



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Natan Raimundo Gonçalves de Assis

TESE DE DOUTORADO:

Avaliação das vacinas de DNA contendo os genes
Sm29 e TSP-2 e a utilização dos nanobastões de ouro
como uma nova formulação vacinal contra a
esquistossomose mansônica

Dr. Sergio Costa Oliveira
Orientador

Abril de 2016

Natan Raimundo Gonçalves de Assis

Avaliação das vacinas de DNA contendo os genes
Sm29 e TSP-2 e a utilização dos nanobastões de ouro
como uma nova formulação vacinal contra a
esquistossomose mansônica

*Tese de doutorado apresentada ao
curso de pós-graduação em
Bioquímica e Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais.*

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

Abril, 2016

043

Assis, Natan Raimundo Gonçalves de.

Avaliação das vacinas de DNA contendo os genes Sm29 e TSP-2 e a utilização dos nanobastões de ouro como uma nova formulação vacinal contra a Esquistossomose mansônica [manuscrito] / Natan Raimundo Gonçalves de Assis. – 2016.

149 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Bioquímica e imunologia - Teses. 2. Esquistossomose - Teses. 3. Vacina. 4. Nanotecnologia. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.


CDU: 577

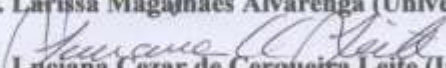


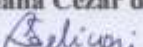
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE NATAN RAIMUNDO GONÇALVES DE ASSIS. Aos vinte e oito dias do mês de abril de 2016 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação das vacinas de DNA contendo os genes Sm29 e TSP-2 e a utilização dos nanobastões de ouro como uma nova formulação vacinal contra a esquistossomose mansônica", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Larissa Magalhães Alvarenga (Universidade Federal do Paraná), aprovado; Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite (Instituto Butantan), aprovado; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Cristina Toscano Fonseca (Fiocruz - MG), aprovado; Dr. Sergio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de abril de 2016.

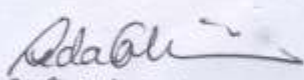

 Dra. Larissa Magalhães Alvarenga (Universidade Federal do Paraná)


 Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite (Instituto Butantan)


 Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)


 Dra. Cristina Toscano Fonseca (Fiocruz - MG)


 Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)


 Profª Lúcia Quercia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Este trabalho foi financiado com verbas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a Deus por tudo. Gostaria muito de agradecer também ao meu orientador Sergio Costa Oliveira pela oportunidade concedida, assim como a sua dedicação, profissionalismo e paciência. Muito obrigado pelos momentos de descontração e diversão também. Valeu chefe!

Gostaria muito de agradecer também ao professor Luis Orlando Ladeira, o qual me incentivou muito neste trabalho. Muito obrigado pelos momentos de discussão científica, empolgação com o trabalho e pelos conselhos sensacionais.

Nunca, em nada do que faça na minha vida, eu poderia deixar de agradecer a minha mãe e ao meu pai. Muito obrigado Mãe por me amar incondicionalmente, você é simplesmente a mãe mais perfeita do mundo! Pai, muito obrigado também por me amar incondicionalmente, muito obrigado também pelos valores e exemplo de seriedade e compromisso que aprendi com o senhor. Muito obrigado Pai e Mãe, amo vocês infinitamente! Muito obrigado também a todos os meus familiares. Amo vocês também!

Não poderia deixar de agradecer também ao querido grupo Xisto! Muito obrigado a Suellen, que já está nesse laboratório a 79 anos e sabe muito de tudo. Muito obrigado Bárbara pelas discussões produtivas. Obrigado Fábio Mambelli pela ajuda e pelas discussões. Muito obrigado mesmo a todo grupo Xisto que tem que aturar minhas perfusões e esplenócitos de 500 animais. Sou muito grato a vocês. Muito obrigado a todos que já fizeram parte desse grupo também.

Gostaria de agradecer ao mais novo mestre, Anderson Caires, o qual foi o responsável por inúmeras discussões e participou muito do desenrolar desse trabalho. Vamos ficar ricos cara!!! Gostaria de agradecer também a Claudilene.

Gostaria de agradecer também a todos os Lidianos pelos momentos super divertidos que vivemos juntos. Muito obrigado pelas piadas, pelas brincadeiras e besteiras. Fiz muitos amigos durante meu tempo aqui e sou muito grato a todos vocês. Vocês são espetaculares. Obrigado por tudo família Lidiana!

Muito obrigado ao Marco Tulio, porque muito ajuda quem não atrapalha.

Jamais poderia deixar de agradecer a nossa administradora Sandra, a qual não me deixa engordar de tanto carregar caixas, brincadeira viu Sandra! Muito obrigado por esses anos de extrema dedicação e profissionalismo, além disso, muito obrigado também pelos momentos de atenção e carinho. Saiba que estou torcendo por você hoje e sempre. Gostaria muito de agradecer também a todos os profissionais do biotério, os quais sempre demonstraram eficiência, profissionalismo e boa vontade. Muito obrigado, sem vocês, esse trabalho não seria possível.

Muito obrigado também aos meus amigos moradores da República da Girafa. Em especial, gostaria muito de agradecer ao meu amigo Gustavo, o qual já é meu amigo a muito tempo. Muito obrigado pelo companheirismo, altruísmo e besteiras. Estou torcendo muito por você, sei que você é um cara muito esforçado e se dará muito bem na vida. Gostaria de agradecer a todos os meus amigos, pelo companheirismo, diversão e besteira. Valeu Matheus!

Muito obrigado a todas as pessoas que direta ou indiretamente estão relacionadas a esse trabalho e/ou a minha vida. Muito obrigado, sem amigos não sou ninguém! Obrigado também as agências de fomento CAPES e CNPq.

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1-INTRODUÇÃO	5
1.1- Distribuição global da esquistossomose	5
1.2- Ciclo de vida	8
1.3- Formas clínicas da esquistossomose	10
1.4- Resposta imune na esquistossomose.....	12
1.4.1- Imunidade inata contra esquistossomose	13
1.4.2- Imunidade adaptativa contra a esquistossomose.....	16
1.5- Desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica	19
1.5.1- Proteínas do tegumento como candidatos vacinais	20
1.5.2- Candidatos vacinais Sm29 e TSP-2	22
1.6- Vacinas de DNA	25
1.6.1- Otimização de vacinas de DNA	26
1.6.2- Principais formas de administração de vacinas de DNA.....	28
1.7- Vacinas de DNA e a esquistossomose mansônica	31
1.8 Nanotecnologia	35
1.8.1 Nanopartículas e o sistema imune	36
1.8.1 Nanotecnologia e o ouro	41
1.8.2 Nanobastões de ouro.....	41
1.8.3 Biofuncionalização	42
1.8.4 Nanobastões de ouro como carreadores vacinais.....	44
2- JUSTIFICATIVA	46
3- OBJETIVO.....	48
3.1- Geral	48
3.2- Específicos.....	48

4- METODOLOGIA.....	50
4. 1- Animais e parasitas	50
4.2- Construções dos plasmídeos	50
4.4 Produção de Sm29 ,TSP-2 e quimera recombinante.....	52
4.5.1- Crescimento e transfecção das células	55
4.5.2- Extração de RNA total.....	56
4.5.3- Síntese cDNA.....	56
4.5.4- Escolha e Síntese dos Iniciadores.....	57
4.5.5- Amplificação do cDNA.....	57
4.6- Western blot.....	59
4.6.1- Transfecção de células BHK-21	60
4.6.2- Extração Proteica.....	60
4.6.3- Western Blot.....	60
4.7- Imunização e infecção.....	61
4.8- Análise da carga parasitária	62
4.9- Análise de anticorpos anti-Sm29,anti-TSP-2 e anti-quimera.....	62
4.11- Análise de citocinas.....	63
4.13 Conjugação da proteína rSm29 nos nanobastões de ouro	65
4.13.1 Funcionalização com o grupamento carboxílico ou amínico	66
4.13.2 Funcionalização direta com a proteína rSm29.....	66
4.14 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	67
4.15 ELISA para caracterização da ligação da proteína rSm29 a nanobastões de ouro...	67
4.16 Avaliação da citotoxicidade celular dos nanobastões de ouro	68
4.17 Derivação de células dendríticas.....	69
4.18 Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas.....	69
4.19 Avaliação da ativação de células dendríticas	70
4.20 Avaliação das citocinas produzidas por células dendríticas.....	71
5- RESULTADOS CAPÍTULO 1.....	74

5.1- Vacinas de DNA.....	74
5.1.1 Avaliação transcricional das vacinas de DNA	74
5.1.3 Avaliação da produção de anticorpos do isotipo IgG anti-Sm29, anti-TSP-2 e anti-quimera	78
5.1.4 Perfil de citocinas.....	80
5.1.5 Carga parasitária recuperada.....	84
5.1.6 Área de granulomas.....	86
6 - DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 1.....	88
7 – RESULTADOS CAPÍTULO 2.....	96
7.1 Nanobastões de ouro	96
7.1.1 Caracterização dos nanobastões de ouro.....	96
7.1.2 Purificação dos nanobastões de ouro	97
7.1.3- Ligação da proteína rSm29 aos nanobastões de ouro.....	98
7.1.4 Identificação da proteína ligada aos nanobastões de ouro	102
7.1.5 Teste de citotoxicidade dos nanobastões de ouro	103
7.1.6 Níveis de proteção alcançados com a imunização com os nanobastões de ouro	105
7.1.7 Níveis de anticorpos dos animais imunizados com os nanobastões de ouro	106
7.1.8 Perfil de citocinas dos animais imunizados com os nanobastões de ouro	108
7.1.9 Avaliação das células produtoras de IFN- γ pelos animais imunizados com os nanobastões de ouro	112
7.1.10 Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas e nanobastões de ouro	115
7.1.11 Ativação de células dendríticas por nanobastões de ouro	119
7.1.12 Avaliação dos níveis de IL-12 e IL-1 β produzidas por células dendríticas incubadas com nanobastões de ouro	120
8 – DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 2.....	123
9- CONCLUSÃO.....	134
10 - PERSPECTIVAS	135

11- ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	136
12- ANEXO.....	138
13- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

Lista de Figuras

FIGURA 1 DISTRIBUIÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE AO REDOR DO MUNDO NO ANO DE 2014....	5
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL.	7
FIGURA 3. POPULAÇÃO AVALIADA E PERCENTUAL DE PESSOAS CONSIDERADAS COMO POSITIVAS PARA ESQUISTOSSOMOSE.	8
FIGURA 4. CICLO DE VIDA DO SCHISTOSOMA MANSONI.	10
FIGURA 5. DESENHO ESQUEMÁTICO DO TEGUMENTO DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> E A POSSÍVEL LOCALIZAÇÃO DE ALGUMAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM TAL ESTRUTURA.	21
FIGURA 6. PRINCIPAIS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS DE DNA.....	29
FIGURA 7 VISÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS MECANISMOS DE CAPTAÇÃO E APRESENTAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR APCs.....	39
FIGURA 8 PUMVC3 (ALDEVRON)	51
FIGURA 9 ESQUEMA DAS SEQUÊNCIAS PRESENTE NA QUIMERA RECOMBINANTE.	54
FIGURA 10 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA.	55
FIGURA 11 ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO CELULAR.	56
FIGURA 12. PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	59
FIGURA 13 AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS VACINAS DE DNA EM CÉLULAS BHK-21. ..	75
FIGURA 14 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA IN VITRO DAS VACINAS DE DNA POR WESTERNBLOT UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-SM29 OU ANTI-TSP-2. ..	77
FIGURA 15 NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG ANTI-SM29, ANTI-TSP-2 E ANTI-QUIMERA DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS VACINAS DE DNA.	79
FIGURA 16 PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO.....	81
FIGURA 17 PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO E INFECÇÃO.	82
FIGURA 18 NÍVEIS DE PROTEÇÃO INDUZIDOS PELA IMUNIZAÇÃO COM AS VACINAS DE DNA.	85
FIGURA 19 REDUÇÃO DE ÁREA DE GRANULOMA E GRANULOMAS REPRESENTATIVOS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS VACINAS DE DNA E DESAFIADOS COM CERCÁRIAS DE <i>S. MANSONI</i>.	87
FIGURA 20 ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	96
FIGURA 21 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.	97

FIGURA 22 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.	98
FIGURA 23 ESPECTRO DE UV-VIS.	99
FIGURA 24 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.	101
FIGURA 25 ELISA DOS NANOBASTÕES DE OURO.	102
FIGURA 26 TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR DOS NANOBASTÕES DE OURO EM CÉLULAS BHK-21.	104
FIGURA 27 TOTAL DE VERMES RECUPERADOS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM NANOBASTÕES DE OURO E NÍVEIS DE PROTEÇÃO.	105
FIGURA 28 NÍVEIS DE IGG TOTAL ANTI-RSm29 DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM OS NANOBASTÕES DE OURO.	107
FIGURA 29 PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO COM NANOBASTÕES DE OURO. ..	109
FIGURA 30 PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO COM NANOBASTÕES DE OURO E INFECÇÃO COM CERCARIA DE <i>S. MANSONI</i>.	110
FIGURA 31 PERCENTUAL DE CÉLULAS CD4+ E CD8+ PRODUTORAS DE IFN-γ EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM NANOBASTÕES DE OURO QUANDO ESTIMULADOS COM CONCAVALINA A.	113
FIGURA 32 PERCENTUAL DE CÉLULAS CD4+ E CD8+ PRODUTORAS DE IFN-γ EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM NANOBASTÕES DE OURO E DESAFIADOS COM CERCARIAS DE <i>S. MANSONI</i> QUANDO REESTIMULADOS COM CONA.	114
FIGURA 33 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INCUBADAS COM NANOBASTÕES DE OURO.	117
FIGURA 34 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INCUBADAS COM NANOBASTÕES DE OURO.	118
FIGURA 35 AVALIAÇÃO DO AMADURECIMENTO E ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS POR NANOBASTÕES DE OURO.	119
FIGURA 36 –PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS QUANDO ESTIMULADAS COM NANOBASTÕES DE OURO.	121

Lista de abreviaturas utilizadas neste trabalho

μg – Micrograma

μL – Microlitro

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

AuNRs – Nanobastões de ouro

AuNRs-NH₂ – Nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina

BHK-21- *Baby hamster kidney cells 21* (Células de rins de filhotes de hamster)

cDNA – DNA complementar

ConA – Concanavalina A

CTAB – Brometo de cetil-trimetilamônio

DNA – Ácido desoxiribonucléico

DP – Desvio Padrão

dsRNA – RNA de fita dupla

ELISA – Ensaio de absorção imunoenzimático

FABP – Proteína ligadora de ácido graxo

HRP – *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de rabanete)

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule 1* (Molécula de adesão intercelular)

ICL – Alça intracelular

IFN-γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

kDa – QuiloDalton

KLH – Hemocianina

KO – *Knockout*

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mM – Milímetro

mRNA – RNA mensageiro

nm – Nanometro

NO – Óxido Nítrico

PBS – Tampão salina fosfato

PMN - Polimorfonucleares

pmoles – Picomoles

RNA – Ácido ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

rt-PCR – Reação de polimerase em cadeia em tempo real

SEA – Antígenos de ovos de *Schistosoma mansoni*

SFB – Soro fetal bovino

SWAP – Preparado de antígenos de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

TGF-β – Fator de crescimento transformador β

Th1 – T *helper* 1 (Células T auxiliaries tipo 1)

Th17 – T *helper* 17 (Células T auxiliaries tipo 17)

Th2 – T *helper* 2 (Células T auxiliaries tipo 2)

TLR – Receptor do tipo toll

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

TNFRI – Receptor de fator de necrose tumoral I

tRNA – RNA transportador

RESUMO

Esquistossomose é uma importante parasitose mundial, afetando mais de 207 milhões de pessoas em 76 países ao redor do mundo e causando aproximadamente 250.000 mortes por ano. Atualmente, a estratégia adotada para o controle da esquistossomose é a utilização de quimioterápicos, como por exemplo, Praziquantel. Porém, altas taxas de reinfecção após o tratamento limitam tal estratégia e pressupõe a necessidade de outras formas de controle como vacinação. Sm29 e tetraspanina-2 são duas proteínas encontradas no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*, e são consideradas como potenciais candidatos vacinais. Neste trabalho objetivamos avaliar em modelo murino vacinas de DNA contendo tais genes, sozinhas ou conjuntamente. Através de avaliações por RT-PCR e western blot, confirmamos que nossas vacinas de DNA apresentavam a capacidade de serem transcritas e traduzidas em células BHK-21. Quando avaliado o perfil da resposta imunológica, observamos um perfil Th1 com a produção das citocinas TNF- α e IFN- γ . Quando avaliada a redução de vermes e redução na área dos granulomas hepáticos, o plasmídeo pUMVC3/Chimera foi o mais promissor (31% e 37%, respectivamente). Devido as características químicas, físicas e imunológicas das nanopartículas, nanocarreadores vem atraindo a atenção de diversos pesquisadores. No campo da nanotecnologia, os nanobastões de ouro aparecem como candidatos promissores como carreadores vacinais. Neste trabalho, ligamos a proteína rSm29 de *S. mansoni* em nanobastões de ouro, diretamente ou através da funcionalização com a cisteamina. Quando avaliado o potencial protetor de nossos candidatos, os animais do grupo AuNRs-NH₂-rSm29 apresentaram os maiores níveis de proteção (29%), sendo que, tais níveis de proteção foram principalmente relacionados a redução no número de vermes fêmeas. Os resultados

indicam que a resposta imune protetora obtida foi mediada principalmente por uma resposta de perfil Th1, com produção de IFN- γ e TNF- α . Ademais, o grupo imunizado com AuNRs-NH₂-rSm29 foram capazes de induzir a ativação de células dendríticas in vitro, aumentando a expressão de MHCII e MHCI e a produção de IL-1 β . Em resumo, a estratégia de vacinação utilizando nanopartículas como avaliado nesse estudo, demonstrou ser promissora para a obtenção de novas formulações vacinais para o controle de doenças infecciosas.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an important parasitic disease worldwide affecting more than 207 million people in 76 countries around the world and causing about 250.000 deaths per year. Nowadays, the main strategy adopted for the control of schistosomes is the use of safe chemotherapy, as the use of praziquantel. However, the high rates of reinfection after the treatment restrict it as a strategy and assume the need for other forms of control such as vaccination. Sm29 and tetraspanin-2 are two proteins localized in *S. mansoni* tegument of adult worms and schistosomula, and are considered as powerful vaccine candidates. In this study, we aim to evaluate DNA vaccines carrying such genes, alone or together in a murine model. By western blot and RT-PCR analysis, we confirmed that studied DNA vaccines were transcribed and translated in BHK-21 cells. We evaluated the worm burden and liver granuloma area reduction, the plasmid pUMVC3/Chimera was the most effective one (31% and 37%, respectively). When the cytokine profile was evaluated, we found production of Th1 cytokines such TNF- α and IFN- γ that correlates with protection.. Because of the chemical, physical and immunological characteristics of nanoparticles, nanocarriers got the attention of the researchers. In the field of nanotechnology, the gold nanorods are considered potential vaccine carriers. Herein, we bounded the *S. mansoni* rSm29 protein to gold nanorods, by a cysteamine functionalization or directly. When worm burden was evaluated, the AuNRs-NH₂-rSm29 group of immunized mice showed the best protection levels (29%). Following AuNRs-NH₂-rSm29 immunization, we determined a Th1 immunological response in mice with production of IFN- γ and TNF- α . Furthermore, the AuNRs-NH₂-rSm29 vaccinated mice were able to activate dendritic cells *in vitro*, enhancing MHCII and MHCI expression and production of IL-

1β. In summary, immunization strategy using nanorods has a potential use in vaccine development against infectious diseases as demonstrated here.

.

1-INTRODUÇÃO

1.1- Distribuição global da esquistossomose

A esquistossomose afeta aproximadamente 207 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que destas, 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões desenvolvem a forma severa da doença (McManus and Loukas, 2008; WHO, 2010). Essa enfermidade apresenta distribuição focal ao redor do mundo, uma vez que a transmissão depende de caramujos hospedeiros específicos e atividades humanas que permitam a contaminação da água e conseqüente infecção (Gryseels et al., 2006; WHO, 2010). A distribuição global é representada na Figura 1.

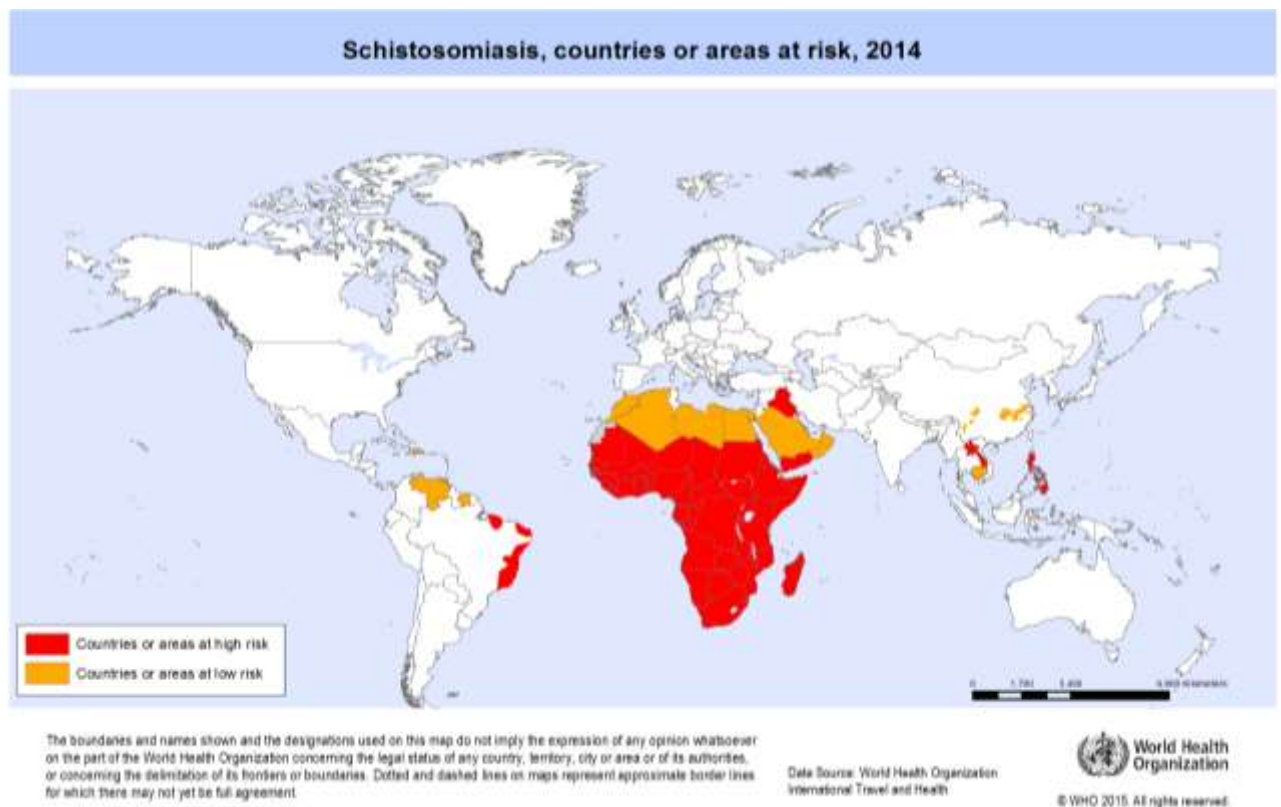


Figura 1 Distribuição da esquistossomose ao redor do mundo no ano de 2014.
Adaptado de (WHO, 2015).

A esquistossomose é endêmica em áreas tropicais e subtropicais e afeta aproximadamente 76 países, sendo a esquistossomose mansônica encontrada principalmente em países subsaarianos, Egito, Líbia, Arábia peninsular, ilhas caribenhas, Venezuela e Brasil (Chitsulo et al., 2004; WHO, 2010). Várias estratégias de controle de transmissão da esquistossomose vem sendo adotadas por várias agências governamentais e atingido resultados satisfatórios, como no Japão, Tunísia e a República Islâmica do Irã, porém, em países como Brasil e Venezuela, mesmo com esforços realizados pelos governos locais, o processo de transmissão da esquistossomose não foi ainda eficientemente controlada (WHO, 2010). Epidemiologicamente, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, são as espécies mais importantes, nas quais os esforços das pesquisas devem ser concentrados (Shabaan et al., 2003). A esquistossomose mansônica endêmica é determinada principalmente pela distribuição do hospedeiro intermediário, caramujos aquáticos pulmonados do gênero *Biomphalaria* (Stelma et al., 1993). A disseminação da esquistossomose no Brasil ocorreu devido às correntes migratórias que se deslocavam da costa do país para o seu interior, e a existência de hospedeiros intermediários, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, susceptíveis à infecção por *S. mansoni* (Coura and Amaral, 2004). A fixação do *S. mansoni* no Brasil ocorreu então, seguramente, devido ao encontro de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes à sua região de origem (Despres et al., 1993). No Brasil a transmissão da esquistossomose ocorre em uma vasta área endêmica, que abrange desde o estado do Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, além de focos isolados em outras regiões do país (Coura and Amaral, 2004). A distribuição da esquistossomose no Brasil está representada na Figura 2.

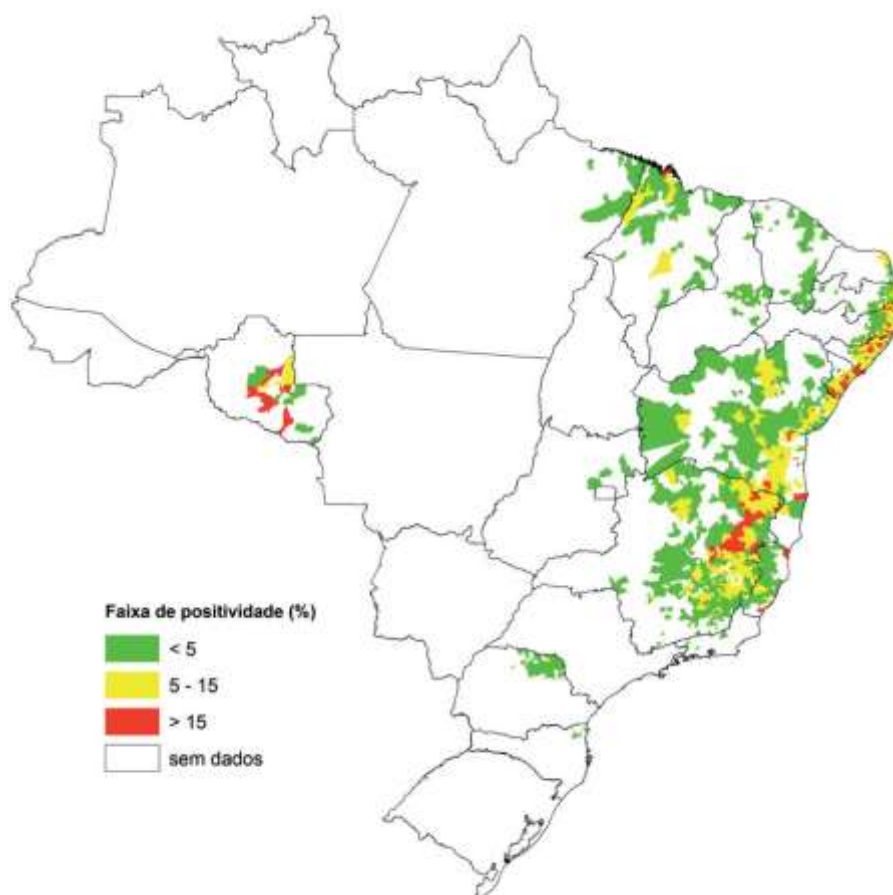


Figura 2. Distribuição da esquistossomose no Brasil. Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS. Adaptado de (Brasil, 2011-2015)

A estratégia para o controle nas últimas duas décadas tem sido focada no tratamento dos grupos de alto risco, buscando reduzir a prevalência da forma clínica hepato-esplênica da esquistossomose intestinal (Barbosa and Coimbra Junior, 1992; Magnussen, 2003). Depois da malária, a esquistossomose é a segunda doença tropical mais importante na área de saúde pública, causando cerca de 280.000 mortes anuais (Hotez et al., 2008; King et al., 2006; Steinmann et al., 2006). Atualmente, a principal forma de tratamento é a quimioterapia, sendo o praziquantel e a oxaminiquina as principais drogas contra o *S. mansoni*. Estudos realizados por (Ferrari et al., 2003), demonstraram que praziquantel foi mais eficiente que a

oxaminiquina no tratamento de pacientes infectados com esquistossomose mansônica quando examinados por oograma quantitativo da mucosa retal, enquanto que nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois tratamentos quando análises fecais foram realizadas. Apesar de esforços do governo e anos de tratamento em massa da população, a esquistossomose ainda não foi erradicada completamente do Brasil, como visto na Figura 3, principalmente devido ao tratamento ser ineficaz em evitar a reinfecção e ao surgimento de novas cepas de *S. mansoni* resistentes ao tratamento (Gryseels et al., 2006).

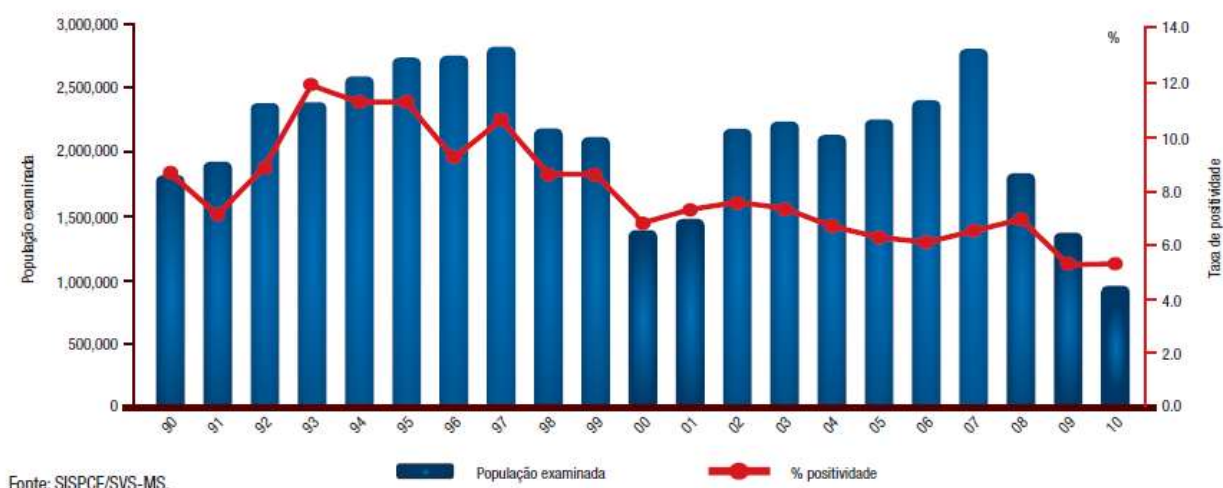


Figura 3. População avaliada e percentual de pessoas consideradas como positivas para esquistossomose. Avaliação do percentual de pessoas positivas para esquistossomose em relação ao número total de pessoas avaliadas desde 1990 até 2010 no Brasil. Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS. Adaptado de (Brasil, 2011-2015).

1.2- Ciclo de vida

Os vermes adultos são dióicos, apresentam corpo cilíndrico medindo de 7 a 20 mm em comprimento possuem ventosas ou sugadores ventral e oral, além de um complexo tegumento com um intestino cego e órgãos reprodutores (McManus and

Loukas, 2008). O corpo dos vermes machos forma uma caneleta, conhecida como canal ginecóforo, local onde se aloja a fêmea que é mais longa e delgada do que o macho (Gryseels et al., 2006; Ross et al., 2002). O ciclo de vida do *S. mansoni* se caracteriza pela presença de alternância de fase sexuada no hospedeiro vertebrado, principalmente o homem, e fase assexuada no hospedeiro invertebrado. Na esquistossomose mansônica, os ovos são liberados na água e liberam os miracídios, os quais guiados por estímulos químicos e luminosos penetram em caramujos, seus hospedeiros intermediários. Após penetrar no caramujo, o miracídio se multiplica assexuadamente em esporocistos multicelulares e posteriormente em cercárias com a característica cauda bifurcada. Um caramujo infectado por um miracídio pode liberar milhares de cercárias por dia, sendo a luminosidade e temperatura os estímulos necessários para tal liberação. As cercárias são formas nadantes livres que sobrevivem aproximadamente 72 horas ou até que encontrem o hospedeiro definitivo, no qual as cercárias penetram ativamente na pele através da secreção de enzimas pelas glândulas acetabulares. Esse processo dura em média 53 horas para a passagem pela epiderme e 18 horas pela derme e após tal evento, as cercárias perdem a cauda bifurcada e sofrem a substituição do tegumento. Atingindo a corrente sanguínea, os esquistossômulos semi-quiescentes (não apresentam consumo significativo de eritrócitos) são direcionados a vasculatura pulmonar e posteriormente atingem os leitos capilares para alcançar o sistema porta hepático, onde se transformam em vermes jovens com característica capacidade de se alimentarem de eritrócitos. Estes maturam na veia porta hepática, entre 4 a 6 semanas, e migram para a região mesentérica intestinal, onde as fêmeas fazem a postura no nível da submucosa. Cada fêmea põe cerca de 400 ovos por dia, na parede de capilares e vênulas, e cerca de 50% desses ganham o meio externo. Os

ovos colocados nos tecidos levam cerca de uma semana para tornarem-se maduros (míracidio formado), da submucosa chegam à luz intestinal e posteriormente são liberados junto as fezes, começando assim, o ciclo novamente (Gryseels et al., 2006; Han et al., 2009; Wilson and Coulson, 2009). O ciclo de vida se encontra esquematizado na Figura 4.

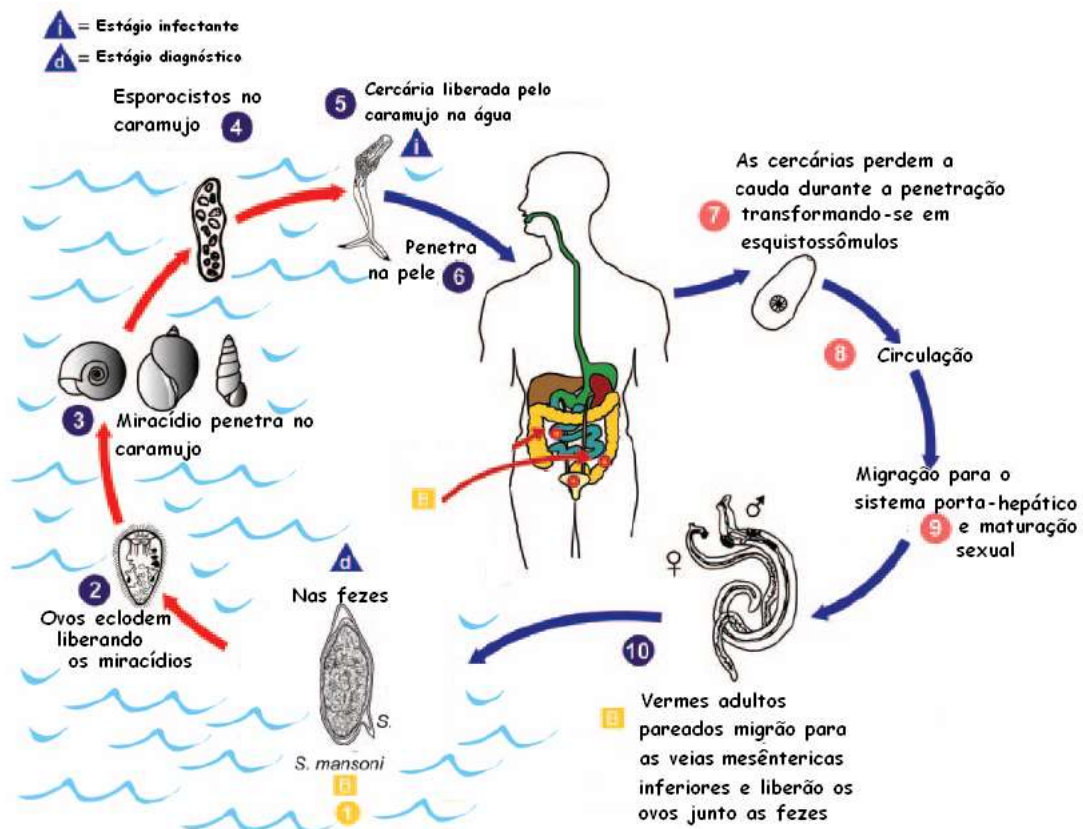


Figura 4. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Setas em vermelho correspondem à parte do ciclo que acontece na água e no hospedeiro invertebrado. Setas em azul correspondem à parte do ciclo que ocorre no hospedeiro vertebrado, no caso o homem. Adaptado de (McManus and Loukas, 2008).

1.3- Formas clínicas da esquistossomose

Duas principais fases de esquistossomose mansônica são conhecidas em indivíduos infectados, a fase aguda e a fase crônica (Caldas et al., 2008; Pearce and MacDonald, 2002).

A fase aguda da esquistossomose é caracterizada principalmente por reações de hipersensibilidade contra esquistossômulos migrantes e ovos, o que geralmente ocorre entre 16-90 dias após infecção (Lambertucci, 2010). A fase aguda da doença geralmente se desenvolve em indivíduos primariamente infectados, sejam eles visitantes ou pessoas habitantes de áreas endêmicas que porventura entrem em contato primário com o parasita (Caldas et al., 2008). As manifestações clínicas mais comuns são febre, calafrios, fraqueza, perda de peso, dores de cabeça, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, tosse seca, hepatomegalia, esplenomegalia e lesões cutâneas, e em menores proporções ocorrem diarreias sanguinolentas, urticárias, edema periorbital e chiado (Lambertucci, 2010).

Os indivíduos portadores da fase crônica geralmente vivem em áreas endêmicas e entram em contato constante com a forma infectante do *S. mansoni*, contudo, são praticamente assintomáticos, e baseado no critério clínico, são classificados como portadores da forma intestinal ou hepatointestinal (Caldas et al., 2008). Porém, uma pequena parcela dessa população desenvolve processos fibróticos, principalmente devido a forte reação granulomatosa contra ovos de *Schistosoma* que se encontram alocados em pequenos vasos presentes no fígado, ocasionando fibrose periportal de Symmer no fígado, conseqüentemente podendo causar hepatoesplenomegalia, fibrose periportal hepática e hipertensão porta, o que pode levar a formação de varizes esofageais e hematêmese, e esses indivíduos são classificados como portadores da forma hepatoesplênica (Caldas et al., 2008; Mwatha et al., 1998). A principal forma de se tentar melhorar tal quadro é através de procedimento cirúrgico para remoção parcial do baço, o que muitas das vezes pode ser utilizada como material de estudo (Widman et al., 2001).

Em meados da década de 90, as principais metodologias para o diagnóstico das fases clínicas da esquistossomose baseavam-se principalmente em características físicas e epidemiológicas, o que tornava extremamente difícil a distinção entre indivíduos em fase aguda da doença de indivíduos portadores da fase crônica (Rabello, 1995). Estudos realizados por Beck e colaboradores (2008) mostraram que através de análises sorológicas por ELISA indireto é possível discriminar indivíduos infectados de forma aguda em relação a fase crônica, principalmente através dos níveis de IgA contra SEA (Antígenos provenientes de ovos de *Schistosoma sp.*) e IgM e IgG contra KLH (Hemocianina) e SWAP, respectivamente. Pode-se ainda diferenciar indivíduos infectados de forma aguda de indivíduos não infectados, através de análises dos níveis de IgG contra SWAP (Antígenos solúveis de vermes adultos) e SEA, porém, a sensibilidade dos testes sorológicos podem variar de acordo os antígenos utilizados e de acordo como os testes são realizados (Beck et al., 2008; Jaureguiberry et al., 2010). Para a distinção entre indivíduos portadores das formas crônicas, as avaliações são feitas basicamente de acordo com o critério clínico (Caldas et al., 2008).

1.4- Resposta imune na esquistossomose

O ciclo de vida do *S. mansoni* em seu hospedeiro definitivo envolve diferentes estágios, portanto, a resposta imune desencadeada pela infecção é bastante complexa. O primeiro contato do parasita com o sistema imunológico é durante a penetração das cercárias através da pele, as quais se transformam em esquistossômulos que caem na corrente sanguínea. Acredita-se que o principal foco de eliminação do parasita no hospedeiro seja o pulmão, onde respostas

imunológicas efetivas conseguem eliminar esquistossômulos migrantes (Kassim et al., 1992; Wilson et al., 1996). A resposta imune do hospedeiro contra o verme adulto é ineficiente, tendo este a capacidade de sobreviver no hospedeiro definitivo por anos (Pearce and MacDonald, 2002). Com o início da ovoposição, os ovos liberados pela fêmea do parasita caem na circulação sanguínea e se depositam em diversos órgãos, sendo o fígado o mais comum entre eles. Esses ovos orquestram uma resposta imune local composta de macrófagos, eosinófilos e células T, ocasionando a formação de um granuloma ao redor dos ovos (Pearce and MacDonald, 2002). No hospedeiro definitivo, os vermes do *S. mansoni* induzem tanto uma resposta imune inata quanto uma resposta imune adaptativa.

