JL, Stolk WA, Undurraga EA, Utzinger J, Wang M, Murray CJ, Naghavi M (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8: e2865.
- Knight JM, Zingales B, Bottazzi ME, Hotez P, Zhan B (2014). Limited antigenic variation in the *Trypanosoma cruzi* candidate vaccine antigen TSA-1. *Parasite Immunology*, 36: 708–712.

Konduri V, Halpert MM, Liang D, Levitt JM, Cruz-Chan JV, Zhan B, Bottazzi ME, Hotez PJ, Jones KM, Decker WK (2017). Genetic adjuvantation of a cell-based therapeutic vaccine for amelioration of chagasic cardiomyopathy. *Infection and Immunity*, 85(9): 85–89.

Kulkarni R, Behboudi S, Sharif S (2011). Insights into the role of toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell and Tissue Research*, 343(1): 141–152.

Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M (2009). Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 48(11): 1534–1540.

Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA (2003). Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *Journal of immunology*, 170(6): 2962–2970.

Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ (2017). The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*, 8(607): 1–14.

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 amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human Gene Therapy*, 17: 898–908.

Maeda FY, Cortez C, Yoshida, N (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*, 3(361): 1–7.

Martinez-Campos V, Martinez-Vega P, Ramirez-Sierra MJ, Rosado-Vallado M, Seid CA, Hudspeth EM, Wei J, Liu Z, Kwityn C, Hammond M, Ortega-López J, Zhan B, Hotez PJ, Bottazzi ME, Dumonteil E (2015). Expression, purification, immunogenicity, and protective efficacy of a recombinant Tc24 antigen as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, 33(36): 4505–4512.

Matos MN, Cazorla SI, Bivona AE, Morales C, Guzman CA, Malchiodi EL (2014). Tc52 amino-terminal-domain DNA carried by attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* induces protection against a *Trypanosoma cruzi* lethal challenge. *Infection and Immunity*, 82: 265–275.

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. *Infection and Immunity*, 73: 7356–65.

Ministério da Saúde (2014). Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza. Ministério da Saúde, 2014. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2013_analise_situacao_saude.pdf

Munõz MJ, Murcia L, Segovia M (2011). The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Review Anti-Infective Therapy*, 9(1): 5–7.

Murphy K, Travers P, Walport M (2010). *Imunobiologia de Janeway*. 7^a Edição.

Oancea G, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Abele R, Tampe R (2009). Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 106: 5551–5556.

Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL (2009). CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Current Opinion in Immunology* 21: 385–390.

Pan American Health Organization (2016). Neglected infectious diseases in the Americas: Success stories and innovation to reach the neediest. Washington, DC, (PAHO, 2016).

Pérez-Molina JA, Norman F, López-Vélez R (2012). Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Current Infectious Disease Reports*, 14(3): 26374.

Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochemical Journal*, 410(2): 359–368.

Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martinez A, Radi R (2013). *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(7): 723–734.

Quijano-Hernandez I, Dumonteil E (2011). Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 7(11): 1184–1191.

Quijano-Hernández IA, Castro-Barcena A, Vázquez-Chagoyán JC, Bolio-González ME,

- Ortega-López J, Dumonteil E (2013). Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against an infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 31(18): 2246–2252.
- Rassi-Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723): 1388–402.
- Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature reviews. Cardiology*, 9(10): 576–589.
- Ribeiro AL, Rocha MO (1998). Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(3): 301–14.
- Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araujo AF, Machado AV, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O, Rodrigues MM (2011). Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 79(5): 2120–2130.
- Rock KL, York IA, Goldberg AL (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nature Immunology*, 5: 670–677.
- Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M (2012). The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of Parasitology Research*, 2012: 1–12.
- Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M (2012). The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of Toll-Like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of Parasitology Research*, 2012: 1–13.
- Rudulier CD, Kroeger DR, Bretscher PA (2012). Distinct roles of dendritic and B cells in the activation of naive CD4^{sup}.+ T cells.(cluster of differentiation). *Immunotherapy*, 4(4): 355(3).
- Salgado-Jimenez B, Arce-Fonseca M, Babylon-Pacheco L, Talamás-Rohana P, Rosales-Encina JL (2013). Differential immune response in mice immunized with the A, R or C domain from TcSP protein of *Trypanosoma cruzi* or with the coding DNAs. *Parasite Immunology*, 35(1): 32–41.

- Sanchez-Valdez FJ, Perez Brandan C, Ferreira A, Basombrio MA (2015). Gene-deleted live attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. *Expert Review of Vaccines*, 14: 681–697.
- Sansom FM, Robson SC, Hartland EL (2008). Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiology and molecular biology reviews*, 7(4): 765–781.
- Santos RF, Possa MA, Bastos MS, Guedes PM, Almeida MR, Demarco R, Verjovski-Almeida S, Bahia MT, Fietto JL (2009). Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(3): e387, 1–11.
- Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KRB, Marinho CRF, Lima MRD, Álvarez JM (2006). Contribution of NK, NK T, $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 74(4): 2031–2042.
- Schmunis GA, Yadon ZE (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1-2): 14–21.
- Serna C, Lara JA, Rodrigues SP, Marques AF, Almeida IC, Maldonado RA (2014). A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. *Vaccine*, 32: 3525–3532.
- Sosa-Estani S, Colantonio L, Segura, EL (2012). Therapy of Chagas disease: implications for levels of prevention. *Journal of Tropical Medicine*, 2012: 1–10.
- Takeuchi O, Akira S (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6): 805–820.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *TRENDS in Parasitology*, 18(6): 262–265.
- Valente SA, da Costa VV, das Neves PAY, de Jesus BCM, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of The Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 103(3): 291–297.
- World Health Organization (2011). Working to overcome the global impact of neglected

