



Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG



Departamento de Bioquímica e Imunologia

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

**CLONE NÃO PATOGÊNICO DE *Trypanosoma cruzi*
EXPRESSANDO ANTÍGENO TUMORAL
COMO VETOR VACINAL CONTRA O CÂNCER**

Caroline Furtado Junqueira

Belo Horizonte

2011

CAROLINE FURTADO JUNQUEIRA

**CLONE NÃO PATOGÊNICO DE *Trypanosoma cruzi*
EXPRESSANDO ANTÍGENO TUMORAL
COMO VETOR VACINAL CONTRA O CÂNCER**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

BELO HORIZONTE

Março de 2011

Ao Mario, por todo o amor, companheirismo

e acima de tudo compreensão.

Te amo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Catarina e José Alberto por estarem ao meu lado ao longo da minha vida, me aconselhando, ajudando e apoiando. Por me fazerem ter orgulho e dedicação à profissão que eu sempre sonhei desde pequena, não me deixando fraquejar nos tão comuns momentos de dúvida.

Aos meus irmãos, Bruno e Diana, por estarem sempre perto, mesmo que muitas vezes distantes.

À minha avó Maria, que com seu amor, carinho e suas orações me ajudou a chegar até aqui.

Ao meu querido marido, Mario, que ao longo destes quatro anos me apoiou incondicionalmente. Agradeço por ter abrido mão da minha companhia, por saber a importância desta profissão para mim e por ter me amparado nos diversos momentos de fraqueza.

Aos meus sogros e cunhados, pelo constante suporte.

Ao meu orientador, Ricardo, por ter acreditado no meu potencial e pelos inúmeros ensinamentos. Por ter me mostrado que a ciência é feita de organização, dedicação e principalmente detalhes.

Ao Bruno, por ter sido um grande companheiro científico, ao qual eu tenho que agradecer todos os dias pelos imensos... experimento, infecções, imunizações e ELISPOTs.

À Luara, Barbara, Warrison, Ana Paula e Flávia, todos que sem dúvida foram pessoas essenciais para essa minha conquista. Agradeço também por vocês terem feito experimentos tão exaustivos se tornarem momentos de descontração.

À Clécia, Eneida, Genice e Gisleine por fazerem do laboratório um local agradável para trabalhar e por não deixarem nos faltar nada.

À Lorena, Marina e Mirla por estarem sempre à disposição para ajudar.

À todos do LAIM e do IMPAR pela ajuda, pelas idéias, pela companhia e pela amizade.

Aos professores e amigos do Departamento de Bioquímica pelas consersas de corredor, pelos conselhos, pelas dúvidas científicas e principalmente pela amizade.

À todos do Ludwig, que tão bem me acolheram durante a minha estadia em NY.

Às agências de fomento, sem as quais nada disso seria possível: CNPq, CAPES, LICR – The Atlantic Philanthropies e Fapemig.

“Quando você procura por diamantes, não jogue fora os rubis”

“Você não saberá vacinar, enquanto você não souber imunizar”

Lloyd Old

SUMÁRIO

	Página
I. LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS -----	v
II. LISTA DE TABELAS -----	vii
III. LISTA DE FIGURAS -----	viii
IV. RESUMO -----	xi
V. ABSTRACT -----	xii
1. INTRODUÇÃO -----	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	1
1.2. Ativação da imunidade inata por <i>T. cruzi</i> -----	2
1.3. Câncer -----	6
1.4. Imunologia do câncer -----	7
1.5. Antígenos “Cancer/Testis” -----	10
1.6. NY-ESO-1 -----	12
1.7. Imunoterapia do Câncer -----	13
1.8. Vacinas -----	15
1.9. Vetores vacinais -----	16
1.10. <i>T. cruzi</i> e Câncer -----	17
1.11. CL-14 -----	18
1.12. Transformação de Tripanossomatídeos -----	19
2. JUSTIFICATIVA -----	21
3. OBJETIVOS -----	22
3.1. Geral -----	22
3.2. Específicos -----	22
4. METODOLOGIA-----	23
4.1. Obtenção e manutenção de camundongos para experimentação animal -----	23

4.2. Avaliação da atividade adjuvante de agonistas de TLRs derivados de <i>T. cruzi</i> ---	23
4.2.1. Síntese de CpG ODNs -----	24
4.2.2. Extração de endotoxina de amostras proteicas -----	24
4.2.3. Teste <i>Limulus amebocyte</i> Lysate (LAL) -----	24
4.2.4. Imunizações com OVA -----	25
4.2.5. Imunizações com NY-ESO-1 -----	25
4.2.6. Predição <i>in silico</i> de epítomos de linfócitos T específicos para NY-ESO-1---	25
4.2.7. Síntese de peptídeos -----	26
4.2.8. “Screening” <i>ex vivo</i> dos peptídeos sintetizados para NY-ESO-1 -----	26
4.2.9. ELISA -----	27
4.2.10. Cultivo de esplenócitos -----	27
4.2.11. ELISA de citocinas -----	28
4.2.12. Cultivo de linhagens tumorais de melanoma B16 WT e B16 NY-ESO-1 ----	28
4.2.13. Desafio com melanoma B16 -----	28
4.3. Caracterização do clone de <i>T. cruzi</i> CL-14 -----	29
4.3.1. Cultivo de <i>T. cruzi</i> -----	29
4.3.2. Infecção <i>in vivo</i> com <i>T. cruzi</i> em camundongos selvagens e imunodeficientes -----	29
4.3.3. Parasitemia e mortalidade em camundongos infectados -----	30
4.3.4. Desafio de animais imunizados com a clone CL-14 -----	30
4.4. Construção de <i>T. cruzi</i> expressando NY-ESO-1 -----	30
4.4.1. Clonagens (estratégia) -----	30
4.4.2. Eletroforese em agarose -----	32
4.4.3. Transfecção de <i>T. cruzi</i> -----	32
4.4.4. Clonagem de parasitos em placas de ágar sangue -----	33
4.4.5. Extração de DNA de <i>T. cruzi</i> -----	33
4.4.6. <i>Southern Blot</i> -----	34

4.4.7. Preparação e hibridização das sondas radioativas -----	34
4.4.8. <i>Western Blot</i> -----	35
4.4.9. Microscopia confocal -----	36
4.5. Avaliação da capacidade dos parasitos transgênicos, em induzir resposta celular em células de humanos -----	36
4.5.1. Imunohistoquímica de linhagens de melanomas humanos infectados com <i>T. cruzi</i> -----	36
4.5.2. Separação de PBMC de amostras de sangue humano -----	37
4.5.3. Sensitização <i>in vitro</i> de linfócitos T CD4+ e T CD8+ -----	37
4.5.4. ELISPOT -----	38
4.5.5. Citometria de fluxo para avaliação de linfócitos CD8+/ tetrâmero+ -----	39
4.6. Avaliar a capacidade dos parasitos transgênicos de induzir resposta imune anti-NY-ESO-1 -----	39
4.6.1. Imunização de animais com <i>T. cruzi</i> transgênicos -----	39
4.6.2. Avaliação da resposta celular -----	39
4.6.2.1. Citometria de fluxo para avaliação de linfócitos CD8+/ tetrâmero+ -----	39
4.7. Avaliar a capacidade protetora induzida pela imunização com parasitos transgênicos -----	40
4.8. Avaliar a capacidade imunoterapêutica dos parasitos transgênicos -----	40
4.8.1. Cultivo de linhagens tumorais CMS5a e CT26 -----	40
4.8.2. Tratamento de animais previamente desafiados com linhagens tumorais -	40
4.9. Plotagem de dados e estatística -----	41
5. RESULTADOS-----	42
5.1. Caracterização de moléculas agonistas de TLRs derivadas de <i>T. cruzi</i> como adjuvantes imunológicos -----	42
5.2. Caracterização do clone de <i>T. cruzi</i> CL-14 quanto a sua não patogenicidade ----	48
5.3. Obtenção de parasitos do clone CL-14 expressando o antígenos tumoral NY-ESO-1 -----	49
5.4. Avaliação da capacidade dos parasitos expressando NY-ESO-1 em induzir resposta imune em modelo humano <i>in vitro</i> -----	53

5.5. Avaliação da capacidade dos parasitos expressando NY-ESO-1 em induzir resposta imune em modelo murino -----	57
5.6. Comparação entre protocolos de imunização empregando formulações contendo a proteína recombinante NY-ESO-1, com os vetores vacinais expressando tal antígeno -----	60
5.7. Avaliação imunoterapêutica de parasitos <i>T. cruzi</i> expressando NY-ESO-1 -----	61
5.8. Avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução da resposta antígeno-específica após imunizações com <i>T. cruzi</i> transgênicos -----	63
6. DISCUSSÃO -----	66
7. CONCLUSÃO -----	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	74
9. ANEXO -----	84
9.1. CETEA -----	86
9.2. pQE-9-NY-ESO-1 -----	87
10. APÊNDICE -----	88

II. LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

mA	miliAmpère
mm	milímetro (10^{-3} m)
μ m	micrômetro (10^{-6} m)
nm	nanômetro (10^{-9} m)
M	concentração molar (moles/L)
mM	concentração milimolar (10^{-3} moles/L)
μ M	concentração micromolar (10^{-6} moles/L)
% (p/v)	percentual peso por volume
% (v/v)	percentual volume por volume
DNA	ácido desoxi-ribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
kDa.	KiloDalton (10^3 Da.)
et al.	e demais colaboradores
g	grama
mg	miligrama (10^{-3} g)
μ g	micrograma (10^{-6} g)
ng	nanograma (10^{-9} g)
ρ g	picograma (10^{-12} g)
°C	graus Célsius ou Centígrados
h	hora
min	minuto
s	segundo
L	litro
ml	mililitro (10^{-3} L)
μ l	microlitro (10^{-6} L)
pH	potencial hidrogeniônico
MW	massa molecular
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
V	volts
q.s.p	completar até volume
U	unidades

TLR	Receptores do Tipo Toll
MyD88	gene preliminar da resposta de diferenciação mielóide
IL	Interleucina
-/-	duplo “nckout”
CT	Cancer/ Testis
APC	célula apresentadora de antígeno
DC	célula dendrítica
IFN- γ	interferon gama
IFN- α	interferon alfa
GPI	glicosilfosfatidilinositol
ODN	oligodeoxinucleotídeo
GIPL	glicoinositol-fosfolípides
NK	células “Natural Killers”
gp63	glicoproteína de 63 Kda
CTLA-4	antígeno associado ao linfócito T citotóxico
PAMPs	Padrões Moleculares Associadas à Patógenos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Th1	resposta auxiliadora do tipo 1
Th2	resposta auxiliadora do tipo 2
OVA	Ovalbumina
ASP	Proteína da superfície de amastigotas
pRb	Proteína do retinoblastoma
p53	Proteína de 53 Kda
PAMPs	Padrões Moleculares Associadas à Patógenos

II. LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Sequências dos CpG oligonucleotídeos sintetizados ----- 24**Tabela 2** – Sequências dos peptídeos sintetizados ----- 26

III. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 - Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário <i>T. cruzi</i> . -----	1
Figura 1.2 - Representação esquemática dos mecanismos imunológicos que medeiam a resposta imune inata com a adquirida. -----	3
Figura 1.3 - Representação esquemática de glicolipídeos derivados de <i>T. cruzi</i> , como agonistas de TLR 2/6 e TLR4. -----	4
Figura 1.4 - Representação esquemática de ilhas de motivos CpG ODN presentes no genoma de <i>T. cruzi</i> , como agonistas de TLR9. -----	5
Figura 1.5 - Representação esquemática do ciclo celular. -----	7
Figura 1.6 - Os Três Es da Imunoedição de tumores. -----	8
Figura 1.7 - Mecanismos imunológicos envolvidos na fase de eliminação de tumores. -----	9
Figura 1.8 - Comparação fenotípica entre a gametogênese e tumorigênese. -----	11
Figura 1.9 - Esquema representativo do “splicing” alternativo na sequência do gene NY-ESO-1. -----	12
Figura 1.10 - Comparação esquemática entre o curso de desenvolvimento da infecção por <i>T. cruzi</i> com o curso do câncer. -----	18
Figura 3.1 - Representação esquemática do vetor pROCKNY-ESO-1Neo. -----	31
Figura 3.2 - Cassete de inserção no genoma do parasito, após digestão com <i>NotI</i> . -----	32
Figura 5.1 - Avaliação de reposta imune induzida por imunização com agonistas de TLR 2 e TLR4. . -----	43
Figura 5.2. - Avaliação de reposta imune induzida por imunização com agonistas de TLR 9. -----	44
Figura 5.3. - Seleção de peptídeos como função de epítomos para linfócitos T. -----	45

Figura 5.4 - Avaliação da resposta imune induzida por imunização com o antígeno tumoral NY-ESO-1. .	46
Figura 5.5 - Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação com formulações contendo o antígeno NY-ESO-1. .	47
Figura 5.6 - Monitoramento da parasitemia e mortalidade de animais infectados com o clone CL-14 e com a cepa CL Brener. .	48
Figura 5.7 - Monitoramento da parasitemia e mortalidade de animais vacinados com o clone CL-14 e posteriormente desafiados com a cepa CL Brener. .	48
Figura 5.8 - Mapa de restrição das construções gênicas. .	49
Figura 5.9 - Integração do gene híbrido no genoma de epimastigota de CL-14. .	50
Figura 5.10 - Análise da expressão de NY-ESO-1 por <i>Western Blot</i> . .	51
Figura 5.11 - Expressão da proteína NY-ESO-1 nos três clones transgênicos. .	51
Figura 5.12 - Expressão da proteína NY-ESO-1 nas quatro fases do ciclo celular do parasito. .	52
Figura 5.13 - Expressão de NY-ESO-1 por parasitos transgênicos, após infecção em células de melanoma humanos. .	53
Figura 5.14 - Produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+, após protocolos de pressensitização. .	54
Figura 5.15 - Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8+, após protocolos de pressensitização. .	55
Figura 5.16 - Avaliação da frequência de células T CD8+/ NY-ESO-1+. .	56
Figura 5.17 - Resposta humoral anti-NY-ESO-1 induzida por vacinação com parasitos transgênicos. .	57
Figura 5.18 - Resposta celular anti-NY-ESO-1 induzida por vacinação com parasitos transgênicos. .	58

Figura 5.19 - Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação com parasitos transgênicos. -----	58
Figura 5.20 - Avaliação da resposta imune após vacinação comparativa entre protocolos vacinais. -----	59
Figura 5.21 - Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação comparativa entre protocolos vacinais. -----	60
Figura 5.22 - Acompanhamento do crescimento de melanoma B16 em animais tratados com parasitos transgênicos. -----	61
Figura 5.23 - Acompanhamento do crescimento de fibrosarcoma CMS5a em animais tratados com parasitos transgênicos. -----	61
Figura 5.24 - Acompanhamento do crescimento de adenoma de cólon CT26 em animais tratados com parasitos transgênicos. -----	62
Figura 5.25 - Resposta celular anti-NY-ESO-1 e anti-TSKB20 em animais deficientes. -----	63
Figura 5.26 - Avaliação da porcentagem de células CD8+ e tetrâmero+ para NY-ESO-1 e TSKB20 em animais selvagens e deficientes. -----	63
Figura 5.27 - Acompanhamento do crescimento tumoral em animais imunodeficientes após vacinação com parasitos transgênicos. -----	64

I. RESUMO

Devido à crescente incidência de câncer em todo o mundo e, ainda, às poucas intervenções médicas preventivas e até mesmo terapêuticas disponíveis, torna-se necessário o desenvolvimento de novos tratamentos. Em busca deste objetivo maior, o desenvolvimento de vacinas antitumorais torna-se uma promissora abordagem a ser aplicada na prevenção e no processo de cura do câncer. O presente projeto propõe uma nova ferramenta vacinal em que se alia os conhecimentos de antígenos tumorais, em especial os pertencentes à família dos “Cancer/testis”, juntamente aos preceitos de imunoparasitologia. Em uma breve descrição, foram abordados aqui a elaboração de uma vacina antitumoral, na qual são empregados componentes derivados do parasito *Trypanosoma cruzi*, os quais são agonistas de Receptores do Tipo Toll (TLR), em formulação com a proteína tumoral NY-ESO-1. Paralelamente, foi proposta uma prova de conceito, em que foram gerados parasitos *T. cruzi* expressando o mesmo antígeno tumoral a ser utilizado como vetor vacinal. Como resultado deste desafio experimental, observamos que as formulações solúveis contendo os agonistas de TLR e a proteína NY-ESO-1 foram capazes de retardar o crescimento tumoral. Por outro lado, quando avaliamos o parasito transgênico como vetor vacinal, observamos que este é capaz de inibir, por completo, o crescimento de tumores de maneira antígeno-específico. Complementarmente, é mostrada aqui uma prévia do que seria uma transposição para o modelo humano, onde o vetor vacinal gerado foi capaz de recrutar uma resposta de linfócitos T CD8+ e T CD4+ também específicos para o antígeno. Diante dos dados obtidos ao longo desta tese, acredita-se em um cenário promissor para o emprego de tais tecnologias na prevenção ou tratamento do câncer.

II. ABSTRACT

Due to the increasing incidence of cancer around the world and even fewer medical interventions and even preventive treatments available, it becomes necessary to develop new treatments. Toward that goal, the development of antitumor vaccines becomes a promising approach to be applied in the prevention and cure of cancer. This project proposes a new vaccine tool that joins the knowledge of tumor antigens, in particular those belonging to the family of "Cancer/testis", together with the precepts of immunoparasitology. In a brief statement, have been addressed here the development of an antitumor vaccine, which employ components derived from the parasite *Trypanosoma cruzi*, which are agonists of Toll Like Receptors (TLR), in formulation with the tumor protein NY-ESO-1. In parallel, it was proposal a proof of concept, which generated parasites *T. cruzi* expressing the same tumor antigen to be used as a vaccine vector. As a result of this experimental challenge, we observed that formulations containing soluble TLR agonists and protein NY-ESO-1 were able to slow tumor growth. On the other hand, when we assess the transgenic parasite vaccine as a vector, we observed that it is able to completely inhibit tumor growth in an antigen-specific manner. In addition, it is shown here a preview of what would be a transposition to the human model, where the vaccine vector was able to recruit a CD4 + T and CD8 + T cells immune response specific to the antigen. From the data obtained during this thesis, is believed to be a promising scenario for using these technologies in preventing or treating cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas. Possui um ciclo de vida complexo, no qual, além de sobreviver em dois hospedeiros, um invertebrado e o outro vertebrado, apresenta formas variadas em cada um deles (figura 1.1). O ciclo inicia-se no momento em que o *Tryatoma infestans*, vulgarmente conhecido como barbeiro, suga o sangue de um hospedeiro vertebrado infectado com o parasito *T. cruzi* em sua forma tripomastigota. Esse parasito, quando na cavidade gástrica do barbeiro, passa pelo processo de diferenciação em epimastigota, forma esta que se replica por repartição binária. Após o processo de multiplicação, os parasitos sofrem metaciclogênese na região posterior do intestino do inseto, denominando-se, assim, tripomastigotas metacíclicos. Esta é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado, o qual será infectado durante a picada do barbeiro. Durante a picada, centenas de tripomastigotas metacíclicos são inoculados e dentro de poucos segundos estes iniciam o processo de infecção nas células do hospedeiro. Uma vez infectado a célula, o parasito diferencia-se em amastigota, forma intracelular que é capaz de replicar e finalmente se transforma em tripomastigota para reinfecção de outras células ou reiniciar o ciclo (Chagas, 1909).

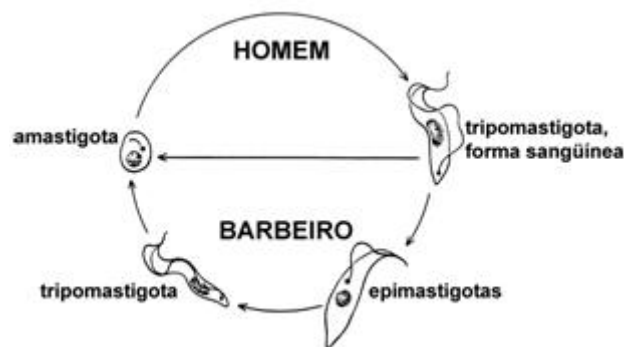


Figura 1.1

Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário *T. cruzi*.
http://www.sbi.org.br/sbinarede/SBInarede70/images/default_clip_image004.jpg

A infecção por *T. cruzi* é caracterizada por uma fase aguda, na qual ocorre uma elevada parasitemia e parasitismo tecidual acompanhada por vasta ativação do sistema imune, com aumento de citocinas circulantes e ativação de linfócitos B e T. A ativação do sistema imune

é responsável pelo controle da parasitemia e do parasitismo, podendo ocorrer a eliminação total dos parasitos ou evoluir para a fase assintomática, que é caracterizada pela difícil detecção de parasitos no organismo (Junqueira et al., 2010).

O curso natural da doença leva à ativação da fase crônica, podendo ser desde aquela assintomática, até a caracterizada pela presença de doenças cardíacas e digestivas severas. Dentre os sinais patológicos mais comuns da fase aguda, estão a cardiomiopatia e os megaesôfagos e megacólon (Junqueira et al., 2010).

1.2. Ativação da imunidade inata por *T. cruzi*

O controle da infecção por *T. cruzi* durante os estágios iniciais da infecção é dependente tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida, a qual induz a imunidade mediada por células (Golgher e Gazzinelli, 2004). Inicialmente, células dendríticas (DCs) e macrófagos infectados pelo parasito irão produzir IL-12 e TNF- α , citocinas estas responsáveis pela ativação de linfócitos e células “Natural Killers” (NK), respectivamente. Dentre os mecanismos efetores, a produção de IFN- γ pelas células NK irá ativar mais macrófagos, que produzirão moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio, responsáveis pela eliminação dos parasitos. Adicionalmente, as DCs irão apresentar antígenos aos linfócitos T, fazendo a ligação com a imunidade adquirida. A produção de IL-12 pelas DCs, assim como o IFN- γ pelas células NK irão diferenciar o fenótipo dos linfócitos T CD4+ para Th1, favorecendo desta forma, mecanismos efetores dependentes de linfócitos T CD8+ citotóxicos. A figura 1.2 ilustra os mecanismos imunológicos acima descritos.

O envolvimento dos Receptores do tipo Toll (TLRs) na resistência à infecção com *T. cruzi* é comprovado por estudos que demonstram que animais deficientes na molécula adaptadora “gene preliminar da resposta de diferenciação mielóide” (MyD88), assim como nos receptores para interleucina (IL) IL-1 e IL-18, apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo parasito (Campos et al., 2004). Além disso, animais deficientes para TLR2 e TLR9 apresentam redução na produção de IL-12 e interferon gama (IFN- γ), sendo altamente susceptíveis à infecção com *T. cruzi* (Bafica et al., 2006).

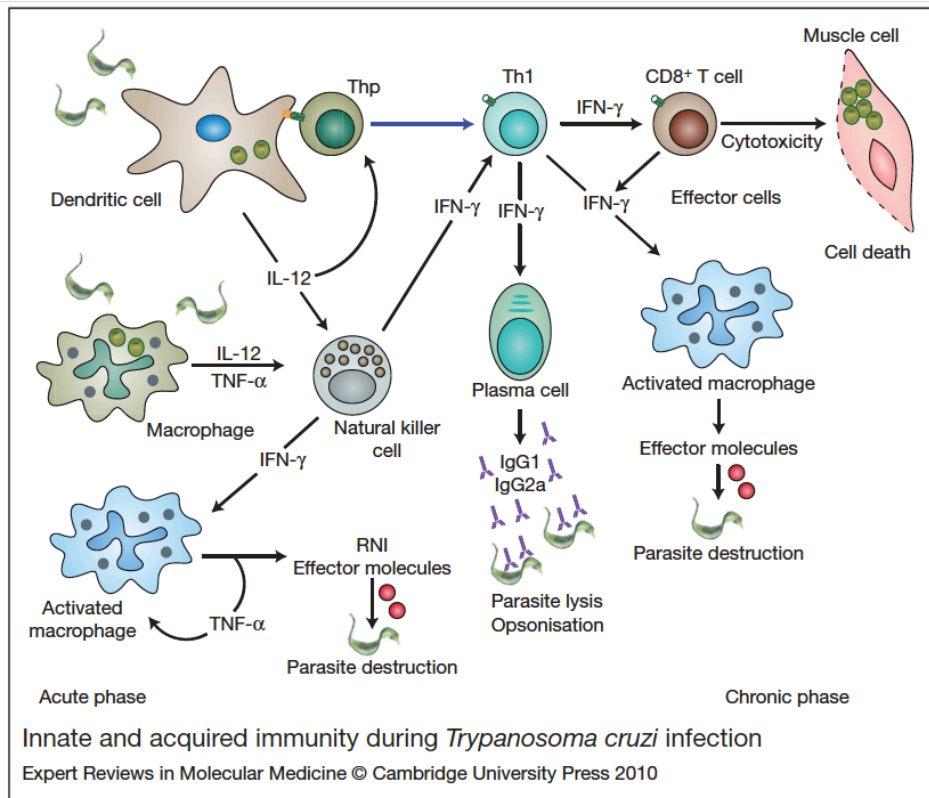


Figura 1.2

Representação esquemática dos mecanismos imunológicos que medeiam a resposta imune inata com a adquirida (Junqueira et al., 2010).

Âncoras de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) são moléculas abundantes na membrana de parasitos protozoários. Recentemente, alguns estudos têm documentado a atividade imunoestimulatória e reguladora de âncoras de GPI derivadas de parasitos e de suas estruturas relacionadas, denominadas Glicoinositol-fosfolípidos (GIPLs) (Ropert e Gazzinelli, 2000). Outros estudos mostram que âncoras de GPI e GIPLs de *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* são capazes de ativar linhagens de células linfóides e mielóides (Camargo et al., 1997; de Veer et al., 2003; Debierre-Grockiego et al., 2003; Magez et al., 1998; Schofield e Hackett, 1993). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que âncoras de GPI e GIPLs purificados do parasito *T. cruzi* são potentes indutores de TLR2/6 e TLR4 respectivamente, (Campos et al., 2001; Gazzinelli et al., 2004) como ilustrado na figura 1.3.