1.4.1- Imunidade inata contra esquistossomose

A primeira linha de defesa do sistema imune contra agentes infecciosos compreende a resposta imune inata. As células envolvidas na resposta inata contra agentes infecciosos são capazes de reconhecer microorganismos infectantes através de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) que são característicos destes microorganismos. O reconhecimento dos PAMPs pelo sistema imune é uma etapa crucial para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente, e tal reconhecimento é mediado por receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PRRs) presentes em células como macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento destes padrões moleculares por células da resposta imune inata desencadeia uma cascata de transdução de sinais intracitoplasmáticos que resultam na ativação de vários genes e expressão de citocinas como: IL-12 e TNF- α . As citocinas liberadas agem diretamente na

determinação do tipo de resposta imune adaptativa desencadeada em resposta ao agente infeccioso, promovendo uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Janeway and Medzhitov, 2002). Entre os receptores da imunidade inata que reconhecem moléculas do *S. mansoni* se encontram a lectina ligadora de manana (MBL - *Mannan-Binding Lectin*), os receptores *scavengers* e alguns receptores do tipo *toll*.

MBL é uma proteína sérica do sistema imune inato e é constitutivamente expressa por hepatócitos. Essa proteína é capaz de se ligar a carboidratos presentes na superfície de cercárias e vermes adultos de *S. mansoni*, o que, em associação com as serino-proteases MASP-1 e MASP-2, apresentam a capacidade de ativar o sistema do complemento através da via dependente de MBL (Klabunde et al., 2000).

Os receptores *scavengers* são glicoproteínas, presentes principalmente em macrófagos, que apresentam a capacidade de se ligarem a uma ampla gama de moléculas como dsRNA, LPS e lipoproteínas de baixo peso molecular (Janeway and Medzhitov, 2002). Esses receptores são capazes de se ligarem e removerem lipoproteínas de baixo peso molecular que se encontrem incorporadas pelo *S. mansoni*, possibilitando o reconhecimento do parasita pelo sistema imune (Xu et al., 1993).

Receptores do tipo "Toll" (TLRs), são proteínas transmembranares que se caracterizam pela presença de repetições ricas em leucina flanqueadas por regiões ricas em cisteína em sua porção extracelular. A porção citoplasmática desses receptores é caracterizada por um domínio TIR (*Toll/IL-1 Receptor*), o qual é fundamental para a sinalização intracelular (Akira et al., 2006). Os diferentes tipos de TLRs reconhecem diferentes ligantes associados a vários patógenos. Dentre esses

receptores, TLR2, TLR3 e TLR4 são capazes de reconhecer moléculas do *S. mansoni* (Aksoy et al., 2005; Thomas et al., 2003; van der Kleij et al., 2002).

O receptor TLR2 presente em células dendríticas é capaz de reconhecer lisofosfatidilserina de ovos e vermes adultos do *S. mansoni*. A ligação dessas moléculas ao TLR2 desencadeia uma cascata de sinalização que promove a maturação de células dendríticas produtoras de IL-10, as quais são capazes de promover a diferenciação de células T precursoras em células T regulatórias (van der Kleij et al., 2002).

O RNA de fita dupla derivado do ovo de *S. mansoni* é reconhecido pelo TLR3 e tem a capacidade de induzir a produção das citocinas IL-12p70 e TNF- α , as quais apresentam a capacidade de diferenciar células precursoras em células de perfil Th1 (Aksoy et al., 2005).

O receptor da imunidade inata TLR4 é capaz de reconhecer o carboidrato lacto-*N* fucopentose III (LNFPIII) presente em diversos estágios do ciclo de vida do *S. mansoni*. Esse carboidrato quando ligado ao receptor TLR4 promove a maturação e a diferenciação de células dendríticas secretoras de IL-4, as quais induzem a diferenciação de células precursoras em células Th2 (Thomas et al., 2003).

Outra molécula da imunidade inata que parece ser essencial na sinalização celular de reconhecimento do *S. mansoni*, é a molécula adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), visto que, animais deficientes de tal molécula, são ineficientes na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α por células dendríticas, quando estimuladas pelos antígenos presentes no tegumento de vermes adultos (Duraes et al., 2009).

1.4.2- Imunidade adaptativa contra a esquistossomose

Vários estudos vêm demonstrando a importância de uma resposta imune adaptativa para a proteção contra esquistossomose mansônica. Em seres humanos, a resposta imune adaptativa pode variar de acordo com a fase clínica do hospedeiro. Durante o desenvolvimento da fase aguda é aparente o aumento na produção das citocinas TNF- α e IFN- γ , as quais caracterizam uma forte resposta imunológica de perfil Th1, e também aumento dos níveis dos anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e baixos níveis dos anticorpos IgM e IgG4 (de Jesus et al., 2002; Jassim et al., 1987). Porém, com o início da ovoposição, parece haver uma aparente modificação da resposta imunológica para um perfil Th2, o que se acredita ser basicamente mediado pela elevada produção da citocina IL-14, IL-5 e IL-13 (Montenegro et al., 1999). Durante o desenvolvimento da fase crônica, ocorre uma modificação no perfil dos anticorpos, com aumento dos níveis de IgG4 e baixa na produção de IgG1, IgG2 e IgG3 (Jassim et al., 1987).

A produção de citocinas Th2 pode também ser importante durante a infecção por *S. mansoni*. Estudos realizados em animais deficientes em IL-4 demonstram que, ocorre um aumento exacerbado na produção de óxido nítrico (NO) durante a fase aguda da infecção, o que pode levar ao desenvolvimento de caquexia e morte, e durante a fase crônica, ocorre também o acúmulo de ovos na região intestinal, os quais geram respostas imunológicas que lesam as paredes intestinais, podendo ocasionar endotoxemia e morte (Brunet et al., 1997; Fallon et al., 2000). Apesar de uma resposta Th2 aparentemente ser importante para o hospedeiro durante os estágios iniciais da infecção, tal resposta pode também contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática e morbidade (Pearce and MacDonald, 2002). Estudos realizados em modelo murino por Fallon e colaboradores, em 2000,

demonstraram o efeito pró-fibrótico das citocinas IL-4 e principalmente IL-13 no desenvolvimento da forma severa da doença (Fallon et al., 2000; Pearce and MacDonald, 2002). A citocina IL-13 em modelo murino vem sendo extensivamente correlacionada ao desenvolvimento da forma severa da esquistossomose, uma vez que camundongos deficientes para essa citocina apresentam considerável diminuição dos principais processos patológicos relacionados à infecção por *S. mansoni* (Fallon et al., 2000). Em humanos, ainda não existe uma correlação entre desenvolvimento da forma severa da doença e IL-13, porém, a produção de citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-5, parece ser comum quando avaliado a resposta proliferativa de indivíduos residentes em áreas endêmicas (Araujo et al., 1996). Entretanto, tal resposta parece ser muito controversa, com alguns trabalhos apresentando resultados contraditórios a tal hipótese, como por exemplo, o trabalho realizado por Mwatha e colaboradores em 1998, o qual avalia o perfil de citocinas produzidos por PBMC de pacientes portadores da fase hepatoesplênica, e encontram aumento na produção de citocinas TNF- α e IFN- γ , redução de IL-5 e aumento na produção de receptores solúveis para TNF e da quimiocina ICAM-1, o que aparentemente indicaria a presença de uma resposta imunológica de perfil característico Th1 (Mwatha et al., 1998).

Vários estudos vêm demonstrando a importância de processos que regulam a exacerbação de uma resposta imune, e acredita-se que IL-10 desempenhe um papel essencial em tal controle em infecções por *S. mansoni* (Hoffmann et al., 2000; Vaillant et al., 2001). Experimentos realizados com camundongos duplamente deficientes para as citocinas IL-4 e IL-10 apresentam uma resposta imune polarizada Th1, com elevados níveis de produção de óxido nítrico (NO), aumento significativo de processos hepatotóxicos e maiores índices de mortalidade quando comparados

aos animais deficientes somente para IL-4 (Hoffmann et al., 2000). Quando avaliado o desenvolvimento da patologia em animais duplamente deficientes em IL-10/TNF- α e IL-10/IFN- γ , nota-se um aumento significativo no processo de deposição fibrótica, o qual foi caracterizado por uma resposta polarizada Th2, com aumento significativo na formação de granulomas e na mortalidade durante a fase crônica da doença (Hoffmann et al., 2000; Vaillant et al., 2001). Portanto, aparentemente a citocina IL-10 apresenta um papel crucial durante a infecção por *S. mansoni*, evitando que ocorram patologias severas mediadas por respostas polarizadas do tipo Th1 ou Th2.

Em modelo murino, uma resposta imune protetora contra esquistossomose aparentemente envolve tanto a imunidade celular quanto a humoral (Jankovic et al., 1999). Acredita-se que essa resposta imune efetiva contra esquistossomose seja mediada pela produção das citocinas IFN- γ e TNF- α e aumento dos níveis de anticorpos IgG2a e IgG2b (Jankovic et al., 1999; Street et al., 1999). As citocinas IFN- γ e TNF- α podem atuar na imunidade protetora contra esquistossomose através de mecanismos mediados pelo aumento da produção de óxido nítrico (NO), assim como, atuar na formação de uma resposta imunológica na região pulmonar, através mecanismo dependente de linfócitos e macrófagos, contra esquistossômulos migrantes (James and Glaven, 1989; Wilson et al., 1996). A atuação dos anticorpos IgG2a e IgG2b na proteção aparentemente se baseia em uma resposta imunológica mediada por eosinófilos, opsonização e ativação do complemento contra esquistossômulos migrantes (Grzych et al., 1982; Horta and Ramalho-Pinto, 1984).

1.5- Desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica

Devido a ineficiência do tratamento quimioterápico em evitar a reinfecção e ao surgimento de cepas de *S. mansoni* resistentes ao tratamento, estratégias de vacinação, em conjunto com a utilização de quimioterápicos, podem ser a única maneira de se acabar com os principais problemas relacionados à esquistossomose mansônica (McManus and Loukas, 2008). Devido a incapacidade do *Schistosoma sp.* de se multiplicar dentro do hospedeiro definitivo, uma vacina que confira um nível de proteção de pelo menos 50% e/ou efeito esterilizante nas fêmeas do parasita, seria eficiente na diminuição da morbidade e da transmissão da doença (Chan et al., 1997; McManus and Loukas, 2008).

Uma vacina anti esquistossomótica ideal, segundo Bergquist (1998), deve ser capaz de induzir altos níveis de proteção e/ou reduzir fecundidade e patologia, ser facilmente produzida em larga escala, ser segura para a utilização em humanos e facilmente incorporada a programas de imunização (Bergquist, 1998).

Diversas estratégias de vacinação já foram avaliadas contra a esquistossomose mansônica, porém, a utilização de cercárias irradiadas é a que induz maiores níveis de proteção em modelo murino, podendo chegar a 94% de redução na contagem de vermes após o desafio com cercárias não irradiadas (Wynn et al., 1996). A resposta imune protetora gerada pela imunização com cercárias irradiadas parece estar diretamente relacionada à atuação das citocinas IFN- γ e TNF- α em conjunto a uma resposta humoral eficiente (Jankovic et al., 1999; Street et al., 1999). Apesar dos elevados níveis de proteção alcançados em camundongos, o uso dessa estratégia vacinal não se aplicaria em humanos, devido principalmente a possibilidade de o parasita recuperar sua forma infectante e aos elevados custos de produção e

manutenção das cercárias irradiadas. Portanto, o modelo de imunização utilizando cercárias irradiadas é utilizado apenas em estudos experimentais dos mecanismos imunológicos responsáveis pela indução da imunidade protetora.

Diversos antígenos do *S. mansoni* já foram avaliados como candidatos vacinais, porém, nenhuma resposta imune protetora, com equivalente nível de proteção obtido pela imunização com cercárias irradiadas, foi alcançada (McManus and Loukas, 2008). Vários pesquisadores acreditam que os principais alvos vacinais se encontram presente no tegumento do *S. mansoni* (Loukas et al., 2007; Pinheiro et al., 2011).

1.5.1- Proteínas do tegumento como candidatos vacinais

O tegumento consiste de um sincício de células que cobrem todo o corpo dos vermes adultos do *Schistosoma sp.*, e visto que tal estrutura se encontra presente em basicamente todos os vermes que habitam a circulação sanguínea, acredita-se que tal estrutura seja uma essencial adaptação para a sobrevivência no hospedeiro (Van Hellemond et al., 2006). O tegumento parece estar envolvido em processos como nutrição, evasão imune e modulação, excreção, osmorregulação, transdução de sinais e recepção sensorial e na perspectiva de desenvolvimento de uma vacina, esse conjunto de moléculas constitui a interface de interação entre hospedeiro e o parasita (Loukas et al., 2007; Van Hellemond et al., 2006). O desenho esquemático de tal estrutura se encontra na Figura 5.

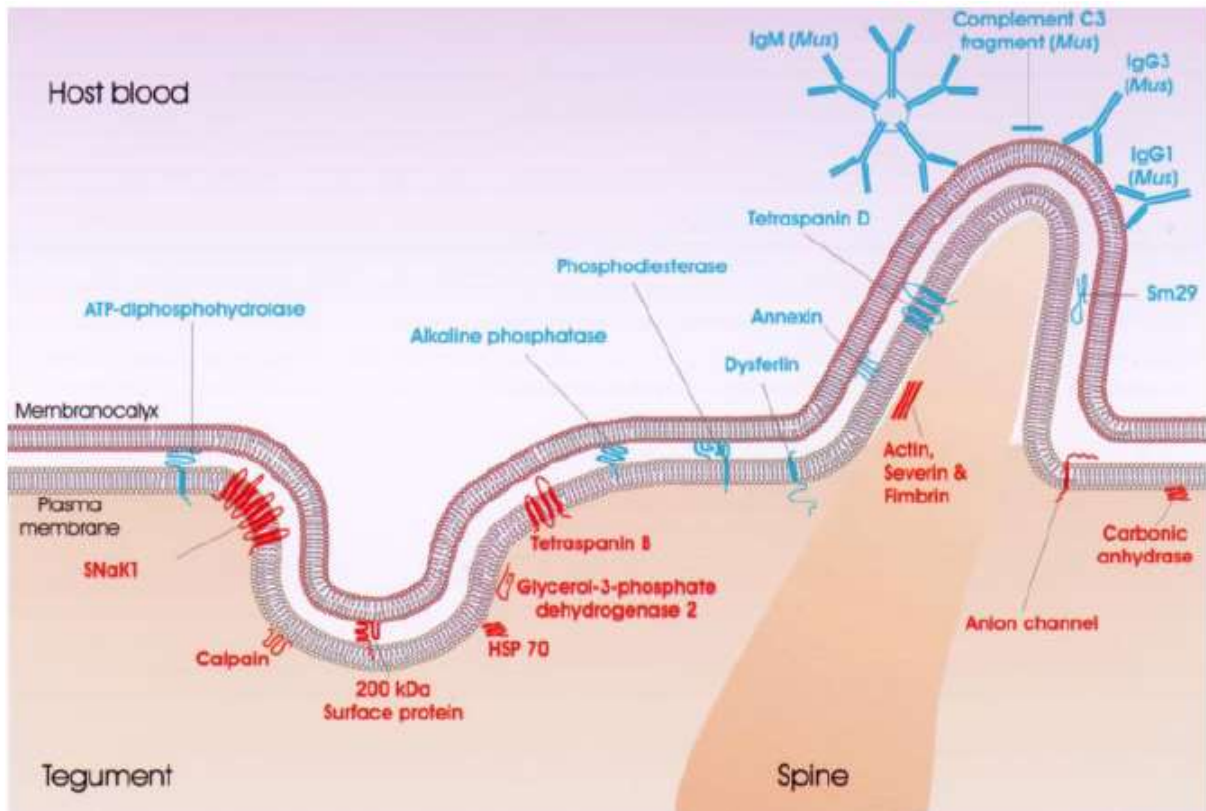


Figura 5. Desenho esquemático do tegumento do *Schistosoma mansoni* e a possível localização de algumas proteínas encontradas em tal estrutura. As proteínas em azul apresentam uma posição mais externa em relação às proteínas em vermelho (Braschi et al., 2006).

Várias proteínas presentes no tegumento já foram avaliadas em relação ao potencial protetor contra a esquistossomose mansônica em modelo murino, dentre elas podemos citar a calpaína (Ahmad et al., 2009a; Zhang et al., 2010b), Sm21.7 (Pinheiro et al., 2011), filamina (Cook et al., 2004), Sm21.6 (Lopes et al., 2009), fimbrina (Mohamed et al., 1998; Romeih et al., 2008), ECL (Nascimento et al., 2007), glutationa peroxidase (Shalaby et al., 2003)(Shalaby et al., 2003), Sm29 (Cardoso et al., 2008), TSP-2 (Tran et al., 2006), dentre outras. Entre as proteínas presentes no tegumento já testadas, a Sm29 e a TSP-2 se destacam nas suas capacidades de induzirem proteção contra a esquistossomose.

1.5.2- Candidatos vacinais Sm29 e TSP-2

Estudos realizados por Cardoso e colaboradores (2006) demonstraram que a Sm29 é uma proteína de ponto isoelétrico 8,08 e de massa molecular aproximada a 18,07 KDa (Cardoso et al., 2006a; Cardoso et al., 2006b). Sm29 possui um peptídeo sinal em sua porção N-terminal de aproximadamente 26 aminoácidos, uma hélice transmembrana na região C-terminal e 17 cisteínas que provavelmente formam oito pontes dissulfeto características de proteínas de membranas ou secretadas (Cardoso et al., 2006b). Tal proteína possui três sítios de O-glicosilação e dois de N-glicosilação em sua estrutura, o que explica a massa molecular prevista de 29KDa (Cardoso et al., 2006b). Resultados de microscopia confocal, confirmam a presença de Sm29 no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos e também em alguns tecidos internos de fêmeas adultas do *S. mansoni* (Cardoso et al., 2008; Cardoso et al., 2006a). A sequência de aminoácidos da Sm29 apresentou vários motivos bem conservados como o de toxinas tipo cobra (enovelamento rico em dissulfetos) e motivos de pequenas proteínas (ligantes de metais, hemes e pontes dissulfeto) (Cardoso et al., 2006b).

A avaliação da sequência peptídica da Sm29 identificou 5 epítomos promíscuos de ligação a MHC-II (HLA) de seres humanos, e quando avaliado o soro de indivíduos resistentes a reinfeção, nota-se maiores níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-Sm29 do que indivíduos naturalmente susceptíveis (Cardoso et al., 2006a).

Quando utilizada como vacina recombinante em modelo murino, a proteína Sm29 foi capaz de gerar uma resposta humoral com altos níveis de IgG, IgG1 e IgG2a anti-Sm29, uma resposta celular de perfil Th1 com níveis elevados de IFN- γ e TNF- α , assim como alcançar níveis de 51%, 60% e 50% na redução de vermes, ovos

presentes no intestino e número de granulomas, respectivamente (Cardoso et al., 2008). Visando avaliar melhor o real potencial de tal proteína recombinante ser aplicada como vacina, Alves e colaboradores (2015) avaliaram o comportamento de camundongos previamente infectados e tratados, e posteriormente imunizados com a proteína rSm29. Os animais previamente tratados e imunizados com a proteína rSm29 apresentaram percentuais de proteção a uma nova infecção equivalentes a 26-48%, significativo aumento nos níveis de IgG, IgG1, IgG2a e IgGE, níveis aumentados de IL-2, IL-4, IL-17, IFN- γ e TNF- α e aumento na geração de células T de memória (Alves et al., 2015).

Tais resultados indicam que Sm29 é um importante candidato vacinal contra a esquistossomose mansônica.

Tetraspaninas consistem de uma larga superfamília de proteínas que provavelmente se encontram presentes em todos os metazoários (Cupit et al., 2011; Kovalenko et al., 2005). Tais proteínas contêm quatro domínios transmembranas bem conservados (TM1-TM4), domínios intracitoplasmáticos N e C-terminais e duas alças extracelulares (ECL-1 e ECL-2) separadas por uma curta alça intracelular (ICL) (Kovalenko et al., 2005). Tetraspaninas tem a capacidade de se ligarem a uma grande gama de proteínas transmembranas, como integrinas, receptores e fatores de crescimento, moléculas de MHC II, proteínas da superfamília das imunoglobulinas a também com outras tetraspaninas, o que permite que tais moléculas estejam envolvidas em diversos processos biológicos, como por exemplo, evasão imune e processos estruturais (Cupit et al., 2011; Kovalenko et al., 2005).

TSP-2 é uma proteína da família das tetraspaninas encontrada basicamente no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* e que possui

homologia a receptores de superfícies de células B e células T (Tran et al., 2006). Trabalhos realizados por Tran e colaboradores (2010) demonstram que quando vermes adultos de *S. mansoni* tem sua produção de TSP-2 inibida pela ação de SiRNAs, processos relacionados a renovação do tegumento apical se tornam prejudicados, visto o aumento no número e tamanho de vacúolos da camada superficial, menor quantidade de inclusões citoplasmáticas e espessura mais fina de tal camada, e em esquistossômulos, o efeito do tratamento com dsRNAs contra TSP-2, faz com que o tegumento se torne mais fino, com maiores índices de invaginações e compartimentos celulares, e também foi demonstrado que a inibição de TSP-2 pode influenciar na sobrevivência de tais parasitas in vivo (Cupit et al., 2011; Tran et al., 2010).

A proteína Sm-TSP-2 exerce funções estruturais e metabólicas importantes a sobrevivência do *S. mansoni*, visto a formação dos microdomínios enriquecidos de tetraspaninas (TEM – *Tetraspanin Enriched Microdomains*), que são estruturas moleculares complexas formadas principalmente pela interação da alça extracelular-2 da Sm-TSP-2 com outras proteínas e membranas celulares, possivelmente exercendo funções essenciais na fusão e reparo de membranas, assim como a regulação do fluxo de Ca^{2+} (Jia et al., 2014). Dentre os principais parceiros da proteína Sm-TSP-2 na formação dos TEMs, se encontra a proteína Sm29 (Jia et al., 2014)

TSP-2 é fortemente reconhecida por anticorpos IgG1 e IgG3 de indivíduos naturalmente resistente a infecção, e quando utilizada na forma de vacina recombinante em modelo murino, tal proteína foi capaz de gerar elevados níveis de IgG1 e IgG2a anti-TSP-2 e também 57%, 64% e 69% de redução na contagem de

vermes, ovos presentes no fígado e nas fezes, respectivamente, e devido ao fato da expressão de tal proteína parecer não estar sobre influência de muitos polimorfismos, ao contrário do que ocorre com a tetraspanina-2 de *S. japonicum*, tal proteína tem uma grande potencial como candidato vacinal (Cupit et al., 2011; Tran et al., 2006).

1.6- Vacinas de DNA

Wolff e colaboradores (1990) demonstraram que a administração via injeção intramuscular de plasmídeos, sob controle de promotor que permita a expressão gênica em células eucarióticas, era capaz de levar a síntese proteica de genes repórteres sem a necessidade de maiores sofisticações da técnica (Wolff et al., 1990). Em 1992, De-Chu Tang e colaboradores, através da administração de plasmídeos em orelhas de camundongos foram capaz de perceber que a expressão da proteína heteróloga era capaz de gerar uma resposta humoral contra hormônio de crescimento humano (Tang et al., 1992). Em 1993, Ulmer e colaboradores demonstraram que plasmídeos contendo a sequência de uma nucleoproteína conservada do vírus influenza era capaz de gerar resposta imune protetora percebida *in vivo* contra tal vírus, dando início assim, a metodologia de vacinação por DNA (Ulmer et al., 1993).

Vacina de DNA é a designação relacionada à metodologia de imunização que ao invés de se utilizar de antígenos como forma de imunização se utiliza de genes que codifiquem tais antígenos (Donnelly et al., 2005). Normalmente, vacinas de DNA correspondem a vetores plasmidiais de origem bacteriana, os quais contenham genes heterólogos de interesse sob o controle de um forte promotor que capacite à

expressão gênica em células de mamíferos (Garmory et al., 2003). Devido tal expressão ocorrer em células de mamíferos, ao contrário de procedimentos de imunização com proteínas, o processo de síntese intracelular do antígeno codificado pelo plasmídeo permitirá que tal proteína sofra normais modificações pós-traducionais e que seja corretamente glicosilado (Shedlock and Weiner, 2000).

A metodologia de vacinação por DNA apresenta como principais vantagens: versatilidade na construção dos plasmídeos; produção relativamente simples e rápida; facilidade de transporte e distribuição; as vacinas são relativamente seguras, uma vez que não existe a necessidade da utilização de organismos patogênicos; estabilidade em temperatura ambiente e ainda apresenta a capacidade de estimular tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (Fioretti et al., 2010; Liu, 2003, 2011). Entretanto, mesmo com todas essas vantagens, as vacinas de DNA geralmente apresentam baixa capacidade de transfecção *in vivo* e baixa imunogenicidade em animais de grande porte (Fioretti et al., 2010; Liu, 2003, 2011).

Devido aos problemas encontrados relacionados à baixa capacidade transfectante e a carência de fortes respostas imunológicas em organismos de grande porte e humanos, grandes esforços são despendidos para aumentar a potência de vacinas de DNA, o que pode ir de tentativas para se aumentar a estabilidade, expressão e otimização de vias de administração (Garmory et al., 2003; Liu, 2011).

1.6.1- Otimização de vacinas de DNA

Mesmo com o grande potencial das vacinas de DNA em induzirem diferentes tipos de resposta imunológica, baixo custo de produção, estabilidade e outras vantagens, a baixa capacidade de transfecção pode limitar a eficiência de tal estratégia, o que

dita a necessidade de técnicas que otimizem o processo de transfecção ou aumentem a eficiência da transcrição gênica e produção protéica do plasmídeo, como por exemplo a inserção de uma sequência de Kozak ou otimização de códons (Fioretti et al., 2010; Liu, 2011; Olafsdottir et al., 2008).

Até 1981 acreditava-se que o início da tradução de uma proteína em eucariotos ocorria quando a subunidade ribossômica 40S encontrava o primeiro 5' AUG 3' em um mRNA, porém, estudos realizados por Marilyn Kozak, no ano de 1981, demonstraram que nas sequências mais expressas, encontravam-se uma purina na posição -3 e uma guanina na posição +4, e trabalhos de avaliação de sequências não codificantes de 699 espécies de vertebrados no ano de 1987, também por Marilyn Kozak, demonstraram que existia uma sequência consenso para o início da tradução na maioria dos RNAs mensageiros, a qual correspondia basicamente a 5' GCCGCCACCAUGG 3', a qual ficou conhecida como sequência consenso de Kozak. A inserção de uma sequência consenso de Kozak na região 5' da sequência a ser produzida e utilizada como imunógeno, provavelmente será capaz de aumentar os índices de tradução do mRNA codificado, o que é almejado na metodologia de imunização por DNA devido aos baixos índices de transfecção (Garmory et al., 2003; Kozak, 1981, 1987; Olafsdottir et al., 2008).

As proporções de tRNAs entre as espécies variam, e o uso de códons selecionados geralmente se encontra relacionado com a eficiência da expressão gênica, de modo que os genes mais expressos evitam a presença de códons correspondentes a tRNAs de menores freqüências, portanto, diferenças entre códons preferenciais entre um organismo hospedeiro e um gene heterólogo podem também afetar os

níveis de expressão de vacinas de DNA (Garmory et al., 2003; Kutzler and Weiner, 2008).

1.6.2- Principais formas de administração de vacinas de DNA

As principais formas de administração de vacinas de DNA são a intramuscular e a biobalística ou *gene gun*, como demonstrado na Figura 6. Outra metodologia promissora como forma de administração de vacina de DNA é a utilização da eletroporação *in vivo*.

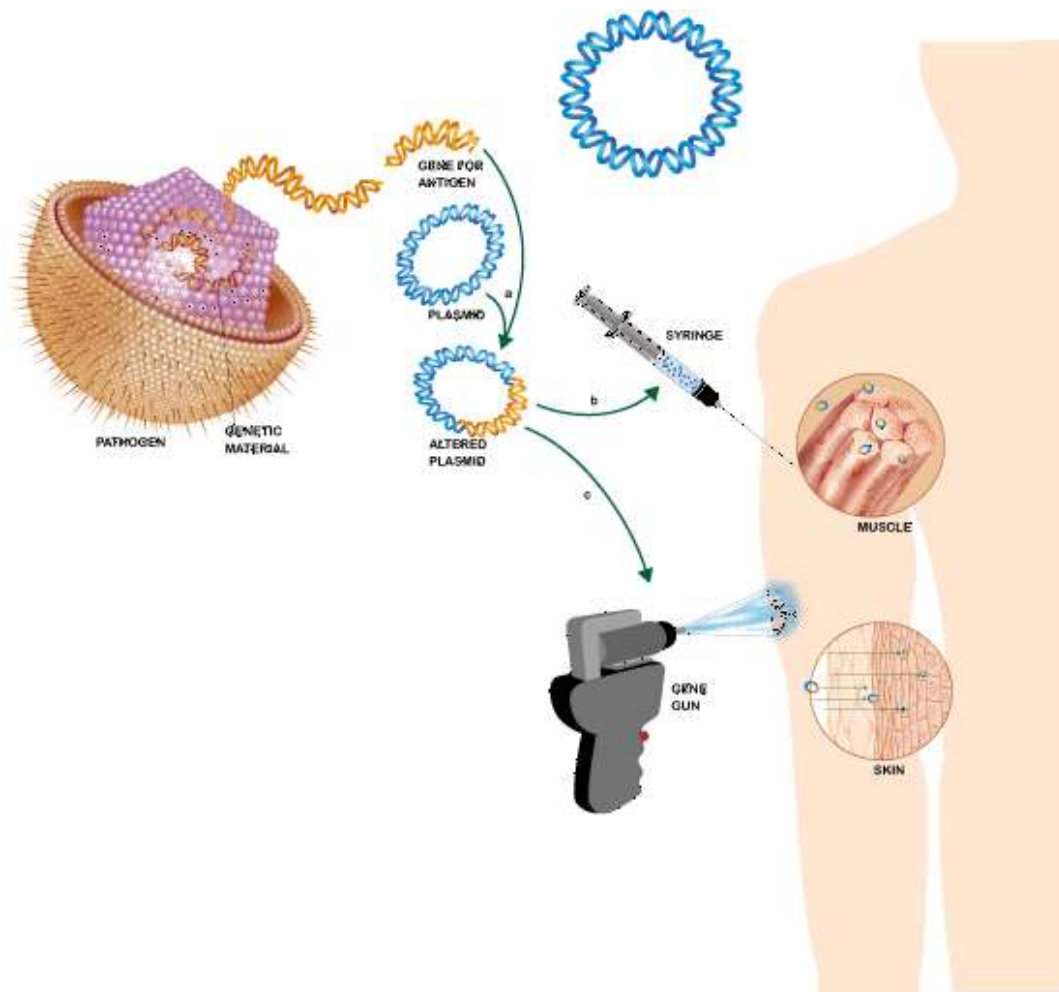


Figura 6. Principais vias de administração de vacinas de DNA. Após a obtenção do plasmídeo contendo o gene do antígeno de interesse, ele pode ser administrado por diversas vias. As duas principais vias de administração são a intramuscular e através de biobalística ou *gene gun*.

Em 1990, Wolff e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a administração de plasmídeos via injeção intramuscular era capaz de levar a expressão proteica sem a necessidade de tecnologias mais elaboradas (Wolff et al., 1990). A partir de tal observação, vários estudos posteriores se utilizaram de tal técnica como forma de imunização gênica. Tal processo de imunização atua transfectando principalmente miócitos, porém, acredita-se que células apresentadoras de antígenos APCs também são transfectadas, as quais exercem

papeis fundamentais na geração da resposta imune. O volume geralmente utilizado para a imunização excede a capacidade volumétrica do músculo anterior tibial de camundongos, o que resulta na dispersão da vacina em toda a extensão do músculo, bainha epimisial e linfonodos circundantes (Dupuis et al., 2000).

Várias metodologias visam o aperfeiçoamento da administração e da transfecção celular pela rota intramuscular, como por exemplo, os sistemas Biojector®2000 e Mini-Ject™ e eletroporação in vivo. O sistema Biojector®2000 é formado por um aparato que é capaz de injetar o material desejado, tanto intramuscularmente quanto subcutaneamente, através de pressão gerada por gás CO₂ em uma maneira independente de agulhas (Bioject - <http://www.bioject.com/biojector2000.html>). O sistema Mini-Ject™ atua inserindo o material intramuscularmente, de maneira independente de agulhas, através de pressão gasosa gerada por reação química. Apesar de menos dolorosas que injeção muscular por intermédio de agulha, os sistemas de injeção Biojector®2000 e Mini-Ject™ aparecem como metodologias muito mais dispendiosas e não apresentam benefícios aparentes no que se relaciona a potencialização imunológica de vacinas de DNA (Rao et al., 2006).

Eletroporação ou Eletropermeabilização vem se mostrando como uma técnica com a capacidade de aumentar o potencial transfectante, níveis de expressão protéica e potencial imunogênico de vacinas de DNA (Babiuk et al., 2004; Dupuis et al., 2000; Wang et al., 2008). A metodologia se baseia na geração de pulsos eletromagnéticos nos locais da injeção da vacina de DNA, o qual permite a maior permeabilização das células ao redor e conseqüentemente aumentando os níveis de transfecção celular (Aihara and Miyazaki, 1998) e com capacidade de gerar prolongada memória imunológica (Tsang et al., 2007). Apesar de se mostrar como tecnologia altamente

eficiente no quesito imunogenicidade e potencial transfectante, a eletroporação pode ocasionar altas taxas de integrações cromossômicas, o que é indesejável para a vacinação por DNA, além do que, ainda se apresenta como tecnologia altamente dispendiosa, o que poderia limitar sua utilização em países menos desenvolvidos (Liu, 2011; Wang et al., 2004).

Experimentos realizados por Williams e colaboradores, em 1991, demonstraram que partículas de ouro ou tungstênio cobertas com plasmídeos quando expelidas por pressão gerada por gás hélio eram capaz de transfectar células da pele e fígado, assim como, síntese de proteínas codificadas pelos plasmídeos, o que tornou tal metodologia indicada para procedimentos de imunização com DNA (Williams et al., 1991). Tal metodologia, atualmente conhecida como gene gun ou biobalística vem sendo utilizada em pequenos animais com bons níveis imunogênicos e se mostra como metodologia promissora para imunização de animais de grande porte (Wang et al., 2008).

1.7- Vacinas de DNA e a esquistossomose mansônica

Muitos pesquisadores acreditam que uma resposta imunoprotetora contra *S. mansoni* envolva tanto a imunidade celular quanto humoral, portanto, vacinas de DNA se tornam metodologia promissora de imunização, devido a sua capacidade de induzir ambos os componentes do sistema imune (Fonseca et al., 2006; Oliveira et al., 2008).

A calpaína (Sm-p80) é uma proteína que se encontra relacionada ao processo de renovação da membrana externa do *S. mansoni*, processo esse utilizado com o intuito de escapar da resposta imune do hospedeiro (Ahmad et al., 2009a). Em 2009,

Ahmad e colaboradores, utilizando o vetor pcDNA3 com a sequência de Sm-p80 como vacina obtiveram níveis de proteção equivalentes a 59% na redução da contagem de vermes e 84% na contagem de ovos do fígado em camundongos C57BL/6, além de elevados níveis de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 e aumento significativo na produção de citocinas IL-2 e IFN- γ , o que pode indicar o direcionamento da resposta imunológica para o perfil Th1. Zhang e colaboradores em 2010, utilizaram em imunizações o vetor vr1020 contendo o gene da Sm-p80, o qual tem seu uso aprovado em seres humanos, e conseguiram níveis de aproximadamente 47% na redução da carga parasitária, o que foi acompanhado por elevados níveis de anticorpos IgG2b e citocinas IL-2 e IFN- γ , o que mais uma vez prediz um direcionamento de resposta imunológica para o perfil Th1 e também um elevado nível de transcritos correspondentes as citocinas TGF- β e IL-17, o que pode estar relacionado a presença de uma resposta de perfil imunológico Th17 (Zhang et al., 2010b). Em 2009, Ahmad e colaboradores, utilizando-se do vetor pcDNA3, imunizaram babuínos (*Papio anubis*) e alcançaram 38% de redução na contagem de vermes recuperados e 32% de redução na contagem de ovos do fígado + intestino, altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-Sm-p80 e altos níveis de IL-2 e IFN- γ quando comparados com o grupo controle, o que mais uma vez prediz o direcionamento para uma resposta imunológica de perfil Th1 (Ahmad et al., 2009a).

A proteína Sm23, da família das tetraspaninas, possui quatro domínios hidrofóbicos e se encontra ligada ao tegumento de vermes adultos através de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Koster and Strand, 1994). Quando avaliada como vacina de DNA, a sequência da proteína Sm23 inserida no vetor pcDNA alcançou níveis de proteção (redução de vermes adultos) de 25-44% e com elevados níveis de IgG, e IgG2a >IgG1 (Da'dara et al., 2001).

Enzimas antioxidantes estão envolvidas na evasão de vermes adultos do *S. mansoni* à respostas imunes do hospedeiro envolvendo espécies oxidantes reativas (Mei and LoVerde, 1997). Dentre essas enzimas está a Cu/Zn superóxido dismutase, que se encontra presente principalmente no tegumento de vermes adultos (Mei and LoVerde, 1997). Em 2003, Shalaby e colaboradores demonstraram que a imunização de camundongos C57BL/6 com o plasmídeo pcDNA contendo as sequências de Cu/Zn superóxido dismutase (CT-SOD) ou Cu/Zn superóxido dismutase com peptídeo sinal (SP-SOD) foram capazes de alcançar 44-60% e 22-45% de proteção, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle (Shalaby et al., 2003). Outra proteína importante provavelmente envolvida na evasão do *S. mansoni* é a glutathiona peroxidase, a qual se encontra presente também preferencialmente no tegumento de vermes adultos (Mei and LoVerde, 1997). Quando avaliada em forma de vacina de DNA, a enzima nativa glutathiona peroxidase (GPXbb) alcançou níveis de proteção de 23-55%, enquanto que a forma mutada (GPXm), a qual tinha um aminoácido selenocisteína substituído por uma cisteína em seu sítio catalítico, induziu apenas 25-35% de proteção na redução de vermes adultos quando comparada ao grupo controle (Shalaby et al., 2003). Posteriormente a isso, Carvalho-Queiroz e colaboradores demonstraram que a imunização de primatas não humanos com o plasmídeo VR1055 contendo as sequências das proteínas Cu/Zn superóxido dismutase e da glutathiona peroxidase de *S. mansoni*, foram capazes de alcançar níveis variáveis de redução na contagem de vermes (0 a 19%), redução significativa dos dias de diarreia e presença de sangue nas fezes (63,3 – 76,7% de redução), redução na excreção de ovos (podendo alcançar até 65% no caso da SmCT-SOD), redução da quantidade de ovos presentes no tecido hepático e intestino grosso, assim como, aumento no

índice proliferativo de células do sistema imune, anticorpos IgG específicos para tais proteínas e a indução de um perfil misto de citocinas, como uma tendência para o perfil Th2 (Carvalho-Queiroz et al., 2015).

Outro candidato testado foi a proteína filamina, a qual possui homologia a proteína ligadora de actina humana e se encontra presente em vários estágios do desenvolvimento de *S. mansoni* e também no tegumento de vermes adultos (Cook et al., 2004). Quando administrada na forma de vacina de DNA, a proteína filamina inserida no vetor pcDNA foi capaz de gerar 50% de redução na contagem de vermes, títulos elevados de IgG e IgG2a, IgG2b e IgG1 e aumento no percentual de células secretoras de IFN γ , IL-4, IL-5 e IL-10, o que é um indicativo de uma resposta de perfil misto Th1/Th2, quando comparada ao grupo controle (Cook et al., 2004).

A proteína Sm21.7 é encontrada principalmente no tegumento e nas camadas parenquimais de vermes adultos de *S. mansoni* e apresenta considerável potencial como antígeno para uma vacina anti-esquistossomótica (Pinheiro et al., 2011). Fimbrina é uma proteína de aproximadamente 651 aminoácidos presente no tegumento de vermes adultos do *S. mansoni* com alta homologia a fimbrina de aves e plastina humana (Romeih et al., 2008). Quando avaliada como vacina de DNA multivalente em conjunto com a proteína Sm21.7, ambas foram capazes de induzir 56% de redução na contagem de vermes, altos níveis de IgG, e 41,5 e 55,6% de redução na contagem de ovos no fígado e intestino respectivamente (Romeih et al., 2008).

