

FERNANDA CABRAL SCHVEITZER

**VACINA PARA DOENÇA DE CHAGAS:
POSSIBILIDADE OU MITO?**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Medicina.

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2006**

FERNANDA CABRAL SCHVEITZER

**VACINA PARA DOENÇA DE CHAGAS:
POSSIBILIDADE OU MITO?**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Medicina.

**Presidente do Colegiado: Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereima
Professor Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando Barreto Miranda
Professor Co-orientador: Prof. Dr. Mário Steindel**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2006**

*Agradeço à minha família:
aos meus pais Fátima e Tarcísio,
e minha irmã Mari.*

*Agradeço ao meu orientador,
Prof. Dr. Antônio Fernando Barreto Miranda,
por todo o apoio e compreensão.*

*Agradeço ao meu co-orientador,
Prof. Dr. Mário Steindel,
por me ensinar a arte da pesquisa.*

*Agradeço ao colega de turma
Pablo Fernando Lauxen,
pela disponibilidade em contribuir
com este trabalho.*

*Agradeço ao Thiago,
O amor e a presença na minha vida.*

*Agradeço aos amigos inseparáveis
das noites de sono mal dormidas:
Super-Victor[®], Clark e Cid.*

RESUMO

Introdução: A doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909 por Carlos Chagas e já a partir de 1913 vários autores publicaram a proteção parcial alcançada pela imunização contra a infecção letal do *Trypanosoma cruzi* em animais experimentais. Atualmente os esforços na busca por uma vacina eficaz contra a infecção continuam expressivos, ao mesmo tempo em que já são aplicadas medidas de controle reconhecidamente eficazes contra a doença de Chagas.

Objetivos: Descrever o estado da arte da vacina contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Relatar os avanços dos estudos experimentais de imunização contra o *T. cruzi*. Enumerar as lacunas existentes para o desenvolvimento da vacina para a doença de Chagas. Ponderar a viabilidade de uma vacina protetora contra a doença de Chagas.

Método: Estudo bibliográfico de artigos selecionados entre os periódicos indexados nas bases de dados Portal Capes, Medline e Lilacs e publicações eletrônicas da Cochrane.

Conclusão: Certo grau de proteção através de vacinação, avaliado pelo aumento da média da sobrevivência e atenuação na fase aguda da doença de Chagas, foi alcançado na maioria dos experimentos, contudo todas as vacinas experimentais falharam em induzir imunidade estéril contra a infecção pelo *T. cruzi*. A comparação dos resultados entre os estudos é limitada pela grande variação existente nos métodos adotados. Apesar dos avanços na compreensão da imunopatogenia da doença de Chagas e aporte tecnológico para desenvolvimento da vacina, os resultados dos experimentos mantém-se semelhantes aos revisados há duas décadas.

ABSTRACT

Background: Chagas' disease was first described in 1909 for Carlos Chagas and already from 1913 some authors had published the partial protection reached by the immunization against the lethal infection of *Trypanosoma cruzi* in experimental animals. Currently, the efforts in the search for an efficient vaccine against the infection continues expressive, at the same time admittedly efficient measures of control are applied against the Chagas' disease.

Objectives: To describe the development state of the vaccine against the infection for *Trypanosoma cruzi*. To describe the advances of experimental studies of immunization against the *T. cruzi*. To enumerate the existing gaps for the development of the vaccine for Chagas' disease. To ponder the viability of a protective vaccine against the Chagas' disease.

Method: Bibliographical article study selected between the periodic ones indexed in the databases Portal Capes, Medline and Lilacs and electronic publications of the Cochrane.

Conclusions: Certain degree of protection through vaccination, evaluated by the increase of average of the survival and attenuation in the acute phase of Chagas' disease, was reached in the majority of the experiments, however all the experimental vaccines had failed in inducing barren immunity against the infection for the *T. cruzi*. The comparison of the results between the studies is limited by the great existing variation between the adopted methods. Although the advances in understanding the immunity pathogen of Chagas' disease and arrive in port technological for development of the vaccine, the results of the experiments remained similar to the ones revised of two decades ago.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ab	<i>Antibody response</i> (Resposta humoral do anticorpo)
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ASP	<i>Amastigote surface protein</i> (Proteína de superfície de amastigotas)
AVAI	Ano de Vida Ajustado para Incapacidade
AVPP	Anos de Vida Potencial Produtiva Perdidos
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BHC	<i>Benzene Hexachloride</i> (Hexacloro Benzeno)
CpGODN	<i>CpG oligonucleotide</i> (Oligonucleotídeo CpG)
CRP	<i>Complementary regulatory protein</i> (Proteína regulatória complementar)
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte activity</i> (Atividade citotóxica do linfócito T)
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
Dpi	<i>Days Post-Infection</i> (Dias Após a Infecção)
EUA	Estados Unidos da América
FaCaBp	<i>Flagellar Ca²⁺ binding protein</i> (Proteína ligadora de Ca ²⁺ flagelar)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago)
Gp	Glicoproteína
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HSP70	<i>Heat-shock protein 70</i> (Proteína de choque térmico 70)
Ig	Imunoglobulina
KMP	<i>Kinetoplast membrane antigen</i> (Antígeno da membrana do cinetoplasto)
NA	<i>Not available</i> (dados não disponíveis)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PFR	<i>Paraflagellar rod protein</i> (Proteína do corpo paraflagelar)
RANK-L	Receptor ativador da ligação NF-κB
TC	Tiol transferase
TS	Trans-sialidase
TSA	<i>Trypomastigote surface antigen</i> (Antígeno de superfície de tripomastigotas)
TSSA	<i>TS surface antigen</i> (Antígeno de superfície TS)

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina
Z Zimodema

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Condições promotoras da pobreza e vacinas em fase inicial de pesquisa e desenvolvimento	5
TABELA 2 – Demanda de pesquisa para o controle da doença de Chagas no presente momento, de acordo com os diferentes níveis epidemiológicos	6
TABELA 3 – Algumas das vacinas tradicionais testadas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
TABELA 4 – Antígenos candidatos à vacina contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	24

SUMÁRIO

FALSA FOLHA DE ROSTO	i
FOLHA DE ROSTO	Erro! Indicador não definido.
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
SUMÁRIO	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 MÉTODO	3
4 DISCUSSÃO	4
4.1 Epidemiologia.....	4
4.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
4.3 Vetores.....	10
4.4 Formas Clínicas	10
4.5 Tratamento Farmacológico.....	11
4.6 Controle de Vetores	12
4.7 Imunidade na Doença de Chagas.....	14
4.7.1 Patogenia da Doença Crônica.....	15
4.7.2 Resposta Imune Experimental	15
4.7.3 Evasão Imune	16
4.8 Vacinas	17
4.8.1 Padronização dos Métodos Experimentais	17
4.8.2 Proteção	19
4.8.3 Vacinas Experimentais	19
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
NORMAS ADOTADAS	32

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909 por Carlos Chagas¹ e já a partir de 1913 vários autores publicaram a proteção parcial alcançada pela imunização contra a infecção letal do *Trypanosoma cruzi* em animais experimentais.

Atualmente os esforços na busca por uma vacina eficaz contra a infecção continuam expressivos e caminham conjuntamente à possibilidade de alcançar uma vacina terapêutica que interfira no desenvolvimento da doença. Duas revisões sobre os resultados alcançados e prospectivas no desenvolvimento da vacina foram realizados por Brener,² em 1982, Garg e Bhatia,³ em 2005, e outros artigos menos extensos também abordaram com objetividade o desafio da vacina.⁴⁻⁶

Concomitantemente, muitos outros temas de pesquisas pertinentes à doença de Chagas desenvolvem-se somando esforços para compreensão da imunopatogenia da infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, a caracterização da resposta imune à infecção, da patogenia da doença crônica e a validade dos modelos animais experimentais são alguns dos temas de pesquisas ainda não consensuais na atualidade cujos resultados implicam diretamente o desenvolvimento da vacina.

Até o momento, nenhuma pesquisa experimental foi capaz de produzir proteção total ao *T. cruzi*. Dessa forma, a dúvida que motiva este trabalho pode ser resumida pela pergunta: é possível o desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever o estado da arte da vacina contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- A. Relatar os avanços dos estudos experimentais de imunização contra o *T. cruzi*.
- B. Enumerar as lacunas existentes para o desenvolvimento da vacina para a doença de Chagas.
- C. Ponderar a viabilidade de uma vacina protetora contra a doença de Chagas.

3 MÉTODO

O modelo de estudo bibliográfico proposto neste trabalho selecionou artigos científicos no período compreendido entre março e de outubro de 2006 em periódicos indexados nas bases de dados Portal Capes, Medline e Lilacs e publicações eletrônicas da Cochrane a partir de três indicadores principais: doença de Chagas, vacina e imunologia.

