
Universidade Federal de Minas Gerais
Pós graduação em Bioquímica e Imunologia

**VACINAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM CÉLULAS DENDRÍTICAS
DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO CONTENDO O
GENE RHO1-GTPASE DE *Schistosoma mansoni*.**

Luara Isabela dos Santos

Belo Horizonte, fevereiro de 2009

LUARA ISABELA DOS SANTOS

**VACINAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM CÉLULAS DENDRÍTICAS
DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO CONTENDO O
GENE RHO1-GTPASE DE *Schistosoma mansoni*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda Goes

Belo Horizonte
2009

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por me guiar quando eu não tinha mais esperanças, por conduzir meus passos quando eu não conseguia enxergar o caminho, por me escutar a todo o momento e por me proporcionar toda a glória após cada desafio.

Ao professor Alfredo Goes, meu eterno MUITO OBRIGADO pela acolhida, pela confiança, pela atenção e paciência em orientar, pelo apoio, pelo constante incentivo e finalmente, por todos os momentos de agradável convivência em que pude aprender muito com o exemplo de pessoa que és.

A todos os verdadeiros amigos que fiz no LICM. Muito obrigada pelo companheirismo, pelas conversas fiadas, pelos almoços em conjunto, pelos lanchinhos no meio da tarde.

A Cris e Caryninha por serem a minha família do LICM. Obrigada pelos conselhos, pelas críticas dóceis, por me defenderem e me ensinarem a ser uma pessoa melhor. Obrigada por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês. Mamãe, muito obrigada por me “pescar” para o *mundo novo*. Irmã muito obrigada pelas nossas conversas no corredor e por fazer o possível pra me ver feliz.

A Paulinha por toda a companhia, pelos conselhos, por todos os momentos de desabafo, por todos os emails, traduções e por me incentivar em todas as grandes mudanças de vida quando eu não conseguia avaliar as possibilidades. Obrigada por ser uma amiga tão especial.

A Débora por ter entrado na minha vida de uma forma muito carinhosa, por ser minha amiga em todas as fases, pelas longas conversas e inestimável presença na minha vida.

Ao Mário por toda a amizade, por acompanhar meus passos, por torcer por mim e por estar sempre disponível a ajudar.

A Cintia e Marina por toda a contribuição e amizade. Obrigada também Cintia Mary por ser um exemplo de pessoa com um sorriso estampado e com palavras sábias em todas as horas.

A Vivi, Juliana Coitinho e Lu pela enorme disposição em me ajudar, pela agradável convivência e, principalmente, pela amizade.

A Peu pela imensa ajuda nos experimentos de infecção e perfusão, por todas as nossas conversas que me ajudaram e incentivaram. Sem você esse trabalho não teria sido possível.

Aos amigos de Bases por tornarem a disciplina um pouco mais amena, por serem a minha referência em cada laboratório e por todo o carinho depositado.

Ao João Pedro por todas as discussões no buteco que resolveram uma grande parte do projeto, pelas tentativas de solucionar os meus indecifráveis problemas da biomol e por ser meu professor/amigo super paciente quando meu desespero era enorme.

Ao Leitim por toda a ajuda no confocal, pelas discussões de trabalho e pela paciência em me fazer companhia até altas horas no lab. Obrigada por estar por perto e disposto a tornar as coisas melhores.

A Tatyana Keesen por toda a ajuda e disposição para me ensinar a usar o citometro de fluxo.

A Viviane Aguiar pela estimável ajuda na microscopia confocal e por crer que conseguiríamos visualizar a fluorescência nas problemáticas transfecções das dendríticas.

Ao professor Oscar-Bruna Romero do departamento de Microbiologia pela doação das células Ag8653 e ajuda indispensável com os vários problemas iniciais com as dendríticas.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, todos os professores e funcionários por serem sempre cordiais.

A Marcela e Dani por terem entrado na minha vida, por serem minhas amigas mais do que queridas, por me proporcionarem vários momentos de descontração e por me fazerem cada vez mais feliz. Amo vocês.

Ao Leo e Ariana por acreditarem na minha capacidade desde a prova do mestrado, por entender minha ausência e por serem como irmãos para mim.

A madrinha por estar sempre ao meu lado me incentivando e apoiando, sendo minha mãe por escolha e destino.

As amigas Fernandinha, Brites e Analu por todos os maravilhosos momentos de diversão. Obrigada por toda a preocupação com as bactérias mesmo quando vocês não entendiam nada. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes só com a presença de vocês. Vocês são as flores da minha vida.

Ao Juninho, cunhado querido, que me adota em vários momentos, me apoiando, defendendo e acolhendo.

A minha amada irmã por ser um exemplo na minha vida, por estar sempre ao meu lado, por me incentivar em todos os momentos, por me acolher sempre, por toda a preocupação, pela condução dos meus passos e por tudo que és na minha caminhada. Não tenho explicação para tudo que representa pra mim. Te amo muito.

Aos meus pais por suportarem minha ausência, por fazerem o possível e o impossível na realização dos meus sonhos, por acreditarem sempre em mim, pela confiança, pelo amor e pela presença constante, mesmo que não fisicamente. Obrigada por me darem mais do que a vida, obrigada por me ensinar a vivê-la.

A Belinha por ser meu refúgio nos momentos de stress e por todo o carinho. Ela nunca vai conseguir ler isso, mas obrigada assim mesmo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto.

MUITO OBRIGADA!

"A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades." (Maxwell Maltz)

Este projeto foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do professor Alfredo de Miranda Goes, com o suporte das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

Índice

	Lista de abreviaturas	XII
	Lista de figuras e tabelas	XIV
	Resumo	XVII
	<i>Abstract</i>	VIII
1	Introdução	1
1.1	Aspectos básicos e a importância da esquistossomose	2
1.2	Tentativas de controle da esquistossomose	4
1.3	Indução de imunidade protetora	5
1.4	Busca de novas estratégias de vacinação	7
1.4.1	As células dendríticas	8
1.4.2	Aplicações terapêuticas	12
2	Objetivos	16
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	Metodologia	18
3.1	Meios de cultura	19
3.1.1	Meio de cultura basal	19
3.1.2	Meio de cultura para diferenciação em células dendríticas	19
3.2	Produção do meio condicionado a partir de células Ag8653	19
3.3	Extração de células tronco murinas	20
3.4	Diferenciação das células tronco hematopoiéticas em células dendríticas	20
3.5	Células HEK 293T	21
3.6	Caracterização das células dendríticas por citometria de fluxo	22
3.6.1	Marcação celular com anticorpos monoclonais ligados a fluoresceína	22

3.6.2	Leitura no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System)	23
3.7	Teste de viabilidade e metabolismo celular	24
3.8	Ensaio de fagocitose de esferas de latex conjugadas a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	24
3.9	Clonagem do gene da Rho1-GTPase de <i>S. mansoni</i> em vetor de expressão de células de mamíferos	25
3.9.1	Obtenção do gene da Rho1-GTPase de <i>S.mansoni</i> (SmRho)	25
3.9.2	Amplificação do gene da Rho1-GTPase de <i>S.mansoni</i>	25
3.9.3	Clonagem no vetor de expressão de células de mamífero	25
3.9.4	Purificação do DNA plasmidial em pequena escala	26
3.9.5	Sequenciamento	27
3.10	Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial através de nanopartículas de quitosana	27
3.10.1	Preparação das microparticulas de quitosana	27
3.10.2	Ligação do DNA à quitosana	27
3.10.3	Transfecção do DNA ligado à quitosana nas células dendríticas	28
3.11	Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando Effectene	28
3.12	Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando GeneJuice	28
3.13	Análise da presença do gene da SmRho nas células transfectadas	29
3.14	Produção da proteína Rho1GTPase de <i>S. mansoni</i> em sistema procarioto	29
3.14.1	Expressão de Rho1 GTPase em fusão com MBP	29
3.14.2	Expressão em pequena escala	30
3.14.3	Expressão em grande escala	30
3.14.4	Cromatografia de afinidade em resina de amilose	30
3.14.5	Clivagem da proteína fusionada SmRho/MBP com fator Xa	31
3.14.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS	31
3.14.7	Eletrotransferência de proteínas - Western blot	31
3.15	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	32

3.16	Imunização de animais experimentais	32
3.17	Avaliação da resposta imune protetora dos camundongos vacinados frente à infecção desafio com cercárias	33
3.17.1	Cercárias	33
3.17.2	A infecção desafio	34
3.17.3	Perfusão	34
3.17.4	Quantificação da atividade protetora	35
3.17.5	Análise da produção de anticorpos	35
3.17.5.1	Preparação antigênica solúvel de verme adulto (SWAP)	35
3.17.5.2	ELISA	36
3.18	Análise estatística	36
4	Resultados	37
4.1	Diferenciação de células tronco hematopoiéticas murinas em células dendríticas	38
4.2	Caracterização das células dendríticas por citometria de fluxo	39
4.3	Teste de viabilidade e metabolismo celular	42
4.4	Ensaio de fagocitose de esferas de látex conjugadas a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	44
4.5	Clonagem do gene da Rho1-GTPase de <i>S. mansoni</i> em vetor de expressão de células de mamíferos	46
4.5.1	Obtenção do gene da Rho1-GTPase de <i>S.mansoni</i>	46
4.5.2	Amplificação do gene da Rho1-GTPase de <i>S.mansoni</i>	46
4.5.3	Clonagem no vetor de expressão de células de mamífero	47
4.5.4	Sequenciamento	48
4.6	Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial através de nanopartículas de quitosana	49
4.6.1	Ligação do DNA à quitosana	49
4.6.2	Transfecção do DNA ligado à quitosana nas células dendríticas	51
4.7	Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando Effectene	51

4.8	Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando GeneJuice	52
4.9	Análise da presença do gene da SmRho nas células transfectadas	54
4.10	Transfecção transiente em DCs	54
4.11	Produção da proteína Rho1GTPase de <i>S. mansoni</i> em sistema procarioto	56
4.12	Avaliação da resposta imune protetora dos camundongos vacinados frente à infecção desafio com cercárias	60
4.12.1	Quantificação da atividade protetora	60
4.12.2	Análise da produção de anticorpos	61
5	Discussão	63
6	Conclusões	70
7	Referências Bibliográficas	72
Anexos		82
Anexo 1	Consentimento do Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFMG	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APC – Célula apresentadora de antígeno

AST - Etiqueta de sequência antigênica

CCR – Receptor de quimiocina

cDNA – Ácido desoxirribonucéico complementar

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CpG - Citosina-fósforo-guanina

DAB – diaminobenzidina

DC – Célula dendrítica

D-MEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate

ELISA – Ensaio de absorção imunoenzimático

FITC– Isotiocianato de fluoresceína

GFP – Proteína fluorescente verde

GM-CSF - Fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos

GTP – Guanidina trifosfato

HEK – Células de rim embrionário humano

HIV - vírus da imunodeficiência humana

IFN – Interferon

IL – Interleucina

imDCs – Células dendríticas imaturas

IPTG – Isopropil- β -tio-D-galactopiranosídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – Linfócitos T

LTc – Linfócito T citotóxico

LTh – Linfócito T auxiliares

MBP – Proteína ligadora de maltose

mDCs – Células dendríticas maduras
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MTT - Metil tetrazol
PBS – Tampão salina fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PE – Ficoeritrina
PI – Iodeto de propídeo
RNA – ácido ribonucéico
rpm – rotação por minuto
SDS – Sodium Dodecyl Sulfate
TCR – Receptores de células T
TDR - Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TNF - Fator de necrose tumoral
U – Unidades de enzima
WHO – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Esquema representativo do ciclo de vida do gênero <i>Schistosoma</i>	3
Figura 2	Ações integradas para redução da esquistossomose	5
Figura 3	Características que modificam durante a maturação das DCs	10
Figura 4	Visão integrada da imunobiologia da célula dendrítica	12
Figura 5	Diversas formas de inoculação de antígenos nas DCs	13
Figura 6	Células Ag8653 usadas para produção da citocina GM-CSF	20
Figura 7	Células HEK 293T	21
Figura 8	Representação esquemática da citometria de fluxo	23
Figura 9	Plasmídeo pcDNA3.1/NT- GFP fusion TOPO TA	26
Figura 10	Fotografia do procedimento de infecção percutânea	34
Figura 11	Análise morfológica das DCs nos dias 0 e 3 de cultivo	38
Figura 12	Análise morfológica das DCs nos dias 6 e 10 de cultivo	39
Figura 13	Análise morfológica das DCs no dia 12 de cultivo	39
Figura 14	Análise fenotípica por meio dos marcadores CD40, CD86 e CD11c das células dendríticas obtidas a partir das células tronco	40
Figura 15	Análise fenotípica por meio dos marcadores H-2Db, I-Ab e CD11c das células dendríticas obtidas a partir das células tronco	41
Figura 16	Comparação entre o fenótipo das células diferenciadas no dia 12 de cultivo com as células que foram submetidas à maturação	41
Figura 17	Comparação da expressão do marcador CD86 entre as células no décimo dia cultivo e no décimo segundo dia	42
Figura 18	Avaliação da atividade metabólica das células submetidas à maturação e nos dias 10, 11 e 12 de cultivo	43
Figura 19	Avaliação da viabilidade celular das células no 10º dia de cultivo e 11º dia	43
Figura 20	Avaliação da viabilidade celular das células no 12º dia de cultivo e após indução da maturação	44
Figura 21	Microscopia confocal das DCs após ensaio de fagocitose	45
Figura 22	Microscopia confocal das DCs controle do ensaio de fagocitose	45
Figura 23	Sequência nucleotídica da SmRho clonada no vetor pMal-c2X	46

Figura 24	Amplificação da SmRho pela reação em cadeia da polimerase	46
Figura 25	Detecção por PCR dos clones positivos obtidos na clonagem da sequência SmRho no vetor de expressão <i>NT- GFP fusion TOPO</i>	47
Figura 26	Confirmação por digestão de alguns dos clones positivos	47
Figura 27	Sequência nucleotídica do clone SmRho/TOPO	48
Figura 28	Pareamento do sequenciamento do SmRho/TOPO com sequência homóloga do NCBI	49
Figura 29	Efeito do peso molecular e concentração de quitosana na porcentagem de DNA ligado	50
Figura 30	Visualização por gel de agarose da complexação quitosana-DNA	50
Figura 31	Transfecção das DC com a quitosana em diferentes concentrações	51
Figura 32	Células HEK transfectadas usando Effectene	52
Figura 33	Transfecção de Células HEK através do GeneJuice	53
Figura 34	Comparação da eficiência de transfecção de dois vetores não virais por meio da quantificação da fluorescência	53
Figura 35	Amplificação da SmRho extraída das células HEK transfectadas	54
Figura 36	Microscopia confocal das DCs transfectadas com 3000ng de DNA utilizando o GeneJuice	55
Figura 37	MTT das células dendríticas transfectadas	55
Figura 38	Análise por PCR de clones obtidos após transformação de bactérias <i>E. coli</i> BL21	56
Figura 39	Mini-expressão dos clones 7 e 8 do plasmídeo pMal-c2X contendo SmRho	57
Figura 40	Western Blot dos clone 1, 2, 3, 6, 7, 8 e 9	57
Figura 41	Visualização por gel de poliacrilamida de cada fração eluída durante a purificação da proteína SmRho/MBP	58
Figura 42	Gel SDS demonstrando a clivagem da proteína fusionada a partir da enzima fator Xa	59
Figura 43	Capacidade protetora induzida contra a esquistossomose de cada grupo estudado, após 45 dias de infecção	60
Figura 44	Respostas de IgG total contra SmRho/MBP	61

Figura 45	Respostas de IgG total contra SWAP	62
Tabela 1	Antígenos selecionados pela WHO/TDR como candidatos a vacina contra esquistossomose,	6
Tabela 2	Concentração dos anticorpos usados na caracterização fenotípica	22
Tabela 3	Grupos experimentais da imunização com sua respectiva via de administração e quantidade de antígeno inoculado	33

RESUMO

A esquistossomose permanece como uma das mais prevalentes infecções. Inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de se obter uma vacina capaz de proteger o indivíduo da infecção pelo *Schistosoma mansoni* ou mesmo limitar o desenvolvimento das fêmeas assim como a supressão da produção dos ovos. No entanto, mesmo com muitos anos de pesquisa, ainda não foi encontrada uma vacina candidata. Em diferentes modelos de doença, tem sido observado que as células dendríticas (DCs) podem atuar como vetor vacinal, mediando proteção contra vários tipos de patógenos. Estudo da manipulação *ex vivo* das DCs podem conduzir ao desenvolvimento de vacinas que induzem a proteção imunológica a infecções a partir da apresentação de antígenos apropriados *in vivo*. **Objetivo:** Avaliar a resposta imune de camundongos vacinados com células tronco derivadas para células dendríticas e posteriormente modificadas contendo o gene Rho1-GTPase de *S. mansoni*. **Metodologia:** DCs foram obtidas a partir da maturação das células tronco com meio condicionado contendo GM-CSF e caracterizadas por citometria de fluxo e microscopia confocal. O fragmento da Rho1-GTPase foi amplificado por PCR, inserido em um vetor de expressão em células eucariotas e então transfectado nas DCs. Essas células foram usadas na vacinação de camundongos C57BL/6 submetidos à infecção desafio com cercárias. **Resultados e conclusão:** A fenotipagem da população celular mostrou que essas células expressavam distintos marcadores de superfície celular CD11c, característicos de células dendríticas mielóides, além das moléculas coestimulatórias CD40 e CD86. As moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II também foram observadas. As DCs foram visualizadas em microscopia confocal para avaliação da morfologia típica e atividade fagocítica, mostrada pela incorporação de partículas de látex fluorescentes. Uma vez clonada, analisada e transfectada, a proteína em fusão com o GFP foi expressa pelas DCs. A expressão da Rho1-GTPase foi observada a partir de transfecções eficientes e a melhor metodologia observada foi pela utilização do GeneJuice comparado a nanopartículas e ao Effectene. A análise da proteção contra *S. mansoni* revelou que a DC modificada induziu proteção de 56%, relativamente maior do que a conferida apenas pela mesma proteína codificada, 51%. Concluímos que a DC é uma ferramenta valiosa a ser usada no controle da esquistossomose assim como os resultados apresentados representam um avanço na produção de novas metodologias vacinais. **Palavras chave:** esquistossomose, células dendríticas, vacina

ABSTRACT

Schistosomiasis remains one of the world's most prevalent diseases. Several studies have been made aiming the development of a vaccine capable of protecting against *Schistosoma mansoni* infection or limiting the development of females as well as suppressing of the egg production. However, many years of searching failed to identify a vaccine candidate. In different models of disease, it has been demonstrated that dendritic cells (DCs) can serve as vaccine carriers, mediating protection against various types of pathogens. The studies of *ex vivo* manipulation requirements of DCs may lead to the design of vaccines that induce protective immunity to infections by appropriate targeting of DCs *in vivo*. **Objective:** To evaluate the immune reply of mice vaccinated with modified stem cell derived in dendritic cells containing the gene Rho1-GTPase of *Schistosoma mansoni*. **Methods:** Dendritic cells (DC) were obtained from the maturation of bone marrow stem cells with conditional medium containing GM-CSF and further characterized by flow cytometry and confocal microscope. After amplification by PCR, the fragment of Rho1-GTPase was inserted in a vector of expression in mammalian cells, *GFP fusion TOPO TA*, and then transfected in dendritic cells. These cells were used in the vaccination of mice submitted to an infection challenge with cercariae. **Results and conclusion:** Analysis of the bone marrow derived cell population showed that these cells expressed the distinctive DC surface marker CD11c, as well as the major histocompatibility complex (MHC) classes I and II molecules. Dendritic cells were visualized on a Zeiss confocal microscope to evaluate phagocytic activity, shown by the uptake of fluorescent-labeled latex beads and the typical morphology. Once cloned, analyzed, and transfected, the GFP fusion protein was expressed by DC. The expression of Rho1-GTPase was observed by an efficient transfection on DC and the best approach was observed from GeneJuice compared with nanoparticles and Effectene. Analysis of protection against *S. mansoni* revealed that altered DC induced 56% of protection, relatively higher than that conferred only by the same encoded protein, 51%. We conclude that the dendritic cell is a valuable tool to control schistosomiasis and the present results represent a breakthrough in the production of new vaccine approaches.