- tropical diseases - summary. *Weekly Epidemiological Record*, 86(13): 113–120.
- World Health Organization (2018). Fact sheet. Updated February 2018. (*WHO 2018*)
- World Health Organization e Pan American Health Organization (2018). Web Bulletins. August 2018. Asuncion/Washington D.C, (*PAHO/WHO 2018*).
- World Health Organization. Tropical disease research (2013). Program for research and training tropical disease (TDR). Fact sheet 340, Geneva, (*WHO 2013*).
- Yamamoto M, Takeda K (2010). Current views of toll-like receptor signalling pathways. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010: 1–39.
- Yamane H, Paul, WE (2012). Cytokines of the γ_c family control CD4⁺ T cell differentiation and function. *Nature Immunology*, 13: 1037–1044.
- Yamane H, Paul, WE (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews*, 252: 1–12.
- Yang L, Seki E (2012). Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Frontiers in Physiology*, 3: 1–18.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28: 445–489.
- Zimmermann H (2006). Ecto-nucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symposium*, 276: 113–128.
- Zimmermann H (2011). Purinergic signaling in neural development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22: 194–204.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a resposta imune induzida por vacina de DNA recombinante, codificando o antígeno NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi* (TcNTPDase-1) e NTPDase-1 recombinante em camundongos BALB/c.

Objetivos específicos

- ▶ Confirmar a expressão *in vitro* da proteína TcNTPDase-1 através da transfecção do plasmídeo recombinante em célula eucariótica (HEK 293);
- ▶ Padronizar os protocolos vacinais;
- ▶ Avaliar a capacidade imunogênica dos protocolos vacinais através da avaliação da produção de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2a) específicos contra TcNTPDase-1, bem como verificar o nível de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 e óxido nítrico (NO) e o perfil de linfócitos presentes no baço dos animais imunizados (linfócitos B e T);
- ▶ Verificar a capacidade de proteção das vacinas avaliando-se a presença de células com fenótipo de memória (CD44/CD62L), carga parasitária presente no tecido cardíaco dos animais desafiados e a sobrevivência desses animais.

CAPÍTULO 1

Evaluation of immunogenicity induced by recombinant protein TcNTPDase-1 and its encoding DNA against Chagas disease

Running title: Evaluation of two Chagas vaccine candidate

Abstract

More than a century after its discovery, Chagas disease still represents a neglected parasitic disease responsible for the most common form of nonischemic cardiomyopathy worldwide. In this study, we describe two different vaccine protocols, based in *T. cruzi* NTPDase-1 antigen, in murine model. The recombinant NTPDase-1 protein and DNA plasmid encoding NTPDase-1 immunogenicity was evaluated by production of specific antibodies, cytokines and NO. We also investigated its effect on the immunophenotype of murine splenocytes. After *T. cruzi* challenge, the content of cytokines and parasite DNA were determined in the cardiac tissue. The *T. cruzi* NTPDase-1 presented immunogenic potential. Protein protocol presented higher immunogenicity; however, the DNA protocol was more efficient in minimizing the parasitic load in the cardiac tissue.

Keywords: subunit vaccine; DNA vaccine; *T. cruzi*

Introduction

The World Health Organization (WHO) recognizes 17 neglected tropical diseases (NTDs) that blight the lives of a billion people in 149 countries and threaten the health of millions more. These tropical infections are strongly associated with poverty and concentrated mainly in a slum and remote rural areas of developing regions in Africa, Asia, and the Americas ¹. Chagas disease, today considered one of the most important NTDs globally, is a vector-borne disease, caused by the infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi*, responsible for 5.7–9.4 million cases in the continental Western Hemisphere ².

T. cruzi is an intracellular protozoan parasite that replicates intracytoplasmically and

establishes low-grade, lifelong infection. Oral infection with *T. cruzi* currently represents the most frequently documented route of transmission in Brazil ³.

The acute phase of infection is characterized by the presence of parasites in the host bloodstream and other tissues, promoting a severe inflammatory response ⁴. Detection of individuals during the acute phase of Chagas disease is rare because of the relatively nonspecific clinical symptoms observed in most of the infected patients ⁵. After the acute phase, generally asymptomatic, the infection evolves to a silent chronic phase. However, after a variable period of time (10–30 years after the onset of infection), 30–40% of the patients develop symptomatic cardiac alterations, including heart failure, arrhythmias, and thromboembolism, which cause major disabilities with high economic and social impact ⁶. Benznidazole, the chemotherapeutic agent most often used for the treatment of chagasic patients, is highly toxic and has limited efficacy, especially in the chronic phase of the disease ⁷.

The strategy for Chagas disease control is based on vector control; systematic screening of blood donors in all endemic countries; detection and treatment of congenital transmission; and treatment of infected children and acute cases. Increased traveling and migration of individuals from endemic to non-endemic areas have presented a worrisome scenario for congenital infection, blood transfusions, and organ transplantations. It has been estimated that over 300,000 people infected with *T. cruzi* currently live in the United States ⁸ and, although relatively limited, epidemiological data from Europe has estimated 59,000–108,000 cases of Chagas disease, with higher numbers in Spain and Italy ⁹. Thus, a disease that was traditionally contained in Latin America, where it still predominantly occurs, has now crossed these boundaries ³. Different approaches have been tested to the development of Chagas vaccine, however, all candidates are still in the preclinical phase of testing and not yet in clinical trials ¹⁰.

An ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), localized on the external surface of the parasite, was characterized as facilitators of infection and virulence of *T. cruzi* ^{11,12}. In the present work, we examined the profile of the immune response that was developed in vaccinated mice with recombinant *T. cruzi* NTPDase-1, and plasmid DNA coding *T. cruzi* NTPDase-1. As well as the induction of protection against *T. cruzi* challenge.

Material and Methods

Experimental animals

Female BALB/c mice (6-8 weeks old) were purchased from the Central Animal Laboratory of the Center of Biosciences and Health of the Federal University of Viçosa (Brazil) and maintained under conditions of controlled temperature at 21 ± 2 °C, relative humidity of 60–70 %, and 12 h light/dark cycle. The study was performed according to the norms established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Viçosa (47/2014), and Oswaldo Cruz Institute-Fiocruz (051/2015) approved the protocol of the study.