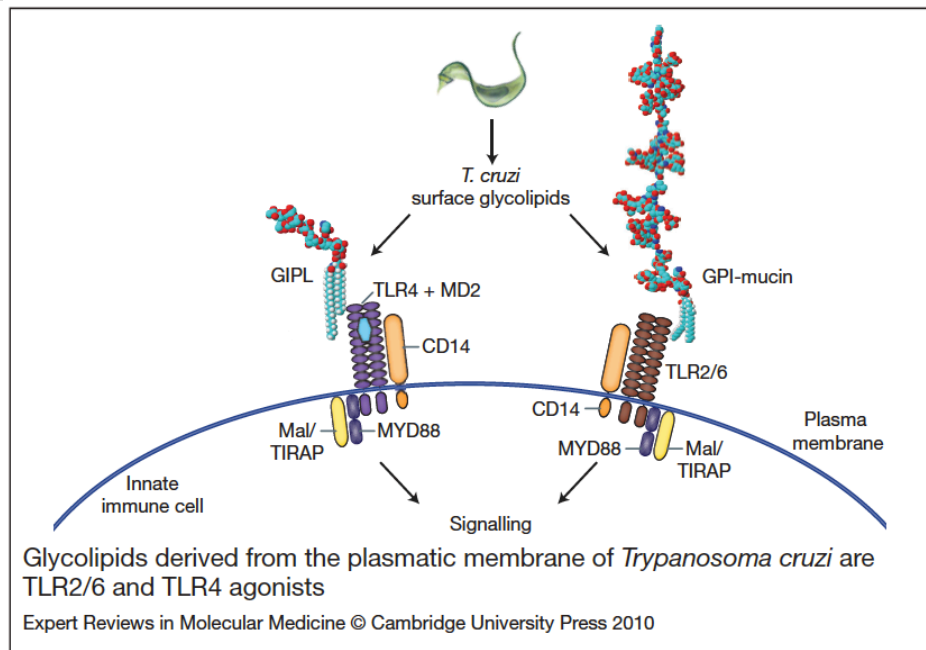


Figura 1.3

Representação esquemática de glicolipídeos derivados de *T. cruzi*, como agonistas de TLR 2/6 e TLR4 (Junqueira et al., 2010).

Oligodeoxinucleotídeos (ODNs) imunoestimulatórios, contendo motivos CpG não metilados são moléculas agonistas de TLR9 capazes de induzir, via MyD88, a produção de IL-12 e IFN- γ (Hemmi et al., 2003; Hemmi et al., 2000; Krieg, 2002). Evidências mostram que motivos de CpG imunoestimulatórios presentes no genoma do *T. cruzi* são reconhecidos pelo TLR9 do hospedeiro (figura 1.4), induzindo a síntese de IL-12 e IFN- γ , sendo, portanto, responsáveis pela resistência do hospedeiro contra a infecção (Bartholomeu et al., 2008).

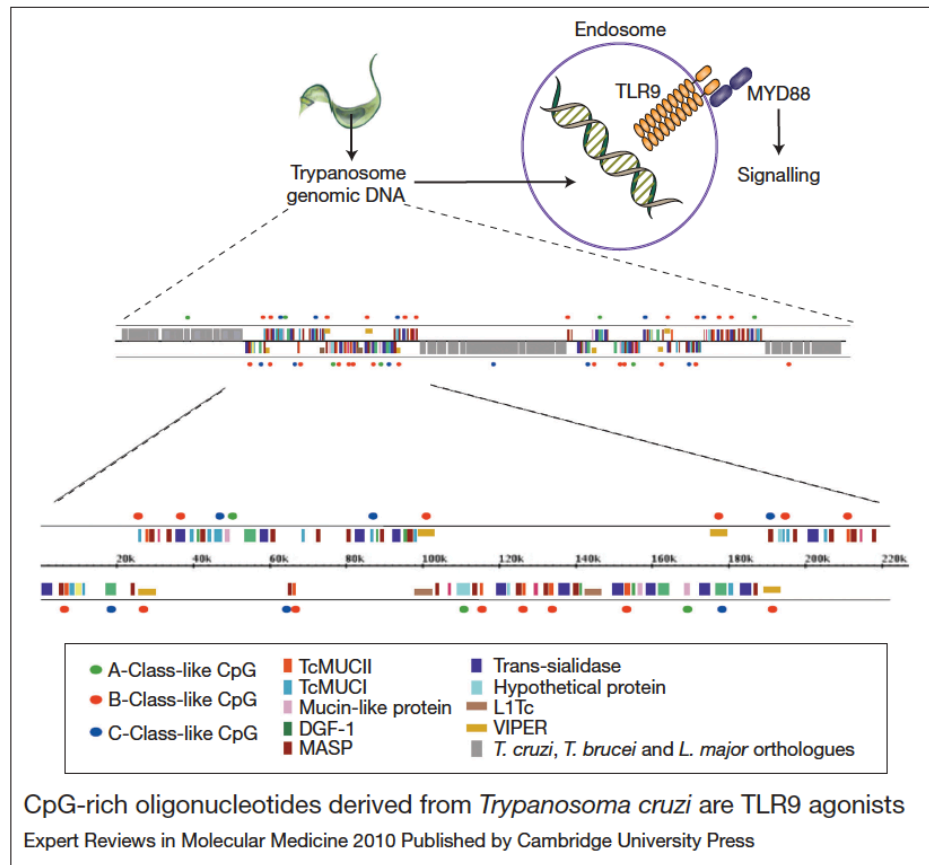


Figura 1.4

Representação esquemática de ilhas de motivos CpG ODN presentes no genoma de *T. cruzi*, como agonistas de TLR9 (Junqueira et al., 2010).

Uma eficiente resposta imune contra infecção com o parasito *T. cruzi* é dependente do fenótipo Th1 e, em especial, ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Foi demonstrado que animais deficientes para β -2microglobulina (CD8^{-/-}) são extremamente susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (Tarleton et al., 1992), e que a resposta mediada por essas células é imunodominante para epítomos cepa-específicos (Haolla et al., 2009; Tzelepis et al., 2008). Sabe-se que cepas e clones derivados da cepa CL possuem um epítomo da transscialidase como imunodominante. No contraste, na cepa Y o epítomo imunodominante está presente na proteína da superfície de amastigotas (ASP)-2.

1.3. Câncer

O câncer é hoje uma das principais causas de óbitos em todo o mundo, sendo responsável por mais de 7,6 milhões de mortes no ano de 2007, e com uma estimativa de progressão para 17 milhões de falecimentos em 2030. A incidência de câncer para este mesmo ano poderá chegar a 26,4 milhões de casos (WHO, 2008).

A denominação “Câncer” refere-se a um conjunto de doenças caracterizadas pela formação de tumores malignos ou neoplasias malignas que possuem denominações específicas de acordo com sua localização. São conhecidos por carcinoma, quando atingem tecidos epiteliais tais como pele e mucosas (Ex.: melanoma); sarcomas ocorrem em tecidos conjuntivos como cartilagem, osso e músculo (Ex.: osteosarcoma); linfomas afetam as células do sistema linfóides, como linfócitos T e B (Ex.: linfoma de Hodgkin); enquanto que leucemias são características das células precursoras hematológicas (Ex.: leucemia mieloide ou linfocítica) (Weinberg, 2008).

Por se tratar de uma doença multifatorial, a prevenção diante de alguns fatores de risco pode diminuir a chance de desenvolver um câncer. Os fatores de risco mais relevantes são: (1) tabagismo; (2) excesso de peso e obesidade; (3) dieta pobre em frutas e vegetais; (4) sedentarismo; (5) ingestão de álcool; (6) infecção por HPV; (7) poluição urbana; (8) inalação de fumaça proveniente da queima de lenha; (9) exposição à radiação ionizante; (10) exposição ao sol na ausência de proteção contra os raios ultra violeta (WHO, 2004, 2008).

O câncer ocorre quando células do corpo se transformam e se tornam malignas. Essas células não mais respondem como células normais, como permanecendo em seus próprios tecidos, parando de crescer quando programadas, não invadindo o resto do corpo e não induzindo angiogênese para suprimento próprio. A transformação de células normais em células cancerosas pode ocorrer de várias maneiras, como por radiação, carcinogênese química, infecção com vírus oncogênicos ou mutação espontânea que induzem as células a terem comportamento anormal. Um evento aleatório, muitas vezes uma mutação nas células do próprio corpo, pode levar ao câncer. Radiações e substâncias químicas cancerígenas causam câncer justamente por induzirem mutações (Weinberg, 2008).

Sabe-se que todos os tipos de células tumorais apresentam modificações genéticas que podem ser desde poucas mutações em nucleotídeos até a existência de anaploidias,

tanto pela ausência de cromossomos inteiros, pela multiplicação destes ou pela junção de dois ou mais cromossomos. Tais modificações genéticas são responsáveis pela ativação da maquinaria celular, de tal forma que essas células se multipliquem descoordenadamente. Mutações ou oncoproteínas são capazes de favorecer o crescimento tumoral por meio da indução de mitose celular ou pela inibição dos mecanismos de apoptose, responsáveis pela morte de células defeituosas (Weinberg, 2008). Exemplo daquele é a proteína do retinoblastoma (pRb), responsável pelo controle do ciclo celular. Esse controle é dependente do estado de fosforilação desta proteína. Quando fosforilada, o ciclo celular permanece em G₁, e possivelmente recua para G₀, mas quando a pRb é defosforilada permite a conclusão do ciclo celular (Figura 1.5) (Rizzolio et al., 2010). A proteína de 53 KDa (p53) é responsável pela indução de apoptose mediante ao dano ou estresse celular. Células tumorais, em geral, possuem uma mutação no gene da p53, favorecendo a formação de tetrâmeros com a p53 selvagem e, conseqüentemente, bloqueando a maquinaria apoptótica (Goh et al., 2011).

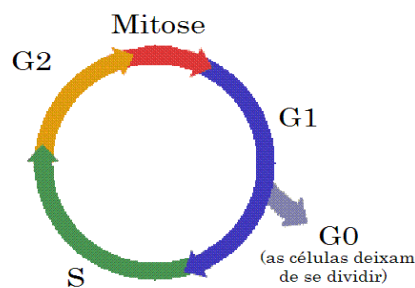


Figura 1.5

Representação esquemática do ciclo celular.

G1 – Intervalo, aumento no volume celular, enzimas e organelas; S – Síntese de DNA, duplicação do patrimônio genético; G2 – Intervalo; Mitose – separação das cromátides irmãs e da célula como um todo; G0 – estágio fora do ciclo celular <http://blog.ccbi.com.pt/blog/media/501/20091212-ciclo%20celular.GIF>.

1.4. Imunologia do câncer

O câncer e o sistema imune têm coexistido por séculos, o que é um dos mais intrigantes desafios da biologia. Mutações ocorrem com mais frequência do que imaginado. Quando as células dividem e duplicam o DNA, frequentemente cometem erros de cópia, estando sujeitas a resultarem em mutações. Agentes modificadores do DNA, como reagentes químicos e radiação, causam centenas alterações nucleotídicas, muitas das quais

não causam danos permanentes, devido à maquinaria de reparo de DNA. Portanto, eventos transformantes não são raros e podem induzir formação de tumores muito frequentemente. No entanto, apesar de algumas células passarem despercebidas pelo reparo de DNA, ainda assim não ocorre o desenvolvimento de câncer na mesma frequência em que as células são transformadas (Dunn et al., 2002).

A teoria da imunovigilância proposta, sugere que em indivíduos imunocompetentes, o sistema imune está em constante patrulhamento, procurando por qualquer sinal de células transformadas e eliminando-as. São poucos os eventos em que o sistema imune não consegue reconhecer essas células e ocorrendo, assim, o desenvolvimento do câncer. Todo este processo pode ser dividido em três fases distintas (figura 1.6), denominadas de **Três Es**:

(i) **eliminação**, em que ocorre a identificação e posterior eliminação das células transformadas; (ii) **equilíbrio**, em que o sistema imune, mesmo que não tenha eliminado por completo um foco de células cancerígenas, consegue mantê-las em controle, evitando a multiplicação e eventos de metástase; (iii) e, por último, a fase de **escape**, em que o sistema imune não mais consegue controlar o crescimento do tumor, devido principalmente a mecanismos imunossupressores do microambiente tumoral (Dunn et al., 2002).

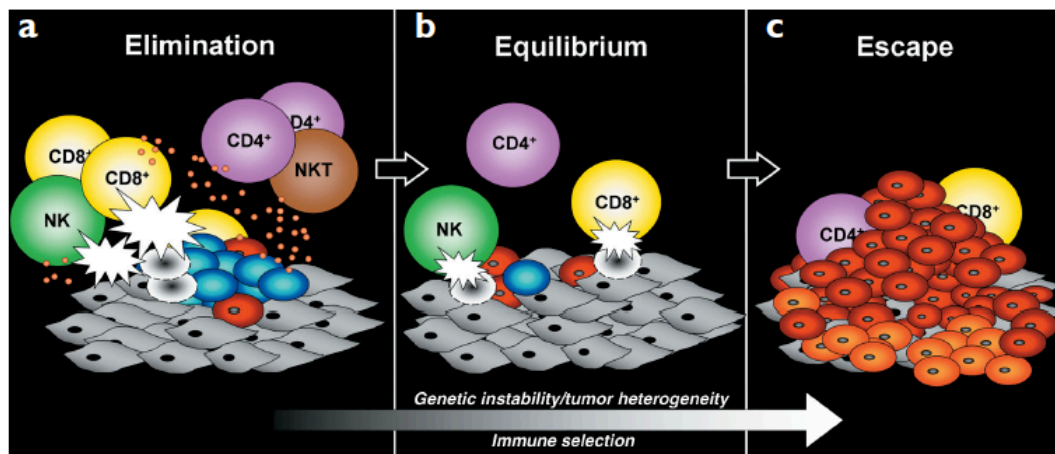


Figura 1.6

Os Três Es da imunoedição de tumores (Dunn et al., 2002).

A imunologia do câncer é caracterizada como atípica. Enquanto que na maioria das doenças ocorre uma super ativação do sistema imune, no câncer ocorre exatamente o oposto. A anergia do sistema imune induzido pelo microambiente tumoral é um fator complicante no tratamento deste (Weinberg, 2008). Compreender como ocorre a inibição

dos mecanismos imunológicos é essencial para desenvolver tratamentos capazes de recuperar a homeostasia no indivíduo afetado.

De forma geral, uma resposta imunológica eficiente na eliminação de células tumorais é mediada por citocinas e células características da resposta imune do tipo 1 (Nishimura et al., 1999), em que as principais citocinas inflamatórias envolvidas são IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Xu et al., 2010). As células “Natural Killers” e os linfócitos T CD8+ possuem um papel fundamental na resposta efetora, enquanto que os linfócitos T CD4+ exercem o papel de mediadores e amplificadores da resposta (figura 1.7). Novos estudos mostram, igualmente, que os linfócitos T CD4+ também possuem propriedades líticas capazes de eliminar células tumorais (Martorelli et al., 2010; Quezada et al., 2010).

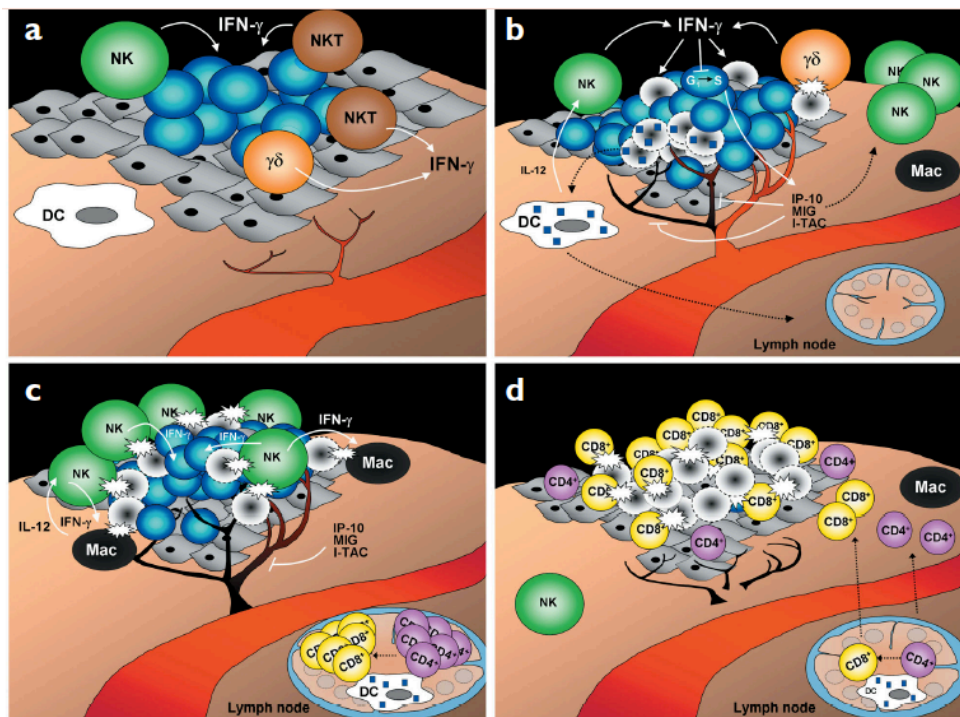


Figura 1.7

Mecanismos imunológicos envolvidos na fase de eliminação de tumores. (a) resposta inicial mediada por células da imunidade inata que reconhecem as células transformadas; (b) início de mecanismos efetores da imunidade inata, mediados pela produção de IFN- γ ; (c) superativação de células NK, enquanto as células T CD4+ e CD8+ se proliferam no linfonodo drenante; (d) linfócitos T CD4+ e T CD8+ já no local do tumor (Dunn et al., 2002).

Apesar do exposto, a montagem dessa resposta imune ideal é dificultada pelos mecanismos imunossupressores do microambiente tumoral (Nishikawa e Sakaguchi, 2010).

Neste local, as células tumorais expressam, em sua superfície, receptores capazes de inibir a função efetora dos linfócitos T CD8+. Neste contexto, o antígeno associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) (Peggs et al.; Suttmüller et al.), agonista do receptor B7-1, expresso na superfície das células tumorais, é um dos principais responsáveis pela inibição da resposta efetora por esses linfócitos. Similarmente ao CTLA-4, um outro agonista de B7-1, o PD-1, induz a mesma função inibitória (Weber, 2010).

A indução de tolerância imunológica é um aspecto de alta relevância na patologia. Esta ocorre principalmente por dois motivos: o primeiro é devido às células tumorais apresentarem antígenos próprios, mecanismos já bem descritos, responsáveis pela inativação de linfócitos (Nishikawa e Sakaguchi, 2010); já no segundo, o processamento dos antígenos tumorais por estas células se dá de uma forma diferente daquela que frequentemente acontece em células apresentadoras de antígeno (APCs) profissionais. Esse processamento diferenciado favorece tolerização dos linfócitos T maduros (Bonifaz et al., 2004; Oldenhove et al., 2003).

1.5. Antígenos “Cancer/Testis”

São comumente denominados como Antígenos Tumorais aqueles antígenos que estão presentes em células tumorais, mas que frequentemente não são expressos em células somáticas normais. Dentro deste contexto, encontra-se a família de antígenos tumorais “Cancer/Testis” (CT), que possuem este nome devido ao perfil de expressão restrito às células tumorais e às células do testículo (Scanlan et al., 2004). Estudos mais recentes melhor definiram o perfil de expressão de proteínas desta família como sendo expressos por células tumorais, germinativas e trofoblastos (Simpson et al., 2005).

As proteínas pertencentes a essa família são em grande parte codificadas por genes presentes no cromossomo X (Caballero e Chen, 2009; Simpson et al., 2005), que são também expressos em células germinativas durante a fase de espermatogônia, que é a fase de multiplicação celular. Já os genes desta família, que se encontram em outros cromossomos, possuem correlação com a fase de diferenciação, que é observada nos espermátócitos (Simpson et al., 2005).

A correlação entre os processos biológicos encontrados em células germinativas e em células cancerosas há muito são observadas por diversos pesquisadores (figura 1.8). Devido a essas características comuns, foram propostas teorias como a “Teoria trofoblástica do câncer” e a teoria de que o câncer é uma “gravidez somática”. Ambas as teorias possuem, como suporte, achados de que alguns tipos de tumores, além de possuírem um perfil de expressão proteica semelhante às células germinativas, também são capazes de produzir hormônios trofoblásticos e gonotrofina. De uma maneira geral, essas teorias sugerem que a expressão ectópica de proteínas gametogênicas em células tumorais faz parte de mecanismos tumorigênicos (Simpson et al., 2005).

Atualmente, mais de 100 antígenos CT já foram descritos, no entanto, nenhum deles foi bem caracterizado quanto a sua função nas células germinativas, e também, nas células cancerígenas (Caballero e Chen, 2009).

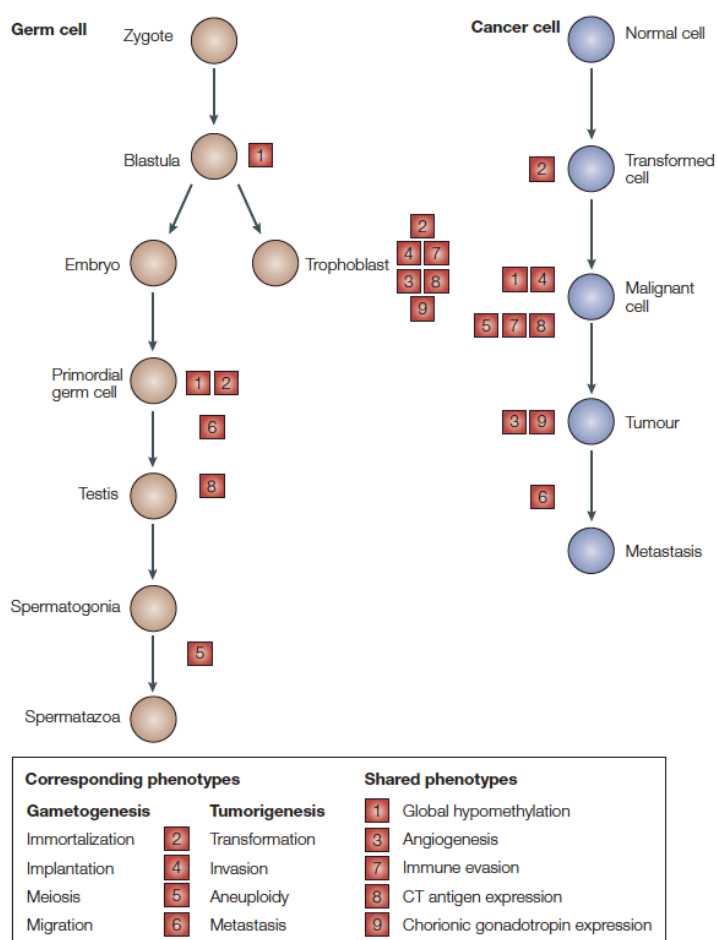


Figura 1.8

Comparação fenotípica entre a gametogênese e tumorigênese (Simpson et al., 2005).

1.6. NY-ESO-1

Pertencente à família de antígenos tumorais “cancer/ testis” encontra-se a proteína NY-ESO-1 (Scanlan et al., 2004). Conhecida também como CTAG1B, CT6.1 ou LAGE-2 é codificada por um gene locado na região Xq28 do cromossoma X, a qual codifica três produtos diferentes. O produto majoritário, NY-ESO-1, é uma cadeia de 180 aminoácidos de 18 kDa (NCBI Reference Sequence NM_001327), que possui a região N-terminal rica em glicina e a região C-terminal extremamente hidrofóbica (Chen *et al.*, 1997). Um “splicing” alternativo (Fig. 1.9) é responsável pela codificação do CAMEL, uma proteína de 58 aa (Aarnoudse et al., 1999). Sua função nas células germinativas, assim como no desenvolvimento de tumores, continua desconhecida, como na maioria dos antígenos “cancer/ testis”.



Figura 1.9

Esquema representativo do “splicing” alternativo na sequência do gene NY-ESO-1 (Aarnoudse et al., 1999).

A terminologia ESO é usada para câncer de esôfago, pois este foi originalmente descrito a partir do “screening” de uma biblioteca de cDNA com o soro autólogo de um paciente com câncer, em Nova York (NY) (Chen et al., 1997). Conhecido como uma das mais antigênicas proteínas tumorais, o NY-ESO-1 é encontrado na maioria dos tipos tumorais, no entanto, a sua expressão varia de indivíduo para indivíduo. A frequência de expressão em alguns tipos tumorais tais como melanoma, pulmão, esôfago, sarcomas sinoviais, pode chegar a até 80% dos pacientes (Gnjatic et al., 2006).

Resposta imune humoral e celular espontânea pode ocorrer em pacientes com tumores positivos para NY-ESO-1, o que possibilitou a seleção de diversos peptídeos restritos a MHC de classe I e II como alvos terapêuticos (Wang et al., 1998; Zarour et al., 2002). A sua alta imunogenicidade e distribuição nos diversos tipos de tecido tumoral tornam o NY-ESO-1 um forte candidato a antígeno a ser aplicado à imunoterapia do câncer.

Muitos antígenos tumorais reconhecidos por células TCD8+ vêm sendo caracterizados e utilizados como antígenos para vacinas baseadas em peptídeos (Castelli et al., 2000; Davis et al., 2004; Novellino et al., 2005). Ultimamente, NY-ESO-1 vem sendo identificado em uma variedade de tumores humanos. Muitos estudos mostram que NY-ESO-1 é um antígeno do desenvolvimento restrito de precursores de espermatozóides no testículo. Nenhum tecido somático expressa NY-ESO-1, mas o antígeno é encontrado com alta frequência em tumores (Chen et al., 1997; Jungbluth et al., 2001; Scanlan et al., 2004). Em estudos anteriores, foi demonstrado que pacientes com câncer frequentemente desenvolvem espontaneamente anticorpos e células TCD8+ específicas contra NY-ESO-1 (Jager et al., 2000a; Jager et al., 2002; Jager et al., 2000b), e que a vacinação usando NY-ESO-1 como antígeno alvo conduz a resposta imune específica contra tumores. Em experimentos com pacientes humanos, Jager e colaboradores (2000), utilizando o vírus vaccinia recombinante expressando NY-ESO-1, seguido por reforço com poxvírus recombinante, demonstraram que a formulação vacinal é capaz de induzir resposta humoral e celular em pacientes com diferentes tipos de câncer. Esse dado reforça o potencial deste antígeno tumoral como candidato à vacina. Nós acreditamos que a formulação da vacina combinando a alta imunogenicidade de NY-ESO-1 e a capacidade adjuvante de *T. cruzi* será uma estratégia interessante para a imunização contra tumores no modelo murino.

1.7. Imunoterapia do Câncer

Ainda hoje, os principais tratamentos contra o câncer são a quimioterapia e a radioterapia. Ambos geram no paciente, diversos efeitos colaterais que, em muitos casos, não são por eles tolerados, evoluindo, portanto, para a interrupção do tratamento. Outra desvantagem desses métodos convencionais é a chamada irresponsividade ao tratamento.

Diante dos diversos efeitos colaterais, quadros de intolerância ou irresponsividade aos tratamentos citados, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapia capazes de prevenir e tratar o câncer. As denominadas terapias alternativas, como acupuntura, Yoga, meditação, homeopatia e até mesmo a fitoterapia são capazes de aliviar sintomas do câncer, no entanto, não são comprovadamente capazes de levar à cura.

Diversas linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidos com o intuito de estabelecer tratamentos alternativos à quimioterapia e radioterapia, que são comumente usados no tratamento de câncer. Além de induzirem diversos efeitos colaterais, existe uma grande percentagem de pacientes não responsivos a esses protocolos (WHO, 2008).

Dentre as diversas linhas de estudo de terapias alternativas, destaca-se a imunoterapia, a qual utiliza componentes capazes de induzir células mediadoras e efectoras do sistema imune, tais como células dendríticas, macrófagos, células natural killers e principalmente linfócitos B, T CD8+ e T CD4+ (O'Neill, 2010; Salagianni et al., 2011). A esse tipo de tratamento, dá-se o nome de vacina, devido à indução do sistema imune de forma específica e eficiente contra os tumores.