Key words: schistosomiasis, dendritic cells, vaccine

1 - Introdução

1.1 Aspectos básicos e a importância da esquistossomose

A esquistossomose permanece como uma das mais prevalentes infecções parasitárias e constitui um significativo problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (King, 2009).

Os mais recentes dados da Organização Mundial da Saúde indicam a existência de cerca de 650 milhões de pessoas em risco de contaminação em todo o planeta. Dentro dessa estatística, mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas de forma contínua ou intermitente, e cerca de 120 milhões são pacientes sintomáticos, dos quais 20 milhões têm consequências graves (Schistosomiasis, WHO, 2007). Estima-se ainda que essa doença seja responsável por cerca de 20.000 mortes por ano (Loukas e Bethony, 2008).

Os agentes causadores da esquistossomose são trematódeos do gênero *Schistosoma* e as espécies causadoras das principais formas conhecidas da doença em humanos são *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (King, 2009). No Brasil o *Schistosoma mansoni* é o agente causador da esquistossomose, também conhecida popularmente como “xistose”, “barriga d’água” ou “mal do caramujo”.

Esses parasitas têm um ciclo de vida complexo, que se caracteriza pela alternância de uma fase sexuada no hospedeiro vertebrado, principalmente o homem, e uma fase assexuada no hospedeiro invertebrado. No Brasil, o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* é o caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*. Durante a fase adulta, os parasitos vivem no sistema porta intra-hepático de seu hospedeiro definitivo. Com a maturação sexual, os vermes adultos migram acasalados, para as veias mesentéricas inferiores. O macho possui um canal ginecóforo longitudinal capaz de abrigar a fêmea durante toda a vida adulta. Nas veias mesentéricas inferiores ocorre a postura dos ovos que, depois de maduros, chegam à luz intestinal e são eliminados junto com as fezes do hospedeiro. Cada fêmea é capaz de colocar cerca de 400 ovos por dia. Os ovos maduros contêm um miracídio já formado em seu interior, o qual é liberado assim que o ovo atinge a água. O miracídio então penetra em seu hospedeiro intermediário, no interior do qual se transforma em esporocisto primário. Este, por sua vez, sofre algumas modificações e passa a ser chamado de esporocisto secundário, contendo em

seu interior cercárias desenvolvidas ou em desenvolvimento. Estima-se que um único miracídio possa originar cerca de 100 a 300 mil cercárias. Estas emergem dos esporocistos e passam ao meio exterior. Já na água, nadam ativamente até atingirem o hospedeiro definitivo, onde penetram através da pele ou mucosas. No interior do hospedeiro definitivo os parasitos são inicialmente denominados esquistossômulos e migram pelo tecido subcutâneo até penetrarem em um vaso, quando então são levados até os pulmões e daí para o sistema porta, onde amadurecem, fechando o ciclo (Figura 1) (revisão em Neves, 2000). Estima-se que cada par de esquistossomos adultos pode dar origem a até 600 bilhões de esquistossomos (Gryseels *et al.*, 2006).

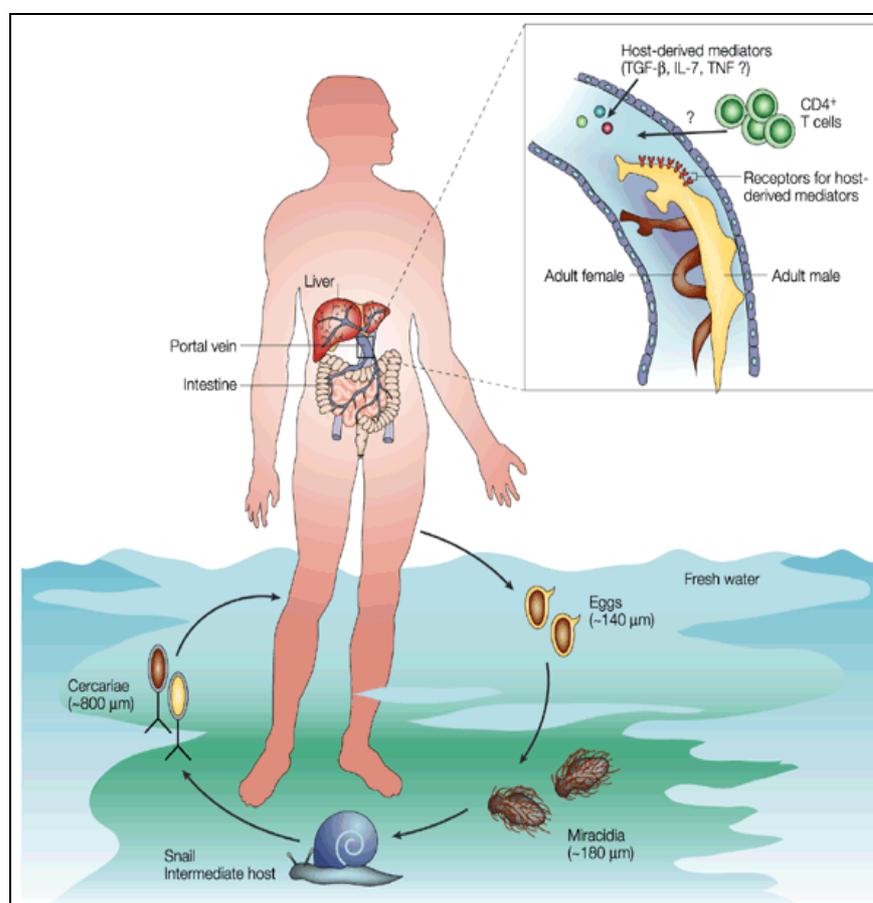


Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida do gênero *Schistosoma*. Fonte: (Pearce e MacDonald, 2002)

Ovos que não alcançam o lúmen do intestino são lançados na circulação portal e, aprisionados tanto no fígado quanto na parede intestinal, são circundados por células inflamatórias do hospedeiro formando os granulomas característicos da esquistossomose (Warren *et al.*, 1967).

Os vermes adultos podem habitar em um mesmo indivíduo por muitos anos e, durante este período, o desenvolvimento dos esquistossômulos, adquiridos por meio de reinfecções, é dificultado pela resposta imunológica induzida pelos vermes adultos já instalados (Smithers e Terry, 1965). Esta atividade imunológica foi denominada de imunidade concomitante e afeta apenas os esquistossômulos, não sendo eficaz no combate aos vermes adultos, que permanecem intactos, apesar dos altos títulos de anticorpos e da reatividade celular dirigidos contra seus componentes (Smithers, 1972; Lewis e Strand, 1991).

1.2 Tentativas de controle da esquistossomose

Em alguns países onde a esquistossomose é endêmica, programas nacionais de controle foram bem sucedidos e conseguiram reduzir a morbidade da doença a baixos níveis. A primeira tentativa bem sucedida de controle da esquistossomose ocorreu em meados de 1950, com o surgimento de moluscidas efetivos, um deles a niclosamida, hoje ainda em uso. A aplicação de moluscidas foi capaz de minimizar a transmissão em várias regiões, mas o progresso do combate à doença mostrou-se lento. O emprego dessas substâncias diminuiu e foi praticamente abandonado por diversas razões, dentre elas o risco de danos adversos ao ambiente (Sturrock, 2001).

O desenvolvimento de drogas contra as diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, dentre elas o praziquantel no início da década de 80, reavivou a expectativa de eliminação da doença. Entretanto, a grande extensão das áreas endêmicas e as elevadas taxas de re-infecções dos indivíduos juntamente com baixas condições sanitárias em países tropicais como o Brasil tornam o tratamento apenas com a droga ineficiente (Bergquist, 1998). O desenvolvimento de resistência a drogas pelos parasitas é outro fator a ser considerado (Coles *et al.*, 1986).

No Brasil, as principais dificuldades relacionadas ao controle da condição patológica envolvem fatores como o alto custo associado à implementação do saneamento básico adequado e o longo tempo necessário para a educação sanitária. Outro fator essencial é que a adesão da comunidade aos programas de controle da doença, o que também demanda um tempo considerável. Além disso, observa-se que o tratamento medicamentoso tem se mostrado eficiente no controle da morbidade, mas não na redução da prevalência devido às

reinfecções (Oliveira *et al.*, 2008). Devido a esses fatores, tem sido sugerido o uso de vacinas para aumentar o potencial imunogênico, evitar a recidiva da doença e complementar as estratégias de prevenção e tratamento da esquistossomose (Figura 2).

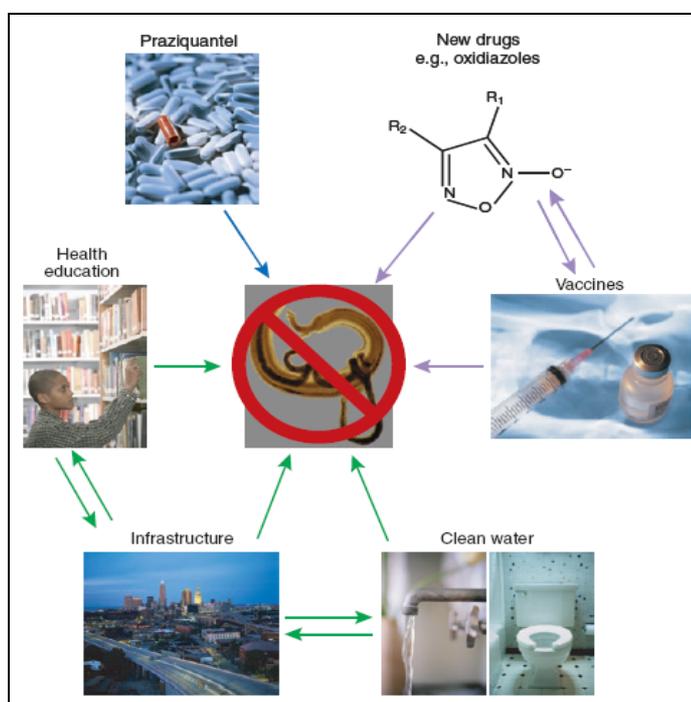


Figura 2: Interligação entre vacinação e quimioterapia, juntamente com um programa de tratamento de água e educação em saúde são uma abordagem eficaz para reduzir a infecção e morbidade da esquistossomose. No entanto, sabe-se que algumas dessas ferramentas proporcionam uma resposta mais rápida e, portanto, mais urgentes (setas verdes) enquanto outras são mais utópicas e de longo prazo (setas roxas). Fonte: (Loukas e Bethony, 2008)

1.3 Indução de imunidade protetora

Inúmeros estudos têm sido feitos no sentido de se obter uma vacina capaz de proteger o indivíduo da infecção pelo *S. mansoni* ou mesmo limitar o desenvolvimento das fêmeas, diminuindo a oviposição e, por consequência, a condição patológica gerada pela formação do granuloma em torno dos ovos (Bergquist, 1995).

A imunidade adquirida com a infecção sugere que antígenos do parasita possam ser usados como medida profilática (Capron *et al.*, 1987). Inicialmente a Organização Mundial de Saúde (WHO) e o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR)

selecionaram seis antígenos, extensivamente caracterizados, para a busca da vacina definitiva contra a esquistossomose (Tabela 1). Porém, experimentos iniciais que visaram quantificar a resposta imune protetora induzida por esses antígenos individualmente em murinos não revelaram dados satisfatórios gerando a necessidade de continuar a busca por novos antígenos (Bergquist e Colley, 1998).

Antígeno	Função	Proteção (animais isogênicos)	Lugar de desenvolvimento	Estado legal	Referencias
Glutathione S-transferase (P28/GST)	Enzima	30-60	Institut Pasteur, Lille, France	Patenteado	(Boulanger <i>et al.</i> , 1995)
Paramyosin (Sm97)	Proteína muscular	30	Case Western Reserve University/ National Institutes of Health Cornell University, USA	Domínio público	(Pearce <i>et al.</i> , 1988)
IrV-5 (62 kd)	Proteína muscular	50-70	Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA	Patenteado	(Soisson <i>et al.</i> , 1992)
Triose phosphate isomerase (TPI) (28 kd)	Antígeno de membrana	30-60	Harvard School of Public Health, Boston, USA	Domínio público	(Reynolds <i>et al.</i> , 1994)
Sm 23	Antígeno de membrana	40-50	Johns Hopkins School of Medicine/ Harvard School of Public Health, USA	Domínio público	(Reynolds <i>et al.</i> , 1992)
Sm14	Antígeno de membrana	40-65	Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Brasil	Patenteado	(Tendler <i>et al.</i> , 1996)

Tabela 1: Antígenos selecionados pela WHO/TDR como candidatos a vacina contra esquistossomose. Fonte: (Bergquist, 1998) com pequenas modificações.

Dentro desse contexto, há a necessidade de buscar novas alternativas para o aumento da capacidade protetora contra a doença. Na esquistossomose, existem evidências indicando o envolvimento de proteínas de baixo peso molecular que se ligam a GTP nos processos de maturação e deposição de ovos pelas fêmeas de *S. mansoni* (Chen e Bennett, 1993; Schussler *et al.*, 1997). A atividade das enzimas pertencentes a essa família está diretamente relacionado à sua localização na região interna da membrana citoplasmática. Modificações pós-transducionais, como a adição de um isoprenóide, proporcionam o seu ancoramento na membrana das células (Kjoller e Hall, 1999). Foi observado que a inibição da produção dos isoprenóides reduz *in vitro* e *in vivo* a produção de ovos pelas fêmeas do Schistosoma e,

consequentemente, bloqueia os efeitos patológicos da doença em camundongos infectados (Chen e Bennett, 1993). Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização do inibidor BZA-5B da enzima preniltransferase, responsável pela prenilação das proteínas (Loeffler e Bennett, 1996). Esses fatos geraram interesse na busca de uma melhor compreensão do papel protetor da Rho GTPase nos processos imunológicos decorrentes da esquistossomose.

A Rho1 GTPase de *S. mansoni* (SmRho) foi identificada primeiramente em um estudo de caracterização do perfil da expressão gênica de cercárias a partir da triagem aleatória de uma biblioteca de cDNA (Santos *et al.*, 1999). Em 2003, Vermeire e colaboradores determinaram por ensaios de Western Blot, a expressão elevada da Rho1 GTPase em parasitas adultos do *S. mansoni* em comparação às outras formas evolutivas. Curiosamente foi observada maior quantidade dessa proteína nas fêmeas em relação aos vermes machos. Ainda nesse estudo, através de imunolocalização, determinou-se a expressão da SmRho em tecidos vitelínicos dos vermes adultos fêmeas, corroborando com a hipótese de sua participação em processos de maturação e deposição de ovos.

Além disso, através de uma pesquisa da etiqueta de sequência antigênica (AST) realizada a partir de soros de pacientes diagnosticados com *S. mansoni*, foi encontrado proteínas homólogas a SmRho (Goes, dissertação de mestrado, 2003). Esse resultado sugere a capacidade imunogênica promissora da proteína em questão em infecções com *S. mansoni*.

1.4 Busca de novas estratégias de vacinação

Tem sido observado que a administração de proteínas muitas vezes não é suficiente para indução de uma resposta imune efetiva, mesmo na vacinação combinada com adjuvantes (Moll, 2003). Portanto, estratégias alternativas de vacinação estão sendo desenvolvidas a fim de superar as dificuldades encontradas na produção de vacinas para diversas patologias.

A célula dendrítica tem sido usada recentemente como vetor na construção de vacinas que, não somente induzem proteção contra patógenos, mas também aumenta a imunidade em doenças diversas como câncer (Melief, 2008), AIDS (Connolly *et al.*, 2008), auto-imunidade e alergia (Belkaid e Oldenhove, 2008). Alguns estudos relacionados ao uso dessas células em

câncer encontram-se em fases avançadas de pesquisa clínica. No entanto, o conhecimento a respeito dessa nova metodologia deve ser aprimorado e o desenvolvimento de células dendríticas geneticamente modificadas torna-se urgente para que possam ser aplicadas em uma variedade maior de doenças.

1.4.1 As células dendríticas

As células dendríticas (DCs, do inglês: “*Dendritic Cells*”) são células apresentadoras de antígenos (APCs) que são funcionalmente cruciais para a resposta imune inata e adaptativa. Elas formam um elo atuando tanto na proteção contra infecções quanto na manutenção da tolerância a antígenos próprios (Banchereau e Steinman, 1998).

As DCs compreendem um grupo heterogêneo de células que agregam subclasses com vias distintas de desenvolvimento e que apresentam funções diferenciadas. Os distintos subníveis são susceptíveis de serem selecionados pelo tipo de patógeno pelo qual gera uma resposta imune inata ou adaptativa característica (Liu, 2005; Shortman and Naik, 2007). Evidências sugerem que existem pelo menos dois troncos principais de desenvolvimento: as células dendríticas mielóides e as plasmocitóides.

As células dendríticas mielóides, caracterizadas pela expressão da integrina CD11c, abrangem a população clássica das APCs, capazes de processar os antígenos e ativar os linfócitos T (den Haan *et al.*, 2000). Foi constatado, ainda, que mesmo as células da pele (células de Langerhans) desse subnível são capazes de induzir respostas por linfócitos T citotóxicos e estimular a produção de anticorpos pelas células B (Klechevsky *et al.*, 2008). Por outro lado, as células dendríticas plasmocitóides não expressam CD11c e estão relacionadas à resposta contra infecções virais e ácidos nucleicos próprios, com produção vigorosa de IFN α (Kadowaki *et al.*, 2000; Lande *et al.*, 2007).

Há um terceiro subnível que compreende as células dendríticas derivadas de monócitos que funcionalmente compreenderia o contexto de ambos os subníveis descritos anteriormente. No entanto, essa relação não está completamente esclarecida (Steinman, 2008).

Em muitos tecidos, as células dendríticas estão presentes no estado denominado imaturo, incapazes de estimular células T, mas extremamente hábeis na captura de antígenos. Figuram-se como sentinelas, sondando o ambiente em que se situam, e respondem a estímulos indicativos de mudanças. Nesse estado são caracterizadas pela alta capacidade de realizar a fagocitose de partículas, fragmentos de células apoptóticas e necróticas além de diversos microorganismos e parasitas (Albert *et al.*, 1998; Banchereau *et al.*, 2000; Sher *et al.*, 2003). Fenotipicamente podem ser diferenciadas pela baixa expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II além de baixa expressão das moléculas coestimulatórias (Garrett *et al.*, 2000; Inaba *et al.*, 2000). Os receptores para cadeias pesadas de imunoglobulinas Fc γ RI e Fc γ RII estão presentes nessas células permitindo a captura de imunocomplexos ou partículas opsonizadas (Fanger *et al.*, 1996).

Os antígenos e partículas após serem endocitados ou fagocitados pelas DCs imaturas (imDCs) são processados em compartimentos especializados e apresentados na superfície celular juntamente com MHC. Os antígenos endógenos são processados via proteassomos, associados a moléculas do MHC classe I e apresentados aos linfócitos T citotóxicos (LTc). Esse processo é particularmente importante na imunidade contra tumores, transplantes e infecções virais. A fagocitose de corpos celulares apoptóticos e proteínas exógenas permitem a apresentação de antígenos por MHCII e a estimulação de linfócitos T auxiliares (LTh). Contudo, há ainda uma via alternativa em que antígenos exógenos podem ser associados ao MHCI através de um mecanismo chamado de “cross-priming” (Xia *et al.*, 2006).

Perante a ativação, as células dendríticas sofrem mudanças morfológicas, fenotípicas e funcionais que caracterizam a mudança para o estado maduro (mDCs) (Figura 3). Entre os vários antígenos que desencadeiam esse processo citam-se as citocinas inflamatórias (como interleucina-1 [IL-1], fator de necrose tumoral [TNF]), constituintes microbianos (como lipopolissacarídeo [LPS], CpG oligonucleotídeos) e traumas celulares (necrose, transplantes) (Steinman, 2001).

