

RESUMO DE TESE

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADE IMUNIZANTE DE UMA PROTEÍNA (72 kDa) UBIQUITÁRIA DO CICLO EVOLUTIVO DE *TRYPANOSOMA* *CRUZI*

Este trabalho mostra algumas propriedades de uma proteína de 72 kDa reconhecida por um anticorpo monoclonal (mAb), de isotipo IgM, produzido contra trypomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y, isolados por centrifugação utilizando Histopaque.

Em uma primeira etapa, a especificidade e a atividade lítica mediada pelo complemento (LMC) do mAb foram analisadas. Através de abordagens imunocitoquímicas foi demonstrado que o mAb reagiu com várias cepas de *T. cruzi* (Y, WSL e Colombiana). Uma reação difusa foi observada no corpo das formas amastigotas e epimastigotas, enquanto que em trypomastigotas a reação foi mais restrita. Ele também reagiu com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. O mAb 164C11 apresentou atividade LMC dirigida contra tripomastigotas sanguíneos e foi mais efetivo do que o soro de camundongo em fase crônica - SCC (164C11 = 83% e SCC = 54%).

Em uma segunda etapa, várias abordagens foram usadas para caracterizar os antígenos reconhecidos pelo mAb 164C11. Através de Western blot, um antígeno de 72 kDa estava presente em *T. cruzi* - amastigotas e epimastigotas obtidos de cultura celular; epimastigotas de cultura axênica e tripomastigotas sanguíneos - da cepa Y. Esta proteína também foi reconhecida em epimastigotas da cepa WSL e Colombiana. O mAb não mostrou especificidade para *T. cruzi* uma vez que ele reagiu com outros membros da família Trypanosomatidae. Como o antígeno de 72 kDa estava presente sobre todos os estágios evolutivos do *T. cruzi* da cepa Y, as formas epimastigotas foram selecionadas para caracterizar o epitopo reconhecido pelo mAb. O tratamento de epimastigotas, da cepa Y, com metaperiodato seguido por Western blot não aboliu a ligação do mAb à proteína de 72 kDa sugerindo que, apesar do antígeno de 72 kDa ser uma

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF A PROTEIN (72 kDa) UBIQUITOUS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* EVOLUTIV CYCLE

This work reports some properties of a 72 kDa protein recognized by a 164C11 monoclonal antibody (mAb) of the IgM isotype produced against bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi*, Y strain, isolated by histopaque centrifugation.

In a first step, the specificity and complement-mediated lytic activity (CML) of the 164C11 mAb were analysed. Using immunocytochemical approaches it was shown that the mAb was reactive with various strains of *T. cruzi* (Y, WSL and Colombian). In amastigotes and epimastigotes a diffuse body pattern of reactivity was found, while in trypomastigotes the reactivity was more restricted. It was also reactive with promastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. 164C11 mAb presented CML activity directed against bloodstream trypomastigotes and was more effective than the chronic serum mouse - CSM (164C11 = 83% and CSM = 54%).

In a second step, many approaches were used to characterize the antigens recognized by the 164C11 mAb. By Western blot a 72 kDa antigen was present in *T. cruzi* Y strain cellular culture-derived amastigotes and trypomastigotes; axenic culture-derived epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. This protein was also recognized on the epimastigotes of WSL and Colombian strain. The mAb was not specific for *T. cruzi*, since it was reactive with other members of the Trypanosomatidae family. As the 72 kDa antigen was present on all developmental stages of *T. cruzi* Y strain, epimastigote forms were selected to characterize the epitope recognized by the mAb. Treatment of Y strain epimastigotes with sodium metaperiodate followed by Western blot did not abolish the ability of the 72 kDa protein to bind the mAb suggesting that although the 72 kDa antigen is a glycoprotein (GP), the epitope recognized is a peptide. The digestion with endoglycosidase F

glicoprotéina (GP), o epítipo reconhecido é um peptídeo. A digestão com endoglicosidase F não aboliu a reação e não modificou a migração do antígeno indicando que a ligação do carboidrato à proteína não é do tipo "N-linked".

Para determinar se a GP de 72 kDa poderia estar associada a entrada do parasita em células fagocíticas, a interação de formas tripomastigotas (cepa Y), com macrófagos (Mø) e células Vero foi examinada. Os parasitas pré-incubados com sobrenadante do mAb 164C11 e semeados sobre os Mø e células Vero mostraram uma percentagem de inibição da infecção de 82,8% e 75,7%, respectivamente, após uma incubação de 72 h. Nenhuma inibição foi observada quando Mø e células Vero foram incubadas com o mAb seguindo a infecção com parasitas não tratados, sugerindo que a GP de 72 kDa pode ser um dos componentes de membrana implicado no processo de invasão da célula hospedeira.

A proteína de 72 kDa foi purificada por eletroforese preparativa e a preparação obtida (TcY 72) foi usada para imunizar camundongos C57Bl/10. Os resultados mostraram que os camundongos imunizados apresentaram: 1) um título de IgG mais elevado do que IgM, e estas Igs reconheceram um antígeno de 72 kDa em epimastigotas. Nenhuma reação foi evidenciada no grupo controle; 2) uma reação positiva de hipersensibilidade retardada; 3) uma diminuição do pico de parasitemia e da mortalidade; 4) um aumento de linfócitos T CD3⁺, os T CD8⁺ mais elevados que os T CD4⁺. Estes resultados são importantes porque é conhecido que os linfócitos T CD8⁺ desempenham um papel importante na imunidade protetora da doença de Chagas. Nós não investigamos o papel da TcY 72 na auto-imunidade. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para elucidar a participação da TcY 72 contra "self antigen".

neither abolished the reactivity nor changed the migration of the antigen, indicating that the carbohydrate moiety is not N-linked.

To determine whether the 72 kDa GP could be associated with the parasite entry into phagocytic cells, the interaction of trypomastigote forms (Y strain) with Mø and Vero cells was examined. Parasites preincubated with the supernatant of 164C11 mAb and seeded onto Mø and Vero cells showed an infection inhibition percentage of 82.8% and 75.7%, respectively, after an incubation of 72h. No inhibition was observed when the Mø and Vero cells were incubated with the mAb following the infection with the non-treated parasites, suggesting that the 72 kDa GP may be one of the trypomastigote surface components implicated in the process of host cell invasion.

The 72 kDa GP was purified by preparative electrophoresis and the preparation obtained (TcY 72) was used to immunize C57Bl/10 mice. The results showed that the immunized mice presented: 1) an IgG titre more elevated than IgM and these Igs recognized a 72 kDa epimastigote antigen. No reaction was evidenced in the control group; 2) a positive delayed hypersensitivity was significant when compared to the control group; 3) a reduced parasitemia peak and mortality; 4) an increase of T CD3⁺ lymphocytes was observed in relation to the control, the T CD8⁺ increased more than the T CD4⁺. This results are relevant because it is known that T CD8⁺ lymphocytes play an important role in protective immunity of Chagas' disease. We have not yet investigated the role of TcY 72 on auto-immunity. However, further experiments are needed to clarify the participation of the TcY 72 against self antigen.

Yara de Miranda Gomes

Tese apresentada a Université Pierre et Marie Curie
para obtenção do Título de Doutor.

Paris, França, 1993.