Na imunidade antitumoral, há vários aspectos importantes que devem ser considerados para o desenvolvimento de uma vacina eficaz: (i) uma ruptura ou neutralização dos mecanismos de tolerância imunológica a auto-antígenos (Garbi e Hammerling, 2011; Nishikawa e Sakaguchi, 2010; Zhang et al., 2007), (ii) indução da resposta imune antitumoral antígeno-específica, em especial aquelas mediadas por linfócitos T CD4 + Th1, bem como os linfócitos T CD8 + efectoras, (iii) e o estabelecimento de resposta imune antitumoral de longa duração (memória) (Gao et al., 2002; Melief et al., 2002; Zinkernagel, 2001). Assim, a indução de uma resposta imune protetora duradoura parece ser extremamente dependente da forma como o antígeno é entregue às células apresentadoras de antígenos (APCs) e do ambiente que as células T “naïve” primeiro encontram o antígeno (Nakamura et al., 2007). Os passos iniciais da ativação das células T, são determinantes para a iniciação e qualidade das respostas mediadas por linfócitos T CD4+ (Gao et al., 2002), bem como a ativação e expansão dos linfócitos T CD8+. Várias abordagens têm sido projetados para atingir a resposta imune adequada para induzir profilaxia eficaz e vacinas terapêuticas antitumorais, que incluem: o uso de adjuvantes imunológicos adequados (Adams, 2009; Schneeberger et al., 2004), a manipulação genética de microorganismos para expressar antígenos tumorais (Liu, 2010), e co-administração de anticorpos que neutralizam os mecanismos de regulação imunológicos como CTLA-4 (Takeda et al., 2010), as células T reguladoras, bem como citocinas moduladoras, como a IL-10.

Na atualidade, duas vacinas antitumorais já foram aprovadas para uso humano pelo governo americano, e dezenas de outras vacinas estão em testes clínicos ou ainda pré-

clínicos. Os antígenos cancer/testis compreendem o grupo de antígenos que estão sendo aplicados na terapia do câncer.

1.8. Vacinas

A maioria das vacinas comercialmente disponíveis induzem proteção mediada pela produção de anticorpos neutralizantes (Plotkin, 2010). No entanto, para a indução de uma imunidade protetora de doenças como câncer, AIDS, malária, Chagas, dentre outras, faz-se necessário induzir uma imunidade dependente de células mediadas por linfócitos T, em especial linfócitos T CD8+.

Nos últimos anos, a tecnologia de proteínas recombinantes trouxe avanço no estudo de candidatos antigênicos para serem usados na elaboração de vacinas. Porém, para uma eficiente indução desta resposta é necessária a combinação de tais proteínas com adjuvantes imunológicos capazes de ativar e direcionar o sistema imune para uma resposta celular. A busca pela resposta imune ideal abriu uma nova questão: o hidróxido de alumínio, único adjuvante comercialmente disponível para uso humano, é capaz de induzir apenas uma resposta humoral. Desta forma, surge a necessidade de obter novos adjuvantes capazes de estimular uma resposta mediada por linfócitos T.

Visando ao estabelecimento de adjuvantes imunológicos capazes de induzir resposta Th1, vislumbra-se os agonistas de Receptores do Tipo Toll (TLRs). Os TLRs são receptores cognatos da imunidade inata que reconhecem Padrões Moleculares Associadas à Patógenos (PAMPs) derivadas de parede celular de bactérias, ácidos nucleicos de vírus, dentre outros componentes derivados de microrganismos (Takeuchi e Akira, 2010). Células do sistema imune inato quando expostas a esses componentes microbianos, produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , que são responsáveis pelo início da síntese de IFN- γ pelas células NK e desencadeiam vários mecanismos efetores, incluindo a síntese de intermediários reativos de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio (RNI), que participam da barreira inicial contra infecções microbianas e mecanismos efetores contra tumores (Coffman et al., 2010).

Adicionalmente, DCs expostas a certos PAMPs expressam co-receptores envolvidos na ativação inicial de células T naïve, fazendo a ponte entre a imunidade inata e a adquirida (Gazzinelli et al., 1993; Trinchieri, 2003). DCs, quando ativadas por agonistas de TLRs, produzem IL-12, influenciando a diferenciação de linfócitos T CD4+ no fenótipo Th1 (Seder et al., 1993; Trinchieri, 2003), orquestrando, desta forma, o estabelecimento de uma imunidade mediada por células, assim como a produção de isotipos de Ig induzidos por IFN- γ , que estão envolvidos na resistência a tumores (Mosmann e Coffman, 1989). Tal ativação favorece a apresentação cruzada de antígenos exógenos via MHC de classe I. Atualmente, formulações vacinais em experimentação contra tumores, vêm sendo feitas, combinando antígenos proteicos com agonistas de TLR como adjuvantes imunológicos, aumentando a capacidade de ativar DCs e favorecer, assim, o desenvolvimento de uma forte imunidade mediada por células T (linfócitos Th1) (Coffman et al., 2010; Wille-Reece et al., 2005).

1.9. Vetores vacinais

Visando à busca por formas vacinais capazes de estabelecer uma resposta TH1 eficiente, uma nova geração de vetores recombinantes vem sendo amplamente utilizada no meio científico (Liu, 2010; Rocha et al., 2004). Além de realizarem o papel de “entregadores” do antígeno de interesse, esses microrganismos também exercem a função de adjuvantes imunológicos capazes de induzir imunidade mediada por células, incluindo linfócitos T CD8+. Por meio da inserção de genes exógenos em seus genomas, os vetores vacinais irão levar o antígeno até a célula hospedeira, favorecendo a apresentação de antígenos pelo MHC de classe I e ativação de linfócitos T CD8+, que são as células efetoras contra patógenos intracelulares e tumores.

Estudos recentes têm apontado para o uso de preparações parasíticas não patogênicas como vetores vacinais (Breton et al., 2005; Breton et al., 2007). Foi demonstrado o potencial da cepa não patogênica *Leishmania tarentolae* expressando o gene Gag do vírus HIV em induzir imunidade celular em camundongos e resposta imune protetora no cultivo *ex vivo* tecidual de tonsila humana, seguida à exposição da infecção por HIV (Breton et al., 2007).

1.10. *T. cruzi* e Câncer

No final da década de 40, estudos utilizando *T. cruzi* vivo ou o extrato lisado demonstraram que esse protozoário possuía efeito tumoricida (Hauschka, 1947; Hauschka e Goodwin, 1948; Roskin, 1946). Esses estudos se baseavam na "Malarioterapia" proposta pelo ganhador do Prêmio Nobel Julius Wagner-Jauregg. Acreditava-se que, assim, como o parasito causador da malária *Plasmodium*, o *T. cruzi* possuiria também uma capacidade de curar outras doenças devido à forma tão intensa da doença causada por este (Krementsov, 2009).

Durante as décadas de 40 a 60, diversas linhas de pesquisa acerca do uso de *T. cruzi* no tratamento de câncer foram desenvolvidas. Naquele tempo, eram de intenso estudo a utilização de microrganismos e suas toxinas no tratamento de câncer, como ocorrido com a Toxina de Coley (Coley, 1893; Nauts e McLaren, 1990), BCG (Old et al., 1959), dentre outros.

Mais recentemente, demonstrou-se, que o lisado de epimastigotas de diferentes grupos genéticos de *T. cruzi* (P209-1, Gamba1, Sp104-1, MASu, Y7 / 1, MN12, CL-Brener, 86/2036, Y7/2-1) inibiam o crescimento de adenocarcinoma de Erlich em ratos (Batmonkh et al., 2006; Kallinikova et al., 2006). Enquanto a base desta atividade antitumoricida ainda é desconhecida, nosso grupo sugere que a ativação inicial de células do sistema imune inato por componentes do parasito pode contribuir para o desenvolvimento de imunidade protetora contra o parasito e outras agressões ao hospedeiro.

Uma correlação entre o curso da infecção com *T. cruzi* e o curso da doença no câncer, pode ser feita (figura 1.10). Como citado anteriormente, o câncer possui três fases de desenvolvimento, em que a primeira é a fase de eliminação, seguida pelo equilíbrio e por último a fase de escape. Similarmente, a infecção pelo *T. cruzi* possui fases homólogas, em que a primeira, também denominada de fase aguda, é caracterizada por uma intensa resposta imunológica, capaz de controlar a parasitemia e o parasitismo. A fase assintomática correlaciona-se com a fase de equilíbrio, no qual o sistema imune controla o crescimento parasitário. Ocorrendo por último, tem-se a fase da patologia (Junqueira et al., 2010).

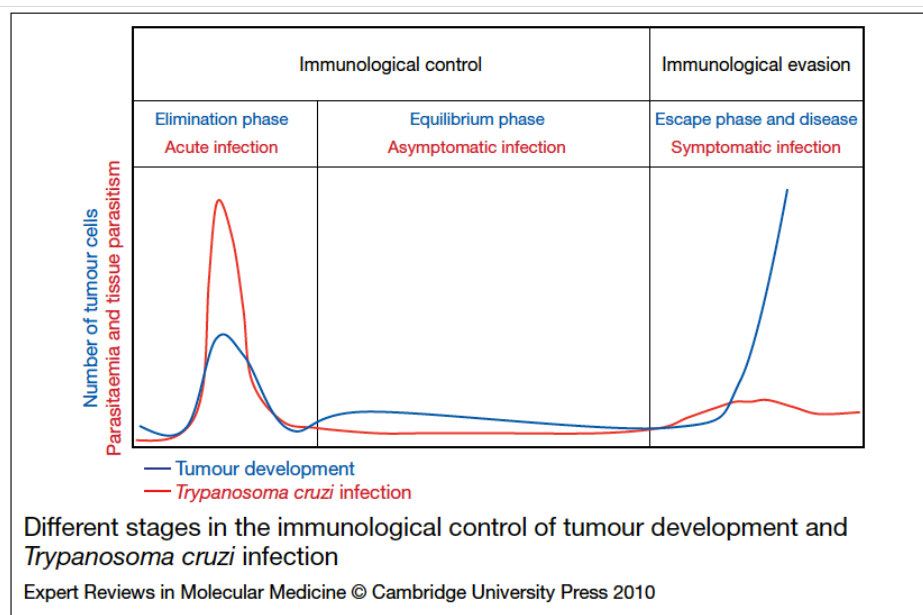


Figura 1.10

Comparação esquemática entre o curso de desenvolvimento da infecção por *T. cruzi* com o curso do câncer (Junqueira et al., 2010).

No presente trabalho, sugerimos, que a correlação entre curso de desenvolvimento do câncer e da infecção pelo *T. cruzi*, assim como a capacidade do parasito em persistir no hospedeiro por muitas décadas, sem que haja a ativação da fase crônica, sejam características positivas para o possível uso deste parasito como um vetor vacinal.

1.11. CL-14

A idéia de utilizar o parasito *T. cruzi* no tratamento do câncer abre uma nova perspectiva no desenvolvimento de vetores vacinais. Combinando a tecnologia de transformação de Tripanossomatídeos com antígenos exógenos (DaRocha et al., 2004b) e a utilização de clones atenuados como o clone CL-14, torna-se possível o desenvolvimento de parasitos transgênicos viáveis de serem utilizados em estratégias vacinais.

A base da atenuação e do fenótipo menos infectivo do clone de *T. cruzi* CL-14 devida à menor expressão da glicoproteína 82 (gp82), a qual é responsável pela interação e invasão à célula do hospedeiro (Ruiz et al., 1998), tornando o clone citado quatro vezes menos

infectivo que a cepa parental CL (Atayde et al., 2004). Estudos anteriores mostram que inoculação com tripomastigotas de CL-14 em camundongos, ao invés de induzirem doença, são capazes de induzir proteção contra um subsequente desafio com a cepa virulenta CL, prevenindo parasitemia, mortalidade e o desenvolvimento de sintomas relacionados à doença de Chagas (Lima et al., 1991; Lima et al., 1995). Complementarmente, foi observado que camundongos imunizados com CL-14 e, posteriormente, desafiados com a cepa CL Brener, não apresentam parasitemia e parasitismo tecidual, nem mesmo em animais neonatos (Paiva et al., 1999). Os animais imunizados são ainda capazes de induzirem produção de IFN- γ , IgG1, IgG2a e IgG2b (Pyrrho et al., 1998; Soares et al., 2003). Portanto, considerando a baixa virulência desta clone e sua alta imunogenicidade, tem-se um candidato em potencial para utilização como vetor vacinal, expressando antígenos exógenos.

1.12. Transformação de Tripanossomatídeos

Experimentos de transfecção em Tripanossomatídeos vêm sendo utilizados para o estudo do controle da expressão gênica nestes parasitos e tem aumentado desde 1989 quando o primeiro experimento de transfecção foi reportado. Utilizando *Trypanosoma brucei* como um modelo, começaram a elucidar os mecanismos de controle e definir os fatores celulares envolvidos na transcrição do RNAm, processamento e tradução nestes parasitos (LaCount et al., 2000). Em 1998, foi mostrada a transfecção estável de epimastigotas de *T. cruzi* com a proteína regulatória do complemento (CRP), que tornava esta forma do parasito resistente à lise pelo Sistema Complemento (Norris, 1998). Vários estudos vêm sendo conduzidos no sentido de melhorar as estratégias de transfecção usando diferentes vetores e marcadores fluorescentes (DaRocha et al., 2004a; Guevara et al., 2005). DaRocha e colaboradores (2004), desenvolveram um novo protocolo de eletroporação e vetores de expressão utilizando luciferase e proteínas verde ou vermelho fluorescente como genes repórter mostrando um maior nível de expressão destes genes quando comparado com protocolos descritos anteriormente (DaRocha et al., 2004b), protocolo este, utilizado neste trabalho.

De maneira geral, o trabalho aqui apresentado resgata conceitos científicos do início do século XX utilizados no tratamento de câncer, assim como conhecimentos a cerca da imunidade induzida por parasitos protozoários *T. cruzi* para serem aplicados na formulação de vacinas anti-tumorais capazes de induzir proteção e tratamento contra o câncer. Adicionalmente, propões-se a utilização de um clone de *T. cruzi* não patogênico, o qual ao ser submetido às técnicas de transfecção de Tripanossomatídeos, se tornam candidatos à utilização como vetores vacinais expressando antígenos exógenos.

2. JUSTIFICATIVA

Diante da crescente incidência de câncer mundial e das ainda poucas intervenções médicas preventivas e até mesmo terapêuticas disponíveis, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas capazes de prevenir e curar o câncer. Além do câncer, dezenas de doenças encontram nas mesmas condições de carência de vacinas e tratamentos.

Desenvolver novas vacinas e vetores vacinais capazes de estimular o sistema imune de forma que ele consiga induzir uma resposta protetora de longa duração é um grande desafio para a ciência contemporânea, principalmente tratando-se de doenças para as quais, ainda hoje, não existe nenhuma forma eficaz de profilaxia.

Estabelecer novos tratamentos ou vacinas terapêuticas que consigam romper a anergia do sistema imune no caso de doenças já estabelecidas é outro campo de intensa pesquisa, uma vez que tratamentos convencionais para diversas doenças, como o câncer, podem induzem irresponsividade a quaisquer outros métodos de cura conhecidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Formular uma vacina antitumoral capaz de induzir uma forte resposta imune anti-NY-ESO-1 e uma resistência do hospedeiro contra tumores singênicos expressando tal antígeno.

3.2. Específicos

- Formular vacina antitumoral contendo agonistas de TLRs derivados de *T. cruzi*, em combinação com o antígeno tumoral NY-ESO-1.
 - Caracterizar moléculas agonistas de TLRs derivadas de *T. cruzi* como adjuvantes imunológicos capazes de induzir uma resposta celular tipo Th1.
 - Avaliar resposta anti-NY-ESO-1 induzida por formulações vacinais empregando os melhores agonistas de TLRs derivados de *T. cruzi* com a proteína NY-ESO-1 recombinante.
- Formular vacina antitumoral por meio da construção de *T. cruzi* não patogênico expressando o antígeno tumoral NY-ESO-1 como vetor vacinal.
 - Caracterizar o clone de *T. cruzi* CL-14 quanto a sua patogenicidade.
 - Construir *T. cruzi* transgênicos capazes de expressar a proteína tumoral NY-ESO-1.
 - Avaliar a capacidade dos parasitos transgênicos de induzir resposta imune anti-NY-ESO-1 específica.
 - Avaliar a capacidade dos vetores vacinais desenvolvidos para prevenir o crescimento de modelos tumorais murinos expressando o antígeno NY-ESO-1.
 - Avaliar o potencial imunoterapêutico dos parasitos transgênicos, quando empregados no tratamento de tumores já estabelecidos.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção e manutenção de camundongos para experimentação animal

A execução dos experimentos *in vivo* do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais pelo número de protocolo 19/2008 (anexo 1).

Os animais selvagens C57BL/6 e Balb/c foram adquiridos no biotério de produção animal da UFMG (CEBIO). Os animais imunodeficientes MyD88^{-/-}, Rag^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2/4^{-/-} foram provenientes do biotério de produção do Laboratório de Imunoparasitologia, UFMG. E os demais animais IL-12^{-/-}, $\beta 2m^{-/-}$ (CD8^{-/-}), NOS2^{-/-} (iNOS^{-/-}) e Trif^{-/-} foram obtidos no biotério de produção da FIOCRUZ.

Todos os experimentos *in vivo* foram realizados no biotério de experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ, o qual é credenciado como NB2. Os animais eram acondicionados em micro-isoladores, com ocupação máxima de 5 animais, maravalha, ração e água autoclavadas e manuseados de acordo com o manual de ética em experimentação animal da instituição.

4.2. Avaliação da atividade adjuvante de agonistas de TLRs derivados de *T. cruzi*

4.2.1. Síntese de CpG ODNs

CpG ODNs derivados do genoma de *T. cruzi*, assim como os controles positivos foram sintetizados pela Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada) como ODNs fosforilados e purificados em colunas para purificação de oligonucleotídeos. A tabela 4.1 mostra as sequências de CpG ODNs da classe B para camundongos, para humanos e híbridos camundongo-humano.

Tabela 1 – Sequência de CpG oligonucleotídeos sintetizados

Classe	Nome	Sequência
CpG classe B Camundongo	B344	TCGACGTTTGGATCGGT
CpG classe B híbrido Camundongo-Humano	B297	TCCTCGTTTTGACGTG
CpG classe B Humano	B128	TCGTCGTTGTAGTCGTA
CpG classe B Camundongo Controle Positivo	CpG 7909 ou CpG(+)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT

4.2.2. Extração de endotoxina de amostras proteicas

A proteína Ovalbumina (OVA) grade IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi submetida à extração de endotoxina pelo método de extração com Triton X-114 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para tanto, a proteína foi diluída em solução salina livre de pirógeno à concentração final de 10 mg/ml. À solução foi adicionado 1% de Triton X-114, incubado em gelo por 30 min, vortexando a cada 5 min. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 37°C por 5 min para a formação de duas fases e centrifugados por 5 min a 13.000 rpm em temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo livre de pirógeno. Esse protocolo de extração foi repetido por seis vezes para a remoção total da endotoxina. Todo o procedimento foi realizado com materiais livres de pirógeno e manuseado em capela de fluxo laminar.

4.2.3. Teste *Limulus Amebocyte* Lysate (LAL)

Para avaliar a dosagem de endotoxina na amostra de Ovalbumina previamente purificada e de NY-ESO-1 recombinante (Produção GMP – LICR/ Cornell University) foi realizado o ensaio de LAL pelo método de Gelclot, com sensibilidade de 0,03 EU/ml (Charles River Endosafe, Wilmington, MA, EUA). O procedimento foi realizado seguindo protocolo do fabricante.

4.2.4. Imunizações com OVA

Animais C57BL/6 foram submetidos a um protocolo de três imunizações, com intervalos de 15 dias. Essas imunizações se deram pela administração de 100 µl de formulação vacinal, via subcutânea, na base da cauda. Cada solução imunizante continha 30% (v/v) de alúmem Rehydrigel L.V. (Reheis, Berkeley Heights, NJ, USA), 10 µg de OVA livre de endotoxina na presença ou ausência de agonistas de Receptores do tipo Toll (TLR), para a avaliação da atividade destes, como adjuvantes imunológicos. Todas as soluções foram preparadas com materiais livres de pirógeno e manuseadas em capela de fluxo laminar. Os seguintes agonistas de TLRs foram utilizados com suas respectivas concentrações por imunização: Monofosforil-lipídio A (MPL) – 10 µg/ml; CpG ODN controle (+) – 180 µg/ml; Pam3Cys – 100 µg/ml; CpG B344, CpG B297, CpG B128 – 180 µg/ml; GIPL GY, GIPL TH – 500 µg/ml.

4.2.5. Imunizações com NY-ESO-1

Animais C57BL/6 e animais imunodeficientes foram submetidos a um protocolo de duas imunizações com intervalos de 21 dias. Essas imunizações se deram pela administração de 100 µl de formulação vacinal, via subcutânea, na base da cauda. Cada solução imunizante continha 30% (v/v) de alúmem Rehydrigel L.V. (Reheis, Berkeley Heights, NJ, EUA), 5 µg de NY-ESO-1 recombinante (Cornell University-LICR, Ithaca, NY, USA) livre de endotoxina na presença ou ausência de agonistas de TLRs para a avaliação da atividade adjuvantes, nas concentrações acima citadas. Todas as soluções foram preparadas com materiais livres de pirógeno e manuseadas em capela de fluxo laminar.

4.2.6. Predição *in silico* de epítopos de linfócitos T específicos para NY-ESO-1

Visando ao estabelecimento de epítopos para linfócitos T, foram utilizados três programas de predição de epítopos disponíveis na Internet. Os programas escolhidos foram: BIMAS (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind); Immune Epitope Database – IEDB (www.immuneepitope.org); SYFPEITHI (www.syfpeithi.de). Cada um dos programas citados utiliza diferentes algoritmos, portanto, foram selecionados aqueles peptídeos que foram

caracterizados como bons ligantes para os MHC de classe I ou classe II nos três programas. Os melhores ligantes foram selecionados para síntese e posterior “screening” *in vitro*.

4.2.7. Síntese de peptídeos

Os peptídeos sintéticos utilizados para re-estimulação *in vitro* de esplenócitos foram sintetizados em sintetizador automático por meio da técnica de Fmoc síntese. Após a síntese, os peptídeos foram purificados em sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão, EUA) em coluna carboximetil-18 e a massa monoisotópica dos mesmos foi confirmada por espectrometria de massa em aparelho MALDI-TOF/TOF. A tabela 2 mostra as sequências sintetizadas.

Tabela 2 – Sequência de peptídeos sintetizados

Peptídeo	Sequência	MHC
OVA CD4	ILTIRLTAADHRQLQ	H2-IAb
OVA CD8	SIINFEKL	H2-Kb
NY-ESO-1 CD4-1	QAEGAGTGGSTGNAN	H2-IAb
NY-ESO-1 CD4-2	AGGPGEAGATGGAGP	H2-IAb
NY-ESO-1 CD4-3	FYLAMPFATPMEAEL	H2-IA
NY-ESO-1 CD8-1	TVSGNILT	H2-kb
NY-ESO-1 CD8-2	SCLQQLSLL	H2-Db
NY-ESO-1 CD8-3	LLEFYLAM	H2-Kb
TSKB18	VNHRFTLV	H2-Kb

4.2.8. “Screening” *ex vivo* dos peptídeos sintetizados para NY-ESO-1

Para seleção dos melhores peptídeos para re-estimulação *in vitro*, foi realizado protocolo semelhante ao acima descrito para imunização com NY-ESO-1 recombinante, em que foram comparados os grupos alúmen, alúmen + NY-ESO-1 e alúmen + NY-ESO-1 + CpG (+). As células do baço dos animais foram submetidas a cultivo de esplenócitos para avaliar a

produção de INF- γ após re-estimulação com os peptídeos. O protocolo detalhado deste procedimento encontra-se no item 4.2.10.

4.2.9. ELISA

Os soros dos animais submetidos às imunizações foram coletados nove dias após a última imunização. Esse soro foi submetido ao método de “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) para avaliação da produção de anticorpos anti-OVA, anti-NY-ESO-1 ou anti-CL-14 específicos. As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno (OVA, NY-ESO-1 ou antígeno total de CL-14), bloqueadas com leite em pó (Molico, Nestlé) diluído em PBS 1X (tampão fosfato 0,15M pH 7,2). As amostras de soro foram diluídas 1:50 em tampão de bloqueio e incubadas por 2 h a 37°C. As placas foram, então, lavadas com PBS 1X contendo 0,5% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e com PBS 1X puro. Em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG total, anti-IgG 1 ou anti-IgG 2c (SouthernBiothec, Birmingham, AL, USA) marcados com peroxidase e incubados por 1 h a 37°C. O experimento foi revelado com substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em tampão citrato-fosfato pH 5,0, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação cromogênica foi paralisada com a adição de H_2SO_4 1:20 e, em seguida, determinada a densidade óptica (O.D.) através da absorbância a 450 nm, lidas em espectrofotômetro de microplacas. Os dados obtidos foram plotados em valores de O.D.

4.2.10. Cultivo de esplenócitos

Os baços dos animais submetidos às imunizações foram coletados 21 dias após a última imunização. Para a obtenção de esplenócitos, os baços dos animais foram macerados, lavados em meio de cultura celular RPMI 1640 contendo 5% soro fetal bovino (SFB) e 40 $\mu\text{g/ml}$ antibiótico gentamicina (Schering-Plough, Cotia, SP). As células foram centrifugadas a 1200 rpm, 4°C por 10 min e, em seguida, submetidas a lise das hemácias em tampão ACK, composto de 150mM de NH_4Cl , 1mM de KHCO_3 e 100 μM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$. Os esplenócitos remanescentes foram lavados mais 2 vezes em RPMI + 5% SFB, e finalmente, ressuspensos

em 1 ml de RPMI 1640 + 10% SFB + 0,2% de sobrenadante de células EL-4 expressando IL-2. Os esplenócitos foram diluídos em Azul de Tripán 0,4% (Gibco, Grand Island, NY, USA) para contagem em câmara de Neubauer.

Para a cultura, 5×10^6 esplenócitos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços na presença ou ausência de peptídeos específicos para linfócitos T CD4+, T CD8+ na concentração de 10 μ M ou Concanavalina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 5 μ g/ml. As placas foram mantidas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 72 h, para posterior coleta dos sobrenadantes da cultura células e dosagem de citocinas por ELISA.

4.2.11. ELISA de citocinas

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram submetidos ao ELISA Sanduíche para dosagem de IFN- γ . O procedimento foi realizado de acordo com manual do kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

4.2.12. Cultivo de linhagens tumorais de melanoma B16 WT e B16 NY-ESO-1

Células da linhagem celular de melanoma B16 foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 100 IU/ml penicilina, 10 μ g/ml estreptomicina, 10% soro fetal bovino (SFB) inativado, 1 μ g/ml tilosina e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. À linhagem transgênica, a qual expressa NY-ESO-1, foram adicionados 250 μ g/ml de geneticina (Gibco, Grand Island, NY, USA) para manutenção do plasmídeo de expressão.