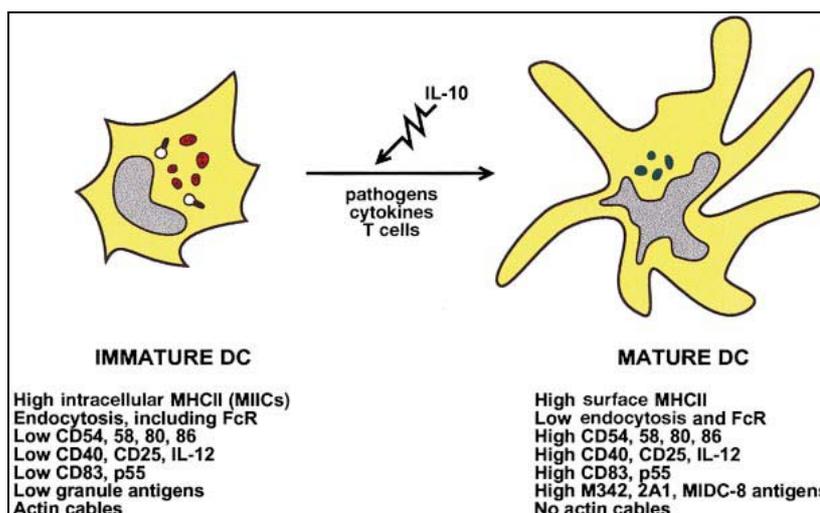


Figura 3: Características que modificam durante a maturação das DCs (Banchereau e Steinman, 1998)

Com a maturação as DCs perdem rapidamente a atividade endocítica, induzem a expressão e estabilização dos complexos peptídicos associados ao MHCI e/ou MHCII, aumentam a expressão e adesão em sua superfície de moléculas coestimulatórias (CD40, CD54, CD80 e CD86), e ainda secretam citocinas pro inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-18 e IL-23. Receptores de quimiocinas importantes nos processos inflamatórios, como o CCR6, passam a ter a sua expressão regulada negativamente e são substituídos pela expressão de CCR7 que conduzem a migração das DCs para as zonas de linfócitos T dos linfonodos. A migração das DCs maduras estimula os linfócitos T naïve e induz a resposta primária mediada pelas células T (Liu, 2001). Uma vez ativados os LT podem completar a resposta imune por interação com linfócitos B induzindo a formação de anticorpos ou com macrófagos promovendo a liberação de citocinas. Além disso, podem interagir diretamente com as células alvos lisando-as (Banchereau e Steinman, 1998)

Resumidamente as DCs convertem as informações derivadas dos tecidos em sinais que promovem e dirigem a maturação dos linfócitos T. Assim, fornecem o primeiro sinal através do reconhecimento dos peptídeos antigênicos complexados ao MHC, pelos receptores de células T (TCR). O segundo sinal é derivado dos contatos entre as moléculas coestimulatórias e de adesão aos seus respectivos receptores além dos fatores humorais secretadas por ambas as células. A combinação desses sinais resulta na ativação de LT antígeno-específico e no desenvolvimento de células efetoras ou de memória (Banchereau e Steinman, 1998; Banchereau *et al.*, 2000)

Diferentes tipos de respostas podem ser gerados dependendo da origem do sinal de maturação. Há dois grupos de sinais que podem estimular a imDC a induzir diferenciação de LTh1 ou LTh2 (Kalinski *et al.*, 1999). As moléculas derivadas de patógenos como LPS, motivos CpG bacteriano e dupla fita de RNA, assim como sinais do ligante CD40 e IFN- γ , promovem imDCs a produzir IL-12 e gerar resposta LTh1. Por outro lado, a prostaglandina E₂, em conjunto com outros fatores como IL-4 e OX40L modulam negativamente a expressão de IL-12 e direcionam a ativação de células LTh2 (Liu, 2001).

Por outro lado, os linfócitos T citolíticos CD8⁺ (LTcs) são células efetoras cruciais nas respostas imunes adaptativas contra tumores, infecções virais e patógenos intracelulares. A geração desse tipo celular ocorre em condições dependentes e independentes dos LTh. Sob condições limitantes como baixo nível de antígenos e fraca resposta imune inata, a geração dos LTcs é dependente de LTh. Dessa forma, os LThs, após ativar células dendríticas por interação CD40/CD40L, aumentam a sua capacidade de apresentação antigênica e em contrapartida, desencadeiam a ativam dos LTcs. A expansão clonal dos LTcs pode ainda ser estimulada pela secreção de IL-2 pelos LTh (Malek, 2002).

A ativação das células dendríticas pode ser ainda tolerogênica, silenciando uma resposta imune. Localizadas em regiões medulares circunscritas do timo, células dendríticas apresentam antígenos próprios aos linfócitos T impondo a distinção entre próprio e não próprio e levando a deleção de células auto-reativas e a manutenção da tolerância central. Em complemento as falhas apresentadas pela tolerância central, as células dendríticas participam da tolerância periférica. As células dendríticas imaturas de alta capacidade endocítica e fagocítica estão constantemente adquirindo e apresentando peptídeos de proteínas próprias, complexados aos MHCs, sem a presença de fatores coestimulatórios induzidos pelos processos inflamatórios nos tecidos não linfóides. Em conjunto, estas células estão em constante circulação entre os tecidos não linfóides e linfóides. Estes fatores permitem o reconhecimento de linfócitos T auto-reativos nos tecidos linfóides periféricos levando a sua deleção ou anergia (Steinman *et al.*, 2003).

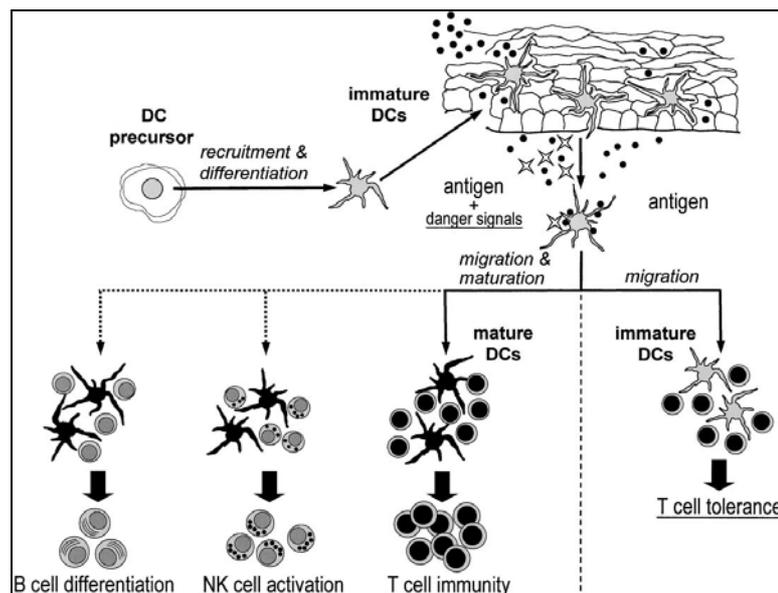


Figura 4: Visão integrada da imunobiologia da célula dendrítica. Fonte: (Ardavin *et al.*, 2004)

1.4.2 Aplicações terapêuticas

Conscientes da importância das DCs no controle da imunidade, o potencial terapêutico dessas células tornou-se uma ferramenta interessante a ser pesquisada. Acredita-se que a administração de diferentes formas de antígenos (DNA, RNA, proteínas, peptídeos, vírus, lisados celulares) tendo como vetor essas células aumenta consideravelmente a imunidade a partir da apresentação aos LT. Esse modelo terapêutico foi comprovado em evidências obtidas em estudos pré-clínicos com animais (Yang e Baltimore, 2005).

O câncer foi a patologia que obteve maior avanço em testes relacionado ao uso da DC como vetor vacinal. O melanoma foi o tipo mais estudado nesse modelo, seguido pelo câncer de próstata, carcinoma renal, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, leucemia, câncer colorretal e gliomas (Nencioni *et al.*, 2008). A maioria dos experimentos consiste do isolamento *in vitro* de células dendríticas e o posterior carregamento destas com antígenos tumorais. No entanto, diversos tipos de antígenos têm sido testados. Entre eles, citamos os antígenos derivados de células tumorais apoptóticas ou necróticas, lisados de células tumorais, peptídeos sintéticos MHC classe I restrito e DNA ou RNA codificadores para antígenos tumorais (Figura 5). Na maioria dos casos tem sido observada a regressão de tumores pré-estabelecidos (Banchereau *et al.*, 2001; Schuler *et al.*, 2003; Nencioni *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2009)

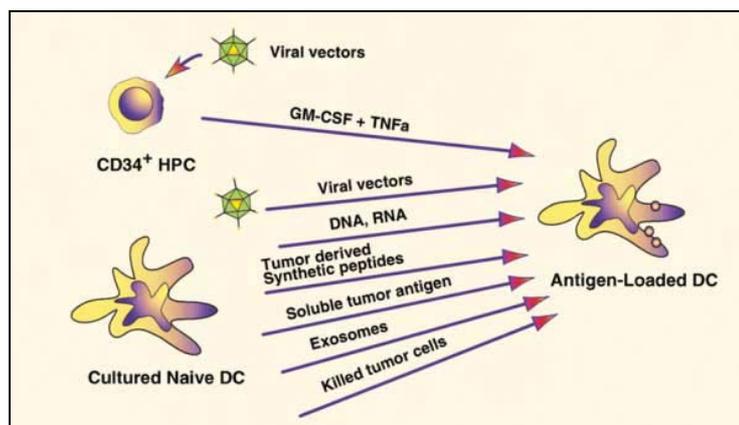


Figura 5: A preparação das células dendríticas e células tronco hematopoiéticas (CD34+) para produção de vacinas tem sido realizado de diversas formas (Banchereau *et al.*, 2001)

A vacina usando células dendríticas foi aplicada, também, em infecções parasitárias. Camundongos imunizados com DCs contendo antígenos de *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, que acomete aves e mamíferos, apresentaram potente resposta imune celular e humoral na redução de aproximadamente 70% da formação de cisto cerebral (Bourguin *et al.*, 1998). Da mesma forma, células dendríticas carregadas com antígenos de *Leishmania dovani*, causador da leishmaniose visceral murina, foram capazes de induzir resposta imune Th1 antígeno específica *in vivo* (Ahuja *et al.*, 1999). Além disso, observou-se aumento da atividade protetora contra malária a partir da indução de resposta dos LTc (Bruna-Romero e Rodriguez, 2001).

Pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) também estão sendo submetidos a vacinas baseadas em DC e até agora os resultados tem sido promissores (Connolly *et al.*, 2008).

Os estudos com vacinas usando as DCs ainda são recentes e todos necessitam de um aprimoramento para que seja induzida uma resposta mais significativa por essas células. Cita-se a necessidade de múltiplas vacinações, verificado nas vacinas baseadas nas DCs como vetores, e a falta de padronização de um método mais efetivo para a inserção do antígeno. Nos estudos com câncer, por exemplo, a forma usual de inserção dos antígenos nas DCs é através de peptídeos pulsados. No entanto, tem se observado diversas limitações como (1) o número

limitado de antígenos caracterizados; (2) a indução de um repertório limitado de células T incapacitando o controle da resposta imune perante variações antigênicas e (3) a apresentação breve dos complexos peptídeos-MHC conduzindo a uma ineficiente apresentação das DCs injetadas. Estratégias alternativas que fornecem ambas as respostas MHC classe I e classe II e conduzem ao envolvimento de diversos clones de LT CD4⁺ e LT CD8⁺ são necessários. Dessa forma é necessário incluir proteínas recombinantes, vetores virais, transfecção com DNA plasmidial ou RNA (Fong e Engleman, 2000; Murphy *et al.*, 2005).

Como método alternativo, tem-se mostrado promissor a vacinação por DNA codificador. Nessa técnica, o cDNA sintetizado ou isolado a partir de tecidos ou células, quando injetado em camundongos demonstraram geração de resposta antígeno específica (Gilboa e Vieweg, 2004). Assim, como descrito anteriormente, é esperado que a apresentação desses antígenos pelas DCs seja mais eficaz na resposta imune e para tal é necessário inserir esses genes nas células.

Atualmente, a terapia genética utiliza dois tipos principais de entrega de genes denominados vetores virais e vetores não virais. Os vetores não virais são representados principalmente por métodos químicos de transferência de genes. Usualmente consistem em lipossomos catiônicos com capacidade de condensar e internalizar o DNA, ou polímeros que podem interagir eletrostaticamente com a carga negativa dos plasmídeos para formar nanopartículas. A vantagem desses vetores sobre os virais são que: (1) não têm limitação no tamanho do plasmídeo a ser inserido; (2) são menos imunogênicos e (3) são mais fáceis de serem produzidos. Entretanto, uma grande inconveniência é a menor eficiência de transfecção obtida em comparação com os vetores virais. Os vetores virais incluem retrovírus, adenovírus, vírus herpes simples, dentre outros, e apesar da grande capacidade de transfecção apresentam muitos problemas a serem abordados e o principal refere-se à segurança na sua administração *in vivo* podendo ser letal (Kirchweger, 2002; Xia *et al.*, 2006). Limitações dos vetores virais incluem ainda o seu rápido depuramento da circulação, a reduzida capacidade da quantidade de informação genética carregada e os riscos da toxicidade imunogênica (Romano *et al.*, 2000). Por essas razões, há um interesse maior no desenvolvimento de um sistema de entrega de gene não viral que seja eficiente e seguro.

Nesse contexto, uma ferramenta de vacina interessante seria o acoplamento da segurança e vantagens dos vetores não virais a uma metodologia de transfecção eficiente nas células dendríticas. A exploração do potencial imunogênico das DCs poderia, dessa forma, ser realizada pela expressão de genes de escolha, e empregada para diversas doenças atualmente sem perspectivas como a esquistossomose.

2 – Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imune protetora de camundongos vacinados com células dendríticas modificadas contendo o gene da Rho1-GTPase de *S. mansoni*.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o cultivo primário de células dendríticas a partir de células da medula óssea murina;
- Transformar células dendríticas para expressão do gene Rho1-GTPase de *S. mansoni*;
- Comparar métodos de transfecção das células dendríticas;
- Expressar a proteína Rho1-GTPase em modelo procarioto.
- Imunizar camundongos com células dendríticas modificadas e com a proteína recombinante Rho1-GTPase.
- Avaliar e comparar a atividade protetora da resposta imune induzida pelos dois sistemas de imunização.

3–Metodologia

3.1 Meios de cultura

3.1.1 Meio de cultura basal

D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de Sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/ mL e 0,25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco).

3.1.2 Meio de cultura para diferenciação em células dendríticas

Objetivando a diferenciação de células tronco em células dendríticas foi acrescentado ao meio de cultura basal 30% do sobrenadante de cultura da linhagem celular Ag8653 que expressa a citocina fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), recombinante de camundongo (Stockinger *et al.*, 1996).

3.2 Produção do meio condicionado a partir de células Ag8653

As células Ag8653 provenientes de mieloma são transfectadas com cDNA de GM-CSF murino. A sequência genética foi isolada de um clone de célula T e inserida em um vetor de expressão (BCMGSNeo). Após a transformação, as células secretam essa citocina que pode ser coletada a partir do sobrenadante. As células foram cultivadas por aproximadamente duas semanas, quando atingiram o crescimento exponencial. No entanto, o sobrenadante só foi coletado após a seleção das células que contém o plasmídeo de expressão, através da adição do antibiótico seletivo. O plasmídeo utilizado confere resistência a geneticina e dessa forma, permanecem viáveis somente as células contendo o vetor. A geneticina (Sigma) foi adicionada na concentração de 500 µg/mL de meio. Após dois dias de incubação, em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂, as células foram centrifugadas e duas vezes lavadas a fim de retirar o antibiótico e as células mortas. O sobrenadante, então, foi coletado por, no máximo, duas semanas. As células foram novamente congeladas por alguns meses e, posteriormente, submetidas ao mesmo procedimento. Evita-se o cultivo dessa linhagem em longo prazo a fim de evitar a proliferação das células que não são capazes de produzir a citocina. As células Ag8653 (figura 6) foram gentilmente cedidas pelo Dr.Oscar-Bruna Romero do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

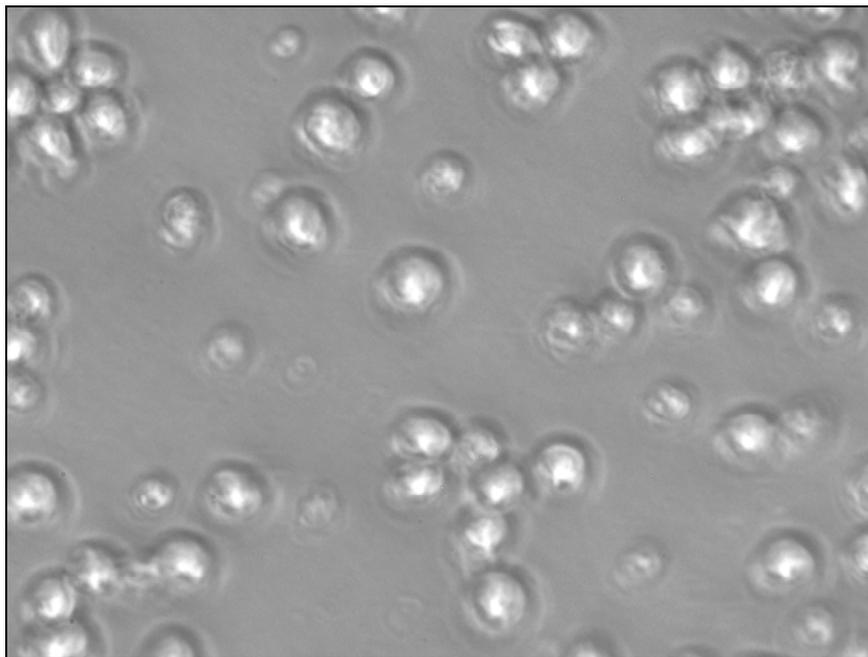


Figura 6: Células Ag8653 usadas para produção da citocina GM-CSF. *Aumento 600x.*

3.3 Extração de células tronco murinas

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade entre 4 e 12 semanas, foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram suas tíbias e fêmurs coletados. Após a retirada do tecido muscular circundante, os ossos foram colocados em solução de etanol 70% por 2 a 5 minutos para desinfecção e lavados com o meio basal. Em fluxo laminar, as diáfises dos ossos recolhidos foram cortadas e a medula foi retirada através do influxo de meio basal promovido por uma seringa. As células foram coletadas em um tubo de 50 mL e submetidas a uma filtração, em separadores de nylon com a malha de 70 μm (BD FALCON), para a remoção de detritos e agregados celulares. O material coletado foi, então, centrifugado a 400 g por 10 minutos a 10°C e o pellet suspenso em meio de cultura para diferenciação em células dendríticas. O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética animal (anexo 1).

3.4 Diferenciação das células tronco hematopoiéticas em células dendríticas

A geração das células dendríticas a partir das células tronco hematopoiéticas murinas foi realizado a partir de modificações da metodologia descrita por Lutz e colaboradores (1999). As células tronco imediatamente após a extração foram submetidas à contagem em câmara de

Neubauer. Em placas de petri de 100 mm de diâmetro foram plaqueadas 3×10^6 células em um volume de 10 mL do meio final de diferenciação. A cultura celular foi mantida em estufa à 37°C e 5% de CO₂. No terceiro dia de cultura foram acrescentados 10 mL de meio de diferenciação por placa. No sexto dia de cultura o meio foi retirado da placa e centrifugado a 400 g por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em 10 mL de meio para diferenciação e devolvidas à placa de origem. No oitavo dia de cultivo o procedimento anterior foi repetido e as células foram novamente incubadas até que fossem realizados os ensaios experimentais.