Expression and purification of rTcNTPDase-1

The plasmid containing the TcNTPDase-1 (Accession N^o. AY540630) construct was kindly provided by Dra Juliana Lopes Rangel Fietto¹¹, and used to transform *E. coli* strain BL21 (DE3) for expression of the recombinant protein. The rTcNTPDase-1 was obtained by transfer an aliquot of transformed *E. coli* BL21 (DE3) to 1 L of sterile Luria-Bertani (LB) medium containing 100 µg/ml of ampicillin. Culture was then incubated at 37°C with shaking at 220 rpm until reaching OD 600. The expression of rTcNTPDase-1 was induced with 0.4 mM IPTG for 4 h at 37°C and shaking at 220 rpm, being protein expressed in inclusion body. The cells were then collected and lysed with lysis buffer. The resulting precipitate containing the inclusion bodies was solubilized with denaturation buffer (150 mM NaCl, 400 mM Tris-HCl, 8 M urea), pH 8.0 and purified. The protein was then dialyzed against PBS to reduce urea concentration and subsequently eluted with 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 300 mM imidazole, pH 8.0. The expression of rTcNTPDas-1 was confirmed by SDS-PAGE and its concentration determined by using the bicinchoninic acid-BCA method (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) and then used in the immunizations.

Construction of recombinant DNA vaccine

For the construction of the DNA vaccine, the cDNA for TcNTPDase-1 was subcloned into the eukaryotic expression vector pVAX (Invitrogen™). The recombinant plasmid

and the empty vector were used to transform competent *E. coli* DH5- α cells by heat shock, which were cultured separately on plates containing LB culture medium and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin and then incubated overnight at 37°C. The purified plasmids were obtained after inoculation of an aliquot of the bacterium into 100 ml of LB culture medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) containing kanamycin for approximately 16 h at 37°C and shaking at 220 rpm. Thereafter, the cell culture was centrifuged at 7.000 x g for 15 min at 4°C to obtain the precipitate. After high-density fermentation, the supercoiled plasmid was purified in an automatized system (ÄKTA) with PlasmidSelect system (GE Healthcare), as manufacturer's specification.

Transfection assay

For the *in vitro* expression analysis of NTPDase-1 cDNA, HEK 293 cells were transfected with DNA vaccine construction (pVAX/NTPDase-1) or pVAX empty plasmid (control). In a 6 well plate were used purified DNA (2 $\mu\text{g}/\text{well}$) and lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) as per the manufacturer's protocol. The cells were incubated with anti-NTPDase-1 antisera (1:40) for 2 h and then incubated with secondary antibody anti-IgG-FITC (1:1000) (Sigma). DAPI (Sigma) was used for nuclear staining. The images were acquired using an EVOS FL Auto Imaging System.

Animal immunization and infection protocol

The animals were randomized into four groups of five animals each: PBS or pVAX empty plasmid for control group; rNTPDase-1 (*T. cruzi* recombinant NTPDase-1 formulated in saponin 0.1%) and pVAX/NTPDase-1 (DNA vaccine construction). Each animal was injected (i.m.) with 100 μg of DNA (pVAX or pVAX/NTPDase-1) or 10 μg of rNTPDase-1 (s.c). All received three doses, one every 15 days, the control group received only PBS solution or empty pVAX. The mice were euthanized fifteen days after the final immunization, and immunological tests were performed.

Infected animals, following the same immunization protocol, were inoculated (i.p.) with *T. cruzi* Y strain (5,000 trypomastigote forms in 0.1 ml of infected mouse blood) fifteen days after the final dose. The animals were euthanized fifteen days after the challenge. The heart was collected and weighed, for quantification of cytokines and parasite burden. Three independent experiments were carried out to generate a result. To obtain

the survival curve the groups of six animals infected with *T. cruzi* were observed daily for a period of 30 days. The survival rate was expressed as a percentage of the accumulated deaths within the experimental period.

Evaluation of antibody responses

The specific humoral response was determined by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum was collected 7 days after each immunization and stored at -20°C. Microplates were coated with recombinant NTPDase-1 (10µg/ml) in a bicarbonate buffer and incubated at 4°C overnight. After blocking with 5% powdered milk, mice serum (1:40 dilution) was separated added in duplicate and incubated at 37°C. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:7,000 dilution), IgG1 (1:10,000 dilution), and IgG2a (1:10,000 dilution) were added, followed by OPD substrate addition. The absorbance was measured in a microplate reader at 450 nm.

Detection of nitric oxide (NO)

NO production was quantified by the accumulation of nitrite in the serum, using the standard Griess reaction. Briefly, 50 µl sera were incubated with an equal volume of the Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄) for 10 min, at room temperature. The absorbance was measured at 550 nm in the microplate scanning spectrophotometer. The conversion of absorbance into micromolar concentrations of NO was deduced from a standard curve using a known concentration of NaNO₂.

Cytokine determination

Samples of serum obtained fifteen days after the last immunization and heart homogenates obtained 15 days after the *T. cruzi* challenge were assessed for IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17 levels by Cytometric Bead Array (CBA; BD Biosciences, USA). The analysis was performed in a FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, USA).

Flow cytometry analysis

Spleen cells suspension (1×10^7) from each group of mice were harvested 15 days post last immunization. Red blood cells were eliminated by lysis buffer, after washing with ice-cold PBS, the cells were incubated with anti-CD19-PerCP-Cy5, anti-CD3-FITC, anti-CD4-APC-Cy7, anti-CD8-PE-Cy7, anti-CD44-PE at 4°C for 30 min in the dark. Then, the cells were fixed with PBS containing 1% FCS, 0.1% sodium azide and 2% paraformaldehyde. The analysis of surface markers was performed with fluorescence profiles through a FACSVerser flow cytometer (BD Biosciences, USA).