4.2.13. Desafio com melanoma B16

Camundongos imunizados foram desafiados com melanoma B16 expressando ou não o antígeno tumoral NY-ESO-1. Cada animal recebeu 5×10^4 células pela via subcutânea na região dorso posterior. O crescimento tumoral foi acompanhado duas vezes por semana, por um período de 40 dias, através da medida dos diâmetros do tumor. As medidas foram plotadas com o valor da área em mm². Todos os animais quando apresentaram tumores

medindo 600 mm² foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os animais desafiados foram acompanhados pelo mesmo período, para estabelecimento da curva de sobrevivência.

4.3. Caracterização do clone de *T. cruzi* CL-14

4.3.1. Cultivo de *T. cruzi*

O clone de *T. cruzi* CL-14 foi mantido em cultivo em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% SFB, penicilina a 100 U/ml e estreptomicina a 100 µg/ml em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 28°C. Os parasitos transgênicos foram mantidos assim como a clone selvagem, mas na presença de geneticina a 250 µg/ml.

Para a obtenção de formas tripomastigotas de cultura e amastigotas extracelulares, células LLCMK2 mantidas em RPMI suplemento com 5% SFB, penicilina e estreptomicina foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos na proporção de 5 parasitos/ célula. As células foram, então, mantidas em estufa a 34°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as culturas foram tratadas por 24 horas com soro de cavalo para a eliminação de possíveis formas epimastigotas da cultura. Posteriormente, foi restabelecida a cultura com 5% SFB até o aparecimento de formas tripomastigotas ou amastigotas extracelulares, em torno de 7 a 8 dias após a infecção.

4.3.2. Infecção *in vivo* com *T. cruzi* em camundongos selvagens e imunodeficientes

Camundongos C57BL/6 e diversos camundongos deficientes foram infectados com o clone CL-14 ou com a cepa CL Brener para avaliação de parasitemia e mortalidade. Animais infectados com o clone CL-14 receberam 10⁷ parasitos na forma tripomastigota metacíclica e animais infectados com a cepa CL Brener receberam 5x10⁵ parasitos na forma tripomastigota metacíclica. Todos os parasitos foram diluídos em tampão PBS 1X, e as infecções foram realizadas pela via intraperitoneal.

4.3.3. Parasitemia e mortalidade em camundongos infectados

Animais infectados com *T. cruzi* clone CL-14 e cepa CL Brener foram monitorados quanto à presença de parasitos na forma de tripomastigota sanguíneo. Para tanto, foram retirados 5 µl de sangue da cauda dos animais e aplicados em lâmina de microscopia cobertas com lamínula de 20 x 20 cm. Foram analisados 50 campos com o aumento de 40 X. O valor da parasitemia foi dado pelo método de Brener (Brener, 1961), no qual se multiplica o número de parasitos pelo fator de correção do microscópio.

4.3.4. Desafio de animais imunizados com o clone CL-14

Animais C57BL/6 infectados com o clone CL-14 foram desafiados com 5×10^3 parasitos da cepa CL Brener, na forma tripomastigota sanguínea aos 30 dias após a infecção. Esses animais foram acompanhados quanto à parasitemia e mortalidade por 30 dias com o intuito de avaliar proteção.

4.4. Construção de *T. cruzi* expressando NY-ESO-1

4.4.1. Clonagens (estratégia)

Com o intuito de gerar *T. cruzi* do clone CL-14 capazes de expressar o antígeno tumoral NY-ESO-1, foram realizadas sub-clonagens, em que o gene do NY-ESO-1 foi retirado do plasmídeo pQE9NY-ESO-1 (anexo 2) e subclonado em pBluescript para obtenção dos sítios de restrição *Xba*I e *Xho*I, para posterior inserção no plasmídeo pRockNeo utilizado para transfecção dos parasitos. O gene NY-ESO-1 foi retirado do vetor pQE9 e clonado em pBluescript. Clones de bactérias contendo as construções gênicas foram selecionados e os plasmídeos resultantes foram purificados, utilizando-se kit Mini-prep ou Maxi-prep (Qiagen, Hilden, Germany).

Três construções foram desenvolvidas: (a) pRockNY-ESO-1 sem cauda de histidina; (b) pRockNY-ESO-1 com calda de histidina; (c) pRockNY-ESO-1 com peptídeo de sinal da glicoproteína 63 (gp63).

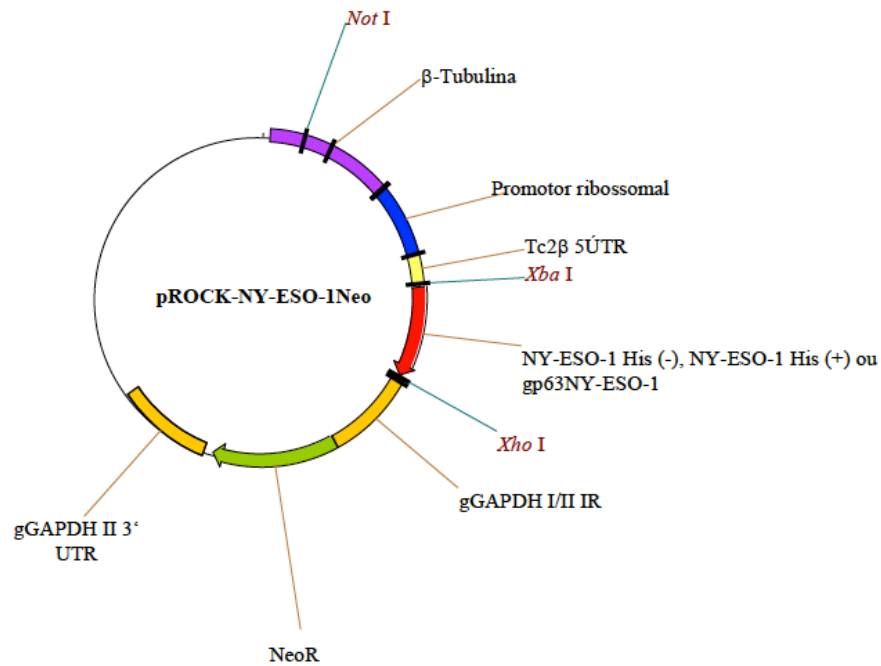


Figura 3.1

Representação esquemática do vetor pROCKNY-ESO-1Neo. Este vetor permite a integração do gene exógeno no locus do gene da β -tubulina, tem o promotor ribossomal de *T. cruzi* seguido pela região intergênica da proteína ribossomal TcP2b 50 (HX1), que fornece o sítio de adição da sequência *splice leader* para o mRNA do gene NY-ESO-1. Este também contém a sequência intergênica 3'UTR derivada do gene gGAPDH I/II, os quais fornecem o sinal para a poliadenilação do gene NY-ESO-1 como também para os sinais de *trans-splicing* para o gene de resistência a neomicina (NeoR), usado como marcador de seleção. Sítios de enzimas de restrição: *NotI*, *XhoI*, *XbaI* em vermelho.

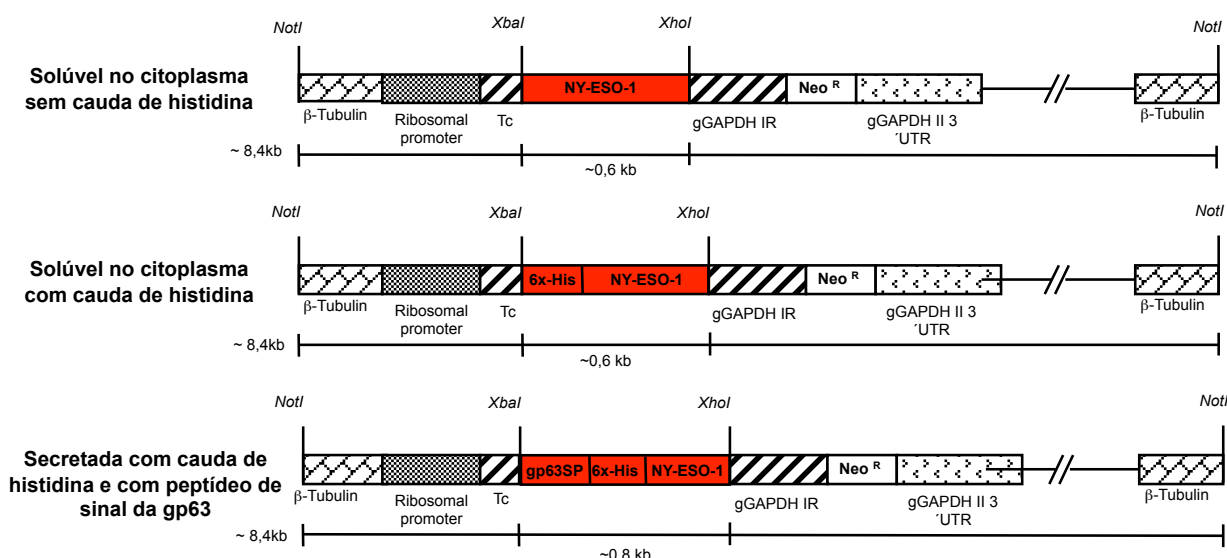


Figura 3.2

Cassete de inserção no genoma do parasito, após digestão com *NotI*.

(A) NY-ESO-1 solúvel sem a cauda de Histidina [NY-ESO-1His(-)], (B) NY-ESO-1 solúvel com a cauda de Histidina [NY-ESO-1His(+)], (C) gp63-NY-ESO-1 forma secretada no citoplasma. (D) pROCKNeo circular contendo NY-ESO-1His(-), NY-ESO-1His(+) ou gp63-NY-ESO-1.

4.4.2. Eletroforese em agarose

O perfil de amostras de DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% adicionado com SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) submerso em tampão TAE 1X, com corrente elétrica constante de 80 V. Após a corrida, o gel foi fotografado em transiluminador de luz UV.

4.4.3. Transfecção de *T. cruzi*

Parasitas do clone CL-14 foram transfectados por eletroporação, na qual 10^8 parasitos na fase de crescimento exponencial foram lavados com PBS 1X, centrifugados e ressuspendidos em tampão de eletroporação eletroporação [tampão CITOMIX (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄; 2 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 25 mM Hepes; pH 7,6) e tampão

Sacarose (277 mM sacarose; 7 mM KH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; pH 7,4). À curveta de eletroporação de 0,2 cm foram adicionados 50 µg do plasmídeo previamente digerido com *NotI*, ou água como “mock” e, em seguida, foram adicionados os parasitos. Os parasitos foram eletroporados a 0.3 KV e 500µF, com dois pulsos com intervalos de 10 segundos, usando um Bio-Rad gene pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O produto da eletroporação foi transferido para meio de cultura LIT suplementado com 10% SFB. 24 horas após a eletroporação, foram adicionados à cultura 250 µg/ml de geneticina para seleção dos parasitos transgênicos. O período de seleção durou de 3 a 6 semanas.

4.4.4. Clonagem de parasitos em placas de ágar sangue

Parasitos transfectados foram sub-clonados em placas de ágar-sangue preparadas usando 0,75% (p/v) de agarose *low melting* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 2% de sangue humano desfibrinado misturado com meio LIT contendo 200 µg/ml do antibiótico G418. O sangue desfibrinado foi obtido pela coleta em tubo estéril, contendo esferas de vidro que foram manualmente homogeneizadas. Após solidificação do meio em placas de Petri, estas foram invertidas e incubadas a 37° C por 48h (Gomes et al., 1991). Parasitos nas concentrações de 10², 10³ e 10⁴ diluídos em 0,1 ml de meio LIT foram plaqueados e incubados a 28 °C. Após cerca de 30 dias, colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para 1 ml de meio LIT suplementado com G418 em placas de cultura de 24 poços.

4.4.5. Extração de DNA de *T. cruzi*

Culturas de parasitos, em fase exponencial de crescimento, totalizando 10⁸ células, foram utilizadas para a extração do DNA genômico. O procedimento foi dividido em três etapas: lise celular, desproteinização e precipitação do DNA. Na primeira etapa, a cultura foi transferida para tubos de 15 ml e centrifugada a 2000 x g, a 4° C, por 10 min. Os parasitos foram lavados duas vezes com tampão PBS 1x, ressuspensos em solução de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0; 100µM EDTA pH 8,0; 20 µg/ml RNase A, 0,5% SDS) e incubados por 1h a 37° C. Em seguida, adicionou-se proteinase K para uma concentração final de 100 µg/ml e o lisado foi homogeneizado e incubado a 50° C por 3h. Na segunda etapa, foram adicionados, ao

lisado, 200µL de fenol e a mistura homogeneizada e centrifugada a 2000 xg por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1. A mistura foi novamente homogeneizada e centrifugada a 2000xg por 10min por 10min a 4° C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 200µL de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1. A mistura foi homogeneizada mais uma vez, centrifugada a 2000xg por 10min a 4° C, e a fase aquosa foi transferida para outro tubo. Na terceira etapa, foram adicionados dois volumes de etanol absoluto e NaCl na concentração de 0,25M. A mistura foi homogeneizada, incubada por no mínimo 3h a -20° C e centrifugada a 10.000 xg por 15min a 4° C. O sedimento foi lavado por duas vezes em etanol 70% e ressuspensão em 100µL de H₂O livre de nuclease.

4.4.6. Southern Blot

Aproximadamente 10mg de DNA genômico foram digeridos com enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 0,7%, contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio. Após a corrida eletroforética, o gel foi desnaturado em tampão 0,25M HCl por 10min, tratado com 0,5N NaOH, 1M NaCl por 30min, neutralizado com tampão 0,5M Tris-HCl, pH 7,4, 3M NaCl por 30min à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi transferido para um sistema de transferência por capilaridade onde foi colocado uma membrana de nylon sobre o gel, várias camadas de papel absorvente, sendo utilizado o tampão SSC 10X pH 7,0 (1,5M NaCl, 0,15M C₆H₅Na₃O₇) para possibilitar a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana. Após 12 – 16h de transferência, a membrana foi colocada em um equipamento de *crosslinking* (Stratagene, Santa Clara, CA, EUA)) para fixação do DNA na mesma.

4.4.7. Preparação e hibridização das sondas radioativas

A sonda utilizada no ensaio de *Southern blot* foi preparada a partir da digestão do vetor pROCKNY-ESO-1His(-) com a enzima de restrição *Xba*I e *Xho*I para a retirada do fragmento NY-ESO-1 e de amostras de cDNA amplificadas de plasmídeos, contendo genes

com múltiplas cópias de Amastina de *T. cruzi*. Os fragmento resultantes foram extraídos do gel, purificados e marcados com [32P] dCTP, conforme protocolo do kit Megaprime DNA Labelling System (GE, Pittsburgh, PA, USA). A pré-hibridização da membrana foi realizada em 15mL do tampão Church [1% BSA, 500mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA e 7% de SDS (Church e Gilbert, 1984) durante 2h a 50° C. Posteriormente, a sonda desnaturada (5min a 95° C e logo após 5min no gelo) foi adicionada à solução de hibridização e incubada durante 14h a 65° C. Após a hibridização, a membrana foi lavada quatro vezes com SSC 2x (300mM NaCl, 30mM C₆H₅Na₃O₇) e 0,1% de SDS, à temperatura ambiente. Após a lavagem, a membrana foi exposta em sistema “Storage Phosphor Autoradiography” de revelação para leitura no Scanner Typhoon (GE, Pittsburgh, PA, USA).

4.4.8. Western Blot

Para a realização de *Western Blot*, 10⁷ parasitos na forma epimastigota foram lavados em PBS 1X e ressuspensos em tampão de amostra 1 X para Gel SDS PAGE. As amostras foram aquecidas a 96°C por 5 minutos e aplicadas em gel SDS PAGE 15%. Após a corrida, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose e bloqueadas de um dia para o outro em tampão de bloqueio, contendo 5% de leite em pó, 0,01% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluídos em PBS 1X. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com anticorpos primários (anti-NY-ESO-1 1:3000, anti-His tag 1:4000 ou soro de animais imunizados 1:50) por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS 1X, contendo 0,05% Tween 20 e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-mouse IgG total – HRP diluído 1:3000. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão de bloqueio, 3 vezes com PBS Tween e, finalmente, 3 vezes com PBS 1X. A revelação foi realizada após a aplicação de ECL Plus na membrana, de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, escaneada em Scanner Storm (GE, Pittsburgh, PA, USA).

4.4.9. Microscopia confocal

Os parasitos transgênicos assim como a forma selvagem, foram submetidos à microscopia confocal para detectar a expressão da proteína NY-ESO-1 pelo parasito. Para tanto, formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas extracelulares e tripomastigotas de cultura celular foram fixadas com paraformaldeído 2%, lavadas com PBS 1X e aplicadas em lâminas de poli-L-lisina para aderência celular. No dia seguinte as amostras foram reidratadas, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e bloqueadas por 1 hora com PBS 1X com 5% SFB. Em seguida, foram incubadas com anticorpos primários (anti-NY-ESO-1 1:1000 ou anti-His tag 1:1000) por 1 hora. Antes e após a incubação com o anticorpo secundário Alexa 488 anti-mouse IgG total, as lâminas foram lavadas 5 vezes com tampão de bloqueio. Como última etapa, foi adicionado Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), antes da colocação da lamélula.

As lâminas foram analisadas em microscópio laser confocal LSM Zeiss com laser de 358 nm para o núcleo corado por DAPI e 488 nm para detecção da proteína NY-ESO-1 e da imagem transmitida (DIC). As imagens foram adquiridas ao aumento de 63X com “crop” e formatadas pelo software Zeiss LSM Image Browser.

4.5. Avaliação da capacidade das formulações vacinais desenvolvidas, em induzir resposta celular em células de humanos

4.5.1. Imunohistoquímica de linhagens de melanomas humanos infectados com *T. cruzi*

Linhagens de melanomas derivadas de pacientes humanos, SK-MEL-149 e SK-MEL-19 foram plaqueadas em lâminas de microscopia, contendo quatro câmeras de contenção e, posteriormente, infectadas com os parasitos transgênicos, assim como o clone selvagem. Dois dias após a infecção, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com 10% formalina e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 para realização do protocolo de imunohistoquímica. Para tanto, foi utilizado o kit PowerVision Poly-HRP (Leica Biosystems

Newcastle, Inglaterra) e como anticorpo primário foi utilizado anti-NY-ESO-1 na concentração de 1,5 µg/ml. As lâminas foram documentadas no aumento de 40X.

4.5.2. Separação de PBMC de amostras de sangue humano

Amostras de sangue de doadores saudáveis obtidas sob consentimento dos mesmos no “New York Blood Center” foram utilizadas para obtenção de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC). Para tanto, foi realizada extração com Ficoll-Paque sob centrifugação a 1800 rpm, por 30 min. Após a centrifugação, foi retirado o anel de linfócitos e transferido para novo tubo, onde foi lavado por três vezes com RPMI. Ao término do procedimento, as células foram contadas e submetidas à separação de linfócitos T CD8+ e T CD4+ por meio de esferas magnéticas Dynalbeads (Invitrogen). O protocolo foi seguido como manual do fabricante. Os linfócitos foram plaqueados em placas de 96 poços com fundo cônico em meio de cultura RPMI suplementado com 10% soro humano-AB inativado (Mediatech, Manassas, VA, EUA) e mantidos de um dia para o outro em estufa a 37° C e 5% CO₂.

Paralelamente, células totais PBMC foram infectadas com Epstein-Barr virus (EBV) para obtenção de linfócitos B imortalizados para serem utilizados como células apresentadoras de antígenos (APC) nos ensaios de ELISPOT. A cada 10⁷ células foram-se adicionados 500 µl de sobrenadante de células infectadas com EBV e 2 µg/ml de ciclosporina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A cultura foi repicada a cada 5 dias para manutenção da cultura.

4.5.3. Sensitização in vitro de linfócitos T CD4+ e T CD8+

Células CD4-/CD8- provenientes da separação com as esferas magnéticas foram infectadas com os parasitos transgênicos ou com o clone selvagem, na proporção de 30 parasitos/célula. Estas foram mantidas de um dia para o outro em tubos de criopreservação a 37° C. No dia seguinte, as células foram irradiadas com 30 Gy e, posteriormente, lavadas três vezes com meio de cultura Ex-vivo 15 (Lonza, Rockland, ME, EUA). 10⁶ células de cada infecção, separadamente, foram plaqueadas com 5 x 10⁵ linfócitos T CD4+ e T CD8+, também

separadamente, em um volume final de 250 µl, em meio Ex-vivo 15. 6 horas após o plaqueamento da co-cultura, foram-se retirados 125 µl do sobrenadante e adicionado 125µl de meio Ex-vivo 15 suplementado com 10 IU/ml de IL-2 (Roche Applied Science, Penzberg, Alemanha) e 20 ng/ml de IL-7 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A cada 4 dias, a metade do meio de cultura foi trocado, como descrito.

4.5.4. ELISPOT

Para a realização do ensaio de “Enzyme-linked immunosorbent spot” (ELISPOT), no primeiro dia, placas de cultura celular MultiScreen - HA (Millipore) de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IFN-γ de um dia para o outro a 4°C. Paralelamente, 10⁶ linfócitos B-EBV modificados como APCs foram pulsados com um “pool” de peptídeos que percorrem toda a sequência da proteína NY-ESO-1 ou com Folwpox vírus selvagem ou FolwpoxNY-ESO-1.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS 1X, bloqueadas com RPMI + 10% SAB por 2 h e lavadas três vezes com meio de cultura RPMI. Em seguida, 5 x 10⁴ de cada linfócitos T (CD4+ ou CD8+) e 5 x 10⁴ de cada APCs, previamente lavadas com RPMI, foram plaqueados por poço. As placas foram mantidas em estufa por 24 h, com 5% CO₂ a 37°C. Este procedimento foi realizado nos dias 8 e 13, após a co-cultura de linfócitos e APCs infectadas para os linfócitos T CD8+ e nos dias 20 e 24 para linfócitos T CD4+.

Após o período de cultivo, as células foram descartadas, as placas lavadas com PBS tween 20 e incubadas por 2 h com anticorpo biotinilado anti-IFN-γ. Em seguida, foram novamente lavadas e incubadas com streptavidina-ALP (Roche Applied Science, Penzberg, Alemanha) por 1 h. O ensaio foi revelado com substrato BCIP/NTB diluído em água. A reação cromogênica foi paralisada com água corrente. Os *spots* foram quantificados em leitor de ELISPOT ImmunoSpot (CTL).

4.5.5. Citometria de fluxo para avaliação de linfócitos CD8+/ tetrâmero+

Linfócitos T CD8+ anteriormente e 13 dias após a pressensitização foram avaliados quanto à capacidade de se ligarem ao HLA-0201, apresentando o peptídeo SLLMWITQC - ESO₁₅₇₋₁₆₅, derivado da sequência de NY-ESO-1. Para tanto, as células foram marcadas com mAb anti-CD8+ PerCPe 1:100 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) e com 0,25 µg do tetrâmero (LICR Facility – Suíça). 20.000 eventos foram coletados em FACScalibur e analisados por meio do software FlowJo.

4.6. Avaliar a capacidade dos parasitos transgênicos de induzir resposta imune anti-NY-ESO-1

4.6.1. Imunização de animais com *T. cruzi* transgênicos

Infecções com a clone CL-14 ou seus transgênicos foram realizadas com o inóculo de 10⁷ parasitos por animal na forma tripomastigota metacíclica via intraperitonal. Na ocasião das infecções com o intuito de imunização, foram realizadas duas infecções equivalentes, sendo a segunda 30 dias após a primeira. Ao 15^o dia após a segunda imunização, os animais foram sangrados pelo plexo orbital para realização de ELISA anti-IgG presente no soro. Ao 21^o dia, também após o reforço, os animais foram sacrificados para retirada do baço para se avaliar a resposta celular.

4.6.2. Avaliação da resposta celular

Com intuito de avaliar a resposta celular foram realizados cultivos de esplenócito para quantificação de citocinas do sobrenadante das culturas, assim como descrito no tópico 4.2.13, além de citometria de fluxo, como se segue.

4.6.2.1. Citometria de fluxo para avaliação de linfócitos CD8+/ tetrâmero+

Células derivadas do baço de animais imunizados com *T. cruzi* foram submetidas a citometria de fluxo para avaliação da população CD8+, responsiva aos tetrâmeros, contendo

peptídeos TSKB18 ou NY-ESO-1 CD8. Para tanto, 10^6 células do baço foram marcadas com 0,25 µg de tetrâmero PE (LICR facility – Suíça), anti- CD3 Cy5 1:200 e anti- CD8 FITC 1:100 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) . 200.000 eventos foram coletados em FACScalibur e analisados por meio do software FlowJo.

4.7. Avaliar a capacidade protetora induzida pela imunização com parasitos transgênicos

Animais vacinados com os parasitos transgênicos e seus controles negativos foram desafiados ao 21^o dia após a segunda imunização. Cada animal recebeu 5×10^4 células do melanoma B16 ou da linhagem transgênica B16-NY-ESO-1. O crescimento tumoral foi acompanhado por 40 dias, por meio da medida do diâmetro dos tumores. Os dados foram plotados em valores de mm². Todos os animais, quando apresentaram tumores medindo 600 mm², foram eutanasiados em câmara de CO₂.

4.8. Avaliar a capacidade imunoterapêutica dos parasitos transgênicos

4.8.1. Cultivo de linhagens tumorais CMS5a e CT26

Células das linhagem tumorais CMS5a e CT26 foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 100 IU/ml penicilina, 10 µg/ml estreptomicina, 10% soro fetal bovino (SFB) inativado, 1 µg/ml tilosina e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. À linhagem transgênica CMS5a-NY-ESO-1 foram adicionados 7,5 µg/ml do antibiótico puromicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a linhagens CT26-NY-ESO-1 foram adicionados 250 µg/ml de geneticina.

4.8.2. Tratamento de animais previamente desafiados com linhagens tumorais

Camundongos fêmeas de Balb/c com idade de 6 semanas foram desafiados com 1×10^6 células de CT26, CT26NY-ESO-1, CMS5a ou CMS5aNY-ESO-1. No dia seguinte ao desafio, os mesmos animais receberam como tratamento 200µl pela via intraperitoneal de PBS, 10^7

parasitos CL-14WT, CL-14NY-ESO-1His+ ou CL-14NY-ESO-1gp63. Outros dois tratamentos equivalentes foram administrados com intervalos de 5 dias. O crescimento tumoral foi acompanhado por 40 dias, por meio da medida do diâmetro do tumor. Os dados foram plotados em valores de mm^2 . Todos os animais, quando apresentaram tumores medindo 600 mm^2 , foram eutanasiados em câmara de CO_2 . Paralelamente, foi feito acompanhamento da sobrevivência dos animais desafiados.