3.5 Células HEK 293T

Células HEK 293T (ATCC) são células derivadas do rim embrionário humano e foram cultivadas em meio de cultura basal com 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂. As células HEK (figura 7) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli, do departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

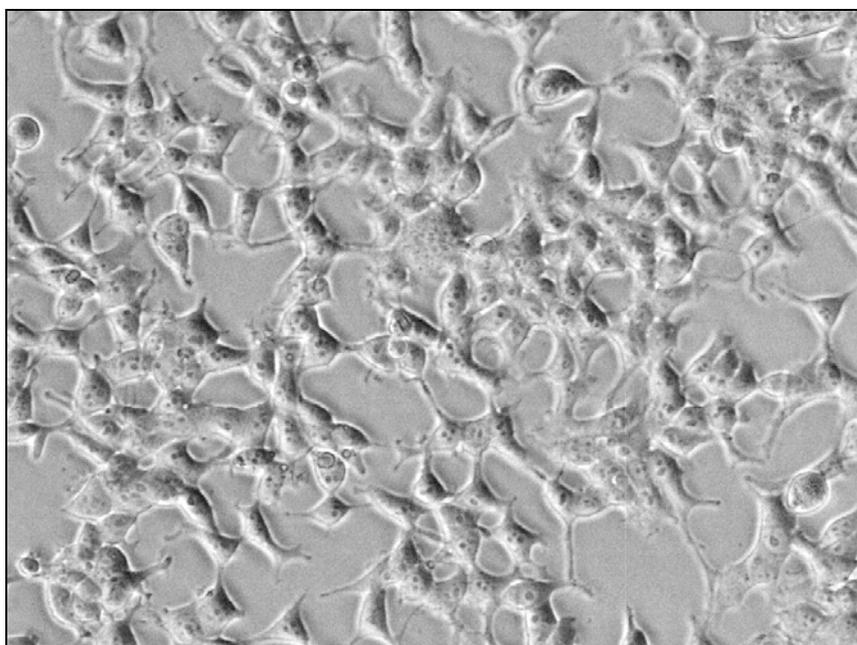


Figura 7: Células HEK 293T. Aumento 150x

3.6 Caracterização das células dendríticas por citometria de fluxo

Após a diferenciação, as células foram caracterizadas por citometria de fluxo por meio da análise da presença dos marcadores de superfície celular CD11c, CD86 e CD40 (BD Biosciences Pharmingen). Além disso, foram analisadas a expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade pelos marcadores I-Ab (MHC II) e H-2Db (MHC I) (BD Biosciences Pharmingen). A capacidade de maturação das células dendríticas foi avaliada por sua ativação através da adição de lipopolissacarídeo (LPS) (1 mg/ml) por 18 h. As marcações, bem como concentração final de cada anticorpo, definida após titulação foi descrita na tabela 2.

Anticorpo	Marcação	Concentração do anticorpo
CD 11c	FITC	0,5 µg/20µl
CD 86	PE	0,3 µg/20µl
CD 40	PE	0,2 µg/20µl
IA-b	PE	0,2 µg/20µl
H-2Db	PE	0,4 µg/20µl
Controle isotipo	FITC	0,2 µg/20µl
Controle isotipo	PE	0,2 µg/20µl

Tabela 2: Concentração dos anticorpos usados na caracterização fenotípica das células da medula óssea após diferenciação para células dendríticas

3.6.1 Marcação celular com anticorpos monoclonais ligados a fluoresceína

Em uma placa de 96 poços com fundo côncavo (Nunc) foram colocadas 1×10^6 células por well. A placa foi centrifugada a 400 g por 10 minutos e, a cada amostra, foi adicionado 0,3 µg do anticorpo bloqueador de receptores inespecíficos FcII/III (FcRII/III), CD16/CD32 (BD Biosciences Pharmingen). Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS) e incubadas com os anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína por 20 minutos, ao abrigo da luz, a 4°C. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 15 minutos com a solução de lavagem B (0,5% de albumina bovina sérica, 2mM de azida em PBS), depois fixadas em PBS contendo 2% de formaldeído por, pelo menos, 30 minutos. Como controle negativo de fluorescência, foram marcadas amostras com o controle de isotipo ligado às fluoresceínas utilizadas. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade.

3.6.2 Leitura no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System)

Um mínimo de 20.000 eventos foram adquiridos e analisados, utilizando o programa CELLQuest. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada em gráficos de tamanho versus granulosidade, observando as características da população celular desejada. Posteriormente, foram usados gráficos de dotplot a fim de delimitar a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o controle de isotipo anti-IgG1, marcado com FITC e com o controle de isotipo anti-IgG2a, marcado com PE. A partir da definição destes parâmetros, iniciou-se a análise da dupla marcação das células com o anticorpo ligado a FITC (CD11c) e à fluoresceína PE (CD86, CD40, I-Ab e H-2Db).

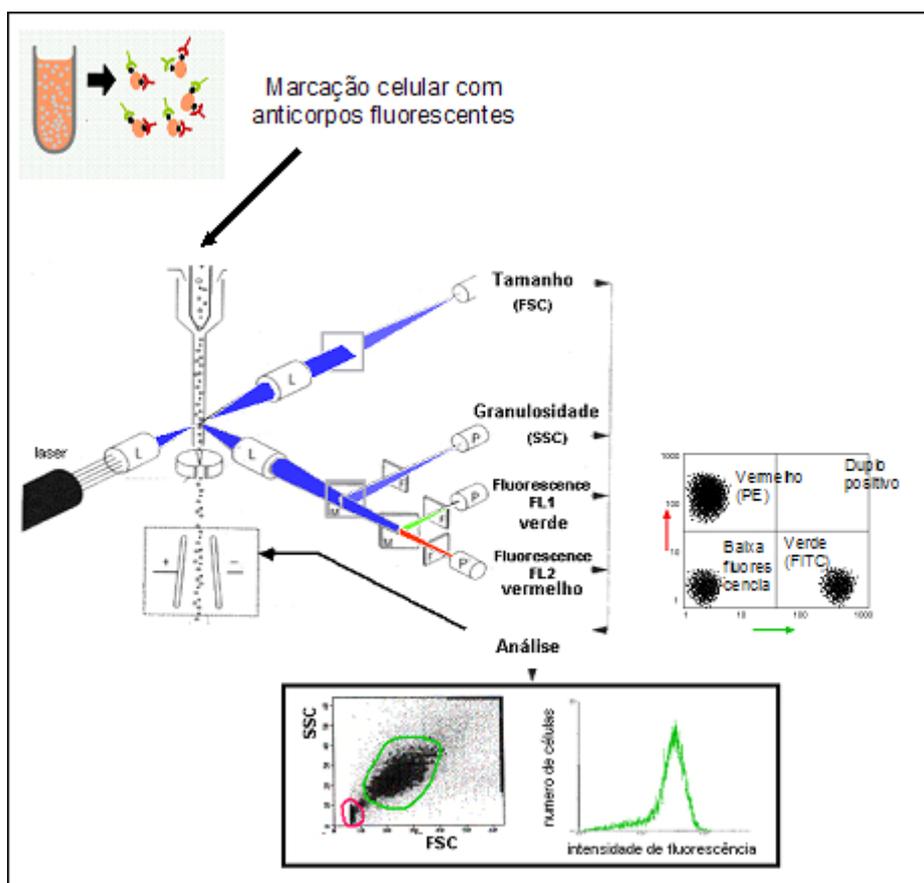


Figura 8: Representação esquemática da citometria de fluxo. Após a marcação celular com anticorpos conjugados ao FITC e/ou ao PE, as células são submetidas à citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência é interpretada pelo programa CELLQuest.

3.7 Teste de viabilidade e metabolismo celular

O ensaio de metabolização do metil tetrazol, MTT, é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura o metabolismo celular, proliferação e estado de ativação das células (Mosmann, 1983). Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, em converter o substrato MTT, solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Em uma placa de 24 poços (Nunc) foram colocadas 4×10^5 células/ poço com a quantidade de meio basal final correspondente a 210 μ l. Foram acrescentados às células, 170 μ l da solução de MTT (Sigma) 5 mg/mL, a cada poço. A placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37°C por 2 horas e, em seguida, as células foram observadas em microscópio óptico para a visualização dos cristais de formazan. Foram acrescentados a cada poço 210 μ l de SDS10%-HCl para a solubilização dos cristais. Após 18 horas, foram recolhidos 100 μ l de cada poço e a leitura dos valores de absorbância da solução resultante foi realizada a 595 nm em um leitor automático de micro placas (Elx800, Bio-Tek, Instruments Inc.).

3.8 Ensaio de fagocitose de esferas de látex conjugadas ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

As células apresentadoras de antígenos são capazes de fagocitar esferas de látex, fato que pode ser utilizado para, indiretamente, verificar sua viabilidade funcional (Matsuno *et al.*, 1996). Desta forma, no décimo dia de cultivo, 1×10^6 células dendríticas foram incubadas em tubo de 50 mL contendo 3 mL de meio para diferenciação, acrescido de $5,6 \times 10^6$ esferas de látex (ϕ 0,2 μ m) conjugadas a FITC (Polysciences. Inc.) durante 3 horas a 37°C em estufa úmida com 5% CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram separadas das esferas não fagocitadas através de lavagem e decantação. O procedimento de lavagem consistiu em acrescentar à suspensão celular igual volume de PBS 0,15M e centrifugá-la a 400 g por 10 minutos a 10°C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi suspenso em 1 mL de meio basal. Em um tubo de 15 mL contendo 10 mL de meio basal foi colocado o volume total da amostra e, decorrido 1 minuto, foram coletados 3 mL de meio da

superfície. Em seguida, foi adicionado iodeto de propídeo (PI) nas células coletadas. O PI é capaz de penetrar na célula morta e/ou viva, dependendo da concentração utilizada, corando o núcleo através da ligação com o DNA. Por fim, as amostras foram novamente centrifugadas e o pellet foi suspenso em 200 µl de solução fixadora (2% de paraformaldeído). A leitura foi realizada em microscópio confocal (Zeiss Hall 100).

3.9 Clonagem do gene da Rho1-GTPase de *S. mansoni* em vetor de expressão de células de mamíferos

3.9.1 Obtenção do gene da Rho1-GTPase de *S.mansoni* (SmRho)

A sequência codificadora da proteína SmRho foi clonada no plasmídeo pMal-c2X (NE BioLabs) em fusão com o gene *male* (Goes, dissertação de mestrado, 2003). Com o objetivo de confirmar que a sequência gênica completa havia sido inserida no plasmídeo, realizamos nova transformação em bactéria *Escherichia coli* TOP10, purificação em baixa escala plasmidial e sequenciamento.

3.9.2 Amplificação do gene da Rho1-GTPase de *S. mansoni*

O plasmídeo contendo o gene da SmRho foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores usados foram RHO1F (5' -ATG GCG AGT GCG GTA CGT AAG-3') e RHO1R (5' - TCA AAT TAA ATC ACA CCT CCT CCT CTT- 3'). Cada reação continha um volume final de 50 µl, com 200 ng dos iniciadores, 50 mM de dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) em tampão de reação 5x (Fermentas) e 50 ng do plasmídeo. As reações de amplificação foram realizadas com um aquecimento inicial de 94°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, e 72°C por 15 minutos utilizando-se o termociclador PTC-100 MJ (Research. Inc.). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com SyberSafe para a sua visualização.

3.9.3 Clonagem no vetor de expressão de células de mamífero

O fragmento da SmRho amplificado foi inserido no vetor de expressão *NT- GFP fusion TOPO TA* (Invitrogen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O vetor linearizado desse Kit possui resíduos de deoxitimidina (T) que permitem uma ligação

eficiente com o produto de amplificação já que a enzima Taq polimerase adiciona, no final da reação de PCR, uma região de deoxiadenosina (A) na terminação 3'. Após a ligação, bactérias eletrocompetentes foram transformadas. Os clones obtidos foram testados por PCR e por digestão com as enzimas de restrição ApaI e KpnI (Promega). O ponto crítico da expressão protéica é a visualização da proteína GFP, presente no vetor, que só é expressa quando a clonagem ocorre corretamente devido à posição em frame com o local de ligação da sequência de interesse. Dessa forma pode-se visualizar, indiretamente, a expressão da proteína SmRho por microscopia de fluorescência.

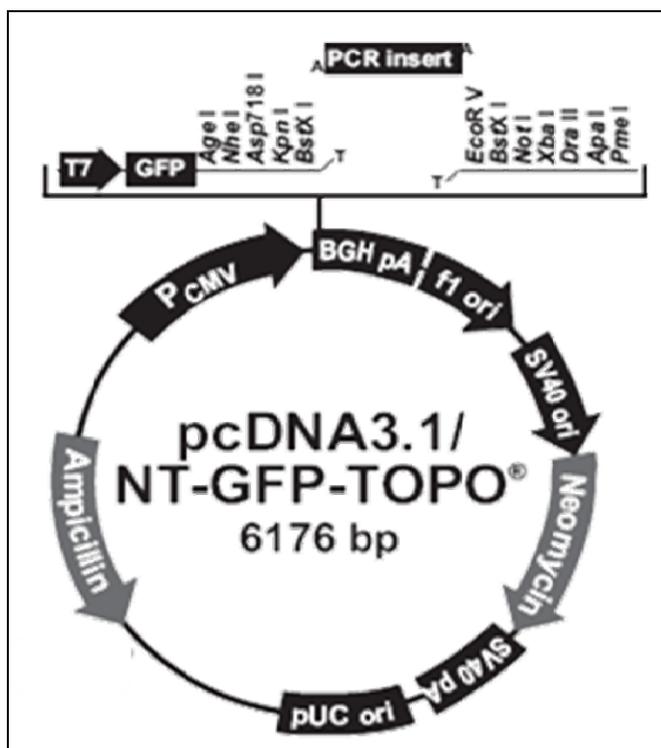


Figura 9: Plasmídeo pcDNA3.1/NT- GFP fusion TOPO TA usado como vetor de expressão em células de mamífero.

3.9.4 Purificação do DNA plasmidial em pequena escala.

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Kit Miniprep (Qiagen) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Após a purificação, o DNA foi dosado por espectrofotômetro (*Biophotometer, Eppendorf*). Quatro colônias positivas foram escolhidas e analisadas por sequenciamento. O clone que apresentou maior homologia foi selecionado e utilizado nos diversos ensaios.

3.9.5 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método da terminação da cadeia de DNA por incorporação de didesoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977). Os iniciadores usados foram GFP Forward (5' - CGA CAC AAT CTG CCC TTT CG - 3') e BGH Reverse (5' - TAG AAG GCA CAG TCG AGG - 3'), conforme instruções do “ABI Prism[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (PE Applied Biosystems).

3.10 Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial através de nanopartículas de quitosana

3.10.1 Preparação das micropartículas de quitosana

Quitosana 85% deacetilada (Sigma) foi solubilizada conforme descrito na literatura em 2007 com algumas modificações (Cui e Mumper, 2001; Zhu *et al.*, 2007). Resumidamente, uma solução de quitosana a 1,0% (peso/volume) foi preparada em água MilliQ contendo 2% (volume/volume) de ácido acético e solubilizada *overnight* à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi diluída até a concentração de 0,5% (peso/volume) em água MilliQ e o pH ajustado para 5,5 com solução de hidróxido de sódio 5M. As concentrações de 0,01%; 0,02% e 0,05% foram preparadas a partir da solução de pH 5,5. Em seguida, 10 mL de cada solução foram colocados em tubos de 50 mL e autoclavados.

3.10.2 Ligação do DNA à quitosana

As diferentes concentrações de quitosana estéreis foram usadas para a ligação ao plasmídeo. O DNA utilizado foi obtido a partir da extração plasmidial em pequena escala e, após dosagem, foi submetido à secagem em sistema de vácuo. A ressuspensão do DNA foi feita com solução 4,3 mM de sulfato de sódio a fim de se obter a concentração de 200 µg/mL. Nanopartículas foram preparadas por coacervação complexa que consiste na combinação de duas soluções de cargas opostas, causando interação e precipitação (Mao *et al.*, 2001). Dessa forma, 100 µl da solução de DNA foram adicionados a 100 µl da solução de quitosana e imediatamente vortexadas a velocidade máxima por um minuto. Posteriormente, a amostra foi submetida à temperatura de 55°C por quatro horas. A solução de nanopartículas produzida foi usada para os experimentos de transfecção sem outras modificações (Corsi *et al.*, 2003).

3.10.3 Transfecção do DNA ligado à quitosana nas células dendríticas

Uma densidade de 3×10^6 células foram colocadas em tubos de 50 mL contendo 3 mL de meio de cultura para diferenciação de células dendríticas. Posteriormente foram adicionados 500 μ l de meio de cultura contendo somente DNA ou nanopartículas de quitosana-DNA com o equivalente a 7 μ g de DNA. Após a incubação overnight, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂, foi acrescentado 1 mL de meio completo e as células foram incubadas por mais 60 horas pós-transfecção. A análise do ensaio foi realizada em microscopia confocal (Zeiss Hall 100).

3.11 Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando Effectene

Uma vez que as APCs, principalmente as DCs, têm a capacidade de processar os antígenos, proporcionam a degradação da proteína GFP transfectada e tornam, dessa maneira, a fluorescência emitida comumente breve e de difícil análise. Além disso, é conhecido que a eficiência de transfecção é dependente de diversos fatores incluindo o tamanho do plasmídeo. Com o objetivo de minimizarmos essas interferências realizamos procedimentos de otimização com células HEK.

A transfecção transiente realizada com o auxílio do “Effectene Transfection Reagent” (Qiagen) foi feita de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As células foram colocadas em placas de 6 poços em uma densidade de 6×10^5 células/well. No dia seguinte, foram adicionadas às células diferentes concentrações de DNA submetidos à ligação ao reagente na proporção de 1:10. Durante 24, 48 e 72 horas as células foram observadas por microscopia de fluorescência. A análise por citometria de fluxo foi realizada 72 horas após a transfecção.

3.12 Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando GeneJuice

A transfecção com o reagente “GeneJuice Transfection Reagent” (Novagen) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As células HEK foram novamente usadas nos

procedimentos de otimização. Em uma placa de 6 poços colocou-se 6×10^5 células/well, 24 horas antes da realização do ensaio. Após o período de incubação, as células foram submetidas às diversas concentrações de DNA fusionado. Durante 24, 48 e 72 horas as células foram observadas por microscopia de fluorescência. A análise por citometria de fluxo foi realizada após 72 horas de transfecção.

3.13 Análise da presença do gene da SmRho nas células transfectadas

As células aderentes HEK, decorridas 72 horas de transfecção, foram submetidas a duas lavagens com tampão PBS a fim de retirar células mortas e DNA não incorporado. Com o uso de tripsina (2,5 mg/mL) as células foram desprendidas da garrafa, coletadas e centrifugadas a 400 g por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em 50 μ l de H₂O deionizada e colocado sob aquecimento até alcançar fervura. A amostra foi rapidamente centrifugada em baixa rotação apenas para baixar o lisado celular. O DNA que se encontrava dentro das células após esse procedimento permanece no sobrenadante. Seguindo a extração de DNA, realizou-se com 4 μ l do sobrenadante uma reação de PCR, com volume final de 25 μ l, utilizando os primers específicos da RHO1-GTPase. A presença do gene de interesse foi confirmada pela visualização da amplificação em gel de agarose 1%.

3.14 Produção da proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni* em sistema procarioto

Com o objetivo de expressar a proteína de interesse, utilizamos o plasmídeo pMal-c2X (NE BioLabs) contendo a sequência codificadora da Rho1-GTPase. A transformação foi realizada em bactéria *Escherichia coli* BL21. Treze clones foram escolhidos aleatoriamente e testados através de PCR usando os primers específicos da Rho1-GTPase. Dois clones positivos foram submetidos à análise da expressão através de mini-expressão e, posteriormente, o clone escolhido foi submetido à maxi-expressão. Essa construção foi denominada de pMal/SmRho.

3.14.1 Expressão da Rho1-GTPase em fusão com MBP

A expressão utilizando pMal/SmRho foi realizada segundo manual do fabricante (NE BioLabs) com modificações.

3.14.2 Expressão em pequena escala

O pré-inóculo com 20 µl de cultura bacteriana foi preparado com 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. A incubação ocorreu por 16 horas, sob agitação, a 37° C. No inóculo foram usados 10 mL de meio LB/ampicilina e 1 mL da cultura bacteriana saturada. O crescimento bacteriano é realizado sob agitação a 37° C até atingir a densidade de, aproximadamente, 2×10^8 células/mL ($A_{600} \sim 0,5$). Para induzir a expressão protéica foi acrescentado, nesse momento, 0,6 mM de IPTG e incubou-se por mais 4 horas a 30° C sob agitação. Nos intervalos subsequentes de uma hora, incluindo o momento imediato antes da indução (tempo zero), as amostras foram coletadas e tiveram a absorbância medida. Ao final do tempo de incubação as células foram recuperadas por centrifugação a 9000 g por 10 minutos e ressuspendidas em 1 mL de PBS. A expressão foi avaliada por meio da visualização em gel de poliacrilamida 10% com SDS em condições desnaturantes.