A revisão bibliográfica foi escolhida por que “permite ao investigador a cobertura de uma variedade de fenômenos muito mais amplos do que se poderia pesquisar diretamente”.⁷

As limitações deste trabalho são aquelas concernentes a outras revisões bibliográficas, em que os equívocos e contradições das fontes consultadas podem ser reproduzidos ou ampliados a depender da análise crítica do revisor.⁸

4 DISCUSSÃO

4.1 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde estima que existam cerca de 18 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* no continente americano, e que 100 milhões de pessoas, ou 25% da população latino-americana, vive em áreas de risco de infecção, nos 15 países endêmicos para a doença. Os números de casos novos está próximo de 200.000 pessoas infectadas por ano, ao tempo em que estimam-se 21.000 mortes anuais decorrentes da doença de Chagas.⁹

A distribuição geográfica da infecção humana compreende uma vasta região entre o sul da Argentina até os estados do sul dos Estados Unidos (EUA), mas o ciclo natural do *T. cruzi* ultrapassa esses limites geográficos.¹⁰ A emigração de áreas endêmicas, estimulada por razões sócio-econômicas,¹¹ expandiu os limites da doença de Chagas para países sem história natural de infecção. A população estadunidense com a doença também se ampliou pela imigração, sendo estimada em mais de 100.000 doentes no país.³ Entretanto, devido aos milhões de imigrantes ilegais, esse número tende a ser muito maior.

A doença de Chagas é um grave problema de saúde pública e está intimamente ligada ao quadro de desigualdade sócio-econômica dos países afetados pela endemia. Em 2000, as Nações Unidas incluíram a doença de Chagas entre as 13 doenças tropicais negligenciadas no mundo. Nesse grupo de doenças, as condições crônicas e incapacitantes são ainda mais importantes que a mortalidade associada,¹² contribuindo na manutenção das condições precárias de vida. A tabela 1 compara o impacto da doença de Chagas na promoção da pobreza com outras doenças tropicais negligenciadas.

O relatório de desenvolvimento humano pondera a perda econômica do continente americano, produzida pela incapacidade e mortalidade precoce pela doença de Chagas em adultos jovens, em 2,5% da dívida externa em 1995.¹³ Esse custo é representado pelo aumento significativo da mortalidade, das aposentadorias precoces, dos custos hospitalares, do desemprego e da discriminação no trabalho das pessoas com a doença.²

A transmissão da doença de Chagas no início do século ocorria essencialmente pelo contato com os vetores infectados. Contudo, os movimentos migratórios rurais para as regiões urbanas ocorridos na América latina nas décadas de 70 e 80 mudaram o padrão epidemiológico estabelecido para a doença enquanto uma condição rural e a transformaram em uma doença urbana potencialmente transmissível por transfusão sanguínea.¹⁴

Tabela 1 - Condições promotoras da pobreza e vacinas em fase inicial de pesquisa e desenvolvimento

Doença	Amostra (AVPP) ^a	Cronicidade	Saúde da Criança	Saúde materna ou perinatal	Produtividade do trabalho	Referências Seleccionadas
Infecção por helmintos						
Ancilostomose	22.1 milhão	++	++	++	++	[26,84-87]
Oncocercose	0.5 milhão	++	-	-	++	[89-91]
Esquistossomose	4.5 milhão	++	++	++	++	[27,92]
Infecção por protozoários						
Amebíase	NA ^b	+	+	+	+	[101-104]
Chagas	0.7 milhão	++	+	+	++	[106-112]
Leishmaniose	2.1 milhão	++	++	++	++	[113]
Malária	46.5 milhão	++	++	++	++	[11]
Infecção por bactérias						
Úlcera de Bauru	NA ^b	++	+	+	++	[118]
Clamídia	5.9 milhão	++	+	+	++	[64,120-122]
Hanseníase	0.2 milhão	++	+	+	++	[117,123]
Leptospirose	NA ^b	+	+	+	+	[124]
Treponematoses	4.2 milhão	++	++	+	+	[125]
Tuberculose	34.7 milhão	++	++	++	++	[12]
Infecção por vírus						
Dengue	0.6 milhão	-	++	+	+	[126,127]
Encefalite Japonesa	0.7 milhão	-	+	+	+	[127]
HIV/AIDS	84.5 milhão	++	++	++	++	[10]
Desordens não comunicadas						
Desordens por uso de drogas	7.4 milhão	++	+	+	++	[31]

^a Anos de Vida Potencial Produtiva Perdidos (AVPP). Valores estimados a partir das referências [9] (estimadas para ancilostomose e esquistossomose) ou [7]

^b Dados não disponíveis

Fonte: Hotez e Ferris,¹² 2006

O risco aproximado de 20% de adquirir a infecção a cada unidade de sangue transfundida contaminada incitou medidas de controle nos bancos de sangue. Atualmente, a maioria dos países da América Latina realiza triagem do sangue doado, mas a transmissão por transfusão sanguínea não está circunscrita apenas aos países endêmicos para a doença, e está descrita no Canadá e Estados Unidos.⁹

Outras formas de transmissão da doença de Chagas, menos relevantes quando comparadas à forma vetorial de transmissão, mas estabelecidas com relatos em diversos países são: a transmissão vertical, os acidentes biológicos com o *T. cruzi*, a ingestão de comida contaminada com o triatomíneo infectado ou seus dejetos, e a recepção de órgãos doados por pacientes chagásicos crônicos.

Apesar do registro de infecção pelo *T. cruzi* em múmias com mais de 9.000 anos, o conhecimento científico da doença e o desenvolvimento de medidas eficazes de controle completaram recentemente um século. Este fato aliado à complexidade do parasito, à variedade de vetores, à extensão continental da doença e à negligência de investimentos em pesquisas contribuem para a necessidade de maiores estudos (tabela 2) visando otimizar o controle da doença de Chagas já conquistado.

Tabela 2 - Demanda de pesquisa para o controle da doença de Chagas no presente momento, de acordo com os diferentes níveis epidemiológicos.

Nível de Controle	Pesquisa requerida	Comentários gerais
Controle do vetor	Melhores inseticidas e metodologia em nível peridoméstico Melhores armadilhas para os triatomíneos em baixas densidades Melhor organização da vigilância epidemiológica Monitoramento da migração silvestre-doméstica dos triatomíneos Monitoramento da resistência de triatomíneos aos inseticidas	A participação comunitária e a manutenção da vontade política numa densidade vetorial muito baixa serão grandes desafios em um futuro próximo
Transmissão por transfusão sanguínea	Sorologia mais rápida, sensível e específica Fármacos mais efetivos e não-tóxicos na	As relações custo-benefício pioram nas fases avançadas do programa, quando o nível da transmissão é muito baixo. Em

	quimioprofilaxia Pesquisa institucional sobre a qualidade da hemoterapia	geral, uma melhor indicação e qualidade da hemoterapia é requerida, principalmente nas cidades menores.
Transmissão congênita	Desenvolvimento de ferramentas para detectar precocemente a transmissão congênita Imunoprofilaxia (ainda não disponível)	Requer melhor organização e cobertura do sistema de cuidado primário à saúde
Acidentes e transplante de órgãos	Fármacos mais eficientes para a quimioprofilaxia Estudo dos fatores de risco	Não há registro/informação adequado
Tratamento específico	Fármacos mais eficientes e menos tóxicos	Indicações para o tratamento estão aumentando nos casos crônicos
Tratamento sintomático	Cardiopatia: Fármacos mais eficientes e procedimentos para o controle de arritmias, insuficiência cardíaca e síndrome trombo-embólica; avanço no diagnóstico precoce da cardiopatia e na modulação imune da fibrose (não disponível); digestivo: avanço no tratamento farmacológico e cirúrgico das lesões digestivas	Diagnóstico precoce e atenção médica e social adequadas continuam o maior desafio para a administração da doença de Chagas humana
Organização do programa	Como melhorar a continuidade e qualidade, bem como o fluxo horizontal da informação e as estruturas operativas descentralizadas? Análise das causas, conseqüências e fatores de risco envolvendo a falha e o enfraquecimento dos programas regionais e nacionais	Melhora dos centros de referência regionais concernentes ao controle, epidemiologia, cuidados médicos, diagnóstico, entomologia, etc., é requerida

Há 4 formas principais de controlar a doença de Chagas: o controle vetorial, a melhora das habitações, quimioterapia e vacinação.² As duas primeiras estratégias estão em fase de implementação através de políticas públicas e acordos entre várias nações, mas a pesquisa de novos fármacos encontra-se totalmente relegada pela indústria farmacêutica, uma vez que os únicos dois medicamentos utilizados na clínica são da década de 70. Além disso, estudos para desenvolvimento de uma vacina protetora são ainda muito incipientes devido principalmente a falta de recursos financeiros e pela complexidade do parasito. Ademais, os resultados existentes neste campo não tem ainda resultado em contribuições práticas para a redução da doença.

4.2 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*¹ é um protozoário hemoflagelado heteroxênico que possui como hospedeiro vertebrado inúmeras espécies de mamíferos pertencentes a sete ordens com mais de 150 espécies e como hospedeiro invertebrado hemípteros hematófagos da ordem Hemiptera e sub-família Triatominae.¹⁰

A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre quando as formas tripomastigotas depositadas juntamente com as fezes e/ou urina pelo inseto vetor, invadem a mucosa - conjuntiva, oral, e nasal principalmente - ou pele com solução de continuidade.¹⁰ As formas tripomastigotas penetram em praticamente qualquer célula do hospedeiro, onde iniciam sua transformação para forma amastigota e se multiplicam através de sucessivas divisões binárias gerando um número expressivo de aproximadamente 500 amastigotas em um período de 120 horas a partir de um único tripomastigota.¹⁶ As formas amastigotas sofrem um processo de diferenciação para tripomastigotas as quais através de movimentos vigorosos rompem a membrana celular e ficam livres no espaço intercelular de onde podem infectar outras células ou caírem na corrente sanguínea para alcançar outros sítios.

