

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de ciências biológicas

Departamento de bioquímica e imunologia

Lucila Grossi Gonçalves Pacífico

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA PROTEÍNA DE 22.6 KDA DO  
*SCHISTOSOMA MANSONI* NA FORMA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE OU  
VACINA DE DNA**



**BELO HORIZONTE  
2007**

Lucila Grossi Gonçalves Pacífico

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA PROTEÍNA DE 22.6 KDA DO  
*SCHISTOSOMA MANSONI* NA FORMA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE OU  
VACINA DE DNA**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora Bioquímica e Imunologia.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira

Belo Horizonte

2007

- 043 Pacifico, Lucila Grossi Gonçalves.  
Avaliação da resposta imune induzida pela proteína de 22.6 kDa do *Schistosoma mansoni* na forma de proteína recombinante ou vacina de DNA [manuscrito] / Lucila Grossi Gonçalves Pacifico. - 2007.  
69 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientação: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Vacinas de DNA. 4. Imunização. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



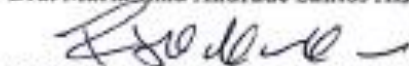
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LUCILA GROSSI GONÇALVES PACÍFICO. Aos oito dias do mês de março de 2007 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação da Resposta Imune Induzida pela Proteína de 22.6 kDa do *Schistosoma mansoni* na Forma de Proteína Recombinante ou Vacina de DNA" 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 a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite do Instituto Butantan, aprovada; Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo da Universidade Federal da Bahia, aprovada; Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira do Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz-MG, aprovada; Dr. Mauro Martins Teixeira da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata 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, 8 de março de 2007.



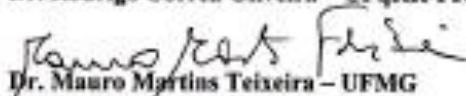
Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite - Instituto Butantan-SP



Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo - UFBA



Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira - CPqRR-FIOCRUZ - MG



Dr. Mauro Martins Teixeira - UFMG



Dr. Sérgio Costa Oliveira - orientador - UFMG



Prof. Andréa Maria Macedo  
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela oportunidade que tão poucos brasileiros têm. Pela oportunidade agradeço também ao meu orientador: Prof. Sérgio Costa Oliveira que acreditou em meu potencial. Pelo seu esforço incansável na busca de recursos para nos propiciar as melhores condições de trabalho possíveis. Foram anos de boa convivência e aprendizado.

À minha família tão querida: meus pais, que sempre me incentivaram muito quanto à importância do estudo, minha mãe, principalmente, que sempre confiou a responsabilidade dos estudos apenas a mim. Meu pai, também muito orgulhoso. Meus irmãos, que pela convivência diária, foram irmãos e sempre orgulhosos do doutorado.

Às Minhas amigas, que com a amizade incondicional, parceria em trabalhos e com passeios ao shopping no horário do almoço, sempre quando o doutorado parecia sufocar, tornaram estes anos muito agradáveis: Cristiana, Kika, Lucimara, Priscilla, Michelle, Vanessa e Luciana. Meus companheiros do laboratório: Schisto people (Julia, Maurício, Rodrigo, Fernanda, Fernandinha, Teresa), *Brucella* people (Nathalia, Gilson, Dani, Thaís, Diogo, Ilana, Cynthia, Cíntia, Léo), Jean e Rubinho. Meu aluno de Iniciação Científica, Fábio Vitarelli, como foi boa a troca de aprendizado! Estou muito feliz em ter convivido com você estes anos. Aos técnicos dos laboratórios, que sempre colaboraram para o bom andamento da tese: Peu, Jamil, Katita, Ilma, Ildinha, Narciso. E a Sandra, claro!!!

Meus colaboradores, que muito mais, foram também meus mestres: Dr. Mauro Martins Teixeira, Dra. Maria Ilma Araújo e Dr. Edgard Carvalho. Aos meus colegas do Departamento: alunos da Prof. Ana Caetano, alunos do Prof. Mauro, do Prof. Carlos Chavez, do Prof. Cristiano, da Prof. Santuza, do Prof. Alfredo, do Prof. Sérgio Penna, da Prof. Glória, da Prof. Andréa Macedo, do Prof. Carlos Renato e do NAGE.

Aos colegas de outros Departamentos: do Laboratório do Prof. Vasco Azevedo (Depto. Genética), ao GIDE, em especial à doutoranda Florence Mara. Ao CPqRR e seus pesquisadores, pela colaboração sempre: Laboratório do Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, especialmente ao Dr. John e Laboratório do Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira.

Por último, agradeço ao meu grande amor e companheiro: “Sinhozinho”, que sempre se orgulhou do meu trabalho como pesquisadora e me deu a coisa mais preciosa da minha vida, minha filha, Maria Antônia.

*“Acreditar que se descobriu um fato científico importante, ansiar anunciá-lo e ainda assim esperar dias, semanas ou até anos; esforçar-se para invalidar as próprias experiências; publicar as descobertas só depois de exaustivas verificações – sim, a tarefa é dura. Mas, quando se consegue a certeza, a recompensa é um dos maiores bálsamos para a alma humana.”*

Louis Pasteur

## Resumo

A esquistossomose é uma doença crônica que atinge aproximadamente 200 milhões de pessoas em 76 países no mundo. Atualmente, a quimioterapia é a estratégia de controle usada, entretanto como controle tem limitações favorecendo o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica. Nesta tese de doutorado, mostramos resultados do estudo da avaliação da resposta imune em camundongos imunizados com Sm22.6 na forma recombinante e de vacina de DNA. Nós isolamos o gene que codifica a Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* da biblioteca de cDNA de fase pulmonar. Uma proteína do verme adulto homóloga foi reconhecida pela IgE de pacientes resistentes a reinfecção que vivem em área endêmica. Neste estudo, a forma recombinante da Sm22.6 e a vacina de DNA foram utilizadas para imunizar camundongos e avaliar a resposta imune gerada. Adicionalmente, avaliamos a habilidade destes dois protocolos de vacinação em induzir imunidade protetora contra *S. mansoni*. A vacina de DNA não induziu qualquer proteção após o desafio de infecção. Entretanto, Sm22.6r mais adjuvante de Freund foi capaz de induzir uma proteção parcial (34,5%) contra o desafio com cercárias de *S. mansoni*. Este protocolo de imunização induziu produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 antígeno-específico em camundongos C57BL/6, uma resposta imune mista do tipo Th1/Th2. Em contraste, o uso de hidróxido de alumínio como adjuvante ou a proteína recombinante na ausência de adjuvante induziu altos níveis de IgG, IgG1 e IgG2a, mas falhou em induzir a proteção conferida pelo adjuvante de Freund. Concluímos que Sm22.6r é um fraco imunógeno e não é recomendado para compor uma vacina anti-esquistossomótica. De forma interessante, Sm22.6r na ausência de adjuvante foi capaz de induzir altos níveis de IL-10 nos camundongos imunizados. Estes dados nos levaram a investigar o papel da Sm22.6 em outras linhas de pesquisa como a da modulação da asma alérgica.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, vacina, imunização, Sm22.6, recombinante, cDNA.

## Abstract

Schistosomiasis is an endemic disease that affects 200 million people in more than 76 countries worldwide. Currently, chemotherapy is the control strategy used, therefore as control it has limitations favoring the anti-schistosomiasis vaccine development. In this doctoral thesis we show results from a study of immune response evaluation in mice vaccinated with Sm22.6 in recombinant form and DNA vaccine. We had isolated the gene encoding the *Schistosoma mansoni* genome 22.6 kDa (Sm22.6) from a lung-stage cDNA library. An homologous adult worm protein was recognized by IgE from individuals resistant to reinfection who live in an endemic area. In this study, the recombinant form of Sm22.6 and the DNA vaccine were used to immunize mice and evaluate the immune response generated. Additionally, we assessed the ability of these two vaccination protocols to induce protective immunity against *S. mansoni*. The DNA vaccine form did not induce any protection after challenge infection. Therefore, rSm22.6 plus Freund's adjuvant was able to induce partial protection (34,5%) against a challenge infection with *S. mansoni* cercariae. This immunization protocol induced the production of antigen specific IFN- $\gamma$  and IL-4 in C57BL/6 mice, hallmark of a mix Th1/Th2 type immune response. In contrast, the use of alum as adjuvant or recombinant protein alone induced high levels of IgG, IgG1 and IgG2a but failed to engender the level of protection induced by Sm22.6 plus Freund's adjuvant. We conclude that Sm22.6r is a weak immunogen and it is not recommended for compose an anti-schistosomiasis vaccine. Interestingly, Sm22.6 alone was able to induce high levels of IL-10 in vaccinated mice. This data lead us to investigate the role of Sm22.6 in other research line such as modulation of allergic asthma

Keywords: *Schistosoma mansoni*, vaccine, immunization, Sm22.6, recombinant , cDNA.



## Lista de Figuras

Figura 1: Mapa da distribuição global da esquistossomos.....	15
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	16
Figura 3: Representação diagramática do tegumento do <i>S. mansoni</i> e a localização proposta de algumas proteínas identificadas.....	29
Figura 4: Vetores de expressão.....	34
Figura 5A: Sequência completa da Sm22.6 do clone SML03775 da biblioteca de cDNA de fase pulmonar.....	40
Figura 5B: Alinhamentos das seqüências de aminoácidos da Sm22.6 com Sh22.6 e Sm22.6 com Sj22.6.....	41
Figura 6: Gel de agarose 1% mostrando o gene da Sm22.6 após amplificação por PCR para inserção das extremidades de restrição.....	42
Figura 7: Gel SDS-PAGE 10%.....	43
Figura 8: Gel SDS-PAGE 10% e Imunobloting.....	44
Figura 9: Imunolocalização da proteína Sm22.6 no verme adulto do <i>S. mansoni</i> .....	44
Figura 10: Nível de anticorpo IgG Sm22.6r específico nos experimentos de imunizações.....	46
Figura 11: Níveis de IgG1 e IgG2a determinados por ELISA após terceira imunização.....	47
Figura 12: Nível de IFN $\gamma$ e IL-4 dos camundongos imunizados com Sm22.6r/CFA ou PBS/CFA....	48
Figura 13: Níveis de IL-10 detectados em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com Sm22.6r na ausência de adjuvante ou na presença de alum.....	49

## Lista de Tabelas

TabelaI: Proteção gerada pela imunizaçõa com Sm22.6r + adjuvante de Freund ou imunização com vacina de DNA .....	45
--	----

## Lista de Abreviações

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês: antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)

Alum – adjuvante hidróxido de alumínio

B7.1 ou CD80 – co-estimulador, ligante de CD28 e CTLA-4, expresso em um subgrupo de células B

B7.2 ou CD86 – co-estimulador, ligante de CD28 e CTLA-4, expresso em monócitos, células B ativadas e células dendríticas.

C1q – primeira proteína da cascata do complemento

C3 – componente do complemento

C3b – Fragmento do C3 que se liga à membrana e opsonina

C8 - componente do complemento envolvido na formação do complexo de ataque de membrana

C9 - componente do complemento envolvido na formação do complexo de ataque de membrana

CD2 – molécula de adesão, expressa em timócitos, células T e NK

CD25 – cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, expresso em células T ativadas, células B e monócitos.

CD3 – Associado ao TCR, expresso em células T

CD4 – co-receptor para MHC de classe II, expresso em células Th1 e Th2, monócitos e macrófagos

CFA – adjuvante completo de Freund (do inglês: complete Freund adjuvant)

CpG – regiões ricas em Citonina e Guanina não metiladas

DNA - desoxiribonucleotídeo

GST – Glutathione-S-transferase

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IgA – imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG1 – Imunoglobulina G1

IgG2a - Imunoglobulina G2a

IgG2b - Imunoglobulina G2b

IgG4 - Imunoglobulina G4

IgM - Imunoglobulina M

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

IL-13 – interleucina 13

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

iNOS – Óxido nítrico sintase indutível

IrV-5 - antígeno número 5 de vacina irradiada

LPS – lipopolissacarídeo (endotoxina)

M28 - serino-protease de 28 kDa

MBL – lectina ligadora de manose (do inglês: manose binding lectin)

MIP-1 $\alpha$  - proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (do inglês: macrophage inflammatory protein 1 alfa)

NK – célula matadoras naturais (do inglês: natural killer cells)

NO – Óxido nítrico (do inglês: nitric oxide)

PAMPS – padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: pathogen associated molecular patterns)

PBMC – células mononucleares do sangue periférico (do inglês: peripheral Blood mononuclear cells)

PGE2 – prostaglandina E2

PRR – receptores de reconhecimento de padrões (do inglês: Patterns recognition receptor)

SCIP-1 – proteína de 94 kDa do *S. mansoni* inibidora do complemento (do inglês: *S. mansoni* complement inhibitory protein 1)

SEA – extrato solúvel de antígenos do ovo do *S. mansoni* (do inglês: Soluble egg antigens)

SWAP - extrato solúvel de antígenos do verme adulto do *S. mansoni* (do inglês: Soluble adult worm antigens)

TCR – Receptor de células T (do inglês: T cell receptor)

Th0 - células T auxiliares do tipo 0 (do inglês: T helper cells type 0)

Th1 – células T auxiliares do tipo 1 (do inglês: T helper cells type 1)

Th2 - células T auxiliares do tipo 2 (do inglês: T helper cells type 2)

TLR – receptores semelhantes ao Toll (do inglês: Toll like receptor)

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

I . INTRODUÇÃO	15
1.1 – A esquistossomose	15
1.2 – O <i>Schistosoma</i>	17
1.3 - Patologia associada à esquistossomose	18
1.4 – Formas clínicas da esquistossomose	19
1.5 – Tratamento	20
1.6 – Resposta Imune na esquistossomose	20
1.7 – Desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica	23
1.8 – Proteínas do tegumento	30
1.9 – A Sm22.6	32
II . OBJETIVOS	33
III . JUSTIFICATIVA	34
IV . METODOLOGIA	35
4.1 – Parasitas e animais	35
4.2 – Clonagem, expressão recombinante e purificação do antígeno Sm22.6	35
4.3 – Gel de poliacrilamida e western blot	37
4.4 – Produção de Sm22.6 em forma recombinante e de vacina de DNA	38
4.5 – Imunolocalização da Sm22.6 no verme adulto do <i>S. mansoni</i>	38
4.6 – Imunização de animais com a Sm22.6 recombinante e vacina de DNA	39
4.7 – Resposta imune dos animais frente à imunização com a Sm22.6r na presença ou ausência de adjuvante de Freund e de hidróxido de alumínio	40
4.8 – Análises estatísticas	41
V . RESULTADOS	42
5.1 – Sequenciamento da Sm22.6	42
5.2 – Clonagem da Sm22.6	44

5.3 – Expressão da Sm22.6r e o seu reconhecimento através de anticorpos específicos	45
5.4 – Imunolocalização da Sm22.6 no verme adulto do <i>S. mansoni</i>	46
5.5 – Imunidade protetora gerada pela vacina Sm22.6 em modelo murino	47
5.6 – Resposta Imune humoral	48
5.7 – Resposta imune celular	50
5.8 - Possível papel imunomodulador da Sm22.6r através da produção de IL-10	50
VI . DISCUSSÃO	52
VII . CONCLUSÕES	58
VIII BIBLIOGRAFIA .	59
IX . PUBLICAÇÕES GERADAS DURANTE O DOUTORADO	69

## INTRODUÇÃO

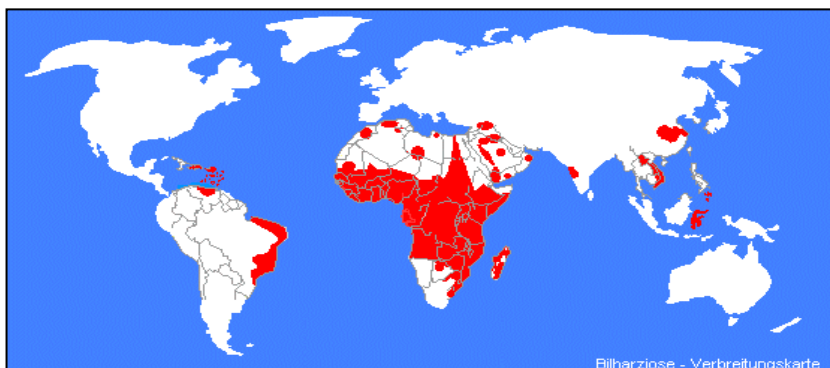
### 1.1. A Esquistossomose

A esquistossomose, também conhecida como “barriga d’água”, é a segunda maior doença de impacto direto sócio-econômico e de saúde pública no mundo, perdendo apenas para a malária ([www.who.int/ctd/schisto](http://www.who.int/ctd/schisto)). Seus efeitos na economia e na saúde são subestimados, pois embora 90% da infecção sejam curadas com o tratamento, as crianças sofrem retardos de crescimento e no desempenho dos estudos. Também a capacidade de trabalho da população rural se torna letárgica e fraca. É uma doença parasitária causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma* que possui um complexo ciclo de vida, envolvendo um hospedeiro intermediário (caramujo) e um hospedeiro definitivo (homem). A esquistossomose é endêmica em 76 países, infectando 200 milhões de pessoas em áreas rurais agrícolas e peri-urbanas (figura 1). A infecção se dá no contato da água contaminada com a pele humana; devido a pesca, a atividades agrícolas, construção de diques ou no simples fato de se banhar. Destas, 20 milhões sofrem conseqüências severas da doença (incluindo o câncer da bexiga ou falência renal, fibrose do fígado e hipertensão portal) e 120 milhões são assintomáticas. Em muitas áreas a esquistossomose infecta grande proporção de crianças abaixo de 14 anos. É estimado que entre 500 e 600 milhões de pessoas correm riscos de se infectar (WHO, 1996). As principais espécies que causam a esquistossomose no homem são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (Rollison & Southgate, 1987). Na região do sub-Sahara, na África, é estimado que 18 milhões sofrem de patologia na parede da bexiga e 10 milhões de hidronefrose (*S. haematobium*). Foi estimado que a infecção por *S. mansoni* causa diarreia em 780 mil pessoas, sangue nas fezes em 4,5 milhões de pessoas e hepatomegalia em 8,5 milhões. Embora estas sejam as estimativas globais da esquistossomose, seu impacto na saúde pública está pouco avaliado e ainda há controvérsias (WHO). As três maiores espécies de schistossomas, *S. mansoni*, *S. haematobium*, e o complexo *S. japonicum* (inclui *S. japonicum* e *S. mekongi*) são diferenciados pelas conchas dos seus vetores, localização na vasculatura do hospedeiro e pela morfologia do ovo. *S. haematobium* é encontrado na África, incluindo as ilhas de Madagascar e Maurício. A esquistossomose intestinal causada pelo *S. mansoni* é encontrada na península arábica, muitos países da África,

Equador, Brasil, algumas ilhas do caribe, Suriname e Venezuela. *S. japonicum* é endêmico na China, onde os bovinos são os maiores reservatórios, na Indonésia e nas Filipinas (com cães e porcos como reservatórios). *S. mekongi* é mais encontrado no Camboja e Laos. No Brasil, a espécie endêmica é o *S.mansoni* e sua ocorrência é na região Nordeste e parte de Minas Gerais com alguns focos no interior do país sendo a prevalência de 5,4% (Coura e Amaral, 2004). Embora existam projetos de controle da doença, o número de pessoas infectadas ou com risco de infecção não tem reduzido (Savioli *e cols.*, 1997). A elevada prevalência da esquistossomose está diretamente ligada ao contato de indivíduos com mananciais de águas naturais contaminadas. A melhoria na qualidade da água e o saneamento básico seriam as estratégias de controle ideais, porém, continuam sendo negligenciadas (WHO, 1993). Dessa forma, as estratégias utilizadas atualmente visam, então, a eliminação do hospedeiro intermediário com o uso de predadores naturais de moluscos e ao tratamento de indivíduos infectados com drogas efetivas contra o parasita (WHO, 1993). Apesar de se ter observado uma diminuição da transmissão, devido às estratégias de controle utilizadas, essas apresentam limitações. As frequentes migrações, associadas a um saneamento básico precário, fazem aparecer novos focos da doença, e mesmo existindo drogas efetivas contra o parasita, as constantes re-infecções e o grande número de indivíduos infectados tornam a quimioterapia em massa uma estratégia de controle ineficiente (Pearce, 1993). Além disso, devido ao uso constante e em grande escala de drogas, existe uma pressão seletiva de cepas resistentes a esses fármacos. Estudos demonstram que assim como surgiram cepas do *S. mansoni* resistentes à oxaminiquine (Coles *e cols.*, 1986, Fallon & Doenhoff, 1994), já são encontradas em indivíduos de vilas do Egito e Senegal cepas resistentes ao tratamento com praziquantel (Ismail *e cols.*, 1999, Fallon *e cols.*, 1995). Portanto, o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica torna-se uma necessidade.