4.9. Plotagem de dados e estatística

Todos os gráficos gerados foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA), por meio do qual também foram feitas as estatísticas dos dados, utilizando os métodos adequados para cada situação.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização de moléculas agonistas de TLRs derivadas de *T. cruzi* como adjuvantes imunológicos

Com o intuito de caracterizar agonistas de TLRs derivados de *T. cruzi*, foram realizadas imunizações em animais C57BL/6, os quais receberam três doses de soluções contendo alúmen, OVA e agonistas de TLRs. Inicialmente, GIPLs derivados de *T. cruzi* (GY – derivado da cepa Y e GTH – derivado da cepa Taluhen) foram comparados com GIPL de *Cryptococcus neoforms* (CN3501), MPL A e Pam3Cys. A produção de anticorpos OVA específicos e produção de IFN- γ específicos foram avaliadas e demonstradas na figura 5.1. Os dados da figura A mostram que todas as formulações contendo agonistas de TLRs foram capazes de induzir a produção de IgG2c, isotipo característico de resposta imunológica tipo 1. Quanto a IgG toatal e IgG1, todos os grupos contendo OVA foram capazes de produzir anticorpos OVA-específicos, o que normalmente é propiciado pela adição do alúmen ao antígeno. Na figura B, observa-se que os controles MPL e Pam3Cys são capazes de induzir produção de INF- γ por linfócitos T CD4+ e T CD8+ OVA-específicos. No entanto, os três GILPs testados são capazes de induzir produção de IFN- γ OVA-específicos, apenas pelas células T CD4+. Observa-se, também, que dentre os GIPLs testados, sugere-se uma tendência do GY como melhor imunoestimulador do que os demais.

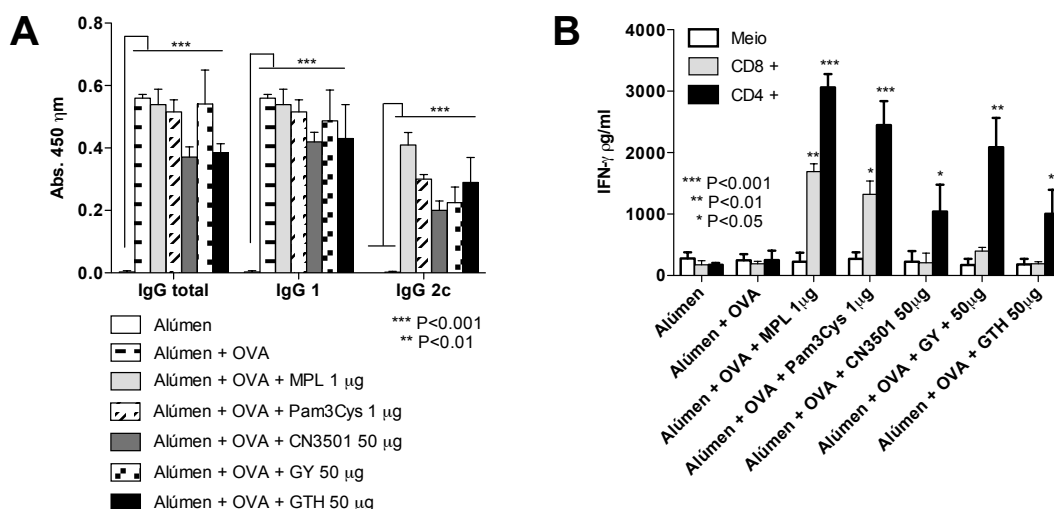


Figura 5.1

Avaliação de reposta imune induzida por imunização com agonistas de TLR2 e TLR4.

Animais C57BL/6 foram imunizados em duas doses com formulações contendo alúmen, OVA e agonistas de TLR2 e TLR4. **(A)** Produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c anti-OVA presente no soro dos animais foi avaliada por ELISA. **(B)** Esplenócitos de camundongos imunizados foram re-estimulados com peptídeos T CD4+ e T CD8+ OVA-específicos e a produção de IFN-γ após 72h de cultivo foi quantificada por ELISA anti IFN-γ.

Comparativamente com CpG ODN tido como controle positivo, CpGs derivados do genoma de *T. cruzi* (CpG B344, B297 e B128) foram utilizados em protocolos de imunização para avaliar a capacidade imunoestimulatória dessas moléculas. Assim como no dado anterior, foi avaliada a produção de anticorpos OVA-específicos e a produção de IFN-γ OVA-específicos (Figura 5.2). No dado mostrado na figura A, observamos que as formulações contendo agonistas foram novamente capazes de induzir IgG2c, o que não ocorre quando misturado OVA somente com alúmen. IgG toatal e IgG1 foi produzido por animais de todos os grupos que receberam o antígeno. A figura B mostra que todos os CpGs testados induziram produção de IFN-γ OVA-específica, tanto por linfócitos T CD4+ quanto T CD8+.

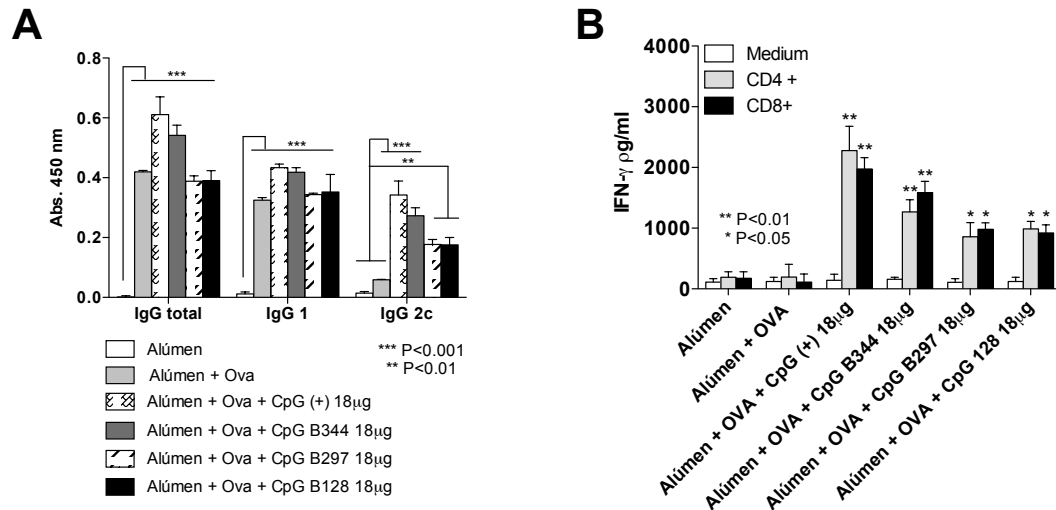


Figura 5.2.

Avaliação de resposta imune induzida por imunização com agonistas de TLR 9. Animais C57BL/6 foram imunizados em duas doses com formulações contendo alúmen, OVA e agonistas de TLR9. **(A)** Produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c anti-OVA presente no soro dos animais foi avaliada por ELISA. **(B)** Esplenócitos de camundongos imunizados foram re-estimulados com peptídeos T CD4+ e T CD8+ OVA-específicos e a produção de IFN- γ após 72h de cultivo foi quantificada por ELISA anti IFN- γ .

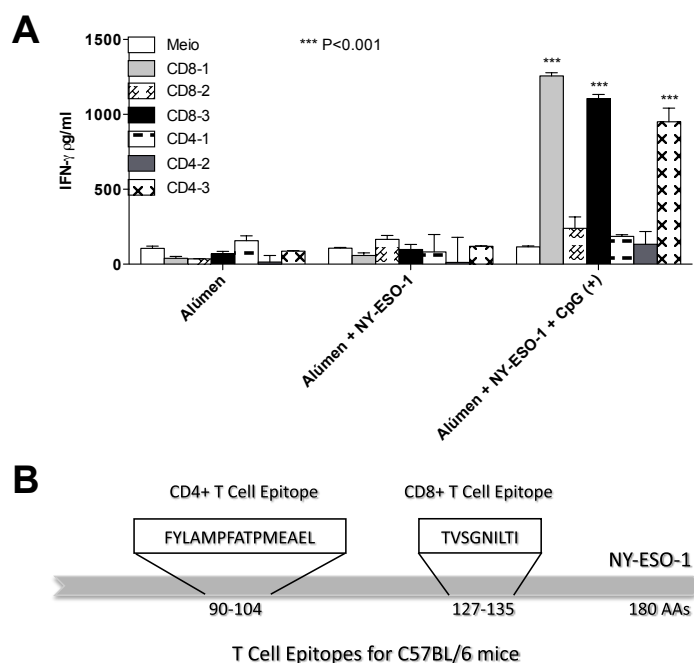


Figura 5.3.

Seleção de peptídeos como função de epítomos para linfócitos T. Peptídeos preditos por meio de programas de predição *in silico* foram sintetizados para serem avaliados *in vitro*. **(A)** Animais C57BL/6 imunizados com formulações contendo NY-ESO-1 tiveram seus baços retirados para cultivo das células do mesmo sob re-estimulação com os peptídeos sintetizados e posteriormente foi feito ELISA anti-IFN- γ com o sobrenadante das culturas. **(B)** O esquema ilustra os peptídeos selecionados para experimentos futuros.

Após a caracterização de protocolos de imunização utilizando OVA como antígeno abundante, foram então iniciados protocolos de imunização, utilizando o antígeno tumoral NY-ESO-1. No entanto, foi preciso selecionar os epítomos para linfócitos T CD4+ e T CD8+ para uma avaliação mais precisa da resposta imunológica. Para tanto, células do baço de animais imunizados com formulações contendo NY-ESO-1 foram re-estimuladas com os peptídeos para seleção *in vitro* dos mesmos. Os dados de quantificação de IFN- γ do sobrenadante das culturas indicaram que os peptídeos CD4-3, CD8-1 e CD8-3 foram capazes de induzir produção de citocina.

Uma vez caracterizados os agonistas de TLRs derivados do parasito *T. cruzi*, foram selecionados com base nos dados acima mostrados o GIPL da cepa Y (GY) e o CpG B344 para experimentos de imunização com o antígeno tumoral NY-ESO-1. Para tanto, foram realizadas imunizações utilizando agonistas controle como o CpG (+) e o MPL comparativamente com

GY, CpG B344, ou combinações desses, em formulação com o NY-ESO-1. A figura 5.4 ilustra resposta humoral e celular anti-NY-ESO-1. Os dados de resposta humoral (A) são coerentes com aqueles encontrados quando utilizado o antígeno OVA. Já nos dados de produção de IFN- γ , observa-se, que os controles e as formulações contendo CpG B344 foram bons indutores de IFN- γ , no entanto, os grupos contendo somente o GIPL ou a combinação GY e MPL não foram capazes de induzir IFN- γ em níveis satisfatórios.

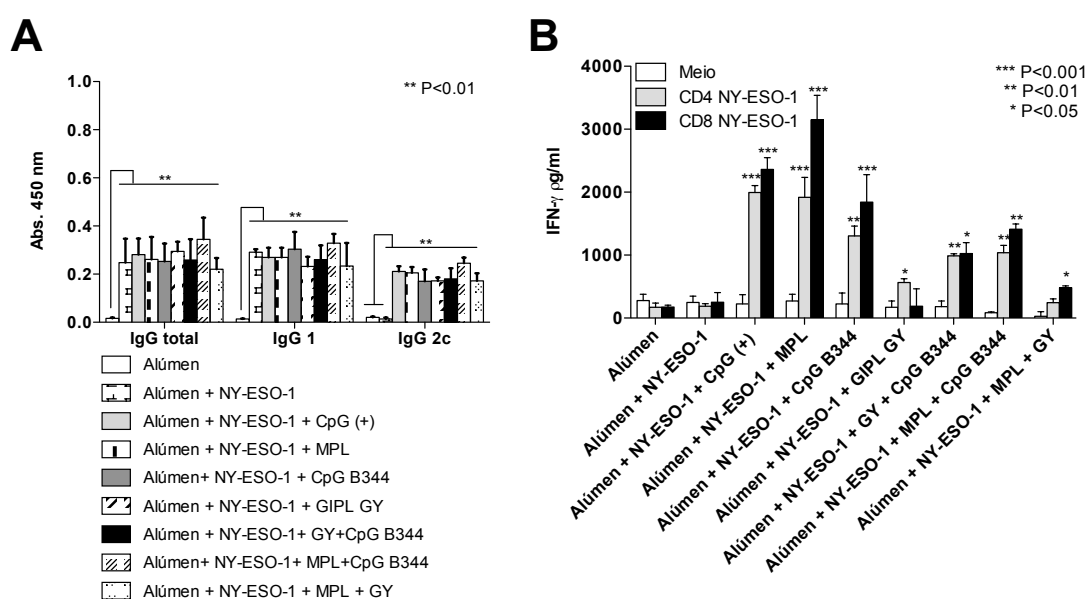


Figura 5.4

Avaliação da resposta imune induzida por imunização com o antígeno tumoral NY-ESO-1.

Animais C57BL/6 foram imunizados em duas doses com formulações contendo alúmen, NY-ESO-1 e agonistas de TLRs. **(A)** Produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c anti-NY-ESO-1 presente no soro dos animais foi avaliada por ELISA. **(B)** Esplenócitos de camundongos imunizados foram re-estimulados com peptídeos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos e a produção de IFN- γ após 72h de cultivo foi quantificada por ELISA anti IFN- γ .

Uma vez avaliada a capacidade de induzir resposta imune NY-ESO-1 específica, camundongos C57BL/6 foram submetidos ao mesmo protocolo de imunização e, posteriormente, desafiados com 5×10^4 células de melanoma B16 expressando ou não NY-ESO-1. O crescimento tumoral foi avaliado duas vezes na semana por um período de 40 dias (Figura. 5.5). Neste dado, observa-se que as formulações contendo o CpG de *T. cruzi* B344 foram mais eficientes em retardar o crescimento tumoral, do que os controles positivos.

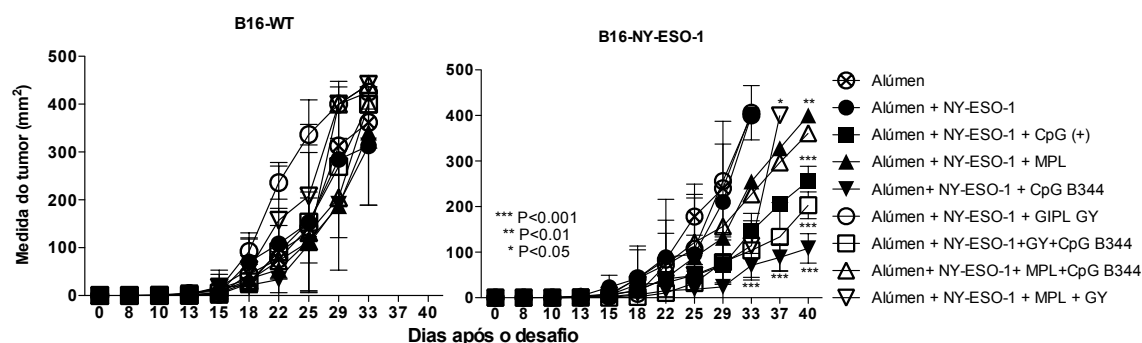


Figura 5.5

Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação com formulações contendo o antígeno NY-ESO-1. Animais vacinados com as formulações contendo alúmen, NY-ESO-1 e agonistas TLRs foram desafiados com 5×10^4 células de melanoma B16, expressando ou não o antígeno tumoral NY-ESO-1. **(A)** O crescimento tumoral foi medido por 90 dias. **(B)** Os animais que receberam melanoma B16-NY-ESO-1 foram monitorados também quanto à porcentagem de sobrevivência após o desafio.

5.2. Caracterização do clone de *T. cruzi* CL-14 quanto a sua não patogenicidade

Visando à utilização do clone CL-14 como vetor vacinal, animais selvagens e deficientes para diversas moléculas fundamentais para o perfeito funcionamento do sistema imune (INOs^{-/-}, Rag^{-/-}, CD8^{-/-}, TRIF^{-/-}, MyD88^{-/-}, IL-12^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}) foram infectados com o clone CL-14 para verificar-se a parasitemia e mortalidade. Os dados mostram que somente os animais Rag^{-/-} e IFN^{-/-} não foram capazes de controlar a parasitemia e impedir mortalidade (Figura 5.6). No restante dos animais não foram encontrados parasitos em circulação e nenhum deles apresentou mortalidade, o que confirma a baixa virulência do clone.

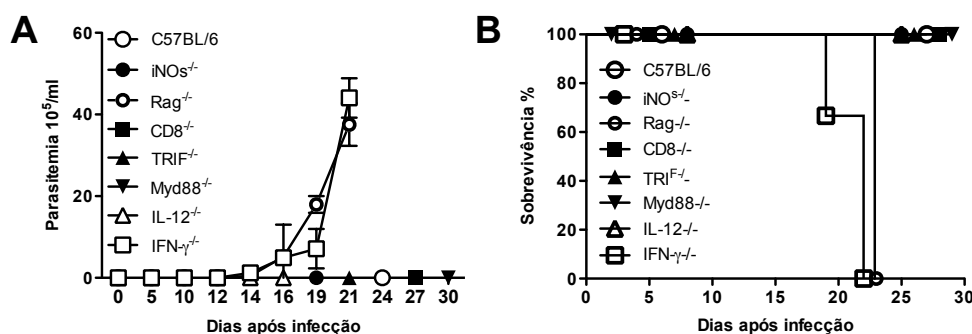


Figura 5.6

Monitoramento da parasitemia e mortalidade de animais infectados com o clone CL-14.

(A) Camundongos C57BL/6 e imunodeficientes infectados com formas tripomastigotas metacíclicas do clone CL-14 foram monitorados por 30 dias quanto à parasitemia (A) e mortalidade (B).

Complementarmente, animais selvagens vacinados ou não com o clone CL-14 foram desafiados ao 30^o dia após a imunização com o clone. Para o desafio, cada animal recebeu 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa CL Brener pela via intraperitoneal. Durante 30 dias foi feito o acompanhamento da parasitemia e da mortalidade. Os dados mostraram que animais vacinados com o clone não patogênico são capazes de proteger animais contra um seguinte desafio (figura 5.7).

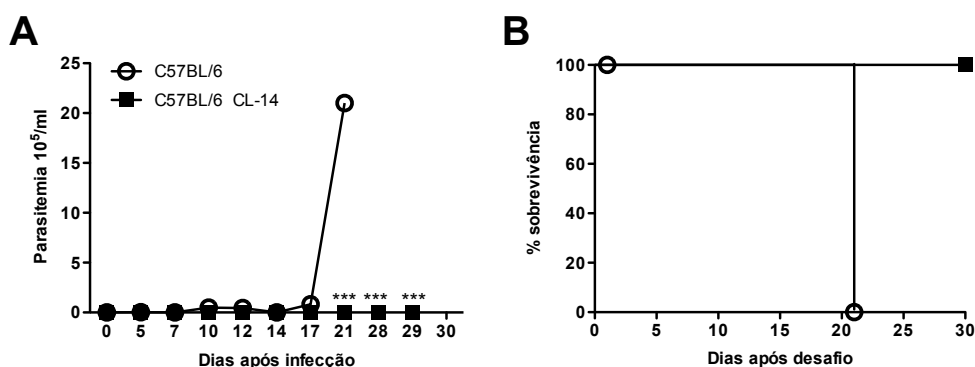


Figura 5.7

Monitoramento da parasitemia e mortalidade de animais vacinados com o clone CL-14 e posteriormente desafiados com a cepa CL Brener.

Camundongos C57BL/6 vacinados com o clone CL-14 foram desafiados com a forma tripomastigota sanguínea da cepa CL Brener. Estes foram acompanhados por 30 dias quanto à parasitemia e mortalidade.

5.3. Obtenção de parasitos do clone CL-14 expressando o antígeno tumoral NY-ESO-1

Uma vez estabelecida a baixa virulência do clone CL-14 foram então iniciadas as construções dos plasmídeos pRockneo com a inserção do gene codificante para NY-ESO-1 para transfecção em *T. cruzi*. Foram realizadas três construção gênicas como proposto na metodologia (item 4.4.1), sendo duas em que o antígeno tumoral ficará solúvel, contendo ou não a cauda com seis resíduos de histidina [pROCKNY-ESO-1His(+); pROCKNY-ESO-1His(-)] e a outra que contém o peptídeo sinal da glicoproteína de 63 kDa (gp63) para direcionar a secreção de NY-ESO-1 no citoplasma do parasito. Todas as construções gênicas elaboradas foram inseridas no vetor pROCKNeo. Este vetor foi desenhado para permitir a integração de um gene exógeno por recombinação homóloga no locus da tubulina, o qual contém um grande arranjo de cópias alternativas dos genes α - e β -tubulina. Além disso, esse vetor também contém sequências derivadas das regiões flanqueadoras da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal (gGAPDH), permitindo a expressão constitutiva do gene exógeno em todas as formas do parasito (DaRocha et al., 2004b). O gel que comprova a presença do inserto, contendo a região codificante para NY-ESO-1 nas três diferentes construções, encontra-se na figura 5.8.

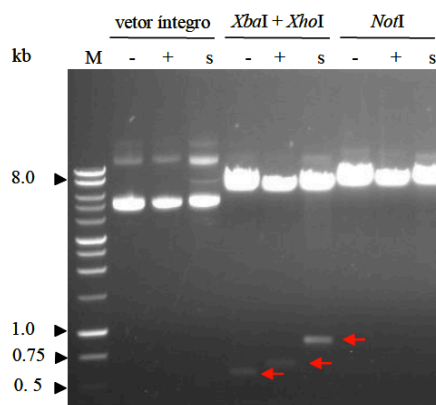


Figura 5.8

Perfil de restrição das construções gênicas. Cerca de 100ng do vetor pROCKNY-ESO-1His(-) ou His(+) e pROCKgp63NY-ESO-1 foram digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*, *NotI*, a 37° C por 2h. Os produtos das reações de digestão foram analisados em gel de agarose a 1% corados com SYBR Safe. **M**: marcador de DNA de 1kb; **(-)**: pROCKNY-ESO-1His(-); **(+)**: pROCKNY-ESO-1His(+); **s**: pROCKgp63-NY-ESO-1.

Após confirmação da presença do inserto e checagem da sequência por sequenciamento de nucleotídeos, os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição *NotI* para eletroporação dos parasitos. Após a transfecção e posterior período de seleção com o antibiótico geneticina, foram realizados experimentos para caracterização dos *T. cruzi* transgênicos. A figura 5.9 mostra a integração dos cassetes de expressão no genoma do parasito, por meio do ensaio de *Southern blot*. Na figura 5.10 observa-se a expressão da proteína NY-ESO-1 pelos parasitos transgênicos por Western blot do lisado de parasitos para as construções sem e com cauda de histidina e da análise do sobrenadante da construção contendo o peptídeo de sinal da gp63. Finalmente, observa-se na figura 5.11 a expressão da proteína por meio da técnica de microscopia confocal para cada um dos parasitos transgênicos e do selvagem.

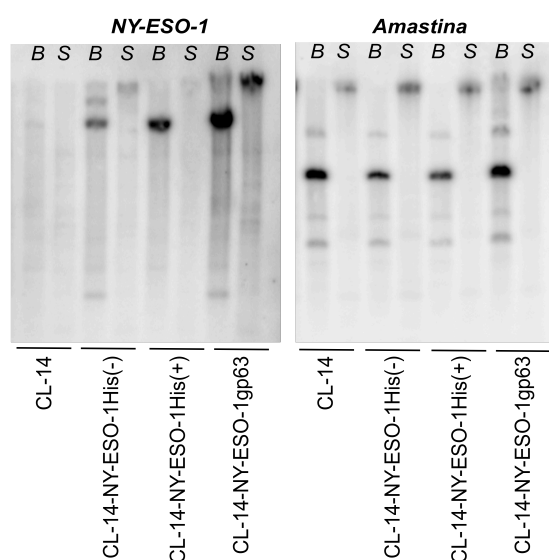


Figura 5.9

Integração do gene híbrido no genoma de epimastigota de CL-14: Cerca de 10µg do DNA genômico de epimastigotas de CL-14 selvagem ou transfectado foram digeridos com as enzimas *BamH* I e *Sac* I a 37oC por 12h. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 0,7%, corado com brometo de etídio. Membrana de náilon hibridizada, por meio da técnica de *Southern Blot*, com uma sonda de 543pb do NY-ESO-1 digerido com *Xba*I e *Xho*I marcada com 32P. Canaletas B: digestão dos DNAs com *Bam*HI; S: digestão com *Sac*I.

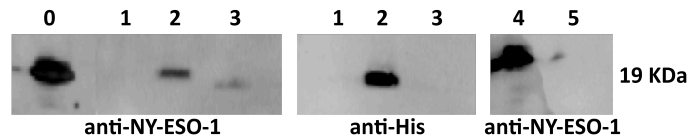


Figura 5.10

Análise da expressão de NY-ESO-1 por *Western Blot*: Após a seleção em meio LIT contendo G418, 10^6 parasitos transfectados, estes foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes SDS PAGE a 15%. As proteínas resultantes foram transferidas para membranas de nitrocelulose incubadas com anticorpos monoclonais anti-NY-ESO-1 e anti-His tag. **(0):** *E. coli* expressando NY-ESO-1; **(1)** cultura de CL-14 selvagem; **(2)** CL-14-NY-ESO-1His(+); **(3)** CL-14-NY-ESO-1His(-); sobrenadante da cultura de CL-14NY-ESO-1gp63SP; **(5)** lisado da cultura de CL-14NY-ESO-1gp63SP.

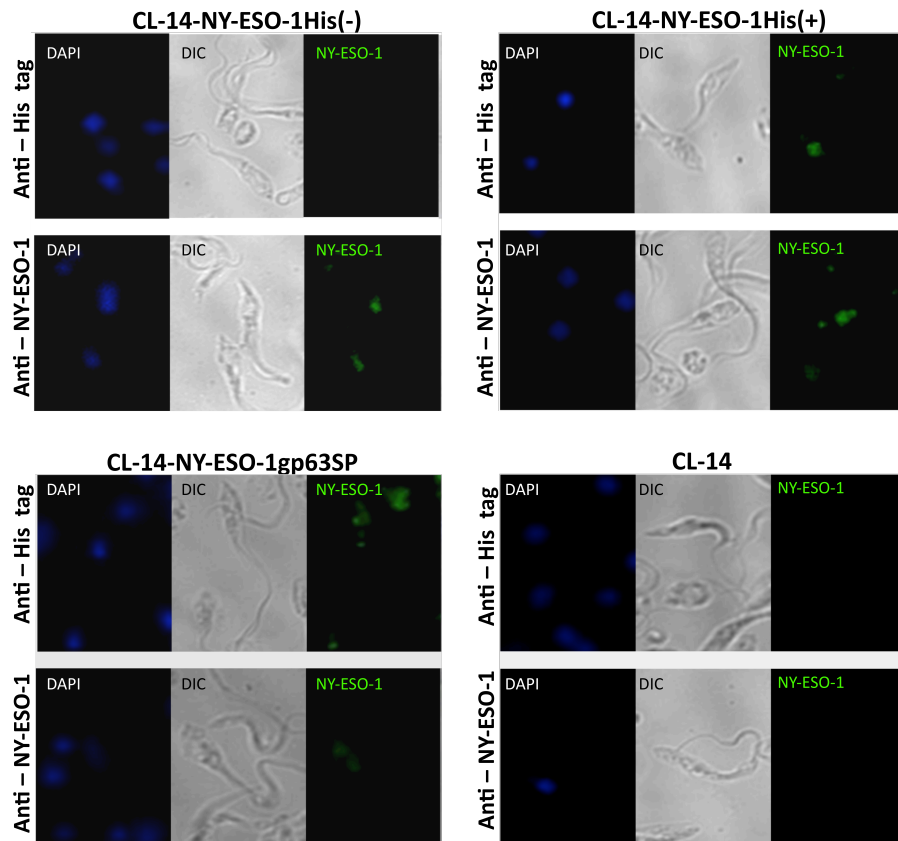


Figura 5.11

Expressão da proteína NY-ESO-1 nos três clones transgênicos. Microscopia confocal dos parasitos transgênicos CL-14-NY-ESO-1His(-), CL-14-NY-ESO-1His(+), CL-14NY-ESO-1gp63, comparados com o clone CL-14 WT na forma infectante tripomastigota metacíclico. Preparações utilizando anticorpos anti-NY-ESO-1 e anti-His tag foram realizadas para distinção das construções com ou sem cauda de histidina. Em verde observa-se a proteína NY-ESO-1, em azul o núcleo corado com Dapi, em cinza a imagem transmitida (Dic).