O hospedeiro invertebrado adquire a infecção pelo parasito ao realizar o repasto sanguíneo em animais infectados. Quando alcançam o estômago, as formas tripomastigotas transformam-se em esferomastigotas e epimastigotas, que migram para o intestino, e multiplicam-se por divisão binária originando novas formas epimastigotas. Ao migrarem para o reto, transformam-se em tripomastigotas e são eliminados com a urina e as fezes do inseto principalmente durante o repasto sanguíneo.¹¹

Todas as espécies de mamíferos são consideradas suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*, e desta forma contribuem na manutenção do ciclo do parasito entre mamíferos silvestres o

que, como observado em outras zoonoses, dificulta ou mesmo impede a completa erradicação do parasito apesar de medidas eficazes de controle.¹⁷

O táxon *T. cruzi* constitui um conjunto complexo e heterogêneo de populações que possui um modelo reprodutivo clonal ou assexuado demonstrado através de estudos bioquímicos e moleculares.¹⁸ Esta heterogeneidade genética do parasito é também explicada pelas variações biológicas observadas em modelos experimentais, bem como na expressão clínica da doença no homem.¹¹ Estudos isoenzimáticos de diferentes isolados de *T. cruzi* realizados a partir da década de 1970 no Brasil mostraram que determinados padrões isoenzimáticos do parasito poderiam ser correlacionados com os ciclos doméstico e silvestre de transmissão.¹⁹ Estes estudos também demonstraram que populações distintas do parasito infectam pacientes crônicos no Brasil e na Venezuela onde as formas clínicas da doença são claramente divergentes.¹⁹ A caracterização de um grande número de cepas isoladas de diferentes hospedeiros em diferentes regiões do Brasil permitiu classificar o *T. cruzi* em três grupos de zimodemas²⁰ a saber: zimodema (Z) 1 associado ao ciclo silvestre de transmissão envolvendo um grande número de espécies de mamíferos e triatomíneos silvestres; Z2 associado com a transmissão intradomiciliar envolvendo espécies domésticas de triatomíneos e principalmente humanos, e Z3 associado a mamíferos de hábito fossorial como tatus e o triatomíneo *Panstrongylus geniculatus* o qual vive em associação a este hospedeiro. Contudo vale salientar que parasitos pertencentes a todos estes zimodemas já foram encontrados infectando o homem. A associação de marcadores isoenzimáticos e estudos biológicos em modelos experimentais permitiram classificar as cepas de *T. cruzi* em três biodemas I, II e III. O biodema I tem como protótipo a cepa Y, sendo constituído por cepas onde predominam as formas delgadas e o macrofagotropismo na fase aguda da infecção, ocasionando elevada parasitemia e altas taxas de mortalidade. No biodema II, cujo protótipo é a cepa São Felipe, predominam cepas com multiplicação lenta, picos de parasitemia irregulares e mortalidade variável, enquanto no biodema III, representado pela cepa Colombiana, predominam cepas com baixa taxa de multiplicação e picos de parasitemia tardios, parasitos da forma larga e acometimento predominante da musculatura esquelética.²¹

Estudos mais recentes utilizando diferentes marcadores bioquímicos e moleculares permitiram a um grupo de especialistas classificar o táxon *T. cruzi* em duas linhagens principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II.²² Entretanto, esta classificação do táxon *T. cruzi* em duas linhagens principais já mostrou-se insuficiente, uma vez que a presença de subgrupos dentro de cada linhagem vem sendo demonstrada.^{23, 24}

4.3 Vetores

O *Trypanosoma cruzi* é naturalmente transmitido pela urina e fezes de insetos hematófagos da subfamília *Triatomineae*. Na fase adulta, as diferentes espécies medem entre 1,6 e 44 mm, e a maioria possui asas que capacitam o vôo. Há 123 espécies de triatomíneos, e todas são potencialmente vetoras, mas poucas apresentam importância no aspecto epidemiológico.²⁵

O habitat natural dos triatomíneos são ninhos e locais de repouso de mamíferos e pássaros, caracterizando o ciclo silvestre do vetor. Mas a aproximação de populações humanas ao seu ambiente natural permitiu a adaptação ao ambiente doméstico de algumas espécies predispostas, definindo o ciclo doméstico. Cinco espécies de triatomíneos tornaram-se vetores notórios da doença de Chagas por adaptarem-se tão bem em colonizar habitações humanas. Desses, o *Triatoma infestans* é o principal vetor nos países do Cone Sul, mas há várias outras espécies vetoras domesticadas com importância secundária.¹⁰

Algumas espécies selvagens raramente formam colônias domésticas ou invadem casas nas formas adultas voadoras, causando casos esporádicos da doença. Outras, embora freqüentem o domicílio, não são capazes de colonizá-lo. Esses fatos explicam a rara aquisição vetorial de infecção na América do Norte, já que as espécies locais de triatomíneo não colonizam casas. Da mesma forma na Amazônia nenhum triatomíneo colonizou as habitações.¹⁰

4.4 Formas Clínicas

A evolução natural da doença de Chagas apresenta duas formas sucessivas, denominadas fase aguda e fase crônica. O período da fase crônica sem qualquer manifestação clínica da doença é conhecido por fase indeterminada, na qual localiza-se a maioria dos indivíduos infectados. Após 10 a 30 anos da primoinfecção, os indivíduos suscetíveis desenvolvem a forma crônica sintomática da doença.

A fase aguda que sucede a primoinfecção pelo *T. cruzi* estende-se por quatro a oito semanas, com resolução espontânea em mais de 90% dos casos.²⁶

A porta de entrada do parasito pode apresentar uma lesão edemaciada da pele, conhecida por chagoma, ou edema bipalpebral indolor das pálpebras, denominado sinal de Romaña. Tais lesões ocorrem geralmente na face em decorrência das picadas nas partes descobertas do corpo durante o sono,⁹ e permitem o diagnóstico precoce da infecção. Contudo, os sinais agudos da doença de Chagas são predominantemente inespecíficos:

linfadenopatia generalizada, febre, mialgia, cefaléia, hepatoesplenomegalia, edema facial ou generalizado, rash cutâneo, vômitos, diarreia e anorexia.¹⁰

A morte na fase aguda acomete aproximadamente 10% dos infectados, especialmente crianças, e decorre majoritariamente da miocardite aguda e meningoencefalite causadas pelo parasito.¹⁰

O diagnóstico parasitológico na fase aguda é realizado pela identificação direta do tripomastigota no sangue periférico. Após a remissão da fase aguda, essa constatação é mais laboriosa e pode obter resultados negativos, pela resistência imune à infecção adquirida pelo hospedeiro. Nessa fase, testes sorológicos de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA reconhecem os anticorpos antiparasitários e confirmam o diagnóstico para doença de Chagas.

A presença do parasito em tecidos do hospedeiro pode ser evidenciada pela constatação de ácidos desoxirribonucleicos do parasito através da aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR).

As lesões da fase crônica afetam o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico. Após vários anos assintomático, 27% dos infectados desenvolvem doença cardíaca, 6% doença digestiva, principalmente megacólon e megaesôfago, e 3% apresentam envolvimento do sistema nervoso periférico.²⁷

As principais manifestações da miocardiopatia chagásica crônica são a insuficiência cardíaca, as arritmias cardíacas e os fenômenos trombo-embólicos.⁹

4.5 Tratamento Farmacológico

Os 2 fármacos utilizados atualmente para tratamento da infecção, o benzonidazol e o nifurtimox, estão disponíveis para uso clínico desde a década de 70. Os efeitos colaterais produzidos por esses fármacos ocorrem em 10 a 20% dos pacientes, podendo exigir a interrupção do tratamento.¹⁰

A introdução da terapia é efetiva em curar pelo menos 50% dos casos agudos recentes da infecção, confirmada pela reversão sorológica no seguimento de um ano.³

A indicação de tratamento farmacológico na fase indeterminada da doença é controverso. A revisão realizada por Villar e colaboradores²⁸ encontrou redução significativa do título de anticorpos e de xenodiagnósticos positivos nos pacientes que receberam medicação, mas os benefícios clínicos permanecem inconclusos.

Já na fase crônica sintomática da doença de Chagas, não há evidência para recomendar o tratamento com benzonidazol ou nifurtimox, e estudos com outros fármacos eficazes nesta fase precisam ser realizados,²⁹ assim como o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas. Uma vertente exequível é a terapia com células-tronco. Vilas-Boas e colaboradores³⁰ realizaram a administração intracoronariana de células-tronco em indivíduos com insuficiência cardíaca chagásica, que mostrou-se segura e eficaz, com melhora de qualidade de vida e capacidade funcional dos pacientes nos 2 meses após o tratamento.