A via metabólica de degradação de glicose é considerada essencial para a sobrevivência e infecção de parasitas (Skelly et al., 1993). Saber e colaboradores (2013) avaliaram o potencial de uma vacina de DNA contendo a sequência da

proteína frutose-1,6-bifosfato aldolase, uma enzima responsável pela conversão reversível de frutose-1,6-bifosfato em di-hidroxiacetoana e gliceraldeído-3-fosfato, contra a infecção por *S. mansoni*. A imunização com a SMALDO foi capaz de induzir a redução de 46% no número total de vermes, 41,7% de ovos no fígado e 40.2% no intestino, 29% e 54.7% de redução no diâmetro e número de granulomas no fígado e elevados níveis de anticorpos IgG anti-SMALDO (Saber et al., 2013).

Outro importante candidato vacinal é a Sm14, a qual apresenta aproximadamente 14,8 KDa e com conhecida homologia a proteínas ligadoras de ácidos graxos, o que associado à incapacidade de síntese DE NOVO de ácidos graxos por tais vermes, indicam que tal proteína possa estar envolvida no processo de captação de metabólitos do hospedeiro (Moser et al., 1991). A proteína Sm14 quando utilizada como vacina de DNA no vetor pCI, foi capaz de gerar uma resposta imunológica protetora com 40,5% de redução na contagem de vermes, altos níveis de IgG anti Sm14 e elevada produção de citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 quando comparada ao grupo controle (Fonseca et al., 2006).

1.8 Nanotecnologia

A palavra nano, é derivada da palavra grega nanos, significa anão e é utilizada para descrever qualquer material ou característica com dimensões em escalas nanométricas (1-100nm) (Dreaden et al., 2012; Jorge Pérez-Juste, 2005). Nanomateriais podem apresentar enormes diferenças em relação ao material bruto de mesma composição e algumas vantagens principalmente devido a sua estrutura única, tamanho menor, grande superfície de contato, facilidade de síntese e grande potencial para modificações, dentre outras (Xu et al., 2012).

1.8.1 Nanopartículas e o sistema imune

Atualmente, já é bem estabelecido que antígenos livres e/ou solúveis são fracos ativadores de uma resposta imune protetora, principalmente pela insuficiente captação de tais antígenos por células profissionais apresentadoras de antígenos (Boraschi and Italiani, 2015). E uma opção de reverter tal cenário é a adsorção ou a ligação covalente de antígenos a superfície de alguns nanocompostos, os quais são capazes de estimular o sistema imune e induzir respostas muito mais efetivas do que as moléculas separadas (Moon et al., 2012; Temchura et al., 2014; Xiao et al., 2013). Nanopartículas podem ser excelentes carreadores, principalmente devido a excelente biocompatibilidade e características físico-químicas (tamanho, formato e carga de superfície), as quais podem ser modificadas para obterem diferentes efeitos imunológicos (Boraschi and Italiani, 2015).

Existem vários princípios pelos quais nanopartículas seriam úteis em aplicações imunológicas, o primeiro deles é que as nanopartículas podem carrear imunocompostos a um determinado local, célula, tecido ou qualquer lugar exigido, diminuindo assim, possíveis efeitos adversos de um imunoterapêutico. Outro princípio é que as nanopartículas podem apresentar efeito adjuvante próprio (anti-ou pró-inflamatório) e outra vantagem das nanopartículas é a habilidade de serem captadas naturalmente por células do sistema imune, ou conjugadas a anticorpos ou moléculas que direcionem especificamente a determinados locais ou células (Irvine et al., 2015).

Em relação as características imunológicas de nanopartículas *in vitro* e *in vivo*, vários pesquisadores alcançaram diferentes resultados, onde algumas

nanopartículas apresentaram efeitos pró-inflamatórios e algumas anti-inflamatórias (Frohlich, 2015).

Existem vários fatores que podem influenciar a migração de nanopartículas no sistema imune, mas em geral, partículas maiores do que 9nm de diâmetro tendem a migrar para os linfonodos, permanecerem no local e serem captadas e apresentadas eficientemente, enquanto que, partículas menores que 6nm, não são retidas no sistema linfático, o que por sua vez, impede que sejam captadas eficientemente por células do sistema linfático. Partículas de 50-100nm geralmente ficam presas na matriz extracelular e não são livremente drenadas para os linfonodos, porém, nanopartículas deste tamanho podem ser fagocitadas por células dendríticas ou monócitos que emigram do sangue, carreando assim, as nanopartículas para o sistema linfático (Irvine et al., 2015; Liu and Irvine, 2015; Manolova et al., 2008). Vários fatores influenciam na captação das nanopartículas, como por exemplo, tamanho, carga, hidrofobicidade e composição (Irvine et al., 2015). O trabalho realizado por Stano e colaboradores (2012) demonstrou que a administração de partículas de 200nm foi mais eficiente direcionado as vias de apresentação MHC I e MHC II, aumento na resposta dependente de células CD4⁺, assim como, o aumento na resposta humoral sistêmica, quando comparadas a nanopartículas de mesma composição e com 30nm de diâmetro (Stano et al., 2012). Outro trabalho semelhante foi desenvolvido por Wang e colaboradores (2011), o que demonstrou que partículas de carbono mesoporosas de 470nm foram capazes de induzir uma resposta imune ao antígeno BSA semelhante a uma resposta induzida através da coadministração do antígeno com adjuvante de Freund (Wang et al., 2011).

Diferentes tipos de nanopartículas são fagocitadas por diferentes tipos celulares, geralmente dependendo das características e do lugar que as nanopartículas se encontram. Mas geralmente, partículas com grupamentos amínicos na superfície formam uma corona em volta da nanopartículas mais fina e são captadas mais facilmente, provavelmente por receptores scavengers (Frohlich, 2015).

Em relação as células profissionais apresentadoras de antígenos, as nanopartículas podem interagir de diversas maneiras, principalmente através da ativação de receptores específicos (PAMPs e DAMPs) que promoverão a ativação de células dendríticas e a indução do reconhecimento das nanopartículas com consequente processamento de antígeno (Irvine et al., 2015). As nanopartículas podem possuir efeito adjuvante próprio, como por exemplo, nanocompostos feitos de ácido polilacto-glicólico (PLGA) e ouro, que em células dendríticas (BMDC), podem induzir a formação do complexo inflamassoma e consequente liberação de IL-1 β (Niikura et al., 2013; Sharp et al., 2009). Outra possibilidade é o carregamento de adjuvantes em nanopartículas para locais específicos, evitando assim a disseminação indiscriminada de imunoestimulantes pelo organismo com consequente redução de possíveis efeitos colaterais (Kasturi et al., 2011). O carregamento por nanocompostos pode também concentrar a quantidade de adjuvantes em determinados órgãos linfoides, formando depósitos intranodais e prolongando a exposição de imunoestimulantes nesses importantes locais de ação (Jewell et al., 2011). A Figura 7 demonstra as principais vias de interação com as APCs do sistema imune.

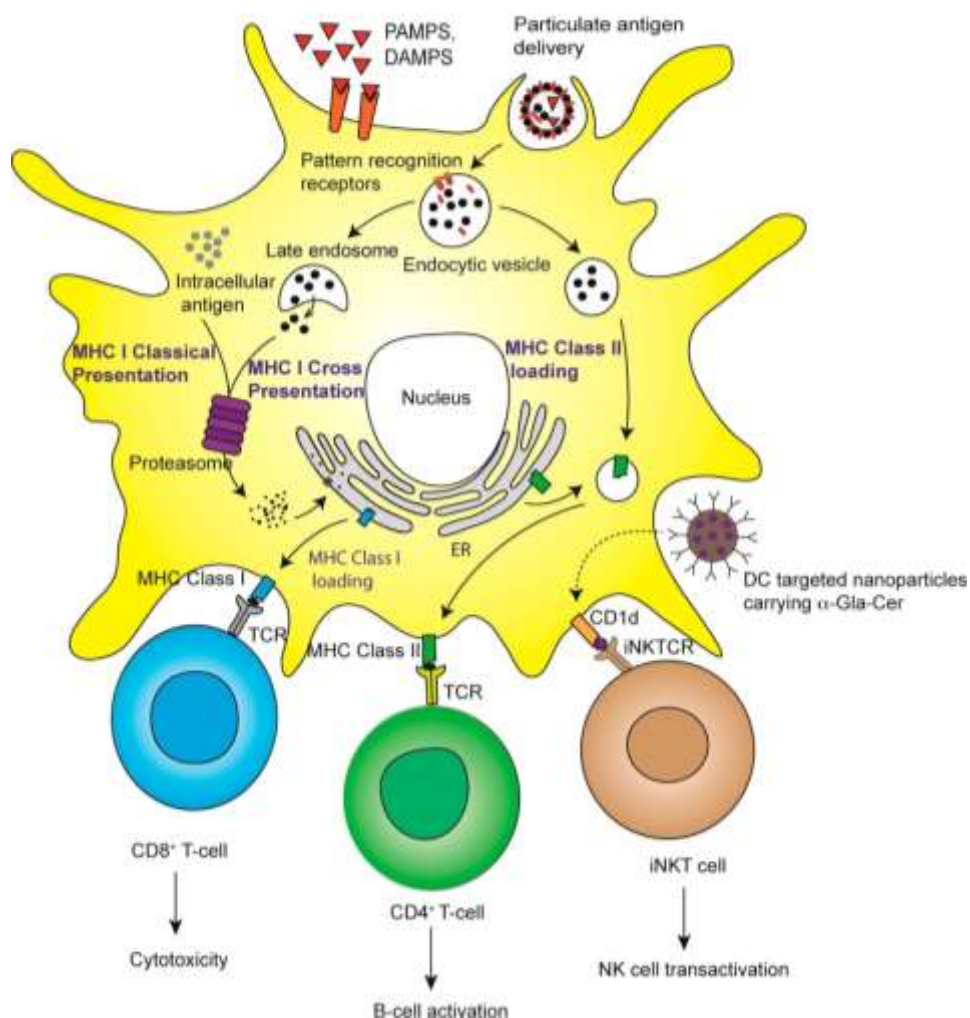


Figura 7 Visão esquemática dos principais mecanismos de captura e apresentação de nanopartículas por APCs. As nanopartículas são captadas por células profissionais do sistema imune, geralmente por fagocitose. Os antígenos presentes nas nanopartículas são então degradados por proteases específicas presentes nos endossomos e são então ligados a moléculas de MHCII, posteriormente sendo apresentados a células TCD4⁺, sendo estas, as células auxiliares na geração de uma resposta imune humoral e celular. As nanopartículas podem carrear os antígenos para serem produzidos na própria célula, os quais serão degradados via proteossoma e enviados ao retículo endoplasmático, onde serão ligados a molécula de MHC I. Existe ainda a possibilidade de ocorrer a apresentação cruzada, onde as nanopartículas podem levar ao escape dos antígenos dos endossomos tardios, via mecanismos específicos, e posteriormente levando a degradação dos antígenos via MHC I. Uma vez carregados nas moléculas de MHC I, os antígenos serão apresentados a linfócitos TCD8⁺ correspondentes, com consequente indução de uma resposta imune citotóxica. Outros mecanismos de indução do sistema imune também podem ocorrer, como por exemplo, a apresentação de antígenos a células iNKT (invariant natural killer T cell), abrindo a possibilidade de geração de respostas imunes a diferentes tipos de antígenos, como lipídeos. Adaptado de (Irvine et al., 2015).

A utilização de nanopartículas como carreadoras pode aumentar a captação de antígenos por APCs do sistema imune, como por exemplo, Foged e colaboradores (2004) demonstraram que lipossomos catiônicos são rapidamente internalizados por células dendríticas, enquanto que lipossomos aniônicos necessitam de alguns motivos específicos que direcionem para uma eficiente internalização (Foged et al., 2004). Outro exemplo importante, é o trabalho realizado por Niikura e colaboradores (2013), no qual eles avaliam a capacidade de captação de diversos nanomateriais de ouro por células Raw 264.7 e percebem que, os nanobastões de ouro são os mais eficientemente internalizados quando comparados com as outras nanopartículas (Niikura et al., 2013).

Além dos antígenos clássicos, as nanopartículas podem carrear antígenos de natureza lipídica, carboidratos ou outros metabólitos antigênicos. Uma de tais estratégias é a utilização de nanopartículas funcionalizadas com o α -Gal-Cer, os quais irão direcionar as nanopartículas e antígenos lipídicos para o MHC não convencional Cd1D, os quais apresentam a capacidade de apresentar e estimular a geração de uma resposta imune mediada por células invariantes NKT (Irvine et al., 2015).

Mesmo com alguns conceitos bem estabelecidos, deve-se notar que, a extensão do direcionamento a células APCs do sistema imune, captação de partículas e subsequente ativação do sistema imune depende das características físico-químicas do nanocarreador, assim como o tipo de adjuvante empregado na formulação vacinal. Portanto, a eficiência na geração de uma resposta imune adaptativa por nanovacinas deve ser otimizada no contexto de cada nanocarreador e adjuvante (Fan and Moon, 2015).

1.8.1 Nanotecnologia e o ouro

O ouro é um elemento nobre quintessencial e vem sendo utilizado a milhares de anos pela humanidade, principalmente na fabricação de jóias, cunhagem de moedas e em peças eletrônicas (Dreaden et al., 2012). O uso do ouro na medicina data de 2500 A.C. por egípcios e chineses, passando pela idade média durante os séculos 17 e 19 na fabricação de elixires e na medicina moderna para o tratamento de artrite reumatoide, artrite psoriática e lúpus eritematoso discoide (Thakor et al., 2011).

Nanopartículas de ouro apresentam diversas características diferentes do ouro bruto ou em escala molecular, o que tem extensamente atraído à atenção de químicos, físicos e biomédicos (Dreaden et al., 2012). Nanopartículas de ouro podem ser produzidas em uma grande variedade de formatos, como nanoesferas, nanobastões, nanogaiolas, nanoprismas, nanoestrelas dentre outros (Thakor et al., 2011).

Nanomateriais de ouro podem ser utilizados nas mais diversas aplicações biológicas, como por exemplo, biosensoriamento, carreamento de genes e fármacos, fototerapia, bioimagem e carreamento de vacinas (Dreaden et al., 2012; Jorge Pérez-Juste, 2005; Liopo et al., 2012).

Dentre as nanopartículas de ouro, os nanobastões de ouro surgem como importantes candidatos à carreadores vacinais.

1.8.2 Nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro vem sendo amplamente utilizados para as mais diversas finalidades, como por exemplo, biomagem, sensoriamento, detecção de moléculas,

testes imunológicos, termoterapia e como carreadores vacinais (Dreaden et al., 2012; Liopo et al., 2012; Niikura et al., 2013; Xu et al., 2012).

A ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) de nanopartículas metálicas é o resultado da oscilação coletiva dos elétrons de condução quando submetidos a interação com a luz (Funston et al., 2009). O formato de bastão das nanopartículas de ouro apresentam dois característicos picos de ressonância de plasmon de superfície, devido ao plasmon de superfície transverso (~500 a 600nm) e o longitudinal (~650 a 800nm)(Chen et al., 2013). Tal característica pode ser utilizada para a caracterização da funcionalização das nanopartículas.

Em relação a segurança de tal metodologia, acredite-se que a citotoxicidade de nanobastões de ouro é dependente da concentração, tamanho, formato, tipo de funcionalização, ou até mesmo o meio de dissolução, e os estudos *in vitro* e *in vivo* existentes até o momento, são raros e controversos (Wan et al., 2015). Porém, o tipo de biofuncionalização parece estar mais relacionado as interações com o sistema imune e citotoxicidade, do que o tamanho da nanopartículas (Alkilany et al., 2009).

1.8.3 Biofuncionalização

Nanobastões de ouro se encontram em lugar de grande destaque no campo da nanotecnologia e o conhecimento sobre os potenciais riscos e segurança de tais nanopartículas é de grande importância (Dreaden et al., 2012; Fraga et al., 2013).

Brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) é amplamente utilizado para o controle do crescimento e dispersibilidade durante a síntese de nanobastões de ouro. Apesar das grandes promessas de utilização biomédica dos nanobastões de ouro, o CTAB

utilizado no processo de fabricação é tóxico para a maioria das células, portanto, os procedimentos de remoção do CTAB ou funcionalização das nanopartículas são necessários para a diminuição do potencial citotóxico e posteriores aplicações terapêuticas (Wang et al., 2013; Xu et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Vários grupamentos funcionais são comumente utilizados durante a funcionalização, sendo os alceno tióis os mais comuns. Tais alceno tióis geralmente apresentam motivos terminais como: Ácidos carboxílicos, aminas, azidas, maleimidadas, fenóis, álcoois, carboidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas (Biju, 2014).

Vários trabalhos demonstram a importância de uma correta biofuncionalização dos nanobastões de ouro. O trabalho realizado por Wan e colaboradores (2005) demonstrou que, nanobastões de ouro com diferentes tipos de funcionalização e diferentes tamanhos, apresentavam citotoxicidade em níveis diferentes. Aparentemente, os nanobastões de ouro com o mesmo tipo de funcionalização, porém com tamanhos diferentes, não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação a citotoxicidade, níveis de autofagia, despolarização de membranas mitocondriais, porém, apresentaram diferentes níveis de acumulação de espécies reativas de oxigênio. Os nanobastões de ouro de mesmo tamanho, porém com diferentes tipos de funcionalização, apresentaram diferentes níveis de danos celulares, sendo os nanobastões de ouro cobertos com CTAB, os que apresentaram os maiores níveis de citotoxicidade, autofagia e aumento no tamanho das mitocôndrias, porém, nenhum aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Quando avaliados *in vivo*, nenhum dos nanobastões avaliados induziu efeitos adversos significativos, como diferenças no peso, fígado ou sistema mononuclear do sangue (Wan et al., 2015). Os trabalhos realizados por Zhu e

colaboradores (2014) demonstraram que nanobastões de ouro funcionalizados com CTAB, PSS (*polystyrene sulfate*), ou SiO₂ mesopórica, apresentaram alta citotoxicidade, enquanto que nanobastões de ouro funcionalizados com polietilenoglicol e TiO₂ não apresentaram nenhum dano celular quando incubadas com células RAW 264.7 ou U-87 MG (Zhu et al., 2014). Os trabalhos realizados por Alkilany e colaboradores (2009) demonstraram que vários nanobastões de ouro de tamanhos diferentes não apresentaram diferenças nos níveis de citotoxicidade celular, quando avaliadas em células HT-29, porém, a presença de CTAB como estabilizante dos nanobastões de ouro, foi responsável pela indução de dano e morte celular (Alkilany et al., 2009).

1.8.4 Nanobastões de ouro como carreadores vacinais

Os nanobastões de ouro são considerados como promissores carreadores vacinais por vários pesquisadores (Dreaden et al., 2012; Stone et al., 2013; Xu et al., 2012). No trabalho realizado por Xu e colaboradores (2012), animais foram imunizados com nanobastões de ouro funcionalizados com os polímeros catiônicos PDDAC, PEI e CTAB, todos conjugados a plasmídeos codificantes da proteína Env 1 do vírus HIV1. Quando avaliada a resposta imunológica destas vacinas, os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro cobertos com PDDAC e PEI foram capazes de induzir uma elevada produção de IFN- γ , maiores títulos de anticorpos anti- Env1, maior capacidade proliferativa de células TCD4⁺ e TCD8⁺ e maiores níveis de maturação de células dendríticas quando comparados aos animais imunizados somente com os plasmídeos contendo a sequência da proteína Env1 (Xu et al., 2012).

Nanobastões de ouro funcionalizados com PAA/PAH foram conjugados com a proteína de fusão F do vírus sincicial respiratório (RSV) e quando avaliados *in vitro*, os nanobastões conjugadas a proteína, quando colocados em cultivos de células dendríticas humanas, foram capazes de induzir uma maior proliferação de linfócitos T quando comparados ao grupo controle, indicando o potencial de tal tecnologia como carreador vacinal (Stone et al., 2013).

2- JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma importante parasitose mundial, afetando mais de 207 milhões de pessoas em 76 países ao redor do mundo, e é considerada a helmintíase mais importante, quando levados em consideração morbidade e mortalidade (McManus and Loukas, 2008). Estudos realizados por Gryssels e colaboradores (2006) demonstram que algumas cepas de *Schistosoma mansoni* desenvolvem a capacidade de resistência ao tratamento quimioterápico (Gryseels et al., 2006). Assim como medida profilática, a vacinação seria um método ideal para o controle da esquistossomose, exclusivamente ou em combinação com quimioterápicos, sendo que a vacinação poderia atuar na redução da morbidade e também impactar a transmissão (Bergquist et al., 2005).

Sendo assim vários antígenos de *S. mansoni* já foram avaliados em relação ao potencial imunogênico, demonstrando diferentes percentuais de proteção alcançados, como proteínas do tegumento, calpaína, SODs (superóxido dismutases), filamina, ECL (Sm200), Sm25, Sm21.7, Smfimbrina, paramiosina, FABPs, (proteínas ligadoras de ácidos graxos) dentre outras (McManus and Loukas, 2008; Pinheiro et al., 2011).

As proteínas Sm29 e TSP-2 do tegumento do *S. mansoni* já foram avaliadas como candidatos vacinais em modelo murino e foram capazes de induzir níveis de 51 e 57% de proteção, respectivamente, porém ambas como proteínas recombinantes (Cardoso et al., 2008; Tran et al., 2006).

Devido aos resultados poucos promissores apresentados até o momento no desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose mansônica, a junção de um ou mais antígenos na metodologia de imunização pode ser responsável pela

potencialização dos níveis de proteção alcançados pelas proteínas em sua forma individual (Romeih et al., 2008).

Visto que a vacinação com DNA é capaz de induzir respostas imunes celulares e humorais, assim como outros componentes do sistema imunológico (Liu, 2011) e que tal metodologia de imunização pode resolver os problemas encontrados com a difícil solubilização da Sm29, visamos avaliar o potencial de tal metodologia como forma de imunização contra a esquistossomose mansônica murina utilizando os candidatos vacinais Sm29 e Tetraspanina-2, em sua forma individual, ou em forma de químera ou vacina multivalente.

A nanotecnologia vem atraindo a atenção de pesquisadores de diversas áreas, principalmente devido as diferentes características e propriedades que os materiais assumem quando se encontram em escala nanométrica. Existem diversos tipos de nanopartículas até o momento, compostos de diversos tipos de materiais e apresentando uma grande diversidade de formas, e dentre tais nanopartículas, se destacam os nanobastões de ouro (Dreaden et al., 2012; Huang et al., 2009). Os nanobastões de ouro são nanopartículas anisotrópicas, compostas de ouro maciço, que apresentam ressonância de elétrons de superfície sensíveis ao ambiente químico, alta estabilidade, biocompatibilidade, baixo custo de produção e alto potencial como carreadores vacinais, visto os resultados promissores obtidos por (Xu et al., 2012) e (Stone et al., 2013). Nenhum estudo utilizando nanobastões de ouro como carreadores vacinais contra parasitas foi realizado até o momento. Portanto, visamos também conjugar a proteína recombinante rSm29 a nanobastões de ouro e avaliar o potencial de tal metodologia contra a esquistossomose mansônica.

3- OBJETIVO

3.1- Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência das vacinas de DNA contendo as sequências das proteínas Sm29 e/ou tetraspanina-2(TSP-2) do *S. mansoni*, e a proteína recombinante Sm29 associada à nanobastões de ouro como nova estratégia vacinal.

3.2- Específicos

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a transcrição e tradução das proteínas Sm29, TSP-2 e quimera, contidas nas vacinas de DNA *in vitro* em células BHK21, através das técnicas de RT-PCR e western blot
- Caracterizar a ligação da rSm29 aos nanobastões de ouro através de espectros UV-VIS, microscopia de transmissão e ELISA
- Analisar a resposta humoral através da avaliação dos níveis de IgG, após a imunização com as vacinas de DNA e com os nanobastões de ouro
- Determinar o perfil de citocinas através da dosagem de IL-4, IL-5, IFN- γ , e TNF- α , após a imunização com as vacinas de DNA e com os nanobastões de ouro
- Avaliar os níveis de proteção alcançados com as vacinas de DNA e com os nanobastões de ouro
- Determinar a influência das imunizações com as vacinas de DNA na patologia dos ovos no fígado

- Avaliar as células produtoras de IFN- γ através de citometria de fluxo
- Avaliar o possível mecanismo de interação entre os nanobastões de ouro ligados a proteína recombinante Sm29 com as células dendríticas.

4- METODOLOGIA

4.1- Animais e parasitas

Camundongos fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram adquiridos do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais. Cercárias de *S. mansoni* (cepa LE) foram obtidas do Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz pelo método de estimulação luminosa a caramujos infectados para a liberação de cercárias. Número de cercárias e viabilidade foram determinados usando microscópio ótico antes da infecção. Todos os estudos utilizando-se animais experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) Protocolo nº 254/2010.

4.2- Construções dos plasmídeos

As sequências gênicas correspondentes as proteínas Sm29, TSP-2 e a forma quimérica de ambas foram sintetizadas no plasmídeo pUMVC3 (Aldevron), Figura 8, pela empresa Epoch Biolabs (Missouri, Texas, USA). Basicamente, foi sintetizada a sequência da Sm29 codificando do aminoácido Val27 a Lys169, a sequência da alça extracelular 2 da SmTSP-2 codificando do aminoácido Glu107 a His184, e uma sequência quimérica, contendo a mesma sequência da Sm29 (Val27 – Lys169) na porção N-terminal e a sequência da alça extracelular 2 da SmTSP-2 (Glu – His184) na porção C-terminal. As sequências gênicas foram inseridas no sítio múltiplo de clonagem entre as regiões correspondentes as enzimas de clivagem EcoRI(1102) e XbaI(1130) e sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV IE). Os insertos passaram por processo de otimização de sequência para expressão gênica em

células de mamíferos e a sequência de KOZAK (5'GCCGCCACCATGG3') foi inserida na janela de leitura em cada um dos genes correspondentes.

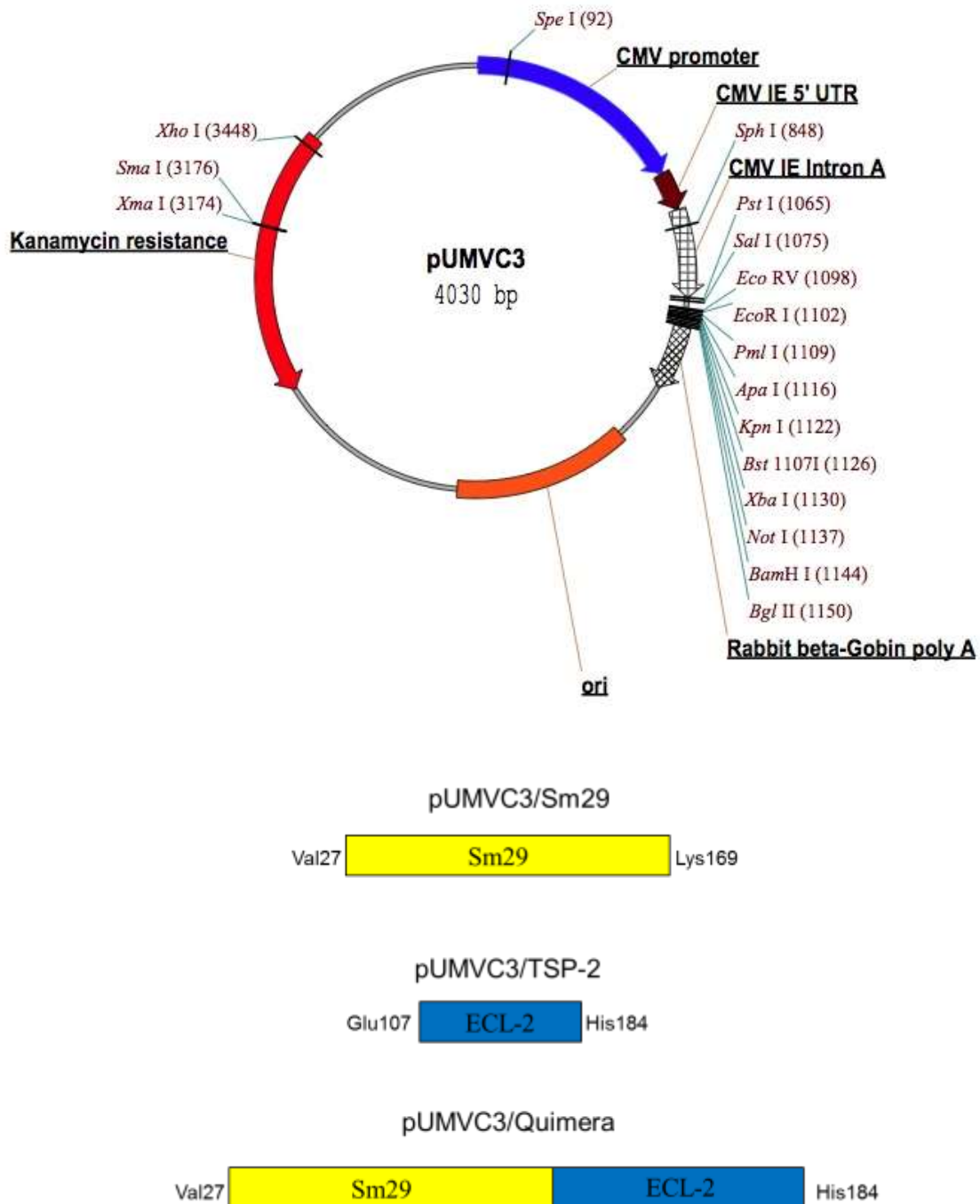


Figura 8 Construções das vacinas de DNA. Utilizamos o plasmídeo pUMVC3 da empresa Aldevron e sintetizamos as sequências da proteína Sm29, a alça extracelular 2 da SmTSP-2 e uma quimera proveniente da fusão de ambas entre os sítios de restrição EcoRI e XBAI.

4.3- Vacinas de DNA

As construções pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera foram amplificadas na cepa bacteriana XL1-Blue e isoladas usando EndoFree Plasmid Giga Kit® (Qiagen, Valencia, CA) conforme manual do fabricante. Os plasmídeos foram ressuspensos em solução salina fosfato tamponado a uma concentração final de 1mg/mL para posteriores imunizações. A integridade dos plasmídeos foi avaliada em gel de agarose 1% corado com blue-green.

4.4 Produção de Sm29 ,TSP-2 e quimera recombinante

A proteína Sm29 recombinante foi produzida de acordo com Cardoso et al., 2006. Em resumo, o cDNA da proteína Sm29 ligado a uma cauda C terminal de histidina 6x foi produzido em *E. coli* utilizando o vetor de expressão pET21a (Novagen, NJ, USA). A proteína Sm29 recombinante foi purificada em uma coluna de afinidade e dializada em PBS pH 7.0.

Para a produção da rTSP-2, a sequência da alça extracelular 2 da proteína TSP-2 (Glu107-His184) foi sintetizada no plasmídeo pD444-CH pela empresa DNA 2.0. Cresceu-se um litro de meio de cultura contendo a bactéria *E. coli* BL21 (DE3 codon plus) transformada com plasmídeo recombinante até a densidade ótica de 0.5-0.8 (600nm) e a expressão gênica da proteína rTSP-2 foi induzida com 1mM de IPTG. Após 4 horas de indução, as bactérias foram coletadas através de centrifugação a 5000xg por 20 minutos. Ressuspendeu-se o pellet em 50mLs de tampão 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl and 10 mM imidazol. Subsequentemente, as células foram submetidas a quatro ciclos de sonicação durando 30 ciclos cada e

então centrifugadas a 5000xg por 20 minutos. A proteína rTSP-2 foi recuperada como corpos de inclusão e solubilizada em 50mLs de tampão 8M uréia, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl e 10 mM imidazol. A proteína TSP-2 recombinante foi purificada em uma coluna de afinidade (Hitrap chelating 5 mLs) e dializada em PBS pH 7.0.

Utilizamos uma mistura de duas quimeras recombinantes, quimera A e quimera B, que foram denominamos aqui, como quimera recombinante, as quais foram usadas somente como estímulos para esplenócitos ou para sensibilização de placas de ELISA, e a Figura 9 esquematiza como é a sequência na quimera recombinante. A quimera A (proteína contendo a sequência da ECL-2 da Sm-TSP-2 na região N-terminal e a porção N-terminal da proteína Sm29 (Val27-Leu87) na região C-terminal) e quimera B (proteína contendo a sequência da ECL-2 da Sm-TSP-2 na região N-terminal e a porção C-terminal da proteína Sm29(Cys88-Lys169) na região C-terminal) recombinantes foram produzidas de acordo com Pinheiro et al., 2014, e a mistura delas foi chamada de quimera recombinante.

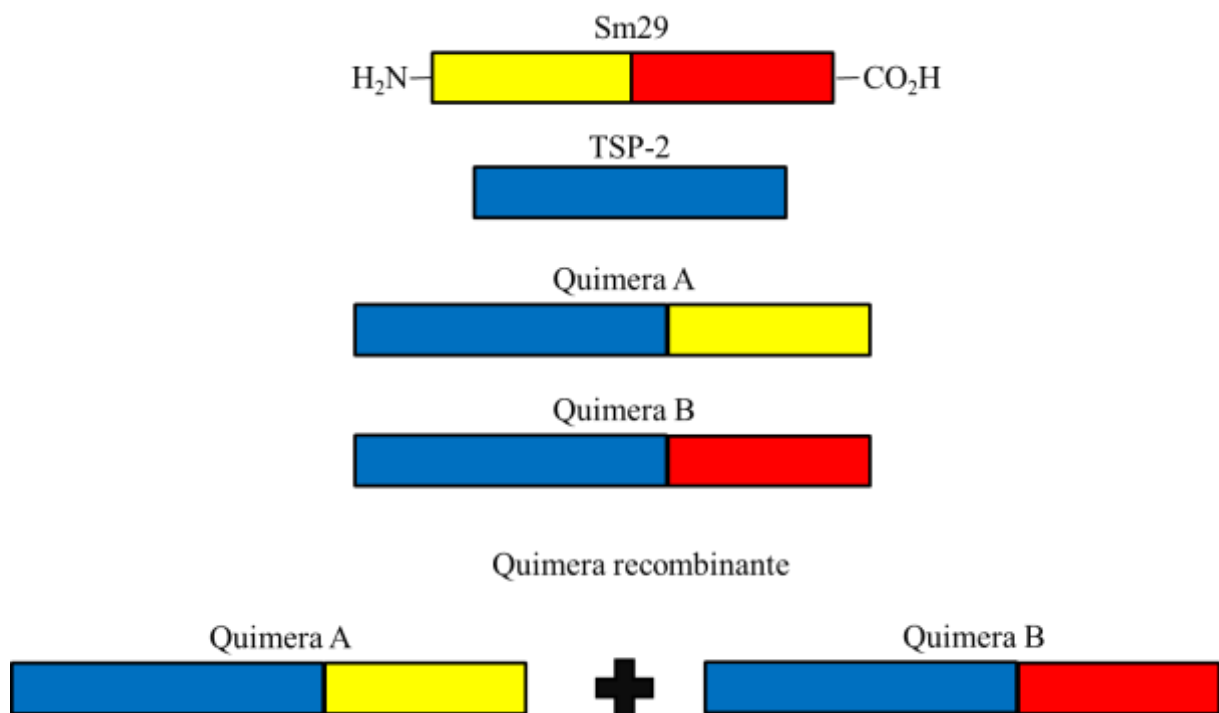


Figura 9 Esquema das sequências presente na quimera recombinante. A quimera recombinante é composta de uma mistura das quimeras A e B, e neste trabalho, foi denominada quimera recombinante.

4.5- RT-PCR

Para a avaliação transcricional das vacinas de DNA, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera utilizando-se o agente transfectante lipofectamina2000, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente extraiu-se o RNA total das células transfectadas e sintetizou-se a fita de DNA complementar a partir de tal molde. O cDNA obtido foi utilizado para o protocolo de RT-PCR.

Resumidamente, o protocolo de RT-PCR se encontra esquematizado na Figura 10.

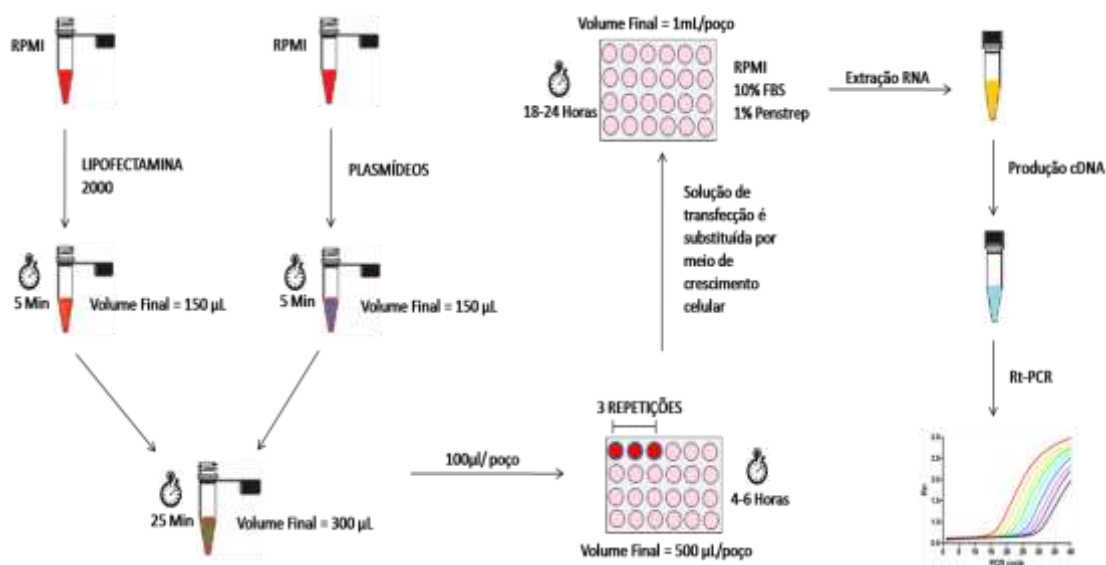


Figura 10 Protocolo para avaliação da transcrição gênica. Desenho esquemático do protocolo de transfecção celular. Plasmídeos pUMVC3 contendo as sequências das proteínas de interesse foram utilizadas em conjunto com o agente transfectante LIPOFECTAMINA2000 para transfectar células BHK-21 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente extraiu-se RNA, o qual serviu de molde para a síntese de cDNA e posteriormente foi utilizado para quantificação do acúmulo de mRNA via RT-PCR.

4.5.1- Crescimento e transfecção das células

Células BHK-21 foram crescidas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (PenStrep), a uma temperatura de 37°C até atingir confluência igual ou equivalente a 80%. Posteriormente o meio foi substituído por RPMI contendo 0,5µg de cada plasmídeo emulsificado em lipofectamina, a uma proporção de 2:1, em triplicatas aos poços correspondentes como apresentado na Figura 11. Após 6 horas o meio das células foi substituído por meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (Penstrep) e armazenadas a 37°C para posterior utilização em ensaios de RT-PCR.

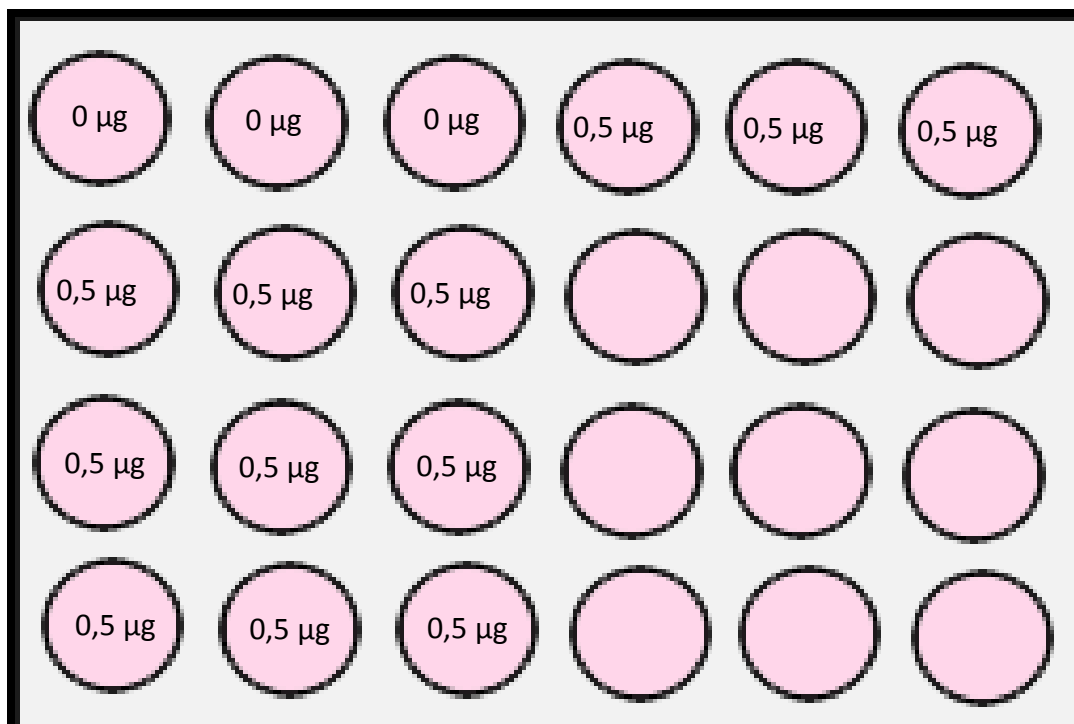


Figura 11 Esquema de transfecção celular. Desenho esquemático das concentrações de lipofectamina e plasmídeos para a transfecção.

