

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DUAS FORMAS QUIMÉRICAS  
DAS PROTEÍNAS Sm29 E SmTSP-2 DO *SCHISTOSOMA MANSONI* E  
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

ANA PAULA DIAS RIBEIRO

ORIENTADOR: DR. SÉRGIO COSTA OLIVEIRA

CO-ORIENTADORA: DRA. CARINA DA SILVA PINHEIRO

BELO HORIZONTE

MARÇO - 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PAULA DIAS RIBEIRO

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DUAS FORMAS QUIMÉRICAS  
DAS PROTEÍNAS Sm29 E SmTSP-2 DO *SCHISTOSOMA MANSONI* E  
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Minas  
Gerais pelo Programa de Pós-Graduação em  
Genética como requisito parcial para obtenção  
do título de mestre.

Área de concentração: Genética Molecular, de  
Microorganismos e Biotecnologia

Orientador: Dr. Sérgio Costa Oliveira

Co-orientadora: Dra. Carina da Silva Pinheiro

Belo Horizonte

2010

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ser sempre o meu caminho. É Ele que me dá a coragem para sempre concluir as etapas da minha vida e que coloca tantas oportunidades e pessoas em meu caminho, às quais também agradeço:

Ao meu orientador, Dr. Sérgio Costa, e à minha co-orientadora, Dra. Carina Pinheiro, por terem compartilhado seus vastos conhecimentos e experiências e pela confiança depositada em mim.

Aos colegas do LIDI, pela paciência, companheirismo e ajuda (esta última, essencial para a conclusão deste trabalho). Agradeço também pelos momentos de descontração e solidariedade.

À Peu e a Ilma, pelos trabalhos prestados sempre muito importantes para a realização das nossas atividades.

À Sandra, pelo esforço, paciência e dedicação.

Aos colegas e profissionais do Programa de Pós Graduação em Genética, por proporcionarem oportunidades aos alunos e pelos esforços em fazer este curso cada vez melhor.

Aos meus parentes e amigos, por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus pais, Afonso e Diana, e à minha irmã, Larissa, por serem conforto e inspiração para mim. Agradeço os esforços constantes investidos em minha educação e pela cumplicidade.

E ao meu marido, Leonardo, por ser também meu ânimo e a minha alegria. Obrigada pela compreensão e pela força que sempre me deu para que eu finalizasse mais esta etapa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 <i>A esquistossomose no mundo.....</i>	12
1.2 <i>O parasita Schistosoma e seu ciclo.....</i>	14
1.3 <i>Aspectos patológicos e imunológicos da esquistossomose.....</i>	16
1.4 <i>Tratamento e controle.....</i>	22
1.5 <i>Estudos do genoma e do transcriptoma de Schistosoma mansoni.....</i>	24
1.6 <i>Atualidades no desenvolvimento de vacinas anti-esquistossomóticas.....</i>	26
1.6.1 <i>O tegumento de Schistosoma mansoni como alvo do desenvolvimento de vacinas</i>	
30	
1.7 <i>Justificativa.....</i>	37
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	38
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	39
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
3.1 <i>Camundongos e cercárias.....</i>	39
3.2 <i>População estudada.....</i>	40
3.3 <i>Expressão e purificação das quimeras A e B de Sm29/SmTSP-2.....</i>	41
3.4 <i>Western blot das quimeras purificadas.....</i>	43
3.5 <i>Imunização dos camundongos.....</i>	44
3.6 <i>Infecção desafio e recuperação de vermes.....</i>	45
3.7 <i>Dosagem de anticorpos em soros de camundongos.....</i>	45

3.8 Dosagem de IgG total em soros de humanos.....	46
3.9 Análises estatísticas.....	47
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 Expressão e purificação das quimeras.....	48
4.2 Resposta humoral em camundongos.....	49
4.3 Resposta humoral em pacientes residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose.....	55
4.4 Imunidade protetora, avaliada por redução do número de vermes totais, induzida pela imunização com as quimeras em modelo murino.....	56
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Distribuição global da esquistossomose .....	
<b>FIGURA 2:</b> Distribuição da esquistossomose no Brasil .....	
<b>FIGURA 3:</b> Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>S. haematobium</i> .....	
<b>FIGURA 4:</b> Desenvolvimento da resposta imune no decorrer da infecção .....	13
<b>FIGURA 5:</b> Os estágios consecutivos na rota de controle em direção à eliminação da esquistossomose .....	14 16
<b>FIGURA 6:</b> Representação diagramática do tegumento do <i>Schistosoma</i> e a localização proposta de proteínas identificadas .....	20 23
<b>FIGURA 7:</b> Porções N- e C-terminais da Sm29 usadas na construção das quimeras A e B .....	32
<b>FIGURA 8:</b> Representação esquemática da estratégia de imunização dos camundongos .....	42
<b>FIGURA 9:</b> Painel A: Gel SDS-PAGE a 12% corado com coomassie blue; Painel B: análise de <i>western blot</i> das quimeras A e B .....	45
<b>FIGURA 10:</b> Cinética da resposta de IgG específica para Sm29 detectada em soros de camundongos imunizados .....	49 50
<b>FIGURA 11:</b> Cinética das respostas de IgG1 e IgG2a específicas para Sm29 detectadas em soros de camundongos imunizados .....	51
<b>FIGURA 12:</b> Perfil da resposta de IgG anti-Sm29, SmTSP-2 e as quimeras A e B em soros de pacientes esquistossomóticos .....	54

## LISTA DE TABELAS

1 - Proteção induzida pela imunização de camundongos com antígenos do tegumento do <i>Schistosoma mansoni</i> .....		
2 - População estudada .....		
3 - Grupos de imunização .....	de	36
		40
4 - Avaliação do perfil IgG1/IgG2a induzido pelas imunizações com as quimeras A e B .....		44
		53
5 - Níveis de proteção induzidos pela imunização de camundongos C57BL/6 com antígenos Sm29-MBP, SmTSP-2, Quimera A e Quimera B formulados com CpG-Alum .....		56



**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpo

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphatase

CFA: adjuvante completo de Freund

C-terminal: carboxi-terminal

DALY: anos de vida ajustados por invalidez

DO: densidade ótica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EST: etiqueta de sequência expressa

FPLC: *fast protein liquid chromatography*

GABA: ácido gama-amino butírico

HLA: antígeno leucocitário humano

IFA: adjuvante incompleto de Freund

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

INF- $\gamma$ : interferon-gama

INF: indivíduo infectado por esquistossomose

IPTG: Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

MAP: peptídeo multiantigênico

MBP: proteína de ligação a maltose

MEG: genes contendo micro-éxons (micro-exon genes)

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

NBT: nitroblue tetrazolium

N-glicosilação: nitrogênio-glicosilação

NI: indivíduo não infectado por esquistossomose

NR: indivíduo naturalmente resistente à esquistossomose

N-terminal: amino-terminal

O-glicosilação: oxigênio-glicosilação

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPD: o-phenylenediamine

PBMC: células mononucleares do sangue periférico

PBS: *phosphate-buffered saline*

PBST: PBS + Tween 20

RR: indivíduo resistente à reinfecção por esquistossomose

SR: indivíduo susceptível à reinfecção por esquistossomose

Th: linfócito T *helper* (ou auxiliar)

TNF: fator de necrose tumoral

UTR: região não traduzida

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, e afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, o *Schistosoma mansoni* é a espécie endêmica, sendo responsável por 7 milhões de casos dentre as 35 milhões de pessoas em risco de infecção. O tratamento estabelecido com praziquantel, apesar de eficaz, enfrenta limitações, como reinfecção de indivíduos tratados e casos de baixa eficiência do medicamento. Dentre os estudos realizados para o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica, os mais promissores até o momento foram os realizados com as proteínas recombinantes Sm29 e SmTSP-2. Neste trabalho foi realizada a expressão e purificação de quimeras destas duas proteínas, resultando nas quimeras A e B, a fim de avaliar o papel protetor das porções N- e C-terminais da proteína Sm29 quando fusionadas à proteína SmTSP-2, em modelo murino; assim como a avaliação da resposta imune humoral em pacientes com esquistossomose. As quimeras foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas em sistema FPLC, e depois usadas em experimento de imunização e proteção em camundongos C57BL/6. A Quimera B (fusão da porção C-terminal da Sm29 com SmTSP-2) apresentou a maior proteção (34,8%) em modelo murino após infecção desafio, quando comparada com a Quimera A que induziu 27,8% de proteção. Foi observada a produção de altos níveis de IgG, IgG1 e IgG2a, em camundongos, para ambas as porções de Sm29 nas quimeras, porém a porção C-terminal (Quimera B) foi a que induziu produção dos maiores níveis de IgG e IgG2a. No estudo em humanos moradores de áreas endêmicas, foi observado o maior reconhecimento da Quimera B em todos os grupos estudados. Na avaliação entre resistência e susceptibilidade dos pacientes-alvos do estudo, o reconhecimento específico de IgG anti-Quimera B foi significativamente maior na comparação entre indivíduos resistentes à reinfecção *versus* susceptíveis à reinfecção. De acordo com estes dados, conclui-se que a Quimera B foi mais antigênica do que a Quimera A e induziu níveis mais elevados de proteção em modelo murino.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by helminths from the genus *Schistosoma* that affects more than 200 million people worldwide. In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the endemic species, responsible for 7 million cases between 35 million people at risk of infection. Established treatment with praziquantel, although effective, faces some limitations such as reinfection after chemotherapy and reduction on drug efficacy. Many studies focusing on the development of an anti-schistosome vaccine have been performed. Among these studies, the most promising proteins described are Sm29 and SmTSP-2. In this study, we have expressed and purified in *Escherichia coli* chimeras of these proteins, termed here chimeras A and B to evaluate the protection role of N- and C-terminus of Sm29 when fused to SmTSP-2. So, the chimeras were purified in FPLC, and then, used for vaccination and protection studies using C57BL/6 mice and for evaluation of humoral responses in schistosomiasis patients living in endemic areas. Chimera B (C-terminus Sm29 fused to SmTSP-2) showed the highest protection level (34,8%) in mice after challenge infection when compared to chimera A (27,8%). It was observed a high level of IgG, IgG1 and IgG2a production in mice against both Sm29 portions (N- or C-terminus) contained in the chimeras A and B. However, C-terminus Sm29 (within chimera B) was the one which induced the higher level of IgG and IgG2a compared to chimera A. Further, studies with sera from patients resident in schistosomiasis endemic areas revealed greater recognition of chimera B in all groups. Evaluating resistant *versus* susceptible groups of individuals, specific human IgG recognition of chimera B was significantly higher in patients resistant compared to susceptible individuals. Based on these data, we concluded that chimera B is a better antigen than chimera A and it was able to induce higher protection level in mice.

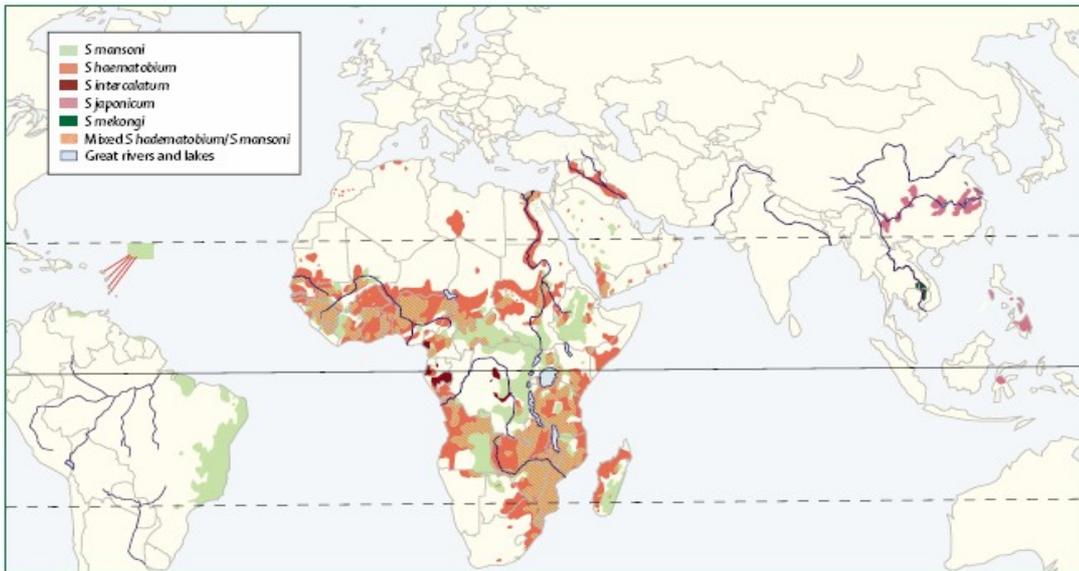
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A esquistossomose no mundo

A esquistossomose humana é uma doença que afeta mais de 200 milhões de pessoas e cerca de 779 milhões vivem em risco de infecção em 76 países em desenvolvimento (CHITSULO e cols., 2000; STEINMANN e cols., 2006). Dentre os infectados, 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões apresentam as formas severas da doença (CHITSULO e cols., 2000; ENGELS e cols., 2002).

Apenas na África concentram-se 85% das pessoas infectadas em todo o mundo (CHITSULO e cols., 2000). Dados da estimativa de mortalidade na África subsaariana revelam que há 280.000 mortes por ano, sendo 150.000 mortes causadas por falha renal e 130.000 por hematómese (VAN DER WERF e cols., 2003).

Há cinco espécies causadoras da esquistossomose humana: *Schistosoma haematobium* (endêmica em 53 países na África e Oriente Médio), *S. mansoni* (endêmica em 54 países na América Latina, Caribe, África e Oriente Médio), *S. intercalatum* (endêmica em 10 países da África central), *S. japonicum* (endêmica na China, Indonésia, Camboja e Filipinas, sendo relatados casos em Laos e Tailândia) e *S. mekongi* (endêmica em Laos e Camboja) (BRUUN e AAGAARD-HANSEN, 2008; CHITSULO e cols., 2000). A Figura 1 mostra a distribuição geográfica da esquistossomose no mundo.

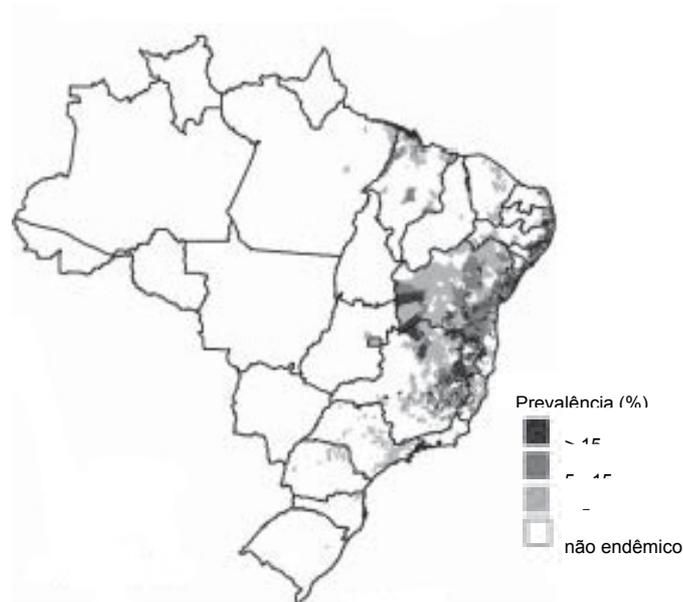


**FIGURA 1:** Distribuição global da esquistossomose (GRYSEELS e cols., 2006).

A esquistossomose está entre as doenças tropicais negligenciadas mais importantes da atualidade. Tais doenças se caracterizam por sua alta endemicidade em zonas rurais e áreas urbanas mais empobrecidas, possui uma capacidade de prejudicar o crescimento, o desenvolvimento intelectual, a educação em crianças e a produtividade dos trabalhadores, sendo estas condições favorecedoras da pobreza (HOTEZ e cols., 2006). Por afetarem a classe mais pobre da população, há pouco investimento no desenvolvimento de medicamentos e vacinas para estas doenças (HOTEZ e cols., 2006). As doenças tropicais negligenciadas causam grande morbidade no mundo, sendo a esquistossomose responsável pela perda de 4,5 milhões de anos de vida ajustados por invalidez precoce (DALY) (dados estimados em 1990), como consequência da patologia causada pela esquistossomose (WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF SCHISTOSOMIASIS., 2002).

A espécie *Schistosoma mansoni*, endêmica em 54 países, é responsável por mais de 70 milhões de casos. Esta também é a espécie endêmica no Brasil, totalizando 7 milhões de casos dentre as 35 milhões de pessoas em risco de infecção (CHITSULO e cols., 2000). A transmissão da esquistossomose no Brasil provavelmente começou com o tráfico de escravos africanos logo após o descobrimento do país, e sua disseminação do litoral para o

interior se deu com o fluxo migratório. Atualmente, a esquistossomose ocorre em grande área endêmica do Brasil (Figura 2), que vai desde o Maranhão até Minas Gerais, com focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COURA e AMARAL, 2004). A média da prevalência estimada para esta doença, em 2002, foi de 5,43% (COURA e AMARAL, 2004).