Cardiac parasite burden

Genomic DNA previously extract was adjusted to 25 ng/ μ l. Quantitative PCR was performed as previously reported¹³ using *T. cruzi* DNA primers (TCZ-F, 5'-CTCTTGCCCACAMGGG TGC-3', where M=A or C, and TCZ-R, 5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') and murine GAPDH primers (mGAPDH-F, 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3', and mGAPDH-R, 5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'). Each reaction plate contained a standard curve with parasite DNA and two negative controls, which consisted of a mixture of *T. cruzi* or GAPDH primers without sample DNA. *T. cruzi* DNA values were normalized by the data obtained from murine GAPDH. The efficiencies of amplification were automatically calculated by the StepOne software v2.0.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software and comparison of data between the two groups by Student's t-test. Data from three or more groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, the difference was considered statistically significant if $p < 0.05$.

Results

The *in vitro* expression of DNA vaccine plasmid encoding *T. cruzi* NTPDase-1 in mammalian cells (HEK 293 cells) was evaluated in a transfection assay. A perinuclear green fluorescence was observed in cells transfected with the recombinant

pVAX/NTPDase-1, evidencing the NTPDase-1 protein expression (Fig.1).

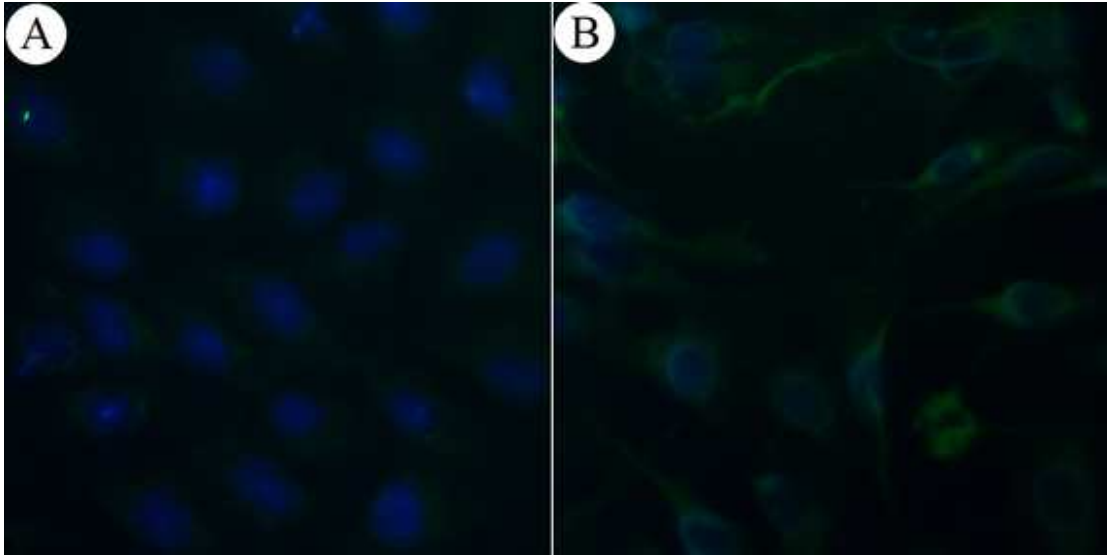


Figure 1: Fluorescence images of expression of TcNTPDase-1 (green signals) by DNA vaccine vector pVAX (A) and pVAX/NTPDase-1 (B) in HEK 293 cells. The cells were incubated with anti-NTPDase-1 antisera (1:40) and the with a secondary antibody anti-IgG-FITC (1:1000). Cell nuclear DNA was stained with DAPI (blue signals). Magnification 400X.

Specific antibody production against *T. cruzi* recombinant NTPDase-1 in the sera of all mice was evaluated seven days after each immunization. Mice immunized with recombinant protein present a faster total IgG kinetics than the DNA group. However, the same magnitude of response was achieved after the third dose and maintained after seven days (Fig. 2A). Elevated specific antibody production was observed seven days after the third dose, for both subclasses of IgG1 and IgG2a (Fig. 2B, 2C). Mice immunized with DNA show a lower specific production in comparison to mice receiving recombinant protein.

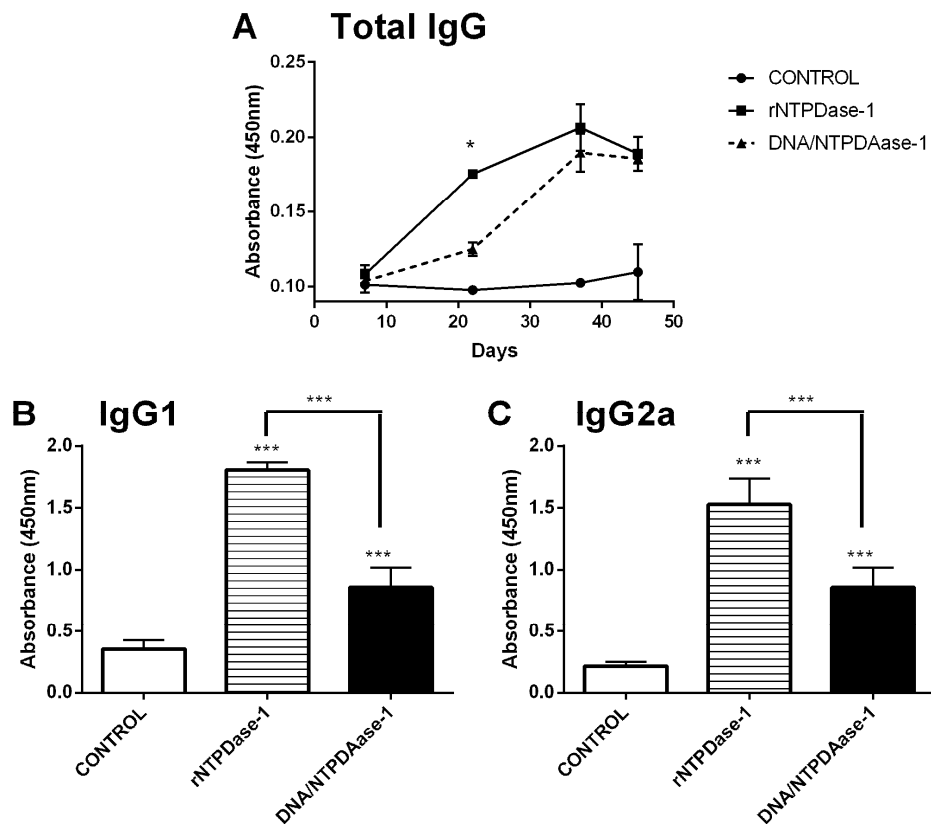


Figure 2: Specific antibody response. Groups of five mice were immunized with PBS (control), NTPDase-1 recombinant, or DNA/NTPDase-1. (A) Total IgG, (B) IgG1 and (C) IgG2a. Data represent mean \pm SEM in one of three similar experiments (n=5 animals). * $p < 0.05$ Tukey's test.