(A)



(B)

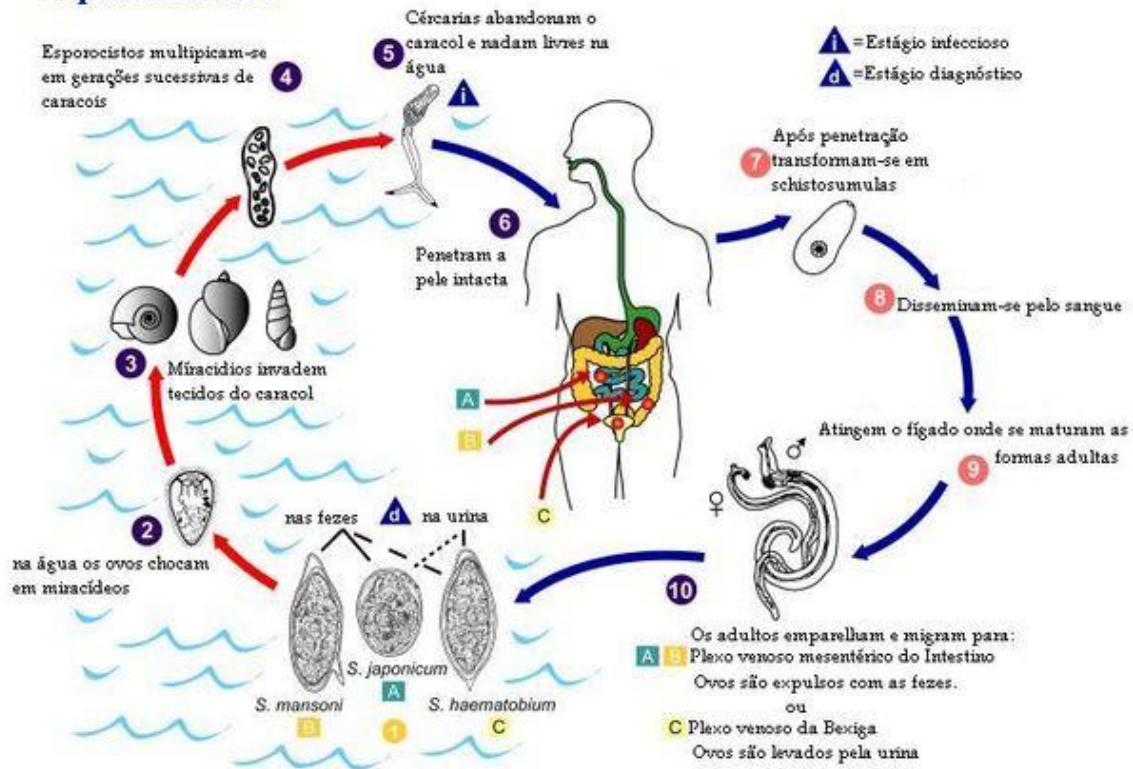


**Figura 1: Mapa da distribuição global da esquistossomose (A). Mapa do Brasil e a esquistossomose (B).**

### 1.2.O *Schistosoma mansoni*

A reprodução assexuada dos parasitos ocorre no caramujo que libera na água grandes quantidades de larvas conhecidas como cercária. As cercárias são atraídas para a pele do homem através da qual elas penetram. Em seguida, perdem a cauda logo após a entrada e se tornam esquistossômulo que migram através dos vasos sanguíneos passam pelos pulmões do hospedeiro e vão até o fígado. Os esquistossômulos amadurecem, se diferenciam em macho e fêmea e migram através da vasculatura portal até as veias mesentéricas, onde depositam seus ovos. Os ovos então saem nas fezes e em contato com a água onde eclodem e liberam o miracídio que nada até encontrar um caramujo. Metade dos os ovos não são eliminados e ficam retidos no tecido causando a patologia. O miracídio penetra no caramujo e se divide originando milhares de cercárias (fig.2).

## Esquistossomose



(www. www.dpd.cdc.gov/dpdx)

Figura 2: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

### 1.3. Patologia associada à esquistossomose

Durante a infecção, dependendo da fase do ciclo de vida do parasita, esse pode gerar diversos efeitos patológicos no hospedeiro, sendo que a cercária, o esquistossômulo, o verme adulto e o ovo exercem papéis diferenciados na geração da patologia. A penetração da cercária pode produzir uma reação alérgica inflamatória denominada dermatite cercarial caracterizada por coceira e eritema. Assim como a cercária, o esquistossômulo pode produzir uma reação alérgica durante a sua migração pelo pulmão do hospedeiro, essa reação alérgica ao parasita é denominada pneumonite larval e se caracteriza por tosse e febre (El-Garem, 1998). Os efeitos patológicos gerados pelo verme adulto que vive no sistema porta do hospedeiro são quase inexistentes; podem-se observar, porém, febre prolongada, sudorese, mialgia e dores de cabeça logo após a ovoposição (El-Garem, 1998). Os ovos do parasita podem ou não ser eliminados com as fezes; os

que não são eliminados depositam-se nos tecidos e secretam substâncias solúveis que induzem a formação do granuloma (Warren *e cols.*, 1967).

A patologia característica desta doença é uma reação granulomatosa que se forma ao redor dos ovos do parasito (Boros, 1999). Na ovoposição, os ovos liberados se mantêm presos à parede do intestino ou fígado. No fígado, a fibrose leva a uma hipertensão portal e esplenomegalia. O processo inflamatório que resulta na formação do granuloma acomete uma grande área do órgão onde esse processo ocorre, causando fibrose dos tecidos e obstrução da veia mesentérica (Boros, 1989; Phillips & Lammie, 1986). A fibrose dos órgãos e a obstrução do plexo venoso podem levar à hipertensão portal, hepatomegalia, esplenomegalia e formação de varizes esôfágicas (Coulson, 1997).

#### 1.4. Formas clínicas da esquistossomose

Do ponto de vista clínico, a esquistossomose tem duas fases evolutivas: aguda e crônica. A fase aguda da esquistossomose é aquela que se segue ao primeiro contato com coleções hídricas contaminadas pelo *S. mansoni*, sendo observadas em indivíduos que não habitam áreas endêmicas ou em trânsito. Esta fase clínica se caracteriza pela apresentação pelo indivíduo infectado de manifestações como febre, anorexia, dor abdominal e cefaléia. Menos frequentes são manifestações de diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca. Os indivíduos infectados podem apresentar hepato-esplenomegalia ao exame físico. O exame parasitológico (Kato-Katz) associado a dados epidemiológicos confirma o diagnóstico da esquistossomose nestes indivíduos (Gryschek, 2001).

Na fase crônica a doença é classificada, de acordo com a patologia envolvida, como: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Tonelli *e cols.*, 1984). A forma clínica intestinal é geralmente assintomática, mas pode ocorrer diarreia. Com o aumento no número de vermes e consequentemente aumento do número de ovos eliminados pelo parasita, parte destes ovos chegam ao fígado do hospedeiro onde induzem uma reação inflamatória granulomatosa que ocasiona o aumento deste órgão caracterizando a forma clínica hepatointestinal, cujos sintomas são: diarreias e apresentação de hepatomegalia ao exame físico. Aproximadamente 5 a 10% dos indivíduos infetados evoluem para uma forma severa da doença, a forma clínica hepatoesplênica.

Esta forma é caracterizada por hipertensão portal, esplenomegalia severa e desenvolvimento de circulação colateral (Gryschek, 2001).

### 1.5. Tratamento

O tratamento contra a esquistossomose é feito com a utilização de três drogas seguras e eficazes (garantidas pela OMS): Praziquantel, Oxaminiquine e Metrifonato. O Praziquantel é efetivo contra todas as formas da esquistossomose com poucos efeitos colaterais. O custo deste medicamento tem diminuído para menos de 0,25 dólares por pessoa. Oxaminiquine é usado na África, África do Sul e Brasil para o tratamento de esquistossomose intestinal. Metrifonato também se mostrou seguro e eficaz para o tratamento da esquistossomose urinária. Mesmo com a utilização destes medicamentos, tem havido notificação crescente falha terapêutica na destruição do parasita, uma forma de resistência. Como resultado, o TDR está a estudar a eficácia e segurança de regimes de tratamento alternativos utilizando doses maiores de praziquantel e a avaliar uma combinação de praziquantel e oxamniquine.

### 1.6. A Resposta Imune na esquistossomose

#### *Resposta Imune Inata*

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) e que são característicos destes microorganismos. O reconhecimento destas moléculas diversas deve-se à presença de receptores na superfície de células como macrófagos e células dendríticas, denominados receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR). O reconhecimento destes padrões moleculares por células da resposta imune inata desencadeia uma cascata de transdução de sinais intracitoplasmáticos que resulta na ativação de vários genes e expressão de citocinas como: IL-12 e TNF- $\alpha$ . 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 & Medzhitov, 2002). Entre os receptores da resposta imune inata que reconhecem moléculas do *S.*

*mansoni* podemos citar a lectina ligadora de manose (MBL - “mannose binding lectin”), C1q, os receptores “scavenger”, a proteína amilóide sérica (SAP) e os receptores “Toll” (TLR2, TKLR3 e TLR4).

MBL é uma proteína sérica da resposta imune inata capaz de se ligar a resíduos de carboidratos presentes tanto na superfície de cercárias de *S. mansoni* como no verme adulto. *In vitro* esta proteína demonstrou-se capaz de se ligar ao tegumento do *Schistosoma* e ativar o complemento pela ligação às serino-proteases MASP-1 e MASP-2 que clivam C3 (Klabunde *et al.*, 2000). C1q se liga diretamente a proteínas de baixo peso molecular do esquistossômulo ativando assim o complemento que promove a morte deste parasita (Santoro *e cols.*, 1980).

Os receptores “scavengers” são glicoproteínas capazes de se ligar a lipoproteínas de baixo peso molecular e ao LPS. No caso da esquistossomose os receptores “scavengers” são capazes de se ligar e remover as lipoproteínas de baixo peso molecular do hospedeiro, incorporadas pelo parasita, possibilitando o reconhecimento do parasita pelo sistema imune (Xu *e cols.*, 1993).

Receptores do tipo “Toll” (TLR) são proteínas transmembrana com domínio extracelular ricos em leucina e intracitoplasmático envolvido na transdução de sinais e transcrição gênica via NFκB (Medzhitov *e cols.*, 1997). Existem diferentes tipos de TLRs que reconhecem diferentes ligantes de diferentes patógenos (Akira & Takeda, 2004). Têm sido demonstrado que entre os diferentes tipos de TLRs, TLR2, TLR3 e TLR 4 são capazes de reconhecer moléculas do *S. mansoni* (Van der Kleij *e cols.*, 2002, Aksoy *e cols.*, 2005, Thomas *e cols.*, 2003). TLR 2, por exemplo, reconhece lisofosfatidilserina de ovos e vermes adulto do *S. mansoni*. A ligação desta molécula ao TLR2 promove a maturação de células dendríticas produtoras de IL-4 e IL-10, células dendríticas com este fenótipo são capazes de promover a diferenciação de células T precursoras em células T reguladoras que induzem uma modulação da resposta imune contra o parasita (Van der Kleij *e cols.*, 2002). TLR3 é capaz de reconhecer RNA de fita dupla derivado do ovo do *S. mansoni*. A sinalização via TLR3, neste caso, leva à produção de citocinas como IL-12p70 e TNF-α (Aksoy *e cols.*, 2005). A produção destas citocinas promove a diferenciação de células T precursoras em células do subtipo Th1 (Abbas *e cols.*, 1996). TLR 4 reconhece o grupamento lacto-*N*-fucopentose III de carboidratos do *S. mansoni*. A ligação de lacto-*N*-fucopentose III a TLR4 de células dendríticas promove a maturação e ativação de células dendríticas do tipo 2 que secretam citocinas envolvidas na diferenciação de células Th2 (Thomas *e cols.*, 2003; Abbas *e cols.*, 1996).

### *Resposta imune adaptativa*

No que diz respeito à resposta imune adaptativa, tanto resposta humoral quanto a resposta celular têm sido relacionadas com proteção na esquistossomose experimental e humana. O papel dos anticorpos na resposta imune contra o *S. mansoni* pode ser regulador ou efetor dependendo do isotipo de anticorpo produzido. Em humanos, IgG1, IgG3 e IgE são isotipos capazes de mediar a destruição de esquistossômulos *in vitro* na presença de eosinófilos, macrófagos e plaquetas por um mecanismo de citotoxicidade mediada por anticorpo-ADCC e fixação de complemento (Khalife *e cols.*, 1986, Capron *e cols.*, 1975, Joseph *e cols.*, 1983), enquanto IgM, IgG2 e IgG4 não são capazes de mediar a destruição do parasita *in vitro* (Khalife *e cols.*, 1986, Butterworth *e cols.*, 1987). *In vivo* tem sido encontrada uma correlação entre a produção de diferentes tipos de anticorpos e susceptibilidade ou resistência à infecção e re-infecção pelo *S. mansoni*. Adultos e crianças exibem diferentes graus de resistência e susceptibilidade à esquistossomose. Crianças são mais susceptíveis à infecção pelo parasita que indivíduos adultos (Butterworth *e cols.*, 1992). A cinética de produção de diferentes isotipos de anticorpos específicos contra o *S. mansoni* também varia de acordo com a idade e pode estar em parte relacionada à susceptibilidade observada em crianças, pois estas produzem contra os antígenos do parasita preferencialmente anticorpos específicos dos isotipos IgM, IgG2 e IgG4 que não são capazes de mediar a destruição do parasita e além disso, competem pela ligação ao antígeno com anticorpos dos isotipos IgE, IgG1 e IgG3 (Butterworth *e cols.*, 1987, 1992). Uma correlação positiva entre os níveis de IgE (Rihet *e cols.*, 1991, Dunne *e cols.*, 1992, Viana *e cols.*, 1995), eosinofilia (Hagan *e cols.*, 1985) e a resistência à re-infecção têm sido observada *in vivo* e sugere que os eosinófilos devem ser capazes de eliminar o parasita por citotoxicidade dependente de IgE.

A resposta de anticorpo contra a esquistossomose humana varia também de acordo com a forma clínica da doença, pacientes agudos produzem altos níveis de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e baixos níveis de anticorpos IgM e IgG4 contra antígenos do esquistossômulo, enquanto que indivíduos crônicos exibem uma baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3 e alta produção de IgG4 em resposta a antígenos do esquistossômulo e do verme adulto (Jassim *e cols.*, 1987).

Em ratos, anticorpos dos isotipos IgG2a e IgG2b são capazes de induzir proteção através de transferência passiva para um recipiente não primado, esta imunidade protetora é inibida por

anticorpos do isotipo IgG2c (Grzych *e cols.*, 1982, 1984, Horta *e cols.*, 1984, Dupre *e cols.*, 1997). A morte do esquistossômulo via anticorpos específicos dos subtipos IgG2a e IgG2b é dependente de células como os eosinófilos e da ativação do complemento (Grzych *e cols.*, 1982, Horta *e cols.*, 1984, Dupre *e cols.*, 1997)

O envolvimento de linfócitos T, na esquistossomose, tem sido reportado tanto no desenvolvimento da patologia como na proteção contra a doença. A expressão diferencial de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares tem sido associada com a proteção ou a progressão da doença, em infecções experimentais com parasitas (Scott *e cols.*, 1989). Na esquistossomose humana, a resposta do tipo Th2 foi descrita, inicialmente, como característica de imunidade protetora contra a re-infecção, observada em pacientes tratados e curados. A maioria dos estudos envolvendo respostas imunes em humanos contra o *Schistosoma* destacam a importância da imunidade humoral baseada na produção da imunoglobulina IgE e tendo eosinófilos como principais células efetoras (Hagan *e cols.*, 1991). Por outro lado, dados utilizando o modelo experimental da esquistossomose sugerem que a imunidade mediada por células, associada com respostas de citocinas do tipo Th1, é essencial para a proteção (Hoffmann *e cols.*, 1998).

Da mesma forma que a resposta imune humoral, a resposta celular em humanos também varia de acordo com a fase e forma clínica da doença. Na fase aguda da doença observa-se uma resposta proliferativa de PBMC a antígenos solúveis de ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) (Gazzinelli *e cols.*, 1987). Indivíduos nesta fase da doença apresentam um perfil de resposta celular do tipo Th1 (Montenegro *e cols.*, 1999) com alta produção de IFN- $\gamma$  por PBMC em resposta a estimulação com SEA e baixos níveis de produção de IL-10 e IL-5 em resposta ao mesmo antígeno (de Jesus *e cols.*, 2002).

Na fase crônica da doença, indivíduos da forma clínica intestinal apresentam uma menor produção de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-10 em resposta à estimulação de PBMC com SEA e SWAP, no entanto, apesar da baixa produção de IFN- $\gamma$ , a neutralização desta citocina resulta em redução nos índices de proliferação. Ao contrário, a neutralização da IL-10 com anticorpos específicos resulta em aumento da resposta proliferativa de PBMC em resposta à estimulação com SEA e SWAP (Correa-Oliveira *e cols.*, 1998). Nestes indivíduos existe um envolvimento tanto de resposta celular do tipo Th1 quanto do tipo Th2 sendo que a IL-4 está envolvida na resposta proliferativa e na formação do granuloma *in vitro* (Correa-Oliveira *e cols.*, 1998).

Na forma clínica hepatoesplênica, o uso de anticorpos anti-IL-10 não reduz o índice de proliferação induzida pelos antígenos do parasita, no entanto a adição da forma recombinante desta citocina é capaz de diminuir ainda mais a resposta proliferativa observada nestes indivíduos. O bloqueio da IL-4, assim como nos indivíduos crônicos intestinais, causa uma redução na resposta proliferativa e na formação do granuloma *in vitro*, além disso, indivíduos hepatoesplênicos produzem baixas quantidades de IFN- $\gamma$  e apresenta em análise de citometria de fluxo redução no percentual de células NK (Martins-Filho *e cols.*, 1997). MIP-1 $\alpha$  parece estar envolvido na formação do granuloma *in vivo*, já que em ensaios realizados *in vitro*, a formação do granuloma ao redor de esferas de latex associadas ao antígeno SEA na presença de PBMC de indivíduos hepatoesplênicos, que produzem altas concentrações de MIP-1 $\alpha$ , é inibida pelo antagonista de quimiocinas CC, MET-RANTES (Falcão *e cols.*, 2002). No entanto, a fibrose hepática resultante da inflamação granulomatosa ao redor do ovo do *S. mansoni* depositado no fígado está associada a uma elevada produção de IL-13 (de Jesus *e cols.*, 2004).