Além de identificar a expressão da proteína na forma infectante tripomastigota metacíclica, também foi realizada microscopia confocal nos quatro estágios de diferenciação do parasito, nos quais foi possível comprovar a expressão persistente da proteína durante o ciclo celular do parasito (figura 5.12)

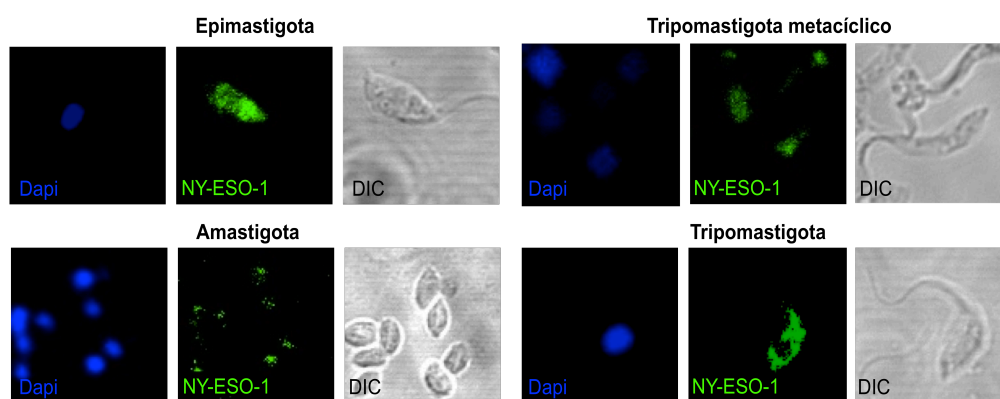


Figura 5.12

Expressão da proteína NY-ESO-1 nas quatro fases do ciclo celular do parasito. Microscopia confocal do parasito transgênico CL-14-NY-ESO-1His(+) nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota extracelular e tripomastigota de cultura. Em verde, observa-se a proteína NY-ESO-1, em azul, o núcleo corado com Dapi, em cinza, a imagem transmitida (Dic).

5.4. Avaliação da capacidade dos parasitos expressando NY-ESO-1 em induzir resposta imune em modelo humano *in vitro*

Células humanas de melanoma SK-MEL-52, as quais possuem expressão constitutiva de NY-ESO-1, foram usadas, como controle positivo, ao serem comparadas com células SK-MEL-149, que não expressam esse antígeno tumoral, após infecção com os parasitos transgênicos. Afim de avaliar a expressão do antígeno por amastigotas intracelulares, foi realizado imunohistoquímica anti-NY-ESO-1. Observa-se na figura 5.13, que os parasitos CL-14-NY-ESO-1His(+) concentram a proteína dentro de si, enquanto que os parasitos CL-14-NY-ESO-1gp63 liberam a proteína para o citoplasma da célula hospedeira, gerando uma coloração dispersa no mesmo.

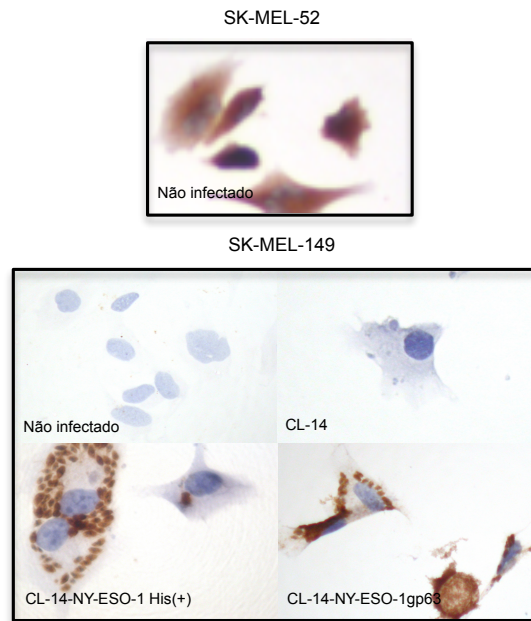


Figura 5.13

Expressão de NY-ESO-1 por parasitos transgênicos, após infecção em células de melanoma humanos. SK-MEL-52 – célula que expressa NY-ESO-1 constitutivamente. SK-MEL-149 – célula que não possui expressão de NY-ESO-1. Esta foi infectada com CL-14, CL-14-NY-ESO-1His(+) e CL-14-NY-ESO-1gp63. Imunohistoquímica anti-NY-ESO-1 foi desenvolvida para avaliação da expressão de NY-ESO-1.

Uma vez bem caracteriza a expressão de NY-ESO-1 por meio de métodos de biologia molecular e biologia celular, foi avaliada a resposta imune induzida por protocolos de pressensitização, onde células APCs foram infectadas com parasitos CL-14 selvagem, CL-14-NY-ESO-1His(+) e CL-14-NY-ESO-1gp63. No dia seguinte, essas células foram irradiadas e colocadas em co-cultura com linfócitos T CD4+ ou T CD8+, visando à apresentação de antígeno, para posterior avaliação da resposta imune. Nas semanas que se seguiram, foram realizados experimentos de ELISPOT para verificar a indução de produção de IFN- γ mediada pelos parasitos. Foram avaliados dois doadores separadamente (NC235 e NC236). Na figura 5.14, observa-se que os parasitos que expressam NY-ESO-1 foram capazes de induzir produção de IFN- γ pelas células CD4+, quando re-estimuladas com APCs infectadas com o vírus Fowlpox expressando NY-ESO-1 ou pulsadas com um “pool” de peptídeos sobrepondo toda a sequência de NY-ESO-1.

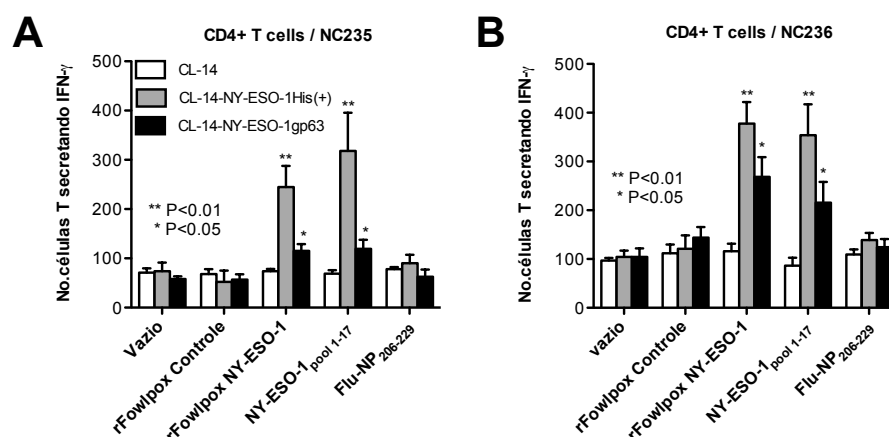


Figura 5.14

Produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+, após protocolos de pressensitização. Células T CD4+ dos doadores NC235 e NC236 foram submetidas a ELISPOT para quantificação de células produtoras de IFN- γ após protocolos de pressensitização com APCs infectados com *T. cruzi* expressando NY-ESO-1.

Linfócitos T CD8+ empregados no mesmo protocolo de ELISPOT foram capazes de produzir IFN- γ quando re-estimulados com APCs infectadas com o vírus Fowlpox expressando NY-ESO-1, pulsadas com “pool” de peptídeos ou com peptídeo NY-ESO-1 específico para o HLA-A*0201, como mostrado na figura 5.15.

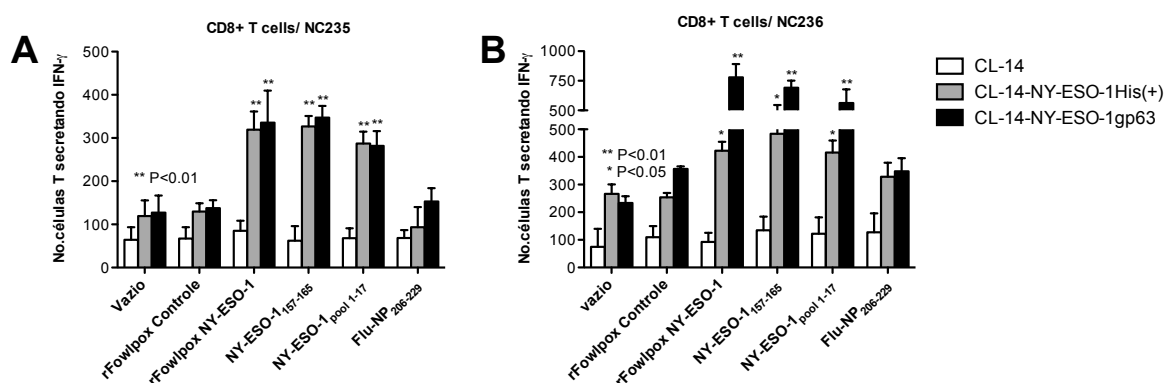


Figura 5.15

Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8+, após protocolos de pressensitização. Células T CD8+ dos doadores NC235 e NC236 foram submetidas a ELISPOT para quantificação de células produtoras de IFN- γ após protocolos de pressensitização com APCs infectados com *T. cruzi* expressando NY-ESO-1.

Paralelamente, alíquotas de linfócitos T CD8+, antes da co-cultura com APCs (Ex-Vivo) e após 13 dias de cultura, foram avaliadas quanto à frequência de células CD8+/tetrâmero+ para o epítipo de HLA-A*0201 de NY-ESO-1. A figura 5.16, mostra que ambos os doadores apresentaram aumento da frequência de células duplo-positivas após 13 dias de pressensitização.

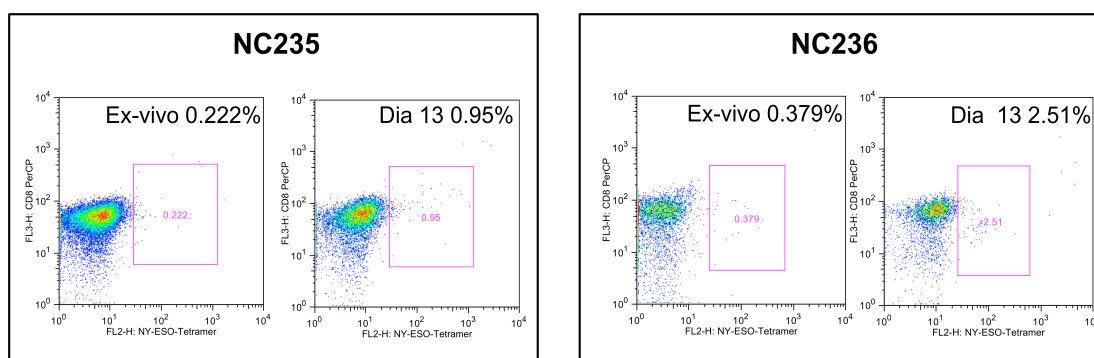


Figura 5.16

Avaliação da frequência de células T CD8+/ NY-ESO-1+. Linfócitos T CD8+ foram marcados com anticorpo anti-CD8 e tetrâmero, contendo epítipo para NY-ESO-1. Amostras antes (Ex-vivo) e após protocolo de pressensitização (Dia 13) foram avaliadas quanto à frequência de células duplo positivas.

5.5. Avaliação da capacidade dos parasitos expressando NY-ESO-1 em induzir resposta imune em modelo murino

Imunizações com parasitos expressando NY-ESO-1 foram realizadas a fim de avaliar a capacidade dos mesmos de induzir resposta imune antígeno-específica. O soro dos animais imunizados foi utilizado para verificar a produção de anticorpos específicos anti-NY-ESO-1 (Figura 5.17). Observa-se, nesta figura, que foi possível detectar a proteína NY-ESO-1 recombinante pelo soro dos animais, quando verificados por *Western Blot*, e para os três isotipos de IgG testados. Neste último, verifica-se uma tendência à resposta imunológica do tipo 1, devido à alta produção de isotipo IgG2c.

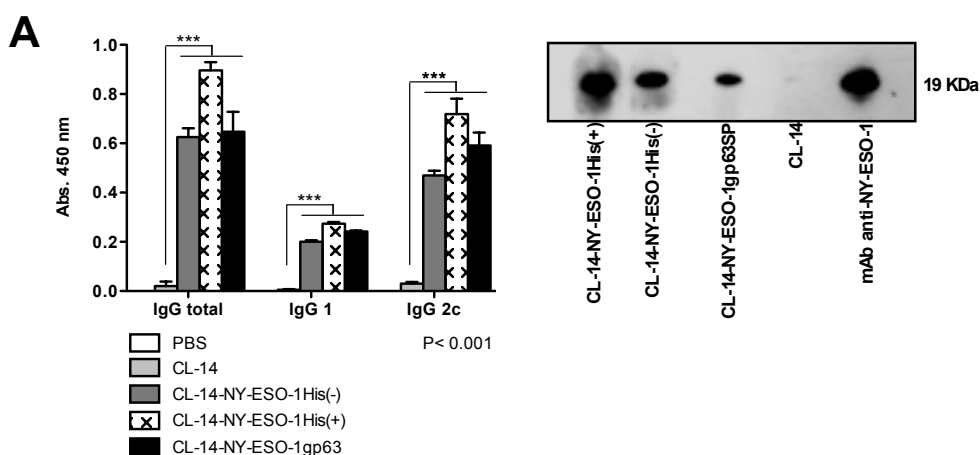


Figura 5.17

Resposta humoral anti-NY-ESO-1 induzida por vacinação com parasitos transgênicos. Animais C57BL/6 imunizados com duas doses de 10^7 parasitos foram analisados quando a indução de resposta NY-Eso-1 específica. Com o intuito de avaliar a produção de anticopos anti-NY-ESO-1, **(A)** foi realizado *Western Blot* e **(B)** ELISA anti-IgG total, IgG1 e IgG2c contra a proteína recombinante.

A resposta celular induzida por esses protocolos de imunizações foi medida 21 dias após a segunda imunização (figura 5.18). No mesmo dia, animais foram desafiados com 5×10^4 células de melanoma B16, expressando ou não o antígeno tumoral. O crescimento tumoral foi acompanhado por 90 dias (figura 5.19), assim como a porcentagem de sobrevivência. Os dados aqui apresentados mostram que os parasitos transgênicos foram capazes de induzir resposta imune e inibição tumoral específicas para o antígeno NY-ESO-1, assim como o aumento da sobrevida.

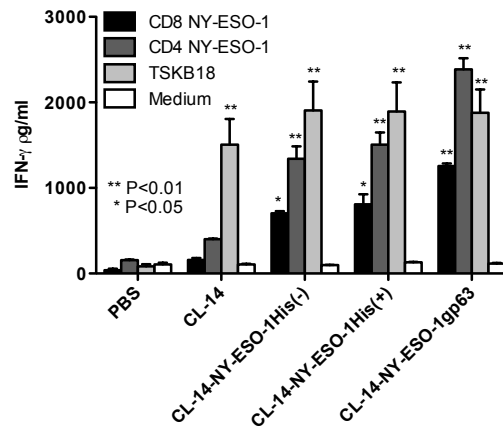


Figura 5.18

Resposta celular anti-NY-ESO-1 induzida por vacinação com parasitos transgênicos. Animais C57BL/6 foram imunizados em duas doses com parasitos transgênicos e seus controles. Esplenócitos de camundongos imunizados foram re-estimulados com peptídeos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos e TSKB-18 como controle da resposta anti-CL-14. A produção de IFN- γ após 72h de cultivo foi quantificada por ELISA anti IFN- γ .

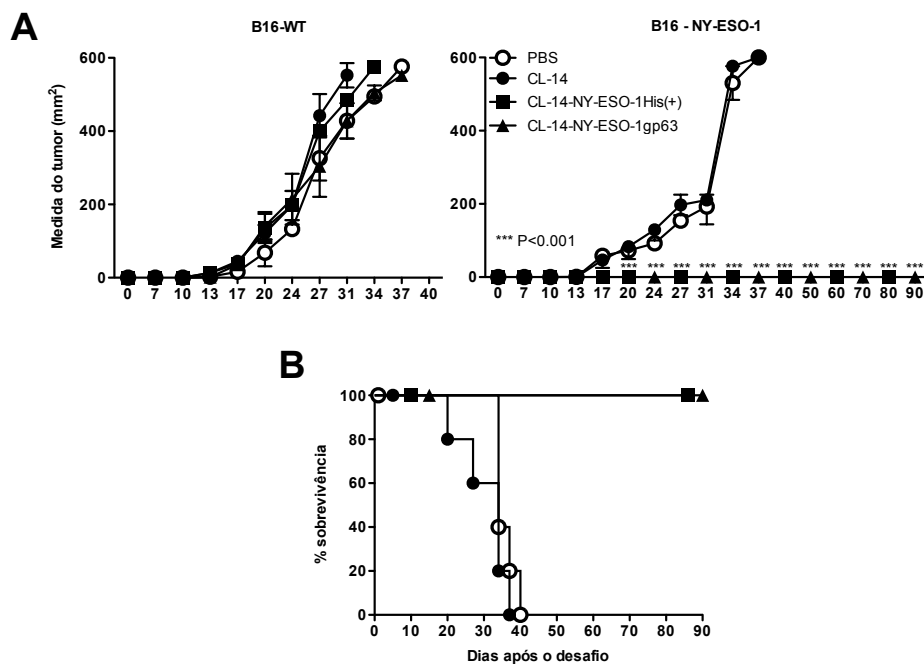


Figura 5.19

Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação com parasitos transgênicos. Animais imunizados com os parasitos transgênicos e seus controles foram desafiados com 5×10^4 células de melanoma B16, expressando ou não o antígeno tumoral NY-ESO-1. **(A)** O crescimento tumoral foi medido por 90 dias. **(B)** Os animais que receberam melanoma B16-NY-ESO-1 foram monitorados também quanto à porcentagem de sobrevivência após o desafio.

5.6. Comparação entre protocolos de imunização empregando formulações contendo a proteína recombinante NY-ESO-1, com os vetores vacinais expressando tal antígeno

Com o intuito de comparar a capacidade indutora de resposta imune gerada pelo parasito transgênico vivo, pelo parasito transgênico morto por choque térmico e pelas formulações contendo alúmen, NY-ESO-1 e agonistas de TLRs, foram realizados experimentos administrando duas imunizações, com intervalos de 21 dias, para todos os grupos. Assim como nos experimentos anteriores, foram avaliadas a resposta humoral, a resposta celular (figura 5.20) e a capacidade de inibir o crescimento de melanoma B16 (figura 5.21).

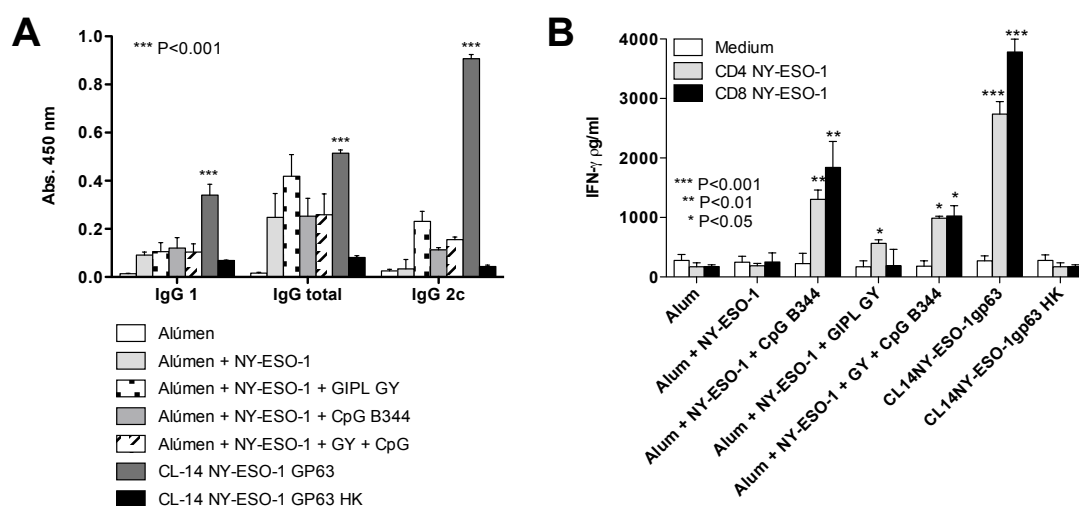


Figura 5.20

Avaliação da resposta imune após vacinação comparativa entre protocolos vacinais. Animais C57BL/6 foram imunizados em duas doses com parasitos transgênicos ou com formulações contendo alúmen, NY-ESO-1 e agonistas de TLRs. **(A)** A presença de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c anti-NY-ESO-1 foi avaliada por ELISA do soro dos animais. **(B)** Esplenócitos de camundongos imunizados foram re-estimulados com peptídeos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos e a produção de IFN- γ , após 72h de cultivo, foi quantificada por ELISA anti IFN- γ .

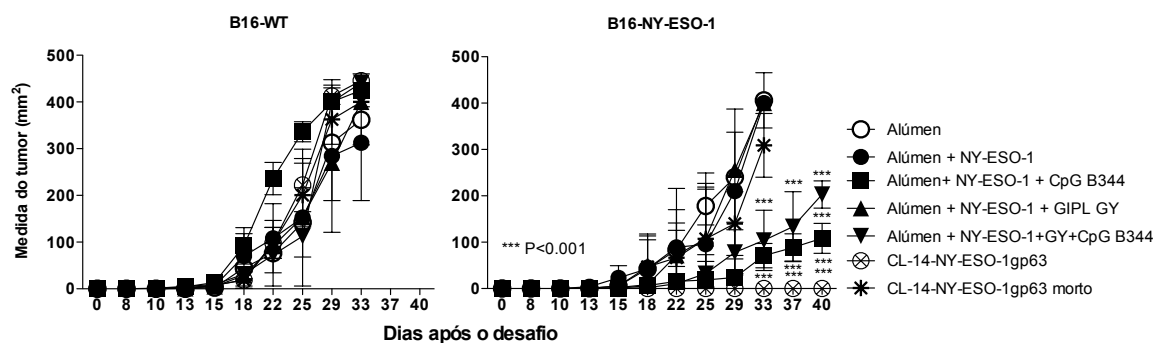


Figura 5.21

Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação comparativa entre protocolos vacinais. Animais imunizados com os parasitos transgênicos ou com formulações contendo alúmen, NY-ESO-1 e agonistas de TLRs foram desafiados com 5×10^4 células de melanoma B16, expressando ou não o antígeno tumoral NY-ESO-1. **(A)** O crescimento tumoral foi medido por 90 dias.

5.7. Avaliação imunoterapêutica de parasitos *T. cruzi* expressando NY-ESO-1

Uma vez estabelecido que o parasito transgênico vivo é mais eficaz tanto na indução da resposta imune específica, quanto na inibição do crescimento tumoral de forma profilática, surge a questão em torno da capacidade desses parasitos em apresentarem potencial imunoterapêutico no tratamento de tumores já estabelecidos. Com o intuito de responder a esta pergunta, foram utilizados três modelos de tumores murinos, expressando ou não o antígeno NY-ESO-1, sendo o B16 singênico para camundongos C57BL/6 e CMS5a e CT26 singênicos para Balb/c. Antes do desafio, todos animais foram imunizados com PBS, CL-14, CL-14-NY-ESO-1His(+) ou CL-14-NY-ESO-1gp63. Ao 21º dia após a segunda imunização, todos os animais foram desafiados com as células tumorais e o crescimento dos tumores, assim como sobrevivência foram monitorados (figuras 5. 22; 5.23; 5.24).

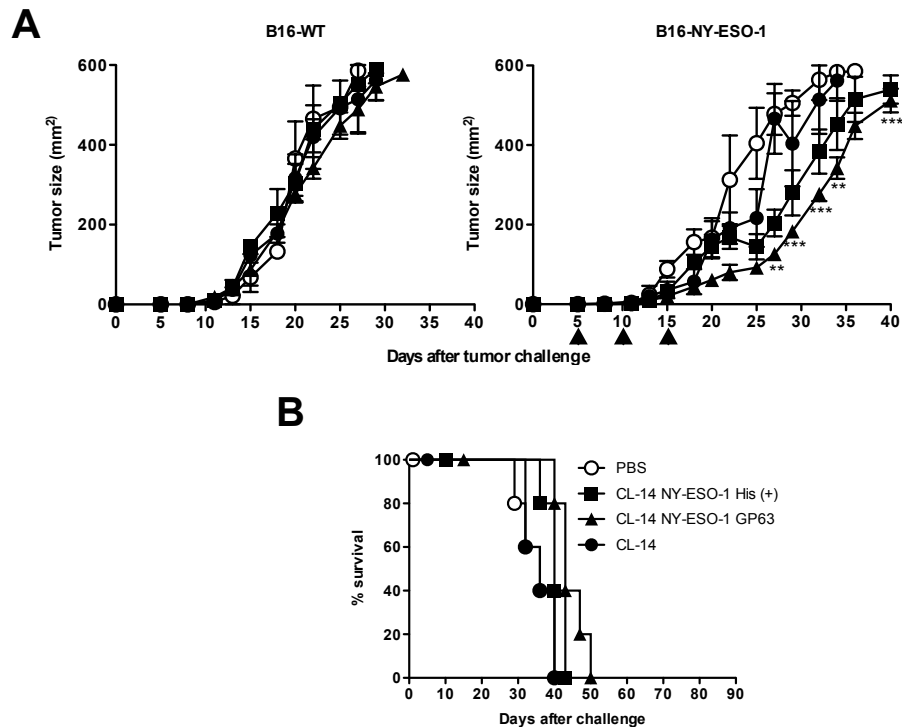


Figura 5.22

Acompanhamento do crescimento de melanoma B16 em animais tratados com parasitos transgênicos. Animais C57BL/6 foram desafiados com 5×10^4 células de B16, expressando ou não NY-ESO-1. Aos 5º, 10º e 15º dias após o desafio, os animais receberam 10^7 parasitos ou PBS pela via intraperitoneal. **(A)** O crescimento tumoral foi medido por 40 dias. **(B)** Os animais que receberam melanoma B16-NY-ESO-1 foram monitorados também quanto à porcentagem de sobrevivência por 90 dias.