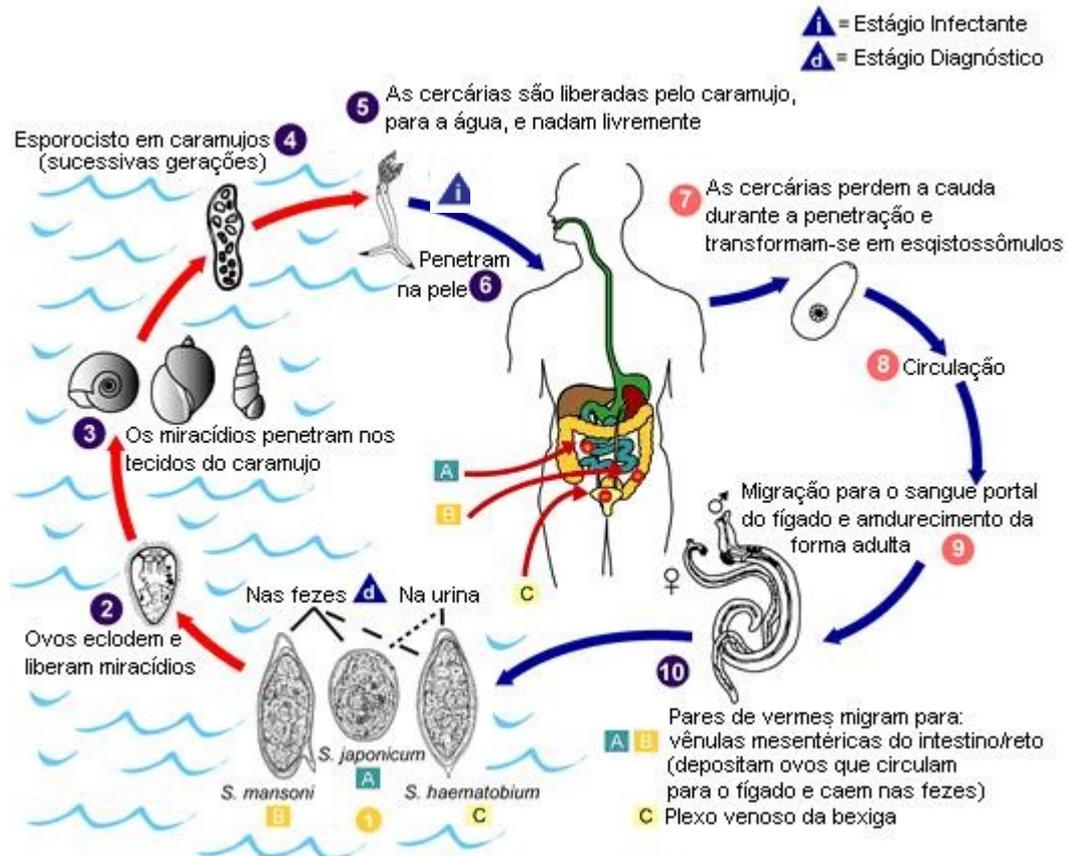
**FIGURA 2:** Distribuição da esquistossomose no Brasil (COURA e AMARAL, 2004) – modificado.

## 1.2 O parasita *Schistosoma* e seu ciclo

Os helmintos do gênero *Schistosoma* são vermes que atingem de 7 a 20 mm de comprimento na fase adulta, possuem corpo cilíndrico com duas ventosas terminais, um tegumento complexo e órgãos reprodutores. Diferentemente de outros trematódeos, estes vermes são dióicos, ou seja, possuem sexos separados. O macho apresenta um canal ginecóforo onde a fêmea se aloja. Estes vivem em plexos venosos do trato genitourinário,

causando a esquistossomose urinária (*S. haematobium*) ou em veias mesentéricas, causando a esquistossomose intestinal e hepática (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*), onde se alimentam de sangue e globulinas. As fêmeas adultas, que são maiores e mais finas que os machos, produzem centenas a milhares de ovos por dia, variando de acordo com a espécie (GRYSEELS e cols., 2006; MCMANUS e LOUKAS, 2008).

Os ovos liberados pelos vermes adultos secretam enzimas proteolíticas que auxiliam na sua migração para o lúmen da bexiga (*S. haematobium*) ou do intestino (outras espécies), e quando excretados e em contato com água, eclodem liberando miracídios (Figura 3). Esta forma larval do verme infecta caramujos do gênero *Biomphalaria* (*S. mansoni*), *Bulinus* (*S. haematobium* e *S. intercalatum*), *Oncomelania* (*S. japonicum*) ou *Neotricula* (*S. mekongi*), onde se multiplicam em esporocistos multicelulares assexuados e depois maturam até a forma larval chamada cercária, na qual adquirem uma característica cauda bifurcada. As cercárias são liberadas pelos caramujos em meio aquático 4 a 6 semanas após a infecção permanecendo viáveis por até 72 horas e utilizam um conjunto de enzimas proteolíticas que auxiliam a penetração do parasita na pele do hospedeiro mamífero. Nesse processo de penetração as cercárias perdem a cauda, alcançam capilares sanguíneos e vão em direção aos pulmões, onde se transformam em esquistossômulos. Estes, por sua vez, migram para as veias do sistema porta, onde se maturam e copulam, e seguem para sua posição final, onde também se inicia a ovoposição no plexo mesentérico ou perivesicular. Entretanto, mais de 50% dos ovos não conseguem deixar os tecidos do hospedeiro. A patologia da doença se deve principalmente à resposta imune do hospedeiro contra antígenos dos ovos, que são isolados dos tecidos do hospedeiro por reações imuno-teciduals, formando os chamados granulomas. O tempo desde a infecção humana até a ovoposição é de 4 a 6 semanas e os vermes adultos vivem em média 2 a 5 anos, podendo chegar a até 30 anos (BRUUN e AAGAARD-HANSEN, 2008; GRYSEELS e cols., 2006; MCMANUS e LOUKAS, 2008).



**FIGURA 3:** Ciclo de vida de *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (MCMANUS e LOUKAS, 2008) – modificado.

### 1.3 Aspectos patológicos e imunológicos da esquistossomose

Do ponto de vista clínico, existem duas fases da esquistossomose no hospedeiro: a fase aguda e a fase crônica.

As manifestações clínicas da fase aguda muitas vezes não são perceptíveis e, se existentes, são caracterizadas pela dermatite cercariana e pela síndrome de Katayama. A penetração percutânea das cercárias pode causar urticárias dentro de poucas horas e persistir durante dias como lesões maculopapulosas, e é mais comum numa infecção

primária (BOTTIEAU e cols., 2006; BURKE e cols., 2009; ROSS e cols., 2007). Já a síndrome de Katayama é uma reação de hipersensibilidade sistêmica à migração dos esquistossômulos e à precoce deposição de ovos, ocorrendo dentro de poucas semanas a meses após a infecção. A manifestação aguda causada pela infecção por *S. mansoni* e *S. haematobium* é mais comum em indivíduos expostos pela primeira vez e rara em populações endêmicas, o que não é verdade para a esquistossomose causada por *S. japonicum*, que é comum em áreas endêmicas (ROSS e cols., 2007). A síndrome de Katayama é caracterizada por um início súbito de febre, fadiga, mialgia, mal-estar, eosinofilia entre outros sintomas. Também podem aparecer sintomas abdominais decorrentes da migração e posicionamento dos vermes jovens (BURKE e cols., 2009; ROSS e cols., 2007).

A fase crônica da doença é variável e depende da localização dos vermes adultos, apesar de suas manifestações estarem relacionadas aos ovos que ficam presos nos tecidos. Isto porque as enzimas proteolíticas secretadas pelos ovos causam reações granulomatosas, que se iniciam numa tentativa de conter os ovos, e estas reações progressivamente serão substituídas por fibras de colágeno (GRYSEELS e cols., 2006). Os vermes adultos do *S. mansoni*, alvo deste trabalho, localizam-se habitualmente nas vênulas da parede do reto, do sigmóide, do intestino e do fígado humano. O fígado é o principal foco de acúmulo dos ovos liberados pelas fêmeas adultas, pois mesmo que estes sejam liberados pelas fêmeas nos vasos do intestino, são carreados pelo fluxo sanguíneo até os minúsculos sinusóides hepáticos, onde é impossível a sua passagem. Aí os ovos ficam presos e elicitam reações granulomatosas, que se acumulam levando a uma progressiva fibrose nos espaços periportais, bloqueando a circulação pré-sinusoidal e conduzindo à hipertensão porta, à circulação colateral, ascite, esplenomegalia e varizes gastrointestinais (PEARCE e MACDONALD, 2002; REY, 2001). O sangramento causado pelo rompimento das varizes gastro-esofágicas é a consequência mais grave da esquistossomose hepática (REY, 2001).

A variação da morbidade na esquistossomose se deve à extensão da resposta imunológica e seus efeitos em órgãos-alvo da patologia. Dentre outros fatores, pode-se citar também: fatores genéticos do hospedeiro e do parasita, intensidade da infecção, estado de saúde do hospedeiro (existência de doenças concomitantes) e a relação parasita-hospedeiro (ABATH e cols., 2006; PEARCE e MACDONALD, 2002).

Segundo Abath e colaboradores (2006), a relação parasita-hospedeiro tende a evoluir para um estado de sobrevivência mútua, no qual o parasita dependerá do nível de dano celular e tecidual que ele causa, enquanto que o hospedeiro dependerá bastante dos mecanismos de resistência inata e da imunidade adaptativa. Portanto, parece que esta relação se desenvolveu de forma que o parasita permanecesse viável ao mesmo tempo em que se pudesse evitar uma patologia severa que resultasse na morte do hospedeiro.

No que diz respeito à resposta imune, tanto a resposta humoral quanto a resposta celular do hospedeiro tem sido associadas à proteção contra a esquistossomose.

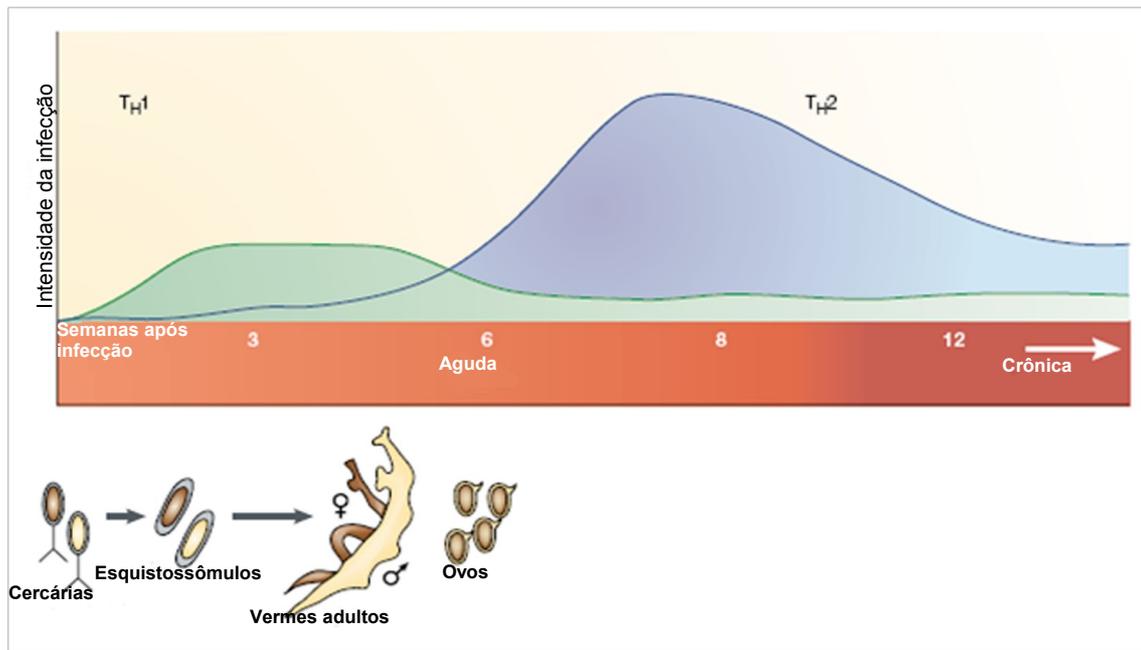
Os anticorpos produzidos durante a infecção podem desempenhar papel efetor ou regulador, dependendo do isotipo. Estudos *in vitro* demonstraram que os isotipos de imunoglobulina (Ig)G1, IgG3 e IgE são capazes de mediar a morte de esquistossômulos por um mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) e ativação de complemento, envolvendo eosinófilos, macrófagos e plaquetas (CAPRON e cols., 1975; JOSEPH e cols., 1983; KHALIFE e cols., 1989). De forma inversa, os isotipos IgM, IgG2 e IgG4 não possuem tal capacidade (BUTTERWORTH e cols., 1987; KHALIFE e cols., 1986), agindo como anticorpos bloqueadores da atividade citotóxica. Os estudos *in vivo* têm relatado uma associação entre especificidades de anticorpos em pacientes susceptíveis e resistentes à infecção e reinfecção, de forma que a resistência estaria positivamente relacionada a elevados níveis de IgE (RIHET e cols., 1991; VIANA e cols., 1995). Também foi encontrada a presença de eosinófilos em crianças resistentes à reinfecção (HAGAN e cols., 1985), sugerindo que os eosinófilos devem eliminar o parasita por citotoxicidade dependente de IgE.

A resposta humoral contra a esquistossomose varia de acordo com a idade e forma clínica da doença. Adultos são mais resistentes à infecção, apresentando um perfil de anticorpos específicos dos isotipos IgE, IgG1 e IgG3, ao passo que as crianças, mais susceptíveis à infecção, produzem preferencialmente IgM, IgG2 e IgG4 contra antígenos do parasita (BUTTERWORTH e cols., 1987). Pacientes agudos apresentam altos níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 e baixos níveis de IgM e IgG4 contra esquistossômulos, enquanto que os pacientes crônicos produzem altos níveis de IgG4 e IgM, com baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3, contra o esquistossômulo e o verme adulto (JASSIM e cols., 1987).

O envolvimento de linfócitos T tem sido relatado tanto no desenvolvimento da patologia como na proteção contra a infecção. Durante o curso da doença, as células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em Th (T helper)1 ou Th2, sendo que durante a fase aguda há uma forte resposta do tipo Th1, com alta produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células mononucleares do sistema periférico (PBMC) e baixos níveis de interleucina (IL)-10 e IL-5 (MONTENEGRO e cols., 1999). Na fase crônica, marcada pelo início da ovoposição pelas fêmeas, a resposta celular evolui para Th2 (Figura 4), na qual há uma menor produção de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-10, dentre outras citocinas (CORREA-OLIVEIRA e cols., 1989; MONTENEGRO e cols., 1999; PEARCE e MACDONALD, 2002). A resposta Th1 (caracterizada pela produção de IL-12, fator de necrose tumoral [TNF- $\alpha$ ] e IFN- $\gamma$ ) é responsável por funções citotóxicas e pró-inflamatórias, induzem hipersensibilidade do tipo tardia e possuem atividade antifibrótica, ao passo que a resposta Th2 (produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) estimula a produção de anticorpos – particularmente IgE – e aumenta a proliferação e função de eosinófilos (ABATH e cols., 2006; PEARCE e MACDONALD, 2002).

A resposta imune do tipo Th2 em humanos foi associada com resistência à reinfeção, com diversos trabalhos envolvendo a produção de IgE, tendo eosinófilos como principais células efetoras (HAGAN e cols., 1991; RIHET e cols., 1991; VIANA e cols., 1995). Por outro lado, estudos em camundongos têm indicado que respostas envolvendo a

subpopulação de células Th1 são cruciais na indução da imunidade protetora (CAPRON e cols., 1999; HOFFMANN e cols., 1998).



**FIGURA 4:** Desenvolvimento da resposta imune no decorrer da infecção (PEARCE e MACDONALD, 2002) – modificado.

Para melhor entender a imunidade protetora contra a esquistossomose, talvez o principal alvo de estudo seja aquele envolvendo indivíduos residentes em áreas endêmicas e que, apesar do contato constante com água contaminada, apresentam exame de fezes negativo para a presença de ovos de *S. mansoni*. Tais indivíduos são considerados naturalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni* e têm mostrado respostas humoral e celular distintas daquelas de pacientes infectados (VIANA e cols., 1995), com significativa proliferação de PBMCs e produção de elevados níveis de IFN- $\gamma$  em estimulações com antígenos do parasita (BAHIA-OLIVEIRA e cols., 1992; CORREA-OLIVEIRA e cols., 2000; VIANA e cols., 1994). Trabalhos realizados em modelos de vacinação com cercária irradiada sugerem que IFN- $\gamma$  deve agir ativando macrófagos, os quais eliminam os esquistossômulos no pulmão utilizando a via de destruição oxidativa (WYNN e cols., 1994).

Já os indivíduos que se tornaram resistentes após o tratamento medicamentoso (resistentes à reinfecção) apresentam um padrão de resposta celular do tipo Th2 com elevada produção de IL-5 e níveis não detectáveis de IFN- $\gamma$  (ROBERTS e cols., 1993). Além disso, foi observado nos pacientes resistentes à reinfecção um aumento dos níveis de IgE específicos para antígenos do tegumento de esquistossômulos e vermes adultos e uma redução nos títulos de IgG4 em relação aos indivíduos susceptíveis (CALDAS e cols., 2000).