3.14.3 Expressão em grande escala

Algumas modificações são inerentes a grande quantidade de proteína a ser expressa por essa metodologia em relação ao procedimento de expressão em pequena escala. As diferenças consistiram, inicialmente, no volume do pré-inóculo (10 mL) e do inóculo (1 L). O crescimento e a indução ocorreram da mesma maneira. No entanto, ao recuperar as células o sedimento foi ressuscitado em 50 mL de tampão da coluna (20 mM de Tris HCl pH 7,4, 200 mM de NaCl, 1mM EDTA). Com o objetivo de lisar as bactérias e obter a proteína solúvel, realizou-se 3 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria a 37° C) seguido por sonicação: 3 pulsos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos a 30% de amplitude (Ultrasonic Processor GEX 600, CE). A suspensão foi centrifugada a 9000 g por 30 minutos e o sobrenadante conservado a - 20° C.

3.14.4 Cromatografia de afinidade em resina de amilose

Com o objetivo de purificar a SmRho fusionada a MBP (SmRho/MBP), os sobrenadantes da cultura da expressão induzida foram submetidos à cromatografia de afinidade. A coluna de resina de amilose (NE BioLabs) foi acoplada ao sistema cromatográfico “Econo Low Pressure Chromatography System” (Biorad) e os sobrenadantes foram aplicados, diluídos 1:5 em tampão da coluna. As proteínas que ficaram retidas na matriz foram eluídas com o tampão de

coluna acrescido de 10 mM de Maltose. A eficiência da purificação foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS em condições desnaturantes.

3.14.5 Clivagem da proteína fusionada SmRho/MBP com fator Xa.

Seguindo o protocolo do fabricante NE BioLabs, cada 100 mg de proteína fusionada foi submetida à clivagem com 1 mg de fator Xa na temperatura de 4°C. O tempo de clivagem foi padronizado e analisado em gel SDS 10%.

3.14.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições redutoras e desnaturantes (Laemmli, 1970). O gel de separação a 10% foi preparado a partir de 1,7 mL de solução estoque acrilamida/bisacrilamida (30:0,8). Foram acrescentados ainda 1,3 mL de 1M Tris HCl pH 8,8; 0,05 mL de solução SDS 10% e 2 mL de água deionizada. O gel de aplicação e concentração da amostra foi usado a 3% contendo, dessa forma, 500 µL da solução estoque de acrilamida/bisacrilamida; 380 µL de 1M Tris HCl pH 6,8; 30 µL de solução SDS 10% e 2,1 mL de água deionizada. A reação de polimerização de ambos os tipos de géis foi proporcionada pela adição de persulfato de amônio e TEMED (Sigma) nas concentrações finais de 0,1% (p/v) e 0,1% (v/v), respectivamente. As amostras a serem analisadas foram diluídas em SDS (2%) e 2-Mercaptoetanol (5%). Depois de homogeneizadas, as amostras foram fervidas durante 15 minutos para completar a desnaturação. O gel de poliacrilamida, imerso em tampão de corrida (0,125 M tris/glicina contendo 0,1% SDS) foi submetidos a 80 V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Um padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad) foi corrido simultaneamente às amostras. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução 0,15% de azul de comassie R-250 sob agitação e descorado, inicialmente, com descorante forte (50% metanol, 10% de ácido acético) e, posteriormente, com solução descorante fraca (5% metanol, 7,5% ácido acético).

3.14.7 Eletrotransferência de proteínas - Western blot

Segundo técnica adaptada a partir de Towbin e colaboradores (1979), após a corrida eletroforética, o gel foi colocado sobre membrana de nitrocelulose e submetido à corrente constante de 100 mA, durante 1 h, a 4°C. Em seguida, a membrana foi bloqueada, por 1 h, com PBS 0,15 M contendo 1,6% de caseína. Após sucessivas lavagens com PBS tween

0,02%, a membrana foi incubada, por 1 h, com o anticorpo primário diluído 1:2000 em PBS caseína 0,25%. O anticorpo utilizado foi o soro produzido em camundongos imunizados com Rho/MBP, gentilmente cedido pela Dra. Glória Regina Franco, do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Seguiu-se a incubação por 1 h com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, na diluição 1:5000, conjugado com peroxidase e a lavagem da membrana. A revelação foi feita com solução de 60% DAB (p/v) acrescido de 20 µl de peróxido de hidrogênio e 200 µl de cloreto de níquel 5% (p/v). Para interromper a revelação, a membrana foi lavada com água bidestilada.

3.15 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Com o objetivo de dosar as proteínas purificadas para realização de ensaios posteriores utilizou-se o método de Bradford. A cada poço de uma placa de microtitulação (Nunc) foi adicionado 20 µL da amostra a ser dosada e 180 µL de reagente de Bradford [0,1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa com 5% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido fosfórico (filtrado em papel filtro número 1)]. Juntamente com as amostras, uma curva-padrão de 0,5 a 1,5 µg de proteína/20 µL foi feita utilizando-se uma solução padrão de albumina de soro bovina (Sigma). A preparação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz e os valores de absorbância determinados a 600 nm em leitor de ELISA (Elx 800, Bio-tek Instruments Inc.). A concentração protéica da amostra foi determinada fazendo-se uso da equação da curva padrão, calculada pelo programa estatístico MicroCal Origin V. 5.0.

3.16 Imunização de animais experimentais

Com o objetivo de avaliar a capacidade protetora contra esquistossomose, foram divididos 6 grupos experimentais de animais C57BL/6, fêmeas. Contendo 5 animais em cada grupo a divisão foi feita da seguinte forma:

A	Solução salina (PBS 0,15M)	100 µl	via intravenosa
B	Células dendríticas não transfectadas	1 x 10 ⁶ células	via intravenosa
C	Células dendríticas transfectadas usando “GeneJuice Transfection Reagent”	1 x 10 ⁶ células	via intravenosa
D	Plasmídeo SmRho/TOPO	100 µg	via intramuscular
E	Proteína SmRho em gel SDS + adjuvante	15 µg/150 µl	via intramuscular
F	Adjuvante	150 µl	via intramuscular

Tabela 3: Grupos experimentais da imunização com sua respectiva via de administração e quantidade de antígeno inoculado.

As diferentes vias foram escolhidas de acordo com o tipo de antígeno que estava sendo testado. De acordo com a literatura, é mais usual a imunização com plasmídeo e proteína pela via intramuscular, da mesma maneira como é esperado que, pela via intravenosa, as células possam ter maior migração e induzir maior proteção. O adjuvante utilizado no experimento juntamente com a proteína e no grupo controle “F” foi a combinação de 100 µg de *Corynebacterium parvum* e 1 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃]. Os animais receberam três doses, a intervalos de 15 dias. Todas as metodologias envolvendo animais foram realizadas conforme aprovação do comitê de ética em experimentação animal (CETEA) (anexo 1).

3.17 Avaliação da resposta imune protetora dos camundongos vacinados frente à infecção desafio com cercárias

3.17.1 Cercárias

Cercárias de *S. mansoni*, obtidas de caramujos *B. glabrata* infectados, foram gentilmente doadas pelo Instituto de Pesquisa Renee Rachou. Para contagem das cercárias, 50 mL da suspensão de cercárias doadas foram transferidas para um béquer de 100 mL. Nesse béquer foi colocado uma lâmina de plástico rígido, perfurada, destinada a homogeneizar a suspensão, garantindo uma distribuição uniforme das cercárias. Amostras de 0,5 mL da suspensão foram distribuídas em placas de vidro quadriculadas, onde as cercárias foram coradas com lugol para realização da contagem das mesmas.

3.17.2 A infecção desafio

Os seis grupos de camundongos foram infectados após quinze dias da última imunização através da via percutânea. Nesse procedimento, os camundongos foram anestesiados com 200 μ l de uma solução de cetamina 10% combinada com xilazina 10% em PBS 0.15M. A região ventral dos camundongos foi raspada e 200 μ l de água contendo 25 cercárias foram colocados em contato com a pele dos animais durante 1h para que ocorresse a infecção espontânea (figura 10).



Figura 10: Procedimento de infecção percutânea realizado mostrando os camundongos anestesiados e imobilizados. As cercárias estão em contato com a pele do camundongo e delimitadas por meio de uma lâmina com um orifício circular.

3.17.3 Perfusão

Os camundongos C57BL/6 foram sacrificados e tiveram o sistema porta- hepático perfundido, conforme técnica descrita por Smithers e Terry (1965). O mesentério e o fígado foram separados através da ligadura da veia renal. A fim de permitir a passagem dos vermes a veia porta foi seccionada. Em seguida, com o auxílio de uma agulha acoplada a um pipetador automático, uma solução salina (NaCl 1,7%) contendo 0.05 U/mL de heparina foi injetada na artéria aorta descendente, permitindo a perfusão das veias mesentéricas e a coleta dos vermes presentes. Os vermes adultos recuperados foram quantificados com o auxílio de lupa.

3.17.4 Quantificação da atividade protetora

A avaliação da atividade protetora de cada grupo foi analisada segundo protocolo descrito por Goes e Ramalho-Pinto (1991). Dessa forma, o número total de vermes adultos recuperados no grupo de interesse (GI) foi comparado ao número total recuperado no grupo controle, imunizado com salina (GC), utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de proteção} = \frac{\text{GC} - \text{GI}}{\text{GC}} \times 100$$

3.17.5 Análise da produção de anticorpos

Amostras de sangue de três camundongos de cada grupo foram coletadas com a finalidade de acompanhar o nível de anticorpo IgG total produzido. O soro inicial, antes das imunizações, foi coletado através de uma pequena incisão na cauda dos animais. Da mesma maneira, foram obtidas as amostras de sangue após a última imunização e 15, 30 e 45 dias após a infecção. A separação do soro foi realizada por meio da centrifugação das amostras na rotação de 400 g por 10 minutos. A monitorização dos anticorpos foi feita pelo ensaio de ELISA (do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”). Foi avaliada a reatividade dos anticorpos produzidos frente à proteína fusionada SmRho/MBP e contra proteínas nativas de *S. mansoni*.

3.17.5.1 Preparação antigênica solúvel de verme adulto (SWAP)

Com o objetivo de determinar se as IgG produzidas são capazes de reconhecer proteínas nativas de *S. mansoni* realizou-se ensaios imunoenzimáticos, nos quais as placas de microtitulação foram sensibilizadas com SWAP. A fim de produzir o SWAP, camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea com 120 cercárias do *S. mansoni*. Após 45 dias de infecção, os animais foram sacrificados e seu sistema porta hepático perfundido usando solução NaCl 1,7% contendo heparina 0,05 U/mL. Os vermes recuperados foram lavados exaustivamente em PBS, sendo então estocados a -20°C em volume mínimo de tampão (Goes *et al.*, 1989). Cerca de 20 mL de vermes congelados foram triturados em Potter e ultracentrifugados a 37.000 rpm, por 1 hora, a 4°C (ultracentrífuga Sorvall OTD5B). No sobrenadante obtido foi feita a dosagem de proteína, segundo método de Bradford. Alíquotas

foram armazenadas a -70°C , até o uso. O sedimento da primeira centrifugação foi levado a uma segunda extração, seguindo o mesmo procedimento.

3.17.5.2 ELISA

Foi usada uma adaptação da técnica descrita por (Lunde *et al.*, 1979), placas de microtitulação MaxiSorp™ Surface (Nunc) de 96 poços foram sensibilizadas com $1\mu\text{g}$ de Ag/poço, em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6, por 16 h à 4°C . Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas com 0,15 M PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio foi realizado com 1,6% caseína em 0,15 M PBS contendo 0,05% Tween 20 à temperatura ambiente por 1 hora. Seguiu-se nova lavagem e as soluções de anticorpos específicos ou antisoros, devidamente diluídos em 0,15 M PBS contendo 0,25% caseína, foram incubados a 37°C por 1 hora. Após nova série de lavagens, as placas foram incubadas com o conjugado (Ig camundongo conjugada à peroxidase) na diluição de 1:10.000, por 1 h. Repetiu-se as lavagens e as placas foram submetidas à solução reveladora contendo 2 mg de ortofenilenodiamino (OPD) e $2\mu\text{l}$ de H_2O_2 30v/v em 10 mL de tampão citrato pH 5,0. Para interromper a revelação foram acrescentados $20\mu\text{l/poço}$ de H_2SO_4 5%. A leitura dos resultados foi feita usando filtro de 492 nm, em leitor de ELISA. Ensaios sem Ag, mas com Ac e sem Ac, mas com Ag foram feitos como controle de adsorção inespecífica do conjugado.

3.18 Análise estatística

Os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada com o Programa PRISM statistical software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando one-way ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 – Resultados

4.1 Diferenciação de células tronco hematopoiéticas murinas em células dendríticas

Células tronco da medula óssea de camundongos foram cultivadas *in vitro* na presença da citocina GM-CSF para a obtenção das células dendríticas. Deste modo, em média, 1×10^7 células foram obtidas da medula óssea de cada camundongo C57BL/6. As células foram cultivadas por 10 dias, período no qual se considera que as células diferenciadas ainda encontram-se imaturas e, então, se seguiu com a caracterização fenotípica. Para cada placa de cultivo de 10 mm foram colocadas 3×10^6 células e, ao final do cultivo, obtinha-se em média $2,6 \times 10^5$ células dendríticas.

No primeiro dia de cultivo observou-se células com morfologia esférica regular enquanto no terceiro dia de cultivo evidenciam-se a formação de grumos característicos (figura 11). A partir do sexto dia de cultivo visualiza-se o aparecimento de células de contorno irregular, granuloso e com poucas projeções laterais, características típicas de células dendríticas imaturas, predominantes no décimo dia de cultivo (figura 12). As células foram caracterizadas morfológicamente também por microscopia confocal no 12º dia de cultivo, quando foram observados com maior nitidez os prolongamentos citoplasmáticos descritos (figura 13).

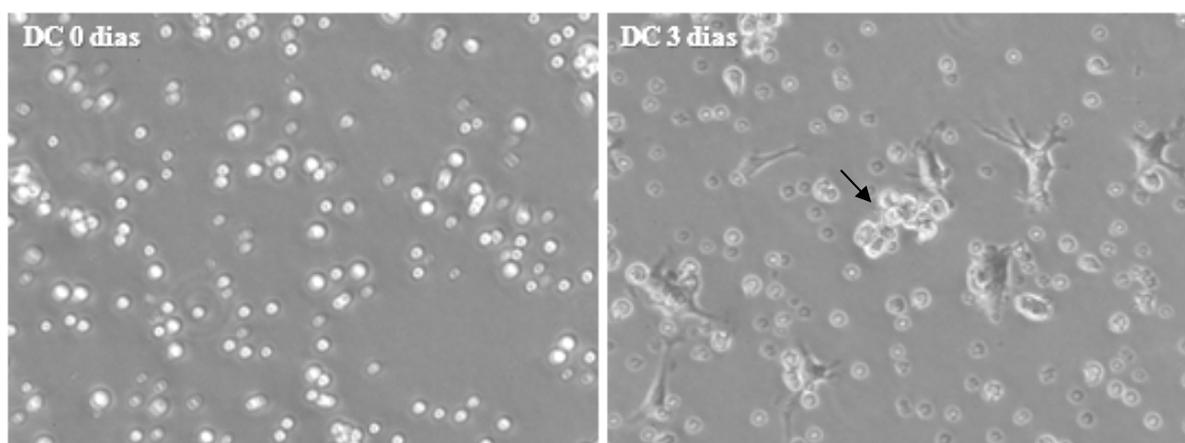


Figura 11: Morfologia celular no dia 0 de cultivo apresenta formato homogêneo arredondado enquanto que no dia 3 ressaltamos a visualização das células agrupadas caracterizando divisão celular no centro da foto (seta).
Aumento de 400x

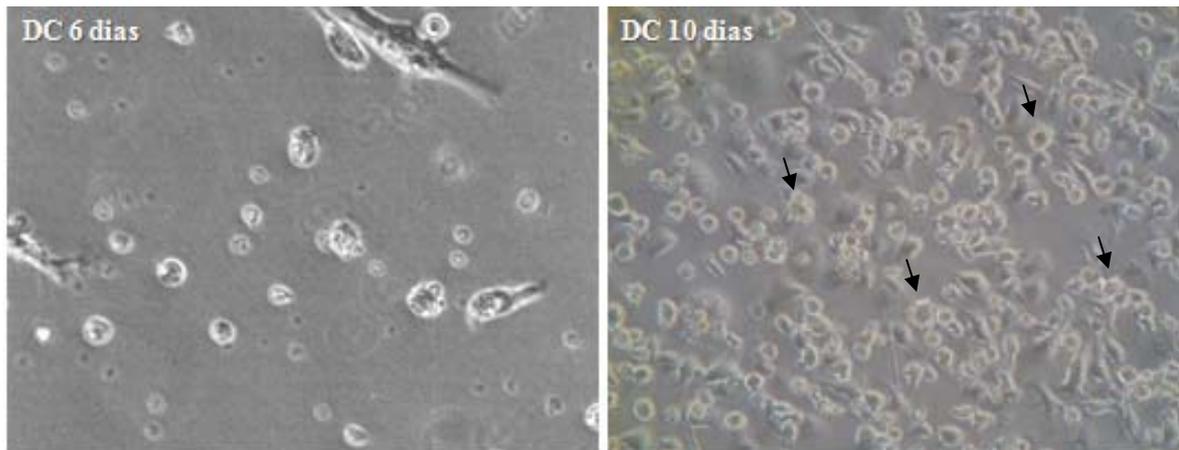


Figura 12: Morfologia celular a partir do 6º de cultivo apresenta pequenas projeções laterais assim como formatos irregulares que se tornam mais evidentes no dia 10 de cultivo (setas). Essas características são características morfológicas típicas de células dendríticas. *Aumento de 400x*

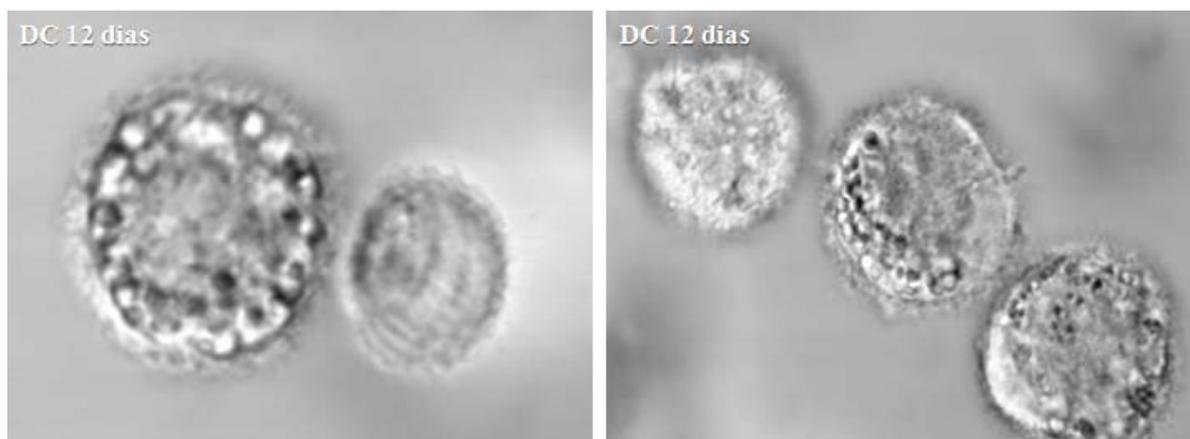


Figura 13: Microscopia confocal das células dendríticas obtidas a partir de células da medula óssea no 12º dia de cultivo quando se encontram, além de diferenciadas, em um estado mais maduro. Nesse estágio aumenta o número de prolongamentos citoplasmáticos tornando-os mais fáceis de serem visualizados. .

4.2 Caracterização das células dendríticas por citometria de fluxo

A análise fenotípica foi realizada com anticorpos monoclonais. A expressão do marcador de superfície CD11c, característico de células dendríticas mielóides, foi evidenciada por meio da ligação com FITC enquanto os demais anticorpos foram ligados a fluoresceína PE, permitindo a dupla marcação. Foram avaliados os marcadores das moléculas coestimulatórias CD40 e CD86 além dos marcadores I-Ab (MHC II) e H-2Db (MHC I).