We further evaluated the frequency of T cells population, 15 days after immunization. Our results reveal a similar frequency of T cells ($CD3^+/CD4^+$ and $CD3^+/CD8^+$) in the control group and in the groups vaccinated with recombinant protein or DNA. There was no difference in the percentage of $CD19^+$ B cells (data not shown). Although there was a significant increased frequency of activated T cells ($CD4^+/CD44^+$ and $CD8^+/CD44^+$) in protein vaccinated group compared to the control group or even the group vaccinated with DNA (Fig. 3).

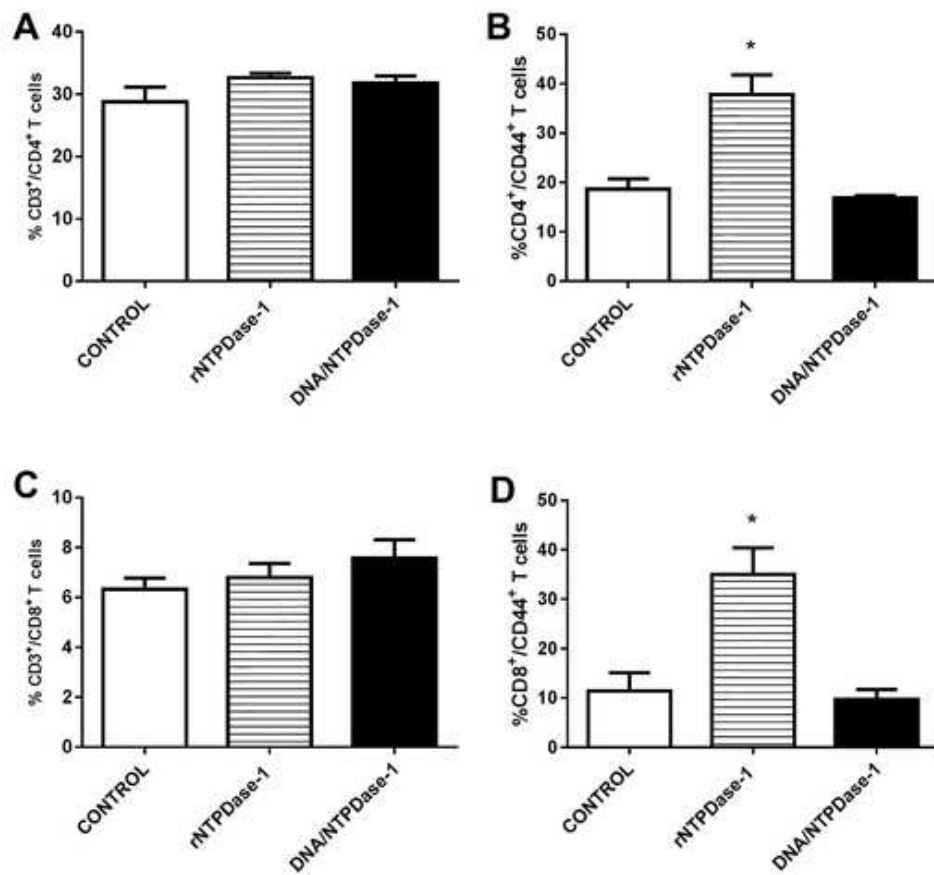


Figure 3: Immunophenotypic characterization of spleen T lymphocytes after immunization. Percentage of spleen T cells CD3⁺/CD4⁺ (A) and CD3⁺/CD8⁺ (C), expressing activation markers CD4⁺/CD44⁺ (B) and CD8⁺/CD44⁺ (D), 15 days after the last dose. Data represent mean \pm SD in one of three similar experiments (n=5 animals). * p<0.05 Tukey's test.

To evaluate the immune response induced by NTPDase-1 vaccination, recombinant protein and DNA, the cytokines levels in serum were examined 15 days after the last immunization. There were no significant difference in the Th1 cytokines (TNF- α and IFN- γ) levels in the serum of the two vaccinated groups. The levels of Th2 cytokines (IL-6 and IL-10) were significantly lower after vaccination with recombinant protein and DNA, in comparison to control group. No difference was detected in the IL-4 levels (Fig. 4).