Os indivíduos resistentes à re-infecção pelo *S. mansoni* apresentam um claro padrão de resposta celular do tipo Th2 com elevada produção de IL-5 e níveis não detectáveis de IFN- $\gamma$  (Roberts *e cols.*, 1993). Em indivíduos resistentes à re-infecção observa-se um aumento da resposta proliferativa de PBMC em resposta a estimulação com SEA após o tratamento com oxaminiquine (Caldas *e cols.*, 2000). Nestes indivíduos observa-se também um aumento nos títulos de IgE específicos para antígenos do tegumento de esquistossômulos e uma diminuição nos títulos de IgG4 específicos em relação aos indivíduos susceptíveis (Caldas *e cols.*, 2000). No modelo murino a imunidade protetora têm sido relacionada a uma resposta do tipo Th1 com alta produção de IFN- $\gamma$  (Smythies *e cols.*, 1992, Sher *e cols.*, 1990), enquanto a resistência à re-infecção têm sido relacionada a uma elevada produção de IgE anti-SWAP (Botros *e cols.*, 2000). Estudos com camundongos knockout têm fornecido bastante informação a respeito da resposta imune contra a esquistossomose. Os mecanismos de eliminação do parasita em camundongos envolvem tanto a resposta humoral quanto a resposta celular (Jankovic *e cols.*, 1999). O óxido nítrico produzido por macrófagos exerce um papel importante na eliminação do parasita (James *e cols.*, 1998). IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são importantes citocinas envolvidas na resposta imune protetora (Smythies *e cols.*; 1992, Street *e cols.*, 1999; Fonseca *e cols.*, 2004).



### 1.7. Desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose

As limitações das estratégias utilizadas no controle da esquistossomose deixam clara a necessidade do desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Como o *Schistosoma* não se multiplica dentro do hospedeiro definitivo, o desenvolvimento de uma vacina que confira proteção de pelo menos 60% seria efetivo na diminuição da morbidade e da transmissão da doença (Capron *e cols.*, 1994, Coulson, 1997). Uma vacina anti-esquistossomótica ideal, segundo Bergquist (1995, 1998), deve conter as seguintes características: ser capaz de induzir altos níveis de proteção e/ou reduzir fecundidade e patologia; ser facilmente produzida em larga escala; ser segura para uso em humanos e ser facilmente incorporada a programas de imunização.

O desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a esquistossomose é um desafio devido à complexidade do parasita causador da doença. Das diversas estratégias de vacinação experimental testadas, a que utiliza a cercária irradiada é a que induz maiores níveis de proteção em camundongo, podendo chegar a até 94% de proteção após desafio com cercária não irradiada (Wynn *e cols.*, 1996). A administração de cercária atenuada por irradiação em animais de laboratório conseguiu uma proteção contra a infecção experimental de *S. mansoni* pelo bloqueio da migração do parasita para fora do pulmão. IFN- $\gamma$  e resposta imune celular do tipo 1 aparecem como responsáveis neste processo. Grande atenção deve-se ter quanto ao uso de antígenos do esquistossômulo. Os melhores resultados têm sido obtidos com antígenos que aparecem entre as fases de esquistossômulo e verme adulto, como a miosina de 63kDa, a paramiosina de 97kDa, triose fosfato isomerase (TPI) de 28 kD, a Sm23 uma proteína integral da membrana e as GSTs (glutathione-S-transferase) de 26 e 28 kDa. Na fase clínica de triagem I e II, a GST do *S. haematobium* (Sh28GST) desenvolvida pelo Instituto Pasteur de Lille (França), se mostrou segura e imunogênica em voluntários franceses, nigerianos e senegaleses. Recentemente, Tran *e cols.* (2006) mostraram que a tetraspanina, uma proteína da superfície do *S. mansoni*, promoveu na sua forma recombinante (TSP-2) proteção parcial de até 64% contra infecção experimental. O programa de Desenvolvimento de Vacina contra a Esquistossomose (SVDP), com base no Egito e financiada pela USAID, tem focado em dois antígenos do *S. mansoni*: a paramiosina e uma construção sintética de peptídios contendo epitopos de múltiplos antígenos (MAP) da triose fosfato isomerase (Bachem Company, Los Angeles, USA). Outro candidato à vacina, patenteada pela FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil), é baseada no uso da Sm14, uma

proteína ligadora de ácido graxo de *S. mansoni* de 14 kDa que apresenta uma reação cruzada com *Fasciola hepatica*. Em camundongos, a Sm14 mostrou 67% de proteção contra infecção experimental com *S. mansoni* e proteção total contra metacercária de *F. hepática*. Entretanto, nenhum dos candidatos acima tem conseguido mais que uma redução parcial no desafio infecção em relação ao controle não imunizado. Por isso, é esperado um maior sucesso na utilização de coquetéis de antígenos recombinantes. Outra abordagem para a vacinação contra esquistossomose tem sido a fecundidade da fêmea com o intuito de diminuir a excreção de ovos. O sucesso com esta abordagem tem sido reportado em camundongos e grandes hospedeiros animais, incluindo suínos e búfalos, utilizando a paramiosina e a 26kDa-GST de *S. japonicum*. A vacinação destes hospedeiros deve ser suficiente na redução da transmissão de *S. japonicum* para seres humanos.

#### *O modelo de vacinação com cercária irradiada*

Diferente da larva normal, cuja migração ocorre rapidamente, a larva atenuada apresenta um padrão de migração truncado no hospedeiro definitivo, importante na indução de imunidade protetora contra a infecção pelo *S. mansoni* (Mountford *e cols.*, 1988). A inflamação induzida na pele pela cercária irradiada persiste por pelo menos 14 dias (Hogg *e cols.*, 2003a) e coincide com a sua permanência na pele (Mountford *e cols.*, 1988). O foco inflamatório induzido pela larva atenuada na pele contém macrófagos e células dendríticas, capazes de capturar os antígenos liberados pela larva e ativar a resposta imune adaptativa nos linfonodos drenantes (Hogg *e cols.*, 2003a, Riengrojpitak *e cols.*, 1998). O microambiente de citocinas onde o reconhecimento de antígenos larvais por células apresentadoras ocorre, é rico em citocinas pró-inflamatórias principalmente IL-12 (Hogg *e cols.*, 2003a, b). A apresentação de antígenos na presença de IL-12 favorece o desenvolvimento de células T auxiliares do tipo Th1. No pulmão, a larva exerce um papel importante na infecção primária, recrutando para este órgão leucócitos ativados (Crabtree & Wilson, 1986).

Uma única exposição de camundongos C57BL/6 à cercária atenuada do *S. mansoni* induz níveis de proteção que variam de 60 a 70 % contra a infecção com a larva não atenuada deste parasita, enquanto que múltiplas exposições a cercária atenuada induzem de 73 a 77% de proteção contra uma infecção desafio (Wynn *e cols.*, 1996). A imunidade protetora induzida por uma única exposição a cercária atenuada envolve uma resposta celular dependente de células T CD4+ associadas a um padrão de produção de citocinas do tipo Th1, já que o uso de anticorpos

monoclonais contra IFN- $\gamma$ , reduz drasticamente o nível de proteção alcançada, enquanto que a neutralização de IL-4 e IL-5 não alteram a imunidade protetora (Vignali *e cols.*, 1989, Smythies *e cols.*, 1992, Sher *e cols.*, 1990).

Múltiplas exposições à cercária irradiada causam um aumento nos níveis de proteção induzido pela imunização com uma única exposição, mas, apresentam um diferente mecanismo de imunidade protetora. Camundongos submetidos a múltiplas exposições à cercária atenuada desenvolvem uma resposta do tipo Th2 e produzem altos títulos de anticorpos que podem transferir imunidade a um recipiente não primados (Mangold & Dean., 1986, Caulada-Benedetti *e cols.*, 1991).

Apesar de induzirem deferentes tipos de resposta protetora, tanto a imunização de camundongos com uma única exposição à cercária irradiada, quanto a imunização com múltiplas exposições à cercária irradiada depende dos dois braços da resposta imune (celular e humoral) para desencadear uma ótima imunidade protetora. Camundongos deficientes em células B imunizados uma vez com cercária irradiada apresentam redução no nível de proteção alcançado comparado com camundongos selvagens. O mesmo fenômeno de redução da imunidade protetora também é observada em camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  expostos a múltiplas imunizações com cercária irradiada (Jankovic *e cols.*, 1999). A imunidade protetora induzida pela imunização com cercária atenuada pode ser aumentada pelo uso de IL-12 exógena como adjuvante. Este protocolo de imunização induz um aumento nos níveis de proteção observada após uma ou múltiplas imunizações. O uso de IL-12 como adjuvante resulta no aumento da produção de citocinas associadas a um perfil de resposta Th1 e redução na produção de citocinas associadas a um perfil Th2, como por exemplo, IL-4 e IL-5. Em camundongos expostos a múltiplas imunizações, a co-administração de IL-12 resulta no aumento dos títulos de anticorpos específicos das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b capazes de transferir resistência a um camundongo não primados (Wynn *e cols.*, 1995, 1996).

Em camundongos imunizados com cercária atenuada de *S. mansoni*, o pulmão parece ser o principal sítio de eliminação do parasita. Estudos autoradiográficos mostram que a eliminação do parasita ocorre em algum ponto entre a entrada do parasita no pulmão e seu desenvolvimento em verme adulto (Kassim *e cols.*, 1992). Os mecanismos precisos de eliminação do parasita ainda não são claros. Uma hipótese defende que o evento crucial na eliminação do parasita envolve o bloqueio físico de sua migração através dos capilares pulmonares por um foco inflamatório

efetor. Várias observações têm sido usadas para formular esta hipótese: primeiro, a larva presa no foco inflamatório não mostra nenhuma evidência de dano citotóxico a nível ultra-estrutural (Kassim *e cols.*, 1992); segundo, a maioria dos esquistossômulos recuperados do pulmão de camundongos imunizados 17 dias após a infecção, foi capaz de se diferenciar em verme adulto quando transferidos para o sistema porta hepático de camundongos não primados (Coulson & Wilson, 1988).

Outra hipótese defende a idéia de que os esquistossômulos do pulmão são eliminados por um mecanismo de morte citotóxica. O óxido nítrico (NO) tem sido considerado o principal agente citotóxico na morte dos esquistossômulos no pulmão. Evidências do efeito citotóxico do óxido nítrico foram observadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O óxido nítrico produzido por macrófagos peritonias ativadas foi capaz de induzir morte citotóxica de esquistossômulos recém transformados *in vitro* (James & Glaven, 1989). A administração de L-NMMA ( $N^G$ -metil-L-arginina acetato), um inibidor de óxido nítrico, a camundongos imunizados com cercária atenuada resulta em diminuição da imunidade protetora nesses camundongos (Wynn *e cols.*, 1994). No entanto, a imunização de camundongos deficientes em iNOS (óxido nítrico sintase indutível) com cercária atenuada induz apenas uma redução parcial no nível de proteção em relação aos camundongos selvagens (James *e cols.*, 1998), demonstrando que existe outro mecanismo indutores de proteção.

Apesar dos elevados níveis de proteção obtidos em camundongo, o uso de vacinas irradiadas não se aplicaria em humanos, devido à possibilidade do parasita recuperar a sua capacidade infectante. Dessa forma, esse modelo de imunização é utilizado apenas no estudo dos mecanismos imunológicos responsáveis pela indução da imunidade protetora.

Vários estudos utilizando antígenos do *S. mansoni* levaram a identificação de antígenos promissores para serem utilizados no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a esquistossomose (Bergquist, 1995). Através da análise dos antígenos identificados e dos resultados obtidos em protocolos de vacinação, a Organização Mundial de Saúde (OMS) selecionou seis antígenos do *S. mansoni* como potenciais candidatos ao desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica (Bergquist, 1995). Mas com o desenvolvimento da genômica e da proteômica, vários novos antígenos têm sido descobertos, muitos deles ainda não haviam sido sequer descritos, surgindo dezenas de novos possíveis candidatos a compor a vacina contra a esquistossomose. Melhor ainda, com a descoberta de novos antígenos, novas linhas de pesquisa

têm surgido relacionadas à esquistossomose. Em nosso laboratório e em colaboração com outros grupos de pesquisa, alguns destes antígenos estão sendo testados como vacina: Sm14 (Fonseca *e cols.*, 2004), paramiosina (Fonseca *e cols.*, 2005), Sm22.6 (Pacífico *e cols.*, 2006), Sm29 (Cardoso *e cols.*, 2006), Sm22.4 (em andamento) e ainda peptídios sintéticos (em andamento).

#### *Estratégias de vacinação*

Dentre as estratégias utilizadas na imunização de camundongos com antígenos do *Schistosoma*, podemos destacar:

- 1) A imunização com proteínas purificadas ou recombinantes, que podem ser produzidas em larga escala, porém necessitam serem purificadas.
- 2) A imunização com construções que codificam antígenos do *S. mansoni* – as vacinas de DNA.
- 3) A imunização com peptídeos sintéticos contendo epitopos imunodominantes de proteínas do parasita.

A purificação de uma proteína nativa do parasita demanda um longo para a sua obtenção, é bastante laboriosa e geralmente resulta na obtenção de baixa quantidade de proteína purificada. As proteínas recombinantes são facilmente produzidas em grandes quantidades, mas, necessitam serem purificadas e, dependendo do sistema utilizado para produzi-las, alguns epitopos conformacionais podem ser perdidos (Dalton *e cols.*, 2003). Entre os diferentes antígenos do *S. mansoni*, Sm28, IrV-5, paramiosina, Sm14, Sm22.6, TSP-2 e a Sm29 já foram produzidos na forma de proteínas recombinantes e testados em protocolos de imunização em camundongos (Balloul *e cols.*, 1987; Soisson *e cols.*, 1992; Pearce *e cols.*, 1988; Fonseca *e cols.*, 2004, 2005; Pacífico *e cols.*, 2006; Tran *e cols.*, 2006; Cardoso *e cols.*, submetido). Todos estes antígenos foram capazes de induzir proteção parcial contra a esquistossomose, a vacinação com a Sm28r e Sm29r foram capaz tanto de diminuir a carga parasitária quanto o número de ovos viáveis (Balloul *e cols.*, 1987; Xu *e cols.*, 1991, Cardoso *e cols.*, submetido).

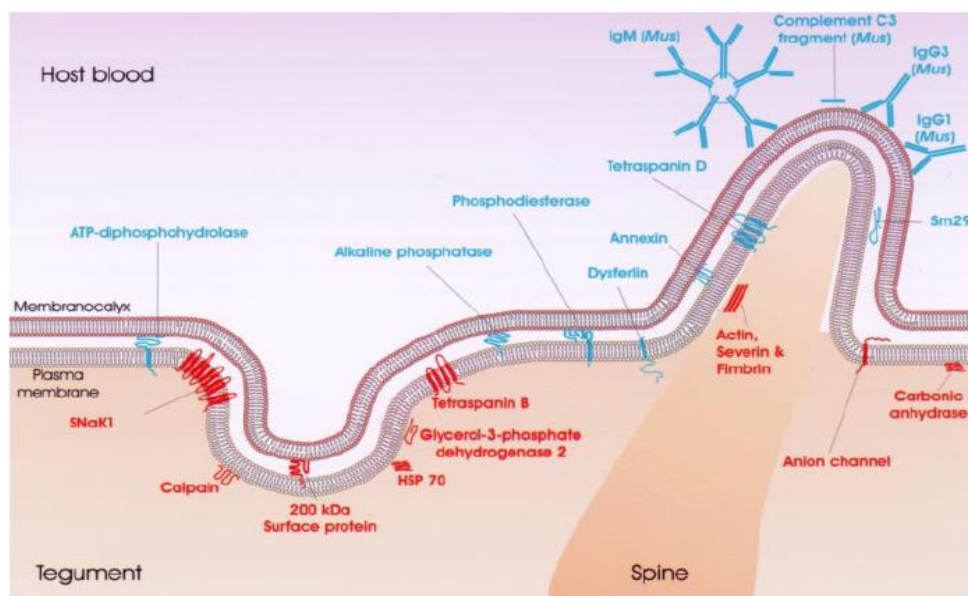
A vacinação com DNA apresenta algumas vantagens frente à vacinação com a proteína recombinante: a produção em larga escala de DNA é mais fácil e mais barata; o DNA é estável à temperatura ambiente facilitando o transporte e armazenamento; e, ainda, o DNA possui atividade adjuvante capaz de amplificar a resposta imune, pois os motivos CpG do DNA se ligam ao TLR9 (receptor do tipo Toll-9), em macrófagos e células dendríticas, ativando a resposta imune inata (Oliveira *e cols.*, 1999; Ishii *e cols.*, 2002). A imunização de camundongos com o

DNA que codifica a GST do *Schistosoma mansoni* foi capaz de aumentar os títulos de IgG2a e IgG2b, anticorpos capazes de induzir citotoxicidade dependente de anticorpo (Dupre *e cols.*, 1997), o uso de IL-18 neste protocolo de imunização não aumenta os títulos de anticorpos, porém aumenta a produção de IFN- $\gamma$ , citocina importante na resposta imune contra o esquistossômulo pulmonar (Dupre *e cols.*, 2001). Outro antígeno testado em protocolos de vacinação com DNA, a Sm23 do *S. mansoni*, foi capaz de induzir níveis de proteção, semelhantes ao observado em protocolos de vacinação utilizando a forma recombinante desta proteína, o que valida a utilização da imunização gênica contra a infecção pelo *S. mansoni* (Da'dara *et al.*, 2001).

### 1.8. Proteínas do tegumento

O tegumento é uma camada sincicial citoplasmática que recobre toda a superfície corporal de Schistosomes adultos, sendo a maior interface entre o parasita e o hospedeiro. Como o parasita sobrevive por décadas, 30-40 anos, nos vasos sanguíneos do hospedeiro, eles são claramente capazes de evadir do sistema imune e essa habilidade é dependente de mecanismos que operam no tegumento como resultado da maturação do parasita e mudanças nesta estrutura (Harris *e cols.*, 1984). O tegumento é formado pelo membranocálice e membrana plasmática e em estudos *in vivo* tem mostrado um lento “turn over”, uma meia-vida de 5 dias, justificando o papel protetor do membranocálice em relação à membrana plasmática formando uma barreira física (Saunders *e cols.*, 1986). Um dos melhores mecanismos imunoevasivos utilizados pelo *Schistosoma* é a aquisição de moléculas do hospedeiro pelo seu tegumento para mascarar seu status de “estranho”. Essa é a chave para o sucesso da sobrevivência do *Schistosoma* no hospedeiro. As moléculas do hospedeiro são adsorvidas na superfície do tegumento, no membranocálice e incluem imunoglobulinas, produtos do MHC, componentes do complemento, DAF, e glicolipídios. Receptores Fc e a fração C3 do complemento têm sido identificados no tegumento do *S. mansoni*. Por essa razão, o tegumento é muito visado como alvo susceptível a drogas e vacinas. As proteínas provenientes do *S. mansoni* associadas ao seu tegumento podem ser solúveis, como a GST (Balloul *e cols.*, 1987), a TPI (Harn *e cols.*, 1992), a GAPDH (Goudot-Crozal *e cols.*, 1989), a Sm22.6 (Jeffs *e cols.*, 1991), a PGK (Lee *e cols.*, 1995) ou podem ser integrais da membrana, como Sm32, Sm25, Sm23 (Reynolds, Shoemaker e Harn, 1992), Sm29 (Cardoso *e cols.*, 2006b) e tetraspanina (Loukas *e cols.*, 2006) dentre outras. As proteínas que são secretadas ou ancoradas

na superfície do *Schistosoma* são expostas ao hospedeiro e por essa razão são potenciais candidatas ao desenvolvimento de novas vacinas. É demonstrado que membranas de tegumento isoladas são capazes de estimular a imunidade protetora em camundongos (Smithers *e cols.*, 1990). Adicionalmente, os antígenos associados à membrana do tegumento não apresentam reação cruzada com os antígenos do ovo, que estão envolvidos na imunopatologia (Simpson, 1990). A Sm29, proteína integral de membrana, aparece como uma forte candidata a compor uma vacina. Cardoso *e cols.* (2006a) mostrou que IgG1 e IgG3 anti-Sm29 foi o isotipo predominante identificado nos soros de pacientes moradores de área endêmica naturalmente resistentes a infecção e resistentes à reinfecção. Em modelo murino, imunização com a Sm29r conferiu uma proteção parcial de 56,7% contra a infecção experimental e ainda uma diminuição na ovoposição de 60% (Cardoso *e cols.*, submetido). A tetraspanina, também uma proteína integral de membrana abundante no tegumento, apresenta níveis de proteção elevado em modelo murino e correlaciona com imunidade protetora em pessoas que moram em área endêmica. (Loukas *e cols.*, 2006). Nos últimos dois anos o estudo do proteoma do tegumento do *S. mansoni* tem sido realizado e vem revelando que estas proteínas do tegumento são grandes promessas a compor uma vacina recombinante contra a esquistossomose. (Braschi *e cols.*, 2006).