4.5.2- Extração de RNA total

O RNA total foi obtido de células BHK-21 transfectadas com plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera através do kit Illustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi quantificado em nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

4.5.3- Síntese cDNA

A partir de uma quantidade de 1µg de RNA total molde produziu-se cDNA fita simples com o kit Illustra™ Ready-to-Go™ RT-PCR Beads (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.4- Escolha e Síntese dos Iniciadores

Iniciadores para a reação de RT-PCR foram desenhados através do programa PRIMER 3, processos de oligomerização ou dimerização foram analisados pelo programa OLIGO ANALYZER e possíveis ampliações inespecíficas foram verificadas através do programa PRIMER-BLAST(NCBI). Os primers escolhidos estão listados na Tabela 1.

Sequência	
Iniciador direto Sm29	5' CGGAATCCCCATAAACTTCC 3'
Iniciador reverso Sm29	5' CGGACAGCACTTTCTGGTTT 3'
Iniciador direto TSP-2	5' ACATCACAAGCGCACTGAAG 3'
Iniciador reverso TSP-2	5' CCCCGTCTTTAGAGCATGAA 3'
Iniciador direto Quimera	5' CCAAAGGACTATGGCGAAAA 3'
Iniciador reverso Quimera	5' GATGCTGACGCTAGTCACGA 3'

Tabela 1 Sequências de iniciadores para o procedimento de RT-PCR

4.5.5- Amplificação do cDNA

Para amplificação os cDNAs obtidos foram utilizados como material genético molde. Cada reação de RT-PCR realizada em triplicata foi constituída de 2µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 1µL de iniciador direto (10µM), 1µL de iniciador reverso (10µM) e 3µL de cDNA. As reações de amplificação foram conduzidas em equipamento ABI 7900 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a

50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto.

Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi β -actina. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas.

4.6- Western blot

Para a detecção da Sm29, TSP-2 e da quimera proveniente da fusão de ambas, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera utilizando-se o agente transfectante lipofectamina2000, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente as proteínas das células transfectadas, foram extraídas e corridas em gel de poliacrilamida desnaturante e submetidas a análises de reconhecimento por anticorpos policlonais anti-Sm29 e anti-TSP-2. O protocolo encontra-se esquematizado na Figura 12.

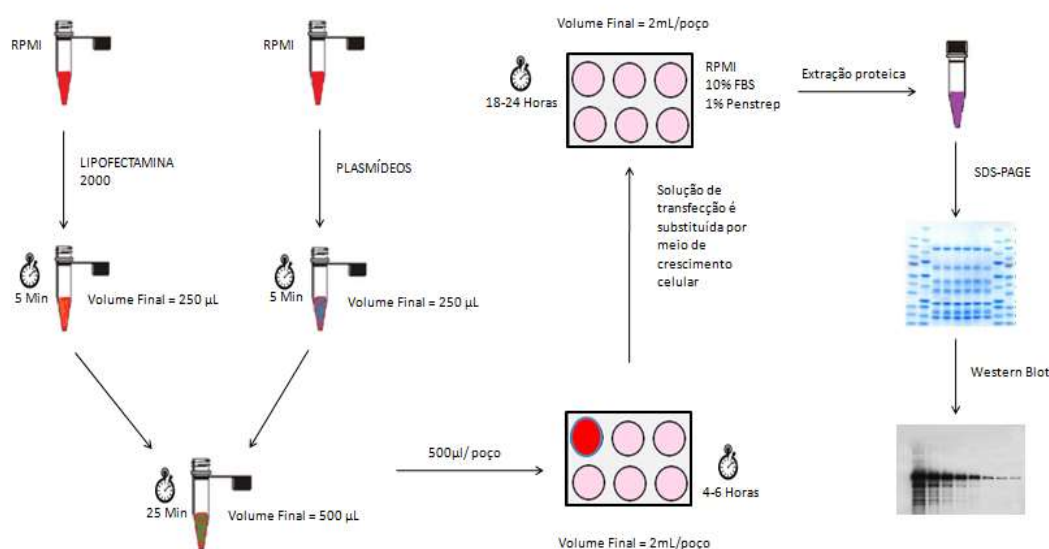


Figura 12. Protocolo para avaliação da expressão protéica. Desenho esquemático do protocolo de transfecção celular. Plasmídeos pUMVC3 contendo as seqüências das proteínas de interesse foram utilizadas em conjunto com o agente transfectante LIPOFECTAMINA2000 para transfectar células BHK-21 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente as proteínas totais foram extraídas e corridas em gel de poliacrilamida para posterior avaliação via western blot.

4.6.1- Transfecção de células BHK-21

Células BHK-21 foram crescidas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (PenStrep), a uma temperatura de 37°C até atingir confluência igual ou equivalente a 80%. Posteriormente o meio foi substituído por RPMI contendo 1µg de cada plasmídeo emulsificado em lipofectamina, a uma proporção de 2:1. Após 6 horas o meio transfectante foi substituído por meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (Penstrep) e as células armazenadas a 37°C.

4.6.2- Extração Proteica

Proteínas totais foram extraídas utilizando-se o tampão de lise celular contendo 50mM de tris-HCl pH 7.4, 150mM de NaCl, 50mM de NaF, 10mM de β-Glicerofosfato, 0,1mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 1mM de ortovanadato de sódio e 1:100 de coquetel de inibidores de proteases (SIGMA, P8340). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas brevemente a 3000rpm para separar o sobrenadante dos debrís celulares.

4.6.3- Western Blot

Para o ensaio de western blot, 20 µL de extrato proteico, obtido de acordo com a seção 4.5.2, foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida 15% e posteriormente transferidas a membrana de nitrocelulose e bloqueada overnight com PBST (tampão salina-fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20) e 5% de leite em pó desnatado. A membrana foi lavada durante 5 minutos por 3 vezes com PBST 0,05% e então incubou-se durante 60 minutos com soro de animais imunizados com

as proteínas Sm29 e TSP-2 na diluição 1:200. A membrana foi lavada novamente durante 5 minutos por três vezes com PBST 0,05% e incubada com anti-IgG total conjugado a HRP 1:2000 (Promega) por aproximadamente 60 minutos. Após nova lavagem em PBST 0,05% durante 5 minutos por 3 vezes, a membrana foi incubada durante 45 minutos em 2mL de reagente quimioluminescente da enzima HRP (MILLIPORE). A reação foi analisada no aparelho STORM (GE Healthcare).

4.7- Imunização e infecção

Para a imunização com vacinas de DNA, fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram divididas em grupos de dez animais cada. Cada animal recebeu 50µL de cardiotoxina (Sigma, Sant Louis, MO) a uma concentração de 10µM cinco dias antes da primeira imunização em cada músculo quadríceps. Cada animal foi imunizado com 50µL de solução PBS contendo plasmídeos a uma concentração de 1µg/µL em cada músculo quadríceps, o que equivale a 100µg de plasmídeo por animal, nos dias 0, 15, 30 e 45. Os grupos foram divididos em animais sendo imunizados com pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e o último grupo recebendo a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2.

Para a imunização com os nanobastões de ouro, fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram divididas em grupos de dez animais cada. Cada animal foi imunizado com 200µL de solução aquosa contendo nanobastões de ouro, com ou sem MPLA, com uma quantidade equivalente a 2µg de proteína rSm29 por animal, nos dias 0, 15 e 30. Os grupos foram divididos em animais sendo imunizados com nanobastões de ouro (AuNRs), nanobastões de ouro ligados diretamente a proteína

rSm29 (AuNRs-rSm29), nanobastões de ouro funcionalizados com a cisteamina (AuNRs-NH₂) e posteriormente ligados a rSm29 (AuNRs-NH₂-rSm29). O grupo Freund foi utilizado como controle do adjuvante, e os animais dos grupos Freund + rSm29, receberam 25µg de proteína por imunização e foram utilizados como caráter comparativo.

Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram anestesiados com quetamina 5%, xilazina 2% e NaCl 0,9% diluídos em água para injeção e desafiados através de exposição percutânea da pele abdominal por uma hora em água contendo 100 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE).

4.8- Análise da carga parasitária

Quarenta e cinco dias após a infecção, os vermes adultos foram recuperados através de perfusão da veia porta (Fonseca et al., 2006; Pacifico et al., 2006) e o nível de proteção foi calculado comparando-se o número total de vermes recuperados de cada grupo em relação ao respectivo grupo controle. A porcentagem de proteção foi calculada utilizando-se da seguinte fórmula:

$$\text{Nível de proteção} = \frac{\text{Total de vermes recuperados do grupo controle} - \text{Total de vermes recuperados do grupo experimental}}{\text{Total de vermes recuperados do grupo controle}} \times 100$$

4.9- Análise de anticorpos anti-Sm29, anti-TSP-2 e anti-quimera

Soro sanguíneo foi obtido em intervalos de 15 dias entre as imunizações e armazenados a -20°C. A dosagem de anticorpos foi realizada pelo método de ELISA

indireta. Microplacas Maxisorp de 96 poços (NUNC, Dinamarca) foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução a 25µg/mL de proteína Sm29 ,TSP-2 ou quimera recombinantes em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 a 4°C por 12 a 16 horas. As placas foram lavadas 3x com PBST (tampão salina-fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20) e posteriormente bloqueadas com 200µL/poço de PBST suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) a temperatura ambiente por 2 horas. Após nova lavagem de 3x com PBST, adicionou-se 100µL/poço de cada soro a uma diluição 1:100 e manteve-se a temperatura ambiente durante 1 hora. As placas foram então lavadas 3x com PBST e adicionou-se 100µL/poço de anti-IgG mouse conjugado a peroxidase a uma diluição 1:5000 e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. As placas foram novamente lavadas 3x com PBST e a reação colorimétrica realizou-se pela adição de 100µL/poço de 200 pmoles de TMB (BD, San Diego, CA, USA). A reação foi parada pela adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico a 5%. A reação foi lida a 450nm em uma leitora de ELISA Multiscan FC (Thermo Science).

4.11- Análise de citocinas

Esplenócitos foram isolados do baço de camundongos vacinados 10 dias após a quarta imunização para as vacinas de DNA e 10 dias após a terceira imunização com os nanobastões de ouro, ou 45 dias após a infecção com cercarias de *S. mansoni*. As células foram tratadas com tampão acetato de potássio pH 7,2 (NH₄Cl 4,15 g 155mM, KHCO₃ 0,5g 10mM ,q.s.p. 500 mL) e lavadas com salina estéril 3 vezes. Após lavados, os esplenócitos foram plaqueados em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor, 100U/mL de sódio

penicilina G e 100µg/mL de sulfato de estreptomicina, a uma concentração de 1×10^6 células/poço para análises de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-5. Para evitar a estimulação das células por LPS contaminante, adicionou-se polimixina B em todos os poços, de acordo com o protocolo de (Cardoso et al., 2007). Os esplenócitos foram mantidos em cultura estimuladas somente com meio, ou rSm29 (5µg/poço), ou TSP-2 (5µg/poço), ou quimera recombinante (5µg/poço), ou Concanavalina A (ConA)(5µg/mL) ou LPS proveniente de E. coli (5µg/mL). Microplacas de 96 poços (Nunc) contendo os esplenócitos e correspondentes estímulos foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As culturas de sobrenadante foram coletadas após 24 horas de estímulo para análises de IL-4 e IL-5, após 48 horas de estímulo para análises de TNF- α e 72 horas para análise de IFN- γ . A análise de todas as citocinas foi realizada através do kit ELISA Duoset (R&D Diagnostic) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.12 Produção dos nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método mediado por semente desenvolvido independentemente por (Jana, 2001; Nikoobakht, 2003). Resumidamente, produziu-se ácido cloroáurico (HAuCl₄) através da dissolução de 5g de ouro puro em 50 mLs de água régia (1:3 HCl/HNO₃) e posteriormente seco a 40°C. O precipitado final é lavado em HCL três vezes e ressuspendido em 250 mLs de água Mili-Q.

Para a solução semente, misturou-se 10mLs de uma solução de CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio) a 0.1M com 100 µL de uma solução de ácido cloroáurico a 0.1M. Posteriormente adicionou-se 0.5mL de uma solução de NaBH₄ (boroidreto de

sódio) a 0.01M e a solução deixada em constante agitação em gelo por aproximadamente 1 minuto. A solução passou de uma cor amarelada para a cor marrom. A solução semente foi mantida por 28°C por pelo menos 1 hora antes do uso.

Para a solução de crescimento, misturou-se 50mLs de CTAB a 0.1M, 2.5mLs de AgNO₃ 4mM e 50mLs de HAuCl₄ 1mM. Posteriormente, adicionou-se gota a gota uma solução de ácido ascórbico 0.1M, até que a solução mude da cor laranja para uma solução completamente transparente, o que indicará a redução do Au⁺³ para Au⁺¹.

O passo final da síntese, é a adição de 120µL da solução semente na solução de crescimento, e a incubação a 30°C por aproximadamente 16 horas, permitindo que assim, as nano sementes de ouro induzam a redução do Au⁺¹ para Au⁰, o que juntamente com os outros reagentes, conferiram o formato de bastão das nanopartículas. Para parar a reação, a solução foi centrifugada a 5.600xg por 15 minutos, o pellet foi removido e ressolubilizado em uma solução de CTAB de mesmo volume a 100mM.

4.13 Conjugação da proteína rSm29 nos nanobastões de ouro

Utilizamos três diferentes protocolos para a funcionalização da proteína rSm29 com os nanobastões de ouro: funcionalização com o grupamento carboxílico, grupamento amínico e ligação direta da proteína aos nanobastões.

4.13.1 Funcionalização com o grupamento carboxílico ou amínico

Para a funcionalização com o grupamento carboxílico e amínico, misturou-se 400µL de AuNRs com 100µL de uma solução de Ácido Lipóico a 20mM em etanol ou Cisteamina a 10mM em água de injeção, respectivamente. As soluções foram então sonicadas por 30 minutos a 55°C e posteriormente a 90 minutos a 30°C. Adicionou-se 80µL de uma solução EDAC/NHS e sonicou-se a 4°C por 30 minutos, e então as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a uma velocidade de 3500xg. Descartou-se o sobrenadante e a amostra foi ressuspensa em 2mLs de água de injeção. Adicionou-se a proteína rSm29 a concentrações finais de 12.5, 25, 50,100 ou 200µg/mL em 0,5mL de solução final. As amostras foram então armazenadas a 27°C, e 24 e 48h após a funcionalização, foram submetidas a leitura UV-VIS (400-1000nm) para avaliação do plasmon de superfície.

4.13.2 Funcionalização direta com a proteína rSm29

Para a funcionalização direta com a proteína, misturou-se 400µL de AuNRs com 100µL de soluções contendo a proteína rSm29. As amostras foram ajustadas a concentrações finais de 12.5, 25, 50,100 ou 200µg/mL em 0,5mL de solução. As soluções foram então sonicadas por 90 minutos a 55°C e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a uma velocidade de 3500xg e então descartou-se os sobrenadantes e as amostras foram ressuspensas em 1mL de água de injeção. As amostras foram então armazenadas a 27°C, e 24 e 48h após a funcionalização, foram submetidas a leitura UV-VIS (400-1000nm) para avaliação do plasmon de superfície.

4.14 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As amostras foram funcionalizadas como descrito nas seções anteriores e posteriormente caracterizadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (Caires, 2015). As amostras foram colocadas imersas em grades de cobre para microscopia eletrônica de transmissão e posteriormente as grades com as amostras foram colocadas em dessecador para retirar o excesso de líquido. Após 48 horas, no mínimo, as amostras foram então analisadas pelo Centro de Microscopia da UFMG em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai 120KV.

4.15 ELISA para caracterização da ligação da proteína rSm29 a nanobastões de ouro

Funcionalizou-se os nanobastões de ouro com 100µL da proteína rSm29, diretamente ou através da cisteamina. Para retirar as proteínas rSm29 insolúveis não ligadas, centrifugou-se as amostras a 200xg por 2 minutos, e recuperou-se o sobrenadante. Para separar as proteínas rSm29 solúveis não ligadas, centrifugaram-se as amostras duas vezes por 15 minutos a uma velocidade de 3500xg e então descartaram-se os sobrenadantes e as amostras foram ressuspensas em 0,5mL de água de injeção. Utilizou-se nanobastões de ouro e a proteína rSm29 não funcionalizada como controles. As amostras foram então submetidas ao protocolo de ELISA. Resumidamente, as amostras foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 a 4°C por 12 a 16 horas. Posteriormente as placas foram bloqueadas com 200µL/poço de PBST suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) a temperatura ambiente por 2 horas. Adicionou-se 100µL/poço de soro anti-rSm29 a uma diluição 1:100 ou anti-His a uma diluição 1:1000 e manteve-se a

temperatura ambiente durante 1 hora. Após, adicionou-se 100µL/poço de anti-IgG mouse conjugado a peroxidase a uma diluição 1:4000 e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. A reação colorimétrica realizou-se pela adição de 100µL/poço de 200 pmoles de TMB (BD, San Diego, CA, USA). A reação foi parada pela adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico a 5%. A reação foi lida a 450nm em uma leitora de ELISA Multscan FC (Thermo Science).

4.16 Avaliação da citotoxicidade celular dos nanobastões de ouro

Para a avaliação da citotoxicidade celular dos nanobastões de ouro, 100µL de células BHK-21 foram plaqueadas em meio RPMI, suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1.5% de penstrep, em placas de 96 poços a uma concentração de 1.10^4 células/mL e as placas foram incubadas por 16 a 24 horas. Realizamos o procedimento de funcionalização dos nanobastões de ouro de acordo com os protocolos citados anteriormente. Retiramos o meio de cultivo celular das células BHK-21 e adicionamos 50µL de meio RPMI, suplementado com 2% de soro fetal bovino e 1.5% de penstrep, e adicionamos 50µL de rSm29 (200µg/mL), ou solução aquosa de CTAB (120mM), ou AuNRs sem ou após o processo de limpeza, ou AuNRs-rSm29 sem ou após o processo de limpeza, ou AuNRs-NH₂ sem ou após o processo de limpeza, ou AuNRs-NH₂-rSm29 sem ou após o processo de limpeza, ou somente o meio de cultivo celular para a padronização da porcentagem de células viáveis, e incubamos as células a 37°C e 5%CO₂. Após 48 horas de incubação realizamos a avaliação da viabilidade celular utilizando o CellTiter 96® AQueous One Solution Non-Radioactive cell proliferation Assay (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

4.17 Derivação de células dendríticas

Para obter células dendríticas, sacrificamos camundongos C57BL/6 para a extração de células da medula óssea. As células da medula óssea foram cultivadas em placas de petri contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina e 20ng/mL de GM-CSF recombinante murino. As placas de petri contendo 1×10^7 células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. No terceiro dia de incubação, 5mL de meio DMEM completo suplementado com GM-CSF foram adicionados nas placas de petri e no quinto e sétimo dias, 3 mL de meio foram substituídos por meio recém preparado e suplementado com GM-CSF. No décimo dia, coletou-se o sobrenadante das placas de petri e descartou-se as células aderidas. As células em suspensão foram então centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos a 4°C e posteriormente lavadas em HBSS 2 vezes. As células foram então centrifugadas novamente, ressuspendidas em meio DMEM completo, contadas em câmaras de newbauer e plaqueadas de acordo com a necessidade do experimento posterior.

4.18 Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas

As células dendríticas derivadas de acordo com a sessão 4.17 foram plaqueadas em placas de 96 poços com uma concentração final de 5×10^5 células por poço. Realizamos o procedimento de funcionalização dos nanobastões de ouro de acordo com os protocolos citados anteriormente, sendo que após a última centrifugação, os nanobastões de ouro foram dissolvidos em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina e 100µg/mL estreptomicina. As células

dendríticas foram incubadas com o meio DMEM suplementado e uma quantidade equivalente de 1µg de proteína rSm29 ligada a nanobastões de ouro diretamente ou através da funcionalização com cisteamina, ou com uma quantidade equivalente de nanobastões de ouro para os grupos controles AuNRs e AuNRs-NH₂, por 24h em atmosfera de 5%CO₂, 37°. As células foram então centrifugadas e lavadas com tampão fosfato 1M e fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24h. Após a fixação, as células foram imobilizadas em matriz de Epon e contrastadas com uranila de acordo com o procedimento padrão do centro de microscopia da UFMG.

4.19 Avaliação da ativação de células dendríticas

As células derivadas de acordo com a sessão 4.17 foram plaqueadas em placas de 96 poços com uma concentração final de 5x10⁵ células por poço. Realizamos o procedimento de funcionalização dos nanobastões de ouro de acordo com os protocolos citados anteriormente, sendo que após a última centrifugação, os nanobastões de ouro foram dissolvidos em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina e 100µg/mL estreptomicina. As células dendríticas foram incubadas com o meio DMEM suplementado e uma quantidade equivalente de 1µg de proteína rSm29 ligada a nanobastões de ouro diretamente ou através da funcionalização com cisteamina, ou com uma quantidade equivalente de nanobastões de ouro para os grupos controles AuNRs e AuNRs-NH₂, ou somente meio ou meio contendo a proteína recombinante Sm29 a uma concentração final de 50µg/mL. As células dendríticas foram incubadas por 24 horas a 37°C em uma atmosfera de 5%CO₂. Após as 24h de incubação, as células foram centrifugadas a 1500rpm a 4°C por 7 minutos e posteriormente lavadas com PBS. As células foram

então centrifugadas novamente seguindo as mesmas condições e as células foram incubadas com Fc Block (1:30 diluído em PBS suplementado com 0,5% BSA) por 20 minutos a 4°C. As células foram então centrifugadas novamente e lavadas em tampão PBS suplementado com 1% BSA. Após o procedimento de lavagem, adicionou-se os anticorpos: Hamster IgG1 anti CD11C murino conjugado a FITC (clone HL3; 1:100), mouse (C3H) IgG2 anti-aH-2K^d/H-2D^d murino conjugado a PE (clone 34-1-2S; 1:200), mouse IgG2a anti-MHC-II murino conjugado a APC (clone AF6 120.1;1:200) e rat(LOU) IgG2a anti CD86 conjugado a PE-Cy7 (clone GL1; 1:200). As células foram então centrifugadas e lavadas com PBS suplementado com 1% BSA e posteriormente ressuspensas em PBS. As células foram então avaliadas no aparelho Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e os resultados analisados pelo software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.20 Avaliação das citocinas produzidas por células dendríticas

As células derivadas de acordo com a sessão 4.17 foram plaqueadas em placas de 96 poços com uma concentração final de 5×10^5 células por poço. Realizamos o procedimento de funcionalização dos nanobastões de ouro de acordo com os protocolos citados anteriormente, sendo que após a última centrifugação, os nanobastões de ouro foram dissolvidos em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina e 100µg/mL estreptomicina. As células dendríticas foram incubadas com o meio DMEM suplementado e uma quantidade equivalente de 1µg de proteína rSm29 ligada a nanobastões de ouro diretamente ou através da funcionalização com cisteamina, ou com uma quantidade equivalente de

nanobastões de ouro para os grupos controles AuNRs e AuNRs-NH₂, ou somente meio ou meio contendo a proteína recombinante Sm29 a uma concentração final de 50µg/mL. As células dendríticas foram incubadas por 24 horas a 37°C em uma atmosfera de 5%CO₂. Após as 24 horas de incubação, coletou-se o sobrenadante das células dendríticas, e os níveis de IL-12 e IL-1β foram avaliados através do kit ELISA Duoset (R&D Diagnostic) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.21 Avaliação das células produtoras de IFN-γ

Animais C57BL/6 foram imunizados 3 vezes com nanobastões de ouro, nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina, nanobastões de ouro ligados a proteína recombinante Sm29 diretamente ou através da funcionalização com a cisteamina, ou então adjuvante de Freund ou adjuvante de Freund e a proteína recombinante Sm29, exatamente como descrito nas sessões anteriores. 10 dias após a última imunização ou 10 dias após a infecção com cercárias de *S. mansoni*, coletou-se os baços dos animais para o plaqueamento de esplenócitos. Foram plaqueadas 1x10⁶ células por poço e as células foram reestimuladas com Concanavalina A (5µg/mL) por 48h. Após a estimulação por 48 horas, adicionou-se 1µg Brefeldina A por poço por 4 horas.

Após os períodos de incubação, as células foram centrifugadas a 1500rpm a 4°C por 7 minutos e posteriormente lavadas com PBS. As células foram então centrifugadas novamente seguindo as mesmas condições e incubadas com Fc Block (1:30 diluído em PBS suplementado com 0,5% BSA) por 20 minutos a 4°C. As células foram então centrifugadas novamente e lavadas em tampão PBS suplementado com 1% BSA. Após o procedimento de lavagem, adicionou-se os anticorpos: Hamster IgG

anti CD3 murino conjugado a biotina (clone 500A2; 1:200), rat IgG2b anti-CD4 murino conjugado a PE-Cy7 (clone GK 1.5; 1:200) e rat IgG2a anti-CD8 murino conjugado a FITC (clone 53-6.7; 1:200), todos os anticorpos provenientes da BD biosciences. As células foram então centrifugadas e lavadas com PBS suplementado com 1% BSA e posteriormente adicionou-se estreptavidina conjugada a PerCP (1:30) por 20 minutos a 4°C. As células foram então centrifugadas e lavadas com PBS suplementado com 1% BSA e então fixadas (100µL/poço) com o reagente BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) por 20 minutos a 4°C. As células foram então centrifugadas e adicionou-se o anticorpo rat IgG1 anti IFN-γ murino conjugado a APC (clone XMG1.2; 1:30; BD) por 30 minutos a 4°C. As células foram então centrifugadas e lavadas 3 vezes, e posteriormente ressuspensas em PBS. As células foram então avaliadas no aparelho Attune Acoustic Focusing ® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e os resultados analisados pelo software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

5- RESULTADOS CAPÍTULO 1

5.1- Vacinas de DNA

5.1.1 Avaliação transcricional das vacinas de DNA

Visando avaliar a capacidade transcricional das vacinas de DNA in vitro, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera. RNA total foi extraído das células e utilizado para a síntese de cDNA, o qual foi utilizado posteriormente para avaliação transcricional pela metodologia de PCR em tempo real. Para a metodologia de PCR em tempo real foram desenhados conjuntos de primers que amplificam regiões específicas das sequências das proteínas Sm29, TSP-2 e uma dupla de primers que amplificam a região presente no plasmídeo pUMVC3/Chimera que corresponde a parte da Sm29 e parte da TSP-2. Os resultados provenientes da avaliação transcricional por PCR em tempo real se encontram representados na Figura 13.

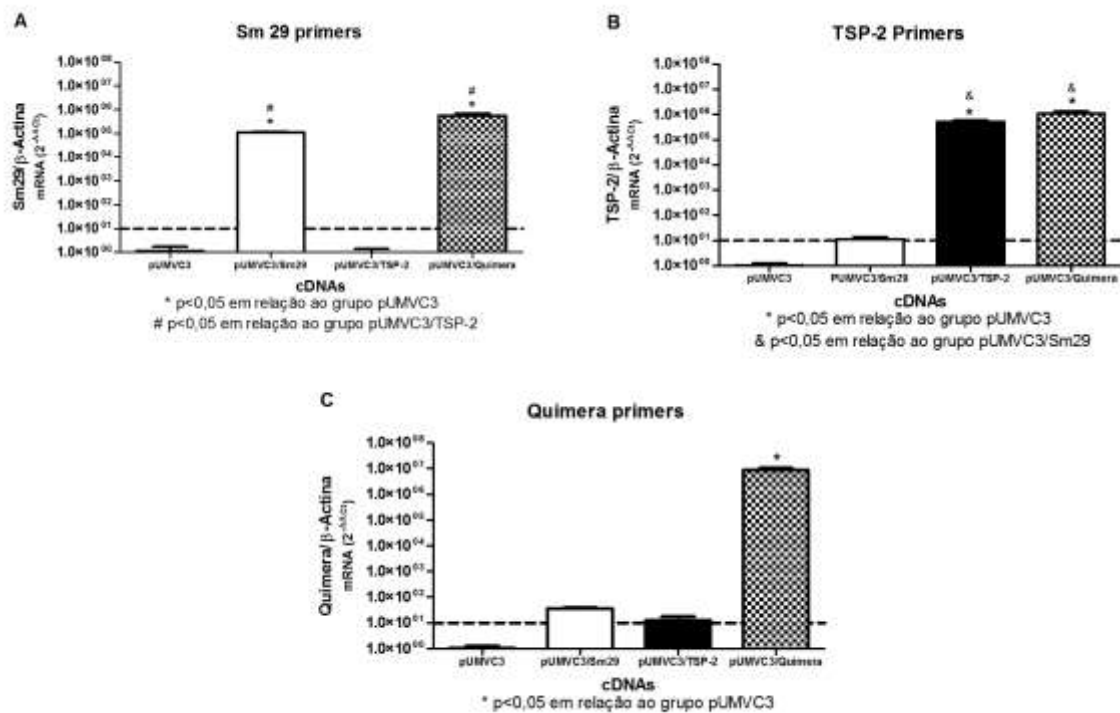


Figura 13 Avaliação transcricional das vacinas de DNA em células BHK-21. (A) Resultado da amplificação proveniente de cDNA células transfectadas com todos os plasmídeos e com primers desenhados para a sequência de Sm29. (B) Resultado da amplificação proveniente de cDNA de células transfectadas com todos os plasmídeos e com primers desenhados para a sequência de TSP-2. (C) Resultado da amplificação proveniente de cDNA células transfectadas com todos os plasmídeos e com primers desenhados para a sequência da quimera. Diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,001$, em relação ao grupo pUMVC3, pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 são representadas por (*), (&) e (#), respectivamente.

Quando utilizados os primers para Sm29, somente o cDNA proveniente das células transfectadas com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Chimera foi amplificado (Figura 13A). Quando utilizado o conjunto de primers para TSP-2, percebemos acúmulo significativo de RNA mensageiro somente nos extratos das células transfectadas com pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera (Figura 13B) e os primers para Quimera só foram capazes de amplificar o cDNA obtido de células

transfectadas com pUMVC3/Chimera (Figura 13C). Esses resultados indicam que as vacinas de DNA foram expressas em nível de mRNA.

5.1.2 Detecção de Sm29, TSP-2 e quimera em células BHK-21 transfectadas

Para a avaliação da tradução proteica das sequências de nossas vacinas de DNA, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera e as proteínas totais foram extraídas e corridas em gel desnaturante de poliacrilamida. Posteriormente, realizou-se o ensaio de western blot com anticorpos policlonais contra as proteínas Sm29 e TSP-2 e os resultados são apresentados na Figura 14.

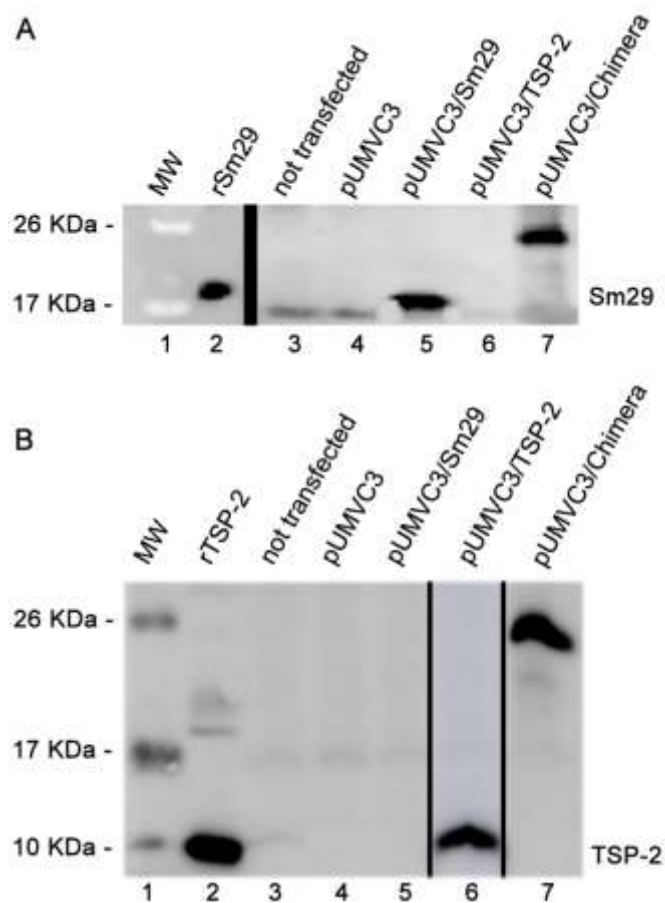


Figura 14 Avaliação da expressão protéica in vitro das vacinas de DNA por westernblot utilizando anticorpos policlonais anti-Sm29 ou anti-TSP-2. (1) Padrão de peso molecular, (2) Sm29 recombinante no painel A ou TSP-2 recombinante no painel B, (3) Células BHK-21 não transfectadas, (4) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3, (5) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/Sm29, (6) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/TSP-2 e (7) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/Chimera.

Quando utilizamos anticorpos policlonais anti-Sm29 observamos a presença de bandas de aproximadamente 18kDa e 25kDa nos extratos protéicos obtidos de células transfectadas com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Chimera respectivamente (Figura 14A). Similarmente, quando anticorpos policlonais anti-TSP-2 foram utilizados, somente os extratos das células transfectadas com

pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera apresentaram bandas características com 12kDa e 25kDa, respectivamente (Figura 14B). Os pesos moleculares de 18kDa e 12kDa correspondem aos pesos das proteínas recombinantes Sm29 e TSP-2, respectivamente. Uma proteína de aproximadamente 25kDa foi reconhecida especificamente por anticorpos anti-Sm29 e anti-TSP-2 nos extratos protéicos de células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/Chimera (Figuras 14A e 14B), o que nos leva a sugerir que a banda corresponde a proteína quimérica de 25kDa é proveniente da fusão entre a Sm29 e TSP-2.

5.1.3 Avaliação da produção de anticorpos do isotipo IgG anti-Sm29, anti-TSP-2 e anti-quimera

Para avaliar os níveis de anticorpos IgG anti-Sm29, anti-TSP-2 e anti-quimera, os soros dos animais imunizados foram avaliados pelo método de ELISA indireto (Figura 15).

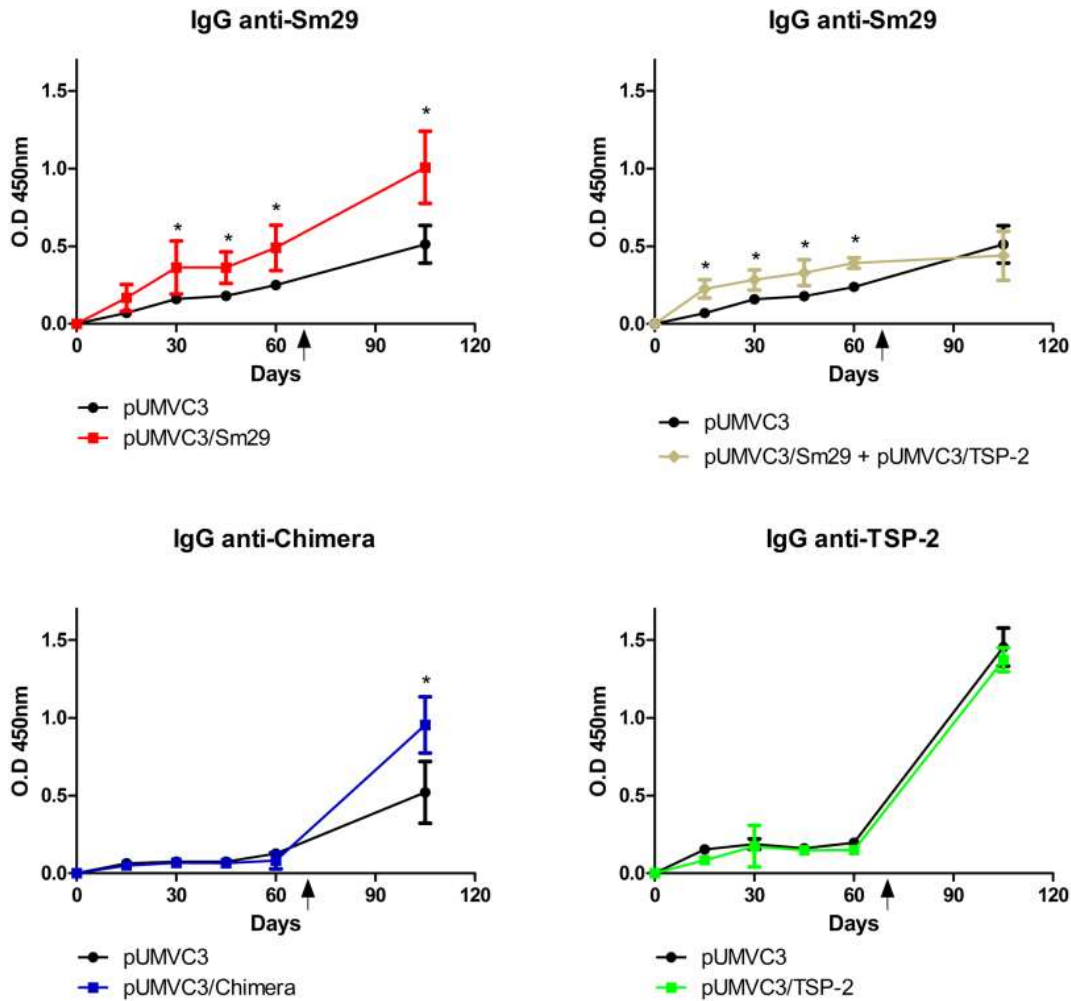


Figura 15 Níveis de anticorpos IgG anti-Sm29, anti-TSP-2 e anti-quimera de animais imunizados com as vacinas de DNA. Média \pm DP de anticorpos anti-Sm29, anti-TSP-2 ou anti-quimera dos animais imunizados com as vacinas de DNA. As setas indicam o dia da infecção (67º dia). Diferenças significativas com $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pUMVC3 são representadas por (*).

Quando avaliamos os soros dos animais que foram somente imunizados, os animais que receberam os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/ Sm29 + pUMVC3/TSP-2 apresentaram os maiores níveis de anticorpos anti-rSm29, quando comparados ao grupo controle pUMVC3. Após as imunizações, não percebemos nenhuma diferença significativa nos níveis de anticorpos IgG anti-rTSP-2 nos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/TSP-2, quando comparados ao grupo controle pUMVC3. Após a infecção, os animais que foram imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e

pUMVC3/Chimera, apresentaram os maiores níveis de anticorpos anti-rSm29 e anti-quimera, quando comparados ao grupo controle pUMVC3 (Figura 15).

5.1.4 Perfil de citocinas

Para avaliar os níveis de citocinas induzidas pela imunização com as vacinas de DNA, coletou-se esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera, pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3, dez dias após a quarta imunização ou 45 dias após à infecção, e essas células foram cultivados em placas de 96 poços estimulados com meio, Sm29 recombinante, TSP-2 recombinante, quimera recombinante, Concanavalina A ou LPS em períodos de 24, 48 ou 72 horas. O sobrenadante proveniente das culturas de esplenócitos foi coletado e as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-5 foram dosadas pelo método de ELISA indireto, e os resultados são apresentados na Figura 16 (animais imunizados) e Figura 17 (animais imunizados e desafiados).