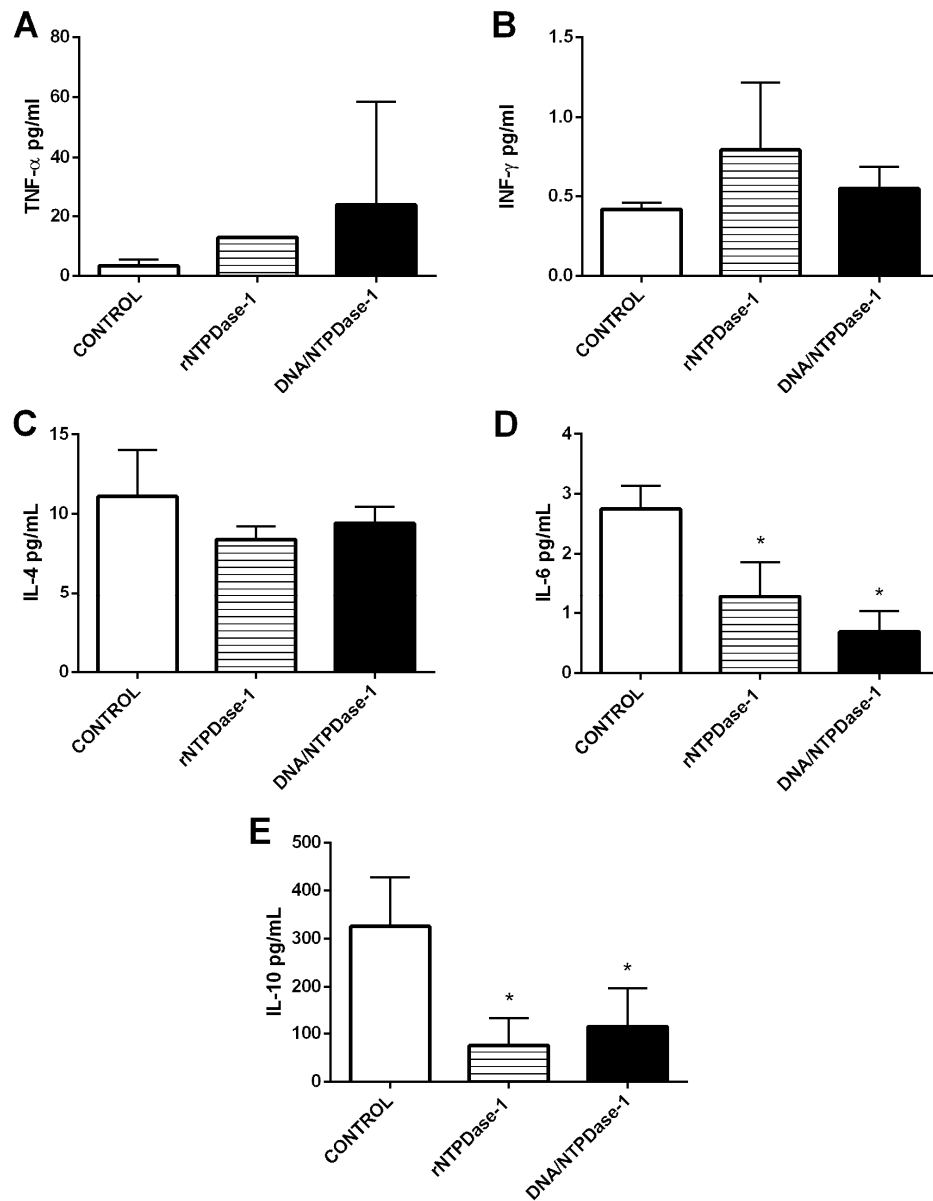


Figure 4: Cytokine response elicited by vaccination. Concentration of TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-4 (C), IL-6 (D) and IL-10 (E) cytokines in the serum was measured by cytometric bead array CBA (BD Bioscience). Each bar represents the mean \pm SD of triplicate samples and is a representative experiment of three assays. * $p < 0.05$ Tukey's test.

The concentration of nitric oxide was measured in the serum of immunized mice. Higher NO levels were detected in recombinant protein immunized mice compared with the control group, 15 days after the last dose (Fig. 5).

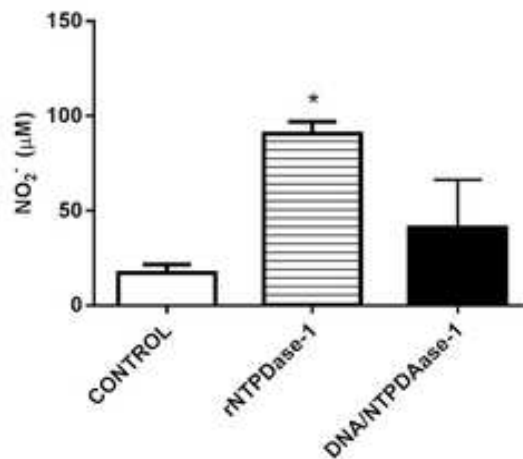


Figure 5: Nitrite production in the serum of mice following three doses. 15 days after the last immunization, the serum was collected and nitrite levels were measured by Griess reaction. Each bar represents the mean \pm SD of triplicate samples and is a representative experiment of three assays. * $p < 0.05$ Tukey's test.

With the aim to evaluate the effect of *T. cruzi* infection on the pattern of the immune response induced by NTPDase-1 two different vaccination protocols (protein and DNA), we analyzed the cytokines levels in the heart. Mice were intraperitoneally challenged with Y strain of *T. cruzi*, two weeks after the last immunization. Groups of mice were euthanized 15 days post-challenge, the TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 and IL-10 heart content were similar in the three groups (data not shown). Interestingly, a significant high IL-17 level was detected after challenge in DNA group (Fig. 6).

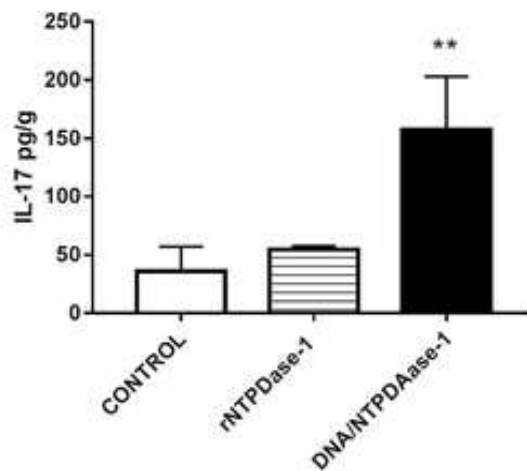


Figure 6: IL-17 levels in heart after challenge in vaccinated mice. Group of BALB/c mice were challenged 15 days after the third dose, with *T. cruzi* Y strain, IL-17 were measured in cardiac homogenate by cytometric bead array CBA (BD Bioscience). Each bar represents the mean \pm SD of triplicate samples and is a representative experiment of three assays. ** $p < 0.01$ Tukey's test.