A pesquisa de novos fármacos com maior eficácia na fase crônica da infecção, e menor toxicidade ao paciente, não representa o interesse dos laboratórios de medicamentos. Das 1393 novas entidades químicas que entraram no mercado farmacêutico entre 1975 e 1999, apenas 16 eram indicadas para o tratamento de doenças tropicais e tuberculose.³¹ Entretanto, há várias classes de drogas aprovadas para uso em outras enfermidades e com atividade comprovada contra o *T. cruzi*, que poderiam ser desenvolvidas para o tratamento da doença de Chagas.³²

4.6 Controle de Vetores

A doença de Chagas transmitida pelo vetor é essencialmente uma doença de habitações pobres.¹⁰ O triatomíneo domesticado abriga-se nas imperfeições das casas de pau-a-pique e das construções, e justifica a relação direta entre pobreza e o risco de infecção. O extermínio das populações domésticas de triatomíneos possui atualmente duas estratégias de efeito: uso de inseticidas de ação residual e a melhora das habitações.

Vários compostos naturais e sintéticos foram utilizados na tentativa de eliminar os insetos das habitações desde o início do século XX. Dentre estes podemos citar o DDT e o BHC que foram utilizados em larga escala nas décadas de 50 e 60 para o controle vetorial da malária e da doença de Chagas. Entretanto devido aos efeitos adversos e sua elevada toxicidade ao homem e ao meio ambiente, estes inseticidas foram abandonados e atualmente seu uso é proibido. A partir de 1980 surgiram os inseticidas piretróides sintéticos utilizados até hoje. A ausência de odores desagradáveis e de marcas nas paredes pulverizadas das casas permitiu sua grande aceitação pela população.¹⁵ De forma complementar, os programas de melhora domiciliar objetivam reconstruir ou consertar as casas de modo a torná-las inabitáveis aos triatomíneos.²

A Iniciativa do Cone Sul para a eliminação da doença de Chagas, assinada em Brasília em 1991, estipulava uma data para eliminação da transmissão vetorial nos países

participantes. Uruguai (1997) e Chile (1999) concluíram no prazo a tarefa, entretanto Brasil (2000), Argentina (2003), Bolívia e Paraguai (2005) não alcançaram o objetivo no limite predefinido. Em 2000, os resultados preliminares da iniciativa alcançaram redução média de 94% do *T. infestans*, principal vetor da doença nos países do Cone Sul.⁹

Estimulados pela iniciativa dos países do Cone Sul, programas de controle iniciaram em 1997 nos países do pacto andino e da América Central,¹⁵ mas a distribuição geográfica e a capacidade de re-invasão doméstica de um importante vetor da região não está clara. Além disso, não há métodos efetivos para uso de inseticidas em palmeiras infestadas com triatomíneos¹⁰ cuja importância epidemiológica reside no contato com o vetor através do extrativismo vegetal ou na proximidade das palmeiras com as residências.

A análise do programa de controle da doença de Chagas no Brasil, realizado no período de 1975 a 1995, demonstrou um alto retorno de benefícios comparado aos custos. Um ano de vida ajustado para incapacidade (AVAI) foi ganho para cada 260 dólares gastos. O custo-benefício foi de 2,01 dólares poupados por dólar gasto em prevenção. A prevenção na hemorrede pública apresentou custo-efetividade menor, e US\$ 0,19 ganho para cada dólar dispendido. Neste período, a triagem sorológica foi efetiva em 81%.³³

No final do ano 2000 o Brasil foi declarado área livre de transmissão vetorial da doença de Chagas uma vez que dos 12 Estados onde ainda havia registros de transmissão vetorial até a década de 90, em 10 deles a transmissão já havia sido interrompida e nos dois estados restantes o trabalho de controle químico do vetor encontrava-se bastante avançado.⁹

Os programas de controle da doença de Chagas mostraram ser efetivos em reduzir a incidência da infecção, e resultaram num custo econômico muito menor para prevenção, quando comparado ao dispendido no tratamento da doença crônica. Esses resultados demonstraram a viabilidade do controle futuro da doença, contudo a implementação e manutenção das medidas de controle dependem do cenário político, e sua fragilidade inquieta os pesquisadores. Uma das preocupações atuais é a continuidade em longo prazo dos programas, baseada na tendência já evidenciada em algumas regiões do Cone Sul de relaxar o controle e cortar recursos, quanto mais se avança no controle de vetores e na escassez da transmissão.³⁴ Também o surgimento de epidemias locais pode significar a suspensão do controle da doença de Chagas, com o remanejamento dos recursos para as medidas emergentes necessárias.

As espécies de triatomíneos de maior expressão epidemiológica estão progressivamente sendo eliminadas dos ecótopos domésticos pelo uso do inseticida, contudo espécies domesticadas secundárias podem emergir como complicações do controle vetorial.¹⁰

²⁵ Corroborar esta hipótese a observação de que o *Triatoma sordida* costuma ocupar os domicílios onde a espécie *T. infestans* foi erradicada, depois de cessada a ação residual dos inseticidas empregados nas campanhas profiláticas.²⁵

As modificações ou a extinção de ecótopos silvestres dos vetores podem suscitar a busca e adaptação destes ao ambiente doméstico. No nordeste, a devastação dos ecossistemas naturais, que motivou a escassez de hospedeiros silvestres para alimentação sanguínea, parece estar envolvida na adaptação do triatomíneo *Panstrongylus megistus* ao domicílio humano, até chegar ao estado atual.²⁵

Uma análise de outras doenças com causas socioeconômicas mostrou que a queda no número de infecções chagásicas é devido às atividades preventivas, e não a uma melhora geral nas condições de vida.³³ Dessa forma, nos raros casos de infecções causadas por vetores selvagens, inclusive nas microepidemias familiares,³⁴ as pessoas infectadas enfrentarão as mesmas dificuldades para o atendimento em saúde, o diagnóstico precoce e a instituição de tratamento farmacológico eficaz existentes hoje.

4.7 Imunidade na Doença de Chagas

A entrada do *T. cruzi* no hospedeiro inicia a infecção aguda e desencadeia múltiplos mecanismos imunes, com elevação dos títulos de anticorpos responsáveis pelo diagnóstico sorológico da doença de Chagas após aproximadamente 2 semanas. Estas respostas imunes são capazes de controlar a infecção aguda, que remite espontaneamente, entretanto, são incapazes de eliminar a infecção pelo parasito.^{35, 36}

As diferentes formas do *T. cruzi* são alvos potenciais de respostas imunes distintas do hospedeiro. As formas tripomastigotas extracelulares circulam no sangue estando expostas à destruição por anticorpos ou através da lise mediada pelo complemento, assim como por fagócitos ativados. Dessa forma, os antígenos de superfície dos tripomastigotas são candidatos naturais a produzir uma resposta humoral protetora.²

Já as formas amastigotas ocupam o ambiente intracelular, estando inacessíveis aos anticorpos circulantes. A defesa contra estas formas é uma função da imunidade celular, mediada pelos linfócitos T que reconhecem as células infectadas por antígenos expressos na superfície celular.³⁷ Apesar de relativamente pouco ser conhecido sobre a biologia celular das formas amastigotas ou das moléculas secretadas por elas, é lógico supor que durante o processo de replicação, proteínas do parasito entram na via de processamento do MHC de classe I e produzem epítomos apresentados aos linfócitos T.³⁵

As razões que justificam a manutenção da infecção crônica pelo *T. cruzi* apontam uma combinação de respostas imunes inapropriadas e evasão parasitária sofisticada, que permite ao parasito evitar a eliminação pelo hospedeiro.¹⁰

4.7.1 Patogenia da Doença Crônica

A causa determinante da patogenia da doença na infecção chagásica é ainda intensamente debatida.^{35, 36} Por muitos anos, especulou-se que a resposta imune a auto-antígenos estimularia a inflamação crônica e a morte celular na doença cardíaca.

A dificuldade em demonstrar a presença do parasito nos tecidos cronicamente afetados unida à demonstração de que anticorpos contra o parasito reconheciam tecidos do hospedeiro sugeriu que a doença de Chagas crônica apresentasse um componente auto-imune ou mesmo que essa fosse sua gênese. Essa teoria foi corroborada pela indução experimental de lesões crônicas semelhantes às humanas pela inoculação de extratos do parasito.³⁸ Dessa forma, a vacina poderia exacerbar a doença ao invés de protegê-la. Entretanto, técnicas mais precisas e recentes detectaram a presença do DNA do *T. cruzi* ou seus antígenos no sangue e tecido cardíaco em animais experimentais e humanos³⁸ com doença de Chagas. Também a reativação da doença aguda em pacientes imunossuprimidos pela AIDS ou quimioterápicos imunossupressores demonstra que o parasito persiste no hospedeiro mesmo após a fase aguda da doença em equilíbrio com o sistema imune do hospedeiro.³ Esses fatos redefiniram o valor da vacina e da terapêutica no controle da infecção.