Após análise dos resultados constatamos a diferenciação efetiva das células tronco em células dendríticas. Dessa maneira, no 12º dia de cultivo, as células foram fenotipadas e comparadas com células em que induzimos a maturação com o LPS. Confirmou-se a diferenciação pela maior expressão das moléculas coestimulatórias (figura 14) e do complexo MHC I e II, características de DC maduras (figura 15). Os dados foram plotados em gráficos para melhor visualização e comparação (figura 16).

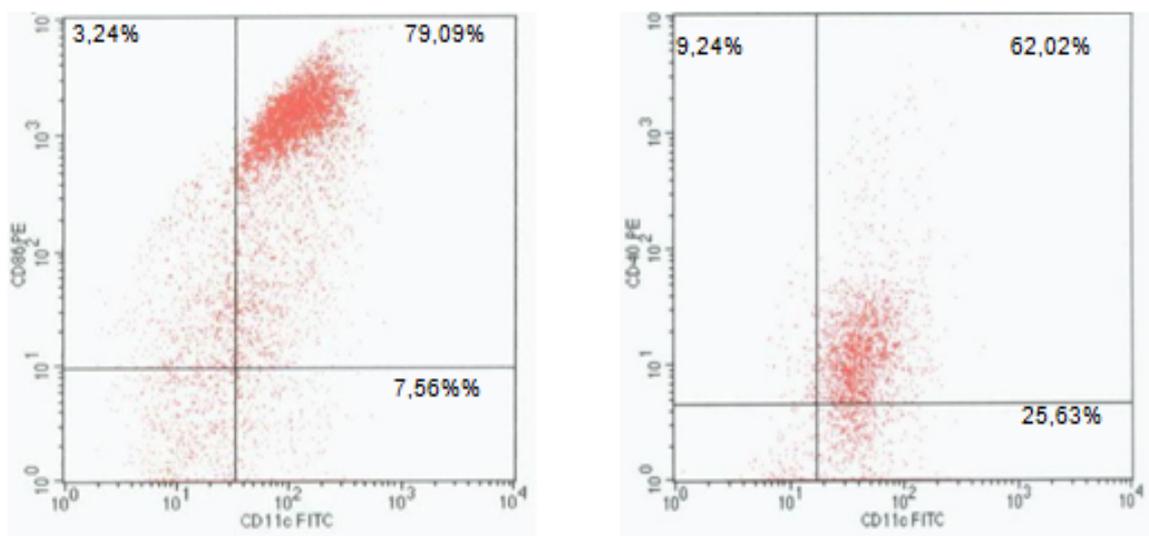


Figura 14: Análise fenotípica das células dendríticas obtidas a partir das células tronco. O marcador Cd11c é característico de DC mielóide e os marcadores CD86 e CD40 são moléculas coestimulatórias presentes nas células apresentadoras de antígeno. A dupla marcação garante com segurança a obtenção da linhagem pretendida.

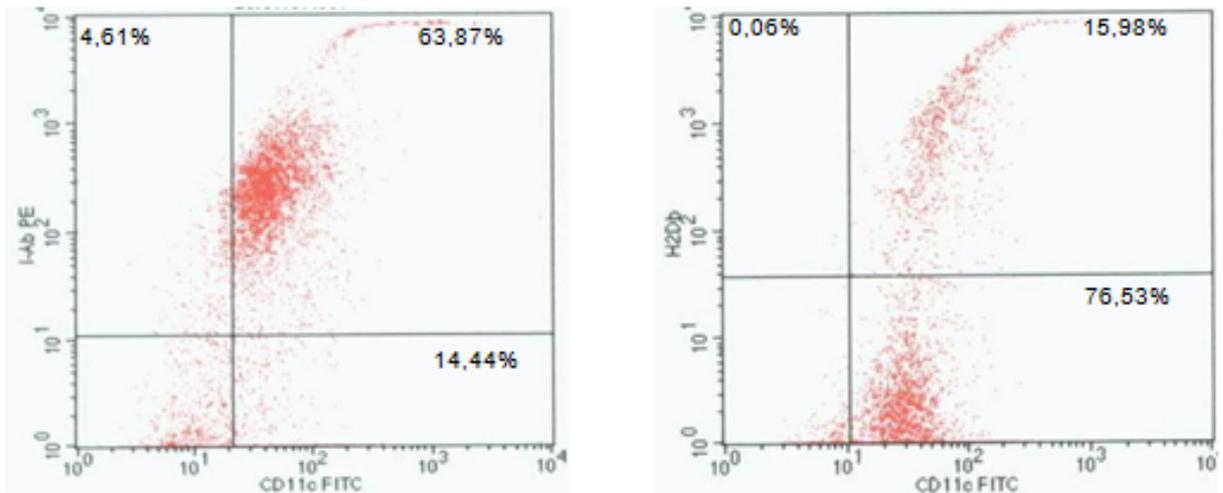


Figura15: A confirmação fenotípica das células dendríticas é realizada com a dupla marcação do Cd11c frente aos marcadores das moléculas do complexo MHC I (H-2Db) e MHCII (I-Ab).

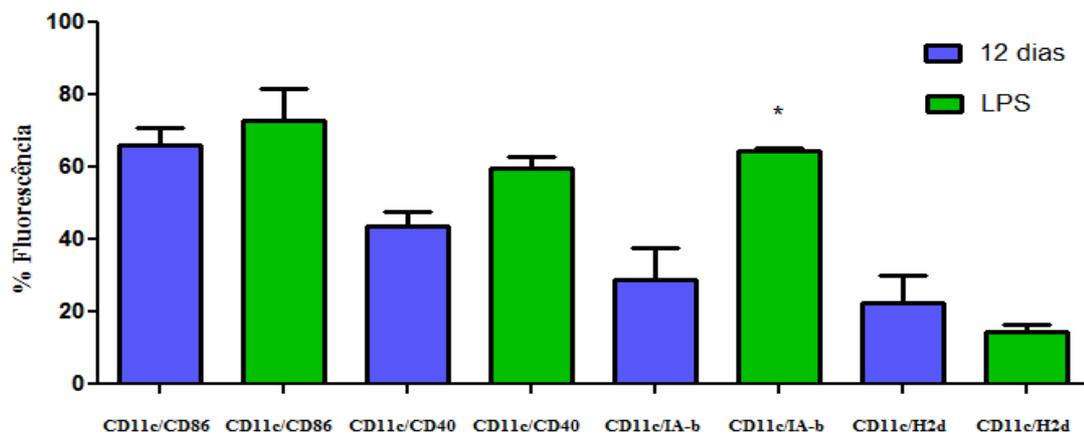


Figura 16: Comparação entre o fenótipo das células diferenciadas no dia 12 de cultivo com as células que foram submetidas à maturação com LPS. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) apenas na marcação com CD11c/IA-b.

No dia 10 de cultivo confirmamos o estado imaturo das células pela menor expressão da molécula coestimulatória CD86 comparadas ao observado nas células no dia 12. (figura 17).

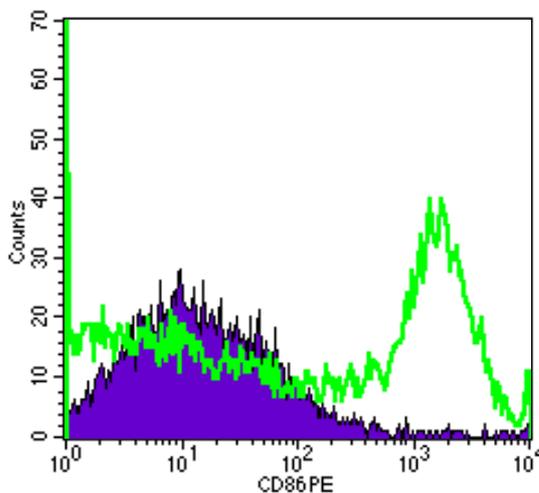


Figura 17: As células submetidas à diferenciação apresentam no dia 10 de cultivo (lilás) menor expressão da molécula coestimulatória CD86 quando comparada com as células no dia 12 (verde).

4.3 Teste de viabilidade e metabolismo celular

A atividade metabólica das células foi avaliada a partir do décimo dia de cultivo até o dia 12. As células ativadas no dia 10 com LPS por 18 horas foram avaliadas juntamente com os outros grupos. As células no menor período de diferenciação (dia 10) apresentaram maior atividade metabólica em relação aos demais grupos (figura 18). Todas as células apresentaram-se viáveis (figura 19 e 20).

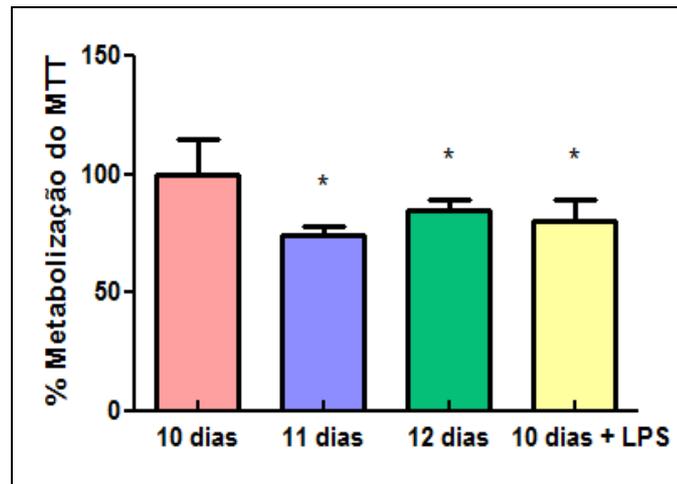


Figura 18: O tempo de 10 dias foi definido como 100% de viabilidade e mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os outros três tempos avaliados. Não houve diferença significativa entre os tempos de 11 dias, 12 dias e nas células submetidas ao LPS.

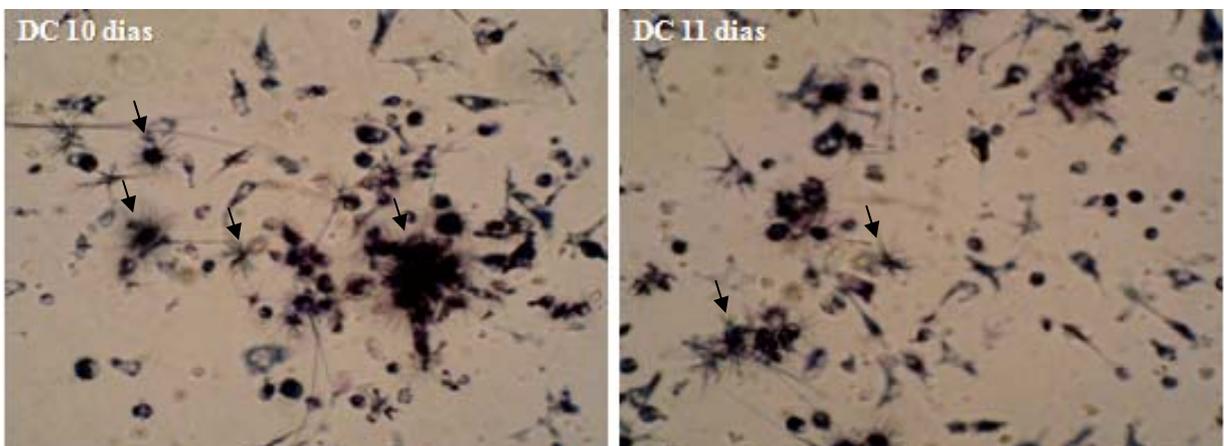


Figura 19: Avaliação da viabilidade celular por meio da metabolização do MTT. Os cristais de formazan (setas) formados são indicativos da presença de células viáveis. *Aumento 200 x*

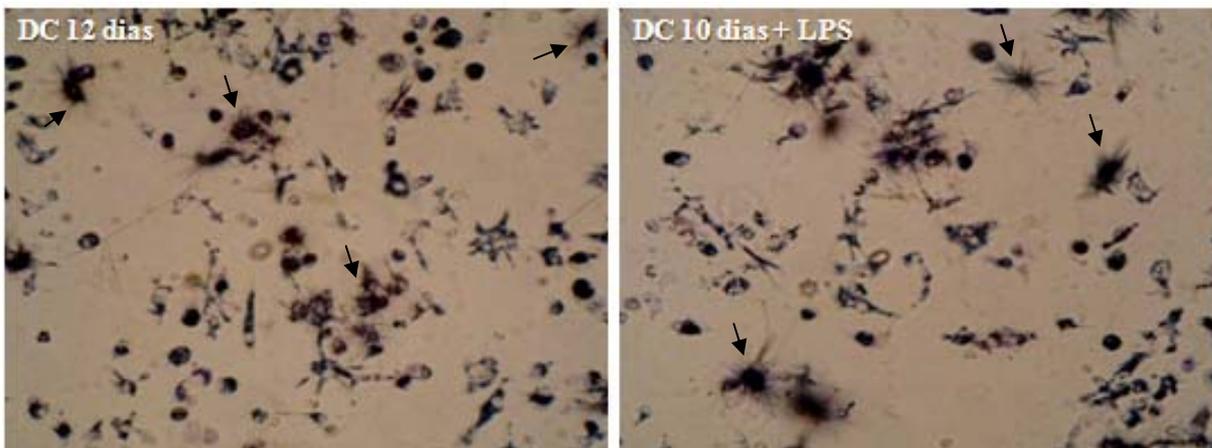


Figura 20: Avaliação da viabilidade celular por meio da metabolização do MTT. Os cristais de formazan (setas) formados são indicativos da presença de células viáveis. *Aumento 200 x*

4.4 Ensaio de fagocitose de esferas de látex conjugadas ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

Células dendríticas, no décimo dia de cultivo, foram incubadas em estufa úmida a 37°C, durante 3 horas, com esferas de látex conjugadas a FITC. Após a incubação e lavagem colocou-se Iodeto de Propídeo (PI). Observou-se em microscopia confocal, a presença de esferas na região citoplasmática mostrando a capacidade fagocítica e viabilidade funcional dessas células (figura 21). Como controle negativo, para garantir que a incorporação das partículas necessitava de uma ação ativa, foi incubado a 56°C, igual quantidade de células e látex. A alta temperatura garante a inativação celular e dessa forma a ausência de fagocitose (figura 22).

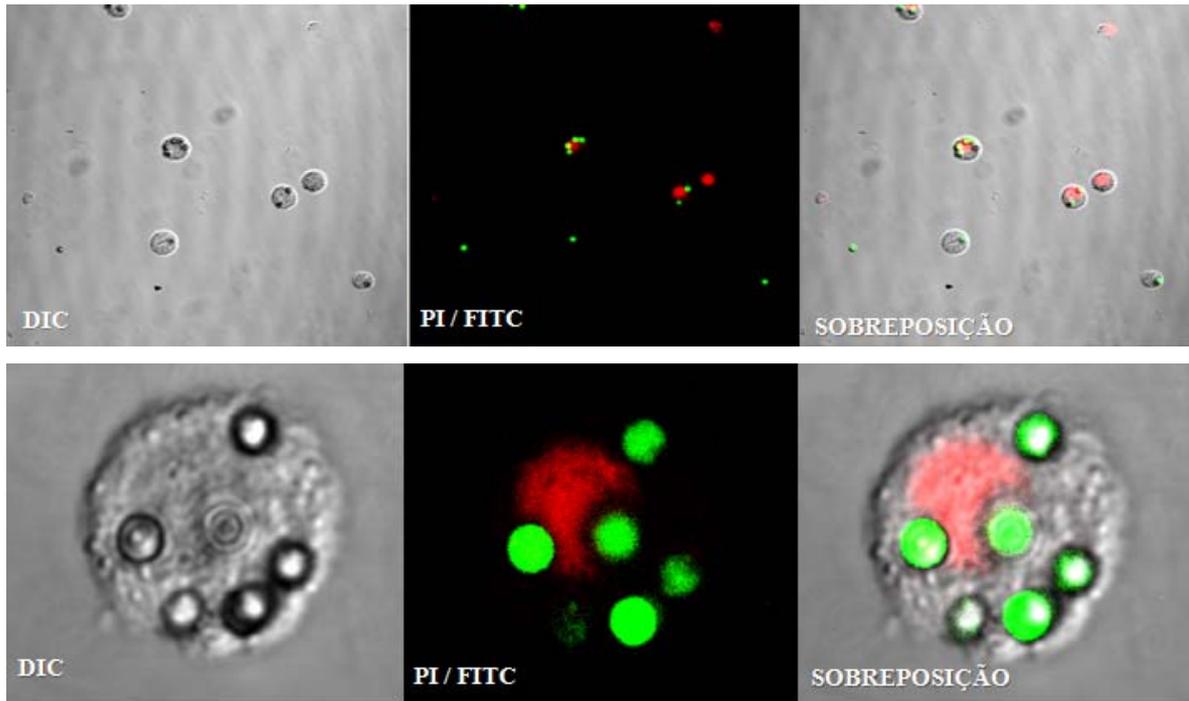


Figura 21: DCs observadas em microscopia confocal após ensaio de fagocitose demonstrando a viabilidade funcional dessas células produzidas a partir das células tronco murinas. Foi acrescentado Iodeto de Propídeo (PI) para corar o núcleo e permitir a visualização diferencial das partículas no citoplasma.

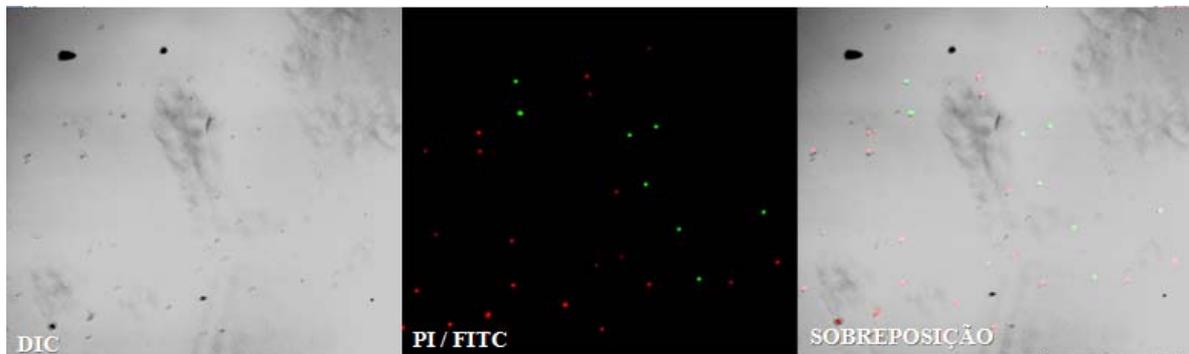


Figura 22: DCs submetidas à temperatura de 56°C a fim de inativá-las. Observam-se os núcleos corados com PI, mas nenhuma partícula fagocitada. Os beads verdes ficaram todos restritos ao ambiente externo às células.

4.5 Clonagem do gene da Rho1-GTPase de *S. mansoni* em vetor de expressão de células de mamíferos

4.5.1 Obtenção do gene da Rho1-GTPase de *S. mansoni*

Após a clonagem, seleção de clones e purificação plasmidial realizou-se o sequenciamento onde observamos a sequência completa codificadora da proteína de interesse. (figura 23).

```

ATGGCGAGTCGGTACTGTAAGAACTTGTATTGTTGGAGATGGTGCATGCGGGAAAACCTGTTTACTTATTG
TATTCAGCAAAGACCAGTTTCCCGAAGTTTACGTTCTACTGTATTTCGAAAACCTATGTTGCAGATATCGAAGT
TGATAACAGACAAGTTGAATTAGCTCTCTGGGACACTGCTGGCCAAGAAGATTATGATGGGCTACGGCCACTT
TCTTATCCTGATACGGATGTAGTTCTGTTATGTTATAGTATTGACTCTCCCGATAGTTTTGCAAACATTGAGG
AAAAATGGTTACCAGAAATCCGTCATTTTTGTCCTGATGTTCCCATTTGTCTTAGTTGGAAACAAAAAAGACTT
ACGACATGACGAGGCTACAAAGAATGAGCTACACAGAACCAAACAACCTCCTGTCACTTTTAAGCGAGGGTAA

```

Figura 23: Sequência nucleotídica da SmRho clonada no vetor pMal-c2X.