**Figura 3: Representação diagramática do tegumento do *S. mansoni* e a localização proposta de algumas proteínas identificadas (Braschi e cols., 2006).**

### 1.9. A Sm22.6

A Sm22.6 é uma proteína solúvel de 22.6 kDa que está localizada no tegumento, mas não ancorada na membrana, de vermes adultos e em outros estágios da vida do parasita no hospedeiro humano, exceto o ovo (Jefferies *et al.*, 1991). A Sm22.6 foi clonada e sequenciada pela primeira vez por Stein *et al.* em 1986. Dunne *et al.* (1992) mostraram que a IgE do soro de pacientes esquistossomóticos moradores de área endêmica resistentes a reinfeção reconhecem a proteína Sm22.6. Além disso, a resposta de IgE específica é maior em soro de pacientes após o tratamento do que antes do tratamento (Webster *et al.*, 1998). Uma correlação negativa entre a resposta de IgE à Sm22.6 e a intensidade de reinfeção pós-tratamento indica que o antígeno também induz uma resposta protetora contra *S. mansoni* ou pode agir como marcador para indivíduos resistentes (Webster *et al.*, 1996) já que a IgE tem um importante papel na imunidade contra a esquistossomose humana. O cDNA codificante da Sm22.6 utilizado nesta tese foi isolado da biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar de *S. mansoni* pertencente à Dra. Elida Rabelo denominado clone SML03775 (Franco *et al.*, 1997). Realizamos o sequenciamento completo do cDNA e então procedemos novo depósito no Gen Bank (número de acesso DQ059818). Este clone apresentou uma similaridade de 100% com a Sm22.6 presente no verme adulto. Proteínas homólogas ao antígeno Sm22.6 foram encontrados em outras duas espécies do *Schistosoma*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, com identidade de 79,9% e 88%, respectivamente. Li *et al.* (2000), mostraram que a proteína recombinante do *S. japonicum*, Sj22.6, não induziu proteção em camundongos e búfalos contra a infecção por cercárias. A diferença da sequência de aminoácidos entre a Sm22.6 e Sj22.6 é de aproximadamente 20%. Nessas regiões podem estar localizados os epitopos envolvidos na indução de proteção, quando a Sm22.6r é utilizada como vacina. A Sm22.6 possui três domínios conservados que são semelhantes entre os outros membros da família de antígenos de tegumento de 20-23 kDa (Fitzsimmons *et al.* 2004). Estes domínios, presentes na Sm22.6, são dois EF-hand e um dineína de cadeia leve. A identidade destes domínios entre Sm22.6, Sh22.6 e Sj22.6 é extremamente elevada, maior que 90% podendo chegar até a 100%, mostrando ser bem conservada (Fitzsimmons *et al.* 2004). Lin *et al.* (2006) mostraram pela primeira vez um papel fisiológico para esta proteína, pois a Sm22.6 em ensaio *in vitro*, interagiu com a trombina humana inibindo a atividade proteolítica da protease. Sugerindo fortemente que a Sm22.6 tem um papel na regulação da coagulação em humanos.



## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o nível de proteção proporcionado pelas imunizações com a vacina recombinante e de cDNA do antígeno de 22.6 kDa do *Schistosoma mansoni*.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Subclonar a Sm22.6 em vetor de expressão de célula de mamífero (pCI) para produzir a vacina de cDNA e em vetor de procarionto (pMAL) para produzir a Sm22.6 recombinante
2. Avaliar a resposta específica do isotipo IgG de camundongos imunizados com as vacinas recombinante e de cDNA e dos subtipos IgG1 e IgG2a dos camundongos imunizados com a vacina recombinante.
3. Caracterizar o perfil de citocinas induzidas pela imunização com a vacina recombinante.
4. Realizar imunolocalização da proteína Sm22.6 em vermes adultos utilizando a microscopia confocal

### III. JUSTIFICATIVA

A quimioterapia como estratégia utilizada no controle da esquistossomose mostra uma significativa limitação, deixando clara a necessidade do desenvolvimento de uma vacina. Das diversas estratégias de vacinação experimental testadas, a que induz maiores níveis de proteção em camundongos é a imunização com cercária irradiada (Wynn *e cols.*, 1996), ainda assim ela não se aplica a humanos, devido à dificuldade de aceitação e de produção de vacina em larga escala e possíveis reações adversas. Neste trabalho utilizaremos duas outras estratégias: imunização com cDNA e imunização com proteína recombinante. Vários trabalhos mostram que tanto a vacina utilizando cDNA quanto a vacina utilizando proteína recombinante induz uma resposta imune protetora parcial, mas até o momento nenhuma vacina apresentou uma proteção eficiente. A Sm22.6 é uma proteína de tegumento de 22.6 kDa, encontrada em todas as fases do ciclo de vida do *S. mansoni*, exceto ovo, e ela é reconhecida pela IgE de pacientes moradores de área endêmica resistentes a reinfecção. Adicionalmente, a descoberta do cDNA que codifica para o antígeno Sm22.6 na biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar do *S. mansoni*, trouxe novas perspectivas na utilização dessa proteína em estudos de imunização visando a proteção contra esquistossomose em modelo experimental.

## IV. METODOLOGIA

### 4.1 Parasitas e Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas, de 6-8 semanas de vida, foram obtidos do CEBIO da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos em biotério. As cercárias de *S. mansoni* (cepa LE) são mantidas rotineiramente em caramujos *Biomphalaria glabrata* no GIDE-UFMG e preparadas pela exposição à luz por 1 hora para induzir sua liberação. O número de cercárias bem como sua viabilidade foram determinados utilizando lupa, antes da infecção.

### 4.2 Clonagem, expressão recombinante e purificação do antígeno Sm22.6.

#### *Clonagem*

A análise da seqüência do clone SML03775 (número de acesso DQ059818) contendo o gene completo da Sm22.6 da biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar (Franco e cols., 1997) cedido pela Dra. Elida Rabelo (UFMG) foi realizada usando o kit “DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)” e o seqüenciador MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, São Paulo, Brazil). As identidades encontradas foram analisadas utilizando o programa BLAST (Altschul e cols., 1997). A seqüência de aminoácidos do antígeno da Sm22.6 de verme adulto ou fase pulmonar de *S. mansoni* e de verme adulto de *S. japonicum* foram alinhadas utilizando o programa de computador disponível [www.searchlauncher.bcm.tmc.edu](http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu). O gene de esquistossômulo de fase pulmonar da Sm22.6 foi amplificado por PCR e subclonado nos vetores de expressão de mamífero pCI (Promega Co., Madison, WI) (fig.4A) e de expressão bacteriano pMAL-c2 (New England Biolabs, Beverly, MA) (fig.4B). Os iniciadores continham um sítio de restrição artificial em cada ponta e foram construídos com base na seqüência de nucleotídeo da Sm22.6. As seqüências de iniciadores eram: (senso) 5'-CCGGAATTCATGGCAACCG AGACGAAA-3' (*EcoRI*) e (antisenso) 5'-TGCTCTAGATTATTGAGATGGTG TTCTC-3' (*XbaI*). A PCR foi realizada em um volume de 50 µl contendo 10 ng de molde de DNA, 10 pmoles de cada iniciador, 100 mM (cada) de trifosfato deoxiribonucleosídeo, tampão PCR 1X e 2.5 U de AmpliTaq polimerase. A amplificação da PCR foi conduzida em um termociclador usando as seguintes condições:

denaturação a 95<sup>o</sup> C por 3 minutos, anelamento a 55<sup>o</sup> C por 45 segundos e extensão a 72<sup>o</sup> C por 1 minuto (30 ciclos). Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit de extração de gel Quiaex II (Qiagen, Valencia, CA) e digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *XbaI* (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Após digestão, os produtos da PCR foram purificados novamente pelo mesmo processo e ligados aos vetores pCI ou pMAL-c2 previamente digeridos. Ambas construções foram usadas para transformar *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , e dessa maneira alguns clones foram selecionados. Os DNAs plasmidiais foram extraídos utilizando o kit de mini prep Wizard (Promega Co., Madison, WI). As construções pCI-Sm22.6 e pMAL-Sm22.6 foram digeridas com as endonucleases e o DNA seqüenciado para confirmação da presença do inserto e correta orientação do gene da Sm22.6.

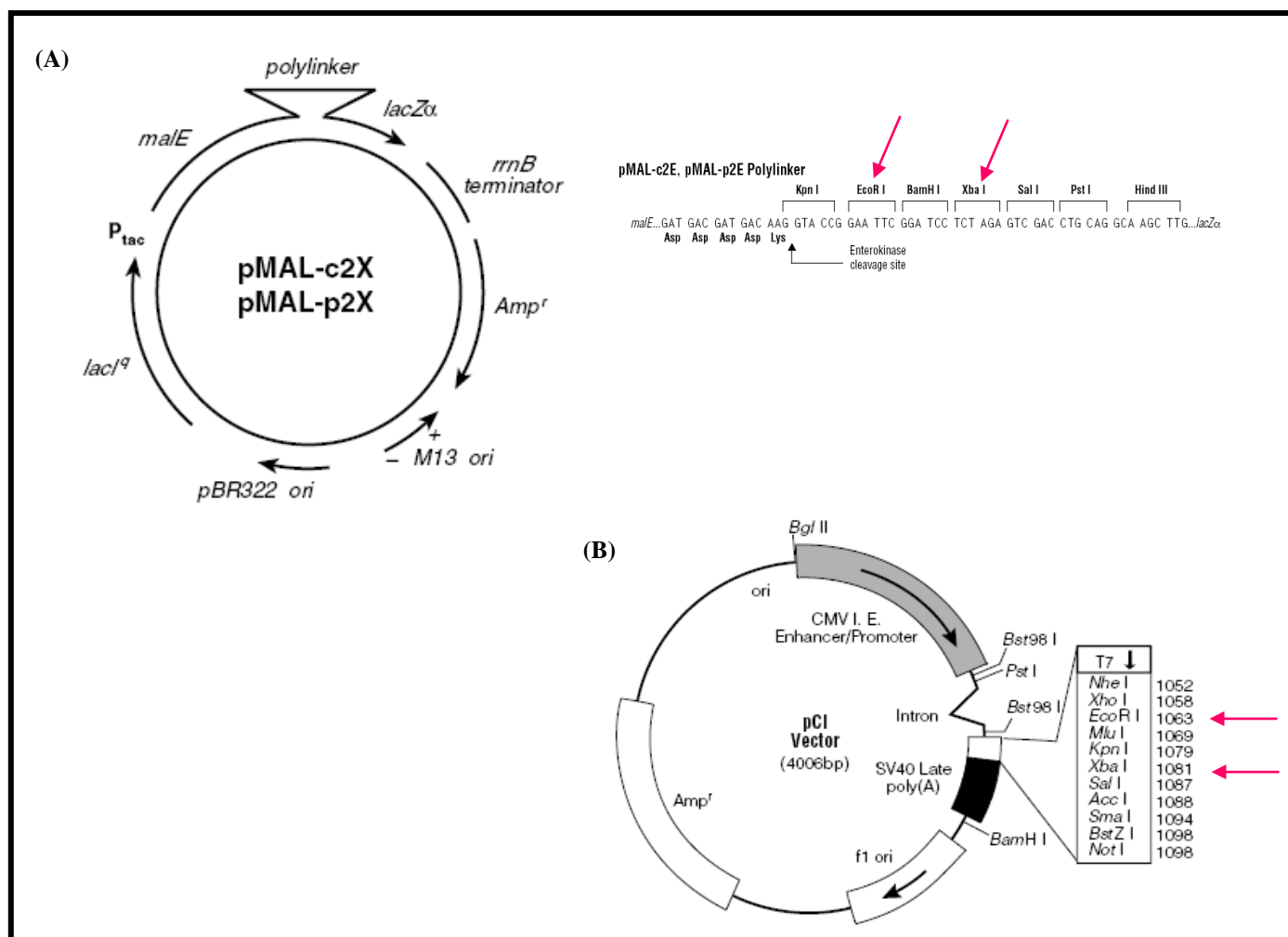


Figura 4: Vetores de expressão, de procaríoto pMAL-c2 (A) e de mamífero pCI (B). Ambos vetores foram digeridos no sítio múltiplo de clonagem utilizando as enzimas *EcoRI* e *XbaI* apontadas em rosa.

### *Expressão recombinante do antígeno Sm22.6*

A Sm22.6 recombinante foi obtida através da expressão em *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) utilizando o vetor de expressão pMAL-c2 (New England Biolabs, Beverly, MA). A Sm22.6r foi produzida como previamente descrita pelo nosso grupo (Brito e cols., 2000). A expressão da proteína de fusão composta pela Sm22.6 e pela ligadora de maltose (MBP) foi induzida por 0.6mM de IPTG (isopropyl-B-D-galactopyranoside). Após 3 horas de indução a 37°C com agitação (200 rpm), as bactérias foram centrifugadas a 4000 x g por 20 minutos. O precipitado de células foi ressuscitado em 100 ml de tampão salina fosfato (PBS, pH 8.4) contendo 25mg de lizosima e congelados e descongelados três vezes. Logo em seguida, o lisado foi submetido a três ciclos de 30 s cada de sonicação para liberar a proteína desejada. Assim, a proteína obtida no sobrenadante após centrifugação foi purificada através de cromatografia de afinidade usando resina de amilose. Para os estudos imunológicos, a proteína de fusão foi clivada com fator Xa (New England Biolabs) overnight e a Sm22.6r foi purificada pela religação a MBP à resina de amilose como previamente descrita (Brito e cols., 2000). A Sm22.6 purificada continha 0.1 ng de LPS por  $\mu$ g de proteína, conforme medida pelo kit de análise QCL-1000 Limulus amoebocyte lysate (BioWhittaker, Walkersville, MD).

### 4.3. Gel de poliacrilamida e Western blot

A proteína de fusão MBP-Sm22.6, Sm22.6 clivada da MBP e a proteína Sm22.6r foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 10 % por eletroforese (Laemmli, 1970). Do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) por Western blot como previamente descrito (Towbin e cols., 1979). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com 10 % de leite em pó a 4 °C overnight, e posteriormente reagidas com soro coelho anti-MBP (1:10.000) ou soro de camundongos imunizados com Sm22.6r (1:50) durante 1h à temperatura ambiente. Após a reação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBST (0.5 M NaCl-0.02M Tris [pH 7.5], 0.05 % Tween 20) e incubadas por 1h a temperatura ambiente com IgG anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:6.000) (Promega) ou IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:8.000) (Sigma) em TBST. Após três lavagens com TBST, a reação foi desenvolvida com

incubação a temperatura ambiente com NBT (nitroblue tetrazolium chloride) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate).

#### 4.4.Obtenção da vacina de DNA

A construção pCI-Sm22.6 foi amplificada em *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  e o DNA foi purificado utilizando o kit EndoFree Plasmid Giga kit (Qiagen, Valencia, CA). O DNA foi ressuspenso em solução fisiológica estéril apirogênica na concentração final de 1mg/ml para as imunizações. A preparação de plasmídeo continha menos que 0.05 unidades de endotoxina (EU) por 100  $\mu$ g de DNA, conforme medido pelo kit QCL-1000 Limulus amoebocyte lysate analysis kit (BioWhittaker, Walkersville, MD).

#### 4.5 Imunolocalização da Sm22.6 no verme adulto do *Schistosoma mansoni*.

Cortes histológicos de verme adulto (fêmea) e parasitas fixados diretamente em lâminas (esquistossômulo) foram submetidos a ensaios de imunolocalização utilizando soro policlonal de animais vacinados com a Sm22.6 recombinante. Utilizamos conjugados anti-mouse marcados com fluoróforos e também anticorpos para marcação do citoesqueleto (actina) e visualização da estrutura geral do parasita. Soro de animais naive foram utilizados como controle negativo. Cortes foram deparafinados com Xilol, e submetidos a PGN (gelatina 0,25%, azida sódio 0,1% e saponina 0,1% em PBS) por 1 h, lavado quatro vezes com PBS e incubado por 1h soro anti-Sm22.6 diluído em PGN. As amostras foram então lavadas quatro vezes e incubadas 1h com IgG anti-camundongo marcado com FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído 1:50 em PGN com 10  $\mu$ M DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) para visualizar núcleo e 0.1  $\mu$ g/ml faloidina-rhodamine (Sigma) para corar os a actina. Em seguida, foram lavados três vezes em PBS 0.1 M Tris-HCl (pH 8.8) em tampão glicerol com 0.1% *p*-phenylenediamine como agente antibleaching para vermes de *S. mansoni* e visualizados no sistema Confocal da Bio-Rad 1024UV usando microscópio Zeiss Axiovert 100 microscope em imersão em água 1.2 NA 40 $\times$  objetiva de plano Apocromatico com contraste. Imagens capturadas com LaserSharp 1024 version 3.2T (Bio-Rad) e processada com NIH-Image-J.

#### 4.6. Imunização de animais com a Sm22.6 recombinante e vacina de DNA

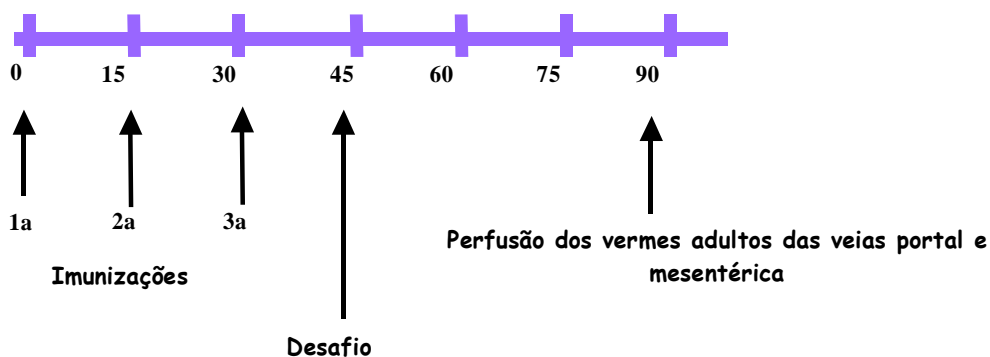
##### *Protocolos de Imunização*

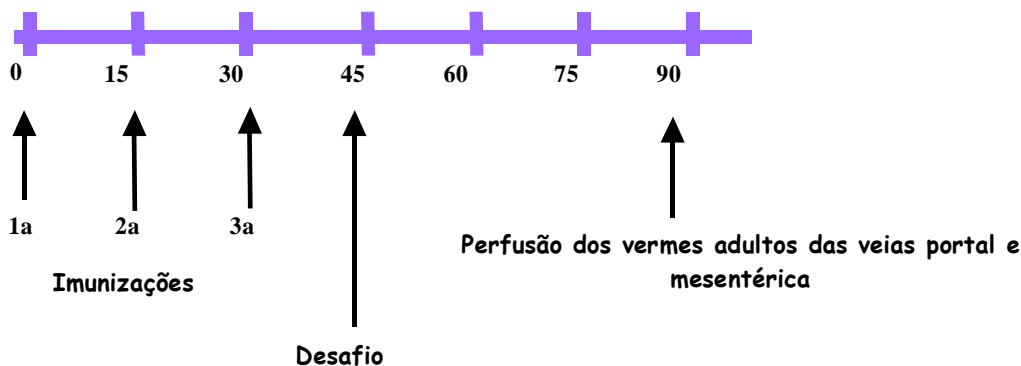
Camundongos C57BL/6 fêmeas de 6-8 semanas foram divididas em quatro grupos de dez animais cada. Para a vacina de DNA, os camundongos foram previamente injetados com 10 mM de cardiotoxina (Sigma, St. Louis, MO) cinco dias antes da vacinação. Nos dias 0, 15, 30 e 45 as construções pCI ou pCI-Sm22.6 foram administradas intramuscularmente. Cada quadríceps recebeu injeção de 50 µl de DNA na concentração de 1 µg/µl em soro fisiológico, de maneira que cada animal recebeu um total de 100 µg de DNA plasmidial. Para a vacinação com proteína recombinante, os camundongos foram imunizados subcutaneamente (s.c.) no pescoço com 25 µg de rSm22.6 nos dias 0, 15 e 30. A proteína recombinante foi utilizada nas imunizações em três diferentes e independentes protocolos: 1) Adjuvante de Freund (CFA-Adjuvante de Freund completo na primeira imunização e incompleto nas imunizações de reforço), 2) Hidróxido de alumínio, e 3) Sm22.6 na ausência de adjuvante. Os grupos controles foram imunizados com adjuvante de Freund em PBS, Hidróxido de alumínio em PBS e PBS, respectivamente, utilizando o mesmo protocolo.