Apesar da resposta Th2 ser importante para o hospedeiro durante a infecção, uma vez que este tipo de resposta previne a produção de mediadores inflamatórios prejudiciais ao hospedeiro, ela também é responsável pelo desenvolvimento de fibrose hepática e pela morbidade (DE JESUS e cols., 2004). Estudos em camundongos deficientes em IL-13, IL-4 e IL-13/IL-4 demonstraram que a incapacidade de desenvolver uma resposta Th2, reguladora da resposta pro-inflamatória observada na fase aguda, pode ser letal, como foi visto em camundongos duplo-deficientes para IL-13/IL-4. Foi demonstrado também que IL-4 é responsável pelo desenvolvimento da resposta granulomatosa, induzindo a proliferação de linfócitos produtores de citocinas Th2, enquanto que IL-13 é um agente profibrótico responsável pelo desenvolvimento da fibrose hepática observada nesta patologia (FALLON e cols., 2000).

A citocina IL-10 exerce papel regulador, evitando o desenvolvimento de uma patologia mais severa devido a respostas polarizadas (ARNAUD e cols., 2008; TEIXEIRA-CARVALHO e cols., 2008; WYNN e cols., 2004). Em um estudo utilizando camundongos deficientes para IL-10, pesquisadores demonstraram o papel regulador dessa citocina, em que os camundongos IL-10/IL-4<sup>-/-</sup> desenvolveram resposta fortemente polarizada Th1 com conseqüente morte dos animais devida à hepatotoxicidade causada, enquanto que camundongos IL-10/IL-12<sup>-/-</sup> desenvolveram forte morbidade e alta mortalidade nos estágios crônicos da doença (HOFFMANN e cols., 2000).

Como demonstrado no modelo murino da esquistossomose, a indução de respostas polarizadas Th1 ou Th2, apesar de causarem distintas lesões teciduais, podem ser prejudiciais e até letais. Desta forma, a produção dos dois tipos de resposta de uma forma

mais equilibrada deve promover a melhor proteção ao hospedeiro contra os efeitos danosos da patologia (WYNN e cols., 2004).

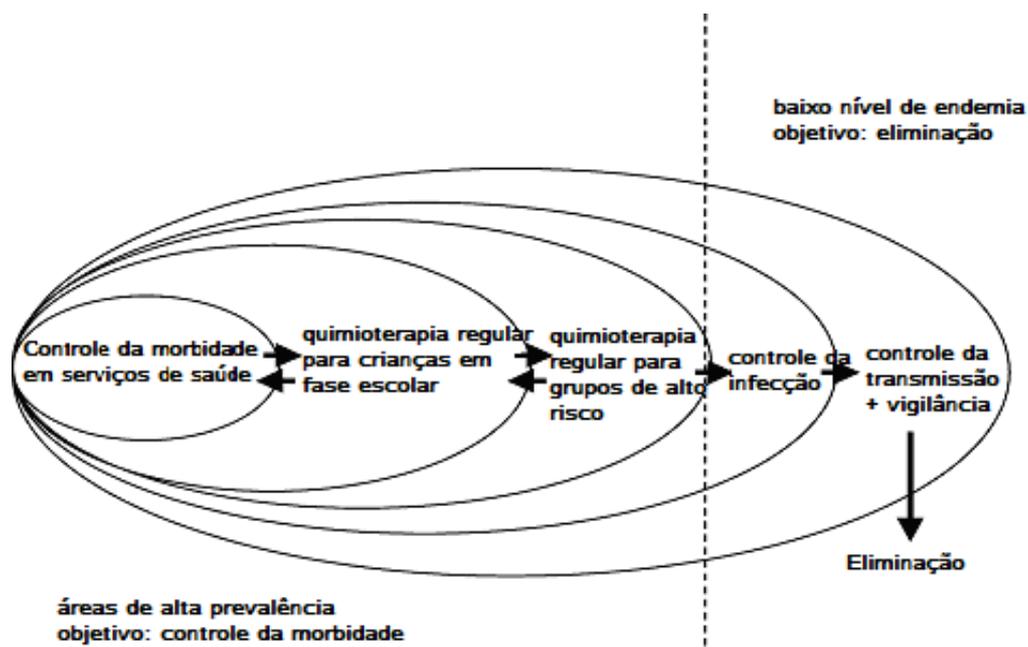
#### 1.4 Tratamento e controle

Durante muitos anos, o praziquantel tem sido o medicamento de escolha para erradicação da esquistossomose em todo o mundo (WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF SCHISTOSOMIASIS., 2002) e é eficaz na redução da intensidade e prevalência da infecção por todas as espécies de *Schistosoma*. Este medicamento é comercialmente vendido como comprimidos de 600 mg, cujo regime de tratamento recomendado é de 40 mg/kg de peso corporal em dose única. Com o término da patente deste medicamento, diversas apresentações genéricas foram disponibilizadas para comercialização a baixo custo (aproximadamente US\$ 0,70 dólares por comprimido), aumentando a perspectiva de um acesso mais generalizado ao tratamento medicamentoso. Oxamniquina é o segundo fármaco de escolha no tratamento para esquistossomose (WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF SCHISTOSOMIASIS., 2002), porém é eficiente apenas contra *S. mansoni*.

Derivados de artemisinina são efetivos apenas contra as formas imaturas do verme, e seu uso em combinação com praziquantel está sendo estudado (GRYSEELS e cols., 2006), como forma de ampliar o tratamento, já que o praziquantel é ativo apenas contra a forma madura do verme.

Desde o início da implementação do tratamento com praziquantel, esperava-se uma redução nos níveis de prevalência e, no entanto, a população infectada continuou aumentando, e até hoje muitas medidas de controle não são implementadas ou não são eficientes em muitos países (CHITSULO e cols., 2000; ENGELS e cols., 2002).

Reconhecendo os diversos perfis da infecção, Engels *et al.* (2002) sugeriram uma distinção entre estratégias de controle da morbidade e controle da transmissão, de forma que estes estágios fossem executados consecutivamente rumo à eliminação da doença (Figura 5). Desta forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) revisou a implementação das estratégias de controle, mudando do controle da transmissão para o controle da morbidade (BRUUN e AAGAARD-HANSEN, 2008). As medidas de controle da transmissão visam impedir a infecção de novos indivíduos com a adoção de ações abrangentes, tais como saneamento básico, educação sanitária e eliminação dos caramujos. No controle da morbidade, o objetivo é impedir o aparecimento de formas mais severas da esquistossomose, o que se consegue com os cuidados primários à saúde, como o uso de medicamentos.



**FIGURA 5:** Os estágios consecutivos na rota de controle rumo à eliminação da esquistossomose (ENGELS e cols., 2002) – modificado.

No entanto, as abordagens de controle tem tido algumas limitações. Casos de baixa susceptibilidade ao praziquantel já foram relatados e são alvos de extensa discussão

(CIOLI, 2000; CIOLI e cols., 1993; DOENHOFF e cols., 2002) e, junto com o aparecimento de casos de reinfecção que demandam re-tratamentos, necessitam de uma abordagem de longo prazo. Estratégias diferentes, como a utilização de vacinas que ofereçam uma proteção total ou parcial poderia ser uma boa estratégia de controle a ser usada juntamente com o tratamento medicamentoso. Para que estas estratégias sejam mais consistentes e racionais, é necessário conhecer as características biológicas do *Schistosoma* e possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas e novos medicamentos. Os estudos do genoma, transcriptoma e proteoma de *Schistosoma mansoni* são úteis neste sentido, pois facilitam a identificação de alvos para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas com base nas diversas ferramentas e bases de dados disponíveis nestes estudos.

### **1.5 Estudos do genoma e do transcriptoma de *Schistosoma mansoni***

O *Schistosoma mansoni* teve seu genoma totalmente seqüenciado recentemente (BERRIMAN e cols., 2009). Esta espécie possui um genoma complexo, totalizando 363 megabases (Mb), com 40% da sua sequência repetitiva, reunidos em sete pares de cromossomos autossômicos e um par de determinantes sexuais – ZW. Foram identificados 11.809 genes hipotéticos codificando 13.197 transcritos, e o tamanho médio de cada gene foi estimado em 4.7 kilobases (Kb), com íntrons maiores que éxons. Além disso, foi encontrada neste genoma uma característica não observada em outros eucariotos, em que os íntrons na extremidade 5' são menores que os da extremidade 3'. Estudos prévios das regiões conservadas entre *S. mansoni* e *S. japonicum* revelaram que elas possuem 84% de identidade, sendo grande parte destas regiões restrita a éxons codificadores de proteínas, e não a íntrons ou regiões não traduzidas (UTRs) (HAAS e cols., 2007).

A estrutura de genes contendo micro-exons (MEGs) também é uma característica desta espécie (BERRIMAN e cols., 2009). Pelo menos 45 genes possuem esta estrutura, que foram classificados em 14 famílias, as quais não apresentaram nenhuma similaridade com genes de outras espécies de *Schistosoma*. Quase todas as famílias de MEGs codificam um peptídeo sinal na extremidade 5' e apenas três destas famílias possuem sinais de ancoragem à membrana, e os genes de todas as famílias demonstraram ser transcritos em estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* presentes em mamíferos. O seqüenciamento de três famílias de MEGs revelou que existem vários sítios de processamento alternativo, o que proporciona grande variação de suas proteínas (BERRIMAN e cols., 2009).

O genoma de *Schistosoma mansoni*, bem como o transcriptoma, é útil por proporcionar a identificação de diferentes alvos de medicamentos e vacinas, o que leva a novas formas de intervir e melhorar as abordagens de controle da esquistossomose. A deficiência no metabolismo de lipídeos faz com que o parasita dependa do hospedeiro, sendo este um alvo para o desenvolvimento de medicamentos, assim como os receptores de membrana, canais iônicos e proteases (BERRIMAN e cols., 2009). Alvos para o desenvolvimento de novos fármacos também foram revelados nos estudos de transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA e cols., 2003). Genes associados com neurotransmissão (receptor nicotínico de acetilcolina, acetilcolinesterase, transportadores de glutamato e de ácido gama-amino butírico – GABA), parálogos de subunidades dos canais de cálcio e ciclofilinas, que mediam o efeito anti-esquistossomótico da ciclosporina são alguns exemplos de candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. Em geral, os candidatos vacinais incluem proteínas expostas na superfície do *Schistosoma mansoni* e aquelas expressas nos estágios do verme em seus hospedeiros mamíferos. Ortólogos de toxinas secretadas, receptores para fatores e nutrientes do hospedeiro, proteínas de membrana e expostas na superfície e enzimas são alguns dos candidatos vacinais postulados por Verjovski-Almeida e cols. (2003).

## 1.6 Atualidades no desenvolvimento de vacinas anti-esquistossomóticas

Dentre as diferentes abordagens para o desenvolvimento de vacinas anti-esquistossomóticas, a imunização com cercárias irradiadas de *S. mansoni* (atenuadas com radiação ionizante) induz altos níveis de proteção em animais (STEK e cols., 1981). A larva atenuada apresenta um padrão de migração truncado e lento no hospedeiro definitivo, sendo tal característica importante na indução da imunidade protetora contra a infecção por *S. mansoni* (MOUNTFORD e cols., 1988). A maioria das larvas irradiadas morre no pulmão aproximadamente em 21 dias, mas pelo menos 25% ainda permanecem na pele por 14 dias (MOUNTFORD e cols., 1988). O foco inflamatório produzido na pele decorrente da permanência das larvas neste sítio contém macrófagos e células dendríticas, que capturam os antígenos liberados pela larva e ativam a resposta imune adaptativa nos linfonodos drenantes (HOGG e cols., 2003a). O microambiente inflamatório na pele também é rico em IL-12, sendo importante por favorecer o desenvolvimento de células T auxiliares do tipo Th1 na resposta protetora subsequente (HOGG e cols., 2003a). Por outro lado, a produção de IL-12 na pele é regulada por IL-10, limitando a extensão da inflamação, bem como reduzindo a força de resposta adaptativa desenvolvida (HOGG e cols., 2003b).

Exposições únicas de camundongos C57BL/6 a cercárias atenuadas de *S. mansoni* induzem proteção em torno de 60 a 70% contra o desafio com cercárias não-atenuadas, enquanto que em múltiplas exposições, o índice de proteção aumenta para 73 a 77%. A imunidade protetora induzida por exposição única envolve uma resposta celular de células T CD4<sup>+</sup> associadas a um perfil de citocinas do tipo Th1, já que o uso de anticorpos monoclonais contra IFN- $\gamma$  reduz o nível de proteção alcançada enquanto que a neutralização de IL-4 e IL-5 não alteram a imunidade protetora (SHER e cols., 1990; SMYTHIES e cols., 1992). Ao contrário da exposição única às cercárias atenuadas, múltiplas exposições apresentam um mecanismo diferente de imunidade protetora em camundongos: há o

desenvolvimento de resposta do tipo Th2, com produção de altos títulos de IgG que podem ser transferidos e conferir imunidade a recipientes não primados (CAULADA-BENEDETTI e cols., 1991; MANGOLD e DEAN, 1986).

Embora induzam mecanismos protetores diferentes, tanto a imunização com uma única exposição às larvas atenuadas, quanto a imunização com múltiplas exposições requerem estímulos capazes de gerar respostas imunes humoral e celular. Camundongos deficientes em células B apresentaram proteção reduzida contra o desafio com cercárias após uma única exposição às larvas atenuadas. O mesmo foi observado em camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  expostos a múltiplas imunizações (JANKOVIC e cols., 1999).

Estudos utilizando camundongos imunizados com cercárias atenuadas mostraram que a eliminação do esquistossômulo por linfócitos T no pulmão parece ser o principal mecanismo de proteção contra o *Schistosoma* (COULSON e WILSON, 1997). Os mecanismos de eliminação do esquistossômulo ainda não são claros. No entanto, há duas hipóteses que poderiam explicar a proteção caracterizada pela imunização única com larvas irradiadas. Uma delas defende que o evento crucial na eliminação do parasita envolve o bloqueio físico de sua migração através dos capilares pulmonares por um foco inflamatório efetor, com a participação de IFN- $\gamma$ , células CD4<sup>+</sup> e macrófagos. A outra hipótese defende a idéia de que os esquistossômulos do pulmão são eliminados por um mecanismo de morte citotóxica, sendo os macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  os mediadores de tal eliminação (HEWITSON e cols., 2005).

Entretanto, apesar dos elevados níveis de proteção obtidos em animais, a utilização do modelo de cercárias atenuadas em humanos não seria aplicável, devido à possibilidade do parasita recuperar sua capacidade infectante (COULSON, 1997). Este modelo é, portanto, importante para elucidação dos mecanismos imunológicos responsáveis pela indução da imunidade protetora.

Considerando que dentre as espécies usadas como modelos de esquistossomose, o macaco rhesus possui uma característica em que a infecção se estabelece, mas a excreção

de ovos rapidamente diminui, estudos nestes animais podem fornecer mais esclarecimentos sobre os mecanismos que estão envolvidos na eliminação do parasita. Sendo assim, um estudo realizado recentemente com esta espécie (*Macaca mulatta*) demonstrou uma forte associação entre o tempo e intensidade da produção de IgG e a deterioração dos vermes adultos nestes animais (WILSON e cols., 2008). Nesse estudo, não houve evidência de um foco agudo mediado por anticorpos, mas sim um mecanismo que parecia envolver uma resposta imunológica sustentada por longos períodos (de semanas a meses), que resultou em sucessivas alterações degenerativas nos vermes, envolvendo cessação da alimentação, desnutrição e por último, falha de diversos órgãos. Uma produção intensa de IgG correlacionou com uma carga parasitária baixa na perfusão, e análises imunoproteômicas identificaram enzimas digestivas, hidrolases da superfície do tegumento e enzimas antioxidantes como alvos de IgG nos animais altamente responsivos. Desta forma, os autores deste estudo sugerem que os vermes morrem após cessação da alimentação, como um resultado de processos mediados por anticorpos, e que as proteínas das três categorias citadas acima têm potencial profilático e terapêutico como vacina (WILSON e cols., 2008).

Outras abordagens, além das cercárias irradiadas, são também utilizadas para se encontrar novos alvos com potencial para compor uma vacina anti-esquistossomótica. Tais abordagens envolvem a imunização de animais com antígenos do *Schistosoma*: a imunização com antígenos purificados na sua forma nativa; a imunização com proteínas recombinantes, que são facilmente produzidas em larga escala; a imunização com genes que codificam os antígenos protéicos do verme em forma de vacinas de DNA, que possuem a vantagem de produção em larga escala de maneira mais fácil, além de serem mais estáveis que proteínas; e a imunização com peptídeos sintéticos contendo epitopos imunodominantes de proteínas do parasita, que são facilmente produzidos e não requerem purificação.