4.5.2 Amplificação do gene da Rho1-GTPase de *S. mansoni*

A sequência codificadora da SmRho tem o tamanho de 581 pares de bases (pb) e, pelo gel de agarose a 1%, foi possível confirmar a sua amplificação e imediatamente realizar a ligação no vetor de expressão determinado (figura 24).

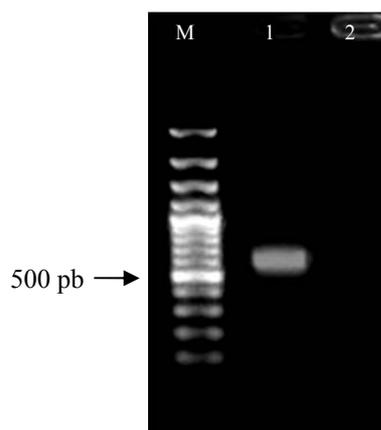


Figura 24: Amplificação da SmRho pela reação em cadeia da polimerase (PCR). M indica a canaleta contendo o padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), 1 indica a canaleta contendo a reação de amplificação com o tamanho aproximado de 581 pb e 2 indica o controle negativo da reação.

4.5.3 Clonagem no vetor de expressão de células de mamífero

A análise dos clones foi realizada por meio da PCR (figura 25) e pela utilização das enzimas de digestão *ApaI* e *KpnI* (figura 26).

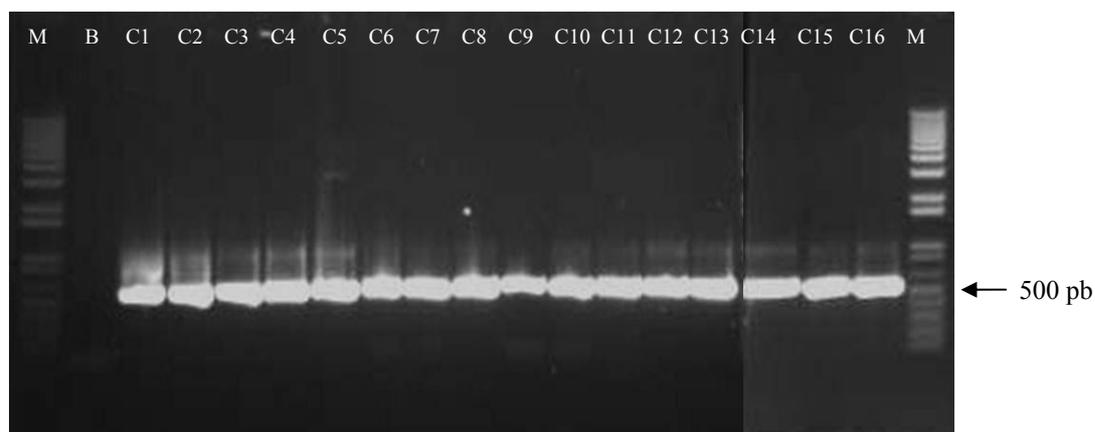


Figura 25: Detecção por PCR dos clones positivos obtidos na clonagem da sequência *SmRho* no vetor de expressão *NT- GFP fusion TOPO TA*. M: padrão de peso molecular de 1Kb plus (Fermentas). B: controle negativo da reação. C1 a C16: clones testados. Todos os clones avaliados foram positivos.

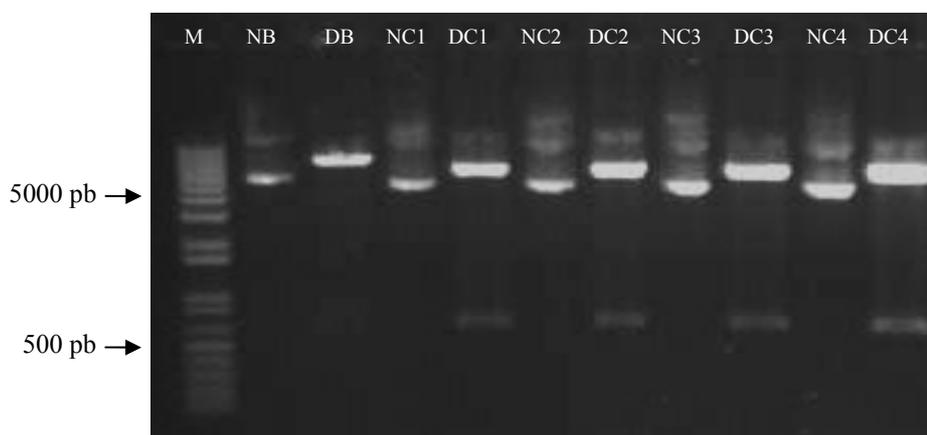


Figura 26: Confirmação de alguns dos clones positivos obtidos através de digestão com as enzimas *ApaI* e *KpnI*. M: padrão de peso molecular de 1 Kb plus (Fermentas). NB: controle negativo da reação (*pMal-c2X/SmRho*) não digerido. DB: controle negativo digerido. NC1 a NC4: clones 1 a 4 não digeridos. DC1 a DC4: clones 1 a 4 submetidos à digestão. Todos os clones avaliados foram positivos.

4.5.4 Sequenciamento

Os clones 1 a 4 foram analisados por sequenciamento. Avaliou-se, além da presença da sequência codificadora da SmRho, o alinhamento correto no vetor de expressão no qual foi inserido. A sequência codificadora da proteína GFP apresentou-se em frame, conforme o objetivo proposto, e dessa forma, a expressão da proteína de *S. mansoni* pôde ser indiretamente visualizada em microscopia pela fluorescência verde emitida pela GFP. (figura 27). A homologia de todos os clones foi avaliada pelo pareamento com sequências depositadas no banco de dados NCBI/BLAST. O clone 1 apresentou a maior homologia (99%) e foi utilizado nos procedimentos posteriores sendo denominado de SmRho/TOPO. (figura 28)

Clone 1 Forward

```

AAAAGCGCGGGACCCCTTGGGTCCCTTCTTGAGTTTGAACTGCTGC TGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTA
CAAAAGCGGTTCCGGACCGGTGCTAGCGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTGCCCTTATGG
CGAGTGCGGTACGTAAGAAACTTGTATTGTTGGAGATGGTGCATGCGGAAAACCTGTTTACTTATTGTATTTCAGCA
AAGACCAGTTTCCGAAGTTTACGTTCTACTGTATTGAAAACTATGTTGCAGATATCGAAGTTGATAACAGACAAG
TTGAATTAGCTCTCTGGGACACTGCTGGCCAAGAAGATTATGATGGGCTACGGCCACTTTCCTTATCCTGATACGGATG
TAGTTCGTTATGTTATAGTATTGACTCTCCCAGATGTTTTGCAAACATTGAGGAAAAATGGTTACCAGAAATCCGTC
ATTTTTGTCCTGATGTTCCCATGTCCTAGTTGGAACAAAAAAGACTTACGACATGACGAGGCTACAAAGAATGAGC
TACACAGAACCAACAACCTTCTGTCACTTTTAACGAGGGTAAACAAGTAGCTGAAAAGATTTCTGCTTATGCCTTCT
TTGAGTGTTACGTAAGACCAAGGAAGGAGTCAGCGATGTTTTCGTAGCAGCTACTC GAGCCGCCTCGAATTCAGCG
AAGAAGAAGAGGAGGAGGTGTGATTTAATTTGAAAGGGCAATTCTGCAGATATCAGCACAGTGGCGGC CCGCTCG
AGTCTAGAGGGCCCGTTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTC
CCCCGTGCCTCTTGACCCTGGAAGTGCCACTCCACTGTCTTTCCAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCAATTGT
CTGAGTATGTGTCATCTTATT

```

Figura 27: Sequência nucleotídica do clone SmRho/TOPO. Em verde está assinalada a sequência codificadora da proteína GFP e em amarelo o início e término da sequência da RHO1-GTPase.

CLONE 1 FORWARD				
Score = 1104 bits (574), Identities = 578/580 (99%), Gaps = 0/580 (0%)				
Rho1	152	ATGGCGAGTGCGGTACGTAAGAACTTGTATTGTTGGAGATGGTGCATGCGGGAAAAC	211	
Bank	7	ATGGCGAGTGCGGTACGTAAGAACTTGTATTGTTGGAGATGGTGCATGCGGGAAAAC	66	
Rho1	212	TGTTTACTTATTGTATTGAGCAAAGACCAGTTTCCCGAAGTTTACGTTCTACTGTATTC	271	
Bank	67	TGTTTACTTATTGTATTGAGCAAAGACCAGTTTCCCGAAGTTTACGTTCTACTGTATTC	126	
Rho1	272	GAAAACATATGTTGCAGATATCGAAGTTGATAACAGACAAGTTGAATTAGCTCTCTGGGAC	331	
Bank	127	GAAAACATATGTTGCAGATATCGAAGTTGATAACAGACAAGTTGAATTAGCTCTCTGGGAC	186	
Rho1	332	ACTGCTGGCCAAGAAGATTATGATGGGCTACGGCCACTTCTTATCCTGATACGGATGTA	391	
Bank	187	ACTGCTGGCCAAGAAGATTATGATGGGCTACGGCCACTTCTTATCCTGATACGGATGTA	246	
Rho1	392	GTTCTGTTATGTTATAGTATTGACTCTCCCGATAGTTTTCGCAACATTGAGGAAAAATGG	451	
Bank	247	GTTCTGTTATGTTATAGTATTGACTCTCCCGATAGTTTTCGCAACATTGAGGAAAAATGG	306	
Rho1	452	TTACCAGAAATCCGTCATTTTGTCTGATGTTCCCATGTCCTTAGTTGGAACAAAAAA	511	
Bank	307	TTACCAGAAATCCGTCATTTTGTCTGATGTTCCCATGTCCTTAGTTGGAACAAAAAA	366	
Rho1	512	GACTTACGACATGACGAGGCTACAAGAATGAGCTACACAGAACCAAACTTCTCTGTC	571	
Bank	367	GACTTACGACATGACGAGGCTACAAGAATGAGCTACACAGAACCAAACTTCTCTGTC	426	
Rho1	572	ACTTTTAACGAGGGTAAACAAGTAGCTGAAAAGATTCTGCTTATGCCTTCTTTGAGTGT	631	
Bank	427	ACTTTTAACGAGGGTAAACAAGTAGCTGAAAAGATTCTGCTTATGCCTTCTTTGAGTGT	486	
Rho1	632	TCAGCTAAGACCAAGGAAGGAGTCAGCGATGTTTTCGTAGCAGCTACTCGAGCCGCTCG	691	
Bank	487	TCAGCTAAGACCAAGGAAGGAGTCAGCGATGTTTTCGTAGCAGCTACTCGAGCCGCTCG	546	
Rho1	692	AATTCAGCGAAGAAGAAGAGGGAGGAGGTGTGATTAAATT	731	
Bank	547	AATTCAGCGAAGAAGAAGAGGGAGGAGGTGTGATTAAATT	586	

Figura 28: Pareamento do sequenciamento do SmRho/TOPO com sequência homóloga obtida no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.6 Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial através de nanopartículas de quitosana

4.6.1 Ligação do DNA à quitosana

O gráfico obtido por K. Corsi e colaboradores (2003) relativo à capacidade da quitosana se ligar ao DNA foi usado como base nesse experimento (figura 29). Nele observa-se que nas concentrações de quitosana de 0,01% a 0,05% há uma alta porcentagem de ligação ao DNA, independente do peso molecular desse polímero utilizado.

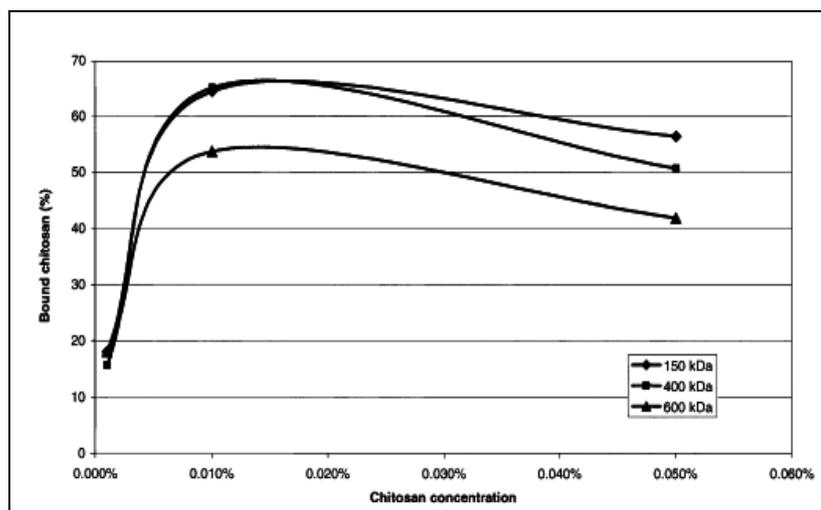


Figura 29: Efeito do peso molecular e concentração de quitosana na porcentagem de DNA ligado. Fonte: K. Corsi *et. al.*, 2003

As seguintes porcentagens das concentrações de quitosana foram testadas em relação à capacidade de ligação ao plasmídeo SmRho/TOPO: 0,01; 0,02; 0,05 e 0,5. A análise foi feita em gel de agarose 1%. Dessa forma o DNA não complexado é visualizado no gel enquanto a ligação completa da quitosana-DNA permanece na canaleta de aplicação, incapaz de penetrar no gel, devido ao tamanho da nanopartícula formada. Na concentração de 0,01% observou-se uma quantidade mínima relativa de DNA não ligado enquanto em todas as outras concentrações a complexação foi totalmente efetiva (figura 30).

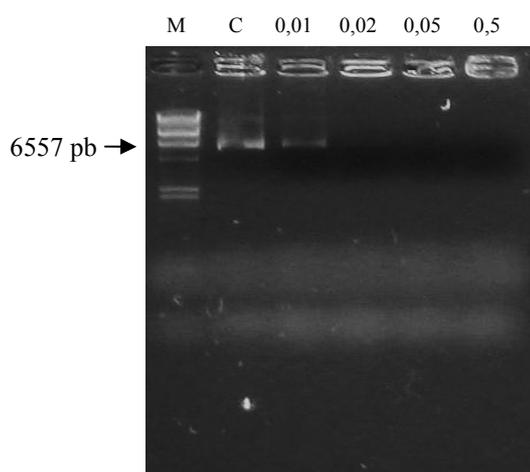


Figura 30: Visualização por gel de agarose da complexação quitosana-DNA. O marcador (M) usado foi o lambda Hind III. O controle (C) corresponde ao plasmídeo SmRho/TOPO não ligado. Na porcentagem de quitosana 0,01% observa-se DNA não ligado que foi capaz de penetrar no gel. Por outro lado nas concentrações de 0,02%, 0,05% e 0,5% a formação da nanopartícula fusionada foi completa.

4.6.2 Transfecção do DNA ligado à quitosana nas células dendríticas

Foi avaliada a capacidade de transfecção das partículas quitosana-DNA produzidas a partir das concentrações de 0,02; 0,05 e 0,5% de quitosana. Em microscopia confocal observou-se que nenhuma das concentrações foi capaz de transfectar eficientemente as DCs (figura 31).

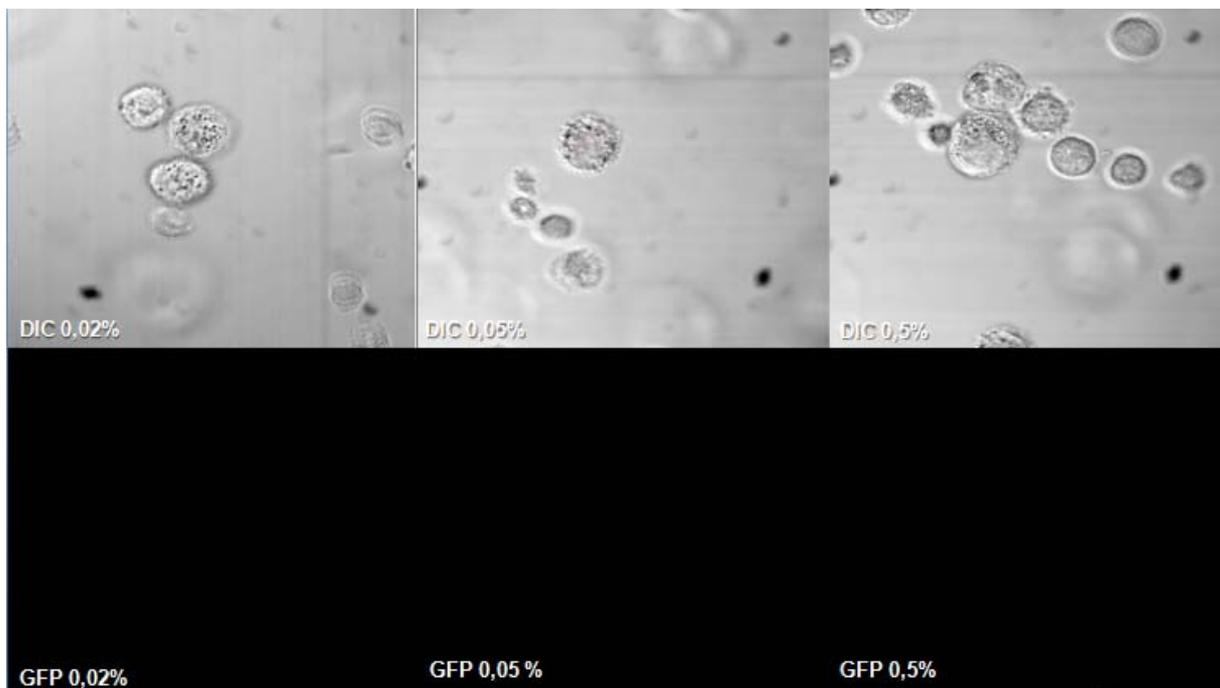


Figura 31: Transfecção com a quitosana em diferentes concentrações não foi eficiente em células dendríticas.

4.7 Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando Effectene

As concentrações de SmRho/TOPO para transfecção nas células HEK foram 400 ng, 1000 ng e 2000ng. A maior quantidade de DNA testada foi descartada, pois induziu morte celular exacerbada (dados não mostrados). A maior eficiência de transfecção foi obtida com 1000ng de DNA (figura 32).

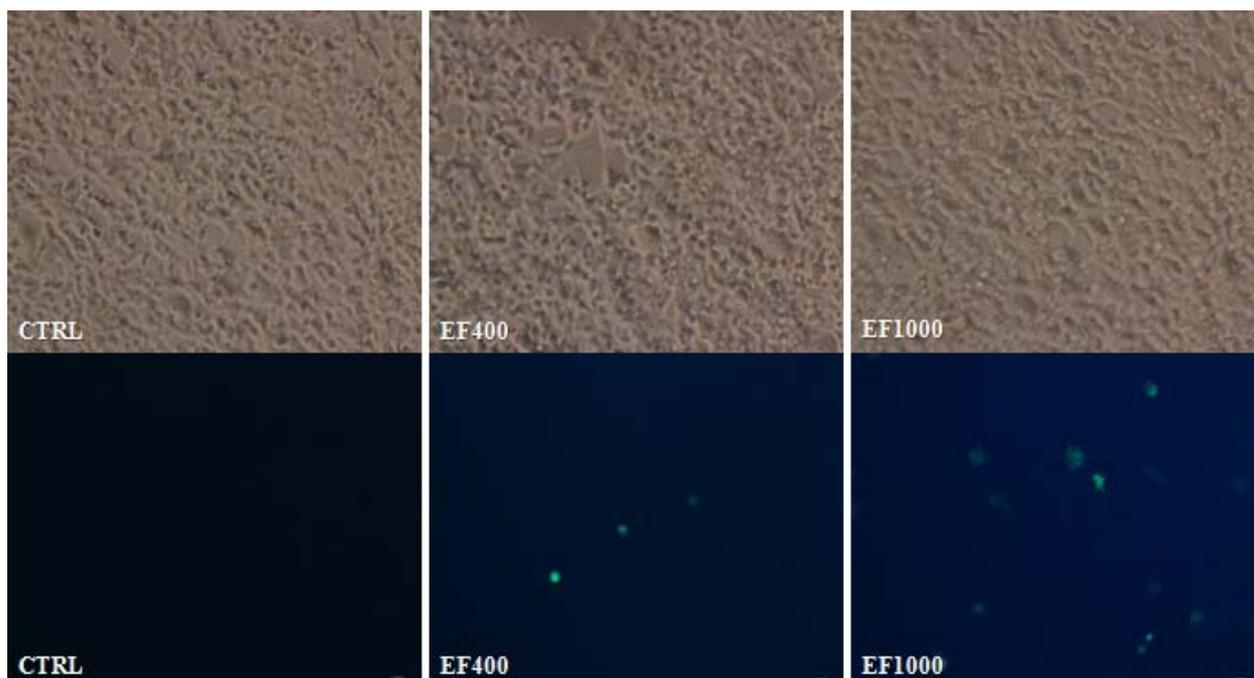


Figura 32: Células HEK transfetadas usando “Effectene Transfection Reagent”. O controle (CTRL) é representado pela linhagem celular submetida ao mesmo tempo de incubação e igual quantidade de células plaqueadas, mas sem serem transfetadas. Visualizamos maior eficiência no grupo em que foi colocado 1000 ng de DNA (EF1000) quando comparadas ao grupo de 400 ng (EF400). *Aumento 200 x*

4.8 Transfecção transiente de células de mamífero com DNA plasmidial usando GeneJuice

O plasmídeo SmRho/TOPO foi inserido nas células HEK fusionado ao vetor não viral nas quantidades de 200 ng, 400ng, 1000ng e 3000ng. A maior eficiência de transfecção, visualizada no microscópio de fluorescência, foi obtida com a maior concentração de DNA testada (3000 ng) (figura 33). Os dados obtidos por citometria de fluxo foram plotados em gráfico de barras para a comparação da eficiência entre a transfecção com o “Effectene Transfection Reagent” versus “GeneJuice Transfection Reagent” (figura 34). Pela análise da fluorescência no citômetro, confirmamos os resultados prévios da visualização por microscopia onde observamos que o vetor não viral GeneJuice foi consideravelmente mais eficiente.