##### *Desafio com cercárias e recuperação dos vermes adultos*

Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram submetidos ao desafio percutâneo através da exposição da pele do abdômen por 1 hora em água contendo 30 cercárias (cepa LE). Quarenta e cinco dias após o desafio, os vermes adultos foram perfundidos pelas veias portais (Fonseca *et al.*, 2004). Três experimentos independentes foram realizados para determinar os níveis de proteção. A proteção foi calculada comparando o número de vermes recuperados de cada grupo imunizado com seus respectivos controles, utilizando a fórmula abaixo:

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





4.7. Resposta imune dos animais frente à imunização com a Sm22.6r na presença ou ausência de adjuvante de Freund e de hidróxido de alumínio.

#### *Resposta Imune humoral*

Antecedendo a cada imunização, o sangue dos dez animais de cada grupo foi coletado através do plexo orbital e o soro obtido por centrifugação. A medida de anticorpos anti-Sm22.6 específicos foi obtida utilizando ELISA indireto. Placas Maxisorp de 96 poços (Nunc, Denmark) foram cobertas com 5 µg/ml de Sm22.6r em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 por 12-16 horas a 4°C, então bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente com 200 µl/poço de PBST (tampão salina fosfato, pH 7.2 com 0.05% Tween-20) com 10% FBS (Soro fetal bovino). Cem microlitros de cada soro diluído 1:100 em PBST foram adicionados por poço e incubados por uma hora a temperatura ambiente. Anticorpos ligados à placa foram detectados através de IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (Promega) diluído em PBST 1:5.000 para DNA ou proteína recombinante, e IgG1 (Sigma) e IgG2a (Sigma) diluídos em PBST 1:2.000 e 1:1.500, respectivamente para animais imunizados com proteína recombinante. A reação de coloração foi desenvolvida pela adição de 100 µl/well e 200 pmoles de OPD (o-phenylenediamine, Sigma) em tampão citrato-fosfato, pH 5.0 com 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos e parada com 50 µl de ácido sulfúrico 5% por poço. As placas foram lidas a 492 nm em leitor de ELISA (BioRad, Hercules, CA).



### *Resposta Imune Celular*

Esplenócitos foram isolados de baços macerados, individualmente, de camundongos uma semana após a terceira imunização dos grupos experimentais (Sm22.6r sem adjuvante e seu controle PBS, Sm22.6r mais adjuvante de Freund e seu controle PBS mais adjuvante de Freund, Sm22.6r mais hidróxido de alumínio e seu controle PBS mais hidróxido de alumínio) e lavados duas vezes com PBS estéril. Depois de lavadas, as células foram ajustadas para  $1 \times 10^6$  células/poço para ensaio de IL-4 e IFN- $\gamma$  ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com Soro Fetal bovino 10%, 100 U/mL de penicilina G sódica, 100  $\mu$ g/mL de sulfato de estreptomicina e 250 ng/mL anfotericina B. Os esplenócitos foram mantidos em cultura com meio ou estimulados com Sm22.6r (25  $\mu$ g/mL) ou concanavalina A (ConA) a 5  $\mu$ g/mL ou LPS de *E. coli* (2.5 ng/ml). LPS purificado de *E. coli* (Sigma) foi utilizado nas culturas de esplenócitos como controle na mesma concentração de endotoxina medida na Sm22.6r. As placas de 96 poços (Nunc) foram mantidas em incubação a 37°C com CO<sub>2</sub> 5%. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 24 h de estimulação com ConA, e 48h (IL-4) ou 72 h (IFN- $\gamma$ ) de estímulo com Sm22.6r para análise das citocinas. Os ensaios de medida de IL-4 e IFN- $\gamma$  foram realizados utilizando o kit Duoset ELISA kit (R&D Diagnostic) de acordo com o manual do fabricante. Para análise de IL-10, os sobrenadantes foram coletados após 72 hs de estímulo e a medida desta citocina foi realizada utilizando o kit de ELISA BD OptEIA (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA) também de acordo com o manual do fabricante.

### 4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *t* de student através do programa de computadores MINITAB (Minitab Inc., State College, PA) ou do GraphPad Prism4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Sequenciamento da sm22.6

O clone SML03775 da biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar foi ressequenciado no sequenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham). A sequência completa da proteína foi depositada no BLAST, número de acesso DQ059818, sendo que este clone apresentou uma homologia de 100% com a Sm22.6 do verme adulto do *S. mansoni*. Em análise de bioinformática realizada no SOSUI, sugeriu que a Sm22.6 é solúvel e não transmembrana (dado não mostrado). A Sm22.6 era composta por 573pb codificantes de 191 aminoácidos (códon inicial: ATG, códon final: TAA) (Fig. 5A). Comparamos esta nova sequência com sequências da Sj22.6 e Sh22.6 depositadas no BLAST e obtivemos uma identidade de 88% e 79,9% (Fig. 5B).

```

1 ATGGCAACCGAGACGAAATTAAGTCAAATGGAAGAGTTTATTAGGGCATTTTTAGAAATAGATGCAGATAGTAATGAA
1 M A T E T K L S Q M E E F I R A F L E I D A D S N E
ATGATTGATAACAAGAATTAATTAATATTGTCAAAAATACCGTTTGGATATGAAATTGATCGATCCATGGATAGCA
M I D K Q E L I K Y C Q K Y R L D M K L I D P W I A
AGGTTTGATACGGATAAAGATAATAAAATCAGTATAGAAGAGTTCTGTCTGGATTTGGTTTAAAAGTATCAGAAATT
R F D T D K D N K I S I E E F C R G F G L K V S E I
GGATTTGGTTTAAAAGTATCAGAAATTCGACGTGAAAAAGATGAATTAATAAAAAGAAAGAGATGGCAAATTCCTAAG
G F G L K V S E I R R E K D E L K K E R D G K F P K
CTTCCACCGAATATTGAAATTATTGCAGCAACCATGTCCAAAACAAAACAATATGAAATATGTTGTCAATTTAAAGAG
L P P N I E I I A A T M S K T K Q Y E I C C Q F K E
TATGTTGATAATACTAGTCGAACAGGTAATGACATGAGAGAGGTAGCAAATAAAATGAAATCATTATTGGATAACACA
Y V D N T S R T G N D M R E V A N K M K S L L D N T
TATGGTCGTGTATGGCAAGTAGTTCTACTAACTGGTTCATATTGGATGAATTTTTCACATGAACCATTTTTATCAATA
Y G R V W Q V V L L T G S Y W M N F S H E P F L S I
CAATTTAAGTATAATAATTATGTCTGTTTAGCATGGAGAACACCATCTCAATA 573
Q F K Y N N Y V C L A W R T P S Q * 191

```

Figura 5A: Sequência completa da Sm22.6 do clone SML03775 da biblioteca de cDNA de fase pulmonar. Inicia-se no códon ATG (1) e finaliza-se no stop códon TAA (191)

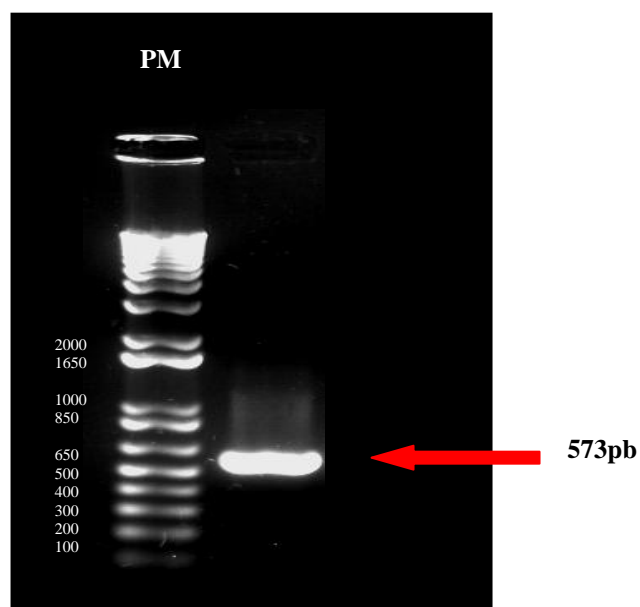
Sh22.6:	1	MST-ETRLSSME <b>EFIRAFLEMDADNNEMIDKQELIKYCQKN</b> RLDMRLIDPW <b>IA</b> RFD <b>TDKDNKI</b>	63
.....		M+T-ET+LS MEEFIRAFLE+DAD+NEMIDKQELIKYCQK RLD <b>M</b> +LIDPW <b>IA</b> RFD <b>TDKDNKI</b>	
Sm22.6:	1	MAT-ETKLSQME <b>EFIRAFLEIDADS</b> NEMIDKQELIKYCQ <b>KY</b> RLDMKLIDPW <b>IA</b> RFD <b>TDKDNKI</b>	63
		MAT E +LS ME+FIRAF+EID D+NE+IDKQEL KYCQ+ ++DMK IDPW <b>IA</b> RFD <b>TDKD</b> K+	
Sj22.6:	1	MATTEYRLSLME <b>QFIRAFIEIDKDNNELIDKQELTKYCQON</b> QMDMKQIDPW <b>IA</b> RFD <b>TDKD</b> GKV	63
Sh22.6:	64	<b>SIEEF</b> CRGFGLKVSEIRREKEELKKEKRGKVS <b>KLFFKVEIIAATMSKTKQYDICYQFKEY</b>	123
		SIEEF <b>CRGFGLKVSEIRREK+ELKKE+DGK</b> KLPPN+EIIAATMSKTKQY+IC QFKEY	
Sm22.6:	64	<b>SIEEF</b> CRGFGLKVSEIRREKDELKKERDGKFPKLPPNIEIIAATMSKTKQYE <b>IC</b> CFKEY	123
		S+EEF <b>CRGFGLKV E+RREK+ELK++++GK</b> LP +I+IIAATMSK KQY ICC+FKE	
Sj22.6:	64	<b>SLEEF</b> CRGFGLKVWEVRRREKEELKRDKEGKVSTLPLDIQIIAATMSKAKQYN <b>IC</b> CKFKEL	123
Sh22.6:	124	IDNSSRTNKDIKEVANKMK <b>TLLDNTYGRVWQVVILTGSYWMNFSHEPFLSIQFKYNNYVC</b>	183
		+DN+SRT D++EVANKMK+LLDNTYGRVWQVV+LTGSYWMNFSHEPFLSIQFKYNNYVC	
Sm22.6:	124	VDNTSRTGNDMRE <b>VANKMKSLLDNTYGRVWQVVLLTGSYWMNFSHEPFLSIQFKYNNYVC</b>	183
		+D TSRTG+++R VAN +K+ LD+ YGRVWQV++LTGSYWMNFSHEPFLS+QFKY+NYVC	
Sj22.6:	124	LDKTSRTGDEVRAVANDLKAFLDSEYGRVWQV <b>II</b> LTGSYWMNFSHEPFLSMQFKYSNYVC	183
Sh22.6:	184	<u>LAWRTPSQ</u> 191	
		LAWRTPSQ	
Sm22.6:	184	<u>LAWRTPS</u> 190	
		L WRTPS	
Sj22.6:	184	<u>LLWRTPS</u> 190	

**Figura 5B:** Alinhamentos das seqüências de aminoácidos da Sm22.6 com Sh22.6 e Sm22.6 com Sj22.6. Os aminoácidos repetidos entre as seqüências marcam as similaridade entre eles. O domínio EF-hand (Pfam database) está indicado em negrito (13-41 e 48-75) e domínios de homologia de dineína cadeia leve estão sublinhados (134-190).

## 5.2 Clonagem da Sm22.6

A Sm22.6 foi clonada em dois vetores de expressão. Em vetor de procarioto para obtenção da proteína recombinante (pMAL-C2) e em vetor de célula de mamífero para a vacina de DNA (pCI). Os iniciadores utilizados continham a sequência da Sm22.6 e a sequência de restrição para a clonagem. O PCR foi realizado e o peso molecular de aproximadamente 573 pb confirmou ser a Sm22.6

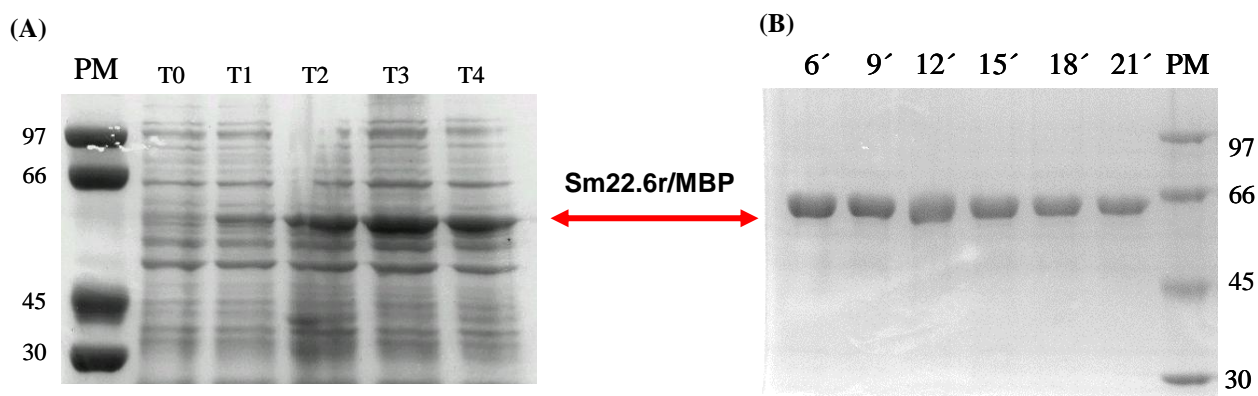
(Fig. 6). Os vetores foram digeridos e a clonagem realizada. Para confirmar a inserção da Sm22.6 nos vetores, realizamos a digestão da construção com as enzimas utilizadas na clonagem e obtivemos duas bandas distintas no gel, representando a banda correspondente ao vetor e a outra banda correspondente ao inserto Sm22.6 (não mostrado).



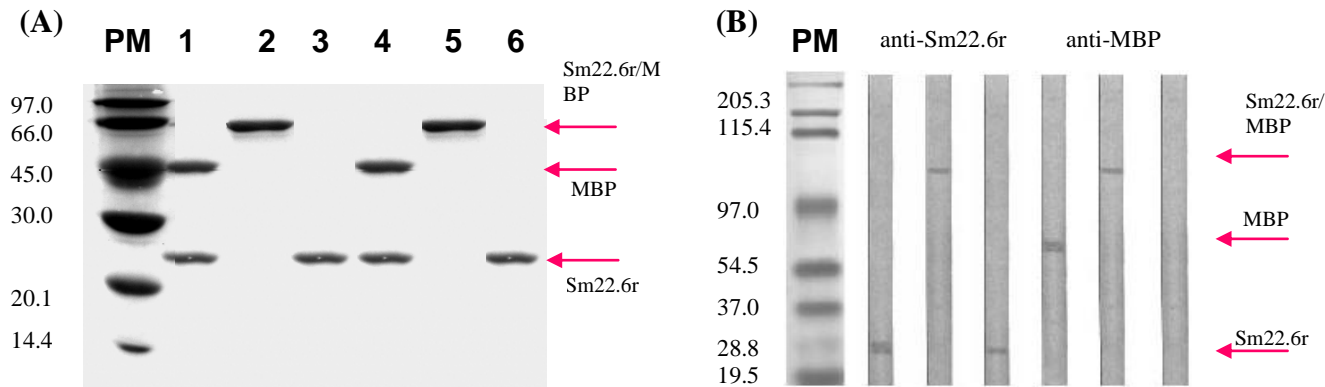
**Figura 6:** Gel de agarose 1% mostrando o gene da Sm22.6 após amplificação por PCR para inserção das extremidades de restrição. Na primeira canaleta está o padrão de peso molecular de 1Kb. Na segunda canaleta, a seta vermelha aponta, a banda que representa o gene da Sm22.6 correspondente a 573 pb.

### 5.3. Expressão e reconhecimento de anticorpo específico contra Sm22.6 r

A expressão da proteína Sm22.6r foi realizada em *E. coli* em fusão com a MBP. Foi realizada uma cinética de indução da expressão com coletas de hora em hora durante 4 horas. Observamos que o melhor tempo de indução foi de 3 horas (Fig. 7A). Em seguida, a Sm22.6 recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de resina de amilose (Fig. 7B) como previamente demonstrada (Brito e cols., 2000) e a quantidade de proteína obtida foi de aproximadamente 30mg. Para ensaios imunológicos a Sm22.6r/MBP foi clivada com fator Xa, purificada em coluna de resina de amilose e então Sm22.6r-MBP, MBP-Sm22.6r clivada, e Sm22.6r purificada da MBP foram analisadas através de gel SDS-PAGE (Fig. 8A) e imunoblotting utilizando soro de coelho para MBP ou soro de camundongos imunizados com Sm22.6r. A massa molecular observada da proteína recombinante estava de acordo com a massa molecular estimada da fusão com MBP, 64 kDa (22 kDa da rSm22.6 e 42 kDa da MBP). As análises de imunoblotting, confirmaram a identidade da MBP-Sm22.6r e Sm22.6r purificadas, através do reconhecimento do anticorpo anti-MBP e anti-Sm22.6r (Fig. 8B).



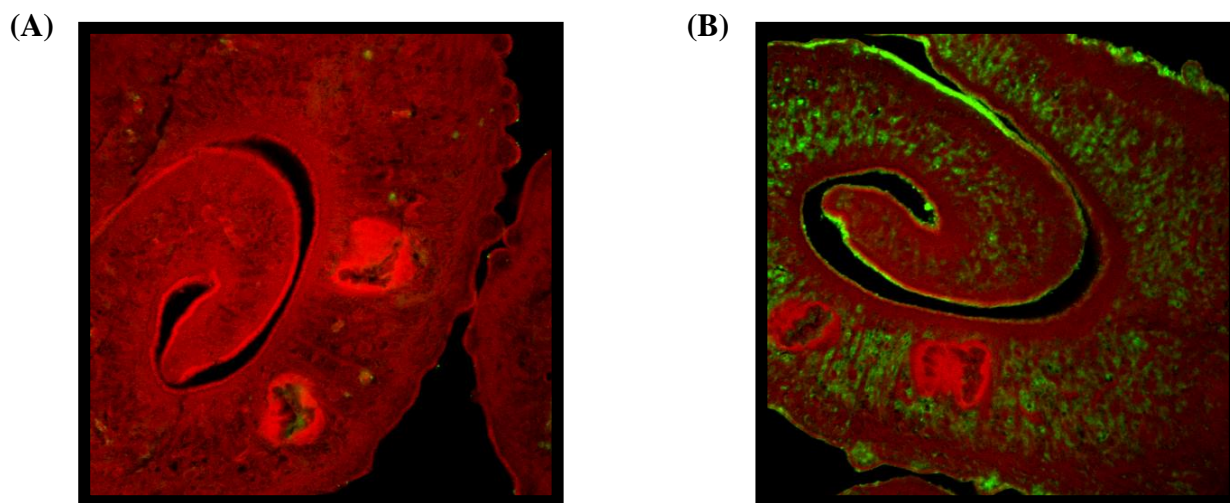
**Figura 7: Gel SDS-PAGE 10%. Em A, está mostrado a cinética da expressão da Sm22.6r/MBP nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h de indução. Em B, o gel corresponde à cinética da purificação da Sm22.6r/MBP, nas canaletas estão os tempos de coletas em minutos. A seta vermelha aponta as bandas de 64kDa correspondentes à Sm22.6r/MBP.**



**Figura 8:** Em (A) Gel SDS-PAGE 10% da proteína fusionada Sm22.6r-MBP e sua clivagem. Nas canaletas 1 e 4 as bandas correspondem a Sm22.6r e MBP clivadas. Nas canaletas 2 e 5, estão bandas correspondentes à Sm22.6r fusionada a MBP e por fim nas canaletas 3 e 6 Sm22.6r somente. Em (B), imunoblotting espelho do gel SDS-PAGE 10%. As canaletas 1 a 3 foram incubadas com soro de coelho anti-MBP e as canaletas 4 a 6 incubadas com soro de camundongo anti Sm22.6.