4.7.2 Resposta Imune Experimental

O modelo imune conhecido da infecção aguda e crônica na doença de Chagas é principalmente baseado em animais e, muitas das observações experimentais, concordam com um número limitado de estudos humanos.³⁹ Diversas células e moléculas efetoras mostraram-se relacionadas com a resistência à infecção experimental, sendo de importância reconhecida para estimulação da imunidade protetora.³ Entre elas, constam as células T CD8+,^{35, 40, 41} a resposta T helper tipo 1,¹⁰ o interferon-gama⁴¹ e a resposta humoral.⁴²

Permanecem os esforços para compreender a resposta imune protetora contra a infecção pelo *T. cruzi* e desenvolver uma vacina capaz de estimular apropriadamente as respostas humoral e celular. Contudo, a história natural da doença de Chagas, com rara evolução para cura, suscita a dúvida pertinente: vacinas contra doenças que não induzem uma boa resposta imune serão exitosas?¹⁰

4.7.3 Evasão Imune

Há curiosidade científica internacional sobre a forma como pelo menos parte da população do *T. cruzi* durante a infecção em humanos escapa à resposta imune do hospedeiro por décadas até a cronicidade.⁴³

As moléculas do parasito que deprimem direta ou indiretamente a resposta imune do hospedeiro ou interferem com a modulação das moléculas de adesão da célula infectada (MHC, receptores de lecitina, matriz extracelular, incorporação do DNA) já foram relatadas, mas não permitiram o entendimento maior de como o parasito mantém a infecção crônica em hospedeiros imunocompetentes.⁴³

Dois modelos foram propostos para explicar a falha na resposta imune do hospedeiro:

A) Respostas policlonais

A capacidade do *T. cruzi* de expressar um número estimado de 10.000 proteínas demonstra o potencial do parasito em oferecer centenas ou milhares de proteínas distintas às vias de processamento do MHC de classe 1 das células infectadas.³⁵ Na infecção aguda, tal estímulo ativa conjuntamente diversos clones distintos de linfócitos B e T, produzindo uma resposta policlonal. Uma análise da utilização intensa sofrida pelos genes que codificam o repertório de células B e T durante a infecção demonstrou-se incompatível com respostas oligoclonais.⁴⁴

A resposta policlonal é essencialmente inespecífica, e por isso incapaz de organizar uma defesa eficaz do hospedeiro, permitindo a evasão imune do parasito.^{35, 44} Segundo Minóprio, 98% das células B ativadas pela infecção são produtoras de anticorpos inespecíficos, em concordância com a natureza policlonal da resposta da célula B. No que tange à resposta celular T CD8+, a pequena densidade de cada peptídeo apresentado poderia não alcançar a mínima necessária para ativar uma resposta específica.³⁵

A presença de famílias de genes que codificam proteínas sem atividade aparente atribui, dessa forma, uma função a essas proteínas de contribuir na geração de respostas policlonais. É o caso da família de genes das transialidases, composta por mais de 800 representantes, dos quais apenas uma minoria possui atividade identificada.⁴⁵

Minoprio⁴⁴ propõe que uma estratégia para produzir imunidade deve incluir estudos esclarecedores dos mecanismos utilizados pelos patógenos para ativar respostas policlonais, o isolamento das partículas responsáveis pela ativação e sua neutralização ou inativação da ação no hospedeiro.

B) Função antagônica dos peptídeos

A expressão de um grande número de proteínas pode ainda produzir um efeito antagônico de alguns peptídeos sobre outros, inibindo a ativação da resposta inata e de células T. Assim, a célula T exposta ao peptídeo antagônico tornar-se-ia refratária à ativação por seu peptídeo respectivo.³⁵

Uma associação deste efeito sobre as células T com a ativação policlonal é uma densidade de epítomos que em sua maioria são incapazes de ativar uma resposta específica e que ao mesmo tempo antagonizam a função das células T já ativadas, desta forma impedindo a resposta imune efetiva do hospedeiro.

4.8 Vacinas

Um número considerável de vacinas contra infecções virais e bacterianas utilizadas na medicina tem reduzido drasticamente a morbidade e mortalidade destas doenças na população humana.

Apesar dos esforços envidados por vários grupos de pesquisa no desenvolvimento de vacinas contra doenças parasitárias, não existe atualmente nenhuma vacina disponível para o controle das doenças parasitárias como a malária, esquistossomose, leishmanioses, filaríoses e tripanossomíases que afetam cerca de 25% da população mundial.⁴⁶

Estes parasitos causam infecções crônicas e persistentes e em muitos casos envolvem diferentes estágios morfológicos dos agentes etiológicos durante o processo de infecção e desenvolvimento da doença. Uma vacina para ser efetiva deve proteger contra mais do que um estágio infectivo e gerar uma resposta imune protetora apropriada. Os parasitos por sua vez desenvolveram várias estratégias para se evadir da resposta imune do hospedeiro. Os antígenos envolvidos são em geral complexos dificultando sua identificação e a resposta imune induzida por vezes não é totalmente compreendida.

4.8.1 Padronização dos Métodos Experimentais

Muitos esforços já foram empregados na busca de uma vacina para doença de Chagas, contudo não há uniformização dos métodos adotados nas pesquisas experimentais realizadas, e muito poucos artigos justificam suas escolhas metodológicas. O resultado final é uma aparente arbitrariedade dos métodos empregados, e uma limitação importante na comparação dos achados.⁴⁷ Várias evidências apontam diferentes resultados a partir de modificações nas variáveis envolvidas para imunização de animais.

O impacto do tamanho do inóculo na proteção foi demonstrada por Szarfman e colaboradores.⁴² Neste estudo, a variação do tamanho do inóculo produziu uma gradação na proteção parcial, com as médias de parasitemia e letalidade menores quanto maior o inóculo de epimastigotas responsável por conferir proteção à reinfeção com tripomastigotas, e quanto menor o inóculo deste. Os títulos de anticorpos também mostraram relação direta com inóculos maiores de epimastogotas.

Kierszenbaum⁴⁸ demonstrou que camundongos imunizados com 2 doses de parasitos mortos obtiveram médias maiores de sobrevivência que aqueles imunizados com apenas 1 dose, apesar dos dois grupos alcançarem proteção significativa comparativamente aos não imunizados. Resultado semelhante condicionado a segunda dose da vacina na redução da parasitemia foi encontrado por Menezes.⁴⁹

A via de inoculação utilizada na imunização determinou o desenvolvimento da imunidade protetora, no estudo experimental conduzido por Wrightsman e colaboradores.⁵⁰ Após inoculação com 103 tripomastigotas, apenas os camundongos vacinados com inoculação subcutânea apresentaram redução na parasitemia e sobreviveram à infecção, enquanto a imunização pela via intraperitoneal foi totalmente inefetiva.

A proposição de novas vias de administração, como a transcutânea, a oral, a retal, e a ingestão de plantas transgênicas ou quiméricas agregará maior complexidade na escolha e confrontação dos resultados.⁵¹

Entre as espécies de mamíferos submetidas aos experimentos, predominam grandemente os camundongos, o que poderia favorecer a confrontação dos achados, não fosse à variedade de linhagens empregadas, com diferentes graus de resistência à infecção pelo *T. cruzi*. A maioria dos experimentos relacionados à vacinação contra o *T. cruzi* usaram camundongos BALB/c ou C57BL/6. Apesar desses camundongos morrerem após infecção com tripomastigotas de certas cepas, eles não são tão suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* como o camundongos A/Sn.⁴¹ A resposta humoral à vacina, da mesma forma, apresentou resultados diferentes, com anticorpos específicos detectadas apenas após a segunda dose de vacina no camundongo B6, enquanto no BALB/c já após a primeira dose os títulos aumentaram.¹⁷

A infecção também foi realizada com cepas de tripomastigotas de virulências variadas, homólogas ou heterólogas às cepas usadas para imunização. Os calendários para a vacinação e infecção não foram uniformes.²

4.8.2 Proteção

A resistência à infecção conferida pela vacinação prévia caracteriza a proteção de uma vacina. A maioria dos trabalhos experimentais realizados correlaciona a capacidade de proteção à sobrevivência de animais a doses outrora letais de tripomastigotas e à redução da parasitemia na infecção aguda, alcançando resultados significativos.