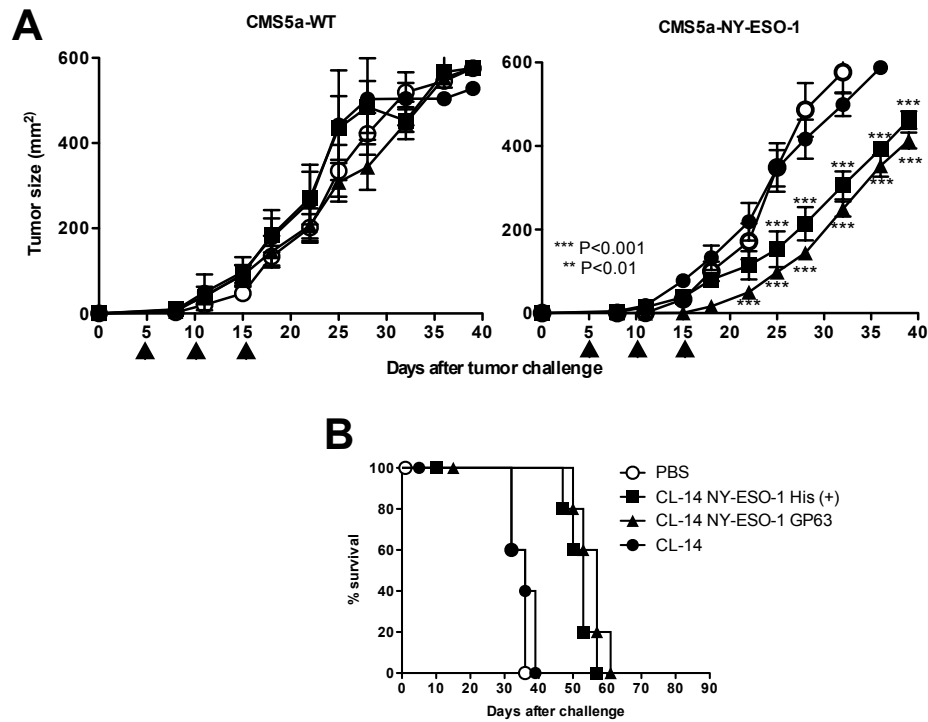


Figura 5.23

Acompanhamento do crescimento de fibrosarcoma CMS5a em animais tratados com parasitos transgênicos. Animais Balb/c foram desafiados com 1×10^6 células de CMS5a, expressando ou não NY-ESO-1. Aos 5º, 10º e 15º dias após o desafio, os animais receberam 10^7 parasitos ou PBS pela via intraperitoneal. **(A)** O crescimento tumoral foi medido por 40 dias. **(B)** Os animais que receberam CMS5a-NY-ESO-1 foram monitorados também quanto à porcentagem de sobrevivência por 90 dias.

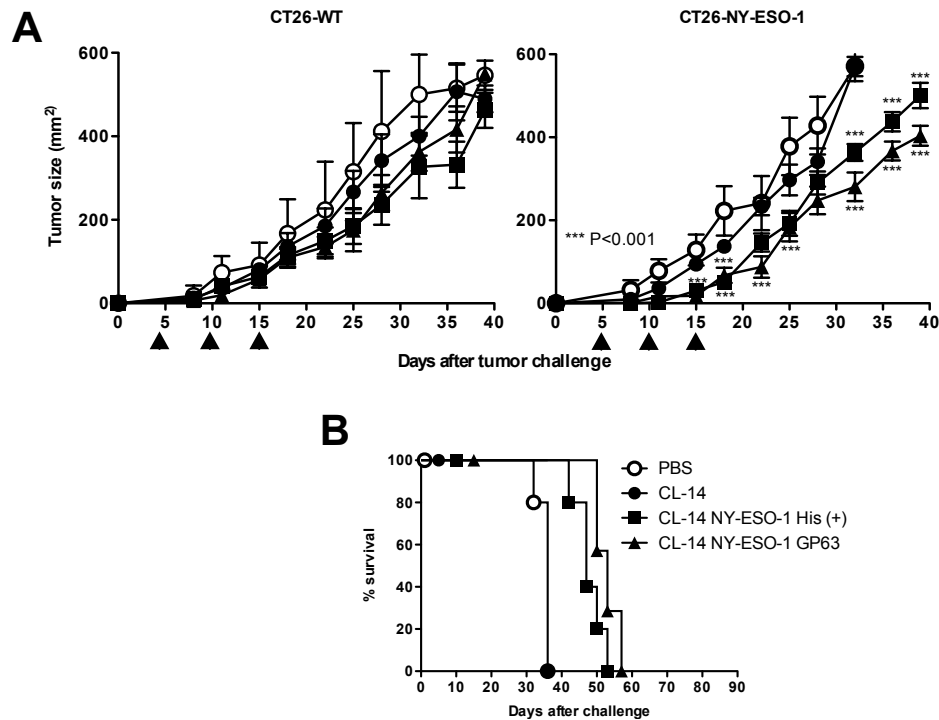


Figura 5.24

Acompanhamento do crescimento de adenoma de cólon CT26 em animais tratados com parasitos transgênicos. Animais Balb/c foram desafiados com 1×10^6 células de CT26, expressando ou não NY-ESO-1. Aos 5º, 10º e 15º dias após o desafio, os animais receberam 10^7 parasitos ou PBS pela via intraperitoneal. **(A)** O crescimento tumoral foi medido por 40 dias. **(B)** Os animais que receberam CT26-NY-ESO-1 foram monitorados também quanto à porcentagem de sobrevivência por 90 dias.

Nos dados acima, observa-se que o parasito CL-14-NY-ESO-1gp63 foi capaz de retardar o crescimento tumoral e aumentar a expectativa de vida dos animais nos três modelos testados expressando NY-ESO-1. Já o parasito CL-14-NY-ESO-1His(+) obteve resultado semelhante somente nos modelos singênicos para Balb/c. Como observado nos experimentos de profilaxia, os controles PBS e CL-14 não foram hábeis em retardar o crescimento tumoral.

5.8. Avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução da resposta antígeno-específica após imunizações com *T. cruzi* transgênicos

Visando avaliar qual o mecanismo envolvido na indução da resposta antígeno-específica pelos parasitos transgênicos foram realizadas imunizações em animais deficientes para IL-12, MyD88, CD8 e iNos, todas paralelamente ao controle selvagem.

Os dados de resposta celular (figura 5.25) e citometria (figura 5.26) mostram que os animais deficientes em IL-12 e MyD88 têm uma diminuição na produção de IFN- γ , porém estes não apresentam diminuição na população de células CD8+/ tetrâmero+, tanto para NY-ESO-1, quanto para TSKB-20.

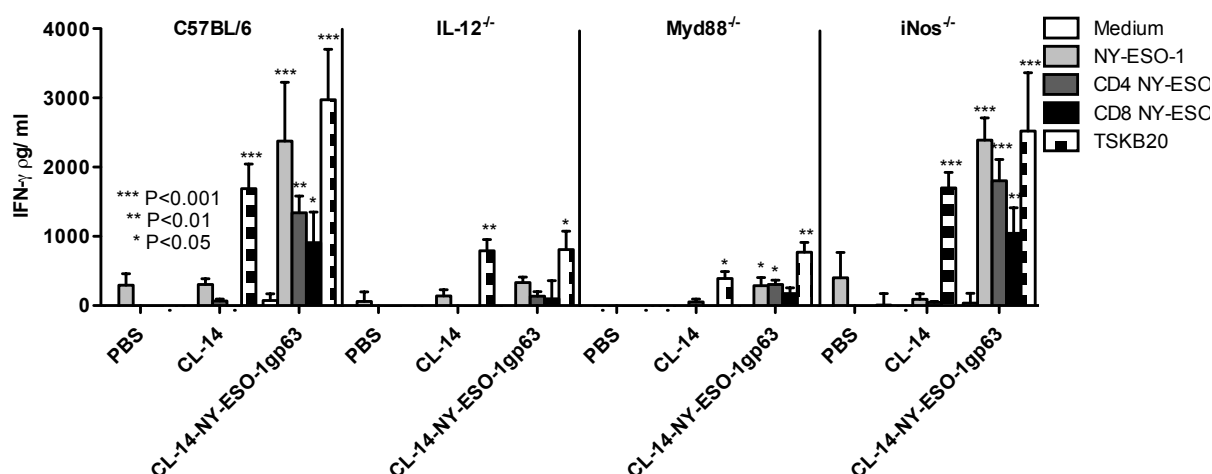


Figura 5.25

Resposta celular anti-NY-ESO-1 e anti-TSKB20 em animais deficientes. Animais C57BL/6 e imunodeficientes para IL-12, MyD88 e iNOS, foram imunizados em duas doses com parasitos transgênicos e seus controles. Esplenócitos de camundongos imunizados foram re-estimulados com a proteína recombinante NY-ESO-1, peptídeos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos e TSKB-18 como controle da resposta anti-CL-14. A produção de IFN- γ após 72h de cultivo foi quantificada por ELISA anti IFN- γ .

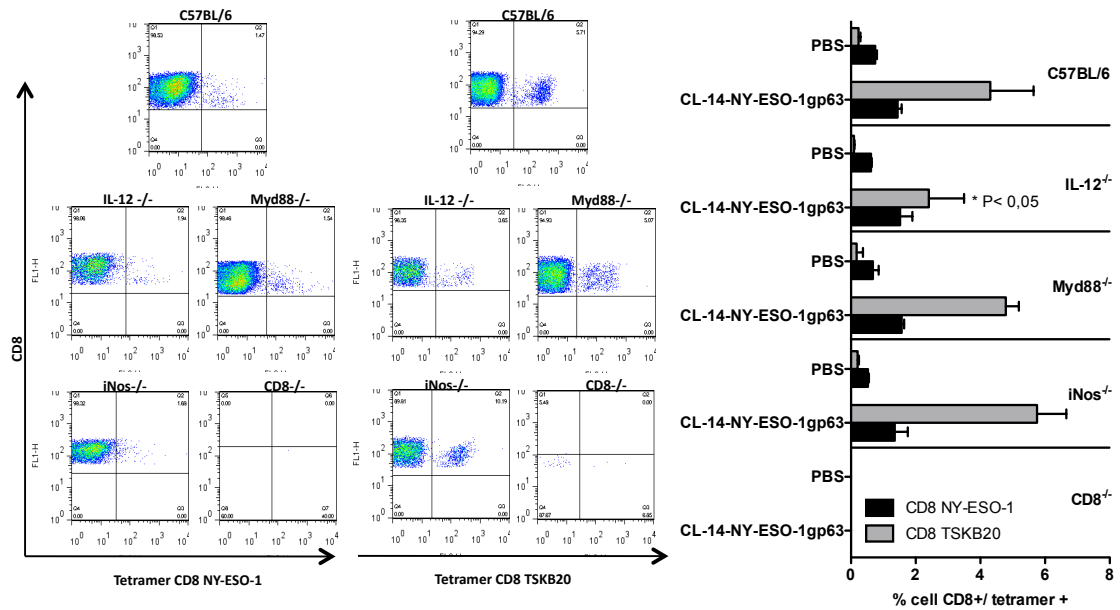


Figura 5.26

Avaliação da porcentagem de células CD8+ e tetrâmero+ para NY-ESO-1 e TSKB20 em animais selvagens e deficientes. Esplenócitos provenientes dos mesmos animais C57BL/6 e imunodeficientes imunizados com parasitos transgênicos foram avaliados quanto à frequência de células específicas para o epítipo de NY-ESO-1 ou para TSKB20.

Os mesmos animais deficientes foram desafiados com melanoma B16, expressando o cancer/testis NY-ESO-1. Na figura 5.27, é possível observar que animais iNos^{-/-} foram capazes de inibir o crescimento tumoral, quando imunizados com o parasito expressando NY-ESO-1, uma vez que apresentava um perfil de produção de INF- γ semelhante ao animal selvagem. Já os animais IL-12^{-/-}, MyD88^{-/-} e CD8^{-/-} não foram capazes de induzir proteção contra o desafio com tumores.

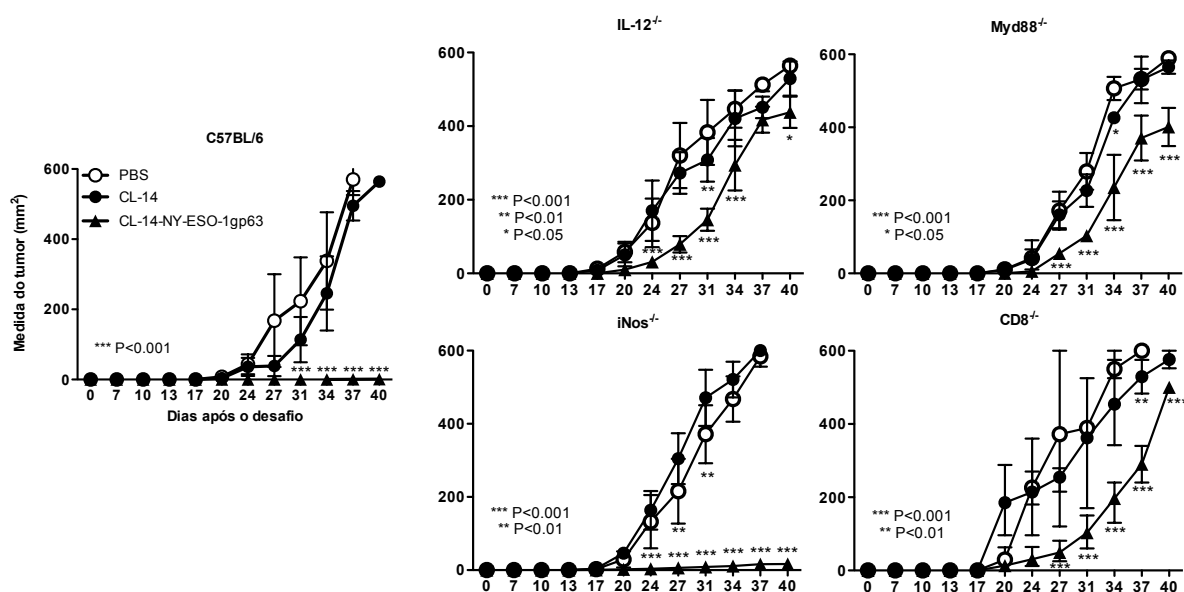


Figura 5.27

Acompanhamento do crescimento tumoral em animais imunodeficientes após vacinação com parasitos transgênicos. Animais imunodeficientes imunizados com os parasitos transgênicos foram desafiados com 5×10^4 células de melanoma B16, expressando ou não o antígeno tumoral NY-ESO-1. O crescimento tumoral foi medido por 40 dias para cada um dos animais C57BL/6, IL-12^{-/-}, MyD88^{-/-}, iNOS^{-/-} e CD8^{-/-}.

6. DISCUSSÃO

A maioria das vacinas comercialmente disponíveis que são consideradas altamente eficazes em induzir uma forte e duradoura imunidade protetora são mediadas por anticorpos neutralizantes, como é o caso do tétano, poliomielite, varíola e sarampo (Plotkin, 2010). Em contraste, o desenvolvimento de vacinas capazes de gerar uma resposta dependente de linfócitos, em grande parte responsável por mediar a imunidade protetora de infecções como a tuberculose e a leishmaniose, bem como o câncer, é uma difícil tarefa (Kaufmann, 2010). Diante disso, um grande desafio para o desenvolvimento de vacinas é o estabelecimento de condições ideais para induzir uma forte e duradoura imunidade protetora mediada por linfócitos T CD8⁺ (Coffman et al., 2010). Avanços recentes foram obtidos com a identificação de antígenos, mapeamento de epítomos, manipulação genética e expressão de proteínas recombinantes. No entanto, a falha contínua na geração de novas vacinas sugere que o caminho para a indução de uma imunidade celular eficaz e duradoura deve ser por meio da utilização de novas ferramentas vacinais.

Observações a cerca da ação de microorganismos na indução de resposta antitumoral, data desde o século XVIII. No entanto, foi Dr. William Coley, no final do século XIX, que demonstrou pela primeira vez, de forma sistematicamente científica, que uma mistura bacteriana contendo *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens* era capaz de regredir tumores humanos. Hoje, com a evolução da imunologia, sabemos que esse efeito é devido à presença de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs), que são capazes de ativar o sistema imune inato, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente ativando células NK e linfócitos T, que eliminarão os tumores estabelecidos (Hobohm, 2001).

Adjuvantes imunológicos capazes de induzir uma forte resposta imune mediada por linfócito T e de longa duração são extremamente necessários para o desenvolvimento de vacinas humanas. A constatação de que a ativação de receptores da imune inata promovem o desenvolvimento de linfócitos Th1 estimulou a busca por novos agonistas de TLRs, como potenciais adjuvantes imunológicos (Coffman et al., 2010; Takeuchi e Akira, 2010). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que as âncoras GPI e GPIs de *T. cruzi* são capazes de induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias via TLR2 e TLR4, respectivamente (Campos et al., 2001; Oliveira et al., 2004). Além disso, várias sequências

CpG ODN derivadas do genoma de *T. cruzi* também se demonstraram capazes de estimular a síntese de citocinas, incluindo IL-12, tanto por macrófagos quanto por células dendríticas via TLR9 (Bartholomeu et al., 2008).

No presente estudo, foram testados *in vivo* PAMPs derivados de *T. cruzi* como adjuvantes imunológicos. Nossos experimentos demonstraram, que GIPLs, em especial o GY derivado da cepa de *T. cruzi* Y, foram eficientes na indução de linfócitos Th1 e produção de IgG2c, isotipo de anticorpo induzido por IFN- γ . Corroborando com esses dados, estudos utilizando GIPLs derivados de *T. cruzi*, mostram que esses são capazes de induzir citocinas pró-inflamórias (Almeida et al., 2000; Almeida e Gazzinelli, 2001; Camargo et al., 1997; Coelho et al., 2002; Medeiros et al., 2007; Oliveira et al., 2004). Em 2008, Bartholomeu e colaboradores descreveram o CpG B344, derivado do genoma de *T. cruzi*, como um potente imunomodulatório, sendo superior ao CpG derivado de bactéria [CpG(+)], que é comumente utilizado como controle positivo.

Os agonistas derivados de *T. cruzi* que apresentaram melhor indução da resposta imune do tipo Th1, quando formulados com o antígeno OVA, foram usados para formular vacinas antitumorais. Os agonistas GIPL GY e o CpG B344 foram associados ao antígeno tumoral NY-ESO-1 e avaliados *in vivo* quanto a sua capacidade de induzir resposta imune antígeno-específica, assim como antitumoral. Nossos dados demonstraram que o CpG B344 é capaz de induzir forte resposta imunológica mediada por linfócitos T CD8+. Além disso, observamos um atraso no desenvolvimento de melanomas B16 de forma antígeno-específica. Já o agonista GY, apesar de induzir uma restosta antígeno-específica, não apresentou resposta antitumoral semelhante ao CpG B344. Os dados apresentados abrem a perspectiva de utilizar agonistas derivados de *T. cruzi* como adjuvantes alternativos para induzir respostas imunes mediadas por linfócitos Th1 a serem empregadas em vacinas contra o câncer e doenças infecciosas.

Inspirado pela "malarioterapia", que usou a infecção pelo *Plasmodium* para tratar sífilis cerebral, assim como nos trabalhos de William Coley, o pesquisador russo Roskin pensou que as infecções parasitárias e bacterianas, que causam doenças graves produziam uma "toxina", que também poderia agir e matar as células tumorais (Krementsov, 2009). Impulsionado por essa idéia, Roskin mostrou que camundongos infectados por *T. cruzi* são

capazes de regredir tumores e, posteriormente, demonstrou os mesmos resultados em pacientes humanos com câncer (Roskin, 1946).

Baseado nesses estudos e subsequentes (Hauschka, 1947; Hauschka e Goodwin, 1948; Malisoff, 1947), abordando a mesma estratégia terapêutica e aliado à conhecimentos modernos da ativação de TLRs por moléculas do parasito (Gazzinelli e Denkers, 2006), foi proposta a utilização de ferramentas moleculares de transformação de Triponossomatídeos, como descrito por DaRocha (2004), para construção de vetores vacinais capazes de expressar antígenos exógenos de forma eficiente.

O uso de *T. cruzi* como vetor vacinal abrange a característica do parasito de induzir uma resposta imune altamente polarizada para Th1, a qual inclui uma resposta proeminente de linfócitos T CD8 + efetores, devido à localização intracitoplasmática do parasito, favorecendo a apresentação de antígeno via MHC de classe I (Padilla et al., 2009; Rodrigues et al., 2008; Tzelepis et al., 2008; Tzelepis et al., 2006). A presença de agonistas de TLRs no parasito funciona como adjuvante imunológico capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, atraindo as células do sistema imune para o local da infecção. Outra característica importante para a escolha do *T. cruzi*, como vetor vacinal contra o câncer, é a capacidade desse em permanecer no organismo por períodos de tempo mais prolongados, devido à ativação da fase crônica da infecção, (Junqueira et al., 2010; Martin e Tarleton, 2005) propiciando uma melhor imunização e aumentando a possibilidade de induzir células de memória.

Diferentemente dos trabalhos de Roskin e demais pesquisadores, nós utilizamos um clone não patogênico de *T. cruzi* de tal forma que possamos infectar o hospedeiro sem lhe causar patologias associadas ao parasito. Como descrito na literatura, repetimos experimentos de infecção com o clone CL-14 para verificar a parasitemia e sobrevivência. Da mesma forma que Lima e colaboradores (1991) e (1995), mostramos que o clone não é capaz de induzir parasitemia nem parasitismo tecidual em camundongos selvagens. No entanto, em desacordo com Lima (1991), demonstramos que o clone é capaz de infectar células, demonstrado pela presença de parasitemia em animais Rag^{-/-} e IFN^{-/-}. Esses dados são coerentes com a capacidade do clone em induzir imunidade protetora, dado este também corroborado por nossos resultados.

A escolha do antígeno tumoral a ser empregado nas construções dos vetores vacinais deu-se por três fatores principais: (i) o NY-ESO-1 é atualmente um dos mais promissores antígenos tumorais a serem utilizados na elaboração de vacinas contra o câncer, devido à sua alta imunogenicidade e amplo espectro de expressão (Gnjatic et al., 2006); (ii) é vastamente estudado e já empregado em várias formulações vacinais pré-clínicas (Davis et al., 2004; Nishikawa et al., 2006), possibilitando a comparação de modelos, assim como a disponibilidade um número maior de ferramentas de avaliação, como anticorpos, linhagens celulares, tetrâmeros, dentre outros; (iii) é empregado em diversos testes clínicos em humanos (Old, 2008), favorecendo uma possível transposição de modelos.

Desenvolvemos, portanto, três construções distintas de *T. cruzi* do clone CL-14 expressando o antígeno tumoral NY-ESO-1. Cada uma das construções foi caracterizada por ferramentas moleculares e celulares comumente utilizadas na avaliação da Tripanossomatídeos (DaRocha et al., 2004a; Pires et al., 2008).

Como o objetivo principal ao gerar os parasitos transgênicos era a utilização como vetores vacinais, nós testamos, inicialmente, a capacidade desses em induzir resposta imune celular em modelos humano *in vitro* como proposto nos trabalhos de Nishikawa et al., 2006 e Nishikawa et al., 2008. Para isso, APCs infectadas com os parasitos transgênicos foram co-cultivadas com linfócitos T CD4+ ou T CD8+. Os resultados obtidos demonstraram a produção de IFN- γ de forma NY-ESO-1-específica e, complementarmente, os linfócitos T CD8+ apresentaram um aumento na frequência de células antígeno-específicas, após apresentação do antígeno pelas APCs. Ao comparar os dados obtidos com os dados da literatura, onde vetores vacinais expressando NY-ESO-1 também foram utilizados em modelos semelhantes (Nishikawa et al., 2006; Palmowski et al., 2004), observamos que o vetor apresentado se destaca dos demais, pelo fato de aumentar a frequência de células T CD8+ antígeno-específicas em doadores saudáveis, que sabidamente não possuem nenhuma resposta anti-NY-ESO-1 pré-existente.

Quando submetidos à protocolos de imunização *in vivo* em modelo murino, o vetor parasitário apresentado foi capaz de gerar resposta antígeno-específica mediada pela produção de altos níveis de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e TCD8+, dados também obtidos com outros vetores vacinais expressando NY-ESO-1 (Meng et al., 2010; Nishikawa et al., 2006). Os grupos de animais que receberam *T. cruzi* expressando NY-ESO-1 ao serem desafiados com

tumores singênicos expressando ou não esse antígeno foram capazes de inibir completamente o crescimento dos tumores de maneira antígeno-específico. Portanto, foi demonstrado que a habilidade imunoestimulatória observada nos modelos animais foi coerente com os dados obtidos ao se avaliar a resposta de linfócitos T derivados de PBMC de humanos. A indução de resposta imune específica demonstra que uma ativação exagerada e inespecífica do sistema imune não está sendo induzida pelo clone CL-14 transgênico, fato que difere dos dados obtido por Roskin, que induzira imunidade contra tumores de forma inespecífica (Roskin, 1946).

Previamente, os *T. cruzi* transgênicos foram submetidos à protocolos profiláticos, no entanto, um dos maiores alvos clínicos das vacinas antitumorais são os tumores já instalados. Com intuito de verificar a capacidade imunoterapêutica dos nossos vetores, os parasitos expressando NY-ESO-1 foram usados em doses consecutivas e verificamos, conforme esperado, a capacidade de retardar o crescimento tumoral. No entanto, a inoculação desses somente, não foi capaz de regredir completamente o tumor implantado.

A regressão parcial dos tumores estabelecidos deve-se à mecanismos de regulação dos linfócitos T presentes no microambiente tumoral. A superexpressão de CTLA-4, CD25, PD-1 ou FoxP3, frequentemente presentes neste microambiente (Peggs et al., 2009a; Weber, 2010), podem ser as principais razões para o fenótipo observado. Os dados obtidos, portanto, nos inspira a utilizar o parasito em protocolos imunoterapêuticos em combinação com imunomoduladores como o anti-CTLA-4 (Yuan et al., 2008), para que consigamos alcançar o objetivo de eliminar completamente o tumor. Dados da literatura, mostram que a administração de vacinas antitumorais, combinadas à anticorpos capazes de inibir os mecanismos regulatórios dos linfócitos T, tais como o anti-CTLA-4, anti-CD25, anti-PD1 apresentam uma significativa melhora na resposta antitumoral (Gulley et al., 2007; Saha e Chatterjee, 2010; Weber, 2010).

É possível afirmar que esse vetor demonstrou ser promissor para utilização futura em protocolos de vacinação contra o câncer, uma vez que a grande maioria dos vetores vacinais descritos na literatura não foram capazes de retardar o crescimento tumoral quando usados em protocolos homólogos, sendo sempre necessária a administração de outro vetor vacinal, vacina de DNA ou formulação proteica (Nishikawa et al., 2006).