#### 5.4. Imunolocalização da Sm22.6 no verme adulto do *Schistosoma mansoni*

As imagens da imunolocalização da Sm22.6 no verme adulto do *S. mansoni* foram obtidas após ensaio com anticorpo anti-Sm22.6r de camundongos imunizados com a Sm22.6r. (Fig. 9).



**Figura 9:** Imunolocalização da proteína Sm22.6 no verme adulto do *S. mansoni*. Em A está mostrado o verme adulto incubado com soro de camundongos imunizados com MBP + CFA (controle negativo). Em B, verme adulto incubado com soro de camundongo imunizado com Sm22.6r + CFA.

### 5.5. Imunidade protetora gerada pela vacina Sm22.6 em modelo murino

#### *A redução no número de vermes totais*

Para medir o nível de proteção induzido pelas imunizações com Sm22.6r na presença ou ausência dos adjuvants ou pela vacina de DNA (pCI-Sm22.6), camundongos foram desafiados e o nível de proteção determinado pela diferença no número de vermes recuperados no grupo experimental comparado a cada grupo controle após 45 dias do desafio. Apenas os animais imunizados com Sm22.6r e adjuvante de Freund apresentaram uma proteção parcial de 34,5% contra a infecção, como média de três experimentos independentes quando comparados ao seu grupo controle (PBS + CFA/IFA). Em contraste, as imunizações com Sm22.6r na ausência de adjuvante ou na presença de hidróxido de alumínio e a vacina de DNA pCI-Sm22.6 não induziram imunidade protetora nos animais vacinados (Tabela I).

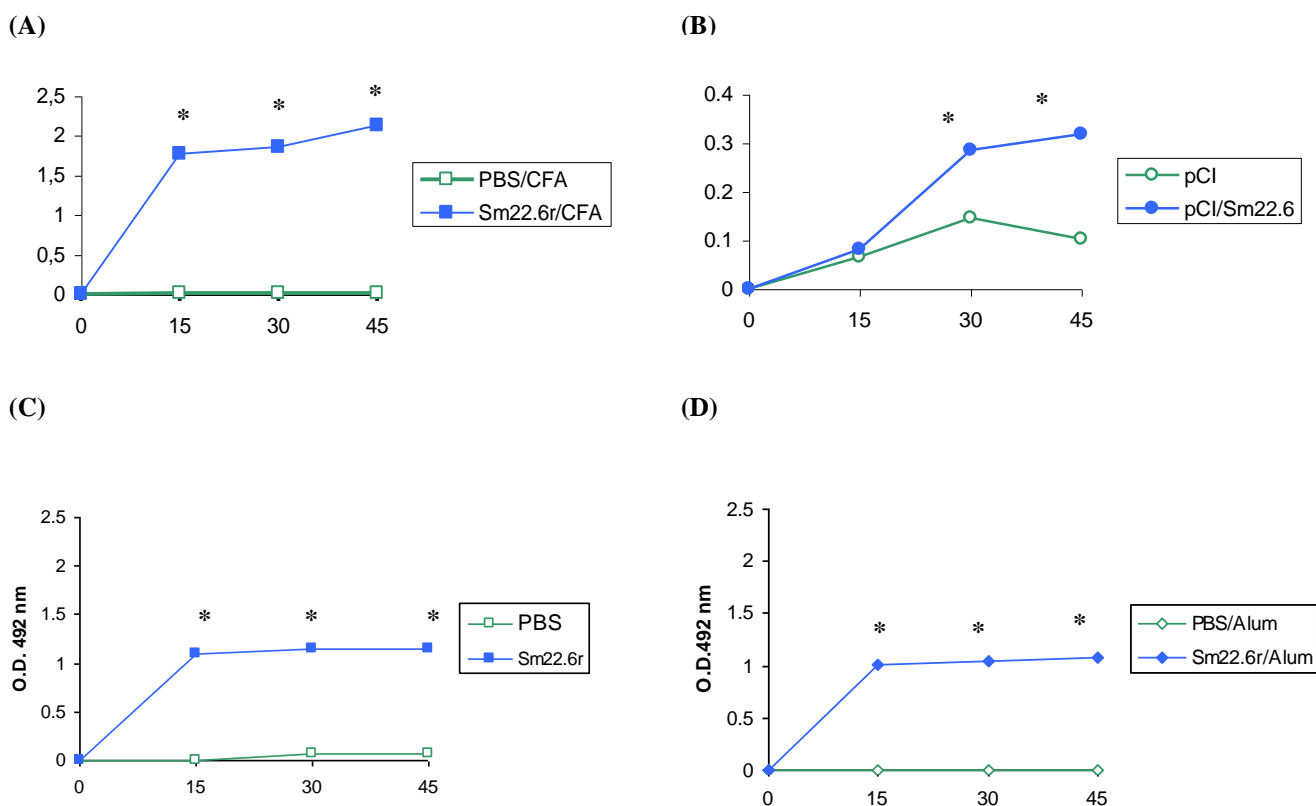
**Tabela I: Proteção gerada pela imunização com Sm22.6r + adjuvante de Freund ou imunização com vacina de DNA. Foram realizados três experimentos independentes e o resultado de 34,5% de proteção parcial encontrado foi obtido pela média entre os três experimentos independentes**

Tratamento	Número de vermes recuperados	Nível de proteção %
2º Experimento		
pCI	14.3 ± 4.2	
pCI-Sm22.6	17.4 ± 4.2	—
PBS + CFA/IFA	20.0 ± 3.6	
rSm22.6 + CFA/IFA	13.6 ± 3.9	32 <sup>a</sup>
3º Experimento		
pCI	9.5 ± 2.7	
pCI-Sm22.6	10.1 ± 2.9	—
PBS + CFA/IFA	18.8 ± 4.4	
rSm22.6 + CFA/IFA	12.2 ± 4.1	35.1 <sup>a</sup>

## 5.6. Resposta Imune humoral

### *Análise da resposta de IgG após imunizações com Sm22.6r e a vacina de DNA*

A Sm22.6 recombinante foi expressa em *E. coli* e purificada utilizando cromatografia por afinidade. Para os estudos imunológicos, a Sm22.6r foi clivada e separada da MBP para ser utilizada como antígeno como descrito por Brito e cols. (2000). Para investigar a presença de anticorpos IgG anti-Sm22.6, soro de dez animais de cada grupo vacinado foram testados através de ELISA. Os animais vacinados com DNA tiveram uma elevação no nível de anticorpos específicos somente após a segunda imunização (no 30° dia). Os grupos imunizados com proteína recombinante na ausência de adjuvante ou na presença de Freund ou hidróxido de alumínio mostraram elevados títulos de IgG após 15 dias da primeira imunização comparados com seus controles. A presença dos adjuvantes não alteram os níveis de IgG específicos quando comparados ao grupo vacinado com a Sm22.6r sozinha (Fig.10).

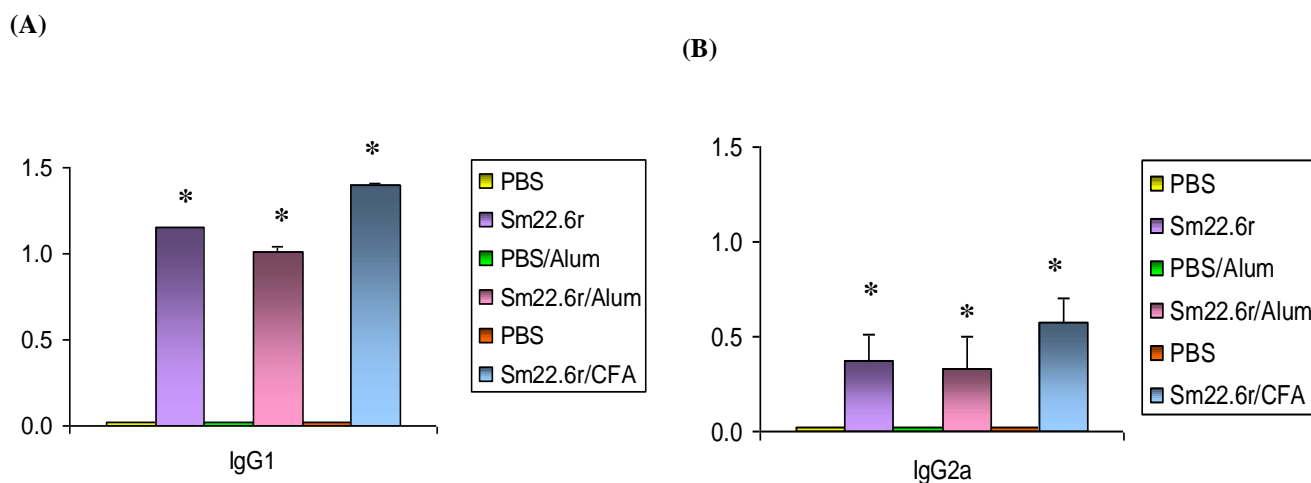


**Figura 10:** Nível de anticorpo IgG Sm22.6r específico nos experimentos de imunizações. No eixo “y” está mostrado o valor da absorvância a 492nm, no eixo “x” o tempo de coleta do soro em dias. Em (A) Sm22.6r + Freund, (B) Sm22.6-pCI, (C) Sm22.6r na ausência de adjuvante e (D) Sm22.6r + Alum.



*Produção de IgG1/IgG2a após vacinação com a Sm22.6r*

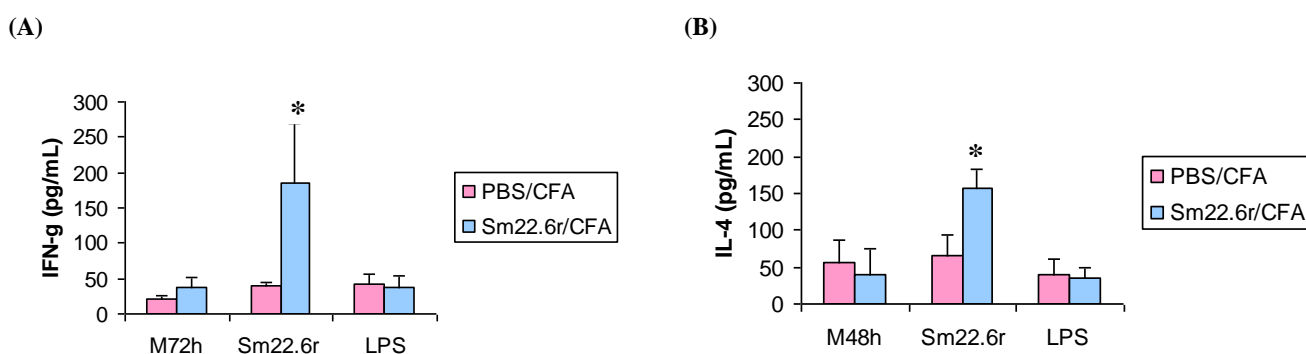
Como apenas o grupo imunizado com a Sm22.6r na presença de adjuvante de Freund conferiu proteção parcial contra a infecção experimental, decidimos analisar a resposta imune induzida apenas nos grupos imunizados com proteína recombinante. Para determinar o tipo de resposta imune induzida após imunização, o nível dos isotipos IgG1 e IgG2a foi medido através de ELISA. Os camundongos imunizados com Sm22.6r na ausência de adjuvante ou na presença de Freund ou hidróxido de alumínio apresentaram elevados títulos de IgG1 e IgG2a quando comparados ao seu respectivo grupo controle (Fig. 11). Adicionalmente, esses títulos ainda eram mais elevados em IgG1 comparados a IgG2a. O perfil IgG1/IgG2a observado neste estudo seguido da imunização com Sm22.6r é um indicativo de uma resposta imune mista Th1/Th2.



**Figura 11: Níveis de IgG1 e IgG2a determinados por ELISA após terceira imunização. No eixo “y” estão os valores obtidos medidos em absorbância de 492nm. Em (A) está representado IgG1. Em (B) está representado níveis de IgG2a. Todas as vacinações com a Sm22.6r na ausência ou presença de adjuvante induziram níveis significativos de IgG1 e IgG2a quando comparados com seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ).**

### 5.7. Resposta Imune celular

Para tentar correlacionar o efeito da proteção parcial causada pela imunização da proteína Sm22.6r associada ao adjuvante de Freund, o perfil de citocinas induzido nos animais vacinados foi avaliado. Para o grupo que apresentou proteção parcial contra a infecção experimental medimos os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-4 no sobrenadante de cultura de esplenócitos dos animais imunizados. Níveis estatisticamente significativos de IFN- $\gamma$  e IL-4 foram detectados nos camundongos imunizados com Sm22.6r associado ao adjuvante de Freund quando comparados com seu grupo controle e, como controle, esplenócitos de camundongos imunizados produziram  $1042 \pm 6$  pg/ml de IFN- $\gamma$  e  $516 \pm 75$  pg/ml de IL-4 após a estimulação com ConA (dado não mostrado). Adicionalmente, o estímulo com LPS na mesma quantidade de endotoxina encontrada na Sm22.6r não induziu qualquer produção significativa de IFN- $\gamma$  ou IL-4 (Fig. 12). Esses resultados indicam que a vacinação com a Sm22.6r induz uma resposta imune por células T de camundongos do tipo mista Th1/Th2 caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  e IL-4.

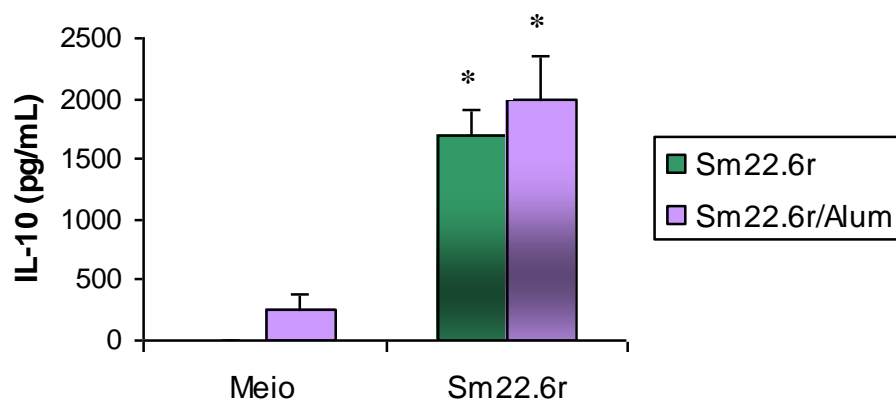


**Figura 12: Nível de IFN $\gamma$  e IL-4 dos camundongos imunizados com Sm22.6r/CFA ou PBS/CFA. Os esplenócitos foram isolados uma semana após a terceira imunização, e analisados quanto a quantidade de IFN- $\gamma$  (A) e IL-4 (B) produzidos em resposta à estimulação com Sm22.6r (25 ug/mL) e LPS.**

### 5.8. Possível papel imunomodulador da Sm22.6r através da produção de IL-10

A produção de IL-10 foi medida no grupo imunizado com a Sm22.6r na ausência de adjuvante e na presença de hidróxido de alumínio. IL-10 é uma citocina reguladora e anti-inflamatória com grande importância na modulação da resposta imune. Os níveis de IL-10

induzidos nos animais vacinados com a Sm22.6r ou Sm22.6r/alum foram significativamente mais elevados quando comparado ao controle (Fig. 13).



**Figura 13:** Níveis de IL-10 detectados em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com Sm22.6r na ausência de adjuvante ou na presença de alum. As células foram estimuladas com Sm22.6r. Como controle positivo, utilizamos LPS, cujo valores já foram descontados.

## VI. DISCUSSÃO

Esta tese faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas cujo objetivo principal é o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a esquistossomose. Com o surgimento da “Era Genômica”, mais precisamente com o desenvolvimento do Projeto Genoma do *S. mansoni*, novos antígenos surgiram, aumentando o número de proteínas candidatas a compor esta vacina. A UFMG, através da Rede Genoma do Estado de Minas Gerais, vem desenvolvendo projetos genomas dentre os quais um destes projetos é o transcriptoma do *Schistosoma mansoni*. Através de estudos genômicos, dentro dessa Rede, nós identificamos uma proteína da biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar que se mostrou 100%, 88% e 79,9% similar à Sm22.6, Sh22.6 e Sj22.6, respectivamente. As proteínas antigênicas associadas ao tegumento do *Schistosoma* compreendidas entre 20-23 kDa estão relacionadas à presença de um motivo conservado denominado “EF-hand” e outro conhecido como Dineína de cadeia pesada (Dynein Light Chain - DLC). O domínio “EF-hand” presente nestes antígenos está localizado na sua porção N-terminal, e entre Sm22.6, Sh22.6 e Sj22.6 é extremamente conservado chegando a até 100% de similaridade (Fitzsimmons *et cols.*, 2004). Este domínio EF-hand está associado à ligação a cálcio e também é similar ao epitopo linear de reconhecimento pela IgE em alérgenos como Gadcl e Cyn d 7, um alérgeno do pólen (Elsayed & Apold, 1983, Suphioglu *et cols.*, 1997). Quanto ao motivo DLC, seu mecanismo de ação é ainda desconhecido, sendo consideradas importantes em eventos do citoesqueleto como citocinese, movimento flagelar ou transporte vesicular (Milisav, 1998). Realizamos um ensaio de imunolocalização no verme adulto e os resultados mostraram a presença da Sm22.6 no tegumento de vermes adultos. Um dado muito importante no que se refere a Sm22.6, é que IgE de pacientes resistentes à reinfeção pós-tratamento reconhece a proteína Sm22.6 em ensaio *in vitro*. Embora a imunização com Sj22.6r não tenha conferido nenhuma proteção contra infecção experimental, não existia qualquer trabalho testando a capacidade imunoprotetora da Sm22.6.

Como na esquistossomose o verme adulto não se multiplica no hospedeiro humano, não se faz necessário o desenvolvimento de uma vacina com 100% de proteção. Proteção parcial induzida por uma proteína do parasita, seria um critério sólido de escolha de uma molécula candidata para compor uma vacina, já que acredita-se que a vacina anti-esquistossomose será multi-protéica, em razão do helminto passar por vários ciclos de desenvolvimento, e

conseqüentemente expressar diferentes proteínas durante as diferentes fases do seu ciclo de vida. Entretanto a Sm22.6r se mostrou um fraco imunógeno, pois protegeu parcialmente (34.5%) apenas quando associada ao adjuvante de Freund.