Dentre as diversas estratégias vacinais utilizadas em estudos com proteínas de *Schistosoma*, a OMS selecionou, em meados dos anos 90, seis antígenos de *S. mansoni* como potenciais candidatos ao desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica,

baseado principalmente nos resultados alcançados em ensaios de proteção em vários experimentos e laboratórios (BERGQUIST e COLLEY, 1998). Os antígenos foram: paramiosina, utilizado na sua forma nativa (PEARCE e cols., 1988); antígeno numero 5 de vacina irradiada – IrV-5, como proteína recombinante (SOISSON e cols., 1992); Sm14 como proteína recombinante (MOSER e cols., 1991; TENDLER e cols., 1995); Sm28/Glutationa S-transferase – GST, também como proteína recombinante (AURIAULT e cols., 1991; TROTTEIN e cols., 1992); triose-fosfatase isomerase – TPI, utilizada em forma de peptídeos sintéticos (SHOEMAKER e cols., 1992); e Sm23, também como peptídeos sintéticos (REYNOLDS e cols., 1992). Estes antígenos foram submetidos a testes independentes em camundongos e os resultados mostraram que o objetivo de se alcançar uma proteção de 40%, ou maior, não foi alcançado com nenhuma das formulações de vacinas testadas (BERGQUIST, 1998).

Considerando que os vermes adultos de *Schistosoma* não se replicam dentro de seus hospedeiros definitivos, o desenvolvimento de uma vacina que produza resposta imune protetora parcial, mesmo que não esterilizante, poderia ter um impacto na redução da morbidade e na transmissão da doença a longo prazo (MCMANUS e LOUKAS, 2008).

Apesar dos estudos realizados em modelos experimentais, a resposta a diversos antígenos tem sido estudada em pacientes residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose. Sm14 (AL-SHERBINY e cols., 2003; BRITO e cols., 2000; FONSECA e cols., 2004), Sm23 (AL-SHERBINY e cols., 2003; RIBEIRO DE JESUS e cols., 2000), Sm28/GST (AL-SHERBINY e cols., 2003), IrV-5 (AL-SHERBINY e cols., 2003; RIBEIRO DE JESUS e cols., 2000), Sm37-GAPDH (AL-SHERBINY e cols., 2003), Sm97-paramiosina (AL-SHERBINY e cols., 2003; CORREA-OLIVEIRA e cols., 1989; RIBEIRO DE JESUS e cols., 2000), SmTSP-2 (TRAN e cols., 2006) e Sm29 (CARDOSO e cols., 2006a); são alguns dos antígenos testados em estudos de caracterização da resposta humoral e celular induzidas em indivíduos residentes em áreas endêmicas. De um modo geral, pacientes com perfil de resistência contra a doença apresentaram elevados títulos de IgG1, IgG2, IgG3, IgE e de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-5, sendo que pacientes infectados apresentaram níveis

elevados de IgG4 e IL-10. No entanto, é importante ressaltar que cada antígeno produz um tipo de resposta imune, sendo difícil encontrar dois ou mais antígenos produzindo o mesmo perfil imunológico de proteção. Como exemplo, o antígeno Sm97-paramiosina foi capaz de induzir altos níveis de IgE, IL-2 e IL-5 em pacientes resistentes à infecção, ao passo que Sm14 induziu níveis elevados de IgG1 e IFN- $\gamma$  no mesmo perfil de pacientes (AL-SHERBINY e cols., 2003). As proteínas Sm29 e SmTSP-2 apresentaram predominância de IgG1 e IgG3 em pacientes naturalmente resistentes (NR), ao passo que Sm29 também foi reconhecida por estas subclasses em indivíduos resistentes à reinfecção (RR) (CARDOSO e cols., 2006a; TRAN e cols., 2006).

### **1.6.1 O tegumento de *Schistosoma mansoni* como alvo do desenvolvimento de vacinas**

Já que os antígenos sugeridos pela OMS não obtiveram a resposta protetora esperada, outros estudos foram realizados na tentativa de se conseguir novos alvos potenciais a uma vacina contra a esquistossomose. Dessa forma, em 2006, estudos utilizando análises proteômicas caracterizaram diversas proteínas expostas na superfície do parasita que possuem grande potencial para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose (BRASCHI e cols., 2006; BRASCHI e WILSON, 2006). Porém, vale lembrar que nem todas as proteínas no tegumento do parasita são antigênicas, sendo que para tal, elas devem estar associadas à membrana e possuírem motivos (peptídeo sinal e/ou domínios transmembrana) que as enderecem, por uma via secretória, para o meio externo ou que permita sua ancoragem à membrana plasmática do tegumento, permitindo o contato do hospedeiro com o parasita (LOUKAS e cols., 2007). Neste sentido, torna-se importante

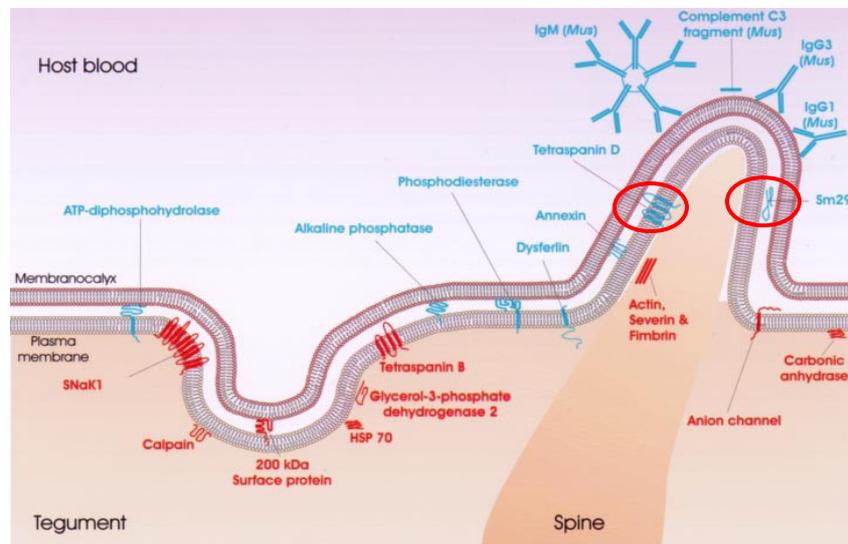
observar que a acessibilidade a proteínas presentes no tegumento possibilita a seleção de moléculas-alvos para o desenvolvimento de novas vacinas e medicamentos.

Dentre as diversas proteínas do tegumento descritas por Braschi e cols. (2006), podemos citar a Sm23, que parece ser a única proteína de tegumento dentre as testadas pela OMS como candidato vacinal (BERGQUIST e COLLEY, 1998). Sm23 é mais eficaz quando utilizada como vacina de DNA, resultando em uma proteção de 36-44% após a infecção desafio, e não conferiu nenhuma proteção como proteína recombinante formulada com suspensão de alumínio na forma de sal (alum) (DA'DARA e cols., 2003). Estudos *in vitro* avaliaram a resposta humoral e celular humana da Sm23 na forma de peptídeo multiantigênico (MAP3), e verificaram a produção de altos níveis de IgG3 em pacientes resistentes à esquistossomose (AL-SHERBINY e cols., 2003).

A paramiosina (Sm97) é uma proteína miofibrilar de 97 kDa presente exclusivamente nos invertebrados e, apesar de não ter sido descrita por Braschi e Wilson (2006), estudos posteriores demonstraram sua expressão no tegumento do esquistossômulo de fase pulmonar (GOBERT e MCMANUS, 2005). A imunização de camundongos com as formas nativa e recombinante da paramiosina mostrou resultados de proteção da faixa de 26 a 33% após infecção desafio com *S. mansoni* (PEARCE e cols., 1988). Ela é fortemente reconhecida por soros de pacientes naturalmente resistentes à infecção pelo parasita (CORREA-OLIVEIRA e cols., 1989) e induz a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  por PBMC destes indivíduos (RIBEIRO DE JESUS e cols., 2000).

Outra proteína, a Sm21.6 (LOPES e cols., 2009), foi revelada por microscopia confocal como sendo presente no tegumento do verme adulto. Ela possui 45% de similaridade a Sm22.6 de *S. mansoni*, proteína que conferiu proteção de 34,5% em camundongos imunizados e posteriormente desafiados com cercárias (PACÍFICO e cols., 2006). Porém, a imunização de camundongos com Sm21.6 mostrou que esta proteína não induziu proteção contra a infecção, mas reduziu em 28%, 21% e 34% o número de granulomas no fígado, a área de granuloma e a área de fibrose, respectivamente.

Já as proteínas SmTSP-2 (*S. mansoni* Tetraspanina-2) e Sm29, antígenos associados à membrana do tegumento (Figura 6), apresentaram proteção de mais de 50% (CARDOSO e cols., 2008; TRAN e cols., 2006). Tetraspaninas são proteínas de quatro domínios transmembrana encontradas na superfície de células eucarióticas, inclusive de células B e T. Especificamente, SmTSP-1 e SmTSP2 possuem dois *loops* extracelulares, um menor de 17 a 22 resíduos (EC-1) e outro maior, de 70 a 90 resíduos (EC-2), sendo que este último possui quatro (SmTSP-2) a seis (SmTSP-1) resíduos de cisteína que formam duas ou três ligações dissulfeto (SMYTH e cols., 2003).



**FIGURA 6:** Representação diagramática do tegumento do *Schistosoma* e a localização proposta de proteínas identificadas. As proteínas em azul são mais externas no tegumento e as proteínas em vermelho, mais internas. Nos círculos vermelhos estão destacadas as proteínas Sm29 e SmTSP-2 (Tetraspanina D) (BRASCHI e WILSON, 2006) – modificado.

Em estudo de proteção, Tran e cols. (2006) expressaram e purificaram o loop extracelular 2 (EC-2) da SmTSP-1 e SmTSP-2 como proteínas de fusão solúveis à tioredoxina e realizaram testes em camundongos e com soros de humanos residentes em áreas endêmicas para esquistossomose. O antígeno SmTSP-2 alcançou uma redução, em

camundongos, de 57% do número total de vermes adultos recuperados por perfusão, índice este que foi de apenas 34% para SmTSP-1. Além disto, SmTSP-2, mas não SmTSP-1, foi fortemente reconhecido por IgG1 e IgG3 de indivíduos resistentes naturais à infecção, demonstrando que SmTSP-2 é um candidato vacinal promissor. Neste estudo, Tran e cols. (2006) também identificaram um ortólogo da SmTSP-2 nos bancos de dados de etiquetas de sequência expressa (ESTs) de *S. japonicum*, os quais compartilharam 90% de similaridade nos primeiros aminoácidos, indicando que a eficiência de uma vacina com SmTSP-2 poderia ser também eficaz contra *S. japonicum*.

Desta forma, um estudo com TSP-2 de *S. japonicum* identificou sete subclasses deste antígeno, chamadas de SjTSP-2a até SjTSP-2g (CAI e cols., 2008). Estas proteínas foram identificadas no tegumento do esquistossômulo de fase pulmonar e nos vermes adultos por imunolocalização. As sequências de TSP-2 mostraram baixa homologia entre as duas espécies, sugerindo que uma divergência funcional possa ter ocorrido ao longo da evolução. Este trabalho também avaliou a proteção em camundongos BALB/c, e houve uma redução da carga parasitária de apenas 15% em animais imunizados com a mistura de todas as subclasses de SjTSP-2 formulados com adjuvante de Freund, e os autores sugeriram que esta proteína, em *S. japonicum*, esteja envolvida em mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, não sendo um bom candidato vacinal.

Assim como SmTSP-2, a Sm29 também é encontrada no tegumento de *Schistosoma* (BRASCHI e cols., 2006; BRASCHI e WILSON, 2006). Análises de bioinformática (CARDOSO e cols., 2006b) indicaram que Sm29 é uma proteína de 18.07 kDa na sua forma madura, presente em *S. mansoni*, e que apresenta similaridade a outras proteínas desconhecidas do *S. japonicum*. Ela possui características relacionadas à associação à membrana plasmática: peptídeo sinal na região amino (N)-terminal, composto por 26 aminoácidos e com sítio de clivagem entre a Serina 26 e Valina 27; hélice transmembrana hidrofóbica na região carboxi (C)-terminal, na região entre os aminoácidos 169 a 191; três potenciais sítios de oxigênio (O)-glicosilação e quatro potenciais sítios de nitrogênio (N)-glicosilação. A análise de localização subcelular classificou a Sm29 em 32 famílias

diferentes, das quais 21 fazem parte de famílias de proteínas integrantes de membrana. Ainda, a análise da estrutura secundária desta proteína identificou a ausência de alfa-hélice ou folha beta, e provavelmente a inserção de carboidratos nos sítios de glicosilação e a formação de pontes de cisteína são responsáveis pela estrutura da Sm29.

A análise de microscopia confocal mostrou que a Sm29 é expressa de forma abundante no tegumento do verme adulto e ausente em tecidos internos do parasita. Adicionalmente a este achado, foi realizada a análise de transcritos de bibliotecas de cDNA do parasita nos diferentes estágios de desenvolvimento (verme adulto, esquistossômulo de fase pulmonar, ovo e cercária). A análise revelou a presença de transcritos correspondentes à proteína apenas no verme adulto e no esquistossômulo de fase pulmonar (CARDOSO e cols., 2006a).

Ainda neste trabalho, foi realizada a investigação do perfil de isotipos de anticorpos anti-Sm29 recombinante presente em soros de pacientes residentes em áreas endêmicas no Brasil, agrupados como resistentes ou susceptíveis à infecção. Foram encontrados níveis elevados de IgG em todos os grupos comparados ao grupo não infectado (NI), e a predominância de IgG1 e IgG3 em pacientes naturalmente resistentes (NR) e resistentes à reinfeção (RR), mostrando que a proteína pode ser alvo da citotoxicidade celular dependente de anticorpo e, desta maneira, ser um forte candidato vacinal (CARDOSO e cols., 2006a).

Além do estudo realizado com soro de humanos, foram realizados estudos da capacidade protetora da Sm29 recombinante (rSm29) em camundongos. Neste estudo, foi confirmada por microscopia confocal a presença da Sm29 no tegumento do verme adulto (macho e fêmea) e no esquistossômulo de fase pulmonar. Além desta localização no tegumento, o verme adulto fêmea também possui a proteína em tecidos internos (CARDOSO e cols., 2008).

Quanto à resposta humoral, o perfil de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a anti-rSm29 foi avaliado. Os soros de camundongos imunizados com a proteína associada a adjuvante de Freund foram coletados e usados em teste de ELISA. Os níveis de IgG

detectados apresentaram-se elevados em todos os tempos de coleta dos soros, assim como IgG1 e IgG2a, porém a relação IgG1/IgG2a diminuiu ao longo do tempo devido à elevada produção de IgG2a, o que indicou um perfil de resposta imune do tipo Th1 após a imunização. Os resultados da resposta celular também apresentaram perfil tipicamente Th1, na qual se observou elevada produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 e ausência de IL-4 na análise de citocinas (CARDOSO e cols., 2008).

Nesse estudo foi avaliada a capacidade protetora da proteína recombinante em camundongos. Para tal, os animais foram imunizados três vezes com rSm29 associada a adjuvante completo/incompleto de Freund e desafiados com 100 cercárias. O grupo controle recebeu PBS associado ao mesmo adjuvante. Os camundongos imunizados com rSm29 apresentaram 51% de proteção, 60% de redução de ovos intestinais e 50% de redução do número de granulomas hepáticos, em comparação com o grupo controle – PBS + adjuvante completo/incompleto de Freund (CFA/IFA). Por último, avaliou-se o perfil de expressão de proteínas em vermes recuperados de animais imunizados com rSm29 usando a técnica de *microarray*. Esta análise mostrou uma regulação negativa de 495 genes e regulação positiva de 22 genes, sugerindo que em camundongos imunizados com a proteína a expressão reduzida de alguns genes codificando antígenos de membrana seria uma maneira de adaptação, pelo parasita, em relação à resposta imune em animais vacinados (CARDOSO e cols., 2008). A Tabela 1 resume a proteção induzida pelos antígenos do tegumento do *S. mansoni* descritos aqui.

**TABELA 1**Proteção induzida pela imunização de camundongos com antígenos do tegumento do *Schistosoma mansoni*

<b>Antígeno</b>	<b>Forma de vacina</b>	<b>Adjuvante utilizado</b>	<b>Proteção (%)</b>	<b>Referência</b>
<b>SmTSP-1</b>	Recombinante	Freund	34	Tran e cols., 2006
<b>SmTSP-2</b>	Recombinante	Freund	57	Tran e cols., 2006
<b>Sm29</b>	Recombinante	Freund	51	Cardoso e cols., 2008
<b>Sm23</b>	Vacina de DNA	--	44	Da'dara e cols., 2003
<b>Sm97 / paramiosina</b>	Nativa ou recombinante	Bacilos Calmette-Guerin (BCG)	33	Pearce e cols., 1988
<b>Sm21.6</b>	Recombinante	Freund	Não conferiu proteção	Lopes e cols., 2009
<b>Sm22.6</b>	Recombinante	Freund	34,5	Pacífico e cols., 2006

Até o momento não há trabalhos que relatem estudos com antígenos de *S. mansoni* expressos como proteínas quiméricas. Apenas em um estudo com vacina de *S. japonicum* foi relatada a associação de duas proteínas, Sj26GST com quatro fragmentos diferentes da paramiosina, induzindo vários níveis de proteção. O maior deles foi alcançado com a quimera 3 (SjGP-3) formulada com adjuvante de Freund, resultando em 37,5% de redução da parasitemia (XU e cols., 2009).