Quando avaliamos a resposta positiva induzida pelos parasitos transgênicos, surgiu a indagação a respeito da necessidade desses infectarem as células do hospedeiro. Visando responder a esta questão, comparamos os diferentes protocolos vacinais utilizando os agonistas de TLRs, parasito vivo, assim como o parasito morto por choque térmico. Observamos, primeiramente, que o parasito morto não foi capaz de induzir qualquer resposta imune, seja humoral ou celular, muito menos inibição de tumores. Em seguida, comparamos a resposta induzida pelo parasito vivo, com as formulações contendo a proteína recombinante e os adjuvantes. Como sugerido pelos dados anteriores, o parasito vivo foi muito superior às formulações na indução de resposta imune, assim como inibição tumoral.

Adicionalmente, foi possível avaliar alguns mecanismos imunológicos que norteiam a indução de resposta imunológica dependente de células. Com base em estudos anteriores, era esperado que na ausência de IL-12, haveria uma deficiência também na produção de IFN- γ , uma vez que essa citocina é dependente da ativação de células NK e linfócitos T auxiliares pela IL-12 (Aliberti et al., 1996; Michailowsky et al., 2001). Nos dados obtidos, observamos que animais deficientes para IL-12 tiveram uma brusca diminuição na capacidade de produzir IFN- γ . Com o intuito de verificar se TLRs exerciam um papel importante na resposta antígeno-específica induzida pelos parasitos transgênicos usamos animais MyD88^{-/-}, uma vez que acreditamos que a função adjuvante induzida pelos TLRs seja devido à presença de agonistas desses receptores no parasito (Gazzinelli e Denkers, 2006). Estudos publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a importância de MyD88^{-/-} na indução de resposta imune durante infecção com *T. cruzi* (Bafica et al., 2006; Campos et al., 2004), e corroborando com esses dados, no presente trabalho, verificamos o decréscimo na produção de IFN- γ no modelo testado. Na avaliação de animais iNOS^{-/-} não observamos diferença na produção de citocina, comparando com o animal selvagem controle; confirmando dados na literatura descritos por (Michailowsky et al., 2001).

Coerentemente com os dados obtidos para a resposta imune celular, os animais deficientes IL-12^{-/-}, MyD88^{-/-} e CD8^{-/-}, quando avaliados em sua capacidade de inibirem o crescimento de melanoma implantado, apresentaram uma maior debilidade no controle de crescimento tumoral. Esses achados vão de encontro ao descrito na literatura (Airoidi et al., 2007; Meeran et al., 2007; Salcedo et al., 2010).

Prevendo que barreiras éticas serão os principais empecilhos para se empregar parasitos *T. cruzi* para tratar o câncer, visamos a necessidade de estudar a base molecular do fenótipo atenuado do clone CL-14 para complementar nossos dados em torno da não patogenicidade desse clone. É importante ressaltar, que o clone CL-14 é altamente suscetível a droga existente benzonidazol (Fontes et al., 1991), utilizada para tratar infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, estamos desenvolvendo simultaneamente, uma construção que possibilita a expressão concomitante do NY-ESO-1 com a timidina-quinase do Herpes Vírus, um mecanismo de segurança adicional para a eliminação de parasitos utilizando terapia com aciclovir (Buckner et al., 1997).

O presente estudo destaca uma nova estratégia que é altamente eficaz na indução de uma forte e duradoura resposta imune mediada por células T, que é algo de difícil indução nos protocolos vacinais contra diferentes tipos de tumores. Assim, os experimentos apresentados indicam que o uso de parasitos *T. cruzi* como vetor vivo de uma vacina anti-câncer deva ser mais explorado, tanto para a construção de parasitos expressando outros antígenos, quanto para reduzir as dúvidas em torno da biossegurança deste vetor.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, é possível concluir:

GIPLs derivados de *T. cruzi* induzem resposta imune medida pela produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+, bem como altos níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2c.

CpG ODNs derivado de *T. cruzi*, induzem uma forte resposta imune mediada por linfócitos T CD4+ e T CD8+. Esse último, é também, capaz de retardar o crescimento de tumores, quando em combinação com o antígeno NY-ESO-1.

T. cruzi expressando NY-ESO-1 conseguiram recrutar linfócitos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos capazes de produzir IFN- γ de forma antígeno-específica, quando avaliados em modelos *in vitro* com células humanas.

Os parasitos transgênicos, quando testados em modelos murinos, foram capazes de induzir altos níveis de resposta imune humoral e celular tipo Th1, além de inibirem completamente o crescimento de melanomas B16 expressando NY-ESO-1.

Quando empregados em protocolos terapêuticos, os parasitos transgênicos foram capazes de regredir o desenvolvimento de tumores singênicos e aumentar a sobrevivência destes animais.

Comparativamente com as formulações vacinais contendo a proteína NY-ESO-1 recombinante, os *T. cruzi* expressando o mesmo antígeno foram superiores na indução de resposta imune específica e inibição tumoral.

Sugere-se que o mecanismo envolvido na indução de resposta imunológica anti-NY-ESO-1 é dependente da molécula adaptadora MyD88, assim como da citocina IL-12.

Finalmente, concluímos que agonistas de TLR derivados de *T. cruzi*, em especial o CpG B344, são potentes adjuvantes imunológicos a serem utilizados na elaboração de vacinas. Acreditamos também, que *T. cruzi* expressando antígenos tumorais ou antígenos relacionados à doenças infecciosas, seja uma ferramenta em potencial para a elaboração de vacinas profiláticas e terapêuticas, bem como uma nova metodologia para o estudo de mecanismos imunológicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarnoudse, C.A., van den Doel, P.B., Heemskerk, B. e Schrier, P.I. "Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1." Int J Cancer 1999 **82**(3): 442-448.

Adams, S. "Toll-like receptor agonists in cancer therapy." Immunotherapy 2009 **1**(6): 949-964.

Airolidi, I., Di Carlo, E., *et al.* "Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A 2007 **104**(10): 3996-4001.

Aliberti, J.C., Cardoso, M.A., *et al.* "Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes." Infect Immun 1996 **64**(6): 1961-1967.

Almeida, I.C., Camargo, M.M., *et al.* "Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents." Embo J 2000 **19**(7): 1476-1485.

Almeida, I.C. e Gazzinelli, R.T. "Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses." J Leukoc Biol 2001 **70**(4): 467-477.

Atayde, V.D., Neira, I., *et al.* "Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14." Int J Parasitol 2004 **34**(7): 851-860.

Bafica, A., Santiago, H.C., *et al.* "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection." J Immunol 2006 **177**(6): 3515-3519.

Bartholomeu, D.C., Ropert, C., *et al.* "Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*." J Immunol 2008 **181**(2): 1333-1344.

Batmonkh, Z., Kallinikova, V.D., *et al.* "In vivo anticancer activity of lysates from *trypanosoma cruzi* of different genetic groups." Bull Exp Biol Med 2006 **142**(4): 470-473.

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., *et al.* "In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination." J Exp Med 2004 **199**(6): 815-824.

Brener, Z. "Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas." Faculdade de Medicina da UFMG 1961 **Tese de livre docência**.

Breton, M., Tremblay, M.J., Ouellette, M. e Papadopolou, B. "Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis." Infect Immun 2005 **73**(10): 6372-6382.

Breton, M., Zhao, C., Ouellette, M., Tremblay, M.J. e Papadopolou, B. "A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection." J Gen Virol 2007 **88**(Pt 1): 217-225.

Buckner, F.S., Wilson, A.J. e Van Voorhis, W.C. "Trypanosoma cruzi: use of herpes simplex virus-thymidine kinase as a negative selectable marker." Exp Parasitol 1997 **86**(3): 171-180.

Caballero, O.L. e Chen, Y.T. "Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy." Cancer Sci 2009 **100**(11): 2014-2021.

Camargo, M.M., Almeida, I.C., *et al.* "Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages." J Immunol 1997 **158**(12): 5890-5901.

Campos, M.A., Almeida, I.C., *et al.* "Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite." J Immunol 2001 **167**(1): 416-423.

Campos, M.A., Closel, M., *et al.* "Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88." J Immunol 2004 **172**(3): 1711-1718.

Castelli, C., Rivoltini, L., *et al.* "T-cell recognition of melanoma-associated antigens." J Cell Physiol 2000 **182**(3): 323-331.

Chagas, C. "Nova tripanozomíase humana." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1909 **1**(ago. 1909.): 159-218.

Chen, Y.T., Boyer, A.D., *et al.* "Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28." Cytogenet Cell Genet 1997 **79**(3-4): 237-240.

Church, G.M. e Gilbert, W. "Genomic sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A 1984 **81**(7): 1991-1995.

Coelho, P.S., Klein, A., *et al.* "Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages." J Leukoc Biol 2002 **71**(5): 837-844.

Coffman, R.L., Sher, A. e Seder, R.A. "Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work." Immunity 2010 **33**(4): 492-503.

Coley, W.B. "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of Erysipelas, with a report of ten original cases." Am J Med Sci 1893 **105**: 487-511.

DaRocha, W.D., Otsu, K., Teixeira, S.M. e Donelson, J.E. "Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol 2004a **133**(2): 175-186.

DaRocha, W.D., Silva, R.A., *et al.* "Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols." Parasitol Res 2004b **92**(2): 113-120.

Davis, I.D., Chen, W., *et al.* "Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans." Proc Natl Acad Sci U S A 2004 **101**(29): 10697-10702.

de Veer, M.J., Curtis, J.M., *et al.* "MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling." Eur J Immunol 2003 **33**(10): 2822-2831.

Debierre-Grockiego, F., Azzouz, N., *et al.* "Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages." J Biol Chem 2003 **278**(35): 32987-32993.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. e Schreiber, R.D. "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol 2002 **3**(11): 991-998.

Fontes, G., Romanha, A.J., Pereira, M.E. e Brener, Z. "Lectin receptors distribution in the surface membrane of *Trypanosoma cruzi* blood forms collected from mice submitted to specific treatment." Mem Inst Oswaldo Cruz 1991 **86**(3): 297-299.

Gao, F.G., Khammanivong, V., *et al.* "Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell." Cancer Res 2002 **62**(22): 6438-6441.

Garbi, N. e Hammerling, G.J. "Co-stimulation by dendritic cells maintains the peripheral pool of Tregs." Eur J Immunol 2011 **41**(2): 282-285.

Gazzinelli, R.T. e Denkers, E.Y. "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism." Nat Rev Immunol 2006 **6**(12): 895-906.

Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S. e Sher, A. "Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts." Proc Natl Acad Sci U S A 1993 **90**(13): 6115-6119.

Gazzinelli, R.T., Ropert, C. e Campos, M.A. "Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites." Immunol Rev 2004 **201**: 9-25.

Gnjatic, S., Nishikawa, H., *et al.* "NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen." Adv Cancer Res 2006 **95**: 1-30.

Goh, A.M., Coffill, C.R. e Lane, D.P. "The role of mutant p53 in human cancer." J Pathol 2011 **223**(2): 116-126.

Golgher, D. e Gazzinelli, R.T. "Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease." Autoimmunity 2004 **37**(5): 399-409.

Gomes, M.L., Araujo, S.M. e Chiari, E. "Trypanosoma cruzi: growth of clones on solid medium using culture and blood forms." Mem Inst Oswaldo Cruz 1991 **86**(1): 131-132.

Guevara, P., Dias, M., *et al.* "Expression of fluorescent genes in Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology." J Med Entomol 2005 **42**(1): 48-56.

Gulley, J.L., Madan, R.A. e Arlen, P.M. "Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities." Vaccine 2007 **25 Suppl 2**: B89-96.

Haolla, F.A., Claser, C., *et al.* "Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection." Vaccine 2009 **27**(41): 5644-5653.

Hauschka, T.S. "Trypanosoma cruzi in the treatment of mouse tumors." Cancer Research 1947 **7**(11): 717.

Hauschka, T.S. e Goodwin, M.B. "Trypanosoma cruzi Endotoxin (KR) in the Treatment of Malignant Mouse Tumors." Science 1948 **107**(2788): 600-602.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. e Akira, S. "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets." J Immunol 2003 **170**(6): 3059-3064.

Hemmi, H., Takeuchi, O., *et al.* "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature 2000 **408**(6813): 740-745.

Hobohm, U. "Fever and cancer in perspective." Cancer Immunol Immunother 2001 **50**(8): 391-396.

Jager, E., Gnjatich, S., *et al.* "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers." Proc Natl Acad Sci U S A 2000a **97**(22): 12198-12203.

Jager, E., Karbach, J., *et al.* "Identification of a naturally processed NY-ESO-1 peptide recognized by CD8+ T cells in the context of HLA-B51." Cancer Immun 2002 **2**: 12.

Jager, E., Nagata, Y., *et al.* "Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A 2000b **97**(9): 4760-4765.

Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., *et al.* "Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues." Int J Cancer 2001 **92**(6): 856-860.

Junqueira, C., Caetano, B., *et al.* "The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease." Expert Rev Mol Med 2010 **12**: e29.

Kallinikova, V.D., Borisova, E.N., *et al.* "[Immunization against *Trypanosoma cruzi* and tumor growth in mice]." Med Parazitol (Mosk) 2006 (4): 9-12.

Kaufmann, S.H. "Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box." Immunity 2010 **33**(4): 567-577.

Krementsov, N. "Trypanosoma cruzi, cancer and the Cold War." Hist Cienc Saude Manguinhos 2009 **16 Suppl 1**: 75-94.

Krieg, A.M. "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol 2002 **20**: 709-760.

LaCount, D.J., Bruse, S., Hill, K.L. e Donelson, J.E. "Double-stranded RNA interference in Trypanosoma brucei using head-to-head promoters." Mol Biochem Parasitol 2000 **111**(1): 67-76.

Lima, M.T., Jansen, A.M., Rondinelli, E. e Gattass, C.R. "Trypanosoma cruzi: properties of a clone isolated from CL strain." Parasitol Res 1991 **77**(1): 77-81.

Lima, M.T., Lenzi, H.L. e Gattass, C.R. "Negative tissue parasitism in mice injected with a noninfective clone of Trypanosoma cruzi." Parasitol Res 1995 **81**(1): 6-12.

Liu, M.A. "Immunologic basis of vaccine vectors." Immunity 2010 **33**(4): 504-515.

Magez, S., Stijlemans, B., *et al.* "The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors." J Immunol 1998 **160**(4): 1949-1956.

Malisoff, W.M. "The Action of the Endotoxin of Trypanosoma cruzi (KR) on Malignant Mouse Tumors." Science 1947 **106**(2763): 591-594.

Martin, D.L. e Tarleton, R.L. "Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent Trypanosoma cruzi infection." J Immunol 2005 **174**(3): 1594-1601.

Martorelli, D., Muraro, E., *et al.* "Role of CD4+ cytotoxic T lymphocytes in the control of viral diseases and cancer." Int Rev Immunol 2010 **29**(4): 371-402.

Medeiros, M.M., Peixoto, J.R., *et al.* "Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from Trypanosoma cruzi." J Leukoc Biol 2007 **82**(3): 488-496.

Meeran, S.M., Katiyar, S., Elmets, C.A. e Katiyar, S.K. "Interleukin-12 deficiency is permissive for angiogenesis in UV radiation-induced skin tumors." Cancer Res 2007 **67**(8): 3785-3793.

Melief, C.J., Van Der Burg, S.H., Toes, R.E., Ossendorp, F. e Offringa, R. "Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes." Immunol Rev 2002 **188**: 177-182.

Meng, J.Z., Dong, Y.J., *et al.* "Oral vaccination with attenuated *Salmonella enterica* strains encoding T-cell epitopes from tumor antigen NY-ESO-1 induces specific cytotoxic T-lymphocyte responses." Clin Vaccine Immunol 2010 **17**(6): 889-894.

Michailowsky, V., Silva, N.M., *et al.* "Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection." Am J Pathol 2001 **159**(5): 1723-1733.

Mosmann, T.R. e Coffman, R.L. "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol 1989 **7**: 145-173.

Nakamura, Y., Watchmaker, P., *et al.* "Helper function of memory CD8+ T cells: heterologous CD8+ T cells support the induction of therapeutic cancer immunity." Cancer Res 2007 **67**(20): 10012-10018.

Nauts, H.C. e McLaren, J.R. "Coley toxins--the first century." Adv Exp Med Biol 1990 **267**: 483-500.

Nishikawa, H. e Sakaguchi, S. "Regulatory T cells in tumor immunity." Int J Cancer 2010 **127**(4): 759-767.

Nishikawa, H., Sato, E., *et al.* "In vivo antigen delivery by a *Salmonella typhimurium* type III secretion system for therapeutic cancer vaccines." J Clin Invest 2006 **116**(7): 1946-1954.

Nishikawa, H., Tsuji, T., *et al.* "Induction of regulatory T cell-resistant helper CD4+ T cells by bacterial vector." Blood 2008 **111**(3): 1404-1412.

Nishimura, T., Iwakabe, K., *et al.* "Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo." J Exp Med 1999 **190**(5): 617-627.

Norris, K.A. "Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance." Infect Immun 1998 **66**(6): 2460-2465.

Novellino, L., Castelli, C. e Parmiani, G. "A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update." Cancer Immunol Immunother 2005 **54**(3): 187-207.

O'Neill, D.W. "Dendritic cells and T cells in immunotherapy." J Drugs Dermatol 2010 **9**(11): 1383-1392.

Old, L.J. "Cancer vaccines: an overview." Cancer Immun 2008 **8 Suppl 1**: 1.

Old, L.J., Clarke, D.A. e Benacerraf, B. "Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* infection on transplanted tumours in the mouse." Nature 1959 **184**(Suppl 5): 291-292.

Oldenhove, G., de Heusch, M., *et al.* "CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo." J Exp Med 2003 **198**(2): 259-266.

Oliveira, A.C., Peixoto, J.R., *et al.* "Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*." J Immunol 2004 **173**(9): 5688-5696.

Padilla, A.M., Bustamante, J.M. e Tarleton, R.L. "CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection." Curr Opin Immunol 2009 **21**(4): 385-390.

Paiva, C.N., Castelo-Branco, M.T., Rocha, J.A., Lannes-Vieira, J. e Gattass, C.R. "*Trypanosoma cruzi*: lack of T cell abnormalities in mice vaccinated with live trypomastigotes." Parasitol Res 1999 **85**(12): 1012-1017.

Palmowski, M.J., Lopes, L., *et al.* "Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response." J Immunol 2004 **172**(3): 1582-1587.

Peggs, K.S., Quezada, S.A. e Allison, J.P. "Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists." Clin Exp Immunol 2009a **157**(1): 9-19.

Peggs, K.S., Quezada, S.A., Chambers, C.A., Korman, A.J. e Allison, J.P. "Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies." J Exp Med 2009b **206**(8): 1717-1725.

Pires, S.F., DaRocha, W.D., *et al.* "Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins." Int J Parasitol 2008 **38**(3-4): 289-297.

Plotkin, S.A. "Correlates of protection induced by vaccination." Clin Vaccine Immunol 2010 **17**(7): 1055-1065.

Pyrrho, A.S., Moraes, J.L., Pecanha, L.M. e Gattass, C.R. "Trypanosoma cruzi: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice." Parasitol Res 1998 **84**(4): 333-337.

Quezada, S.A., Simpson, T.R., *et al.* "Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts." J Exp Med 2010 **207**(3): 637-650.

Rizzolio, F., Esposito, L., *et al.* "RB gene family: genome-wide ChIP approaches could open undiscovered roads." J Cell Biochem 2010 **109**(5): 839-843.

Rocha, C.D., Caetano, B.C., Machado, A.V. e Bruna-Romero, O. "Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases." Int Microbiol 2004 **7**(2): 83-94.

Rodrigues, M.M., de Alencar, B.C., Claser, C. e Tzelepis, F. "Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease?" Braz J Med Biol Res 2008.

Roport, C. e Gazzinelli, R.T. "Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa." Curr Opin Microbiol 2000 **3**(4): 395-403.

Roskin, G. "Toxin therapy of experimental cancer; the influence of protozoan infections upon transplanted cancer." Cancer Res 1946 **6**: 363-365.

Ruiz, R.C., Favoreto, S., Jr., *et al.* "Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity." Biochem J 1998 **330** (Pt 1): 505-511.

Saha, A. e Chatterjee, S.K. "Combination of CTL-associated antigen-4 blockade and depletion of CD25 regulatory T cells enhance tumour immunity of dendritic cell-based vaccine in a mouse model of colon cancer." Scand J Immunol 2010 **71**(2): 70-82.

Salagianni, M., Lekka, E., *et al.* "NK Cell Adoptive Transfer Combined with Ontak-Mediated Regulatory T Cell Elimination Induces Effective Adaptive Antitumor Immune Responses." J Immunol 2011.

Salcedo, R., Worschech, A., *et al.* "MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18." J Exp Med 2010 **207**(8): 1625-1636.

Scanlan, M.J., Simpson, A.J. e Old, L.J. "The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary." Cancer Immun 2004 **4**: 1.

Schneeberger, A., Wagner, C., *et al.* "CpG motifs are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines." J Invest Dermatol 2004 **123**(2): 371-379.

Schofield, L. e Hackett, F. "Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites." J Exp Med 1993 **177**(1): 145-153.

Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A. e Paul, W.E. "Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming." Proc Natl Acad Sci U S A 1993 **90**(21): 10188-10192.

Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T. e Old, L.J. "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." Nat Rev Cancer 2005 **5**(8): 615-625.

Soares, M.B., Goncalves, R., *et al.* "Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent Trypanosoma cruzi." An Acad Bras Cienc 2003 **75**(2): 167-172.

Sutmoller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., *et al.* "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses." J Exp Med 2001 **194**(6): 823-832.

Takeda, K., Kojima, Y., *et al.* "Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules." J Immunol 2010 **184**(10): 5493-5501.

Takeuchi, O. e Akira, S. "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell 2010 **140**(6): 805-820.

Tarleton, R.L., Koller, B.H., Latour, A. e Postan, M. "Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection." Nature 1992 **356**(6367): 338-340.

Trinchieri, G. "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol 2003 **3**(2): 133-146.

Tzelepis, F., de Alencar, B.C., *et al.* "Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance." J Immunol 2008 **180**(3): 1737-1748.

Tzelepis, F., de Alencar, B.C., *et al.* "Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice." Infect Immun 2006 **74**(4): 2477-2481.

Weber, J. "Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade." Semin Oncol 2010 **37**(5): 430-439.

Weinberg, R.A. "A Biologia do Câncer." 2008: 844.

WHO, W.H.O. "World Cancer Report 2004." WHO Press 2004.

WHO, W.H.O. "World Cancer Report 2008." WHO Press 2008.

Wille-Reece, U., Flynn, B.J., *et al.* "HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates." Proc Natl Acad Sci U S A 2005 **102**(42): 15190-15194.

Xu, M., Mizoguchi, I., *et al.* "Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27." Clin Dev Immunol 2010 **2010**.

Yuan, J., Gnjatic, S., *et al.* "CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit." Proc Natl Acad Sci U S A 2008 **105**(51): 20410-20415.

Zhang, Y., Wakita, D., *et al.* "Th1 cell adjuvant therapy combined with tumor vaccination: a novel strategy for promoting CTL responses while avoiding the accumulation of Tregs." Int Immunol 2007 **19**(2): 151-161.

Zinkernagel, R.M. "Immunity against solid tumors?" Int J Cancer 2001 **93**(1): 1-5.

9. ANEXO

9.1. CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 19/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Adjuvantes derivados de parasitas para vacina contra o câncer**", que tem como responsável(is) **Ricardo Tostes Gazzinelli**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/04/2008**.

Este certificado expira-se em **9/04/2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 19/2008**, related to the project entitled "**Parasite derived adjuvants for cancer vaccines**", under the supervisors of **Ricardo Tostes Gazzinelli**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 9, 2008**.

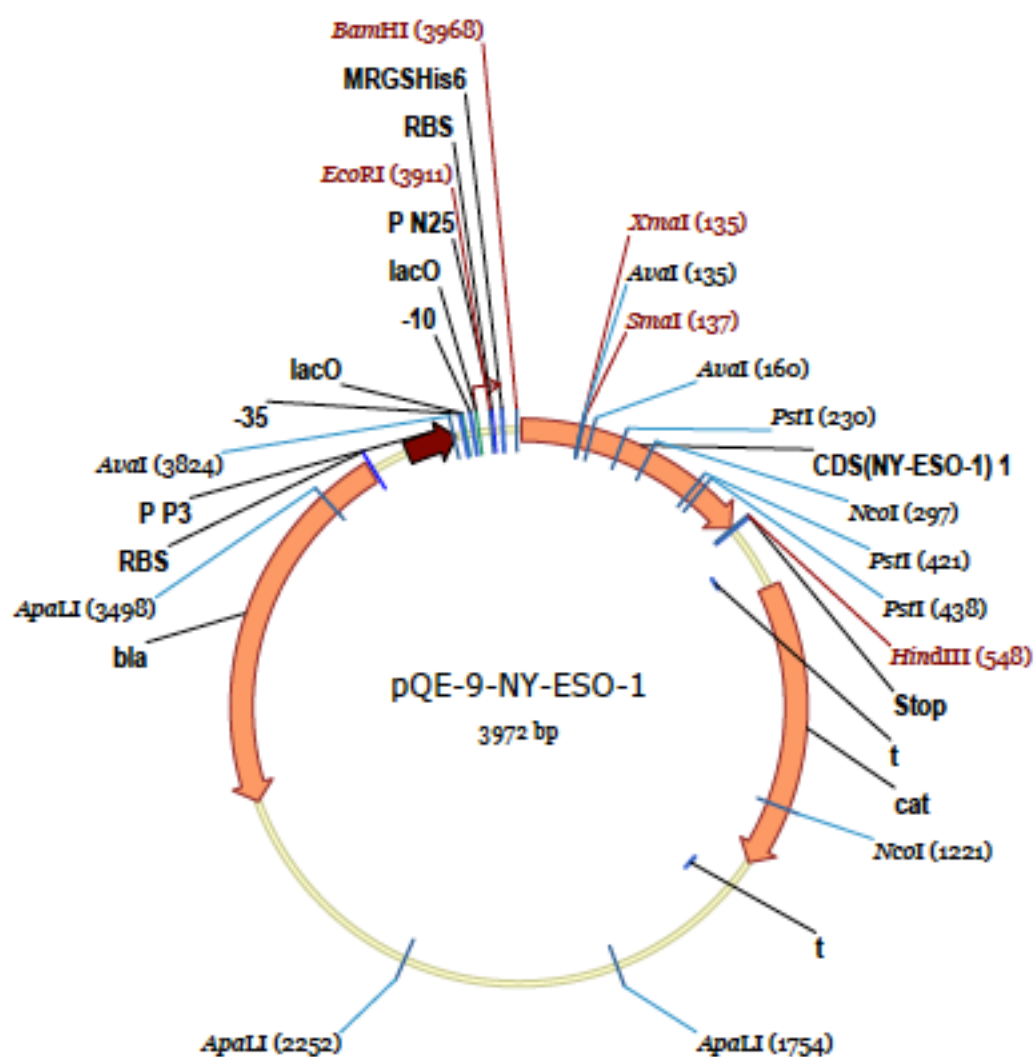
This certificate expires in **April 9, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Abril de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2. pQE-9-NY-ESO-1



10. APÊNDICE