On day fifth post-challenge the parasitic burden was evaluated, in terms of *T. cruzi* DNA. Significantly lower *T. cruzi* genetic material was detected from heart tissue of DNA immunized mice compared with control animal group, and rNTPDase-1 group (Fig. 7a). Monitoring of the survival of the animals after challenge with *T. cruzi* Y strain occurred for a period of 30 days. It is possible to observe there was no death in the both immunized groups and that 50% of the control animals had died (Fig. 7b)

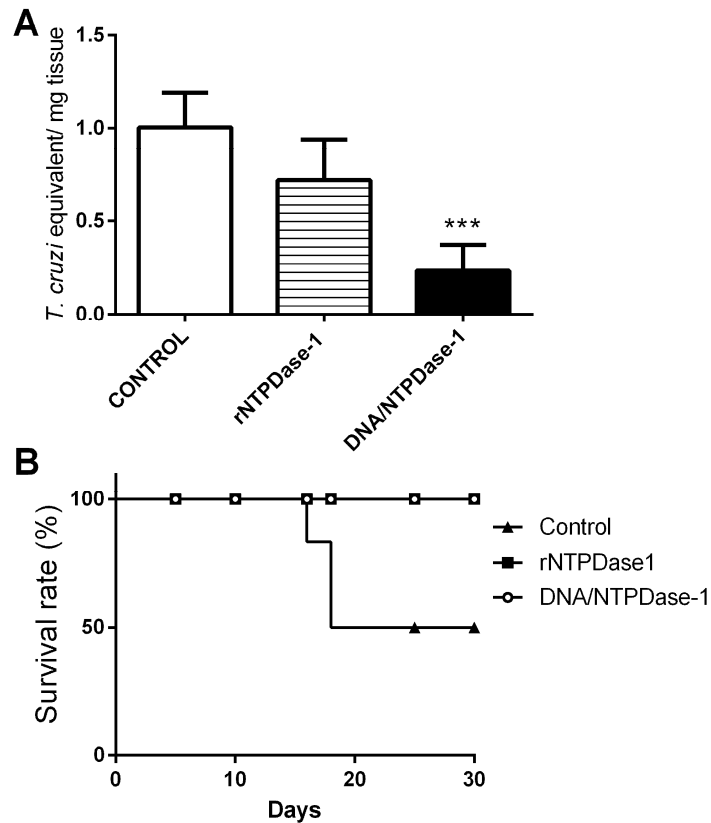


Figure 7: Parasite load and survival rate. A) Quantification of parasite burden by qPCR. The *T. cruzi* equivalent/mg of heart was valued 15 days post-infection. Each bar represents the mean \pm SD of triplicate samples and is a representative experiment of three assays. *** $p < 0.05$ Tukey's test. B) Mice were challenged with 5,000 trypomastigote forms 15 days after the last immunization, survival was monitored for 30 days.

Discussion

Trypanosoma cruzi is the causal agent of Chagas disease that affects millions of people around the world, mostly in South and Central America. *T. cruzi* expresses a wide variety of proteins on its surface membrane which has an important role in the biology

of these parasites¹⁴. NTPDase-1 activity was characterized on the external surface of *T. cruzi*, and correlated with infectivity and virulence^{11,12}. Extracellular ATP originating during lysis of *T. cruzi*-infected cells is a direct target of parasite ectonucleotidases, like ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ecto-NTPDase). ATP hydrolysis by NTPDase has the potential to subvert and avoid host defense mechanisms, in normal conditions ATP triggers the release of proinflammatory cytokines mediated by the activation of type 2 purinergic receptors to control the infection¹⁵⁻¹⁷. In the present work, we report the immune response developed by vaccinated mice with recombinant *T. cruzi* NTPDase-1 protein or DNA plasmid encoding NTPDase-1.

Innate and acquired cell-mediated immune responses are induced after experimentally induced acute *T. cruzi* infection, and combined mobilization of NK cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells, and antibody-producing B cells are required for establishing host resistance¹⁸. Our results demonstrate that recombinant protein vaccines NTPDase-1 formulated on saponin was more efficient than DNA, in stimulating specific total IgG response. In 1982, Krettli and Brener described that antibodies against *T. cruzi* living blood forms are important for monitoring protection in experiments of vaccination, even as an important element in establishing a reliable criterion of cure in human Chagas disease¹⁹.

Recombinant protein vaccines have some disadvantages against *T. cruzi* infection. *T. cruzi* strains are highly diverse and it is difficult to have a protein vaccine that can confer broad protections cross different strains. In addition, protein vaccines are more suitable for inducing antibody responses and are not efficient in eliciting the cell-mediated immunity that is essential for controlling the intracellular stage of a pathogen²⁰. Both NTPDase-1 vaccine protocols do not alter the T lymphocyte (CD4⁺ and CD8⁺) and B (CD19⁺) profile in the spleen. However, vaccination with recombinant protein was able to significantly increase the percentage of activated T lymphocytes.

Gama interferon (IFN- γ) is a critical cytokine in host resistance to *T. cruzi* infection, presumably by controlling the early replication of parasites in host macrophages²¹. Traditionally thought to be the CD4⁺ T cell subset most important for IFN- γ response to *T. cruzi*, however, NK cells actively participate at the early phase of infection²². IFN- γ , synergistically with TNF- α , induces NO synthesis by macrophages, a critical mediator for killing of causal organisms during the acute phase of infection²³. There was no

significant production of Th1 cytokines fifteen days after immunization (IFN- γ and TNF- α), for both NTPDase-1 protocols. In the meantime was observed significantly elevated NO serum levels, in recombinant protein group. As previously demonstrated, the action of nitric oxide is crucial for intracellular elimination of *T. cruzi* during the acute phase. Interestingly, both protocols evaluated resulted in the significant reduction of circulating anti-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-10).