Uma vez que a proteção alcançada com um único antígeno geralmente é baixa (com exceção da Sm29 e SmTSP-2), a tentativa de se aumentar a eficácia das vacinas pela combinação de antígenos do parasita pode ser vantajosa. Considerando, ainda, que Sm29 e SmTSP-2 apresentaram os melhores dados de proteção como candidatos vacinais, a investigação da imunidade protetora promovida por quimeras destes dois antígenos abre um novo e interessante campo para pesquisa no desenvolvimento de novas vacinas.

## 1.7 Justificativa

A esquistossomose mansônica representa uma preocupação em muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. O tratamento preconizado com praziquantel, apesar de eficaz, enfrenta algumas limitações: o tratamento em massa não previne reinfecções, já que pacientes tratados continuam em risco devido às condições precárias de saneamento; o acesso ao medicamento muitas vezes é difícil em todas as áreas endêmicas, fazendo com que o tratamento fique caro; casos de baixa eficiência do praziquantel já foram relatados. Ademais, o praziquantel é considerado uma droga órfã para o tratamento da esquistossomose humana. A associação de vacinas com a quimioterapia seria uma boa estratégia de combate à esquistossomose, já que o tratamento quimioterápico propicia a

redução da carga parasitária em curto prazo e a vacinação propicia uma resposta imune protetora de longa duração.

Considerando, ainda, que: (1) diversas proteínas estudadas em busca de uma vacina eficiente não alcançaram níveis de proteção maiores que 40%, (2) os maiores níveis foram alcançados com cercárias atenuadas, cujo uso não é aplicável em humanos, (3) os maiores níveis de proteção com antígenos únicos foram alcançados com as proteínas recombinantes Sm29 (51% proteção) e SmTSP-2 (57% proteção) e (4) o objetivo inicial da OMS e de estudos no passado era de se obter antígenos com potenciais elevados de proteção, será que a associação da Sm29 e SmTSP-2 induziria uma proteção mais elevada que estes antígenos separadamente? E, além disso, qual é a porção da Sm29 envolvida nesta proteção?

O estudo de proteção utilizando quimeras de proteínas localizadas no tegumento do *Schistosoma mansoni*, até então não realizado para esta infecção e pouco utilizado em estudos envolvendo parasitas, poderá ter uma contribuição para a pesquisa científica, ampliando oportunidades para uma nova abordagem vacinal com proteínas recombinantes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Expressar e purificar as porções N- e C-terminais da proteína Sm29 em fusão com a SmTSP-2 e avaliar a resposta imunológica em modelo murino e humano.

## 2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar as quimeras A e B da Sm29 fusionada à SmTSP-2;
- Avaliar a resposta protetora induzida pela imunização com cada uma das quimeras associadas ao adjuvante CpG-Alum em camundongos C57BL/6;
- Avaliar o perfil dos isotipos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-Sm29 produzidos com as quimeras de Sm29/SmTSP-2 em soros de camundongos C57BL/6 imunizados;
- Avaliar os títulos de IgG total anti-Sm29, anti-SmTSP-2, anti-Quimera A ou anti-Quimera B produzidos em soros de pacientes residentes em áreas endêmicas para esquistossomose.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Camundongos e cercárias

Fêmeas de camundongos C57BL/6, com idade entre 6 e 7 semanas, foram obtidas no biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa LE) foram mantidas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e preparadas por exposição à luz por duas horas, no Centro de Pesquisas Rene Rachou (CPqRR/Fiocruz). A contagem do número de cercarias viáveis suficiente para a infecção foi realizada com lupa acoplada à luz utilizando lugol.

### 3.2 População estudada

As amostras de sangue foram obtidas através do trabalho de cooperação com o Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira (CPqRR/Fiocruz), de indivíduos moradores de três áreas endêmicas para esquistossomose (Melquiades, Córrego do Onça e Caatinga do Moura). Estes indivíduos foram classificados em cinco grupos diferentes (Tabela 2), baseados em seu *status* de infecção, selecionados de forma aleatória, apenas utilizando o critério de inclusão ou exclusão em um grupo, sem conhecimento prévio de sua resposta imunológica. Os indivíduos NI (não-infectados) são pessoas saudáveis, não residentes em áreas endêmicas, sem nenhuma infecção parasitária e sem nenhum contato com água contaminada.

**TABELA 2**

População estudada

<b>Grupo</b>	<b>Status de infecção</b>	<b>Idade (média <math>\pm</math> desvio padrão)</b>
<b>Infectados (<math>n = 8</math>)</b>	Infectados com <i>S. mansoni</i>	17,1 $\pm$ 14,9
<b>Susceptíveis à reinfeção (<math>n = 8</math>)</b>	Infectados	22,8 $\pm$ 12,1
<b>Resistentes à reinfeção (<math>n = 8</math>)</b>	Não infectados	18,8 $\pm$ 9,3
<b>Naturalmente resistentes (<math>n = 8</math>)</b>	Não infectados	45,8 $\pm$ 8,1
<b>Não infectados (<math>n = 8</math>)</b>	Não infectados	28,3 $\pm$ 4,5

Os indivíduos naturalmente resistentes (NR) são aqueles que, apesar do freqüente contato com águas contaminadas, apresentaram exame de fezes negativo para esquistossomose e nenhum sinal clínico da doença por pelo menos três anos consecutivos. Já os indivíduos resistentes à reinfeção (RR) são aqueles que, após quimioterapia,

apresentaram exame de fezes negativo. Pacientes susceptíveis à reinfecção (SR) são os que se reinfectaram após o tratamento químico (exame de fezes positivo para a presença de ovos), e os pacientes infectados (INF) apresentaram exame de fezes positivo e nenhum histórico de tratamento quimioterápico.

### **3.3 Expressão e purificação das quimeras A e B de Sm29/SmTSP-2**

Ambas as quimeras de Sm29/SmTSP-2 foram expressas como proteína de fusão a uma cauda de 6 resíduos de histidina. As quimeras A e B são produtos da fusão do fragmento N- ou C-terminal da proteína Sm29 (Figura 7) com o loop extracelular 2 (EC-2) da SmTSP-2. A construção das quimeras foi realizada pela Dra. Fernanda Caldas Cardoso (Queensland Institute of Medical Research – Austrália) no plasmídeo pET24a.

Os clones foram transformados em *Escherichia coli*, linhagem Rosetta-gami® (Novagen) por meio de choque térmico. Esta linhagem permite a expressão de proteínas de eucariotos que possuem códons raramente usados em *E. coli*, além de evitar degradação de proteínas por possuir mutações em genes específicos.

```

1   ATG AAA AGT GGC TGG GAG TAT ATT GGA ATC TTT TTG TAC ATT ATG GTG AAT ATT CTG GAT
1   M  K  S  G  W  E  Y  I  G  I  F  L  Y  I  M  V  N  I  L  D
61  AAA CAA CGA TGT CAT TCA GTG CGT TGC TAC GTC TGT GAT TAT TGT CCG ATA GTA ACA AGC
21  K  Q  R  C  H  S  V  R  C  Y  V  C  D  Y  C  P  I  V  (T) S
121 GTA TCA ATA TCA GAA GAG AAC AAC TGT ACA TCT TGC TCA ACG GCT GGT TAT AAT TAT TCG
41  V  S  I  S  E  E  N  N  C  T  S  C  S  T  A  G  Y  N  Y  S
181 ATT CAC AGA ATA TGC GTG TTT AAG GAT GGC ATA CCC ATT AAC TTC CCA AAC GAA AAT CGA
61  I  H  R  I  C  V  F  K  D  G  I  P  I  N  F  P  N  E  N  R
241 ACG CAG TGT AAC ACT GAT TTG TGT AAC GGG TTA ACA GTT GAT AAC ACT GGA AAA ATT CCA
81  T  Q  C  N  T  D  L  C  N  G  L  T  V  D  N  T  G  K  I  P
301 TCA GTT CCT ATA GCA AAT CCA TTT CGT TGC TAT ACG TGT TTG AAT TGT ACA AAA AGT AAC
101 S  V  P  I  A  N  P  F  R  C  Y  T  C  L  N  C  T  K  S  N
361 CAA AAG GTA CTT AGC GGT TGT GGT GCA TGT GTG ACA ACT CGT GGT TCT GGA ATT ATC AGT
121 Q  K  V  L  S  G  C  G  A  C  V  (T) (T) R  G  S  G  I  I  S
421 AAA TTT TGT GGA ACT ACA TGT GAA AGA TTG TAT ATT GAC GAT CAA ATT AGT TGT TGC TCA
141 K  F  C  G  T  T  C  E  R  L  Y  I  D  D  Q  I  S  C  C  S
481 ACA GAT CTA TGT AAC GGA ATG ACA AAA TTA TCT ATT CAT CGT CAT GTT ATT ATT GTT CTG
161 T  D  L  C  N  G  M  T  K  L  S  I  H  R  H  V  I  I  V  L
541 TTT GTT TGC ATA GGA ATC AGT AAA TAC ATT CTA TGA
181 F  V  C  I  G  I  S  K  Y  I  L  stop

```

**FIGURA 7:** Porções N- e C-terminais da Sm29 usadas na construção das Quimeras A e B. Em quadro de linha contínua está representada a porção N-terminal da Sm29 (Quimera A) e em quadro de linhas tracejadas, a porção C-terminal da Sm29 (Quimera B).

Para a expressão das proteínas, primeiro foi feita uma indução em pequena escala para padronização das melhores condições de expressão. A indução foi feita com o plasmídeo recombinante pET24-Quimera A e pET24-Quimera B. As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos contendo meio de cultura líquido LB contendo 0,050 mg/ml de kanamicina, 0,25 mg/ml de tetraciclina e 0,034 mg/ml de cloranfenicol para ambas as construções. A cultura foi crescida por aproximadamente 16 horas a 37° C sob agitação constante e após este período, foi diluída no mesmo meio de cultura para densidade ótica  $(DO)_{600nm} = 0,2$ , e depois foi crescida até a  $DO_{600nm}$  entre 0,5 e 0,8. Após atingir essa densidade, foi retirada uma alíquota de 1 mL, e adicionada à cultura 1mM de IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside). A indução foi realizada a 26° C durante 16 horas, retirando-se alíquotas neste tempo. As alíquotas foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos e tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram então analisados em gel de

poliacrilamida SDS a 12% corrido em tampão tris-glicina 1X, e corado por Coomassie brilliant blue R250.

Após a padronização em pequena escala foi feita a indução em grande escala. Para isso, um litro de cultura de *Escherichia coli* contendo a construção da quimera A ou B foi crescido a 37° C até obtenção da DO<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,8. Esta cultura foi então induzida por 16 horas a 26° C com 1 mM de IPTG para expressão das quimeras. Após este período, as células provenientes de 1 litro de cultura foram centrifugadas à 4000 g e ressuspensas em 50 ml de solução de lise (12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol). Estas células foram lisadas por sonicação três vezes (pulsos de 30 segundos cada) a uma amplitude de 30% e centrifugadas novamente por 20 minutos, 4° C, à 4000 g. As proteínas recombinantes foram recuperadas como corpos de inclusão e foram ressuspensas em 50 ml de tampão (12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol, 8M uréia). Em seguida, a purificação de ambas as quimeras foi feita em coluna de níquel através de cromatógrafo FPLC (*fast protein liquid chromatography*) multidimensional ÄKTA Prime® (GE Healthcare), em condições desnaturantes. A renaturação das quimeras foi feita por diálise com 10 litros de tampão PBS, utilizando membrana porosa de 3 kDa (Spectrum Medical Industries).

### **3.4 Western blot das quimeras purificadas**

A avaliação das quimeras A e B foi realizada após eletroforese em gel SDS-PAGE a 12% e transferência para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 10% de leite em pó desnatado em tampão PBST (PBS + 0,05% Tween 20) por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Após três lavagens com PBST, a membrana foi incubada em solução contendo o anticorpo anti-6xhistidina C-

terminal de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Invitrogen), na diluição 1:2000 em tampão PBST, por duas horas à temperatura ambiente sob agitação. Após três lavagens com PBST, a membrana foi tratada com tampão para fosfatase alcalina contendo nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphatase (BCIP). Após a revelação, a membrana foi lavada com água bidestilada e seca em papel filtro. Uma vez identificadas, as quimeras foram utilizadas para ensaios de imunização.

### 3.5 Imunização dos camundongos

As fêmeas C57BL/6, de 6 a 7 semanas de idade, foram divididas em cinco grupos experimentais de 10 animais cada e imunizadas com três doses subcutâneas, em intervalos de 15 dias. As injeções subcutâneas foram feitas na região da nuca dos animais, com 25 µg de proteínas formuladas com adjuvante CpG-Alum, conforme a Tabela 3. O regime de imunização dos animais está esquematizado na Figura 8.

**TABELA 3**

Grupos de imunização

<i>Grupo</i>	<i>Proteína</i>	<i>Adjuvante</i>
1	Proteína de ligação à maltose (MBP)	CpG (20 µg) <sup>a</sup> + Alum <sup>b</sup> (1300 µg)
2	Sm29-MBP	CpG (20 µg) <sup>a</sup> + Alum <sup>b</sup> (1300 µg)
3	SmTSP-2-6xHis	CpG (20 µg) <sup>a</sup> + Alum <sup>b</sup> (1300 µg)
4	Quimera A-6xHis	CpG (20 µg) <sup>a</sup> + Alum <sup>b</sup> (1300 µg)
5	Quimera B-6xHis	CpG (20 µg) <sup>a</sup> + Alum <sup>b</sup> (1300 µg)

<sup>a</sup> CpG 04  
<sup>b</sup> Sign

Dias 0 15 30 45 60 75 90

↑ Coleta de sangue para obtenção soro – ELISAs

**FIGURA 8:** Representação esquemática da estratégia de imunização dos camundongos.

### **3.6 Infecção desafio e recuperação de vermes**

Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por exposição da pele do abdômen destes animais a uma suspensão de 100 cercárias em água durante uma hora. Após 45 dias do desafio, os vermes adultos foram perfundidos das veias do sistema porta-hepático dos animais, coletados em placas de Petri descartáveis e contados com auxílio de lupa acoplada à lâmpada. O nível de proteção (em percentagem) foi calculado através da fórmula:

$$P = \frac{(VRGC - VRGE)}{VRGC} \times 100$$

onde P = nível de proteção (em %), VRGC = número de vermes adultos recuperados no grupo controle e VRGE = número de vermes adultos recuperados no grupo experimental.

### **3.7 Dosagem de anticorpos em soros de camundongos**

Os soros coletados de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a primeira imunização foram usados para dosagem de anticorpos por ELISA. As placas de fundo chato foram sensibilizadas overnight a 4° C com 100µl/poço de rSm29 a uma concentração de 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato. Após este período, as placas foram bloqueadas com 200µL/poço de soro fetal bovino 10% em PBS por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST em lavadora de microplacas. 100µl/poço de amostras de soro dos camundongos dos grupos 1, 2, 4 e 5 da TAB. 1 foram diluídas 1:100 com PBST foram adicionadas às placas, que por sua vez foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBST, foram adicionados os anticorpos anti-IgG total (Promega), anti-IgG1 (Sigma) e anti-IgG2a (Sigma) de camundongo, todos conjugados à peroxidase, nas diluições de 1:10.000 (anti-IgG e anti-IgG1) e 1:2.000 (anti-IgG2a) em PBST. 100µL/poço da diluição dos anticorpos secundários foram adicionados às placas e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Após novas lavagens com PBST, a reação foi revelada por 15 minutos com 100µL/poço de solução: OPD (o-phenylenediamine) diluído em 50mL de tampão citrato-fosfato 0.5M (pH 5) com 0.04% de peróxido de hidrogênio. Após a revelação, a reação foi interrompida com 50µL/poço de ácido sulfúrico a 5%. A densidade ótica foi determinada em leitor automático de ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando filtro de comprimento de onda de 492nm.

### **3.8 Dosagem de IgG total em soros de humanos**

Os soros coletados de pacientes dos cinco grupos descritos na Tabela 2 foram utilizados em teste de ELISA para avaliação dos níveis de IgG específicos para as proteínas recombinantes Sm29, SmTSP-2, Quimera A e Quimera B. As placas de fundo chato foram sensibilizadas overnight a 4° C com 100µl/poço dos antígenos a uma concentração de 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato. Após este período, as placas foram bloqueadas com 200µL/poço de soro fetal bovino 10% em PBS por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST em lavadora de microplacas. 100µl/poço de amostras de soro de pacientes de cada grupo, diluídas 1:50 em PBST foram adicionadas às placas, que por sua vez foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBST, anti-IgG de humano conjugado à peroxidase (Sigma) foi adicionado à placa na diluição de 1:10.000 (100µl/poço) e incubados por 1 hora a 37° C. Após novas lavagens com PBST, a reação foi revelada por 30 minutos à temperatura ambiente com 100µL/poço de solução: OPD diluído em 50mL de tampão citrato-fosfato (pH 5) com 0.05% de peróxido de hidrogênio. Após a revelação, a reação foi interrompida com 50µL/poço de ácido sulfúrico a 5%. A densidade ótica foi determinada em leitor automático de ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando-se filtro de comprimento de onda de 492nm.