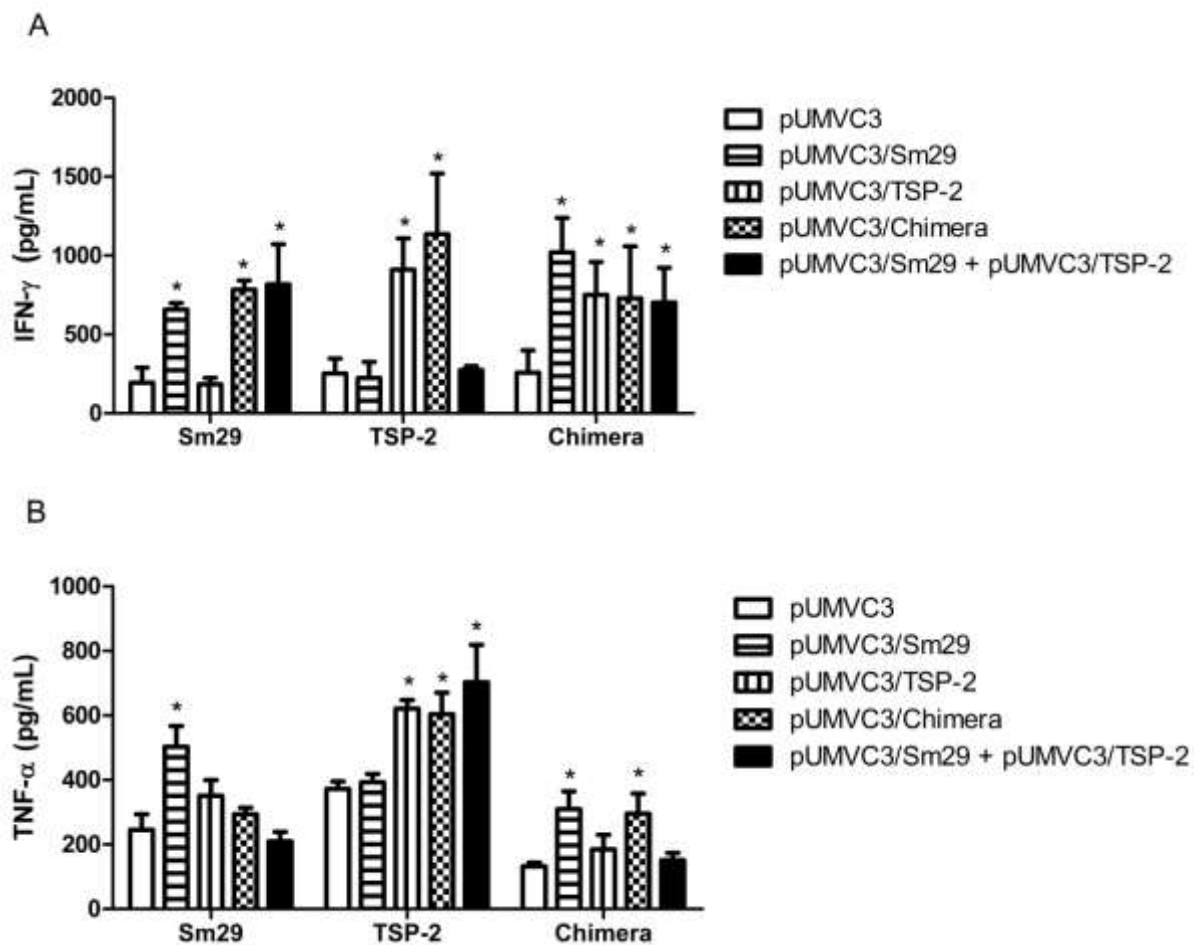


Figura 16 Produção de citocinas após imunização. Média \pm DP de citocinas produzidas por esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2. Os esplenócitos foram estimulados com Sm29 recombinante, ou TSP-2 recombinante ou Quimera recombinante. ConA ou LPS foram utilizados como controles positivos (Dados não mostrados). Diferenças estatísticas com $p < 0,001$ em relação ao grupo controle são representadas por (*).

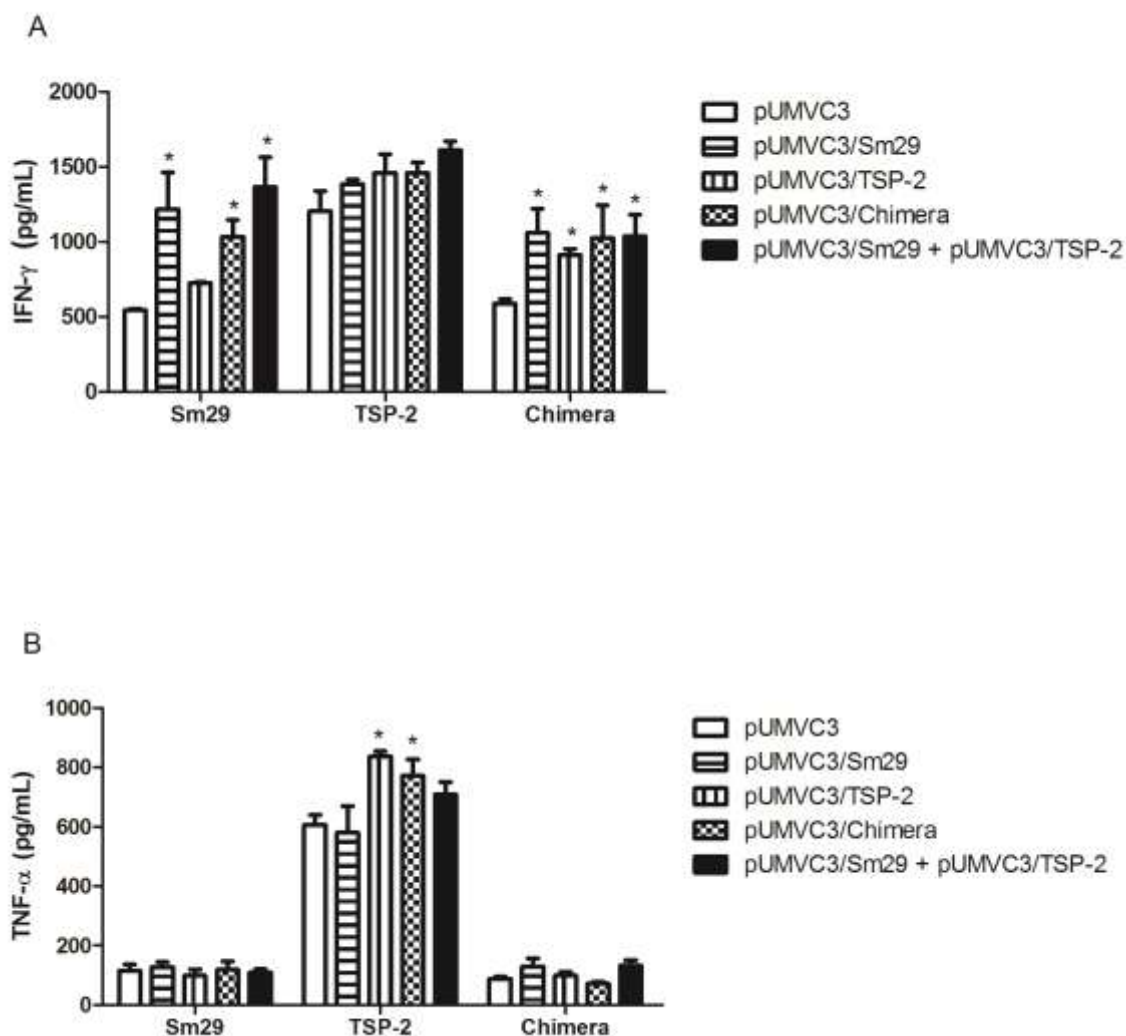


Figura 17 Produção de citocinas após imunização e infecção. Média \pm DP de citocinas produzidas por esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 e posteriormente desafiados com 100 cercárias durante 45 dias. Os esplenócitos foram estimulados com Sm29 recombinante, ou TSP-2 recombinante ou Quimera recombinante. ConA ou LPS foram utilizados como controles positivos (Dados não mostrados). Diferenças estatísticas com $p < 0,001$ em relação ao grupo controle são representadas por (*).

Após quatro imunizações, detectamos altos níveis de IFN- γ nos sobrenadantes das células dos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/Chimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2 quando reestimuladas com rSm29, nos sobrenadantes das células dos animais imunizados com os plasmídeos

pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera quando reestimulados com a TSP-2 recombinante, assim como, todos os sobrenadantes das células dos animais imunizados, quando reestimuladas com a quimera recombinante, quando comparados ao grupo controle pUMVC3 (Figura 16A). Quando avaliamos os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes das células dos animais imunizados com as vacinas de DNA e infectados com cercárias de *S. mansoni*, somente percebemos uma elevada produção de tal citocina nos sobrenadantes das células dos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/Chimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC/TSP-2 quando reestimulados com rSm29, assim como no sobrenadante de todos os animais imunizados quando reestimulados com a quimera recombinante, quando comparados ao grupo controle pUMVC3 (Figura 17A). Quando avaliamos os níveis de TNF- α nos animais que foram somente imunizados, observamos uma significativa produção de tal citocina no sobrenadante das células dos animais que foram imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Sm29 quando reestimuladas com rSm29, no sobrenadante das células dos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC/TSP-2 quando reestimuladas com a TSP-2 recombinante, e nos sobrenadantes das células dos animais imunizados com pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Chimera quando reestimulados com a quimera recombinante, quando comparados ao grupo controle pUMVC3 (Figura 16B). Quando os níveis de TNF- α foram avaliados nas culturas de células de animais que foram imunizadas e desafiadas com cercárias de *S. mansoni*, somente nos sobrenadantes de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera quando reestimulados com a TSP-2 recombinante apresentaram maiores níveis de tal citocina quando comparados ao grupo controle pUMVC3 (Figura 17B). Nenhuma produção significativa de IL-4 ou IL-5 foi percebida em

nenhum dos grupos e estímulos com proteínas recombinantes avaliados. A produção elevada das citocinas IFN- γ e TNF- α pode estar relacionada a uma resposta imune protetora contra *S. mansoni*, visto que, animais deficientes em tais citocinas apresentam menores índices de proteção quando imunizados com cercárias irradiadas (Jankovic et al., 1999; Street et al., 1999).

5.1.5 Carga parasitária recuperada

Para avaliar o potencial da vacinação de DNA com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera ou pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2 em induzir proteção em modelo murino, os camundongos foram desafiados com 100 cercárias de *S. mansoni* 15 dias após a última imunização, e 45 dias após a infecção, o número de vermes recuperados foi determinado e se encontra demonstrado na Figura 18.

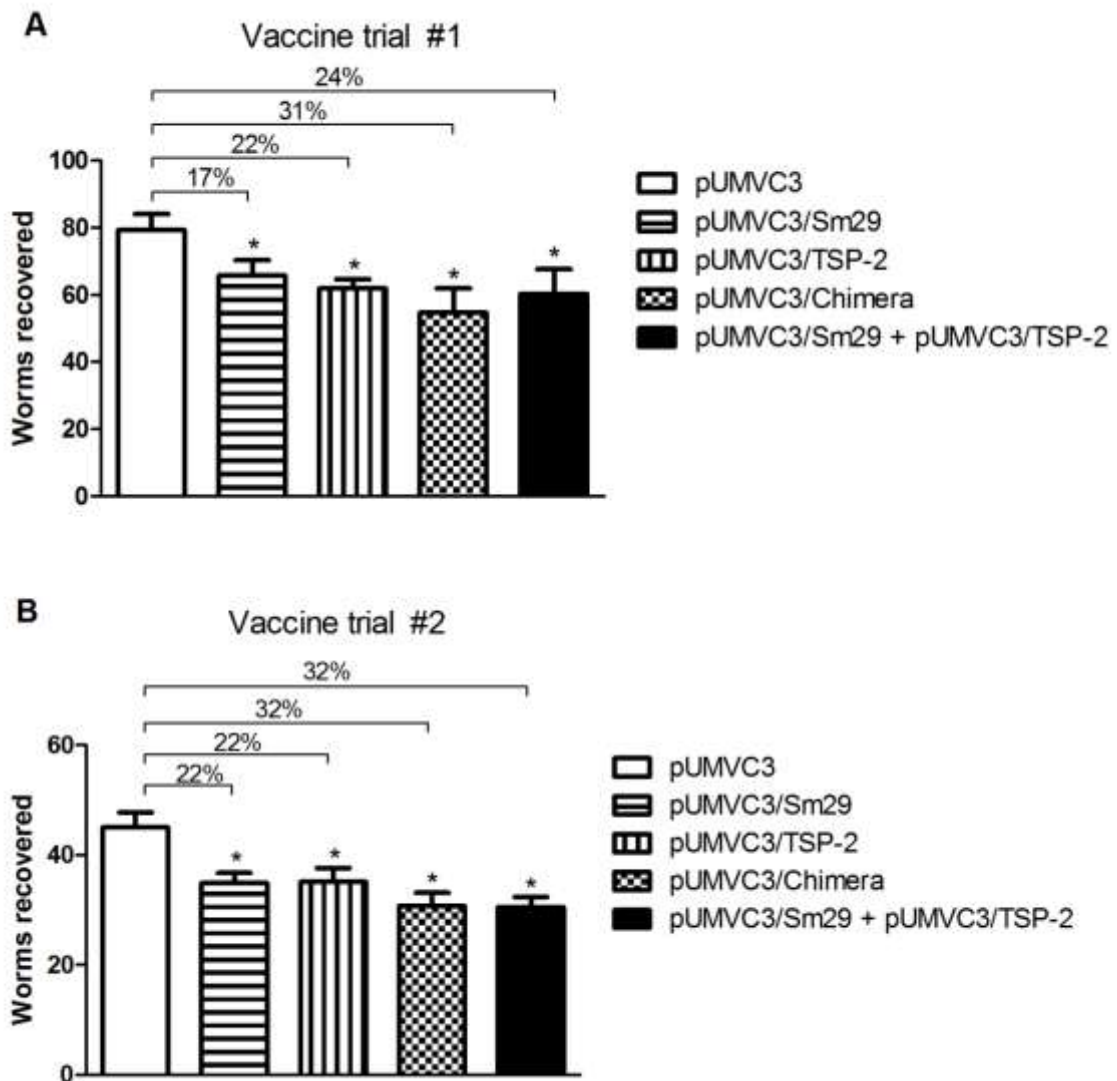


Figura 18 Níveis de proteção induzidos pela imunização com as vacinas de DNA. Média \pm DP de vermes recuperados das veias mesentéricas de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 em dois experimentos independentes (A e B). Os valores apresentados acima dos colchetes representam os percentuais de redução na contagem de vermes em relação ao grupo pUMVC3. Diferenças estatísticas com $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pUMVC3 são representados por (*).

Todos os grupos de animais imunizados apresentaram níveis de redução de vermes significantes quando comparados ao grupo controle, sendo que os níveis de proteção foram 17-22%, 22%, 31-32% e 24-32% para os animais imunizados com

pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2, respectivamente (Figura 18). Adicionalmente, no primeiro experimento, os animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Chimera apresentaram uma proteção superior quando comparados aos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Sm29 (Figura 18A); no segundo experimento, mesmo com os alto níveis de proteção induzidos pela imunização com o plasmídeo pUMVC3/Chimera, não houve nenhuma diferença significativa em relação aos animais sendo imunizados somente com os plasmídeos contendo a sequência da proteína Sm29 (Figura 18B). Mesmo os animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Chimera apresentando maiores valores de proteção, não houve nenhuma diferença significativa em relação ao número de vermes recuperados em relação aos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/TSP-2 ou a administração conjunta de pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2. Esse resultado valida o uso de quimeras como estratégias para a potencialização de uma vacina anti-esquistossomótica.

5.1.6 Área de granulomas

Quarenta e cinco dias após a quarta imunização todos os animais infectados foram sacrificados e coletaram-se os fígados para posterior avaliação da área de granulomas. Mediram-se 20 granulomas por fígado e os valores de área estão representados na Figura 19.

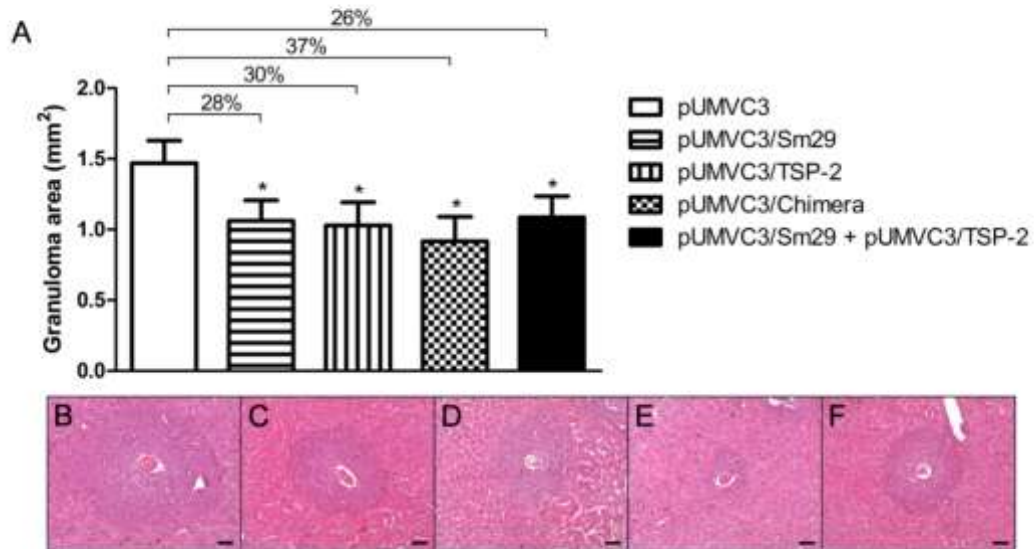


Figura 19 Redução de área de granuloma e granulomas representativos de camundongos imunizados com as vacinas de DNA e desafiados com cercárias de *S. mansoni*. Gráfico demonstrando a área de granulomas presentes nos fígados dos animais imunizados com as vacinas de DNA e desafiados com cercárias de *S. mansoni*. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo pUMVC3 são representadas por um (*) e o percentual de redução são apresentados acima dos colchetes. Imagens representativas de granulomas dos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3 (B) pUMVC3/Sm29 (C), pUMVC3/TSP-2 (D), pUMVC3/Chimera (E) e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 (F).

Todos os grupos de animais imunizados apresentaram redução estatisticamente significativa na área de granulomas quando comparados ao grupo controle, sendo que os níveis de redução foram 28%, 30%, 37% e 26% para os animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2, respectivamente. Isso demonstra o potencial das vacinas de DNA reduzirem a patologia hepática relacionada com a esquistossomose mansônica.

6 - DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 1

Uma resposta eficiente contra a esquistossomose mansônica parece envolver uma efetiva resposta imune humoral e celular (Jankovic et al., 1999; Oliveira et al., 2008). Vacinas de DNA apresentam a capacidade de ativar esses dois componentes da resposta imune do hospedeiro. Ademais, as vacinas de DNA têm a capacidade de produzir proteínas com conformações mais complexas, além do que, são de fácil produção, relativamente baratas e de fácil distribuição visto a alta estabilidade (Gurunathan et al., 2000; Liu, 2003, 2011). Tal afirmativa se reflete nos resultados promissores apresentados com várias proteínas do *S. mansoni* testadas como vacinas de DNA, como por exemplo, Sm-p80, Smfimbria em conjunto com Sm21.7, Cu/Zn superóxido dismutase e filamina, as quais apresentaram 59%, 56%, 44-60% e 44-57% na redução de contagem de vermes, respectivamente (Ahmad et al., 2009a; Cook et al., 2004; Pinheiro et al., 2011; Romeih et al., 2008; Shalaby et al., 2003). Portanto, a estratégia de vacinação com DNA se apresenta como metodologia promissora para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose mansônica.

Os maiores níveis de proteção alcançados contra a esquistossomose foram obtidos através da imunização com cercárias irradiadas, e o processo imunológico basicamente parece ocorrer na região pulmonar contra esquistossômulos migrantes (Jankovic et al., 1999; Wilson et al., 1996). Visto que as proteínas Sm29 e Tetraspanina-2 (TSP-2) se encontram preferencialmente no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos (Cardoso et al., 2008; Cardoso et al., 2006a; Cardoso et al., 2006b; Tran et al., 2006) e os resultados promissores apresentados por essas moléculas como vacinas recombinantes (Cardoso et al., 2008; Tran et al., 2006), tais

proteínas são consideradas como potentes candidatos vacinais. E neste trabalho, avaliamos o potencial protetor de vacinas de DNA contendo as sequências correspondentes as proteínas Sm29, TSP-2 e a quimera proveniente da fusão de ambas.

Visando avaliar a capacidade de nossas vacinas de DNA produzirem os antígenos de interesse, transfectamos células BHK-21 e avaliamos a capacidade transcricional e de expressão protéica de nossas construções. Para a avaliação transcricional, extraímos o RNA total das células transfectadas e sintetizamos o cDNA, o qual foi utilizado posteriormente para a avaliação de acúmulo de mRNA por RT-PCR, e o que observamos foi a expressão gênica de Sm29, TSP-2 e a quimera nas células transfectadas com pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Chimera quando utilizamos primers específicos para Sm29, TSP-2 e a região quimérica, respectivamente.

Para a avaliação da produção das proteínas, células BHK-21 foram transfectadas e o extrato protéico total foi coletado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida para posterior avaliação através do western blot. Os resultados demonstram que quando utilizamos soro anti-Sm29, detectamos uma banda com o mesmo tamanho característico da proteína recombinante de 18kDa somente nas células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/Sm29. Quando testamos o soro anti-TSP-2, detectamos uma banda característica com peso aproximado ao da proteína recombinante de 12kDa somente nas células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/TSP2. E quando avaliamos o extrato protéico das células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/Chimera, detectamos uma banda característica de aproximadamente 25KDa quando utilizamos tanto o soro anti-Sm29

quanto o soro anti-TSP-2, correspondente a quimera proveniente da fusão entre Sm29 e TSP-2. Tais resultados, conjuntamente aos resultados de transcrição gênica, demonstram que as vacinas de DNA testadas nesse estudo expressam o antígeno alvo.

Várias proteínas já foram avaliadas como candidatos vacinais e quando administradas como vacinas de DNA, algumas conseguem demonstrar níveis de redução de vermes acima de 50% em ensaios pré-clínicos, como por exemplo, Filamina, Cu/Zn superóxido dismutase e Sm-p80, sendo esta última, a indutora dos maiores índices de proteção (59% na redução de vermes e 84% de redução na contagem de ovos no fígado) (Ahmad et al., 2009a; Cook et al., 2004; Pinheiro et al., 2011; Shalaby et al., 2003). Porém, quando avaliada em primatas não humanos (*Papio anubis*), o potencial de tal candidato caiu para 38% de redução na contagem de vermes e 32% de redução na contagem de ovos presentes no fígado, o que torna necessário o desenvolvimento de novas estratégias vacinais que superem o baixo índice de proteção (Ahmad et al., 2009b). Nossos estudos demonstraram que as vacinas de DNA pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e a administração conjunta dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 foram capazes de alcançar 17%, 21,9%, 31% e 24% de redução na contagem de vermes, respectivamente. Quando avaliados os níveis de proteção entre os grupos imunizados, percebemos uma diferença estatisticamente significativa entre os animais que foram imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Chimera em relação aos que foram imunizados com pUMVC3/Sm29, o que demonstra que a utilização da proteína quimérica foi capaz de aumentar os níveis de proteção quando comparada a Sm29 sozinha. Em relação ao plasmídeo contendo a sequência da TSP-2, mesmo

com maiores valores de proteção, não houve nenhuma diferença significativa em relação aos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Chimera.

Quando avaliados os níveis de anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados, percebemos uma significativa produção de anticorpos anti-Sm29 e anti-rQuimera nos animais que foram imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Chimera, o que demonstra que o potencial de nossas vacinas induzirem uma resposta humoral. Em relação aos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/TSP-2, não percebemos nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle pUMVC3. Tal inabilidade de gerar uma resposta humoral elevada é diferente dos resultados obtidos por Tran e colaboradores em 2006, os quais demonstram a capacidade de tal proteína, quando administrada em sua forma recombinante, induzir um aumento significativo de anticorpos anti-rTSP-2 (Tran et al., 2006). Os trabalhos de Jia e colaboradores (2014), demonstraram que o loop extracelular 2 da proteína Sm-TSP-2 é estruturalmente muito coordenada, principalmente através da interação de cadeias laterais de aminoácidos presentes na estrutura da alça (Jia et al., 2014). Especulamos, que a proteína sintetizada *in vivo* pela utilização do plasmídeo pUMVC3/TSP-2, adquira tais modificações estruturais, as quais seriam muito mais semelhantes e complexas do que a estrutura primária adotada pela proteína recombinante produzida por bactérias, portanto, os anticorpos gerados contra a proteína produzida pela imunização com DNA, não seriam eficientes no reconhecimento da proteína utilizada no procedimento de ELISA. A utilização de uma proteína recombinante produzida por transgenes eucarióticos poderia converter tal situação e nos dar uma resposta mais eloquente em relação aos níveis de tais anticorpos anti-TSP-2.

As vacinas de DNA testadas neste estudo induziram uma resposta imunológica de perfil Th1, o que foi demonstrado pela elevada produção de IFN- γ e TNF- α e nenhuma produção significativa de IL-4 e/ou IL-5. Tais dados se encontram em concordância com os resultados obtidos por Cardoso e colaboradores, em 2008, e Pearson e colaboradores, em 2012, onde as proteínas Sm29 e TSP-2 recombinantes, foram avaliadas como candidatos vacinais e apresentaram basicamente as mesmas características da resposta imunológica de perfil Th1 (Cardoso et al., 2008; Pearson et al., 2012). Vários fatores podem estar relacionados a indução da resposta Th1 nas vacinas de DNA testadas nesse estudo. Acreditamos que a presença de motivos CpG não metilados em nossos plasmídeos podem ter contribuído com tal resposta, visto que essas sequências não metiladas tem a capacidade de induzirem a liberação de citocinas pró-inflamatórias Th1, interferons e quimiocinas através de mecanismos mediados pela ativação de receptores *TLR-9* (Hemmi et al., 2000; Krieg, 2002). Outro fator importante que pode ter contribuído com a capacidade de gerar tal perfil de resposta imunológica é a escolha da rota de administração via intramuscular, a qual vem sendo demonstrada como indutora de respostas de perfil Th1 (Faurez et al., 2010).

Vários estudos utilizando proteínas recombinantes ou a metodologia por vacinação de DNA vêm apresentando resultados relacionando o perfil Th1 com uma imunidade protetora contra esquistossomose mansônica, como exemplo, podemos citar os trabalhos envolvendo as proteínas Sm-p80, Sm29, *Stomatin like protein-2* e rP22, as quais apresentaram níveis elevados de proteção e esses resultados foram associados ao aumento na produção do IFN- γ e do TNF- α (Ahmad et al., 2009a; Cardoso et al., 2008; Farias et al., 2010; Rezende et al., 2011; Zhang et al., 2010a). Trabalhos realizados com a proteína Sm23 demonstram uma possível relação entre

imunidade protetora e o perfil Th1, pois quando administrada como vacina de DNA, apresenta um perfil Th1 e consegue níveis de proteção de 21-44%, porém, quando administrada em estratégia de *Prime-boost* (DNA-proteína) observa-se uma polarização para uma resposta Th2 e nenhum nível de proteção foi obtido (Da'Dara et al., 2003; Da'dara et al., 2001). Estudos imunizando camundongos deficientes para IFN- γ e TNF- α com cercárias irradiadas também correlacionam uma resposta imune protetora com o perfil Th1 de produção de citocinas (Jankovic et al., 1999; Smythies et al., 1992; Street et al., 1999; Wilson et al., 1996).

O envolvimento do IFN- γ na imunidade protetora contra o *S. mansoni* é bem descrito. Em 1992, Smythies e colaboradores, demonstraram que anticorpos anti-IFN- γ eram capazes de reduzir a resposta imune em camundongos imunizados com cercárias irradiadas (Smythies et al., 1992). Wilson e colaboradores em 1996 e Jankovick e colaboradores em 1999, demonstraram que animais deficientes para o gene que codifica o IFN- γ ficavam menos protegidos quando imunizados com cercárias irradiadas. Acredita-se também que o IFN- γ desempenhe importante função no desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva contra esquistossômulos na região pulmonar. Esta afirmativa se baseia no fato de animais selvagens imunizados com cercárias irradiadas apresentarem um processo imunológico, envolvendo principalmente a formação de focos de linfócitos e macrófagos ao redor do parasita, capaz de impedir a movimentação dos esquistossômulos na região pulmonar, deslocando-os para as vias respiratórias com conseqüente eliminação dos vermes, enquanto que, animais deficientes para o IFN- γ se demonstram incapazes de direcionar a formação de tal processo imunológico de maneira eficiente (Jankovic et al., 1999; Wilson et al., 1996). Outro possível mecanismo de atuação do IFN- γ na resposta imunoprotetora é a ativação de

macrófagos para eliminarem os vermes de uma maneira dependente de óxido nítrico (Jankovic et al., 1999). Nós também conseguimos demonstrar elevada produção de IFN- γ nos animais imunizados com pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Chimera e com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2, e acreditamos que esse aumento de IFN- γ pode estar diretamente relacionada aos níveis de proteção alcançados.

Os animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Chimera apresentaram elevada produção de TNF- α . A produção do TNF- α se encontra relacionada a resposta imune protetora contra o *S. mansoni*, visto que animais deficientes para o receptor TNFR1 (Receptor de fator de necrose tumoral I) não exibem níveis significativos de proteção quando imunizados com cercárias irradiadas (Street et al., 1999). Existe também um grande debate em relação a capacidade de tal citocina estar diretamente relacionada a formação de granulomas e também de sua atuação em conjunto a IFN- γ no aumento da produção de NO na resposta protetora a *S. mansoni*. (Amiri et al., 1992; Cheever et al., 1999; Pearce and MacDonald, 2002). Portanto, a produção de TNF- α nos animais imunizados com a vacina de DNA pUMVC3/Sm29 pode estar relacionada ao nível de proteção alcançado.

A elevada produção das citocinas IFN- γ e TNF- α pelos animais imunizados com as vacinas de DNA, também podem explicar a redução da área dos granulomas presente nos fígados dos animais imunizados, visto o mecanismo bem descrito onde tais citocinas, aparentemente, exercem um efeito inibitório na conversão de L-arginina em L-ornitina pela enzima arginase, e posteriormente evitando a conversão de L-ornitina em prolina pela enzima ornitina-aminotransferase, diminuindo a

disponibilidade de tal molécula, seja utilizada para síntese de colágeno e formação de tecido fibrótico ao redor dos ovos. O mecanismo de atuação do IFN- γ e TNF- α parece estar relacionado com a indução da enzima óxido nítrico sintase, a qual é responsável pela conversão da L-arginina em L-hidroxiarginina, a qual será utilizada na síntese de citrulina e óxido nítrico, evitando desta maneira a síntese de prolina pela competição pelo substrato L-arginina (Hesse et al., 2000; Modolell et al., 1995). A utilização de uma coloração específica para tecido fibrótico nas lâminas histopatológicas avaliadas, poderia ajudar na elucidação de tal teoria.

Com base em todas estas informações, concluímos que a utilização de formas quiméricas em conjunto com a metodologia de imunização por DNA pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra esquistossomose mansônica.

7 – RESULTADOS CAPÍTULO 2

7.1 Nanobastões de ouro

7.1.1 Caracterização dos nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método mediado por semente. Após a síntese, as nanopartículas foram caracterizadas pelo espectro de absorção UV-VIS (Figura 20) e microscopia eletrônica de transmissão (Figura 21).

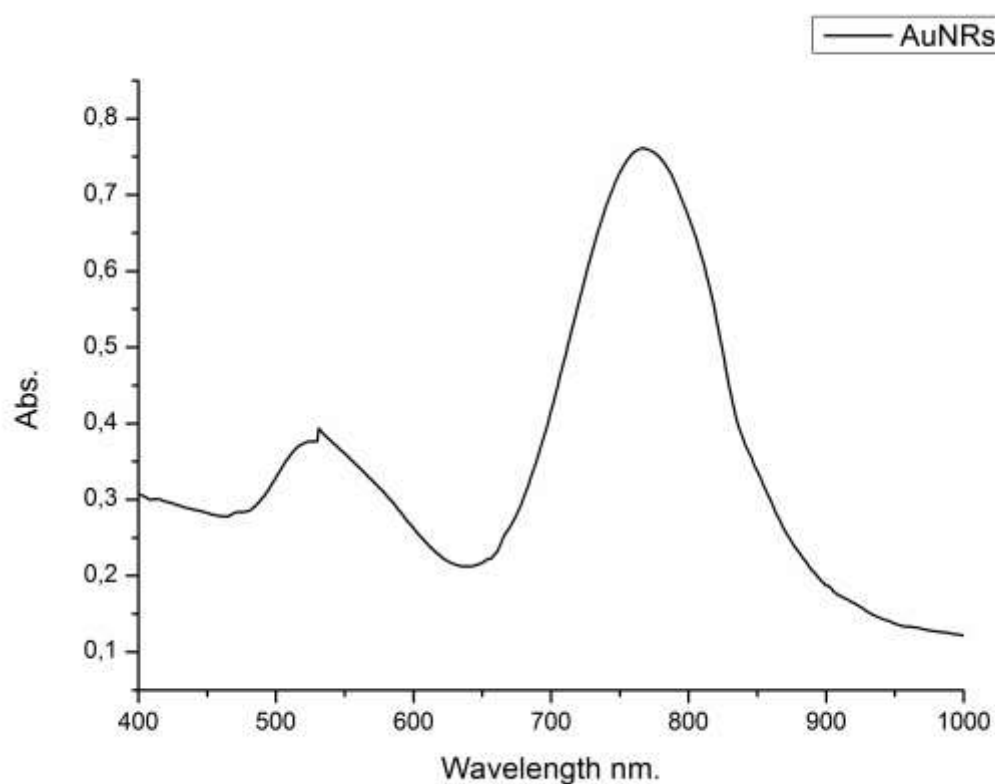


Figura 20 Espectro de absorção UV-VIS das nanopartículas de ouro.

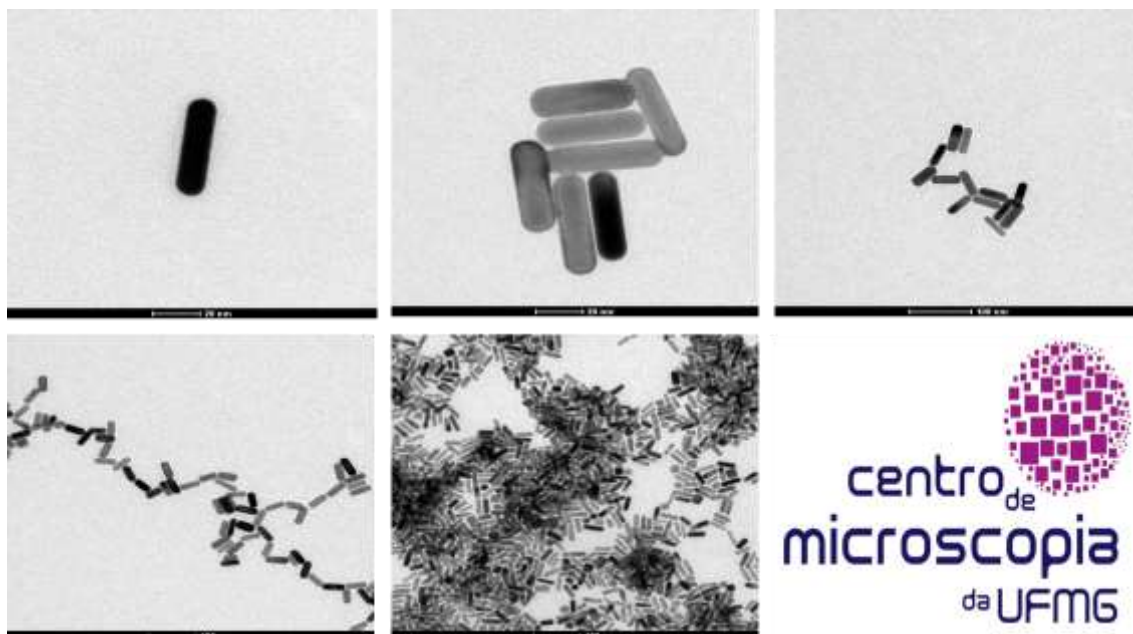


Figura 21 Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro. As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de semente e posteriormente immobilizadas em grades para microscopia eletrônica de transmissão.

Devido a presença dos dois picos característicos de absorção no espectro de UV-VIS e as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, podemos confirmar o formato de bastão de nossas nanopartículas de ouro.

7.1.2 Purificação dos nanobastões de ouro

O procedimento de síntese dos nanobastões de ouro envolve a utilização de quantidades significativas de CTAB, portanto, técnicas para a remoção do excesso de tal reagente são requeridas para a posterior utilização em animais.

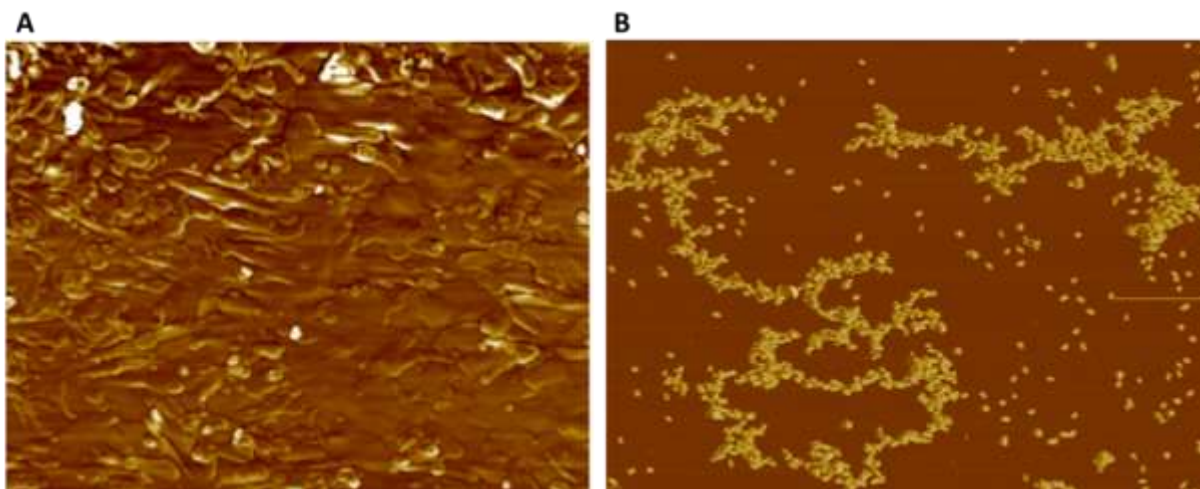


Figura 22 Microscopia de força atômica. Após síntese, os nanobastões de ouro são submetidos a centrifugação para a limpeza do excesso de CTAB. Nanobastões de ouro logo após a síntese (A) e após o procedimento de limpeza (B).

Após o procedimento de síntese dos nanobastões de ouro, quando avaliadas por microscopia de força atômica (AFM), as nanopartículas aparecem recobertas por um material de aparência viscosa, o qual acreditamos ser o surfactante utilizado na síntese (CTAB). Após o procedimento de limpeza, as nanopartículas aparecem com o formato característico de bastões, e sem nenhuma quantidade significativa de material viscoso ao redor dos bastões (Figura 22).

7.1.3- Ligação da proteína rSm29 aos nanobastões de ouro

Tentou-se ligar a proteína rSm29 aos nanobastões de ouro diretamente ou através da funcionalização com cisteamina ou ácido lipóico. Quando a proteína foi ligada diretamente aos nanobastões de ouro, através da funcionalização com ácido lipóico ou cisteamina, as amostras foram nomeadas como AuNRs-rSm29, AuNRs-COOH + rSm29, AuNRs-NH₂ + rSm29, respectivamente. Após o procedimento de ligação as amostras foram caracterizadas pelo espectro de absorção na região do UV-VIS (Figura 20) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Figura 24).