The interleukin-17 is a proinflammatory cytokine, mainly produced by activated CD4⁺ T cells, which are now classified as Th17 cells. But can also be produced by CD8⁺, $\gamma\delta$ T cells, NK cells, and neutrophils^{24,25}. Th17 cells confer significantly stronger protection against *T. cruzi*-related mortality, than even Th1 cells, through the IL-17A-dependent induction of NADPH oxidase, involved in the phagocyte respiratory burst response, and provide indirect help through IL-21-dependent activation of CD8⁺ T cells²⁶. Thus IL-17A is essential for the host's protection during acute-phase *T. cruzi* infection²⁷.

Our results demonstrate that immunization with DNA encoding NTPDase-1 results in significantly increased levels of IL-17A in cardiac tissue, thirty days post *T. cruzi* challenge associated with a significant reduction of parasitic burden in cardiac tissue. A recent study demonstrates that high plasma IL-17A levels were correlated with better left ventricular function, in human chronic Chagas disease, suggesting an important immunomodulatory role, involved in protection against myocardial damage²⁸.

Similarly, a study in a canine model, demonstrate that a eukaryotic expression plasmid containing the TcSP and TcSSP4 gene were able to reduce the acute phase of infection, resulting in cardiac and clinical protection than that of using a recombinant protein²⁹.

DNA immunization resulting in increased expression of IL-17A in cardiac tissue, after the *T. cruzi* challenge. Simultaneously, this group presented IL-6 and IL-10 reduction as described for the protein group after immunization. The IL-17A has been associated with recruitment of suppressive IL-10-producing neutrophils, necessary to prevent inflammatory damage and mortality during *T. cruzi* infection³⁰.

Conclusion

In conclusion, the *T. cruzi* NTPDase-1 present immunogenic potential. The three doses recombinant protein protocol was able to: stimulate increased production of specific

antibodies; induce activation profile in splenic CD4 and CD8 T cells; reduce anti-inflammatory cytokines serum levels, and increase NO production. However, the three doses of plasmid DNA encoding *T. cruzi* NTPDase-1 protocol was responsible for increased production of IL-17A in cardiac tissue after challenge, as well as reduction of parasite load in the same organ. Both vaccine protocols were able to protect the mice from challenge with lethal doses of *T. cruzi*. These observations suggest that successful control of *T. cruzi* infection involves a balance between stimulation of inflammatory immune response and the regulation of this response to prevent extensive host tissue destruction.

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian funding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-02226-14 and PPM-00485-16). We thank Maria de Nazaré Correia Soeiro from Laboratory of Cellular Biology (Fiocruz-RJ). Karla Veloso Gonçalves Ribeiro has been supported by a grant of CAPES (Sandwich PhD) (process number: 88881.133528/2016-01).

References

1. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - summary. *Wkly Epidemiol Rec.* 2011; 86(13):113–20.
2. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet.* 2015; 386(9995):743–800.
3. Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *Plos neglect.* 2014; 8(7):1-10.
4. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002; 18,262-265.

5. Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, *et al.* Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *Plos Negl Trop Dis.* 2010; 4(6):711.
6. Benziger CP, Carmo GAL, Ribeiro ALP. Chagas cardiomyopathy. *Cardiol Clin.* 2017; 35:31-47.
7. García S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1521–1528.
8. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24:655–681.
9. Angheben A, Anselmi M, Gobbi F, Marocco S, Monteiro G, Buonfrate D, *et al.* Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. *Euro Surveill.* 2011; 16:19969.
10. Beaumier CM, Gillespie PM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine.* 2016; 34(26):2996-3000.
11. Fietto JLR, DeMarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TMU, *et al.* Characterization and immunolocalization of a NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004; 316:454-460.
12. Santos RF, Pôssa MAS, Bastos MS, Guedes PMM, Almeida MR, DeMarco R, Almeida SV, Bahia MT, Fietto JLR. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *Plos Negl Trop Dis.* 2009; 3:387.
13. Novaes RD, Santos EC, Fialho MCQ, Gonçalves WG, Sequetto PL, Talvani A, Gonçalves RV. Nonsteroidal anti-inflammatory is more effective than anti-oxidant therapy in counteracting oxidative/nitrosative stress and heart disease in *T. cruzi*-infected mice. *Parasitology.* 2017; 144(7):904-916.
14. Pech-Canul AC, Monteón V, Solís-Oviedo RL. A Brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res.* 2017; 3751403.

15. Silverman JA, Qi H, Riehl A, Beckers C, Nakaar V, Joiner KA. Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J Biol Chem.* 1998; 273:12352–12359.
16. Sansom FM, Newton HJ, Crikis S, Cianciotto NP, Cowan PJ, d'Apice AJ, Hartland EL. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* 2007; 9:1922–1935.
17. Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 200; 165:4704–4709.
18. Rottenberg M, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Orn A. Role of T helper/inducer cells as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J. Immunol.* 1988; 28:573-582.
19. Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol.* 1982; 128:2009-2012.
20. Ma Y, Weiss LM, Huang H. Strategy for the development of Chagas disease. *J Vaccines Res.* 2015; 1:001.
21. Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* 1991; 146(10):3626-32.
22. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun.* 1996; 64(1):128-34.
23. Silvia JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 1995; 63(12):4862-7.
24. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004; 21: 467–476.

25. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol.* 2003; 170: 2106–2112.
26. Cai CW, Blasé JR, Zhang X, Eickhoff CS, Hoft DF. Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. *Plos One.* 2017; 12(3):1-23.
27. Miyazaki Y, Hamamo S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010; 185:(2):1150-1157.
28. Juliana GR, Gomes AS, Damasio MPS, Nunes MCP, Costa HS, Medeiros NI, Fares RCG, Chaves AT, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC. The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. *PLoS One.* 2017; 9(12):e0172833.
29. Rodríguez-Morales O, Pérez-Leyva MM, Ballinas-Verdugo MA, Carrilo-Sánchez SC, et al. Plasmid DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* genes induces cardiac and clinical protection against Chagas disease in the canine model. *Vet Res.* 2012; 43(1):79.
30. Boari T, Amezcua WMC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10 producing neutrophils. *Plos Pathog.* 2012; 8(4):e1002658.