Esses fenômenos, entretanto, estão diretamente relacionados à fase aguda da infecção, e seu impacto na redução das manifestações crônicas da doença é controverso. É necessário demonstrar que uma fase aguda branda confere proteção às lesões crônicas da doença, pois, de outra forma, a mera atenuação da forma aguda não poderá ser tomada como critério de proteção, já que os poucos parasitos sobreviventes podem desencadear a lesão crônica.²

A proteção total oferecida por uma vacina resulta em uma imunidade estéril, com 100% dos animais protegidos da infecção após a vacinação. Este grau de imunidade para o *T. cruzi* ainda não foi alcançado por nenhum dos experimentos.^{2,3}

4.8.3 Vacinas Experimentais

Inicialmente, os pesquisadores estimularam a proteção ao desafio com dose letal de *T. cruzi* através da imunização prévia com doses sub-letais do mesmo parasito, alcançando resultados parciais com médias menores de letalidade e parasitemia.² Outras evidências corroboraram essa capacidade de proteção, como a ausência de alterações histopatológicas em miocárdio, músculo esquelético, fígado e baço nos animais sobreviventes após 75, 105 e 150 dias da infecção.⁴²

A infecção residual decorrente da imunização com parasitos vivos impulsionou a elaboração de vacinas compostas pelo parasito intacto morto ou vivo e atenuado, neste caso causando uma infecção não progressiva, pela incapacidade de reproduzir-se. A avirulência do parasito era produzida pelo tratamento prévio com agentes atenuantes químicos, radiação, ou passagens seriadas em cultura, mas objetivando preservar sua imunogenicidade.³⁹ Entretanto, a reversão para forma virulenta de parasitos atenuados e a resistência de qualquer número de tripanossomas ao tratamento letal poderiam predispor a primoinfecção.²

A ausência de parasitos sobreviventes pôde ser confirmada em estudos realizados com a cepa Tulahuén quando os parasitos foram tratados com perclorato de sódio antes da inoculação. Nenhum organismo móvel foi observado à microscopia óptica, e as culturas com o preparado foram todas negativas mesmo após 12 semanas de incubação, enquanto as

culturas controles eram positivas geralmente entre 2 e 4 semanas. A mesma cepa tratada com cloreto de sódio foi incapaz de exterminar 100% dos parasitos.⁴⁸

Uma série de experimentos em cães e camundongos buscou demonstrar que a cepa Y de *T. cruzi*, altamente virulenta para camundongos, mantida através de passagens seriadas em cultura tornou-se avirulenta. Entretanto, em experimentos de imunização de camundongos, foram observados dois resultados de hemoculturas positivas, atribuídos a persistência de parasitos originais do inóculo.⁵² Além disso, uma redução significativa de alterações tissulares nos camundongos imunizados também foi relatada.⁵³ Esta mesma cepa avirulenta foi utilizada para imunizar dois voluntários homens, com ausência de sinais clínicos e laboratoriais de infecção decorridos 5 anos da vacinação.^{49, 54}

Basombrio e colaboradores⁵⁵ utilizando a cepa Tulahuén atenuada imunizaram camundongos com objetivo de demonstrar que a atenuação da fase aguda da infecção poderia estender-se à fase crônica, confirmado pela prevenção significativa das lesões no músculo esquelético, no coração, no cólon, e na bexiga observada ao 2º, 6º e 10º mês pós-infecção.

Apesar de haver evidências contrárias à permanência de patógenos virulentos, a proteção oferecida pelas vacinais com parasitos atenuados ou mortos foi semelhante à oferecida pela imunização com formas vivas do *T. cruzi*, com resultados parciais decorrentes de menor letalidade e parasitemia expressas nos animais vacinados.^{47, 48, 49, 53}

Um novo modelo de imunização começou a ser aplicado, visando expor antígenos intracelulares de *T. cruzi* a partir da lise celular. Diferentes técnicas foram aplicadas para romper as células dos parasitos e selecionar frações com maior potencial imunogênico, contudo, partilhando as dificuldades técnicas já vivenciadas para esterilizar as vacinas com parasitos mortos. A proteção parcial não mostrou resultados melhores do que os modelos anteriores (tabela 3), mas estes estudos contribuíram para compreensão da resposta imune do hospedeiro.²

A fração flagelar de epimastigotas da cepa Tulahuén obtida por fracionamento em centrifugação diferencial e posterior purificação por gradiente de densidade, utilizada na imunização de animais mostrou redução significativa da parasitemia e sobrevivência de 100% dos camundongos imunizados.⁵⁶

Com a evolução das técnicas laboratoriais, tornou-se possível selecionar proteínas contidas em frações do parasito e testar a capacidade destas isoladamente em gerar proteção. Ao modo de outras frações, algumas proteínas purificadas da fração flagelar mostraram resultados protetores semelhantes aos das frações totais. É o caso da proteína do corpo paraflagelar purificada, que conferiu sobrevivência a 100% dos animais vacinados;⁵⁰ e dos

antígenos purificados empregando o anticorpo monoclonal FCH-F8-4 em frações flagelares, que reduziu significativamente as médias de parasitemia.⁶ A presença de anticorpos contra estes dois antígenos foi testada e confirmada em amostras de soro de pacientes chagásicos crônicos,^{6, 50} com reação positiva de todos os 16 pacientes expostos à proteína do corpo paraflagelar.

Da mesma forma, a engenharia genética permitiu sintetizar por tecnologia recombinante proteínas reconhecidamente imunogênicas ou ainda trechos de aminoácidos pertinentes a estas proteínas, viabilizando a manipulação de antígenos que antes só poderiam ser obtidos a partir do próprio parasito. As proteínas flagelares^{50, 57} e as proteínas de superfície de amastigotas⁴¹ são exemplos de antígenos inicialmente obtidos por purificação, que passaram a ser produzidos através da tecnologia do DNA recombinante para imunização experimental contra a infecção pelo *T. cruzi*.

A biologia molecular tornou possível definir a localização de epítomos imunogênicos contidos numa proteína reconhecidamente protetora. Para tal, a proteína de superfície de amastigotas 2 recombinante (ASP-2) foi desmembrada em porções menores de aminoácidos, e dessas apenas a fração de proteína recombinante compreendida entre os aminoácidos 261 a 500 da ASP-2 conferiu proteção. Este trecho foi novamente dividido em duas porções, uma com os aminoácidos 261 a 380, e outra de 381 a 500 e realizou-se a vacinação pelo mesmo método. Observou-se, assim, que a primeira porção da proteína produziu proteção igual ao trecho de 261 a 500, enquanto a segunda porção protéica foi incapaz de produzir qualquer proteção, sugerindo que proteínas recombinantes ainda menores, ou até mesmo peptídeos sintéticos, podem ser utilizados para vacinação.⁴¹

A imunização com proteínas recombinantes do *Trypanosoma rangeli*, protozoário indiferenciável do *T. cruzi* pelos anticorpos do hospedeiro, mas não patogênico para o homem, produziu proteção parcial dos animais caracterizada pela parasitemia mais controlada, queda na mortalidade e redução do infiltrado inflamatório e de pseudocistos em coração e músculo esquelético no modelo murino.⁵⁸ Tripanossomas não patogênicos de roedores também foram experimentados em outros modelos vacinais, contudo sem conferir qualquer proteção.²

Paralelamente aos esforços na identificação de candidatos a vacina, muitos adjuvantes foram testados na modulação de imunidade protetora. Além do objetivo de melhorar diretamente a eficácia das vacinas, propôs-se a administração conjunta dos adjuvantes para iniciar a resposta imune celular, direcionar a resposta Th1 e obter ativação dos linfócitos T citotóxicos.³⁷ O emprego desses adjuvantes, contudo obteve sucesso limitado.³⁹

Tabela 3 - Algumas das vacinas tradicionais testadas contra *Trypanosoma cruzi*

Estratégia de Vacinação	Modelo Animal	Sobrevivência % (dpi)*	Ref.
<i>Trypanosoma cruzi</i> tratado com:			
Thimerosal	Macaco Rhesus, camundongo	0	[45,46]
Formalina	Camundongo	0	[47]
Pulverização	Camundongo	100 (10-15)	[48]
Congelamento e descongelamento	Camundongo, cobaio	70 (120)	[49]
Sonicação	Camundongo	0	[50,51]
Ruptura por pressão	Camundongo	80-100 (120)	[52]
Irradiação	Camundongo	80-100	[53,54]
Frações subcelulares <i>T. cruzi</i>			
Solúvel	Camundongo	85 (150)	[55]
Flagelar	Camundongo	90-100 (60)	[56,57]
Membranas	Camundongo	Não detectada	[58]
<i>T. cruzi vivo atenuado por:</i>			
Droga de tratamento			
Tripaflavina	Camundongo	100 (30)	[59]
Actinomicina D	Camundongo	100 (13)	[60]
Bayer 7602	Camundongo	100	[61]
Primaquina	Camundongo	100	[62]
L-furaltodone	Camundongo	100 (11)	[63]
Passagem serial em cultura	Camundongo	100 (13-77)	[64-68]
	Cão	100 (30)	
Imunomodulares não-específicos			
BCG	Camundongo	Não detectada	[69]
Dipeptídeo Muramyl	Camundongo	57 (36)	[70]
Levamisole, isoprinosina	Camundongo	0	[71]
<i>Corynebacterium parvum</i>			

* A sobrevivência dos animais experimentais foi observada por n dias após a infecção. BCG: Bacilo Calmette-Guérin; dpi: dias após a infecção.