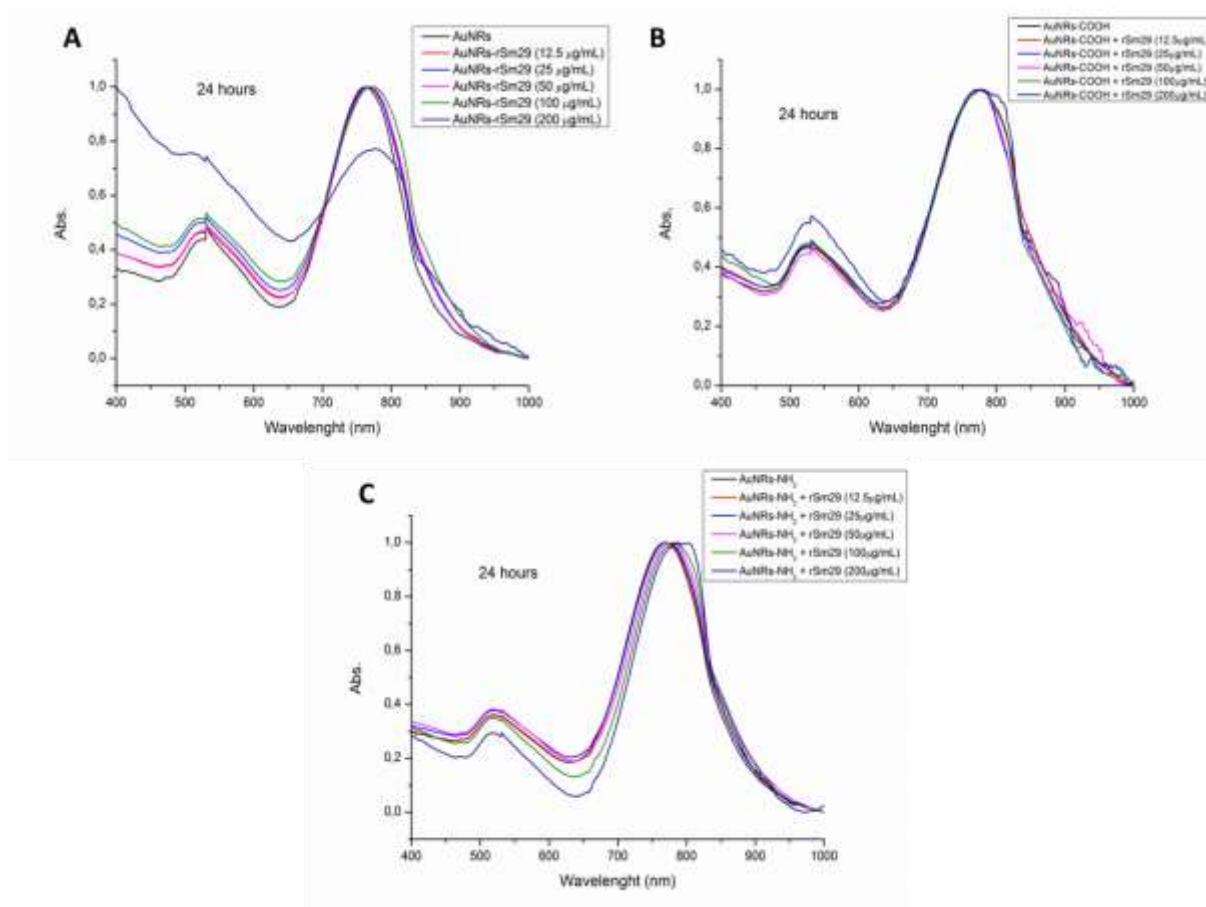
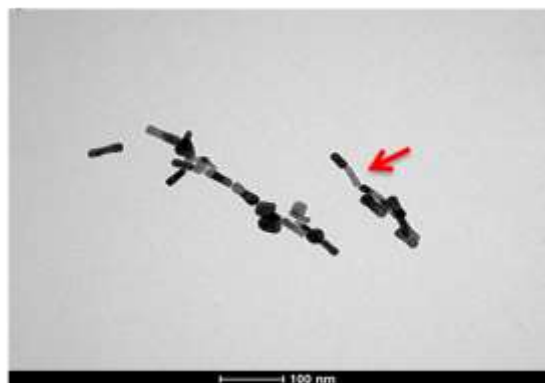
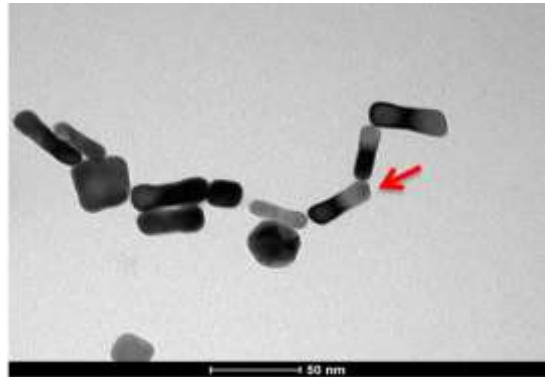
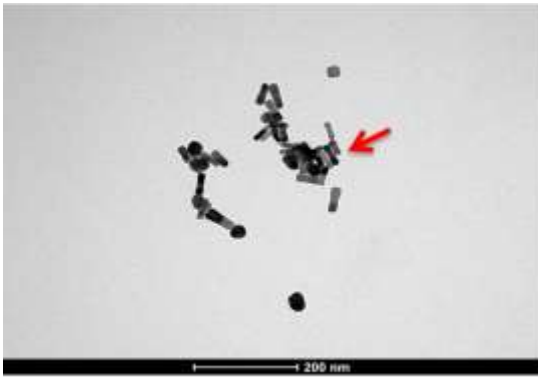


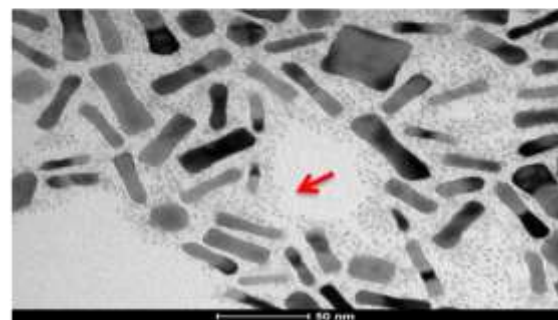
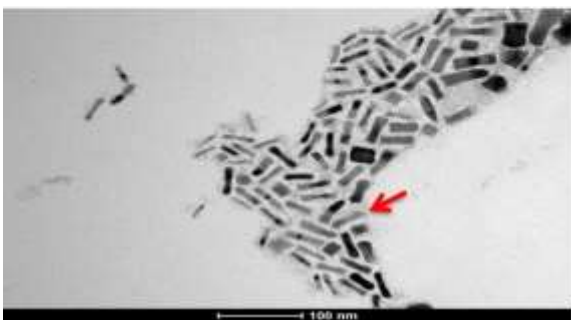
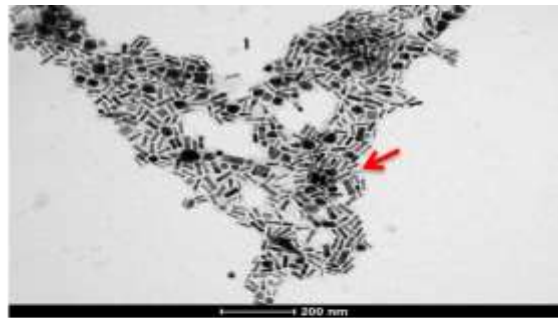
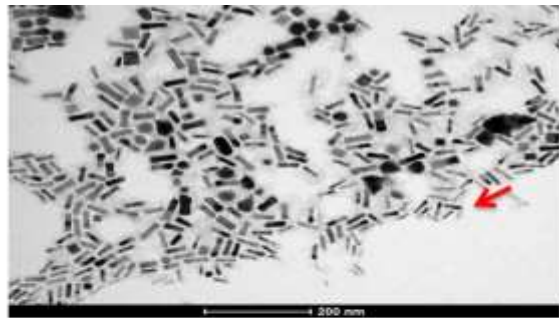
Figura 23 Espectro de UV-VIS. Espectro de absorção UV-VIS dos nanobastões de ouro conjugados a proteína rSm29 diretamente (A), através da funcionalização com ácido lipóico (B) ou cisteamina (C).

Como podemos ver na Figura 23, percebemos deslocamento significativo dos picos de plasmon de superfície somente nas amostras em que a proteína foi ligada diretamente ou através da cisteamina aos nanobastões de ouro. Não percebemos nenhum deslocamento significativo quando as nanopartículas foram funcionalizadas com ácido lipóico, portanto, excluimos tal tipo de funcionalização para os próximos experimentos.

A



B



C

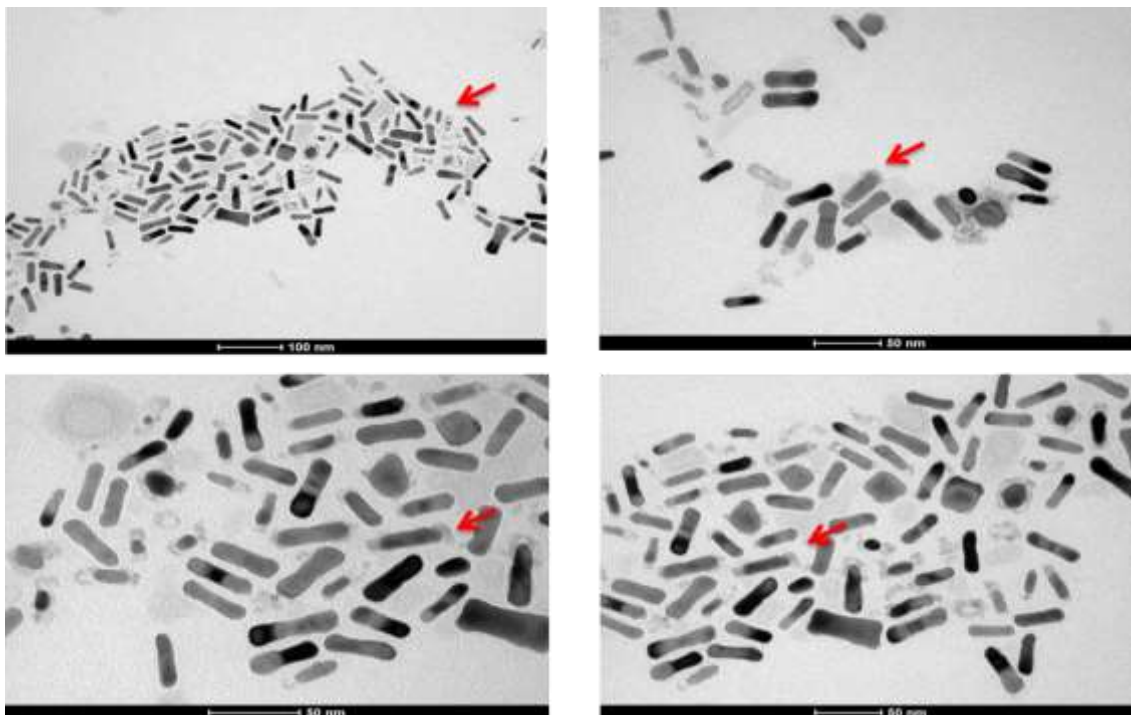


Figura 24 Microscopia eletrônica de transmissão. Os nanobastões de ouro (A) foram ligados a proteína rSm29 diretamente (B) ou através da funcionalização com cisteamina (C) e posteriormente caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão. As setas em vermelho indicam os possíveis locais de funcionalização e ligação com a proteína. As Figuras são apresentadas como imagens representativas.

A avaliação realizada por microscopia eletrônica de transmissão indica nas imagens a ligação da proteína rSm29 aos nanobastões de ouro. Aparentemente, a ligação direta da proteína ocorre por toda extensão dos nanobastões (setas vermelhas na Figura 24B), enquanto que, a ligação através da cisteamina ocorre preferencialmente nas extremidades das nanopartículas (setas vermelhas na Figura 24C).

7.1.4 Identificação da proteína ligada aos nanobastões de ouro

Para a identificação da proteína ligada aos nanobastões de ouro, após o procedimento de ligação, realizamos o ELISA com anticorpos anti-rSm29. Além da identificação da proteína, realizamos o procedimento de retirada de proteínas não ligadas as nanopartículas por centrifugações em diferentes velocidades.

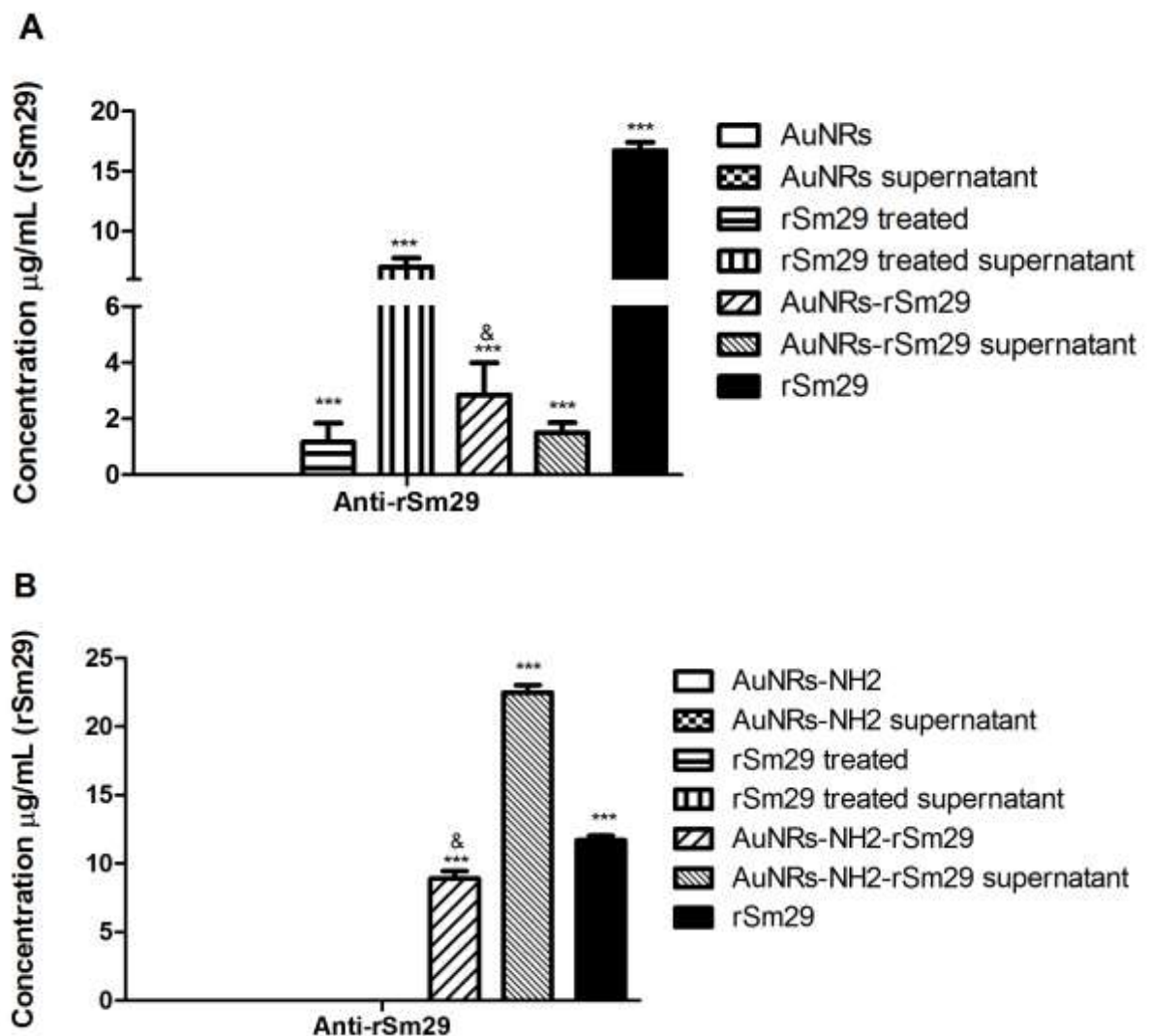


Figura 25 ELISA dos nanobastões de ouro. Os nanobastões de ouro foram ligados diretamente a proteína rSm29 (A) ou através da funcionalização com a cisteamina (B) e caracterizados por ELISA com anticorpos anti-rSm29. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle AuNRs; & $p < 0,001$ em relação ao grupo rSm29 treated. O grupo rSm29 é utilizado para validação da curva de concentração e os grupos AuNRs supernatant, rSm29 treated supernatant, AuNRs-rSm29 supernatant,

AuNRs-NH₂ supernatant , AuNRs-NH₂-rSm29 supernatant são controles experimentais.

Após o procedimento de separação das proteínas não ligadas aos nanobastões de ouro, podemos perceber um aumento significativo na concentração da proteína rSm29 nos grupos AuNRs-rSm29 e AuNRs-NH₂-rSm29 quando comparados ao grupo rSm29 treated ou aos grupos AuNRs e AuNRs-NH₂, respectivamente, em todas as condições avaliadas. Quando avaliamos os grupos rSm29 treated supernatant, AuNRs-rSm29 supernatant, AuNRs-NH₂-rSm29 supernatant, percebemos uma maior concentração de rSm29 em relação aos grupos AuNRs supernatant e AuNRs-NH₂ supernatant, os quais são controles experimentais (Figura 25).

Devido a diferença significativa entre os grupos AuNRs-rSm29 e AuNRs-NH₂-rSm29 e rSm29 treated (proteína recombinante que passou pelos mesmos procedimentos de separação de proteínas não ligadas), podemos supor que existem proteínas realmente ligadas aos nanobastões de ouro nas condições testadas, e devido ao reconhecimento pelos anticorpos anti-rSm29, acreditamos que tal proteína ligada seja a Sm29 recombinante.

7.1.5 Teste de citotoxicidade dos nanobastões de ouro

Para a avaliação da citotoxicidade celular dos nanobastões de ouro, incubamos células BHK-21 com rSm29, ou solução aquosa de CTAB, ou AuNRs sem ou após o processo de limpeza, ou AuNRs-rSm29 sem ou após o processo de limpeza, ou AuNRs-NH₂ sem ou após o processo de limpeza, ou AuNRs-NH₂-rSm29 sem ou

após o processo de limpeza, ou somente o meio de cultivo celular como controle e avaliamos o percentual de células viáveis, como demonstrado na Figura 26.

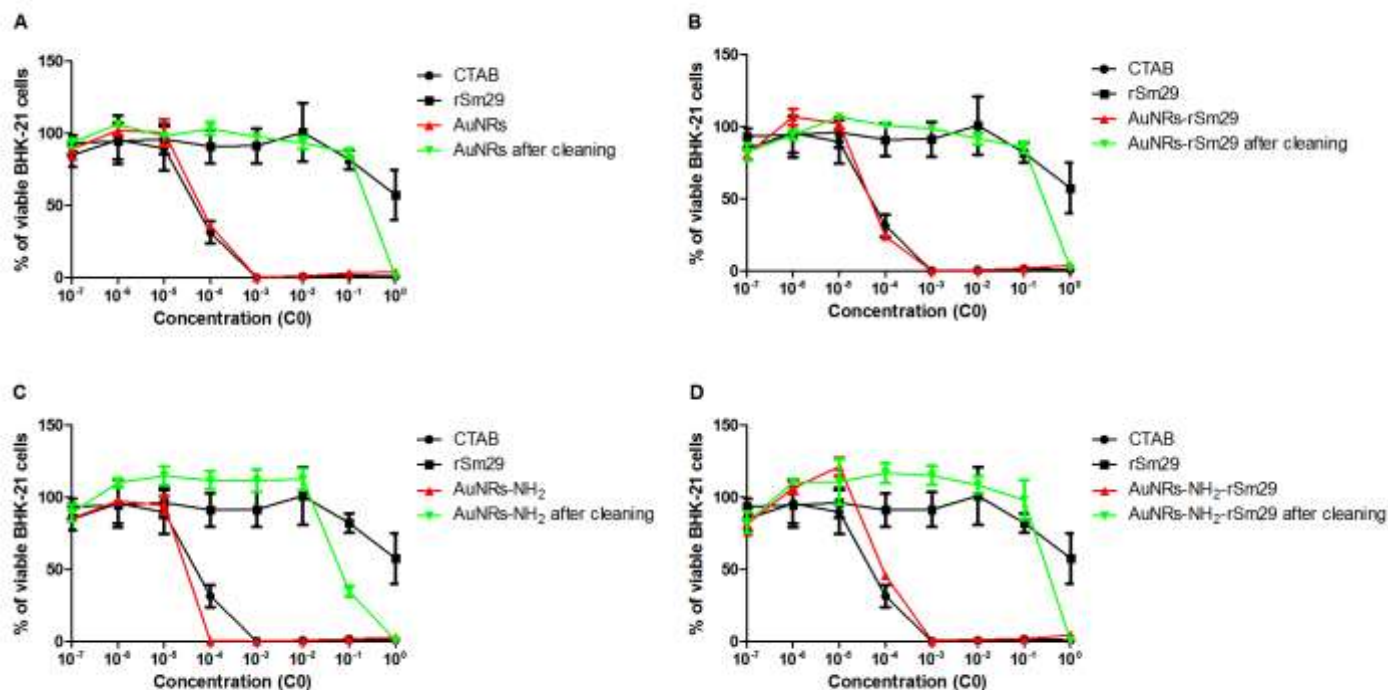


Figura 26 Teste de citotoxicidade celular dos nanobastões de ouro em células BHK-21. Células BHK-21 foram incubadas AuNRs sem ou após o processo de limpeza (A), ou AuNRs-rSm29 sem ou após o processo de limpeza (B), ou AuNRs-NH₂ sem ou após o processo de limpeza (C), ou AuNRs-NH₂-rSm29 sem ou após o processo de limpeza (D), ou somente o meio de cultivo celular como controle para avaliação do percentual de células viáveis. As células também foram incubadas com rSm29 ou solução aquosa de CTAB, como controles experimentais.

Como demonstrado na Figura 26, todos os grupos contendo nanobastões de ouro após o procedimento de limpeza são bem menos citotóxicos do que os nanobastões de ouro sem o procedimento de limpeza, apresentando apenas baixa ou toxicidade nula nas concentrações utilizadas.

7.1.6 Níveis de proteção alcançados com a imunização com os nanobastões de ouro

Todos os animais foram imunizados com os grupos contendo nanobastões de ouro, desafiados com 100 cercárias de *S. mansoni* e quarenta e cinco dias após a infecção, todos os animais foram sacrificados e os vermes presentes nas veias mesentéricas intestinais foram recuperados pelo método de perfusão da veia porta hepática. Os resultados dos vermes recuperados encontram-se na Figura 27.

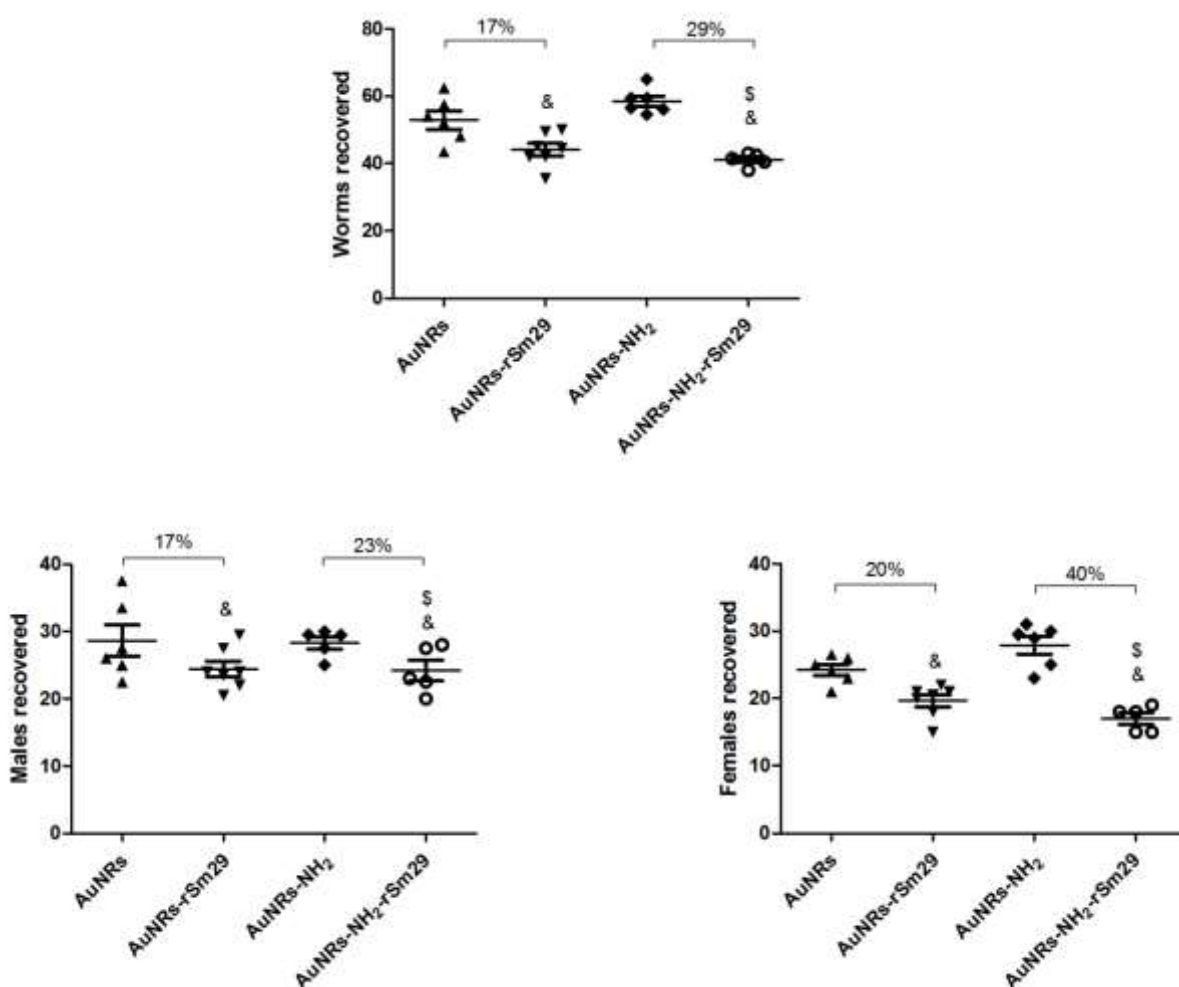


Figura 27 Total de vermes recuperados dos animais imunizados com nanobastões de ouro e níveis de proteção. Quantidade de vermes recuperados através da perfusão da veia porta dos animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro e desafiados com cercárias de *S. mansoni*. Os gráficos

representam as dispersões dos vermes contados \pm SEM. Os números acima dos colchetes representam os percentuais de proteção comparados com os seus respectivos grupos controles. Diferenças com $p < 0,001$ quando comparados com os grupos controles AuNRs e AuNRs-NH₂ são representadas por (&) e (\$), respectivamente.

Os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados diretamente a proteína rSm29 ou através da ligação com a cisteamina, apresentaram 17% e 29% de redução na contagem total de vermes quando comparados aos respectivos grupos controle AuNRs e AuNRs-NH₂, respectivamente. Quando avaliados separadamente os níveis de redução na contagem de vermes machos, os níveis de redução dos animais dos grupos AuNRs-Sm29 e AuNRs-NH₂-rSm29 apresentaram níveis semelhantes de proteção (17% e 23%, quando comparados aos grupos controles AuNRs e AuNRs-NH₂, respectivamente), porém, quando comparados os níveis de redução de vermes fêmeas, os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro, funcionalizados com a cisteamina, e posteriormente ligados a proteína Sm29, apresentaram uma maior redução no número de fêmeas (40% quando comparado ao grupo AuNRs-NH₂), enquanto que os animais do grupo AuNRs-Sm29, apresentaram somente 20% quando comparado ao grupo AuNRs.

7.1.7 Níveis de anticorpos dos animais imunizados com os nanobastões de ouro

Os animais foram imunizados 3 vezes com os nanobastões de ouro, com intervalos de 15 dias entre cada imunização, e nos intervalos entre as imunizações se coletou o soro para a avaliação dos níveis de anticorpos IgG total anti-Sm29 desses animais, como demonstrado na Figura 28.

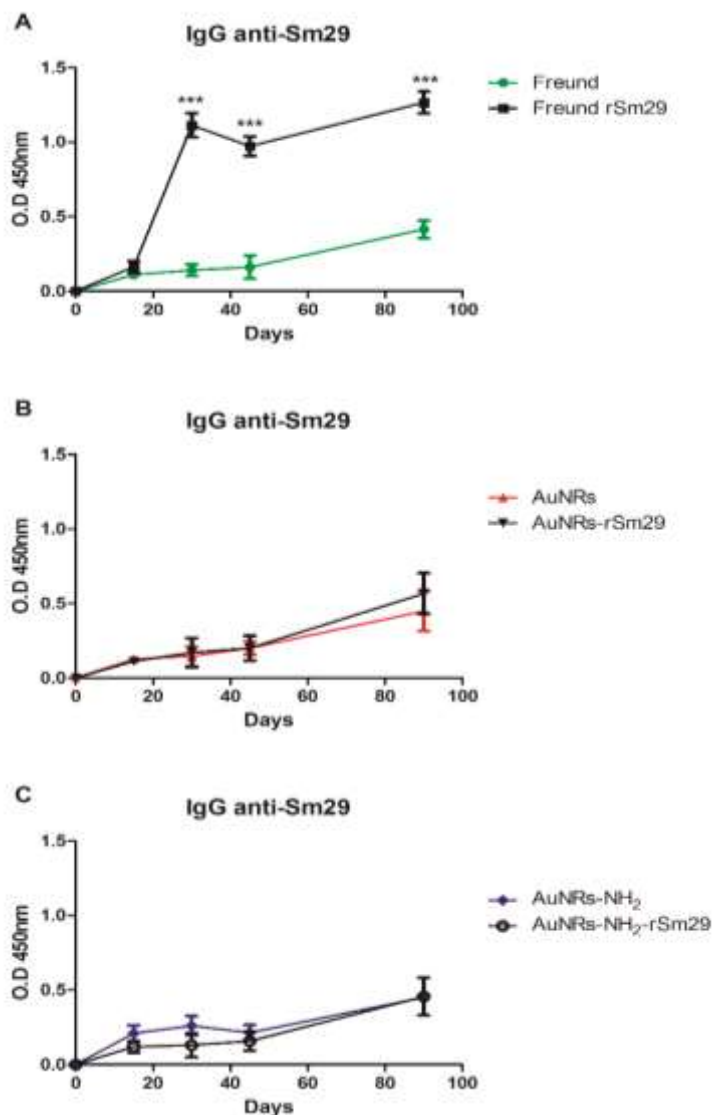


Figura 28 Níveis de IgG total anti-rSm29 dos animais imunizados com os nanobastões de ouro. Níveis de anticorpos anti-rSm29 nos soros dos camundongos imunizados com os nanobastões de ouro e desafiados com cercarias de *S. mansoni*. Diferenças significativas dos respectivos grupos controles são demonstradas por: (*) para $p < 0,05$, (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$.

Quando avaliados os níveis de anticorpos IgG total anti-rSm29 nos animais imunizados, percebemos que os animais que foram imunizados com o adjuvante de Freund juntamente com a proteína rSm29 começam a apresentar níveis significativos de tais anticorpos após a segunda imunização, níveis estes que tendem a se manter altos durante o período avaliado. Quando avaliamos os níveis

de anticorpos anti-rSm29 produzidos pelos animais imunizados com os nanobastões de ouro ligados diretamente ou através da funcionalização com cisteamina com a proteína rSm29, não apresentam nenhum aumento significativo na produção de tais anticorpos.

7.1.8 Perfil de citocinas dos animais imunizados com os nanobastões de ouro

Os animais foram imunizados com os nanobastões de ouro conjugados diretamente a proteína rSm29 (AuNR-rSm29) ou através da funcionalização com a cisteamina (AuNR-NH₂-rSm29), e como controles, temos os nanobastões de ouro sem nenhum tipo de funcionalização (AuNR), funcionalizados somente com a cisteamina (AuNR-NH₂) e a proteína rSm29 juntamente com Freund (rSm29 Freund). Após 10 dias da última imunização ou 45 dias após a infecção com cercarias de *S. mansoni*, coletaram-se os baços dos animais para a avaliação das citocinas IL-4, IL-5, TNF- α e IFN- γ (Figura 29 e Figura 30).

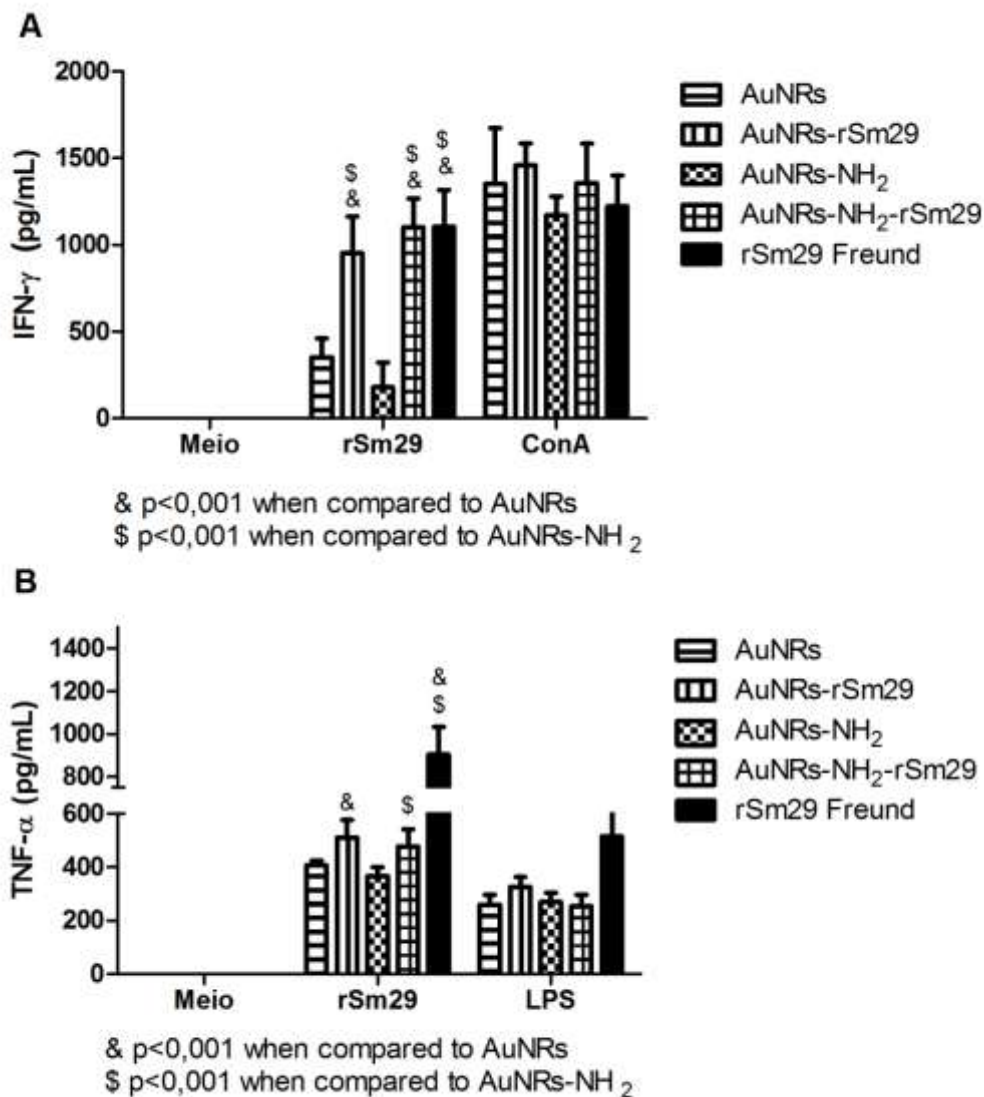


Figura 29 Produção de citocinas após imunização com nanobastões de ouro. Média \pm DP de citocinas produzidas por esplenócitos de animais imunizados com nanobastões de ouro sem funcionalização (AuNR), conjugados diretamente com a proteína rSm29 (AuNR-rSm29), funcionalizados com cisteamina (AuNR-NH₂) e posteriormente com a proteína recombinante (AuNR-NH₂-rSm29). Os esplenócitos foram estimulados com meio (controle), ou rSm29, ou ConA (controle), ou LPS (controle). Diferenças com $p < 0,001$ quando comparados com os grupos controles AuNRs e AuNRs-NH₂ são representadas por (&) e (\$), respectivamente.

Nos esplenócitos dos animais que foram somente imunizados, os que foram imunizados com os nanobastões de ouro conjugados diretamente ou funcionalizados

com cisteamina e posteriormente ligados a proteína rSm29, apresentaram produção significativa das citocinas TNF- α e IFN- γ , em relação aos grupos controles AuNR e AuNR-NH₂ quando estimulados com a proteína Sm29 recombinante. Não observou-se nenhuma produção significativa das citocinas IL-4 e IL-5 em nenhum dos grupos de animais somente imunizados que foram avaliados. A proteína recombinante Sm29 juntamente com adjuvante de Freund foi utilizada como controle experimental e apresentou perfis semelhantes de produção de citocinas ao publicado por Cardoso e colaboradores (Cardoso et al., 2008).

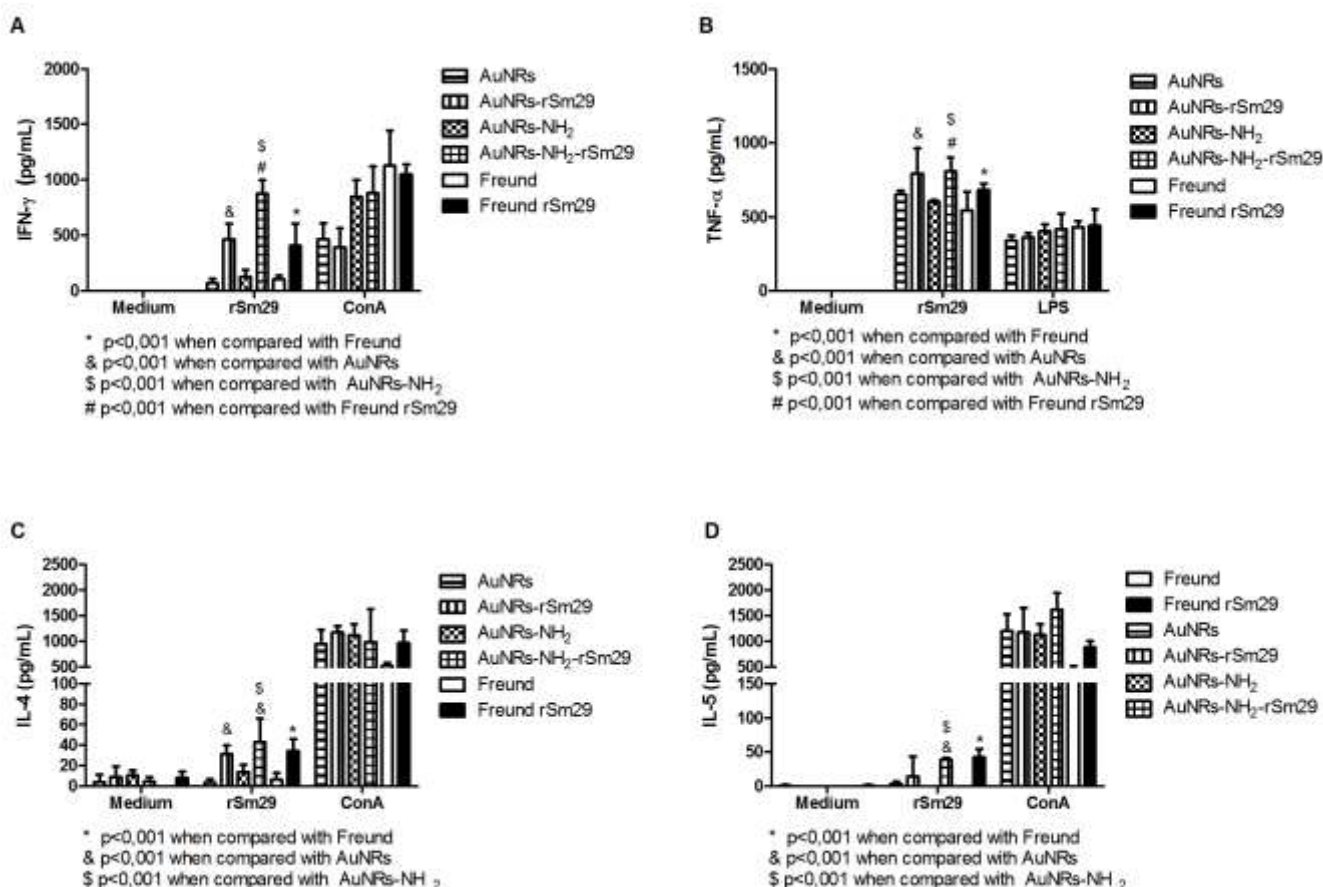


Figura 30 Produção de citocinas após imunização com nanobastões de ouro e infecção com cercaria de *S. mansoni*. Média \pm DP de citotocinas produzidas por esplenócitos de animais imunizados com adjuvante de Freund, adjuvante de Freund e a proteína rSm29, nanobastões de ouro sem funcionalização (AuNR), conjugados diretamente com a proteína rSm29 (AuNR-rSm29), funcionalizados com cisteamina

(AuNR-NH₂) e posteriormente com a proteína recombinante (AuNR-NH₂-rSm29), e posteriormente desafiados com 100 cercárias de *S. mansoni* por 45 dias. Os esplenócitos foram estimulados com meio (controle), ou rSm29, ou ConA (controle), ou LPS (controle). Diferenças significativas com p<0,001 quando comparados com os grupos Freund, AuNRs, AuNRs-NH₂ e Freund rSm29 são representadas por (*),(&),(\$ e (#), respectivamente.