Nossos resultados de imunização com a Sm22.6 recombinante demonstram claramente a influência das formulações adjuvantes utilizadas em protocolos de imunização nos níveis de proteção alcançados. Imunização realizada com a proteína recombinante na ausência de adjuvantes não foi capaz de induzir qualquer resposta imune protetora, embora elevados níveis de anticorpos IgG anti-Sm22.6 foram encontrados. A utilização de adjuvantes como o hidróxido de alumínio, um adjuvante que tende a polarizar a resposta imune para um perfil Th2 (Grun & Maurer, 1989) e que é a única formulação de adjuvante licenciada para uso em humanos, também não se mostrou eficiente na indução de resposta imune protetora quando camundongos foram vacinados com a Sm22.6 recombinante na presença deste adjuvante. De maneira interessante, o adjuvante completo de Freund que tende a polarizar a resposta imune para um perfil do tipo Th1 (Grun & Maurer, 1989), foi capaz de induzir um nível de proteção parcial de 34,5%. No entanto, o uso da vacina de DNA utilizando o vetor pCI, não foi capaz de induzir imunidade protetora aliada a baixos níveis de IgG anti-Sm22.6 produzidos. O adjuvante completo de Freund é composto por óleos minerais livres de componentes aromáticos policíclicos acrescido de micobactérias mortas pelo calor (Claassen *et. al.*, 1992). Os componentes da parede de micobactérias ativam macrófagos através da sinalização por TLR2, a ligação destes componentes ao TLR2 da superfície de macrófagos leva à secreção de TNF- $\alpha$  (Jones e cols., 2001). Embora o adjuvante de Freund seja considerado o adjuvante mais efetivo, o seu uso está diretamente associado à reações adversas à saúde humana (Broderson, 1989, Kleinman *e cols.*, 1993, Claassen *e cols.*, 1992, Steiner J *e cols.*, 1960). Sm22.6r/alum não induziu proteção parcial contra a infecção experimental por cercária. Não há uma correlação aparente entre os títulos de anticorpos gerados e a eficiência na proteção, pois todos os grupos imunizados com proteína tiveram níveis significativos dos isotipos IgG1 e IgG2a. Da'dara *e cols.* (2003) em vacinação com Sm23r na presença do hidróxido do alumínio também obtiveram elevados títulos de IgG1, mas sem proteção contra a infecção experimental. Uma hipótese para tentar explicar a não proteção mesmo com elevada produção de IgG anti-Sm22.6 e seus isotipos IgG1 e IgG2a, seria que apenas a produção de anticorpos para este antígeno em particular tenha sido insuficiente para induzir proteção contra a infecção ou que a resposta imune baseada somente em Th2 não foi protetora.

Jankovic e cols. (1999) demonstraram usando camundongos knockout para célula B que a vacinação efetiva contra esquistossomose depende da indução simultânea da resposta imune celular e humoral. Adicionalmente, experimentos realizados com camundongos duplo knockout sugerem que o estabelecimento de uma resposta celular e humoral eficientes seja a chave para a geração de uma imunidade eficiente contra a esquistossomose murina (Wynn & Hoffmann, 2000).

Um modelo de resistência bastante estudado na esquistossomose é o que utiliza a cercária atenuada em imunizações. Uma única exposição à cercária atenuada é capaz de induzir altos níveis de proteção em camundongos desafiados com cercária não atenuada, e essa imunoproteção está relacionada à produção de IFN- $\gamma$  e à imunidade mediada por células (Vignali *e cols.*, 1989; Wilson *e cols.*, 1996). Esses autores sugerem que a proteção nesse modelo está relacionada a um perfil de resposta imune do tipo Th1. Em humanos a resposta do tipo Th1 também tem sido associada à resistência contra infecção pelo *S. mansoni*, já que PBMC de indivíduos naturalmente resistentes à infecção por este parasita produz altos níveis de IFN- $\gamma$  *in vitro* quando estimuladas com antígenos das diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni* (Viana *e cols.*, 1994). Nosso resultado de imunização com a Sm22.6 recombinante demonstra o envolvimento de uma resposta mista do tipo Th1/Th2 na indução de proteção parcial contra a infecção. Além da imunidade mediada por células, a imunidade humoral parece exercer um papel importante na resistência ao *S. mansoni*. No modelo de vacinação com cercária atenuada, múltiplas imunizações causam um pequeno aumento no nível de proteção (Delgado e McLaren, 1990; Caulada-Benedetti *e cols.*, 1991) e envolvem um mecanismo de resistência dependente de anticorpo, uma vez que a transferência passiva de anticorpos IgG desses camundongos transferem resistência a um recipiente não primado (Mangold & Dean, 1986). Além disso, camundongos deficientes em células B, quando vacinados com três doses de cercária irradiada apresentam uma redução na proteção quando comparados com camundongos normais (Jankovic *e cols.*, 1999). Em camundongos, linfócitos do tipo Th1 estimulados são capazes de induzir a produção de IgG2a (Stevens *e cols.*, 1988), sendo que o IFN- $\gamma$  é a citocina capaz de induzir a troca da cadeia pesada no linfócito B para produzir esta subclasse de imunoglobulina (Snapper & Paul, 1987). Em contraste, linfócitos do tipo Th2 induzem a produção de IgG1 (Stevens *e cols.*, 1988), sendo que a mudança na cadeia pesada para a produção dessa subclasse parece ser induzida por IL-4 (Isakson *e cols.*, 1982).

Em nossos estudos, as diferentes formulações de adjuvantes induziram um perfil similar de produção das subclasses de IgG, específicas para Sm22.6r. Tanto na imunização na presença dos adjuvantes de Freund e hidróxido de alumínio, quanto na ausência do adjuvante, a Sm22.6r induziu níveis elevados de IgG1 quando comparados a IgG2a. Porém, sabemos que em camundongos normalmente IgG1 encontra-se em maiores títulos do que os demais subtipos. Tanto a IgG1 quanto a IgG2a obtidas de soro de camundongos imunizados múltiplas vezes com cercária atenuada mostraram-se capazes de transferir proteção a um animal não primado (McLaren & Smithers, 1988; Delgado & McLaren, 1990; Wynn *e cols.*, 1996). Em camundongos CBA, a IgG1 está envolvida na eliminação de larvas na pele (McLaren & Smithers, 1988) e em C57BL/6, na eliminação de larvas pulmonares (Mangold & Dean, 1986), sendo que a eliminação da larva na pele se dá pela formação de imunocomplexos e envolve, assim como no pulmão, células mononucleares (McLaren & Smithers, 1988). Apesar de todos os protocolos vacinais utilizados nesse estudo induzirem IgG1 e IgG2a, apenas a imunização com adjuvante de Freund conseguiu induzir proteção parcial. Portanto, a proteção de 34,5% conferida pela Sm22.6r associada ao adjuvante de Freund, provavelmente deve-se em grande parte a imunidade celular, pela produção de IFN- $\gamma$  e IL-4, característica de uma resposta mista do tipo Th1/Th2.

Outra estratégia utilizada, foi testar a capacidade do cDNA que codifica a Sm22.6 em induzir proteção no modelo experimental. Na imunização gênica, um gene que codifica um antígeno específico de um determinado patógeno é clonado em um plasmídeo de expressão em células de mamífero e administrado como vacina. O DNA inoculado entra na célula do hospedeiro, e utiliza a maquinaria celular para a expressão deste gene heterólogo. A proteína resultante da expressão gênica será então, processada e apresentada ao sistema imunológico do hospedeiro que irá reconhecê-la como um antígeno estranho e montará uma resposta específica contra este antígeno. Desta forma a vacina de DNA mimetiza diversos aspectos da infecção natural.

Para imunizar camundongos com o gene que codifica a proteína Sm22.6, este foi subclonado no vetor de expressão em células de mamíferos pCI. Esta construção foi utilizada no protocolo de imunização que consistiu de quatro doses da vacina com intervalos de 15 dias entre as doses. A imunização com o gene *Sm22.6* não foi capaz de induzir qualquer nível de proteção e ainda ao contrário da imunização com a proteína recombinante, a imunização gênica produziu baixos níveis de IgG anti-Sm22.6.

O DNA bacteriano possui em sua seqüência regiões contendo motivos CpG não metilados que são capazes de se ligar ao TLR 9 (receptor do tipo Toll-9), em macrófagos e células dendríticas, ativando a resposta imune inata e adquirida que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Oliveira *e cols.*, 1999; Ishii *e cols.*, 2002, Hong *e cols.*, 2004), auxiliando a diferenciação de linfócitos T em células T do tipo Th1. O uso da estratégia de imunização com DNA mostrou-se eficiente na indução de proteção parcial contra a esquistossomose, em alguns casos como Sm20.8 (Mohamed *e cols.*, 1998), Sm23 (Da'dara *e cols.*, 2003), Sm14 (Fonseca *e cols.*, 2006). Porém, utilizando a construção Sm22.6 essa estratégia não foi promissora.

Para tentar explicar a proteção parcial induzida pela Sm22.6r associada ao adjuvante de Freund, especularemos sobre alguns possíveis mecanismos a seguir. O pulmão é o principal sítio de eliminação do parasita após uma infecção primária, por um mecanismo dependente da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que leva a um aumento na produção de NO por macrófagos, e recrutamento de células inflamatórias para o órgão formando um foco inflamatório ao redor da larva que pode bloquear sua migração. Dessa forma, a Sm22.6 encontrada no esquistossômulo de fase pulmonar, induziria a produção de IFN- $\gamma$  que ativaria macrófagos a produzirem óxido nítrico, que atuariam como agente tóxico destruindo o parasita. IFN- $\gamma$  também induziria células B a produzirem IgG2a, que se ligaria ao esquistossômulo auxiliando na formação do foco inflamatório e o bloqueio de sua migração. Por outro lado, a produção de IL-4 estimularia linfócitos B a produzirem IgE que juntamente com eosinófilos destruiriam o esquistossômulo por citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC).

Fonseca *e cols.* (2004) e Wilson *e cols.* (1996) mostraram que IFN- $\gamma$  está envolvido na resposta imune protetora induzida pela imunização contra a infecção no modelo murino. Por outro lado, altos níveis de IgE é encontrado em soro de pacientes resistentes a reinfeção (Dunne *e cols.*, 1992a, 1992b, Webster *e cols.*, 1996). Resultados de muitos estudos em ratos e humanos sugerem que uma vacina deve apresentar mecanismos efetores baseados na resposta Th2 (Capron *e cols.*, 1994, 1995), enquanto estudos de vacinação em camundongos indicam que a imunidade envolvendo o perfil Th1, deve ser mais vantajoso (Wynn 1999, Wilson e Coulson, 1999). Em imunizações utilizando o modelo de cercária irradiada, a exposição uma vez à larva desenvolve imunidade com produção de IFN- $\gamma$  (Th1). Entretanto, quando camundongos recebem duas imunizações com a larva irradiada, eles desenvolvem uma resposta mista Th1/Th2 elevando



ainda mais a proteção (Wynn e Hoffman, 2000). Dessa maneira, o estabelecimento de uma resposta humoral e celular, ou seja, a indução desse perfil misto (Th1/Th2) é provavelmente o tipo de resposta imune desejada para se obter uma proteção eficiente contra a esquistossomose (Jankovic *e cols.*, 1999, Hoffmann *e cols.*, 1999, Wynn *e cols.*, 1996).

Nosso laboratório em colaboração com o grupo de pesquisa do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas da UFBA (coordenado pelo Dr. Edgar Carvalho e Dra. Maria Ilma Araújo) está desenvolvendo um projeto cuja principal objetivo é a investigação dos mecanismos envolvidos na proteção da asma alérgica durante a infecção pelo *S. mansoni*. Medeiros *e cols.* (2003) mostraram que em área endêmica para a esquistossomose mansônica, a prevalência e a gravidade da asma é diminuída. Outro estudo também mostrou a associação inversa entre a infecção por *S. mansoni* e resposta positiva aos aeroalérgenos (Araújo *e cols.*, 1999). Desenvolvemos um modelo murino que mostrou que animais infectados pelo *S. mansoni* se tornam protegido da asma alérgica experimental. Acredita-se que um dos mecanismos responsáveis por essa modulação seja a IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Moore *e cols.*, 2001) que é produzida na fase crônica da esquistossomose para controlar o granuloma causado pela deposição do ovo no fígado e intestino do paciente. A IL-10 tem diversas ações como citocina anti-inflamatória, dentre elas a modulação da resposta Th2. A observação de Borish *e cols.* (1996) de que indivíduos alérgicos têm deficiência em IL-10 reforça a importância desta citocina na modulação da alergia. Surgiu então o interesse de estudar antígenos do parasita envolvidos na modulação da alergia. Testamos a Sm22.6r quanto a sua capacidade em induzir a produção de IL-10. Camundongos C56BL/6 foram imunizados três vezes com a Sm22.6r e após estimulação *in vitro* com o antígeno recombinante, esplenócitos primados produziram elevados níveis desta citocina (Pacífico *e cols.*, 2006). Os nossos colaboradores da UFBA estão testando alguns antígenos do *S. mansoni* (entre eles Sm22.6r) em cultura de células de indivíduos moradores de área endêmica e indivíduos asmáticos. Paralelamente, utilizaremos também estes antígenos no nosso modelo experimental de asma alérgica. Em conclusão, apesar da Sm22.6r sozinha não ter induzido proteção contra a infecção com o *S. mansoni*, esse antígeno tem o potencial a ser explorado no estudo da modulação da asma alérgica.

## VII. CONCLUSÕES

- Experimentos de imunolocalização por imunofluorescência confirmaram a proteína Sm22.6 como uma proteína presente no tegumento do *Schistosoma mansoni*
- A imunização de camundongos com a forma recombinante da Sm22.6 na presença de adjuvante de Freund foi capaz de induzir proteção de 34,5% contra a infecção com cercária do *S. mansoni*
- A imunização de camundongos com a Sm22.6r na presença de adjuvante de Freund foi capaz de induzir um perfil de resposta celular mista do tipo Th1/Th2, com produção de níveis significativos de IFN- $\gamma$  e de IL-4.
- A imunização de camundongos com a Sm22.6r na ausência de adjuvante ou na presença de hidróxido de alumínio, produziu níveis elevados de IgG anti-Sm22.6, mas não induz proteção contra infecção com cercária do *S. mansoni*.
- A imunização de camundongos com a vacina de DNA pCI/Sm22.6 não induziu proteção contra a infecção pelo *S. mansoni*.
- Apesar dos experimentos realizados neste estudo demonstrarem que a Sm22.6 sozinha não induz proteção contra infecção, essa molécula pode ser testada em outros ensaios de imunomodulação, haja visto que a Sm22.6 é indutora de IL-10.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abath FGC, Werkhauser.** The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunologic features. *Parasite immunology* 18: 15-20, 1996
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A.** Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383(6603):787-93, 1996.
- Akira S, Takeda K.** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4(7):499-511, 2004.
- Aksoy E, Zouain CS, Vanhoutte F, Fontaine J, Pavelka N, Thieblemont N, Willems F, Ricciardi-Castagnoli P, Goldman M, Capron M, Ryffel B, Trottein F.** Double-stranded RNAs from the Helminth Parasite *Schistosoma* Activate TLR3 in Dendritic Cells. *J Biol Chem*. 280(1):277-283, 2005.
- Alkarmi T, Ijaz MK, Dar FK, Abdou S, Alharbi S, Frossard P, Naiem M.** Suppression of transplant immunity in experimental trichinellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 18(3):171-7, 1995.
- Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Sole D, Carvalho EM.** Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 123(2):145-8, 2000.
- Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M Jr, Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, Oliveira RR, Kruschewsky R, Figueiredo JP, Cruz AA, Carvalho EM.** Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis*. 190(10):1797-803, 2004.
- Auriault C, Ouaissi MA, Torpier G, Eisen H, Capron A.** Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol*. 3(1):33-44, 1981.
- Balloul JM, Grzych JM, Pierce RJ, Capron A.** A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J Immunol*. 138(10):3448-53, 1987.
- Bergquist, N. R.** Controlling schistosomiasis by vaccination: a realist option? *Parasitology Today*. 11(5):191-194, 1995
- Bergquist, N. R.** Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 93(Suppl.1): .95-101, 1998.
- Boros, D. L.** Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin. Microbiol. Rev*. 2: 250-269, 1989.
- Boros DL, Whitfield JR.** Endogenous IL-10 regulates IFN-gamma and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosomiasis mansoni*-infected mice. *Immunology*. 94(4):481-7, 1998.
- Botros SS, Makary EA, Ahmed KM, Ibrahim AM, Nashed NN, El-Nahal HM, Doughty BL, Hassanein HI.** Effect of combined praziquantel and recombinant glutathione S-transferase on resistance to reinfection in murine *Schistosomiasis mansoni*. *Int J Immunopharmacol*. 22(11):979-88, 2000.
- Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KH.** *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 67(10):5372-8, 1999.
- Braschi S Wilson RA.** Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation *Mol. Cell proteomics* 5(2):347-56, 2006.
- Brito, C. F. A., Fonseca, C. T., Goes, A.M., Azevedo, V. & Oliveira S.C.** Human IgG1 and IgG3 recognition of *Schistosoma mansoni* 14 Kda fatty acid-binding protein. *Parasite Immunology*. 22: 41-48, 2000a.

- Brito, C.F.A.; Caldas, I.R; Coura Filho, P.; Oliveira, R. C.;& Oliveira S.C.** CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in response to recombinant 14kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Scand. J. Immunol.* 51: 595-601, 2000b.
- Broderson JR.** A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci.* Sep;39(5):400-5, 1989.
- Brophy PM, Barrett J.** Glutathione transferase in helminths. *Parasitology.*100 (Pt 2):345-9, 1990.
- Butterworth AE, Bensted-Smith R, Capron A, Capron M, Dalton PR, Dunne DW, Grzych JM, Kariuki HC, Khalife J, Koech D.** Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology.* 94( Pt 2):281-300, 1987.
- Butterworth AE, Dunne DW, Fulford AJ, Thorne KJ, Gachuhi K, Ouma JH, Sturrock RF.** Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms, and implications for control. *Immunol Invest.* 21(5):391-407, 1992.
- Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massara CL, Colley DG, Gazzinelli G.** Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotopic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 62(1):57-64, 2000.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. & Bazin, H.** Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *S. mansoni* schistosomules. *Nature.*253:474-475, 1975.
- Capron, A., Riveu, G., Grzych, J. M., Boulanger, D.,Capron, M., Pierce, R.** Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. *Tropical and geographical medicine.* 46(4):242-246, 1994.
- Caulada-Benedetti, Z., Al-Zamel, F., Sher, A. & James, S. L.** Comparison of Th1 and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *S. mansoni* cercariae. *The Journal of Immunology.* 146:1655-1660, 1991.
- Cardoso FC, Pacifico RNA, Mortara RA, Oliveira SC.** Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin. Exp. Immunol.* Jun;144(3):382-91. 2006a
- Cardoso, FC, Pinho JM, Azevedo V, Oliveira SC.** Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. *Genet Mol Res.* 31;5(4):609-18, 2006b.
- Cardoso FC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, de Mello AL, Caliari MV, Macedo GC, and Oliveira SC.** Vaccine against schistosomiasis: The role of a new tegument protein Sm29 on human and murine protective immune responses. *Submetido.*
- Claassen, E.; Leeuw, W.; Greeve, P. Hendriksen, C. & Boersma, W. J. A.** Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Res. Immunol.*143:478 – 483, 1992.
- Clegg JA, Smithers SR, Terry RJ** Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Nature.* 232(5313):653-4, 1971.
- Coles, G. C., Bruce, J.P.Capron, Kinoti, G. K., Mutahi, W.T., Dias, E. P. & Katz, N.** Drug resistance in schistosomiasis. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.* 80:347- , 1986.
- Correa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-Filho OA, Wilson RA, Gazzinelli G.** Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res.* 31(1):171-7, 1998.

- Coulson PS, Wilson RA.** Examination of the mechanisms of pulmonary phase resistance to *Schistosoma mansoni* in vaccinated mice. *Am J Trop Med Hyg.* 38(3):529-39, 1988.
- Coulson, P. S.** The radiation-attenuated vaccine against Schistosomes in animal models: paradigm for human vaccines? *Advances of Parasitology*..39: 271-336, 1997.
- Coura JR, Amaral RS.** Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(Suppl 1):13-9, 2004.
- Crabtree JE, Wilson RA.** The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 8(3):265-85, 1986.
- Da'dara AA, Skelly PJ, Wang MM, Harn DA.** Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine.* 20(3-4):359-69, 2001.
- Da'dara AA, Skelly PJ, Walker CM, Harn DA.** A DNA-prime/protein boost vaccination regimen enhances Th2 immune response but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite Immunology* 25: 429-437, 2003.
- Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A.** Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol.* 33(5-6):621-40, 2003.
- de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhaes A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM.** Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis.* 185(1):98-105, 2002.
- de Jesus AR, Magalhaes A, Miranda DG, Miranda RG, Araujo MI, de Jesus AA, Silva A, Santana LB, Pearce E, Carvalho EM.** Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun.* 72(6):3391-7, 2004.
- Delgado, V. & McLaren, D. J.** Evidence for enhancement of IgG1 subclass expression in mice polyvaccinated with radiation-attenuated cercariae of *S. mansoni* and the role of this isotype in serum-transferred immunity. *Parasite Immunol.* 12:15-32, 1990.
- Dunne, D.W., Butterworth, A.E., Fulford, A.J., Ouma, J.H., Sturrock, R.F.** Human IgE responses to *Schistosoma mansoni* and resistance to reinfection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz;* 87 Suppl 4: 99-103, 1992.
- Dunne D. W., Butterworth, A. E., Fullford A. J. C., Kariuki, H. C. Langley, J. G., Ouma, J.H., Capron, A., Pierce, R. J. & Sturrock, R.F.** Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to infection. *European Journal of Immunology.* 22: 1483-1494, 1992.
- Dunne, D.W., Webster, M., Smith, P., Langley J.G., Richardson, B.A., Fulford, A.J., Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Kariuki, H.C., Ouma, J.H.** The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection. *Parasite Immunol.* 19, 79-89, 1997.
- Dupre L, Poulain-Godefroy O, Ban E, Ivanoff N, Mekranfar M, Schacht AM, Capron A, Riveau G.** Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* 19(11):505-13, 1997.
- Dupre L, Kremer L, Wolowczuk I, Riveau G, Capron A, Locht C.** Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. *Vaccine.* 19(11-12):1373-80, 2001.
- El Garem A.A.** Schistosomiasis. *Digestion.* 59: 589-605, 1998.