### **3.9 Análises estatísticas**

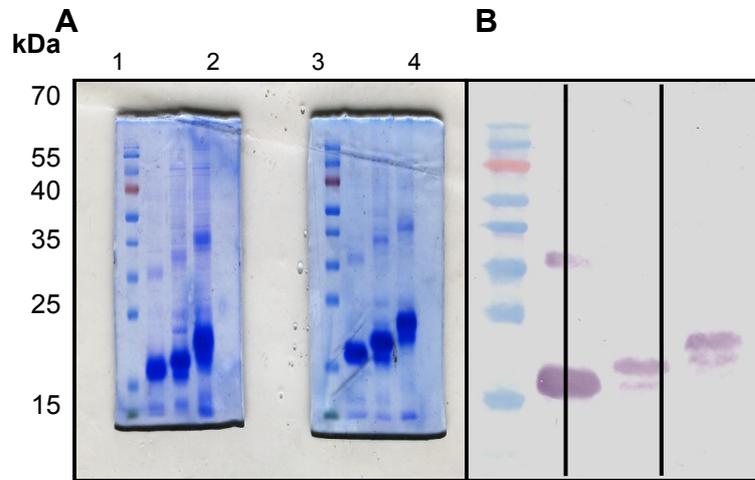
Para avaliar a significância dos resultados obtidos na análise da resposta humoral dos pacientes residentes em áreas endêmicas, o teste de Kruskal-Wallis foi usado como ferramenta para comparação de todos os grupos em relação ao grupo não-infectado (NI). O teste de Mann-Whitney foi usado para avaliar a significância do nível de anticorpos obtidos entre os grupos RR *versus* SR e NR *versus* INF. Para avaliação da significância dos resultados nas análises da resposta humoral em camundongos imunizados, foi utilizado o teste de Tukey. O teste *t de Student* foi usado para avaliar significância dos níveis de proteção entre os grupos imunizados. Todos estes testes foram realizados utilizando o programa computacional GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Expressão e purificação das quimeras**

O sistema de expressão em *E. coli* selecionado para produção das formas recombinantes das quimeras A e B de Sm29/SmTSP-2 foi capaz de produzir quantidades suficientes das proteínas em corpos de inclusão, que foram recuperados em tampão contendo uréia a 8 M. As quimeras foram purificadas em coluna de afinidade contendo níquel, própria para extração de proteínas com cauda de histidina, e depois foram renaturadas por diálise. Cerca de 3,5 mg de ambas as quimeras foram purificadas, o suficiente para os experimentos de imunização. As quimeras purificadas e a análise por *western blot* estão representadas na Figura 9. O anticorpo anti-histidina foi capaz de

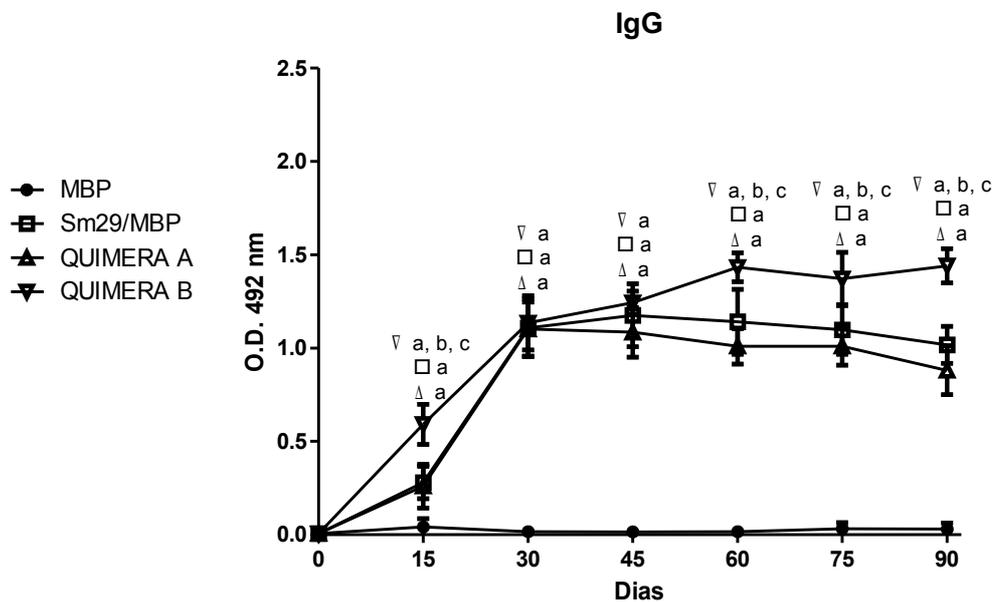
reconhecer a Quimera A (aproximadamente 17 kDa), a Quimera B (aproximadamente 20 kDa) e o controle positivo rSm29-his (16 kDa).



**FIGURA 9:** Painel A: Gel SDS-PAGE a 12% corado com coomassie blue; Painel B: análise de *western blot* das quimeras A e B. (1) marcador pré-corado de peso molecular (kDa); (2) controle positivo – rSm29-6xHis; (3) Quimera A purificada; (4) Quimera B purificada. As mesmas canaletas 2, 3 e 4 estão representadas na membrana do *western blot*, quando o anticorpo anti-histidina foi utilizado.

#### 4.2 Resposta humoral em camundongos

Para investigar o perfil de anticorpos específicos para as porções N- e C-terminais da proteína Sm29 nos soros dos camundongos imunizados, foi realizado o teste de ELISA.



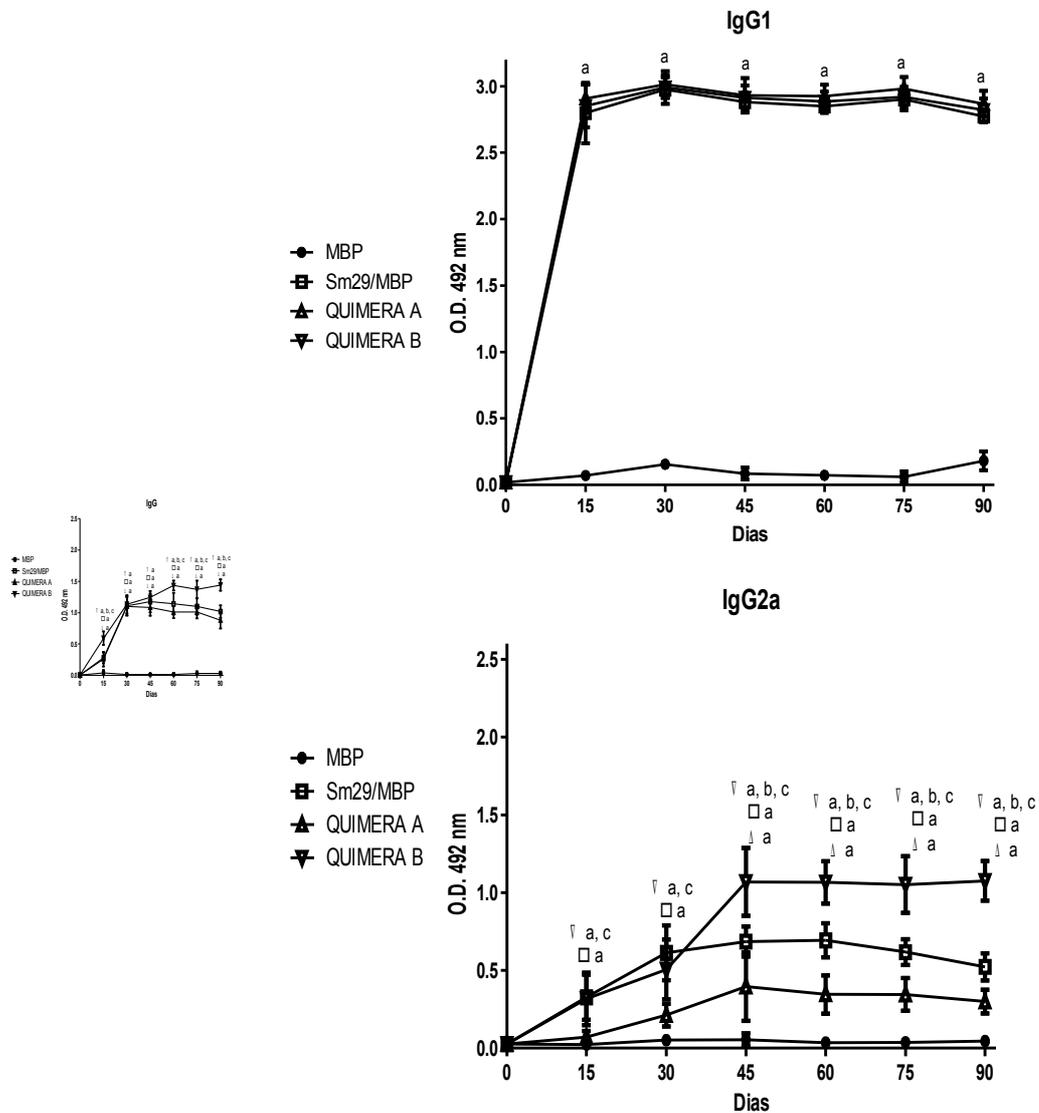
Todos os grupos experimentais testados produziram altos níveis de IgG em resposta à imunização com Sm29-MBP, Quimera A e Quimera B (Figura 10). Os maiores níveis de IgG produzidos foram induzidos pela quimera B, 15, 60, 75 e 90 dias após a imunização, e essa elevação na produção de IgG foi estatisticamente significativa. A quimera B também foi o grupo mais reconhecido por IgG, mostrando que a porção C-terminal de Sm29 é capaz de induzir altos níveis deste isotipo.

**FIGURA 10:** Cinética da resposta de IgG específica para Sm29 detectada em soros de camundongos imunizados. Os símbolos  $\square$ ,  $\Delta$ ,  $\nabla$  representam as respostas contra os antígenos Sm29-MBP, Quimera A e Quimera B, respectivamente. O símbolo *a* representa a diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo controle; *b* representa a diferença estatisticamente significativa comparada com Sm29-MBP; *c* representa diferença estatisticamente elevada comparada com Quimera A ( $p < 0,05$ ).

As subclasses IgG1 e IgG2a também foram analisadas. A cinética de IgG1 apresentou níveis significativamente elevados em relação ao grupo controle (MBP) a partir

da primeira imunização dos animais. Não foi possível detectar diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Em relação aos níveis de IgG2a produzidos, a imunização com a quimera B induziu os níveis mais elevados entre os grupos experimentais, alcançando seus maiores valores



nos dias 45, 60, 75 e 90 após a primeira imunização. Estes dados são condizentes com aqueles encontrados para IgG, demonstrando mais uma vez o papel relevante da porção C-terminal da Sm29 em induzir resposta humoral mais robusta. As cinéticas de IgG1 e IgG2a anti-Sm29 estão representadas na Figura 11.

**FIGURA 11:** Cinética das respostas de IgG1 e IgG2a específicas para Sm29 detectadas em soros de camundongos imunizados. Os símbolos  $\square$ ,  $\Delta$ ,  $\nabla$  representam as respostas contra os antígenos Sm29-MBP, Quimera A e Quimera B, respectivamente. O símbolo *a* representa a diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo controle; *b* representa a diferença estatisticamente significativa comparada com Sm29-MBP; *c* representa diferença estatisticamente elevada comparada com Quimera A ( $p < 0,05$ ).

O perfil de IgG1/IgG2a também foi analisado para as porções N- e C-terminais da Sm29 nas quimeras A e B (Tabela 4). A Quimera A apresentou um perfil elevado de IgG1/IgG2a, e mesmo tendo reduzido, esta proporção continuou elevada até o final do experimento. Já a relação IgG1/IgG2a para a Quimera B teve uma redução a partir da segunda imunização devido ao aumento da resposta de IgG2a anti-C-Sm29, permanecendo constante após a terceira dose aplicada nos animais do grupo, demonstrando uma resposta humoral mista Th1/Th2 inicialmente, com subsequente polarização da resposta Th1.



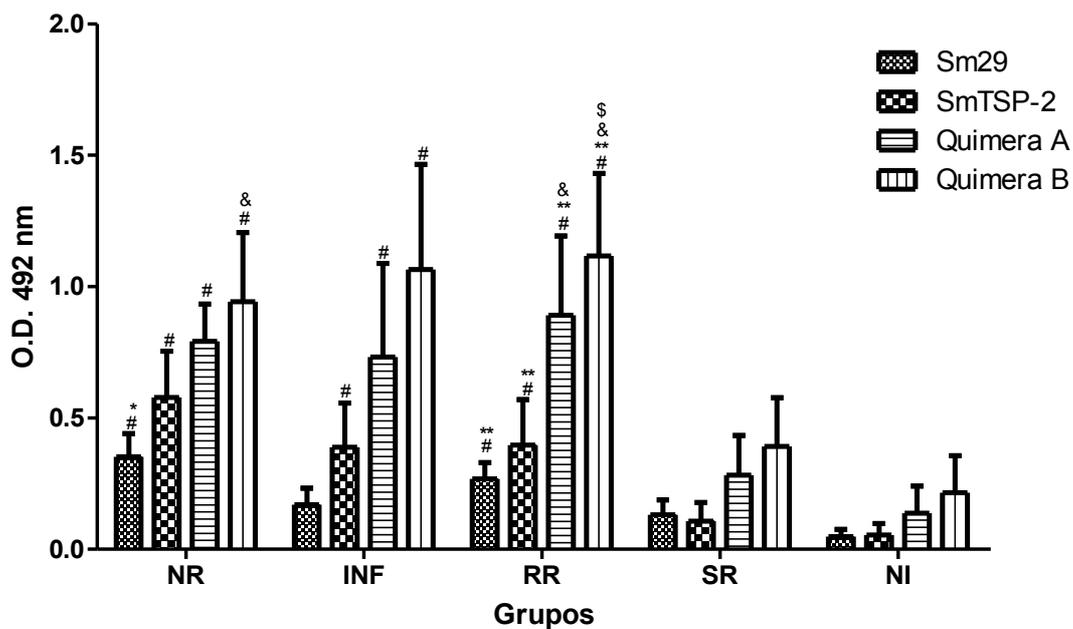
**TABELA 4**

Avaliação do perfil IgG1/IgG2a induzido pelas imunizações com as quimera A e B

<b>Dias</b>	<b>Grupos</b>					
	<b>IgG1</b>		<b>IgG2a</b>		<b>IgG1/IgG2a</b>	
	<b>Quimera A</b>	<b>Quimera B</b>	<b>Quimera A</b>	<b>Quimera B</b>	<b>Quimera A</b>	<b>Quimera B</b>
<b>15</b>	2,909 ± 0,104	2,851 ± 0,160	0,072 ± 0,039	0,317 ± 0,169	40,565	8,995661
<b>30</b>	3,012 ± 0,101	2,993 ± 0,075	0,213 ± 0,071	0,506 ± 0,192	14,176	5,914867
<b>45</b>	2,931 ± 0,130	2,913 ± 0,092	0,396 ± 0,220	1,069 ± 0,219	7,412	2,725428
<b>60</b>	2,926 ± 0,085	2,886 ± 0,075	0,346 ± 0,124	1,066 ± 0,137	8,462	2,706636
<b>75</b>	2,983 ± 0,088	2,919 ± 0,076	0,345 ± 0,105	1,052 ± 0,182	8,647	2,775351
<b>90</b>	2,983 ± 0,096	2,822 ± 0,085	0,299 ± 0,076	1,076 ± 0,128	9,586	2,623455

### 4.3 Resposta humoral em pacientes residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose

Para investigar a resposta humoral específica do isotipo IgG para as proteínas recombinantes Quimera A, Quimera B, Sm29 e SmTSP-2 presente nos soros de pacientes esquistossomóticos, a técnica de ELISA foi utilizada. Os níveis de IgG foram elevados em quase todos os grupos em relação ao grupo não infectado (NI), com exceção do grupo susceptível à reinfeção (SR) e da resposta de IgG anti-Sm29 no grupo infectado (INF) (Figura 12).



**FIGURA 12:** Perfil da resposta de IgG anti-Sm29, SmTSP-2 e as quimeras A e B em soros de pacientes esquistossomóticos. NR, indivíduos naturalmente resistentes; INF, indivíduos infectados; RR, resistentes à reinfeção; SR, susceptíveis à reinfeção; NI, não-infectados. # Estatisticamente significativo comparado ao grupo NI; \* estatisticamente significativo comparado com o grupo INF; \*\* estatisticamente significativo comparado com o grupo SR; & estatisticamente significativo comparado com Sm29 no mesmo grupo; § estatisticamente elevado comparado com SmTSP-2 no mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

Com o objetivo de se determinar em qual grupo de indivíduos as quimeras A e B são reconhecidas com melhor eficiência, foram analisados os níveis de IgG em soros de pacientes resistentes *versus* susceptíveis à infecção e à reinfecção. Analisamos os níveis de IgG entre os grupos naturalmente resistentes (NR) e infectados (INF) e entre os grupos resistentes à reinfecção (RR) e susceptíveis à reinfecção (SR). Os pacientes RR produziram níveis significativamente maiores que os indivíduos SR para todos os antígenos analisados neste estudo. Apenas a resposta anti-Sm29 foi significativa quando se comparou pacientes NR *versus* INF.