Quando avaliada a produção das citocinas TNF- α e IFN- γ nos esplenócitos dos animais que foram imunizados e desafiados com cercarias de *S. mansoni*, percebe-se que os animais que foram imunizados com nanobastões de ouro conjugados diretamente a proteína recombinante Sm29 ou através da cisteamina apresentaram maiores níveis de tais citocinas quando comparados com os grupos controles AuNR e AuNR-NH₂, quando estimulados com a proteína Sm29 recombinante. Quando avaliada a produção das citocinas IL-4 e IL-5, os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados diretamente a proteína Sm29 apresentaram um aumento significativo de IL-4 quando comparados ao grupo de animais imunizados somente com os nanobastões de ouro, e os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína recombinante Sm29 através da funcionalização com a cisteamina, apresentaram maiores níveis de IL-4 e IL-5 quando comparados aos grupos controles AuNR e AuNR-NH₂. A proteína recombinante Sm29 juntamente com adjuvante de Freund foi utilizada como controle experimental e apresentou perfis semelhantes de produção de citocinas em animais que foram imunizados e desafiados com cercarias de *S. mansoni* como publicado por (Cardoso et al., 2008).

Mesmo o utilizando uma quantidade 10 vezes menor de proteína para a imunização com os nanobastões de ouro funcionalizados com a cisteamina, e posteriormente ligados a proteína recombinante Sm29, conseguimos uma maior produção, em

níveis significativos, de TNF- α e IFN- γ quando comparamos aos animais imunizados com a proteína recombinante em combinação com o adjuvante de Freund e após o desafio com cercárias.

7.1.9 Avaliação das células produtoras de IFN- γ pelos animais imunizados com os nanobastões de ouro

Como visto nas Figuras 29 e 30, os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína Sm29, diretamente ou através da funcionalização com a cisteamina, apresentaram uma produção equivalente da citocina IFN- γ quando comparados aos animais imunizados com adjuvante de Freund juntamente com uma quantidade de proteína 10 vezes maior, e no caso dos animais imunizados e infectados, o grupo AuNRs-NH₂-rSm29 apresentou maiores níveis de tal citocina até mesmo quando comparado com os animais do grupo Freund + rSm29. Portanto, com o objetivo de identificar a fonte desse aumento na produção de tal citocina chave em uma resposta imune contra esquistossomose mansônica, imunizamos animais com nanobastões de ouro e os desafiamos com cercárias de *S. mansoni*, e 10 dias após a última imunização e 10 dias após a infecção, coletamos as células dos baços dos animais e as incubamos com ConA, por 48 horas. Após tais incubações, marcamos as células e através da citometria de fluxo, analisamos os perfis das células produtoras de IFN- γ , como demonstrado nas Figuras 31 e 32.

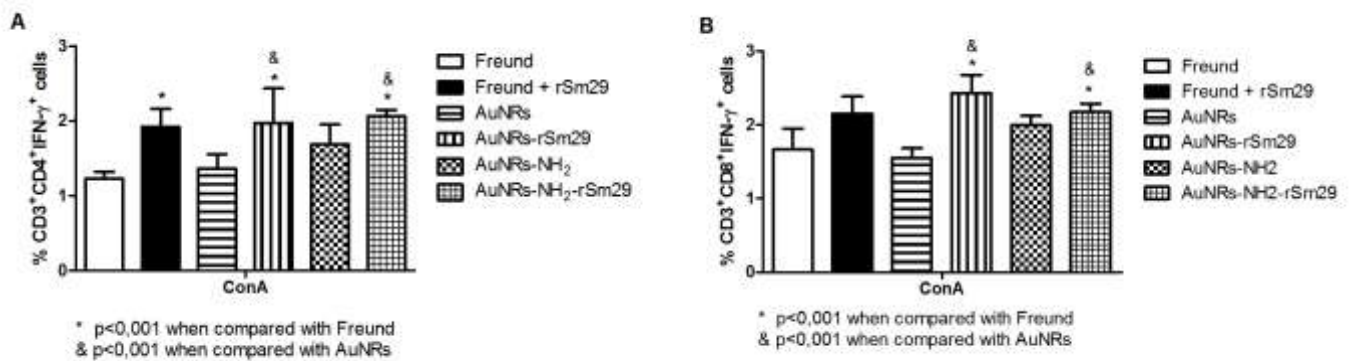


Figura 31 Percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN-γ em animais imunizados com nanobastões de ouro quando estimulados com Concanavalina A. Animais C57Bl/6 foram imunizados com nanobastões de ouro e coletou-se os baços para posterior avaliação do percentual de células CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) produtoras de IFN-γ quando estimuladas com concanavalina A 48 horas. Diferenças significativas com p<0,001 quando comparados com os grupos Freund e AuNRs são representadas por (*) e (&), respectivamente.

Quando avaliada a produção de IFN-γ pelas células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de animais imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados diretamente com a proteína rSm29 ou através da cisteamina, percebemos que há um aumento significativo na produção de tal citocina quando comparado as células dos animais que foram imunizados com Freund e com AuNRs quando reestimuladas com concanavalina A.

Os animais imunizados com Freund + rSm29 foram utilizados como controles experimentais e apresentaram diferenças significativas em relação a produção de IFN-γ por células CD3⁺CD4⁺ em relação aos animais imunizados somente com Freund.

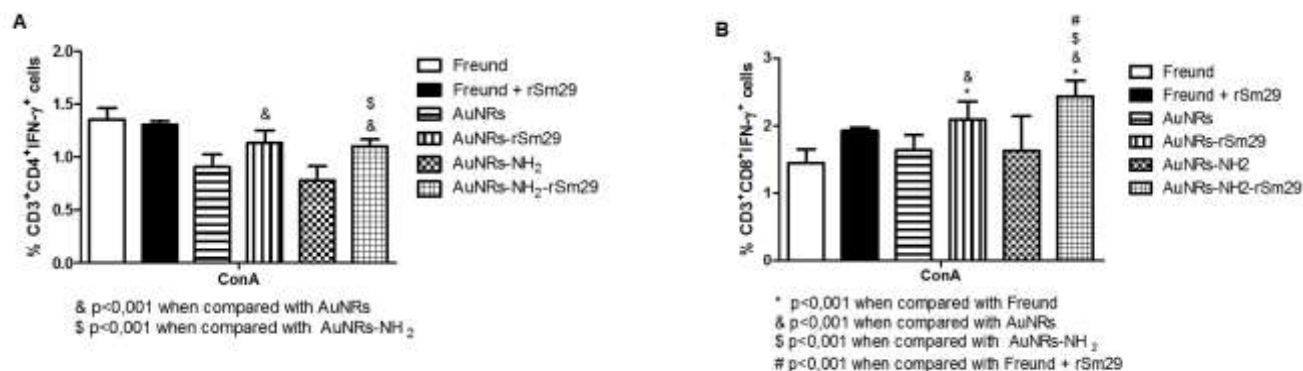


Figura 32 Percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ em animais imunizados com nanobastões de ouro e desafiados com cercarias de *S. mansoni* quando reestimulados com ConA. Animais C57Bl/6 foram imunizados com nanobastões de ouro e infectados com cercarias de *S. mansoni*. 10 dias após a infecção coletou-se os baços para posterior avaliação do percentual de células CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) produtoras de IFN- γ quando reestimuladas com ConA por 48 horas. Diferenças significativas com $p < 0,001$ quando comparados com os grupos Freund, AuNRs, AuNRs-NH₂ e Freund rSm29 são representadas por (*), (&), (\$) e (#), respectivamente.

Quando avaliada a produção de IFN- γ dos animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro e posteriormente infectados com cercárias de *S. mansoni*, os animais do grupo AuNRs-rSm29 apresentaram maior produção de tal citocina por células CD3⁺CD4⁺ quando comparadas as células do grupo AuNRs e por células CD3⁺CD8⁺ quando comparadas aos animais dos grupos Freund e AuNRs, quando reestimuladas com ConA.

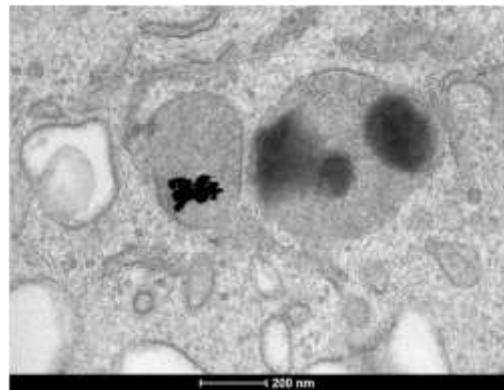
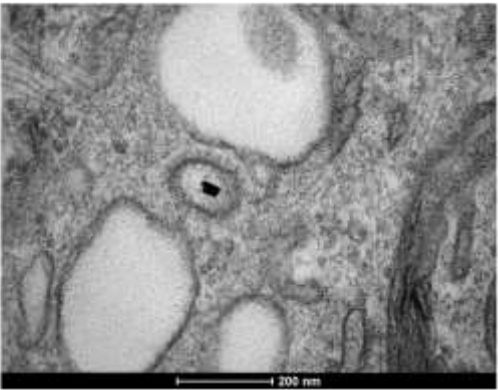
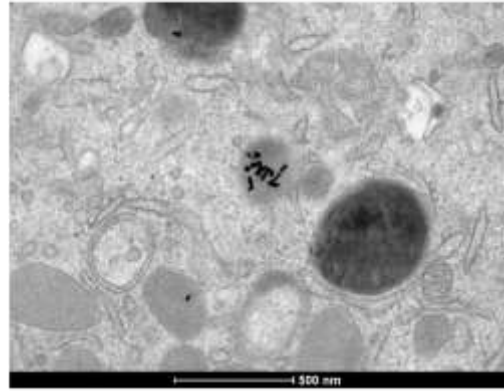
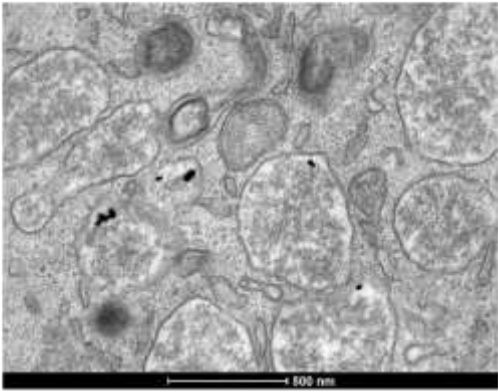
As células CD3⁺CD4⁺ dos animais do grupo AuNRs-NH₂-rSm29 apresentaram maiores níveis de IFN- γ quando comparadas as células dos animais dos grupos AuNRs e AuNRs-NH₂. Quando avaliada as células CD3⁺CD8⁺, os animais imunizados com AuNRs-NH₂-rSm29 apresentaram uma maior produção de IFN- γ quando comparadas aos grupos Freund, AuNRs, AuNRs-NH₂ quando reestimuladas com ConA. Mesmo utilizando uma quantidade 10 vezes menor de proteína para as

imunizações, os animais imunizados com nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e posteriormente ligados a proteína rSm29, apresentaram uma maior produção de IFN- γ por células CD3⁺CD8⁺ e uma equivalente produção por CD3⁺CD4⁺ quando comparada as células dos animais imunizados com Freund + rSm29, o que pode explicar o aumento significativo na produção de tal citocina percebido nas Figuras 29 e 30.

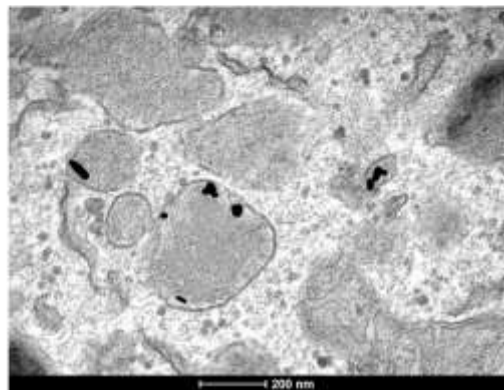
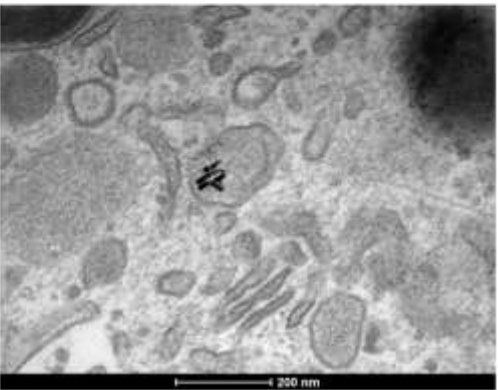
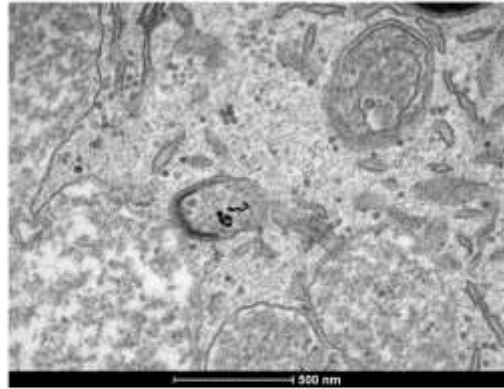
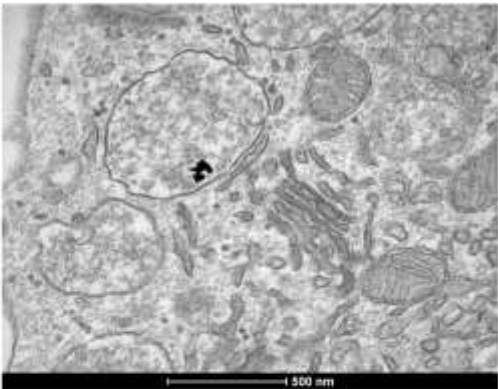
7.1.10 Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas e nanobastões de ouro

Para avaliar a captação celular dos nanobastões de ouro, derivamos células dendríticas a partir da medula óssea de camundongos C57BL/6 e as incubamos por 24 horas com os nanobastões de ouro sem nenhuma funcionalização, ou ligados a proteína rSm29, diretamente ou através da funcionalização com cisteamina. As células dendríticas foram então fixadas e contrastadas, e as imagens se encontram representadas na Figura 33.

A



B



C

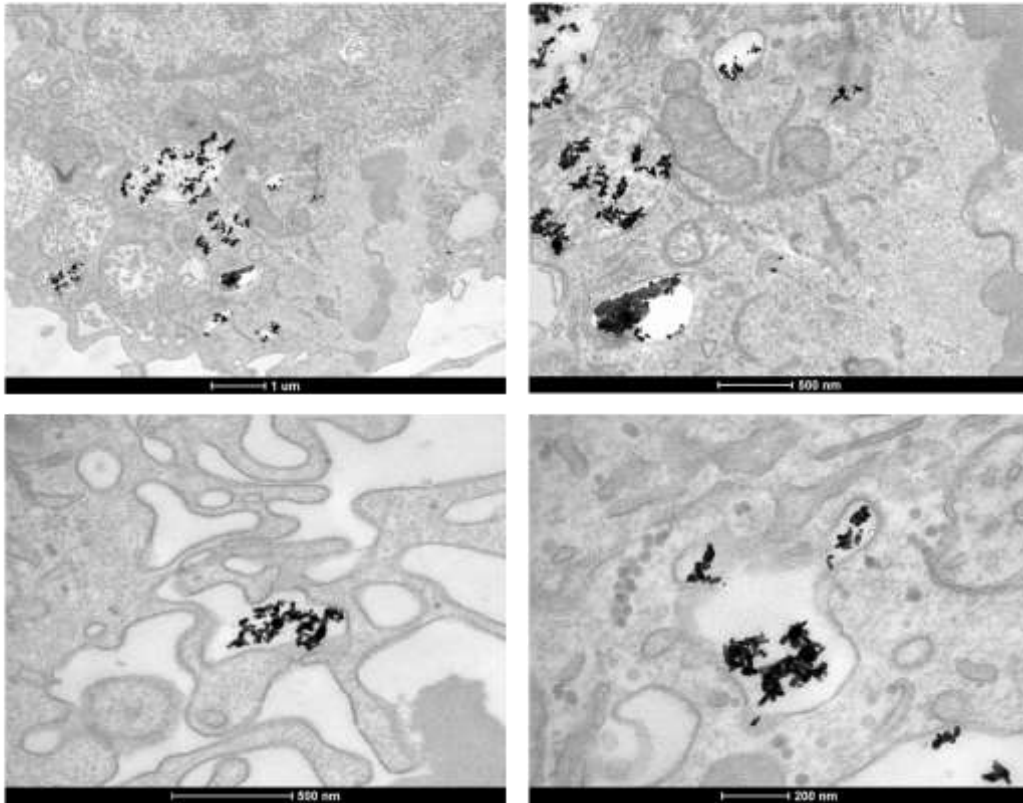


Figura 33 Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas incubadas com nanobastões de ouro. Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 incubadas 24 horas com nanobastões de ouro sem nenhuma funcionalização (A), ou ligadas a proteína recombinante Sm29 diretamente (B) ou através da funcionalização com cisteamina (C).

De acordo com as imagens apresentadas na Figura 33, as células dendríticas que foram incubadas com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29 através da cisteamina (Figura 33C), apresentaram um maior número de nanopartículas no interior das células, quando comparadas as células dendríticas que foram incubadas com os nanobastões sem nenhum tipo de funcionalização (Figura 33A) ou ligados diretamente a proteína rSm29 (Figura 33B).

Além de serem mais captadas por células dendríticas, os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29 através da funcionalização com a cisteamina,

aparentemente, apresentam algumas nanopartículas fora dos vacúolos característicos onde se encontram as outras nanopartículas, como demonstrado na Figura 34. Porém, estudos posteriores para a avaliação do escape de fagossomos ainda são necessários.

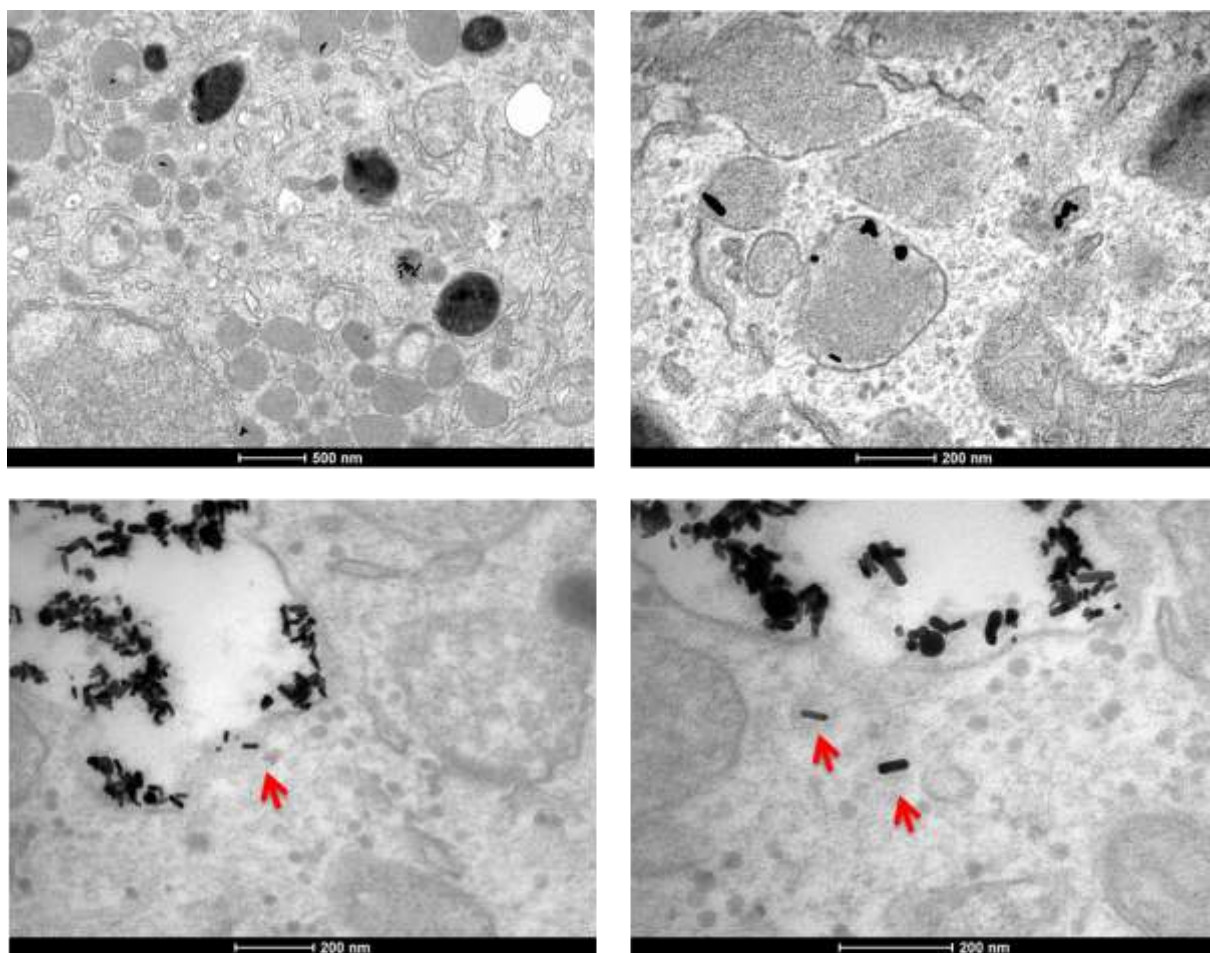


Figura 34 Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas incubadas com nanobastões de ouro. Microscopia eletrônica de transmissão de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 incubadas 24 horas com nanobastões de ouro sem nenhuma funcionalização (painel superior esquerdo), ou ligadas a proteína recombinante Sm29 diretamente (painel superior direito) ou através da funcionalização com cisteamina (painéis inferiores). As setas vermelhas indicam nanobastões de ouro possivelmente na região citoplasmática.

7.1.11 Ativação de células dendríticas por nanobastões de ouro

Com o objetivo melhor compreender o mecanismo imunológico por trás da imunização com os nanobastões de ouro, derivou-se células dendríticas a partir da medula óssea de camundongos C57BL/6. As células dendríticas foram incubadas com os nanobastões de ouro e avaliou-se o percentual de células com elevada expressão de MHC I ou MHC II, ambas analisadas juntamente com a expressão da molécula coestimulatória CD86, como demonstrado na Figura 35.

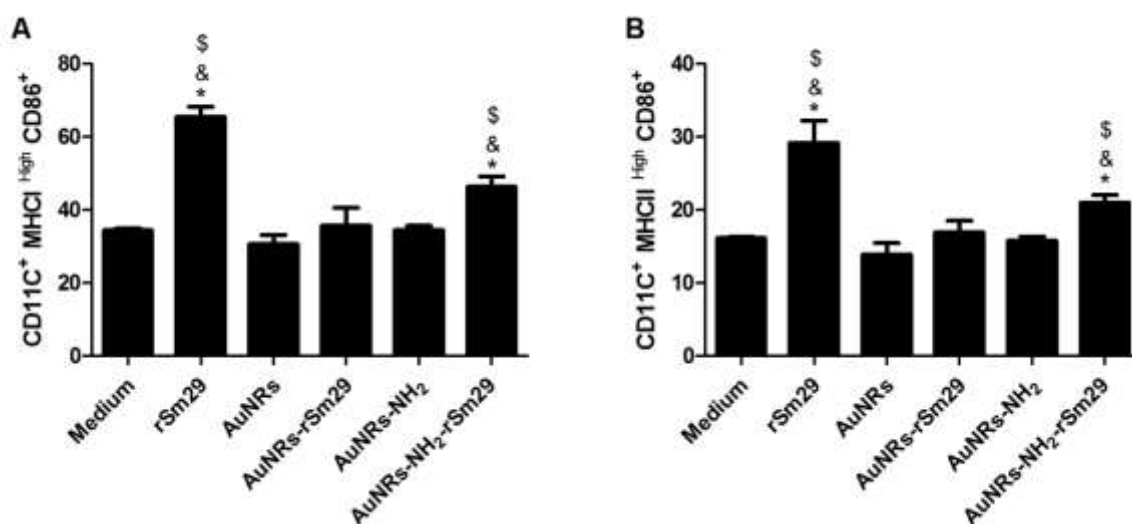


Figura 35 Avaliação do amadurecimento e ativação das células dendríticas por nanobastões de ouro. Avaliação do percentual de células expressando as moléculas MHC I (A) e MHC II (B), juntamente com a molécula coestimulatória CD86 de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6. As células foram incubadas por 24 horas com nanobastões de ouro, nanobastões de ouro ligados diretamente a proteína rSm29, nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e posteriormente ligados a proteína rSm29. Diferenças significativas com $p < 0,001$ dos grupos Medium, AuNRs e AuNRs-NH₂ são demonstradas por (*), (&) e (\$), respectivamente.

Quando avaliado o percentual de células CD11c⁺ expressando níveis elevados de MHC I ou MHC II, juntamente com a molécula coestimulatória CD86, percebemos que

as células dendríticas incubadas com os nanobastões de ouro funcionalizados com a cisteamina e posteriormente ligadas a proteína recombinante Sm29, apresentam maiores percentuais de tais células quando comparadas as células dendríticas que foram estimuladas somente com meio, nanobastões de ouro sem funcionalização ou funcionalizados somente com cisteamina. Apesar de existir uma tendência no aumento do percentual de células dendríticas ativadas e expressando as moléculas MHCI e MHCII nas células incubadas com os nanobastões de ouro ligados diretamente com a proteína recombinante Sm29, não percebemos nenhuma diferença significativa quando comparadas aos respectivos controles, meio ou AuNRs. A proteína recombinante Sm29 foi utilizada como controle positivo em concentrações bem mais elevadas que os grupos que foram avaliados.

Os nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e ligados a proteína rSm29 foram capazes de levar ao aumento de expressão das moléculas MHCI e MHCII de células dendríticas *in vitro*. Agora precisamos avaliar se a ativação das células dendríticas pelos nanobastões de ouro ocasiona o aumento na expressão de citocinas chaves na indução de uma resposta imunológica, como por exemplo, IL-12 e IL-1 β .

7.1.12 Avaliação dos níveis de IL-12 e IL-1 β produzidas por células dendríticas incubadas com nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro foram capazes de induzir a ativação de células dendríticas *in vitro*, e com o objetivo de avaliar a produção de citocinas induzidas por essa ativação, derivamos células dendríticas de medula óssea de camundongos C57BL/6

e incubamos com os grupos de nanobastões de ouro por 24h para avaliar a produção das citocinas IL-12 e IL-1 β , como demonstrado na Figura 36.

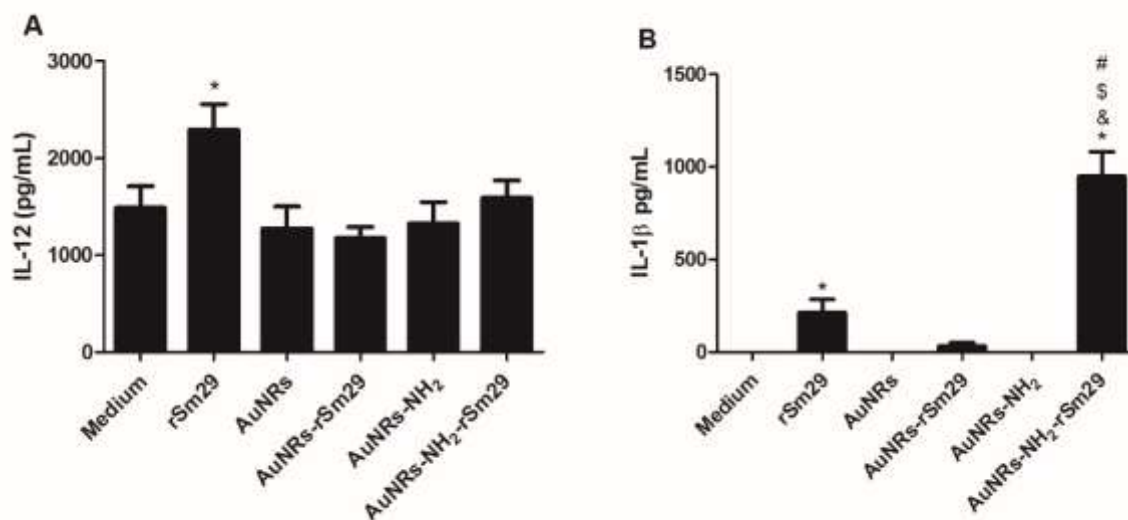


Figura 36 –Produção de citocinas por células dendríticas quando estimuladas com nanobastões de ouro. Células dendríticas derivadas de camundongos C57BL/6 foram incubadas com rSm29, AuNRs, AuNRs-rSm29, AuNRs-NH₂, AuNRs-NH₂-rSm29 ou meio como controle. Após 24 horas de exposição, os níveis de IL-12 (A) e IL-1 β (B) foram avaliados. Diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,001$ em relação aos grupos Medium, AuNRs, AuNRs-NH₂ e rSm29, são representados por (*), (&), (\$) e (#), respectivamente.

Quando avaliamos a produção da citocina IL-12 por células dendríticas incubadas com os nanobastões de ouro, não percebemos nenhuma diferença significativa quando comparadas aos respectivos grupos controles. Somente a incubação com a proteína recombinante Sm29 foi capaz de induzir uma maior produção de tal citocina quando comparada ao meio.

Em relação a produção da citocina IL-1 β , as células dendríticas que foram incubadas com os nanobastões de ouro ligada a proteína rSm29 através da cisteamina, apresentaram um aumento significativo na produção de tal citocina quando comparadas a todos os outro grupos avaliados. Em resumo os nanobastões de ouro

associados à Sm29 foi capaz de induzir a ativação do inflamassoma resultando na secreção de IL-1 β .

8 – DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 2

Vários candidatos vacinais já foram avaliados, como proteínas recombinantes, na formulação de uma vacina contra esquistossomose mansônica, como por exemplo: a calpaína (Ahmad et al., 2009a; Zhang et al., 2010b), Sm21.7 (Pinheiro et al., 2011), filamina (Cook et al., 2004), Sm21.6 (Lopes et al., 2009), fimbrina (Mohamed et al., 1998; Romeih et al., 2008), ECL (Nascimento et al., 2007), glutathione peroxidase (Shalaby et al., 2003), TSP-2 (Tran et al., 2006), Sm14 (Santini-Oliveira et al., 2016; Tandler et al., 2015) e Sm29 (Cardoso et al., 2008), porém, a maioria dos candidatos vacinais foram avaliados na presença de adjuvantes não permitidos para uso em humanos.

Dentre os candidatos avaliados, alguns se apresentaram mais promissores que os outros, como por exemplo, as proteínas Sm14 e Sm28GST, as quais estão em testes clínicos, e as proteínas TSP-2 e Sm29, que apresentaram níveis de proteção acima dos 50% quando avaliados em modelo murino (Cardoso et al., 2008; Santini-Oliveira et al., 2016; Tran et al., 2006). Porém, a Sm14 ainda se encontra em fases bem iniciais dos testes clínicos e os potenciais protetores obtidos pela imunização com as proteínas TSP-2 e Sm29 ainda são dependentes de adjuvantes não permitidos para uso em humanos. Portanto, a avaliação de novas estratégias vacinais, como o uso de nanocarreadores, poderia potencializar os efeitos imunológicos alcançados até o momento e assim, maximizar os níveis de proteção contra a esquistossomose mansônica.

A nanotecnologia vem atraindo a atenção de pesquisadores de diversas áreas, principalmente devido as diferentes características e propriedades que os materiais assumem quando se encontram em escala nanométrica. Existem diversos tipos de

nanopartículas até o momento, compostos de diversos tipos de materiais e apresentando uma grande diversidade de formas, e dentre tais nanopartículas, se destacam os nanobastões de ouro (Dreaden et al., 2012; Huang et al., 2009). Os nanobastões de ouro são nanopartículas anisotrópicas, compostas de ouro maciço, que apresentam ressonância de elétrons de superfície sensíveis ao ambiente químico, alta estabilidade, biocompatibilidade, baixo custo de produção e alto potencial como carreadores vacinais em modelos virais (Xu et al., 2012) e (Stone et al., 2013). Nenhum estudo utilizando nanobastões de ouro como carreadores vacinais contra parasitas foi realizado até o momento.

Com o objetivo de avaliar o potencial dos nanobastões de ouro como carreadores vacinais, tentamos a ligação da proteína recombinante Sm29 de *S. mansoni* por três maneiras diferentes nas nanopartículas: através da funcionalização com ácido lipóico, cisteamina ou através da ligação direta da proteína. Utilizando a análise do espectro UV-VIS dos nanobastões de ouro, o qual apresenta sensibilidade ao ambiente químico ao redor das superfícies dos bastões, percebemos que a ligação direta com a proteína ou através da funcionalização com a cisteamina, foram as metodologias mais eficientes na ligação da proteína recombinante ao nanobastão de ouro, enquanto que, mesmo com concentrações crescentes, não percebemos nenhuma mudança significativa no espectro de absorção dos nanobastões de ouro quando funcionalizados com ácido lipóico e incubados juntamente com a proteína rSm29. A ligação direta da proteína ao nanobastão, provavelmente, ocorreu de maneira eficiente, devido ao alto conteúdo de cisteínas presente na estrutura da proteína, uma vez que moléculas contendo grupamentos tióis tendem a se ligar naturalmente a nanoestruturas de ouro através de um processo de oxirredução (Dreaden et al., 2012; Thakor et al., 2011). A proteína Sm29 apresenta um número

equivalente de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente ou negativamente, e a ligação da proteína a nanobastões de ouro funcionalizados com a cisteamina e a ineficiência de ligação aos nanobastões funcionalizados com ácido lipóico, indicam que, provavelmente, os aminoácidos carregados negativamente se encontram mais expostos ou disponíveis a ligações do que os aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente, favorecendo assim, a ligação com grupamentos amínicos ou carregados positivamente.

Quando avaliados por microscopia eletrônica de transmissão, os nanobastões de ouro ligados a proteína recombinante Sm29 diretamente ou através da funcionalização com a cisteamina, apresentaram um material de densidade eletrônica menor que a do ouro, cobrindo grande parte da superfície das nanopartículas, tendendo a formar aglomerados de tal substância e nanopartículas, indicando que, provavelmente, a substância ao redor dos nanobastões de ouro era a proteína rSm29. Tal substância não foi vista em nenhum momento nas amostras controles. Resultados semelhantes foram obtidos após funcionalização com proteínas virais por (Stone et al., 2013). Para a identificação da proteína, funcionalizamos os nanobastões de ouro com a proteína rSm29 diretamente ou através da cisteamina, e utilizamos anticorpos policlonais anti-rSm29 como ferramenta de reconhecimento, e como resultado, vimos que realmente a proteína ligada aos nanobastões de ouro era a proteína Sm29.

A molécula de CTAB, um surfactante amplamente utilizado na síntese dos nanobastões de ouro é consistentemente tóxico e nocivo a componentes celulares, portanto, estratégias de biofuncionalização ou remoção de tal surfactante, são necessárias para a posterior utilização dos nanobastões de ouro em organismos

vivos (Kinnear et al., 2013; Wan et al., 2015; Wang et al., 2013). Visto que, aparentemente, a citotoxicidade dos nanobastões de ouro se deve principalmente a moléculas de CTAB livres e em solução (Alkilany et al., 2009), realizamos um processo de remoção de tal surfactante por centrifugação, e como visto por microscopia de força atômica, o procedimento de remoção de CTAB livre em solução ocorreu de maneira eficiente. Porém, alguns trabalhos indicam que o CTAB presente ao redor dos nanobastões de ouro também pode ser responsável por danos ou morte celular (Wan et al., 2015; Xu et al., 2012), e para averiguar possível citotoxicidade, incubamos células imortalizadas de mamíferos com nanobastões de ouro, antes ou após o procedimento de limpeza, e percebemos que, todos os nanobastões de ouro após o procedimento de remoção de CTAB, somente apresentavam citotoxicidade significativa quando em concentrações muito elevadas, reforçando a ideia de biocompatibilidade e segurança de nossos carreadores.

Uma vez demonstrado a segurança da utilização dos nanobastões de ouro, partimos para a avaliação do potencial imunológico *in vivo*, e percebemos que, os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados diretamente com a proteína recombinante Sm29 ou através da funcionalização com a cisteamina apresentaram uma redução significativa no número total de vermes (17 a 29%), no número de vermes machos (17 a 23%) e no número de vermes fêmeas (20 a 40%). Os animais que foram imunizados com os nanobastões funcionalizados com cisteamina e ligados a proteína rSm29 apresentaram os maiores níveis de proteção, principalmente quando avaliada a redução no número total de fêmeas recuperadas dos animais infectados com *S. mansoni*. A cisteamina é uma molécula composta de um grupamento tiol, espaçada por dois grupamentos metilas e um grupamento amino terminal, e tal molécula apresenta alta afinidade por átomos de ouro e vem

sendo utilizada para as mais diversas funcionalidades na nanotecnologia de ouro (Shervedani and Mozaffari, 2006). Acreditamos que a maneira como a proteína rSm29 se encontra ligada aos nanobastões de ouro funcionalizadas com a cisteamina pode atuar de diversas maneiras no sistema imune, como a blindagem de epitopos específicos contra a degradação extracelular, exposição de regiões inacessíveis da proteína em condições normais ou até mesmo o direcionamento da proteína para regiões específicas intracelulares, o que não acontece de maneira tão eficiente quando utilizamos a proteína recombinante ligada diretamente com os nanobastões de ouro.

Como os nanobastões se demonstraram promissores imunologicamente, avaliamos a capacidade de tais nanopartículas gerarem uma resposta humoral eficiente. Quando avaliamos o perfil de anticorpos de animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29, não percebemos nenhum aumento significativo nos níveis de anticorpos quando comparados aos grupos controles, o que aparentemente vai contra a idéia do potencial de geração de uma resposta humoral demonstrada por (Xu et al., 2012), onde a imunização de camundongos com nanobastões de ouro carregando vacinas de DNA foram responsáveis pelo aumento significativo no número de anticorpos contra uma proteína específica do envelope do vírus HIV. As diferenças aqui percebidas, provavelmente, devem-se as diferentes metodologia de imunização empregadas, assim como os diferentes tipos de funcionalização. Outro fator importante que pode ter influenciado na incapacidade de indução de uma resposta humoral por nossas vacinas é quantidade de proteína utilizada para a imunização (~2ug de proteína ligada aos nanobastões), sendo que a utilização de adjuvantes ou a melhoria no processo de funcionalização poderiam contornar tal condição.

Para a avaliação do perfil e características da resposta imune, animais foram imunizados com os nanobastões de ouro e/ou infectados com cercárias de *S. mansoni*, e posteriormente a produção de citocinas foi avaliada. Os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29, diretamente ou através da funcionalização com a cisteamina, apresentaram maiores níveis de TNF- α quando comparados aos respectivos controles, porém, menores níveis quando comparados aos animais imunizados com Freund e rSm29. Quando avaliados os níveis de IFN- γ , os animais imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29 apresentaram altos níveis de tal citocina quando comparados aos grupos controles e níveis semelhantes aos animais imunizados com Freund + rSm29. Quando avaliada a produção de citocinas por animais que foram imunizados e desafiados com cercárias de *S. mansoni*, percebemos que todos os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína recombinante Sm29 apresentaram níveis mais elevados de TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-5 (AuNRs-NH₂-rSm29) quando comparados aos grupos controles. Quando avaliamos especificamente os animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29 através da funcionalização com a cisteamina, percebemos um aumento tão significativo na produção de IFN- γ , que existe uma diferença significativa em relação aos animais que foram imunizados com Freund e rSm29 com uma quantidade de proteína aproximadamente 12 vezes superior, enfatizando o alto potencial como carreador vacinal de nossa nanopartícula e indicando um possível mecanismo para o potencial protetor obtido. A produção de TNF- α induzida pela imunização com os nanobastões de ouro é diferente dos resultados obtidos por (Niikura et al., 2013), onde a utilização de nanobastões de ouro funcionalizadas com o PSS-MA (ácido 4 co-maleioestirenosulfônico) e proteínas virais, não foi capaz

de induzir a produção de níveis significativos de TNF- α quando comparados aos grupos controles, porém, a metodologia de funcionalização empregada é diferente da nossa, e a avaliação foi realizada em células dendríticas derivadas de medula óssea, enquanto que nossas avaliações são provenientes de células do baço de animais imunizados com os nanobastões de ouro. Em relação a produção de IFN- γ , os trabalhos de (Xu et al., 2012) demonstraram o potencial de uma vacina de DNA contra o vírus HIV1 carregada por nanobastões de ouro em induzir a produção de tal citocina em camundongos, porém, nenhum trabalho comparativo em relação a outros adjuvantes padrões ou carreadores havia sido realizado até o momento. Em relação a produção das citocinas IL-4 e IL-5 e nanobastões de ouro, não existe nenhum dado publicado até o momento, porém, em relação ao potencial protetor induzido por nossas vacinas, existem vários trabalhos atuais relacionando a uma possível resposta com perfis Th1/Th2 ou Th2 com imunidade protetora contra esquistossomose, principalmente pela utilização de papaína como adjuvante ou peptidases do próprio *S. mansoni* (El Ridi and Tallima, 2013; El Ridi et al., 2014a; El Ridi et al., 2014b).