- Elsayed S & Apold J.** Immunochemical analysis of cod fish allergen M: locations of immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy*. 7: 449-59, 1983.
- Enk AH, Katz SI** Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol*. 149(1):92-5, 1992.
- Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Correa-Oliveira R.** Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol*. 20(10):447-54, 1998.
- Falcão PL, Correa-Oliveira R, Fraga LA, Talvani A, Proudfoot AE, Wells TN, Williams TJ, Jose PJ, Teixeira MM.** Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1alpha during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. *J Infect Dis*. 186(11):1696-700, 2002.
- Fallon, P. G. & Doenhoff, M. J.** Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxaminiquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med Hyg*. 51(1):83-88, 1994.
- Fallon PG, Sturrock RF, Niang AC, Doenhoff MJ.** Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 53(1):61-2, 1995.
- Fishelson Z.** Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 90(2):289-92, 1995.
- Fitzsimmons CM, Stewart TJ, Hoffmann KF, Grogan JL, Yazdanbakhsh M, Dunne DW.** Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen. *Parasite Immunology*. 26 (371-76), 2004.
- Fonseca CT, Brito CF, Alves JB, Oliveira SC.** IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. *Vaccine*. 22(3-4):503-10, 2004.
- Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Kalil J, de Jesus AR, Carvalho EM, Correa-Oliveira R, Hammer J, Sidney J, Sette A, Oliveira SC.** Identification of paramyosin T cell epitopes associated with human resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection. *Clin Exp Immunol*. 142(3):539-47, 2005.
- Fonseca CT, Pacífico LGG, Barsante MM, Rassi T, Cassali GD e Oliveira SC.** 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(9-10):2509-16, 2006.
- Franco GR, Rabelo EM, Azevedo V, Pena HB, Ortega JM, Santos TM, Meira WS, Rodrigues NA, Dias CM, Harrop R, Wilson A, Saber M, Abdel-Hamid H, Faria MS, Margutti ME, Parra JC, Pena SD.** Evaluation of cDNA libraries from different developmental stages of *Schistosoma mansoni* for production of expressed sequence tags (ESTs). *DNA Res*. 4, 231-240, 1997.
- Gazzinelli G, Montesano MA, Correa-Oliveira R, Lima MS, Katz N, Rocha RS, Colley DG.** Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 82(Suppl) 4:95-100, 1987.
- Goudot-Crozel V., Caillol D, Kjabali M, Desein AJ.** The major surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kD-glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *Journal of Experimental Medicine* 170, 2065-2080, 1989.

- Graham AL, Lamb TJ, Read AF, Allen JE.** Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *J Infect Dis.* **191**(3):410-21, 2005.
- Grun, J.L. & Maurer, P.H.** Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol.* **121**(1):134-45, 1989.
- Gryschek, RCB.** Esquistossomose. Available from internet. 2001. Programa Saúde da família. Home: [http://ids-aude.uol.com.br/psf/medicina/tema3/texto37\\_definicao.asp](http://ids-aude.uol.com.br/psf/medicina/tema3/texto37_definicao.asp).
- Grzych JM, Capron M, Bazin H, Capron A.** In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J Immunol.* **129**(6):2739-43, 1982.
- Grzych JM, Capron M, Dissous C, Capron A.** Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J Immunol.* **133**(2): 998-1004, 1984.
- Hagan, P., Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J. & Greenwood, B. M.** Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunology.* **7**: 625-631, 1985.
- Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA.** Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature.* **349**(6306):243-5, 1991.
- Harn DA.** A protective monoclonal antibody. *Journal of Immunology* **148**: 562-567, 1992.
- Harris AR, Russell RJ, Charters AD .** A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 385, 1984.
- Hoffmann, K. F., Caspar, P., Cheever, A. W. & Wynn, T. A.** IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$  are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* egg and IL-12. *The Journal of Immunol.* **161**: 4201-4210, 1998.
- Hogg KG, Kumkate S, Anderson S, Mountford AP.** Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* **71**(6):3563-71, 2003a.
- Hogg KG, Kumkate S, Mountford AP.** IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Int Immunol.* **15**(12):1451-9, 2003b.
- Hong Z, Jiang Z, Liangxi W, Guofu D, Ping L, Yongling L, Wendong P, Minghai W.** Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *Int Immunopharmacol.* **4**(2):223-34, 2004.
- Horta MF, Ramalho-Pinto FJ.** Subclasses of rat IgG active in the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J Immunol.* **133**(6): 3326-32, 1984.
- Horta MF, Ramalho-Pinto FJ.** Role of human decay-accelerating factor in the evasion of *Schistosoma mansoni* from the complement-mediated killing in vitro. *J Exp Med.* **174**(6):1399-406, 1991.
- Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, Krammer PH.** T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med.* **155**(3):734-48, 1982.
- Ishii KJ, Takeshita F, Gursel I, Gursel M, Conover J, Nussenzweig A, Klinman DM.** Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J Exp Med.* **196**(2):269-74, 2002.
- Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL.** Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg.* **60**(6):932-5, 1999.

- James, S. L. & Glaven, J.** Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *The Journal of Immunology*. 143: 4208-4212, 1989.
- James, S. L., Cheever, A.W., Caspar, P. & Wynn, T. A.** Inducible nitric oxide synthase-deficient mice develop enhanced Th1 cytokine-associated cellular and humoral immune responses after vaccination with attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae but display partially reduced resistance. *Infection and Immunity*. 66(8): 3510-3518, 1998.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 20:197-216, 2002.
- Jankovic, D., T.A. Wynn, M.C. Kullberg, R. Caspar, S. James, A.W. Cheever And A. Sher.** Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN $\gamma$  dependent effector mechanisms. *The Journal of Immunology* 162: 345-351, 1999.
- Jassim A, Hassan K, Catty D.** Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol*. 9(6):627-50, 1987.
- Jeffs, S.A, Hagan, P., Allan, R. e cols., Allen, R., Correa-Oliveira, R., Smithers, R., Simpson, A.J.G.** Molecular cloning and characterization of 22-kilodalton adult *S. mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46, 159-167, 1991.
- Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ.** Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol*. 69(6):1036-44, 2001.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H & Viens, P.** A new function for platelets: IgE dependent killing of schistosomules. *Nature*. 303: 810-812, 1983.
- Kassim OO, Dean DA, Mangold BL, Von Lichtenberg F.** Combined microautoradiographic and histopathologic analysis of the fate of challenge *Schistosoma mansoni* schistosomula in mice immunized with irradiated cercariae. *Am J Trop Med Hyg*. 47(2):231-7, 1992.
- Khalife J., Capron M., Capron A., Grzych J. M., Butterworth A. E, Dunne D. W., & Ouma, J. H.** Immunity in human schistosomiasis mansoni : regulation of protective immune mechanism by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med*. 164: 1626-1640, 1986.
- Klabunde J, Berger J, Jensenius JC, Klinkert MQ, Zelck UE, Kreamsner PG, Kun JF.** *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Exp Parasitol*. 95(4):231-9, 2000.
- Kleinman NR, Kier AB, Diaconu E, Lass JH.** Posterior paresis induced by Freund's adjuvant in guinea pigs. *Lab Anim Sci*. Aug;43(4):364-6, 1993.
- La Flamme AC, Scott P, Pearce EJ.** Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol*. 24(7):339-45, 2002.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- Lee KW, Shalaby KA, Thakur A, Medhat AM, Karim AM, LoVerde PT.** Cloning of the gene for phosphoglycerate kinase from *Schistosoma mansoni* and characterization of its gene product. *Molecular and biochemical parasitology* 71: 221-231, 1995.
- Li, Y., Auliff, A., Jones, M.K., Yi, X., McManus, D.P.** Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunology* 22, 415-424, 2000.
- Lin YL, He S.** Sm22.6 antigen is a inhibitor to human trombin. *Molecular Biochem. Parasitol*. May;147(1):95-100, 2006.



- Loukas A, Tran M, Pearson MS.** Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int J Parasitol.* 37(3-4):257-63, 2007.
- Mangold, B.L. & Dean, D. A.** Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercariae induced resistance against *S. mansoni* in mice. *The Journal of Immunology.* 136: 2644-2648, 1986.
- Martins-Filho OA, Dutra WO, Freeman GL, Silveira AM, Rabello A, Colley DG, Prata A, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra J.** Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. *Scand J Immunol.* 46(3):304-11, 1997.
- McKee AS, Pearce EJ.** CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol.* 173(2):1224-31, 2004.
- McLaren DJ, Smithers SR.** Serum from CBA/Ca mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni* protects naive recipients through the recruitment of cutaneous effector cells. *Parasitology.* 97 ( Pt 2):287-302, 1988.
- Medeiros M Jr, Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araujo MI, Cruz AA, Atta AM, Rego MA, de Jesus AR, Taketomi EA, Carvalho EM.** *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 111(5):947-51, 2003.
- Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V.** Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med.* 160(5):1558-78, 1984.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388(6640): 394-7, 1997.
- Milisav I.** Dynein and dynein-related genes. *Cell Motil Cytoskelet.* 39 (4): 261-72, 1998.
- Mohamed MM, Shalaby KA, LoVerde PT, Karim AM..** Characterization of Sm20.8, a member of a family of schistosome tegumental antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96: (1-2): 15-25, 1998.
- Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Goncalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA.** Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis.* 179(6):1502-14, 1999.
- Mountford AP, Coulson PS, Wilson RA.** Antigen localization and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 97( Pt 1):11-25, 1988.
- Oliveira SC, Rosinha GM, de-Brito CF, Fonseca CT, Afonso RR, Costa MC, Goes AM, Rech EL, Azevedo V.** Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Braz J Med Biol Res.* 32(2):207-14, 1999.
- Pacífico LGG, Fonseca CT, Chiari L, Oliveira SC..** 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, 2006.
- Pearce, E. J., James, S. L., Dalton, J.** Immunochemical characterization and purification of Sm97, a *Schistosoma mansoni* antigen monoespecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with nonliving vaccine. *The Journal of Immunology.* 137: 3593-3600, 1986.
- Pearce, E.** Proselytizing with immunity. *Nature,* .363: 19-20, 1993.
- Phillips SM, Lammie PJ.** Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. *Parasitol Today.* 2(11):296-302, 1986.

- Porchet E, McNair A, Caron A, Kusnierz JP, Zenzoumi K, Capron A.** Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology*. 109 ( Pt 5):565-72, 1994.
- Reynolds SR, Shoemaker CB, Harn DA.** T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* 149, 3995-4001, 1992
- Riengrojpitak S, Anderson S, Wilson RA.** Induction of immunity to *Schistosoma mansoni*: interaction of schistosomula with accessory leucocytes in murine skin and draining lymph nodes. *Parasitology*. 117(Pt 4):301-9, 1998.
- Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgois, A., Prata, A. & Dessein, A. J.** Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *European Journal of Immunology*. 21: 2679-2686, 1991.
- Roberts M, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJ, Dunne DW, Ouma JH, Sturrock RF.** Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun*. 61(12):4984-93, 1993.
- Rollinson D, Southgate VR** The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal, p. 1-49. In D Rollinson, AJ Simpson (eds), *The Biology of Schistosomes: from Genes to Latrines*. Academic Press, London. 1987.
- Ruzicka T, Printz MP.** Arachidonic acid metabolism in skin: a review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 100:121-60, 1984.
- Santoro F, Ouaisi MA, Pestel J, Capron A.** Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: binding of C1q to schistosomula. *J Immunol*. 124(6):2886-91, 1980.
- Saunders N, Wilson RA, Coulson PS.** The outer bilayer of the adult *Schistosoma mansoni* tegument surface has a low turnover rate in vitro and in vivo. *Mol Biochem Parasitol*. 25(2):123-31, 1987.
- Savioli, L., Renganathan, E., Montresor, A., Davis, A, Behbehani, K.** Control of schistosomiasis – a global picture. *Parasitology today*. Nov; 13 (11): 444-8, 1997.
- Scott P., Pearce E., Cheever A.W., Coffmann R.L. Sher A.** A role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev*. 112:161-82, 1989.
- Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., Cheever, A.W.** Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *S. mansoni*. *The Journal of Immunology*. 145: 3911-3916, 1990b.
- Simpson AJ.** Schistosome surface antigens: Developmental expression and immunological function. *Parasitology Today* 6:40-5, 1990.
- Smithers SR, Hackett F, Braga V, Simpson AJ.** Immunoblotting identifies additional antigens recognised by mice protectively vaccinated with adult *Schistosoma mansoni* tegumental membranes. *Parasitol. Res*. 76:454-6, 1990.
- Smythies L. E. Coulson, P. S. & Wilson, R. A.** 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, 1992.
- Snapper CM, Paul WE.** B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 139(1):10-7, 1987.
- Stein, L.D., David, J.R.** Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; sept:20 (3): 253-64, 1986.
- Steiner JW, Langer B, Schatz DL.** The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. *Arch Pathol*. 70:424-34, 1960.

- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES.** Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*. 334(6179):255-8, 1988.
- Street, M., P.S. Coulson, C. Sandler, L. J. Warnock, D. McLaughlin, H. Bluethmann, R. Alan Wilson.** TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated Schistosoma Vaccine. *J. Immunol.* 163: 4489-4494, 1999.
- Suphioglu C, Ferreira F, Knox RB.** Molecular cloning and immunological characterization of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS Lett.* 402: 167-72, 1997.
- Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'Dara AA, Piskorska D, McGuire E, Harn DA.** Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol.* 171(11):5837-41, 2003.
- Tonelli E., Andrade G.M.Q. & Martins, M.A.** Esquistossomose mansoni. In: Doenças infecciosas na infância. Editado por J. Neves. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1984.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354, 1979.
- Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus DP, Correa-Oliveira R & Loukas A.** Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Medicine* 12, 835 – 840, 2006.
- Van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M.** A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem.* 277(50):48122-9, 2002.
- Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA.** Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med.* 181(2):775-9, 1995.
- Viana IR, Sher A, Carvalho OS, Massara CL, Eloi-Santos SM, Pearce EJ, Colley DG, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R** Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88(4):466-70, 1994.
- Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos S, Massara CL, Colosimo E, Colley DG, Gazzinelli G.** Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol.* 17(6):297-304, 1995.
- Vignali, D. A., P. Cracker, Q. D. Bickle, S. Cobbould, H. Waldmann And M.G. Taylor.** A role for CD4+ but not CD8+ t cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 Krad irradiated and Ro 11-3128 terminated infections. *Immunology.* 67: 466-472, 1989.
- Warren, K. S., Domingo, E. S. & Cowan, R. B. T.** Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am J. Pathol.* 51: 735-756, 1967.
- Webster M, Fulford A.J., Braun G, Ouma J.H., Kariuki H.C., Havercroft J.C., Gachuhi K., Sturrock R.F., Butterworth A.E., Dunne D.W.** Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6-kilodalton antigen from schistosomiasis mansoni adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. *Infect. Immun.* 64, 4042-4046, 1996
- Webster, M Dunne, D.W.** Human IgE responses to rSm22.6 are associated with infection intensity rather than age per se, in a recently established focus of *Schistosoma mansoni*. *Trop. Med. Int. Health;* apr 3 (4): 318-26, 1998.

- WHO** technical reports series 830, 1993. O controle da esquistossomose: segundo relatório do comitê de especialistas da O.M.S. Editora Fiocruz Tradução por: Maria de Fátima Azevedo – Rio de Janeiro, 1993 V.III, 117p.
- WHO.** Schistosomiasis. Available from internet.1996. Infectious disease home. [www.who.int/ctd/schisto/index.html](http://www.who.int/ctd/schisto/index.html).
- Wilson, R. A., P. S. Coulson, C. Betis, M.A. Dowking And L.E. Smythies.** Impaired Immunity and altered pulmonary response in mice with a disrupted interferon- $\gamma$  receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology*. **87**: 275-282, 1996.
- Wynn, T. A., Oswald, I. P., Eltoun, I. A., Caspar, P., Lowenstein, C. J., Lewis, F. A., James, S. L. & Sher, A.** Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lung of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **153**: 5200-5209, 1994.
- Wynn, T. A., D. Jankovic, S. Hieny, A. W. Cheever And A. Sher.** IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinofilia. *The Journal of Immunology*. **154**: 4701-4709, 1995.
- Wynn, T. A., A. Reynolds, S. James, A. W. Cheever, P. Caspar, S. Hieny, D. Jankovic, M. Strand And A. Sher.** IL-12 enhances vaccine induced immunity to *Schistosoma mansoni* by augmenting both humoral and cell mediated immune response against the parasite. *The Journal of Immunology*. **157**:4068-4078, 1996.
- Wynn, T.A., Hoffmann, K.F.** Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th1 versus Th2? *Parasitol Today* 16, 497-501, 2000.
- Xu CB, Verwaerde C, Grzych JM.** Fontaine J, Capron A. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur J Immunol.* 21(8):1801-7, 1991.
- Xu X, Remold HG, Caulfield JP.** Potential role for scavenger receptors of human monocytes in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Am J Pathol.* 142(3):685-9, 1993.

## IX . PUBLICAÇÕES GERADAS DURANTE O DOUTORADO

1. Rodrigues, TS, **Pacífico, LGG**, Ribeiro SMR, Oliveira SC, Braga, AP. Clustering and artificial neural networks: classification of variables lengths of helminth antigens in set of domains. *Genetics and molecular biology* 27 (4) 673-678, 2004.
2. **Pacífico LGG**. Fonseca CT, Chiari L, Oliveira SC. 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, 2006.
3. Torres CB, Góes VS, Góes AM, **Pacífico LGG**, Silva GA, Junior NL, Alves JB. Fibroblast growth factor 9: cloning and immunolocalisation during tooth development in *Didelphis albiventris*. *Arch Oral Biol.* Apr;51(4):263-72, 2006.
4. Fonseca CT, **Pacífico LGG**, Barsante MM, Rassi T, Cassali GD e Oliveira SC. 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(9-10):2509-16, 2006.
5. Cardoso LS, Oliveira SC, **Pacífico LGG**, Góes AM, Oliveira RR, Fonseca CT, Carvalho EM, e Araujo MI. *Schistosoma mansoni* antigen-driven IL-10 production in infected asthmatic individuals. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, vol 101 (Suppl. I): 339-343, 2006.
6. **Pacífico LG**, Fonseca CT, Barsante MM, Cardoso LS, Araújo MI, Oliveira SC. Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter IL-10 production. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 101 (Suppl. I) : 365-368, 2006.
7. Cardoso LS, Araújo MI, Góes AM, **Pacífico LGG**, Oliveira RR, Oliveira SC. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact.* Jan 3;6:1, 2007.
8. **Pacífico LGG**, Barsante MM, Fonseca CT, Pinho V, Marinho FV, CardosoLS, Araújo MI, Carvalho EM, Cassali GD , Teixeira MM e Oliveira SC. *S. mansoni* infection modulates experimental allergic asthma in the murine model. *Submetido*.