Fonte: Garg e Bhatia,³ 2005

As vacinas com proteínas purificadas e recombinantes tornaram os inóculos mais seguros, pois encerraram as possibilidades de parasitos virulentos misturados à amostra, e reduziram o número de antígenos possibilitando conseqüentemente a redução de anticorpos

gerados no processo capazes de reagir com tecidos do hospedeiro.² No entanto, os resultados alcançados com estes modelos experimentais mostram o predomínio da indução de resposta imune humoral mostrando que tanto vacinas com parasitos atenuados, bem como aquelas que utilizam antígenos purificados ou recombinantes foram insuficientes para controlar a infecção limitando-se à proteção parcial contra o *T. cruzi*.³⁹

A limitação dos resultados obtidos com os modelos vacinais descritos acima impulsionou a pesquisa de novas formas de vacina, ainda em estágio experimental, e de novas tecnologias para seleção de antígenos e indução de respostas protetoras humoral e celular. No campo de pesquisa das vacinas, a imunização com plasmídeos de DNA, há mais de uma década em estudo, obteve alguns resultados promissores na imunização contra a infecção pelo *T. cruzi*, além de oferecer algumas outras vantagens.³

A vacina com plasmídeos de DNA ou simplesmente vacina de DNA baseia-se na inclusão de genes que codificam proteínas antigênicas aos plasmídeos. Estes são inoculados no organismo do hospedeiro e fagocitados por células apresentadoras de antígenos e células dendríticas. Dessa forma, o plasmídeo se interioriza na célula e utiliza o aparato celular do hospedeiro para transcrever e traduzir a proteína imunogênica que estimulará respostas imunes específicas. Na seqüência de nucleotídeos do plasmídeo, também estão codificados os elementos regulatórios da expressão gênica como os promotores, os acentuadores e os terminadores, e podem ser incluídas seqüências imuno-estimulatórias com função adjuvante.⁵⁹

A vacina de DNA demonstrou estimular a imunidade inata e humoral, e poder produzir respostas celulares eficazes mesmo na ausência de adjuvantes (tabela 4), sendo capaz de induzir excelente memória imune.⁵¹ Contudo, a dificuldade de reproduzir resultados tão promissores do modelo murino em primatas e humanos não permite o estabelecimento preciso dos fatores que determinam a eficácia em humanos para a vacina com plasmídeos de DNA.³⁷

Em experimentos com plasmídeos de DNA contendo genes que codificam as proteínas do *T. cruzi* cruzipaina,⁵⁷ o antígeno de superfície de tripomastigotas-1 (TSA-1),¹⁷ a ASP-2⁴⁰ produziram imunidade parcial, sem, entretanto produzir imunidade estéril. Da mesma forma, nenhum experimento com vacinas de DNA contra a doença de Chagas mostrou produzir imunidade total.

A proteção comparada da vacinação com plasmídeo de DNA, ou com proteína recombinante ou pelos dois métodos conjuntamente, com o plasmídeo de DNA seguido de proteína recombinante, não mostrou diferenças significativas na sobrevivência dos animais após infecção por *T. cruzi*, apesar da vacinação de DNA seguida por proteína recombinante ter aumentado a proteção em outras patologias.⁶⁰

Tabela 4 - Antígenos candidatos à vacina contra *Trypanosoma cruzi*

Antígeno	Adjuvante utilizado	Resposta imune	Sobrevivência % (dpi*)	Ref.
<i>Vacina protéica</i>				
Gp90	Saponina	Ab	60 (100) [§]	[104]
Gp56	Adjuvante de Freund	Ab	40 (12)	[105]
Gp82	Alúmen	Ab, citocina Th1	Não detectada [§]	[106]
PFR-1, PFR2 [†]	Alúmen, IL-12,	Ab, citocina Th1, CTL	100 (30-60) [§]	[107-109]
CRP	Adjuvante de Freund	Ab, citocina Th1	10 (40) [#]	[110]
TC52	Alúmen, <i>Bordetella pertussis</i>	Ab, célula T	62 (120) [§]	[111]
Cruzipaina [†]	IL-12, CpGODN	Ab, IgA, Ab, citocina Th1	67-82 (60-100) [§]	[112-114]
<i>Vacina de DNA</i>				
TS [†]		Ab, citocina Th1	100 (50) ^{§,**}	[115]
KMP11	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1	50 (70) [§]	[116]
TSA-1 [†]		Ab, citocina Th1, CTL	60 (140) [¶]	[82,117]
CRP		Lytic Ab, citocina Th1	100 (40) [§]	[110]
Cruzipaina ASP-1 [†]	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1, CTL	Não detectada <60 (140) [¶]	[118] [82]
ASP-2 [†]	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1, CTL	80 (140) ^{§,**}	[82]
TSSA [†]	IL-12, RANK-L	Ab, citocina Th1	80-100 (40) [§]	[119,120]
ASP-clone 9		Ab, citocina Th1	100 (60) [§]	[96]
Proteína formadora de poro LYT1	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1, CTL	80 (75)	[94]
FCaBP	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1, CTL	0 (75)	[94]
TCβ3	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1, CTL	0 (75)	[94]
Biblioteca genômica de <i>T. cruzi</i>		Ab		[121]
ASP-1 + ASP-2 + TSA-1	IL-12 + GM-CSF	Ab, citocina Th1	83 (140) [§]	[82]
Membros da família TS			75 (75)	[94]

Membros da família das mucinas	25 (75)	[94]
Imunoterapêutica (vacina de DNA)		
TSA-1 [†]	70 (45) ^{§,**}	[122]
TC24 [†]	100 (45) ^{§,**}	[122]

* A sobrevivência dos animais experimentais foi observada por n dias após a infecção.

[†] Estes antígenos demonstraram prover vários graus de proteção em diferentes linhagens de camundongos.

Uma vez infectados, animais imunizados exibiram muito baixa ($\leq 10\%$)[§], moderada ($\sim 50\%$)[¶] ou similar[#] parasitemia como detectada nos animais não imunizados e infectados (dados apresentados são do modelo animal que exibiu a melhor proteção). ^{**} Imunização com esses antígenos demonstraram decair a severidade da doença crônica, avaliado por análise histopatológica da biópsia de tecido cardíaco.

Ab: Resposta humoral do anticorpo; ASP: Proteína de superfície de amastigotas; CTL: Atividade citotóxica do linfócito T; CpGODN: Oligonucleotídeo CpG; CRP: Proteína regulatória complementar; dpi: dias após a infecção; FaCaBp: Proteína ligadora de Ca²⁺ flagelar; GM-CSF: Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago; Gp: Glicoproteína; HSP70: Proteína de choque térmico 70; IL: Interleucina; RANK-L: Receptor ativador da ligação NF- κ B; Ig: Imunoglobulina; KMP: Antígeno da membrana do cinetoplasto; PFR: Proteína rod paraflagelar; TC: Tiol transferase; TCb3: Homólogo da subunidade b-3 do complexo da adaptina AP-3; Th1: Tipo de linfócito T-helper; TS: Trans-sialidase; TSA: Antígeno de superfície de tripomastigotas; TSSA: Antígeno de superfície TS.

Fonte: Garg e Bhatia,³ 2005

Os conhecimentos atuais acerca da vacina de DNA equilibram potenciais vantagens e danos. Entre as vantagens já conhecidas estão a produção mais barata em larga escala, a fácil manutenção do controle de qualidade, e a dispensa de refrigeração, que favorecem sua futura implementação para as doenças negligenciadas.⁵⁹ Contudo, os riscos de induzir a entrada de material genético heterólogo são desconhecidos em humanos.

A integração do DNA plasmidial em cromossomos de células somáticas do hospedeiro, fenômeno conhecido por mutagênese de inserção, poderia ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumor, precipitando o desenvolvimento de células cancerosas. A recombinação homóloga é um evento menos freqüente que também pode inserir o DNA plasmidial no genoma celular e potencialmente causar câncer. Esses riscos são reduzidos pelas técnicas aplicadas na construção dos plasmídeos, entretanto, apenas testes clínicos de longa duração com voluntários permitirão mensurar o potencial oncogênico das vacinas de DNA em humanos.⁵⁹

Bhatia e colaboradores³⁹ recentemente empregaram a informática associada à estratégia experimental para identificação de antígenos altamente conservados em diversas cepas clinicamente relevantes do *T. cruzi* e que estão presentes em múltiplos estágios do parasito. Tal estratégia primeiramente seleciona no genoma conhecido do parasito, genes codificadores de proteínas para o estudo experimental posterior, sendo assim denominada vacinologia reversa. Os resultados alcançados validam a aplicação da bioinformática na

avaliação genômica e identificação de proteínas associadas à membrana do parasito que são candidatas potenciais a vacina.

Esforços futuros são necessários na identificação de sistemas de vacinação eficientes, adjuvantes e regimes de vacinação para aumentar as respostas protetoras a já conhecidos candidatos vacinais. Dada a complexidade do genoma do parasito, os vários estágios do ciclo evolutivo no hospedeiro, e as variações das cepas, é essencial que se empregue esforços na escolha de candidatos apropriados a vacinas.³⁹

Tantas intervenções variáveis podem gerar certo grau de ceticismo para o eventual desenvolvimento e produção de uma vacina contra doença de Chagas. Entretanto alguns desses problemas podem ser mais acadêmicos que práticos e não necessariamente precisam ser resolvidos antes que uma vacina efetiva seja alcançada.² Ironicamente, há menos conhecimento acerca do genoma e proteoma do *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose e do *Ancylostoma duodenale* causador da ancilostomose, em que há estudos clínicos da vacina em humanos em andamento, do que para a maioria das outras infecções em que nenhum estudo humano está em andamento, como a doença de Chagas, demonstrando que o conhecimento técnico não é o fator limitante.¹²

O desenvolvimento de uma vacina profilática eficaz apresenta muitos desafios, e o progresso é lento, apesar dos vários anos de esforços. Contudo, dada a habilidade do parasito em evadir-se do reconhecimento imune e sobreviver por longo tempo em hospedeiros imunocompetentes, Garg e Bhatia³ concluem que é improvável que vacinas contra o *T. cruzi* sejam eficientes em prevenir a infecção ou oferecer imunidade estéril. Entretanto, vacinas capazes de reduzir a parasitemia poderão ser eficientes em eliminar a ativação imune persistente mediada pelo parasito e diminuir a lesão tissular, e assim evitar a progressão ou reduzir a severidade da doença crônica.