As células dendríticas são componentes essenciais na geração de uma resposta imunológica eficiente, principalmente em relação a apresentação de antígenos (Boraschi and Italiani, 2015). A captação antigênica e ativação de células dendríticas são princípios básicos para a avaliação do bom funcionamento de um nanocomposto bioconjugado (Liu and Irvine, 2015). Para avaliar tais condições, utilizamos células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos e avaliamos a captação das nanopartículas e a presença dos principais marcadores de superfície relacionados a ativação de células dendríticas, quando incubadas com os nanobastões de ouro. Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão

indicam que os nanobastões de ouro, funcionalizados com cisteamina e ligados a proteína recombinante Sm29 foram muito mais captadas pelas células dendríticas do que os nanobastões de ouro sem nenhum tipo de funcionalização ou ligados diretamente a rSm29. Alguns estudos demonstram que nanobastões de ouro com cargas superficiais positivas, são mais facilmente internalizados, provavelmente pela ligação de proteína séricas específicas ao redor das nanopartículas, formando aglomerados intracelulares que não são eliminados pelas células, porém, não afetam a viabilidade celular (Frohlich, 2015; Huff et al., 2007), o que, do ponto de vista imunológico, poderia aumentar a eficiência e potencial imunológico de certas vacinas. Nas células dendríticas incubadas com nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e ligados a proteína recombinante Sm29, percebemos uma pequena porção dos bastões na região intracitoplasmática, fora de vesículas ou vacúolos, o que pode indicar um possível escape das nossas nanopartículas dos fagossomos. Quando avaliamos a ativação das células dendríticas, percebemos que, as células incubadas com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29 através da funcionalização com cisteamina apresentaram os maiores percentuais de células MHC I⁺ e MHC II⁺ juntamente com a molécula co-estimulatória CD86, indicando o grande potencial de tal carreador vacinal na ativação dessas células. Em contraste, as células incubadas com os nanobastões de ouro funcionalizadas diretamente com a proteína rSm29 apresentaram apenas moderados números de células dendríticas ativadas, o que não foi estatisticamente diferente do seu respectivo grupo controle. Os dados obtidos neste trabalho reforçam os dados apresentados por (Xu et al., 2012), onde nanobastões de ouro ligados diretamente a vacinas de DNA contendo sequências de proteínas virais foram incapazes de induzir a ativação de células dendríticas, enquanto que,

nanobastões com outros tipos de funcionalização e posteriormente ligados a vacina de DNA, realizaram tal processo de maneira muito mais efetiva. A presença de nanopartículas no citoplasma, juntamente com a capacidade de induzir o amadurecimento de células dendríticas, com elevada expressão de MHCI, provavelmente indica certa capacidade de escape do fagossomo por nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e ligados a proteína recombinante. Tal escape permitiria o acesso da proteína recombinante Sm29 ao citoplasma e consequente degradação via proteassoma, ocasionando a ativação de linfócitos TCD8⁺ via MHCI.

Para avaliar o papel dos nanobastões de ouro após a ativação das células dendríticas, incubamos nanobastões de ouro com BMDCs de camundongos C57BL/6 e avaliamos os níveis de IL-12 e IL-1 β , e percebemos que, as células incubadas com os nanobastões de ouro ligados a proteína rSm29 através da cisteamina, foram capazes de induzir uma elevada produção de IL-1 β quando comparado a todos os outros grupos. Os trabalhos realizados por (Niikura et al., 2013) demonstram o potencial de alguns nanobastões de ouro em induzirem a liberação de IL-1 β por células dendríticas, porém, a metodologia utilizada é diferente da empregada nesse trabalho. Em relação a esquistossomose mansônica, o trabalho realizado por (Ritter et al., 2010) correlaciona a secreção de IL-1 β com a geração de respostas imunológicas de perfil Th1, Th2 e Th17 durante à infecção pelo *S. mansoni*. A secreção de IL-1 β por células dendríticas incubadas com os nanobastões de ouro funcionalizadas com a proteína rSm29 através da cisteamina, pode indicar um possível mecanismo de escape de fagolissomo, uma vez que a ruptura do fagolissomo pode ser responsável pela formação do complexo multi-proteico inflamassoma, com consequente liberação de IL-1 β ativa (Hornung et al.,

2008). Contudo, quais os receptores do inflamassoma estão envolvidos nessa ativação pelos nanobastões de ouro ainda precisa ser investigado.

Vários estudos já demonstraram a importância da citocina IFN- γ em uma resposta imune protetora contra esquistossomose mansônica, principalmente devido a incapacidade de camundongos nocautes para IFN- γ e com sua via de sinalização bloqueada em gerar uma resposta imune eficiente quando imunizados com cercárias irradiadas (Jankovic et al., 1999; Smythies et al., 1992; Wilson et al., 1996). As células dos animais que foram imunizadas com os nanobastões de ouro se demonstraram capazes de produzir IFN- γ quando reestimuladas *in vitro*, principalmente quando avaliamos as células dos animais imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados com a cisteamina e ligados a proteína rSm29, os quais apresentaram níveis maiores de tal citocina quando comparados aos animais imunizados com adjuvante de Freund em quantidades bem superiores de proteína rSm29. Portanto, para avaliar quais células estão produzindo IFN- γ , imunizamos animais com os nanobastões de ouro e avaliamos os subtipos CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T produtores de IFN- γ . Percebemos que as células dos animais que foram imunizados com os nanobastões de ouro ligados diretamente a proteína rSm29 ou através da cisteamina, apresentaram maiores percentuais de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , quando comparadas aos respectivos grupos controles e níveis semelhantes aos obtidos dos animais do grupo Freund + rSm29. Porém, quando avaliamos os animais que foram imunizados e posteriormente infectados com cercárias de *S. mansoni*, percebemos que os animais imunizados com os nanobastões de ouro, ligados a proteína rSm29 diretamente ou através da cisteamina, apresentaram maiores percentuais de células produtoras de IFN- γ quando comparados aos respectivos controles. Os animais do grupo AuNRs-NH₂-

rSm29 apresentaram um maior percentual de células TCD8⁺ produtoras de IFN- γ quando comparados aos animais imunizados com o adjuvante de Freund + rSm29. Com a avaliação de tais resultados, acreditamos que a elevada produção de IFN- γ pelas células dos animais imunizados com os nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina e ligados a rSm29 se deve principalmente a produção por células TCD8⁺, principalmente após a infecção, o que corrobora os dados apresentados na Figura 30. O mecanismo de indução de linfócitos TCD8⁺ pode estar relacionado ao efeito de esponja de prótons citado anteriormente, onde as aminas livres presentes nos nanobastões de ouro irão aumentar o influxo de íons e água para o interior dos fagolisossomos de células apresentadoras de antígeno, ocasionando à ruptura osmótica e consequente liberação do antígeno, em nosso caso a proteína recombinante Sm29, no citoplasma, com posterior degradação via proteassoma e apresentação via MHC I e estimulação de receptores específicos presentes na superfície de linfócitos TCD8⁺, induzindo assim, possivelmente, a uma maior produção de IFN- γ por estas células, sendo que tal mecanismo, não ocorre de maneira eficiente quando se utiliza antígenos livres (Benjaminsen et al., 2013; Liu and Irvine, 2015).

Com base nas informações obtidas, a utilização de nanobastões de ouro funcionalizados com a cisteamina, aparece como nova metodologia promissora de carregamento de antígenos no desenvolvimento de novas vacinas, principalmente contra a esquistossomose mansônica.

9- CONCLUSÃO

As vacinas de DNA testadas nesse estudo, quando administrados intramuscularmente em camundongos C57BL/6, foram capazes de alcançar níveis significativos de redução de vermes adultos do *S. mansoni* quando comparados ao grupo controle, sendo que os maiores níveis de proteção e redução de patologia, foram alcançados pelos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Chimera. Esse trabalho valida o uso da associação de antígenos ou genes codificando antígenos na forma de quimeras como vacinas. Quando avaliamos o potencial dos nanobastões de ouro como carreadores vacinais, vimos que a proteína recombinante Sm29 quando ligada a nanobastões de ouro funcionalizados com cisteamina, apresentou níveis significativos de proteção, principalmente quando avaliado o número de vermes fêmeas, e aparentemente, tais índices de proteção foram relacionados a uma resposta de perfil Th1. Acreditamos que os nanobastões apresentem a capacidade de escapar de fagolisossomos e induzir uma resposta mediada por linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. Podemos concluir que a estratégia utilizando nanobastões de ouro e proteínas de *S. mansoni*, é altamente promissora e pode auxiliar na geração de respostas efetivas na vacinação contra esquistossomose, porém, tal metodologia ainda precisa ser aprimorada.

10 - PERSPECTIVAS

A utilização de quimeras com outros antígenos além da Sm29 e TSP-2, assim como diferentes plasmídeos e metodologias de imunização por DNA poderiam aumentar a eficácia das vacinas de DNA aqui demonstradas.

Em relação aos nanobastões de ouro, estratégias visando aumentar a quantidade de antígenos associados na superfície dos nanobastões de ouro, poderiam otimizar e potencializar a resposta imunológica induzida por tais nanocarreadores. A utilização de outros antígenos e a conjugação a outros adjuvantes, podem ajudar na geração de uma resposta imune protetora também.

11- ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

• **GONÇALVES DE ASSIS, NATAN RAIMUNDO** ; BATISTONI DE MORAIS, SUELLEN ; FIGUEIREDO, BÁRBARA CASTRO PIMENTEL ; RICCI, NATASHA DELAQUA ; DE ALMEIDA, LEONARDO AUGUSTO ; DA SILVA PINHEIRO, CARINA ; MARTINS, VICENTE DE PAULO ; OLIVEIRA, SERGIO COSTA . DNA Vaccine Encoding the Chimeric Form of Schistosoma mansoni Sm-TSP2 and Sm29 Confers Partial Protection against Challenge Infection. Plos One, v. 10, p. e0125075, 2015.

• FIGUEIREDO, BARBARA C. ; **Assis, Natan R. G.** ; Morais, Suellen B. ; RICCI, NATASHA D. ; Pinheiro, Carina S. ; Martins, Vicente P. ; BICALHO, RODRIGO M. ; DA'DARA, AKRAM A. ; SKELLY, PATRICK J. ; Oliveira, Sergio C. Schistosome Syntenin Partially Protects Vaccinated Mice against Schistosoma mansoni Infection. PLoS Neglected Tropical Diseases (Online) , v. 8, p. e3107, 2014.

• Pinheiro, Carina S. ; RIBEIRO, ANA PAULA DIAS ; CARDOSO, FERNANDA C. ; Martins, Vicente P. ; Figueiredo, Barbara C. P. ; **ASSIS, NATAN R.G.** ; Morais, Suellen B. ; Caliani, Marcelo V. ; LOUKAS, ALEX ; Oliveira, Sergio C. A multivalent chimeric vaccine composed of Schistosoma mansoni SmTSP2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. Parasite Immunology (Print) , v. 36, p. 303312, 2014.

• FIGUEIREDO, BARBARA CASTRO PIMENTEL ; **DE ASSIS, NATAN RAIMUNDO GONÇALVES** ; DE MORAIS, SUELLEN BATISTONI ; MARTINS, VICENTE PAULO

; RICCI, NATASHA DELAQUA ; BICALHO, RODRIGO MARQUES ; PINHEIRO, CARINA DA SILVA ; OLIVEIRA, SERGIO COSTA. Immunological characterization of a chimeric form of Schistosoma mansoni aquaporin in the murine model. Parasitology (London. Print) , v. CJO, p. 112, 2014.

• Martins, Vicente P. ; Morais, Suellen B. ; Pinheiro, Carina S. ; **Assis, Natan R. G.** ; Figueiredo, Barbara C.P. ; RICCI, NATASHA D. ; ALVES SILVA, JULIANA ; Caliari, Marcelo V. ; Oliveira, Sergio C. Sm10.3, a Member of the MicroExon Gene 4 (MEG4) Family, Induces Erythrocyte Agglutination In Vitro and Partially Protects Vaccinated Mice against Schistosoma mansoni. Infection. PLoS Neglected Tropical Diseases (Online) , v. 8, p. e2750, 2014.

• FIGUEIREDO, BARBARA CASTRO PIMENTEL; RICCI, NATASHA DELAQUA ; **DE ASSIS, NATAN RAIMUNDO GONÇALVES** ; DE MORAIS, SUELLEN BATISTONI ; FONSECA, CRISTINA TOSCANO ; OLIVEIRA, SERGIO COSTA. Kicking in the Guts: Schistosoma mansoni Digestive Tract Proteins are Potential Candidates for Vaccine Development. Frontiers in Immunology (Online), v. 6, p. 17,2015.

12- ANEXO

Artigo publicado relacionado a tese: DNA Vaccine Encoding the Chimeric Form of Schistosoma mansoni Sm-TSP2 and Sm29 Confers Partial Protection against Challenge Infection. Plos One, v. 10, p. e0125075, 2015.

13- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, G., Torben, W., Zhang, W., Wyatt, M., and Siddiqui, A.A. (2009a). Sm-p80-based DNA vaccine formulation induces potent protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 31, 156-161.
- Ahmad, G., Zhang, W., Torben, W., Damian, R.T., Wolf, R.F., White, G.L., Chavez-Suarez, M., Kennedy, R.C., and Siddiqui, A.A. (2009b). Protective and antifecundity effects of Sm-p80-based DNA vaccine formulation against *Schistosoma mansoni* in a nonhuman primate model. *Vaccine* 27, 2830-2837.
- Aihara, H., and Miyazaki, J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature biotechnology* 16, 867-870.
- Aksoy, E., Zouain, C.S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., *et al.* (2005). Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 277-283.
- Alkilany, A.M., Nagaria, P.K., Hexel, C.R., Shaw, T.J., Murphy, C.J., and Wyatt, M.D. (2009). Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 5, 701-708.
- Alves, C.C., Araujo, N., dos Santos, V.C., Couto, F.B., Assis, N.R., Morais, S.B., Oliveira, S.C., and Fonseca, C.T. (2015). Sm29, but not Sm22.6 retains its ability to induce a protective immune response in mice previously exposed to a *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003537.
- Amiri, P., Locksley, R.M., Parslow, T.G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D., and McKerrow, J.H. (1992). Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356, 604-607.
- Araujo, M.I., de Jesus, A.R., Bacellar, O., Sabin, E., Pearce, E., and Carvalho, E.M. (1996). Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European journal of immunology* 26, 1399-1403.
- Babiuk, S., Baca-Estrada, M.E., Foldvari, M., Middleton, D.M., Rabussay, D., Widera, G., and Babiuk, L.A. (2004). Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. *Journal of biotechnology* 110, 1-10.
- Barbosa, F.S., and Coimbra Junior, C.E. (1992). Alternative approaches in schistosomiasis control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 *Suppl* 4, 215-220.
- Beck, L., Van-Lume, D.S., Souza, J.R., Domingues, A.L., Favre, T., Abath, F.G., and Montenegro, S.M. (2008). Discriminating acute from chronic human schistosomiasis *mansoni*. *Acta Trop* 108, 229-233.
- Benjaminsen, R.V., Matthebjerg, M.A., Henriksen, J.R., Moghimi, S.M., and Andresen, T.L. (2013). The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 149-157.
- Bergquist, N.R. (1998). Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 *Suppl* 1, 95-101.
- Bergquist, N.R., Leonardo, L.R., and Mitchell, G.F. (2005). Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol* 21, 112-117.
- Biju, V. (2014). Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society reviews* 43, 744-764.

- Boraschi, D., and Italiani, P. (2015). From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines* 3, 930-939.
- Braschi, S., Borges, W.C., and Wilson, R.A. (2006). Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1, 205-212.
- Brasil (2011-2015). Plano integrado de ações estratégicas. De eliminação da Hanseníase, Filariose, Esquistossomose e Oncocercose como problema de saúde pública, Tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases.
- Brunet, L.R., Finkelman, F.D., Cheever, A.W., Kopf, M.A., and Pearce, E.J. (1997). IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol* 159, 777-785.
- Caires, A.J.A., D. C. B. ; Fantini, C.; Ferlauto, A. S.; Ladeira, L. O. (2015). One-pot in situ photochemical synthesis of graphene oxide/gold nanorod nanocomposites for surface-enhanced Raman spectroscopy *RSC advances* 5, 46552-46557.
- Caldas, I.R., Campi-Azevedo, A.C., Oliveira, L.F., Silveira, A.M., Oliveira, R.C., and Gazzinelli, G. (2008). Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 108, 109-117.
- Cardoso, F.C., Macedo, G.C., Gava, E., Kitten, G.T., Mati, V.L., de Melo, A.L., Caliari, M.V., Almeida, G.T., Venancio, T.M., Verjovski-Almeida, S., *et al.* (2008). Schistosoma mansoni tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e308.
- Cardoso, F.C., Pacifico, R.N., Mortara, R.A., and Oliveira, S.C. (2006a). Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol* 144, 382-391.
- Cardoso, F.C., Pinho, J.M., Azevedo, V., and Oliveira, S.C. (2006b). Identification of a new Schistosoma mansoni membrane-bound protein through bioinformatic analysis. *Genetics and molecular research : GMR* 5, 609-618.
- Cardoso, L.S., Araujo, M.I., Goes, A.M., Pacifico, L.G., Oliveira, R.R., and Oliveira, S.C. (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of Schistosoma mansoni recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact* 6, 1.
- Carvalho-Queiroz, C., Nyakundi, R., Ogongo, P., Rikoi, H., Egilmez, N.K., Farah, I.O., Kariuki, T.M., and LoVerde, P.T. (2015). Protective Potential of Antioxidant Enzymes as Vaccines for Schistosomiasis in a Non-Human Primate Model. *Frontiers in immunology* 6, 273.
- Chan, M.S., Woolhouse, M.E., and Bundy, D.A. (1997). Human schistosomiasis: potential long-term consequences of vaccination programmes. *Vaccine* 15, 1545-1550.
- Cheever, A.W., Poindexter, R.W., and Wynn, T.A. (1999). Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with Schistosoma japonicum and S. mansoni with or without recombinant tumor necrosis factor alpha treatment. *Infect Immun* 67, 2201-2208.
- Chen, H., Shao, L., Li, Q., and Wang, J. (2013). Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chemical Society reviews* 42, 2679-2724.
- Chitsulo, L., Loverde, P., and Engels, D. (2004). Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol* 2, 12-13.
- Cook, R.M., Carvalho-Queiroz, C., Wilding, G., and LoVerde, P.T. (2004). Nucleic acid vaccination with Schistosoma mansoni antioxidant enzyme cytosolic superoxide dismutase and the structural protein filamin confers protection against the adult worm stage. *Infect Immun* 72, 6112-6124.
- Coura, J.R., and Amaral, R.S. (2004). Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99, 13-19.

- Cupit, P.M., Steinauer, M.L., Tonnessen, B.W., Eric Agola, L., Kinuthia, J.M., Mwangi, I.N., Mutuku, M.W., Mkoji, G.M., Loker, E.S., and Cunningham, C. (2011). Polymorphism associated with the *Schistosoma mansoni* tetraspanin-2 gene. *International journal for parasitology* 41, 1249-1252.
- Da'Dara, A.A., Skelly, P.J., Walker, C.M., and Harn, D.A. (2003). A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite Immunol* 25, 429-437.
- Da'dara, A.A., Skelly, P.J., Wang, M.M., and Harn, D.A. (2001). Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine* 20, 359-369.
- de Jesus, A.R., Silva, A., Santana, L.B., Magalhaes, A., de Jesus, A.A., de Almeida, R.P., Rego, M.A., Burattini, M.N., Pearce, E.J., and Carvalho, E.M. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of infectious diseases* 185, 98-105.
- Despres, L., Imbert-Establet, D., and Monnerot, M. (1993). Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Molecular and biochemical parasitology* 60, 221-229.
- Donnelly, J.J., Wahren, B., and Liu, M.A. (2005). DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* 175, 633-639.
- Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., and El-Sayed, M.A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society reviews* 41, 2740-2779.
- Dupuis, M., Denis-Mize, K., Woo, C., Goldbeck, C., Selby, M.J., Chen, M., Otten, G.R., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Ott, G., *et al.* (2000). Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 165, 2850-2858.
- Duraes, F.V., Carvalho, N.B., Melo, T.T., Oliveira, S.C., and Fonseca, C.T. (2009). IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunology letters* 125, 72-77.
- El Ridi, R., and Tallima, H. (2013). Vaccine-induced protection against murine schistosomiasis mansoni with larval excretory-secretory antigens and papain or type-2 cytokines. *The Journal of parasitology* 99, 194-202.
- El Ridi, R., Tallima, H., Dalton, J.P., and Donnelly, S. (2014a). Induction of protective immune responses against schistosomiasis using functionally active cysteine peptidases. *Frontiers in genetics* 5, 119.
- El Ridi, R., Tallima, H., Selim, S., Donnelly, S., Cotton, S., Gonzales Santana, B., and Dalton, J.P. (2014b). Cysteine peptidases as schistosomiasis vaccines with inbuilt adjuvanticity. *PLoS one* 9, e85401.
- Fallon, P.G., Richardson, E.J., McKenzie, G.J., and McKenzie, A.N. (2000). 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* 164, 2585-2591.
- Fan, Y., and Moon, J.J. (2015). Nanoparticle Drug Delivery Systems Designed to Improve Cancer Vaccines and Immunotherapy. *Vaccines* 3, 662-685.
- Farias, L.P., Cardoso, F.C., Miyasato, P.A., Montoya, B.O., Tararam, C.A., Roffato, H.K., Kawano, T., Gazzinelli, A., Correa-Oliveira, R., Coulson, P.S., *et al.* (2010). *Schistosoma mansoni* Stomatin like protein-2 is located in the tegument and induces partial protection against challenge infection. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e597.

- Faurez, F., Dory, D., Le Moigne, V., Gravier, R., and Jestin, A. (2010). Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine* 28, 3888-3895.
- Ferrari, M.L., Coelho, P.M., Antunes, C.M., Tavares, C.A., and da Cunha, A.S. (2003). Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bulletin of the World Health Organization* 81, 190-196.
- Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, V.M., and Rinaldi, M. (2010). DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010, 174378.
- Foged, C., Arigita, C., Sundblad, A., Jiskoot, W., Storm, G., and Frokjaer, S. (2004). Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine* 22, 1903-1913.
- Fonseca, C.T., Pacifico, L.G., Barsante, M.M., Rassi, T., Cassali, G.D., and Oliveira, S.C. (2006). Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. *Microbes Infect* 8, 2509-2516.
- Fraga, S., Faria, H., Soares, M.E., Duarte, J.A., Soares, L., Pereira, E., Costa-Pereira, C., Teixeira, J.P., de Lourdes Bastos, M., and Carmo, H. (2013). Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *Journal of applied toxicology : JAT* 33, 1111-1119.
- Frohlich, E. (2015). Value of phagocyte function screening for immunotoxicity of nanoparticles in vivo. *International journal of nanomedicine* 10, 3761-3778.
- Funston, A.M., Novo, C., Davis, T.J., and Mulvaney, P. (2009). Plasmon coupling of gold nanorods at short distances and in different geometries. *Nano letters* 9, 1651-1658.
- Garmory, H.S., Brown, K.A., and Titball, R.W. (2003). DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther* 1, 2.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., and Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106-1118.
- Grzych, J.M., Capron, M., Bazin, H., and Capron, A. (1982). In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J Immunol* 129, 2739-2743.
- Gurunathan, S., Klinman, D.M., and Seder, R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* 18, 927-974.
- Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y., and Chen, Z. (2009). *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual review of genomics and human genetics* 10, 211-240.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hesse, M., Cheever, A.W., Jankovic, D., and Wynn, T.A. (2000). NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *The American journal of pathology* 157, 945-955.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2000). 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* 164, 6406-6416.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 9, 847-856.

- Horta, M.F., and Ramalho-Pinto, F.J. (1984). Subclasses of rat IgG active in the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J Immunol* *133*, 3326-3332.
- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., and Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of clinical investigation* *118*, 1311-1321.
- Huang, X., Neretina, S., and El-Sayed, M.A. (2009). Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Adv Mater* *21*, 4880-4910.
- Huff, T.B., Hansen, M.N., Zhao, Y., Cheng, J.X., and Wei, A. (2007). Controlling the cellular uptake of gold nanorods. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* *23*, 1596-1599.
- Irvine, D.J., Hanson, M.C., Rakhra, K., and Tokatlian, T. (2015). Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chemical reviews* *115*, 11109-11146.
- James, S.L., and Glaven, J. (1989). Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* *143*, 4208-4212.
- Jana, N.R., Gearheart L. , Murphy, C. J. (2001). Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry*.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* *20*, 197-216.
- Jankovic, D., Wynn, T.A., Kullberg, M.C., Hieny, S., Caspar, P., James, S., Cheever, A.W., and Sher, A. (1999). Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *J Immunol* *162*, 345-351.
- Jassim, A., Hassan, K., and Catty, D. (1987). Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol* *9*, 627-650.
- Jaureguiberry, S., Paris, L., and Caumes, E. (2010). Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* *16*, 225-231.
- Jewell, C.M., Lopez, S.C., and Irvine, D.J. (2011). In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 15745-15750.
- Jia, X., Schulte, L., Loukas, A., Pickering, D., Pearson, M., Mobli, M., Jones, A., Rosengren, K.J., Daly, N.L., Gobert, G.N., *et al.* (2014). Solution structure, membrane interactions, and protein binding partners of the tetraspanin Sm-TSP-2, a vaccine antigen from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *The Journal of biological chemistry* *289*, 7151-7163.
- Jorge Pérez-Juste, I.P.-S., Luis M. Liz-Marzán, Paul Mulvaney (2005). Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coordination Chemistry Review* *249*, 1870–1901.
- Kassim, O.O., Dean, D.A., Mangold, B.L., and Von Lichtenberg, F. (1992). Combined microautoradiographic and histopathologic analysis of the fate of challenge *Schistosoma mansoni* schistosomula in mice immunized with irradiated cercariae. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *47*, 231-237.
- Kasturi, S.P., Skountzou, I., Albrecht, R.A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H.I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., *et al.* (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* *470*, 543-547.

- King, C.H., Sturrock, R.F., Kariuki, H.C., and Hamburger, J. (2006). Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. *Trends Parasitol* 22, 575-582.
- Kinney, C., Dietsch, H., Clift, M.J., Endes, C., Rothen-Rutishauser, B., and Petri-Fink, A. (2013). Gold nanorods: controlling their surface chemistry and complete detoxification by a two-step place exchange. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 1934-1938.
- Klabunde, J., Berger, J., Jensenius, J.C., Klinkert, M.Q., Zelck, U.E., Kremsner, P.G., and Kun, J.F. (2000). *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Experimental parasitology* 95, 231-239.
- Koster, B., and Strand, M. (1994). *Schistosoma mansoni*: Sm23 is a transmembrane protein that also contains a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Archives of biochemistry and biophysics* 310, 108-117.
- Kovalenko, O.V., Metcalf, D.G., DeGrado, W.F., and Hemler, M.E. (2005). Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC structural biology* 5, 11.
- Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* 9, 5233-5252.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148.
- Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
- Kutzler, M.A., and Weiner, D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature reviews Genetics* 9, 776-788.
- Lambertucci, J.R. (2010). Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 422-435.
- Liopo, A., Conjusteau, A., Tsyboulski, D., Ermolinsky, B., Kazansky, A., and Oraevsky, A. (2012). Biocompatible Gold Nanorod Conjugates for Preclinical Biomedical Research. *Journal of nanomedicine & nanotechnology* S2.
- Liu, H., and Irvine, D.J. (2015). Guiding principles in the design of molecular bioconjugates for vaccine applications. *Bioconjugate chemistry* 26, 791-801.
- Liu, M.A. (2003). DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 253, 402-410.
- Liu, M.A. (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev* 239, 62-84.
- Lopes, D.O., Paiva, L.F., Martins, M.A., Cardoso, F.C., Rajao, M.A., Pinho, J.M., Caliari, M.V., Correa-Oliveira, R., Mello, S.M., Leite, L.C., *et al.* (2009). 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* 27, 4127-4135.
- Loukas, A., Tran, M., and Pearson, M.S. (2007). Schistosome membrane proteins as vaccines. *International journal for parasitology* 37, 257-263.
- Magnussen, P. (2003). Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. *Acta Trop* 86, 243-254.
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology* 38, 1404-1413.
- McManus, D.P., and Loukas, A. (2008). Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21, 225-242.

- Mei, H., and LoVerde, P.T. (1997). Schistosoma mansoni: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Experimental parasitology* 86, 69-78.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European journal of immunology* 25, 1101-1104.
- Mohamed, M.M., Shalaby, K.A., LoVerde, P.T., and Karim, A.M. (1998). Characterization of Sm20.8, a member of a family of schistosome tegumental antigens. *Molecular and biochemical parasitology* 96, 15-25.
- Montenegro, S.M., Miranda, P., Mahanty, S., Abath, F.G., Teixeira, K.M., Coutinho, E.M., Brinkman, J., Goncalves, I., Domingues, L.A., Domingues, A.L., *et al.* (1999). 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. *The Journal of infectious diseases* 179, 1502-1514.
- Moon, J.J., Suh, H., Polhemus, M.E., Ockenhouse, C.F., Yadava, A., and Irvine, D.J. (2012). Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. *PloS one* 7, e31472.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G., and Klinkert, M.Q. (1991). A 14-kDa Schistosoma mansoni polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 266, 8447-8454.
- Mwatha, J.K., Kimani, G., Kamau, T., Mbugua, G.G., Ouma, J.H., Mumo, J., Fulford, A.J., Jones, F.M., Butterworth, A.E., Roberts, M.B., *et al.* (1998). High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 160, 1992-1999.
- Nascimento, E.J., Amorim, R.V., Cavalcanti, A., Alves, V.F., Nakazawa, M., Pereira, V.R., and Lucena-Silva, N. (2007). Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 21-27.
- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., *et al.* (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS nano* 7, 3926-3938.
- Nikoobakht, B.a.E.-S., M. A. (2003). Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* 15, 1957-1962.
- Olafsdottir, G., Svansson, V., Ingvarsson, S., Marti, E., and Torsteinsdottir, S. (2008). In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence. *Acta veterinaria Scandinavica* 50, 44.
- Oliveira, S.C., Fonseca, C.T., Cardoso, F.C., Farias, L.P., and Leite, L.C. (2008). Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop* 108, 256-262.
- Pacifico, L.G., Fonseca, C.T., Chiari, L., and Oliveira, S.C. (2006). 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* 211, 97-104.
- Pearce, E.J., and MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews Immunology* 2, 499-511.

- Pearson, M.S., Pickering, D.A., McSorley, H.J., Bethony, J.M., Tribolet, L., Dougall, A.M., Hotez, P.J., and Loukas, A. (2012). Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1564.
- Pinheiro, C.S., Martins, V.P., Assis, N.R., Figueiredo, B.C., Morais, S.B., Azevedo, V., and Oliveira, S.C. (2011). Computational vaccinology: an important strategy to discover new potential *S. mansoni* vaccine candidates. *J Biomed Biotechnol* 2011, 503068.
- Rabello, A. (1995). Acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90, 277-280.
- Rao, S.S., Gomez, P., Mascola, J.R., Dang, V., Krivulka, G.R., Yu, F., Lord, C.I., Shen, L., Bailer, R., Nabel, G.J., *et al.* (2006). Comparative evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model. *Vaccine* 24, 367-373.
- Rezende, C.M., Silva, M.R., Santos, I.G., Silva, G.A., Gomes, D.A., and Goes, A.M. (2011). Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: effects on granuloma down-modulation and cytokine production. *Immunology letters* 141, 123-133.
- Ritter, M., Gross, O., Kays, S., Ruland, J., Nimmerjahn, F., Saijo, S., Tschopp, J., Layland, L.E., and Prazeres da Costa, C. (2010). *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20459-20464.
- Romeih, M.H., Hassan, H.M., Shousha, T.S., and Saber, M.A. (2008). Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* infection by multivalent DNA vaccine. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 327-338.
- Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleight, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., and McManus, D.P. (2002). Schistosomiasis. *The New England journal of medicine* 346, 1212-1220.
- Saber, M., Diab, T., Hammam, O., Karim, A., Medhat, A., Khela, M., and El-Dabaa, E. (2013). Protective and anti-pathology effects of Sm fructose-1,6-bisphosphate aldolase-based DNA vaccine against schistosoma mansoni by changing route of injection. *The Korean journal of parasitology* 51, 155-163.
- Santini-Oliveira, M., Coler, R.N., Parra, J., Veloso, V., Jayashankar, L., Pinto, P.M., Ciol, M.A., Bergquist, R., Reed, S.G., and Tendler, M. (2016). Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. *Vaccine* 34, 586-594.
- Shabaan, A.M., Mohamed, M.M., Abdallah, M.S., Ibrahim, H.M., and Karim, A.M. (2003). Analysis of *Schistosoma mansoni* genes using the expressed sequence tag approach. *Acta biochimica Polonica* 50, 259-268.
- Shalaby, K.A., Yin, L., Thakur, A., Christen, L., Niles, E.G., and LoVerde, P.T. (2003). Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine* 22, 130-136.
- Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D.T., Petrilli, V., Tschopp, J., *et al.* (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 870-875.
- Shedlock, D.J., and Weiner, D.B. (2000). DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 68, 793-806.
- Shervedani, R.K., and Mozaffari, S.A. (2006). Copper(II) nanosensor based on a gold cysteamine self-assembled monolayer functionalized with salicylaldehyde. *Analytical chemistry* 78, 4957-4963.

- Skelly, P.J., Stein, L.D., and Shoemaker, C.B. (1993). Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation. *Molecular and biochemical parasitology* 60, 93-104.
- Smythies, L.E., Coulson, P.S., and Wilson, R.A. (1992). Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol* 149, 3654-3658.
- Stano, A., Nembrini, C., Swartz, M.A., Hubbell, J.A., and Simeoni, E. (2012). Nanoparticle size influences the magnitude and quality of mucosal immune responses after intranasal immunization. *Vaccine* 30, 7541-7546.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., and Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious diseases* 6, 411-425.
- Stelma, F.F., Talla, I., Polman, K., Niang, M., Sturrock, R.F., Deelder, A.M., and Gryseels, B. (1993). Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in northern Senegal. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 49, 701-706.
- Stone, J.W., Thornburg, N.J., Blum, D.L., Kuhn, S.J., Wright, D.W., and Crowe, J.E., Jr. (2013). Gold nanorod vaccine for respiratory syncytial virus. *Nanotechnology* 24, 295102.
- Street, M., Coulson, P.S., Sadler, C., Warnock, L.J., McLaughlin, D., Bluethmann, H., and Wilson, R.A. (1999). TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *J Immunol* 163, 4489-4494.
- Tang, D.C., DeVit, M., and Johnston, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.
- Temchura, V.V., Kozlova, D., Sokolova, V., Uberla, K., and Epple, M. (2014). Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. *Biomaterials* 35, 6098-6105.
- Tendler, M., Almeida, M., and Simpson, A. (2015). Development of the Brazilian Anti Schistosomiasis Vaccine Based on the Recombinant Fatty Acid Binding Protein Sm14 Plus GLA-SE Adjuvant. *Frontiers in immunology* 6, 218.
- Thakor, A.S., Jokerst, J., Zavaleta, C., Massoud, T.F., and Gambhir, S.S. (2011). Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. *Nano letters* 11, 4029-4036.
- Thomas, P.G., Carter, M.R., Atochina, O., Da'Dara, A.A., Piskorska, D., McGuire, E., and Harn, D.A. (2003). Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 171, 5837-5841.
- Tran, M.H., Freitas, T.C., Cooper, L., Gaze, S., Gatton, M.L., Jones, M.K., Lovas, E., Pearce, E.J., and Loukas, A. (2010). Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS pathogens* 6, e1000840.
- Tran, M.H., Pearson, M.S., Bethony, J.M., Smyth, D.J., Jones, M.K., Duke, M., Don, T.A., McManus, D.P., Correa-Oliveira, R., and Loukas, A. (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med* 12, 835-840.
- Tsang, C., Babiuk, S., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, L.A., and Griebel, P. (2007). A single DNA immunization in combination with electroporation prolongs the primary immune response and maintains immune memory for six months. *Vaccine* 25, 5485-5494.

- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., *et al.* (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.
- Vaillant, B., Chiamonte, M.G., Cheever, A.W., Soloway, P.D., and Wynn, T.A. (2001). Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 167, 7017-7026.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., *et al.* (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *The Journal of biological chemistry* 277, 48122-48129.
- Van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F., van Balkom, B.W., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B., and Tielens, A.G. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International journal for parasitology* 36, 691-699.
- Wan, J., Wang, J.H., Liu, T., Xie, Z., Yu, X.F., and Li, W. (2015). Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo. *Scientific reports* 5, 11398.
- Wang, L., Jiang, X., Ji, Y., Bai, R., Zhao, Y., Wu, X., and Chen, C. (2013). Surface chemistry of gold nanorods: origin of cell membrane damage and cytotoxicity. *Nanoscale* 5, 8384-8391.
- Wang, S., Zhang, C., Zhang, L., Li, J., Huang, Z., and Lu, S. (2008). The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine* 26, 2100-2110.
- Wang, T., Zou, M., Jiang, H., Ji, Z., Gao, P., and Cheng, G. (2011). Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 44, 653-659.
- Wang, Z., Troilo, P.J., Wang, X., Griffiths, T.G., Pacchione, S.J., Barnum, A.B., Harper, L.B., Pauley, C.J., Niu, Z., Denisova, L., *et al.* (2004). Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene therapy* 11, 711-721.
- WHO (2010). WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. "First WHO report on neglected tropical diseases". 129-135.
- WHO (2015). WORLD HEALTH ORGANIZATION . Schistosomiasis, countries and areas at risk, 2014.
- Widman, A., de Oliveira, I.R., Speranzini, M.B., Cerri, G.G., Saad, W.A., and Gama-Rodrigues, J. (2001). [Hepatosplenic schistosomiasis portal hypertension: effect of esophagogastric devascularization with splenectomy on the diameter and mean flow velocity in the portal system (ultra-sonographic Doppler)]. *Arquivos de gastroenterologia* 38, 19-23.
- Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., DeVit, M.J., McElligott, S.G., and Sanford, J.C. (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2726-2730.
- Wilson, R.A., and Coulson, P.S. (2009). Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends Parasitol* 25, 423-431.

- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Betts, C., Dowling, M.A., and Smythies, L.E. (1996). Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* *87*, 275-282.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* *247*, 1465-1468.
- Wynn, T.A., Reynolds, A., James, S., Cheever, A.W., Caspar, P., Hieny, S., Jankovic, D., Strand, M., and Sher, A. (1996). IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *J Immunol* *157*, 4068-4078.
- Xiao, Y., Zeng, Y., Alexander, E., Mehta, S., Joshi, S.B., Buchman, G.W., Volkin, D.B., Middaugh, C.R., and Isaacs, S.N. (2013). Adsorption of recombinant poxvirus L1-protein to aluminum hydroxide/CpG vaccine adjuvants enhances immune responses and protection of mice from vaccinia virus challenge. *Vaccine* *31*, 319-326.
- Xu, L., Liu, Y., Chen, Z., Li, W., Wang, L., Wu, X., Ji, Y., Zhao, Y., Ma, L., Shao, Y., *et al.* (2012). Surface-engineered gold nanorods: promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1 treatment. *Nano letters* *12*, 2003-2012.
- Xu, X., Remold, H.G., and Caulfield, J.P. (1993). Potential role for scavenger receptors of human monocytes in the killing of *Schistosoma mansoni*. *The American journal of pathology* *142*, 685-689.
- Zhang, W., Ahmad, G., Torben, W., Noor, Z., Le, L., Damian, R.T., Wolf, R.F., White, G.L., Chavez-Suarez, M., Podesta, R.B., *et al.* (2010a). Sm-p80-based DNA vaccine provides baboons with levels of protection against *Schistosoma mansoni* infection comparable to those achieved by the irradiated cercarial vaccine. *The Journal of infectious diseases* *201*, 1105-1112.
- Zhang, W., Ahmad, G., Torben, W., and Siddiqui, A.A. (2010b). Sm-p80-based DNA vaccine made in a human use approved vector VR1020 protects against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mouse. *Parasite Immunol* *32*, 252-258.
- Zhang, W., Meng, J., Ji, Y., Li, X., Kong, H., Wu, X., and Xu, H. (2011). Inhibiting metastasis of breast cancer cells in vitro using gold nanorod-siRNA delivery system. *Nanoscale* *3*, 3923-3932.
- Zhu, X.M., Fang, C., Jia, H., Huang, Y., Cheng, C.H., Ko, C.H., Chen, Z., Wang, J., and Wang, Y.X. (2014). Cellular uptake behaviour, photothermal therapy performance, and cytotoxicity of gold nanorods with various coatings. *Nanoscale* *6*, 11462-11472.