Apesar das quimeras A e B não terem apresentado diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos NR *versus* INF, o nível de resposta de IgG específica anti-Quimera B foi estatisticamente maior que a resposta deste isotipo contra a Sm29 no grupo NR. Ainda, no grupo RR, os pacientes apresentaram níveis significativamente maiores de IgG anti-quimeras A e B, em relação à Sm29, e anti-quimera B, quando comparado com SmTSP-2. Não houve diferença estatística entre Quimera A e Quimera B dentro do grupo NR ou RR.

#### **4.4 Imunidade protetora, avaliada por redução do número de vermes totais, induzida pela imunização com as quimeras em modelo murino**

Para medir os níveis de proteção induzidos pelas quimeras A e B e comparar se estes níveis foram maiores que a proteção induzida pelas proteínas Sm29 e SmTSP-2 separadamente, camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados com estes antígenos e desafiados com 100 cercárias após a imunização. Os níveis de proteção foram determinados 45 dias após a infecção (Tabela 5), e o número de vermes totais obtidos na perfusão de cada grupo de animais foi comparado com o grupo controle. Os animais

imunizados com Quimera B mostraram os maiores níveis de proteção (34,8%) quando comparado com o grupo controle. Já a Quimera A conferiu 27,8% de proteção quando comparada ao grupo controle.

Além da avaliação da proteção com estes grupos, utilizamos um grupo de camundongos C57BL/6 imunizados com Sm29-6xHis + CFA/IFA como controle do experimento. O número de vermes recuperados após infecção destes animais, de aproximadamente 50%, foi semelhante ao encontrado por Cardoso e cols. em 2008 (dados não apresentados).

**TABELA 5**

Níveis de proteção induzidos pela imunização de camundongos C57BL/6 com antígenos Sm29-MBP, SmTSP-2, Quimera A e Quimera B formulados com CpG-Alum

<b>Grupos</b>	<b>Vermes totais (média ± desvio padrão)</b>	<b>Proteção</b>
<b>Controle (MBP + CpG-Alum)</b>	46,25 ± 3,11	-
<b>Sm29-MBP + CpG-Alum</b>	36,83 ± 5,81*	20,36 %
<b>SmTSP-2-6xHis + CpG-Alum</b>	38,71 ± 4,64*	16,29 %
<b>Quimera A-6xHis + CpG-Alum</b>	33,37 ± 5,63*	27,84 %
<b>Quimera B-6xHis + CpG-Alum</b>	30,14 ± 6,57**	34,83 %

\* Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ )

# Estatisticamente significativo comparado ao grupo SmTSP-2-6xHis + CpG-Alum ( $p < 0,05$ )

## 5 DISCUSSÃO

Apesar de ser considerada uma das doenças negligenciadas no mundo, a esquistossomose é uma doença parasitária de importância mundial, sendo responsável por manifestações clínicas menos severas até as mais graves, que podem levar a morte de indivíduos infectados. Apenas na África sub-Saariana, estima-se que há 280 mil mortes por ano devido às consequências graves desta patologia (VAN DER WERF e cols., 2003). A morbidade causada pela esquistossomose é também muito importante, devido à invalidez precoce que ela pode causar, uma vez que a esquistossomose afeta as funções cognitivas e o desenvolvimento infantil e a produtividade de adultos (HOTEZ e cols., 2006). O tratamento quimioterápico é capaz de reduzir a morbidade, mas não reduz a prevalência devido aos casos de reinfecção. Desta forma, a terapia combinada à vacinação, como uma forma de controlar a esquistossomose, se mostra importante como a base para uma nova abordagem de controle.

Os estudos de vacinas anti-esquistossomóticas resultaram no descobrimento de diversos antígenos do parasita, e poucos têm sido utilizados em estudos mais aprofundados. A imunização com cercária irradiada de *S. mansoni* é capaz de induzir altos níveis de proteção em animais – 70% a 90%, este último alcançado utilizando IL-12 como adjuvante (STEK e cols., 1981; WYNN e cols., 1995), porém seu uso não é aplicável em humanos, podendo este modelo ser utilizado para auxiliar na elucidação dos mecanismos imunes envolvidos na eliminação do parasita em animais. Ao contrário do modelo de cercária irradiada, nenhum antígeno sozinho alcançou níveis tão elevados de proteção, particularmente na forma recombinante. Os seis candidatos vacinais selecionados e testados pela Organização Mundial de Saúde não alcançaram níveis maiores que 40% de proteção, que não foi validado em laboratórios independentes.

Com os avanços na biologia molecular, muito do proteoma do *S. mansoni* tem sido amplamente caracterizado (BRASCHI e cols., 2006; BRASCHI e WILSON, 2006), chamando a atenção para o estudo de proteínas localizadas no tegumento desta espécie, já que são estes os antígenos mais expostos na superfície do parasita e que estão em contato direto

com o sistema imune do hospedeiro, podendo ser então os candidatos vacinais mais interessantes. Vários trabalhos vêm sendo realizados para avaliar a proteção conferida por proteínas localizadas no tegumento de *Schistosoma mansoni*, sendo aquelas presentes nos estágios de esquistossômulo e verme adulto os alvos mais importantes, uma vez que estas são as formas infectantes presentes no hospedeiro humano (LOUKAS e cols., 2007; WILSON e COULSON, 2006). Modelos de vacinas baseados em proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e DNA tem sido estudados, e poucos apresentam proteção maior que 50%.

Dentre as diversas proteínas de tegumento estudadas, tanto aquelas descritas por Braschi e Wilson (2006), quanto as caracterizadas independentemente deste estudo, têm mostrado resultados de proteção pouco promissores. A Sm23, uma proteína da família das tetraspaninas exposta no tegumento de *S. mansoni* (BRASCHI e WILSON, 2006), é um dos seis candidatos selecionados pela OMS (BERGQUIST e COLLEY, 1998). Essa proteína alcançou sua maior eficácia quando avaliada como vacina de DNA. Da'dara e colaboradores (2003) observaram que o nível de proteção alcançado por este antígeno como vacina de DNA chegou a 44%, enquanto que sua forma recombinante formulada com alum não induziu significativa proteção em camundongos C57BL/6. Na forma de vacina de DNA, a Sm23 induziu uma resposta imune do tipo Th1, com baixa proporção de IgG1/IgG2a, enquanto que a proteína recombinante formulada com alum induziu uma resposta do tipo Th2, representada por alta proporção entre IgG1/IgG2a. Já Pacífico e colaboradores (2006), estudando a proteína Sm22.6 na forma recombinante associada a adjuvante de Freund (CFA/IFA) alcançou uma maior proteção quando comparada à sua formulação como vacina de DNA. Os camundongos C57BL/6 imunizados e desafiados com Sm22.6 recombinante em fusão com MBP foram protegidos em 34,5% e apresentaram perfil de resposta celular misto Th1/Th2. Um outro estudo utilizando a proteína de membrana do *S. mansoni* investigou o papel protetor da Sm21.6, demonstrando que a imunização de camundongos C57BL/6 com a Sm21.6 recombinante associado a adjuvante de Freund não induziu proteção aos animais, e a resposta imune observada nestes animais foi predominantemente

Th2 (LOPES e cols., 2009). Outros antígenos associados ou ancorados à membrana do tegumento do *S. mansoni* ainda não foram testados como vacinas, mas merecem atenção devido à sua localização, o que propicia seu contato direto e reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro: Sm200, Anexina, Tetraspanina B e duas outras tetraspaninas: Sm11921 e Sm07392 (LOUKAS e cols., 2007).

Duas outras proteínas encontradas no tegumento de *S. mansoni* apresentam-se, até o momento, como as mais promissoras no desenvolvimento de vacinas anti-esquistossomóticas. Tran e colaboradores (2006) demonstraram que a proteína recombinante SmTSP-2 (*loop* extracelular 2) associada a CFA/IFA foi capaz de induzir 57% de proteção em camundongos CBA, sendo este o maior nível de proteção encontrado em estudos de vacinas para *S. mansoni* (LOUKAS e cols., 2007). Em experimento com camundongos C57BL/6 realizado por Cardoso e colaboradores (2008), a proteína recombinante Sm29 associada a CFA/IFA também produziu índices altos de proteção. Nesse estudo, a imunização com Sm29 recombinante produziu uma resposta protetora de 51% e um perfil de resposta humoral e celular tipicamente Th1. Até o momento, não foi reportado na literatura nenhum estudo realizado com quimeras de proteínas de *S. mansoni*, sendo esta uma interessante estratégia no desenvolvimento de novas vacinas, permitindo a associação de proteínas que, separadamente, já produziram níveis elevados de proteção.

No presente trabalho, avaliamos a proteção induzida pela imunização de camundongos C57BL/6 com as proteínas recombinantes Sm29-MBP e SmTSP-2, isoladamente, e associadas como duas formas quiméricas, A e B. A Quimera A é produto da fusão da porção N-terminal da Sm29 com a SmTSP-2, e a Quimera B possui a porção C-terminal da Sm29 fusionada à SmTSP-2. Para avaliação da proteção, cada grupo de 10 animais foi imunizado com três doses do respectivo antígeno, desafiados com 100 cercárias quinze dias após a última imunização e, 45 dias após a infecção desafio, os vermes foram recuperados por perfusão dos vasos do sistema porta-hepático. Para controle positivo do experimento, foi usado um grupo de imunização com Sm29-6xHis associado a adjuvante de Freund (o mesmo realizado por Cardoso e cols. em 2008), e o número de vermes

recuperados por perfusão foi semelhante ao encontrado no referido estudo, garantindo a confiabilidade do nosso experimento (dados não apresentados). Observamos que, em comparação com o grupo controle (MBP + CpG-Alum), todos os grupos tiveram níveis significativos de proteção, sendo a Quimera B o grupo que induziu o maior nível de proteção (34,8%), diferença esta estatisticamente significativa quando comparada também com o grupo SmTSP-2 (16,3% de proteção). O grupo imunizado com a Quimera A teve redução da carga parasitária de 27,8%, redução esta que foi pouco maior que aquela alcançada pela proteína Sm29-MBP (20,4%) e pela SmTSP-2. Considerando que o índice de proteção de quase 35% promovido pela imunização com a Quimera B foi semelhante à soma da proteção das proteínas Sm29 e TSP-2 separadamente, é plausível afirmar que a porção C-terminal da Sm29 é responsável pela maior parte da resposta imune protetora nesta proteína, não subestimando o papel da SmTSP-2 na quimera. Tal fato pode ser explicado pelo estudo de predição de epitopos de MHC classe II (complexo principal de histocompatibilidade de classe II), o qual revelou a presença de cinco peptídeos com alto *score* de ligação para alelos HLA-DR (antígeno leucocitário humano), sendo três deles presentes na porção C-terminal da Sm29 (CARDOSO e cols., 2006a). Neste trabalho foram utilizados adjuvantes diferentes em comparação com os trabalhos de Tran e cols. (2006) e de Cardoso e cols. (2008), e por isso, uma comparação justa entre nosso trabalho e o trabalho destes dois autores não é possível. Sabe-se que novas vacinas baseadas em proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e DNA são mais seguras, mas ao mesmo tempo, são fracos indutores da resposta imune. Neste contexto, a associação de adjuvantes a tais vacinas possui um papel importante na indução da proteção (PASCUAL e cols., 2006). O uso do adjuvante de Freund, apesar de ser um potente estimulador da resposta imunológica, é tóxico e seu uso não é aprovado em humanos (O'HAGAN e cols., 2001). Apesar da proteção menor alcançada em nosso trabalho, usamos os adjuvantes CpG-Alum que estimulam a produção de resposta imune Th1 e Th2 (KLINMAN e cols., 2004; LAMBRECHT e cols., 2009), evitando respostas imunológicas polarizadas que podem ser prejudiciais ao hospedeiro (HOFFMANN e cols., 2000; WYNN e cols., 2004). Além disso, o

adjuvante alum é aprovado para uso em humanos e o CpG está em fase de teste clínico em seres humanos, em formulações de vacinas para hepatite e influenza (GUPTA e COOPER, 2008; O'HAGAN e cols., 2001).

Outra avaliação realizada em animais no presente trabalho foi o perfil de resposta humoral induzido pelas porções N- e C-terminais da Sm29 presente nas quimeras A e B, respectivamente. Os soros dos camundongos C57BL/6 imunizados com MBP (controle), Sm29-MBP, Quimera A e Quimera B foram coletados em intervalos de 15 dias, a contar da primeira imunização, e utilizados em testes de ELISA. Os animais imunizados produziram níveis elevados de IgG específicos contra cada um dos antígenos, entretanto, os níveis induzidos pela porção C-terminal (Quimera B) após a infecção desafio foram muito maiores quando comparado com a porção N-terminal na Quimera A e com a Sm29-MBP. A porção C-terminal da Sm29 também foi capaz de induzir a produção dos maiores níveis de IgG2a, porém não foi possível identificar diferenças na produção de IgG1 entre os antígenos, pois todos os grupos produziram níveis similares desta subclasse. Avaliando a proporção de IgG1/IgG2a específicos anti-C-terminal Sm29, observamos um perfil elevado no dia 15 após a primeira dose de imunização, e este foi reduzindo devido a um aumento da resposta Th1 a cada dose aplicada. Tal perfil pode ser devido às características imunoestimuladoras dos adjuvantes usados (KLINMAN e cols., 2004; LAMBRECHT e cols., 2009). Pacífico e cols. (2006) alcançaram uma resposta humoral mista Th1/Th2 e uma proteção de 34,5% com a Sm22.6, mas o adjuvante de Freund foi utilizado nas imunizações. Da'dara e cols. (2003) alcançaram 44% de proteção com a Sm23 na forma de vacina de DNA, associada à indução de uma resposta imune do tipo Th1, com baixa proporção de IgG1/IgG2a. Já Fonseca e cols. (2004) conseguiram um perfil imunológico Th1 quando associaram a proteína Sm14 com IL-12 como adjuvante, o que foi coincidente com um aumento de proteção de 25% (Sm14 + Freund) para 42%. Wynn e cols. (1995) conseguiu uma proteção alta ao imunizar animais com cercárias irradiadas de *S. mansoni* associadas à citocina IL-12, mais uma vez demonstrando o papel da resposta Th1 na indução da proteção contra a infecção pelo parasita. Outros estudos com o modelo de cercárias irradiadas em camundongos sugerem

que a proteção pode ser induzida tanto com repostas polarizadas Th1 ou Th2, quanto com uma resposta mista Th1/Th2 (HEWITSON e cols., 2005; HOFFMANN e cols., 1999). Portanto, não há um consenso entre o tipo de resposta induzida e existência ou ausência de proteção, e a escolha entre as duas vias (Th1 ou Th2) pode ser menos importante do que se pensa. Talvez uma vacina que induza uma resposta mista seja uma estratégia mais desejável (HOFFMANN e cols., 1999).

A fim de investigar a presença de anticorpos IgG específicos para as Quimeras A e B em soros de pacientes de acordo com seu *status* de resistência e susceptibilidade à infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*, o teste de ELISA foi realizado. Os resultados mostraram que os níveis de IgG anti-Quimera A e anti-Quimera B foram elevados em todos os grupos (exceto no grupo SR), em comparação com o grupo não-infectado (NI). Ambas as quimeras foram preferencialmente reconhecidas por indivíduos resistentes à reinfecção *versus* susceptíveis à reinfecção, e ainda induziram níveis de IgG estatisticamente maiores do que Sm29 no mesmo grupo (RR). A Quimera B ainda foi mais reconhecida que a SmTSP-2 neste grupo. Em seu trabalho com a proteína recombinante Sm29, Cardoso e cols. (2006) observaram que esta proteína foi preferencialmente reconhecida por anticorpos de indivíduos naturalmente resistentes em comparação com indivíduos infectados. Já Tran e cols. (2006) fizeram os estudos avaliando o reconhecimento da SmTSP-2 por IgG1 e IgG3, cujos níveis foram estatisticamente maiores nos soros de pacientes NR quando confrontados com pacientes cronicamente infectados e indivíduos não infectados. O antígeno Sm23, na forma de peptídeos, também foi estudado quanto a seu reconhecimento em soro de pacientes residentes em áreas endêmicas, e IgG3 foi o principal isotipo encontrado no reconhecimento por pacientes resistentes à infecção, ao passo que a Sm14 foi preferencialmente reconhecida por IgG1 destes pacientes (AL-SHERBINY e cols., 2003) Considerando que IgG1 e IgG3 são anticorpos efetores relacionados à opsonização, citotoxicidade celular e ativação da via clássica do complemento, o reconhecimento de antígenos por estes isotipos em pacientes resistentes à infecção e reinfecção é importante para se avaliar seu potencial como candidato vacinal.