5 CONCLUSÃO

Todos os antígenos definidos testados até então, individualmente ou em combinação, com ou sem adjuvantes, falharam em produzir imunidade estéril contra a infecção pelo *T. cruzi* em 100% dos animais vacinados.

Certo grau de proteção através de vacinação avaliado pelo aumento da média da sobrevivência e atenuação na fase aguda da doença de Chagas foi alcançado na maioria dos experimentos. Contudo, os protocolos utilizados nestes estudos não foram padronizados e desta forma limitam a comparação de resultados entre os diferentes estudos experimentais.

O conhecimento acerca da resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* envolvida na proteção parcial de animais avançaram com as pesquisas, assim como a tecnologia disponível para o desenvolvimento da vacina cresceu a cada década, ampliando as possibilidades de imunização e controle da resposta protetora.

A proteção documentada nos experimentos atuais, assim como a dificuldade de padronização dos métodos guarda grande semelhança com os resultados revisados por Brener há mais de 2 décadas, sugerindo que não houve melhora na estimulação da resposta protetora.

Este resultado sugere duas hipóteses, a saber: a resposta protetora não se tornou possível porque ainda não foi desenvolvido um modelo adequado de estudo para imunidade na doença de Chagas, ou a elicitação de uma imunidade protetora não será desenvolvida por limitações da relação entre a imunidade do hospedeiro e os mecanismos de evasão imune do parasito.

REFERÊNCIAS

1. Chagas C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909.
2. Brener Z, Camargo EP. Perspectives of vaccination in Chagas' disease. Scripta Varia Academiae Vaticanum. 1982.
3. Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Rev Vaccines. 2005 Dec;4(6):867-80.
4. Chagas' disease: potential for immunoprophylaxis. Lancet. 1980 Mar 1;1(8166):466.
5. Brener Z. Why vaccines do not work in Chagas disease. Parasitol Today. 1986 Jul;2(7):196-7.
6. Segura EL, Cardoni RL, Bua J, Rottenberg ME, Bontempi EJ, Esteva MI, et al. Molecular and immunologic bases for the development of a vaccine against Chagas disease. Medicina (B Aires). 1989;49(3):203-9.
7. Demo P. Metodologia do Conhecimento Científico. São Paulo: Atlas; 2000.
8. Gil AC. Métodos e Técnicas de Pesquisa Social. 5ª ed. São Paulo: Atlas; 1999.
9. World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Geneva, Switzerland. 2002.
10. Miles MA. American Trypanosomiasis (Chagas disease) In: Cook GC, Zumla A, editors. Manson's Tropical diseases. 21 ed. London: Saunders; 2003.
11. Schmuñis GA. A tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: Brener Z AZ, Barral-Neto M., editor. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
12. Hotez PJ, Ferris MT. The antipoverty vaccines. Vaccine. 2006 Jul 26;24(31-32):5787-99.
13. World Health Organization [homepage na Internet] Geneva. [acesso em 2006 May 19] Chagas Disponível em: <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>. [cited; Available from:
14. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Jul;98(5):577-91.
15. Dias J, Schofield C. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:103-21.
16. Souza Wd. O Parasito e sua Interação com os Hospedeiros. In: Brener Z AZ, Barral-Neto M, editor. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
17. Wizel B, Garg N, Tarleton RL. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5073-81.
18. Silveira JFd. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z AZ, Barral-Neto M, editor. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
19. Miles MA, Cedillos RA, Povia MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet. 1981 Jun 20;1(8234):1338-40.
20. Miles MA LS, Povia M 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* in their evaluation for strain identification. Trans R Soc Trop Med Hyg 74: 221-237.
21. Andrade SG CM, Figueira RM 1970. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Gaz Méd Bahia 70: 32-42.

22. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:429-32.
23. Di Noia JM BC, De Marchi CR, et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. J Exp Med 2002;195:401-13.
24. Westenberger SJ SN, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. Int J Parasitol. 2006;36:337-46.
25. Sherlock IA. Vetores. In: Brener Z AZ, Barral-Neto M., editor. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
26. World Health Organization. Control of Chagas' disease: WHO expert committee. Geneva, Switzerland. 1991.
27. World Health Organization [homepage na internet] Geneva. [acesso em 2006 May 05] Chagas Disponível em: <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>.
28. Villar JC, Villar LA, Marin-Neto JA, Ebrahim S, Yusuf S. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2006.
29. Reyes PA, Vallejo M. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection) (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2006.
30. Fábio Vilas-Boas GSF, M B P Soares, A Mota, J A Pinho-Filho et al. Resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Ago 2006;87(2):159-66.
31. World Health Organization [homepage na internet] Geneva. [acesso em 2006 Nov 08] The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/index.html>.
32. Rodriguez-Morales AJ. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005;22(2):123-32.
33. Akhavan D. Análise de custo-efetividade da doença de Chagas no Brasil: relatório final Brasília Organização Pan-Americana da Saúde; 1998.
34. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Jul;97(5):603-12.
35. Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol Rev. 2004 Oct;201:304-17.
36. Tarleton RL. New approaches in vaccine development for parasitic infections. Cell Microbiol. 2005 Oct;7(10):1379-86.
37. Abbas AK, H LA. Cellular and molecular immunology. 5 ed. Filadélfia, Pensilvânia: Saunders; 2003.
38. JONES EM CD, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES CL, McCURLEY TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am J Trop Méd Hyg. 1993;48(3):348-57.
39. Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. Infect Immun. 2004 Nov;72(11):6245-54.
40. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. Infect Immun. 2006 Apr;74(4):2477-81.
41. Araujo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Penido ML, et al. CD8+-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible

- mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun.* 2005 Sep;73(9):6017-25.
42. Szarfman A, Schmunis GA, Vattuone NH, Yanovsky JF, Cossio PM, Arana RM. Protection against challenge of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed Parasitol.* 1977 Sep;28(3):333-41.
 43. Araujo-Jorge TC. Biology and ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-year old challenge for scientists. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:131-4.
 44. Minoprio P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):588-91.
 45. Frascch AC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 2000 Jul;16(7):282-6.
 46. Ada GC. Vaccines and the challenge of parasitic infections. In: Warren KS, editor. *Immunology and molecular biology of parasite infection.* 3 ed. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1993.
 47. Kierszenbaum F. Immunization against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: inherent difficulties of a uniform comparative evaluation of antigenic preparations. *Tropenmed Parasitol.* 1979 Sep;30(3):287-8.
 48. Kierszenbaum F, Budzko DB. Immunization against experimental Chagas' disease by using culture forms of *Trypanosoma cruzi* killed with a solution of sodium perchlorate. *Infect Immun.* 1975 Sep;12(3):461-5.
 49. Menezes H. Immunization of human beings with a live avirulent strain of *Trypanosoma cruzi* (preliminary report). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1971 Mar-Apr;13(2):144-54.
 50. Wrightsman RA, Miller MJ, Saborio JL, Manning JE. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 1995 Jan;63(1):122-5.
 51. Plotkin SA. Vaccines, vaccination, and vaccinology. *J Infect Dis.* 2003 May 1;187(9):1349-59.
 52. Menezes H. I. The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1970 Jan-Feb;12(1):64-8.
 53. Menezes H. Histological lesions in vaccinated mice with nonvirulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Med.* 1968 Mar;25(3):160-5.
 54. Menezes H. Vaccination with live, non-virulent *Trypanosoma cruzi* vaccine in man. A 5-year follow up study the 1st 2 cases. *AMB Rev Assoc Med Bras.* 1976 Jul;22(7):252-2.
 55. Basombrio MA, Besuschio S. *Trypanosoma cruzi* culture used as vaccine to prevent chronic Chagas' disease in mice. *Infect Immun.* 1982 Apr;36(1):351-6.
 56. Ruiz AM, Esteva M, Riarte A, Subias E, Segura EL. Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol Lett.* 1986 Jan;12(1):1-4.
 57. Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss R, 3rd, Hoft DF. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5065-74.
 58. Zuniga C, Palau T, Penin P, Gamallo C, de Diego JA. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health.* 1997 May;2(5):482-7.
 59. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento [homepage na internet] Brasil [acesso em 2006 Fev 06] Vacinas de DNA disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/biochat/viewchat.asp?id=9&data=13/10/2003> Biochat realizado em 2003 Oct 13. coord. Vasco Azevedo.
 60. Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Claser C, Machado AM, Gazzinelli RT, et al. Protective immunity against *trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse

strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther.* 2004 Sep;15(9):878-86.

NORMAS ADOTADAS

Este trabalho foi realizado seguindo a normatização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, em 17 de novembro de 2005.