Vários argumentos demonstram a viabilidade de desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Primeiro, o uso de cercárias irradiadas e de antígenos recombinantes como Sm29 e SmTSP-2 mostram uma proteção significativa em modelos experimentais (CARDOSO e cols., 2008; TRAN e cols., 2006; WYNN e cols., 1995); segundo, alguns indivíduos moradores de áreas endêmicas adquirem resistência natural contra a esquistossomose (CORREA-OLIVEIRA e cols., 2000); e em terceiro, vacinas recombinantes de uso veterinário contra *Echinococcus granulosus* e *Taenia ovis* têm sido usadas com sucesso (DALTON e MULCAHY, 2001). Aliado à viabilidade de se desenvolver uma vacina anti-esquistossomótica eficiente, a idéia de se associar proteínas recombinantes em formas quiméricas, ampliando a chance de uma resposta imunológica mais efetiva, constitui uma abordagem que pode tornar possível tal vacina. Neste contexto, a Quimera B mostrou resultados mais promissores quando analisados os ensaios de proteção e perfil imunológico induzido, no entanto, mais estudos precisam ser realizados para avaliar o papel protetor das quimeras estudadas neste trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

As quimeras das proteínas Sm29 e SmTSP-2, Quimera A e Quimera B, foram expressas e purificadas, sendo possível produzir quantidades suficientes para realização dos experimentos *in vivo* e *in vitro*. A Quimera B foi melhor reconhecida por anticorpos IgG nos soros de pacientes esquistossomóticos, sendo preferencialmente reconhecida por indivíduos resistentes à reinfecção em relação a indivíduos susceptíveis. A porção C-terminal da Sm29, presente na Quimera B, foi capaz de induzir a produção de níveis elevados de IgG e IgG2a em camundongos C57BL/6, quando comparado à Quimera A. Condizente com os dados da resposta humoral em humanos e animais, a proteção avaliada

em modelo murino também foi maior em animais imunizados com a Quimera B, resultando em 34,8% de redução da carga parasitária. Diante destes resultados, é possível afirmar que a Quimera B e, por sua vez, a porção C-terminal da Sm29, é a forma mais imunogênica da associação entre Sm29 e SmTSP-2, e portanto essa molécula tem um potencial para compor uma vacina anti-esquistossomótica.

## 7 PERSPECTIVAS

Mais experimentos devem ser realizados para investigar de forma mais aprofundada o papel protetor das quimeras A e B. Para tal, será necessária a avaliação histopatológica do fígado dos animais imunizados com estas quimeras a fim de verificar se houve e quanto foi a redução do número e área dos granulomas e da área de fibrose neste órgão. Além disso, é necessário avaliar a resposta celular induzida pela imunização com as Quimeras A e B. E após a realização destes estudos, mais um experimento de vacinação deve ser realizado para confirmar os dados encontrados e para a submissão do artigo científico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G., C. N. MORAIS, C. E. MONTENEGRO, *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol*, v.22, n.2, Feb, p.85-91. 2006.

AL-SHERBINY, M., A. OSMAN, R. BARAKAT, *et al.* In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta Trop*, v.88, n.2, Oct, p.117-30. 2003.

ARNAUD, V., J. LI, Y. WANG, *et al.* Regulatory role of interleukin-10 and interferon-gamma in severe hepatic central and peripheral fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum*. *J Infect Dis*, v.198, n.3, Aug 1, p.418-26. 2008.

AURIAULT, C., I. WOLOWCZUK, H. GRAS-MASSE, *et al.* Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST). *Pept Res*, v.4, n.1, Jan-Feb, p.6-11. 1991.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M., G. GAZZINELLI, S. M. ELOI-SANTOS, *et al.* Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.86, n.1, Jan-Feb, p.57-61. 1992.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.93 Suppl 1, p.95-101. 1998.

BERGQUIST, N. R. e D. G. COLLEY. Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitol Today*, v.14, n.3, Mar, p.99-104. 1998.

BERRIMAN, M., B. J. HAAS, P. T. LOVERDE, *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, v.460, n.7253, Jul 16, p.352-8. 2009.

BOTTIEAU, E., J. CLERINX, M. R. DE VEGA, *et al.* Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect*, v.52, n.5, May, p.339-45. 2006.

BRASCHI, S., R. S. CURWEN, P. D. ASHTON, *et al.* The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*, v.6, n.5, Mar, p.1471-82. 2006.

BRASCHI, S. e R. A. WILSON. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics*, v.5, n.2, Feb, p.347-56. 2006.

BRITO, C. F., C. T. FONSECA, A. M. GOES, *et al.* Human IgG1 and IgG3 recognition of *Schistosoma mansoni* 14kDa fatty acid-binding recombinant protein. *Parasite Immunol*, v.22, n.1, Jan, p.41-8. 2000.

BRUUN, B. e J. AAGAARD-HANSEN. *The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography*. Geneva: World Health Organization. 2008. 277 p.

BURKE, M. L., M. K. JONES, G. N. GOBERT, *et al.* Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*, v.31, n.4, Apr, p.163-76. 2009.

BUTTERWORTH, A. E., R. BENSTED-SMITH, A. CAPRON, *et al.* Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*, v.94 ( Pt 2), Apr, p.281-300. 1987.

CAI, P., L. BU, J. WANG, *et al.* Molecular characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein tetraspanin-2: Sequence variation and possible implications for immune evasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.372, n.1, p.197-202. 2008.

CALDAS, I. R., R. CORREA-OLIVEIRA, E. COLOSIMO, *et al.* Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg*, v.62, n.1, Jan, p.57-64. 2000.

CAPRON, A., J. P. DESSAINT, M. CAPRON, *et al.* Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, v.253, n.5491, Feb 6, p.474-5. 1975.

CAPRON, A., D. DOMBROWICZ e M. CAPRON. Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. *Microbes Infect*, v.1, n.7, Jun, p.485-90. 1999.

CARDOSO, F. C., G. C. MACEDO, E. GAVA, *et al.* *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v.2, n.10, p.e308. 2008.

CARDOSO, F. C., R. N. PACIFICO, R. A. MORTARA, *et al.* Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol*, v.144, n.3, Jun, p.382-91. 2006a.

CARDOSO, F. C., J. M. PINHO, V. AZEVEDO, *et al.* Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. *Genet Mol Res*, v.5, n.4, p.609-18. 2006b.

CAULADA-BENEDETTI, Z., F. AL-ZAMEL, A. SHER, *et al.* Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J Immunol*, v.146, n.5, Mar 1, p.1655-60. 1991.

CHITSULO, L., D. ENGELS, A. MONTRESOR, *et al.* The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*, v.77, n.1, Oct 23, p.41-51. 2000.

CIOLI, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Curr Opin Infect Dis*, v.13, n.6, Dec, p.659-663. 2000.

CIOLI, D., L. PICA-MATTOCCIA e S. ARCHER. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol Today*, v.9, n.5, May, p.162-6. 1993.

CORREA-OLIVEIRA, R., I. R. CALDAS e G. GAZZINELLI. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Today*, v.16, n.9, Sep, p.397-9. 2000.

CORREA-OLIVEIRA, R., E. J. PEARCE, G. C. OLIVEIRA, *et al.* The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.83, n.6, p.798-804. 1989.

COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Adv Parasitol*, v.39, p.271-336. 1997.

COULSON, P. S. e R. A. WILSON. Recruitment of lymphocytes to the lung through vaccination enhances the immunity of mice exposed to irradiated schistosomes. *Infect Immun*, v.65, n.1, Jan, p.42-8. 1997.

COURA, J. R. e R. S. AMARAL. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.99, n.5 Suppl 1, p.13-9. 2004.

DA'DARA, A. A., P. J. SKELLY, C. M. WALKER, *et al.* A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite Immunol*, v.25, n.8-9, Aug-Sep, p.429-37. 2003.

DALTON, J. P. e G. MULCAHY. Parasite vaccines--a reality? *Vet Parasitol*, v.98, n.1-3, Jul 12, p.149-67. 2001.

DE JESUS, A. R., A. MAGALHAES, D. G. MIRANDA, *et al.* Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun*, v.72, n.6, Jun, p.3391-7. 2004.

DOENHOFF, M. J., J. R. KUSEL, G. C. COLES, *et al.* Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.96, n.5, Sep-Oct, p.465-9. 2002.

ENGELS, D., L. CHITSULO, A. MONTRESOR, *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*, v.82, n.2, May, p.139-46. 2002.

FALLON, P. G., E. J. RICHARDSON, G. J. MCKENZIE, *et al.* Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol*, v.164, n.5, Mar 1, p.2585-91. 2000.

FONSECA, C. T., C. F. BRITO, J. B. ALVES, *et al.* IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. *Vaccine*, v.22, n.3-4, Jan 2, p.503-10. 2004.

GOBERT, G. N. e D. P. MCMANUS. Update on paramyosin in parasitic worms. *Parasitology International*, v.54, n.2, p.101-107. 2005.

GRYSEELS, B., K. POLMAN, J. CLERINX, *et al.* Human schistosomiasis. *Lancet*, v.368, n.9541, Sep 23, p.1106-18. 2006.

GUPTA, K. e C. COOPER. A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs R D*, v.9, n.3, p.137-45. 2008.

HAAS, B. J., M. BERRIMAN, H. HIRAI, *et al.* Schistosoma mansoni genome: closing in on a final gene set. *Exp Parasitol*, v.117, n.3, Nov, p.225-8. 2007.

HAGAN, P., U. J. BLUMENTHAL, D. DUNN, *et al.* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with Schistosoma haematobium. *Nature*, v.349, n.6306, p.243-245. 1991.

HAGAN, P., H. A. WILKINS, U. J. BLUMENTHAL, *et al.* Eosinophilia and resistance to Schistosoma haematobium in man. *Parasite Immunol*, v.7, n.6, Nov, p.625-32. 1985.

HEWITSON, J. P., P. A. HAMBLIN e A. P. MOUNTFORD. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol*, v.27, n.7-8, Jul-Aug, p.271-80. 2005.

HOFFMANN, K. F., P. CASPAR, A. W. CHEEVER, *et al.* IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with Schistosoma mansoni eggs and IL-12. *J Immunol*, v.161, n.8, Oct 15, p.4201-10. 1998.

HOFFMANN, K. F., A. W. CHEEVER e T. A. WYNN. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*, v.164, n.12, Jun 15, p.6406-16. 2000.

HOFFMANN, K. F., S. L. JAMES, A. W. CHEEVER, *et al.* Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, v.163, n.2, Jul 15, p.927-38. 1999.

HOGG, K. G., S. KUMKATE, S. ANDERSON, *et al.* Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun*, v.71, n.6, Jun, p.3563-71. 2003a.

HOGG, K. G., S. KUMKATE e A. P. MOUNTFORD. IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Int Immunol*, v.15, n.12, Dec, p.1451-9. 2003b.

HOTEZ, P. J., D. H. MOLYNEUX, A. FENWICK, *et al.* Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med*, v.3, n.5, Jan, p.e102. 2006.

JANKOVIC, D., T. A. WYNN, M. C. KULLBERG, *et al.* Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *J Immunol*, v.162, n.1, Jan 1, p.345-51. 1999.

JASSIM, A., K. HASSAN e D. CATTY. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol*, v.9, n.6, Nov, p.627-50. 1987.

JOSEPH, M., C. AURIAULT, A. CAPRON, *et al.* A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, v.303, n.5920, Jun 30, p.810-2. 1983.

KHALIFE, J., M. CAPRON, A. CAPRON, *et al.* Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J Exp Med*, v.164, n.5, Nov 1, p.1626-40. 1986.

KHALIFE, J., D. W. DUNNE, B. A. RICHARDSON, *et al.* Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, v.142, n.12, Jun 15, p.4422-7. 1989.

KLINMAN, D. M., D. CURRIE, I. GURSEL, *et al.* Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev*, v.199, Jun, p.201-16. 2004.

LAMBRECHT, B. N., M. KOOL, M. A. M. WILLART, *et al.* Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, v.21, n.1, p.23-29. 2009.

LOPES, D. O., L. F. PAIVA, M. A. MARTINS, *et al.* Sm21.6 a novel EF-hand family protein member located on the surface of *Schistosoma mansoni* adult worm that failed to induce protection against challenge infection but reduced liver pathology. *Vaccine*, v.27, n.31, p.4127-4135. 2009.

LOUKAS, A., M. TRAN e M. S. PEARSON. Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int J Parasitol*, v.37, n.3-4, Mar, p.257-63. 2007.

MANGOLD, B. L. e D. A. DEAN. Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J Immunol*, v.136, n.7, Apr 1, p.2644-8. 1986.

MCMANUS, D. P. e A. LOUKAS. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*, v.21, n.1, Jan, p.225-42. 2008.

MONTENEGRO, S. M., P. MIRANDA, S. MAHANTY, *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis*, v.179, n.6, Jun, p.1502-14. 1999.

MOSER, D., M. TENDLER, G. GRIFFITHS, *et al.* A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J Biol Chem*, v.266, n.13, May 5, p.8447-54. 1991.

MOUNTFORD, A. P., P. S. COULSON e R. A. WILSON. Antigen localization and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, v.97 ( Pt 1), Aug, p.11-25. 1988.

O'HAGAN, D. T., M. L. MACKICHAN e M. SINGH. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng*, v.18, n.3, Oct 15, p.69-85. 2001.

PACÍFICO, L. G. G., C. T. FONSECA, L. CHIARI, *et al.* Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology*, v.211, n.1-2, p.97-104. 2006.

PASCUAL, D. M., R. D. MORALES, E. D. GIL, *et al.* Adjuvants: present regulatory challenges. *Vaccine*, v.24 Suppl 2, Apr 12, p.S2-88-9. 2006.

PEARCE, E. J., S. L. JAMES, S. HIENY, *et al.* Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.85, n.15, Aug, p.5678-82. 1988.

PEARCE, E. J. e A. S. MACDONALD. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*, v.2, n.7, Jul, p.499-511. 2002.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomiase: a doença. In: L. Rey (Ed.). *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. *Schistosoma mansoni* e esquistossomiase: a doença, p.426-443

REYNOLDS, S. R., C. B. SHOEMAKER e D. A. HARN. T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, v.149, n.12, Dec 15, p.3995-4001. 1992.

RIBEIRO DE JESUS, A., I. ARAUJO, O. BACELLAR, *et al.* Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infect Immun*, v.68, n.5, May, p.2797-803. 2000.

RIHET, P., C. E. DEMEURE, A. BOURGOIS, *et al.* Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur J Immunol*, v.21, n.11, Nov, p.2679-86. 1991.

ROBERTS, M., A. E. BUTTERWORTH, G. KIMANI, *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun*, v.61, n.12, Dec, p.4984-93. 1993.

ROSS, A. G., D. VICKERS, G. R. OLDS, *et al.* Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis*, v.7, n.3, Mar, p.218-24. 2007.

SHER, A., R. L. COFFMAN, S. HIENY, *et al.* Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.1, Jan, p.61-5. 1990.

SHOEMAKER, C., A. GROSS, A. GEBREMICHAEL, *et al.* cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.5, Mar 1, p.1842-6. 1992.

SMYTH, D., D. P. MCMANUS, M. J. SMOUT, *et al.* Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method. *Infect Immun*, v.71, n.5, May, p.2548-54. 2003.

SMYTHIES, L. E., P. S. COULSON e R. A. WILSON. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol*, v.149, n.11, Dec 1, p.3654-8. 1992.

SOISSON, L. M., C. P. MASTERSON, T. D. TOM, *et al.* Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J Immunol*, v.149, n.11, Dec 1, p.3612-20. 1992.

STEINMANN, P., J. KEISER, R. BOS, *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*, v.6, n.7, Jul, p.411-25. 2006.

STEK, M. F., P. MINARD, D. A. DEAN, *et al.* Immunization of Baboons with *Schistosoma mansoni* Cercariae attenuated by gamma irradiation. *Science*, v.212, n.4502, Jun 26, p.1518-20. 1981.

TEIXEIRA-CARVALHO, A., O. A. MARTINS-FILHO, V. PERUHYPE-MAGALHAES, *et al.* Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Trop*, v.108, n.2-3, Nov-Dec, p.139-49. 2008.

TENDLER, M., M. M. VILAR, C. A. BRITO, *et al.* Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.90, n.2, Mar-Apr, p.255-6. 1995.

TRAN, M. H., M. S. PEARSON, J. M. BETHONY, *et al.* Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*, v.12, n.7, Jul, p.835-40. 2006.

TROTTEIN, F., C. GODIN, R. J. PIERCE, *et al.* Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. *Mol Biochem Parasitol*, v.54, n.1, Aug, p.63-72. 1992.

VAN DER WERF, M. J., S. J. DE VLAS, S. BROOKER, *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop*, v.86, n.2-3, May, p.125-39. 2003.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S., R. DEMARCO, E. A. MARTINS, *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet*, v.35, n.2, Oct, p.148-57. 2003.

VIANA, I. R., R. CORREA-OLIVEIRA, S. CARVALHO ODOS, *et al.* Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol*, v.17, n.6, Jun, p.297-304. 1995.

VIANA, I. R., A. SHER, O. S. CARVALHO, *et al.* Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.88, n.4, Jul-Aug, p.466-70. 1994.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF SCHISTOSOMIASIS. *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis : report of a WHO expert committee*. Geneva: World Health Organization. 2002. vi, 57 p.

WILSON, R. A. e P. S. COULSON. Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101 Suppl 1, Sep, p.13-20. 2006.

WYNN, T. A., D. JANKOVIC, S. HIENY, *et al.* IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. 154: 4701-4709 p. 1995.

WYNN, T. A., I. P. OSWALD, I. A. ELTOUM, *et al.* Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, v.153, n.11, Dec 1, p.5200-9. 1994.

WYNN, T. A., R. W. THOMPSON, A. W. CHEEVER, *et al.* Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev*, v.201, Oct, p.156-67. 2004.

XU, X., D. ZHANG, W. SUN, *et al.* A *Schistosoma japonicum* chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens. *BMC Infect Dis*, v.9, p.54. 2009.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)