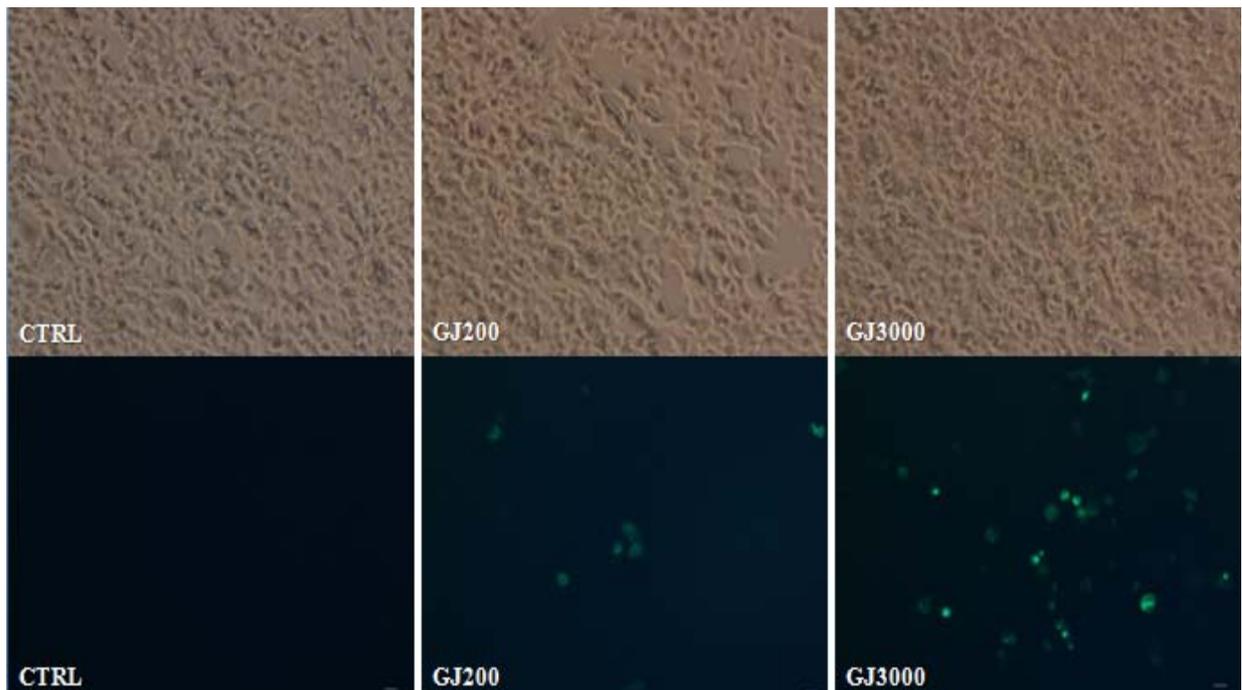


Figura 33: Transfecção de Células HEK através do “GeneJuice Transfection Reagent”. A maior taxa de transfecção foi observada na concentração de 3000 ng de DNA (GJ3000) comparada a 200 ng de DNA (GJ200). No controle (CTRL) não foi observada nenhuma fluorescência. *Aumento 200 x*

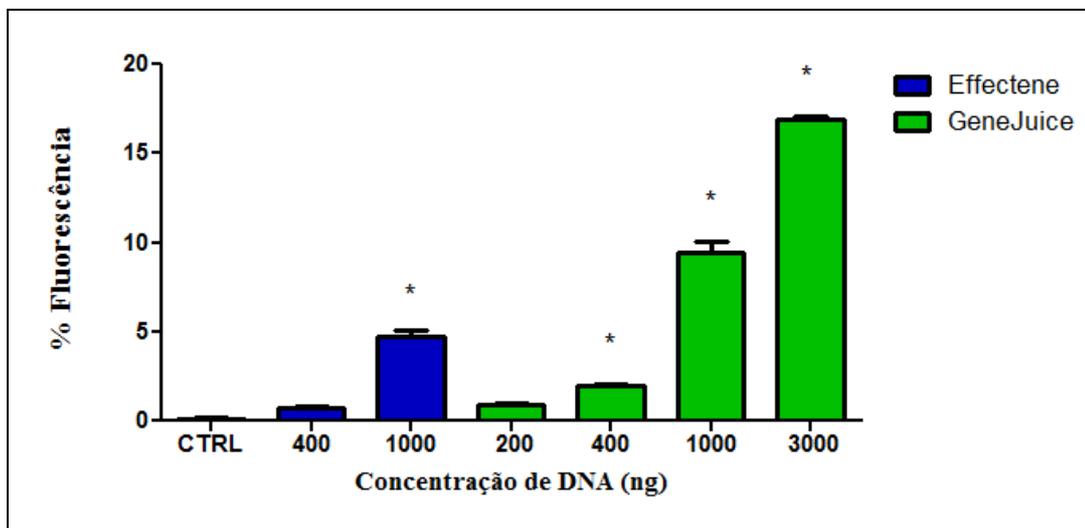


Figura 34: Comparação da eficiência de transfecção de dois vetores não virais por meio da quantificação da fluorescência na citometria de fluxo.

4.9 Análise da presença do gene da SmRho nas células transfectadas

A reação em cadeia da polimerase confirmou a presença do gene codificador da proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni* nas células transfectadas (figura 35).

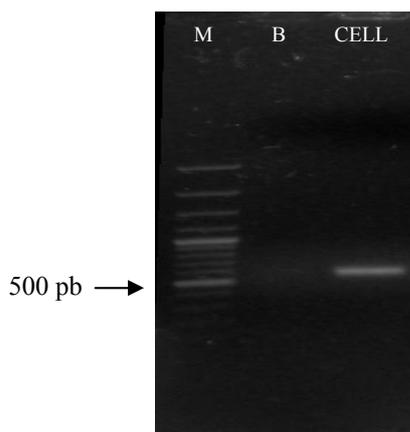


Figura 35: Amplificação da SmRho extraída das células HEK transfectadas. Observa-se a presença do gene de interesse visualizado indiretamente pela microscopia de fluorescência. M corresponde ao marcador 100 pb, B refere-se ao controle negativo da reação e CELL corresponde ao DNA extraído da célula.

4.10 Transfecção transiente em DCs

Após a otimização da metodologia com as células HEK procedemos a transfecção das células dendríticas por meio da metodologia GeneJuice, por ter sido constatado sua maior eficiência de transfecção. Dessa forma o mesmo protocolo foi seguido e, por microscopia confocal, foi possível observar o sucesso da padronização (figura 36). A viabilidade das DCs transfectadas foi comprovada pelo ensaio de metabolização do MTT e visualizada pela microscopia ótica a partir da formação dos cristais de formazan (figura 37).

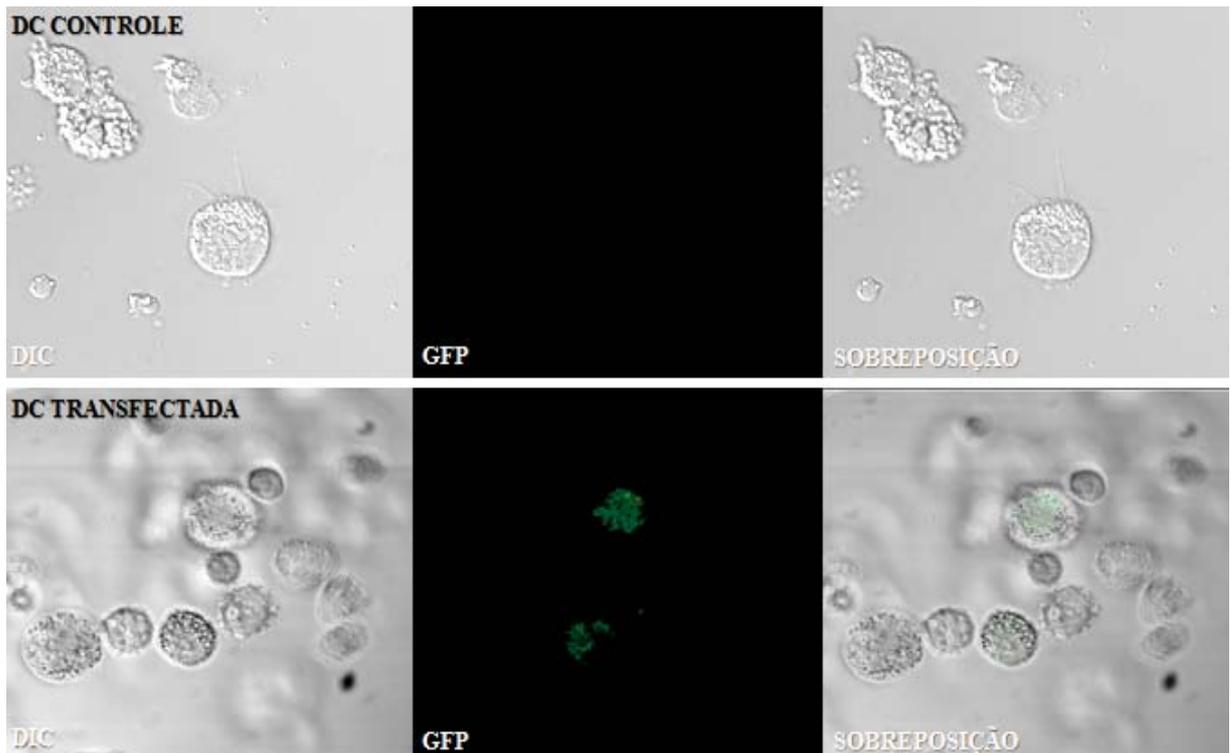


Figura 36: Células dendríticas transfectadas com 3000ng de DNA utilizando o “GeneJuice Transfection Reagent”. A visualização é realizada no confocal e o controle está representado pela fotografia superior enquanto a DC transfectada é visualizada no conjunto de fotografias inferiores.

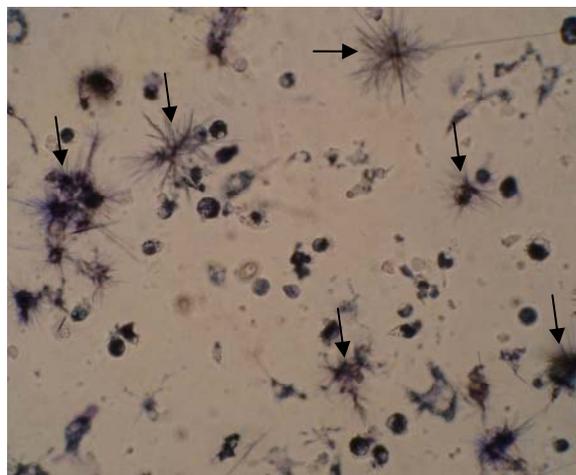


Figura 37: MTT das células dendríticas transfectadas. A formação dos cristais de formazan (setas) permite a confirmação da manutenção da viabilidade celular após terem sido submetidas à transfecção. *Aumento 200x*

4.11 Produção da proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni* em sistema procarioto

Escolhidos aleatoriamente, 13 clones foram testados pela PCR e o resultado foi evidenciado no gel de agarose (figura 38). A banda de 581 pb corresponde à amplificação do gene de interesse Rho1-GTPase.

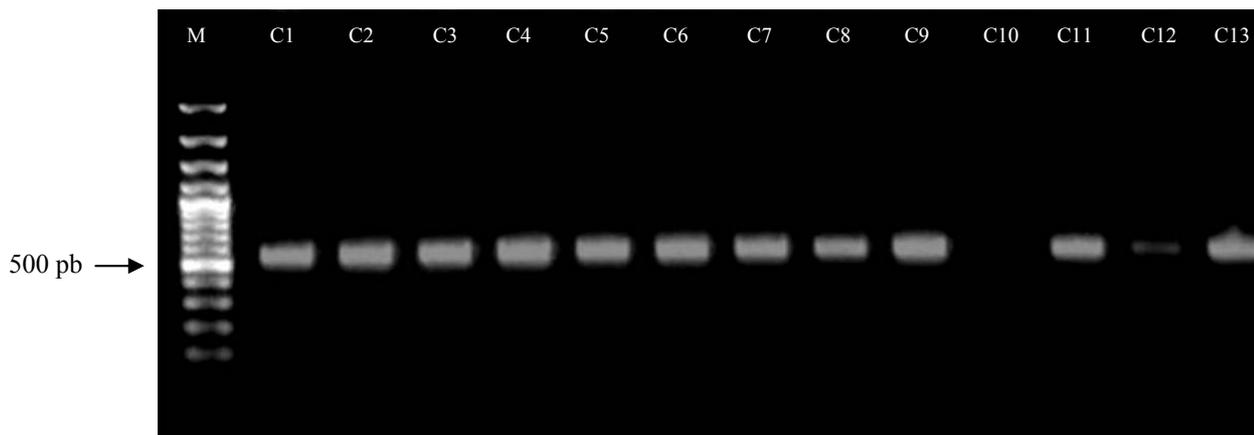


Figura 38: Análise por PCR de alguns dos clones obtidos após transformação de bactérias *E. coli* BL21. M representa o marcador de peso molecular 100 pb enquanto C1 a C13 representam respectivamente os clones 1 a 13.

O peso molecular esperado para a proteína de fusão é de aproximadamente 62 kDa (MBP 42,7 kDa + SmRho 19,4 kDa). Os clones denominados como 7 e 8 foram submetidos à expressão em pequena escala e ambos expressaram a proteína fusionada Rho/MBP (figura 39).

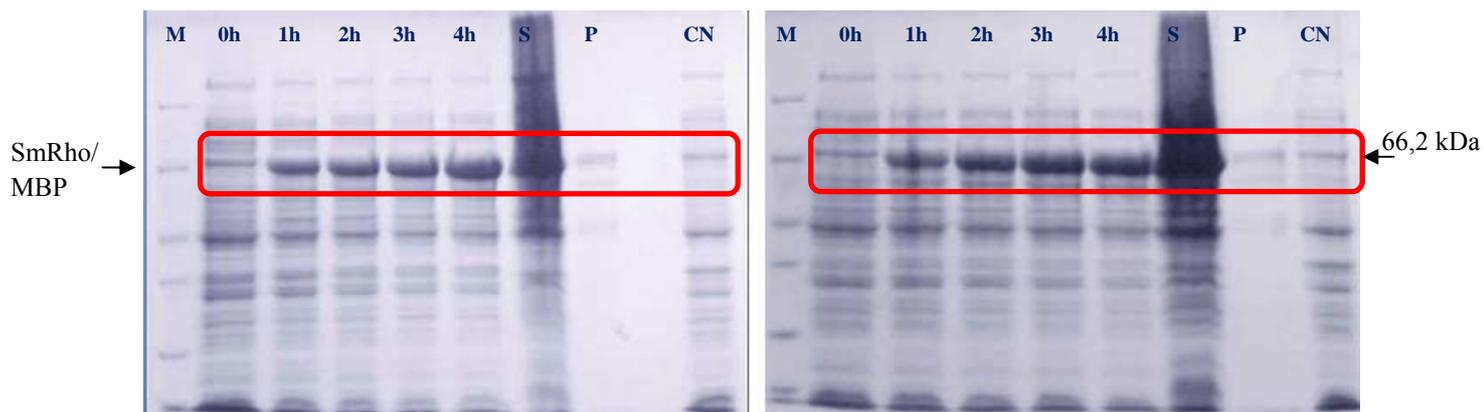


Figura 39: Mini-expressão dos clones 7 (esquerda) e 8 (direita) do plasmídeo pMal-c2X contendo SmRho. M é o marcador do peso da proteína. As amostras foram coletadas antes da indução da expressão (0h) e nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h após ter adicionado o IPTG. As bactérias foram lisadas para separar as proteínas solúveis que permanecem no sobrenadante, das insolúveis que ficam retiradas no pellet (P). O controle negativo (CN) foi a bactéria BL21 que não possui nenhum plasmídeo inserido. Em vermelho está assinalado o tamanho correspondente a proteína fusionada.

Foram observados sete clones por Western Blot e em todos se observou o reconhecimento acentuado na região correspondente a proteína fusionada (figura 40).

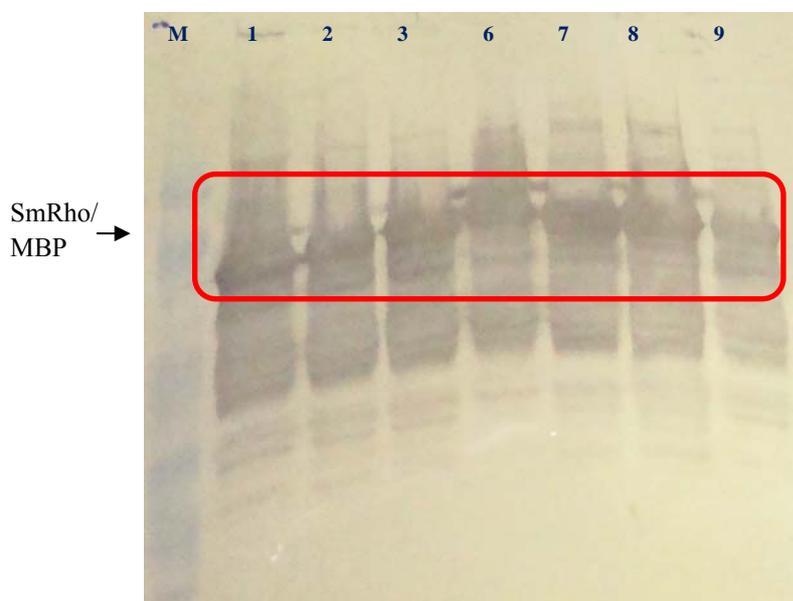


Figura 40: Western Blot dos clone 1, 2, 3, 6, 7, 8 e 9 mostrando o reconhecimento da proteína fusionada pelo anticorpo policlonal produzido em camundongos. Em vermelho está assinalado o tamanho correspondente a proteína fusionada, realçando o maior reconhecimento dessa frente a outras.

O clone 8 foi selecionado para continuação experimental e assim foi realizada a sua expressão em grande escala e posterior purificação pela coluna de amilose (figura 41). Esse clone foi denominado como pMal/SmRho 8. Observou-se que a purificação eliminou proteínas bacterianas permanecendo apenas a proteína correspondente ao peso molecular da proteína fusionada, assim como frações menores até o mínimo relativo ao tamanho da MBP isolada. Esse padrão é compatível com o esperado já que a proteína MBP é mais estável e pode ter ocorrido expressão incompleta da proteína SmRho e/ou degradação durante o processo de purificação.

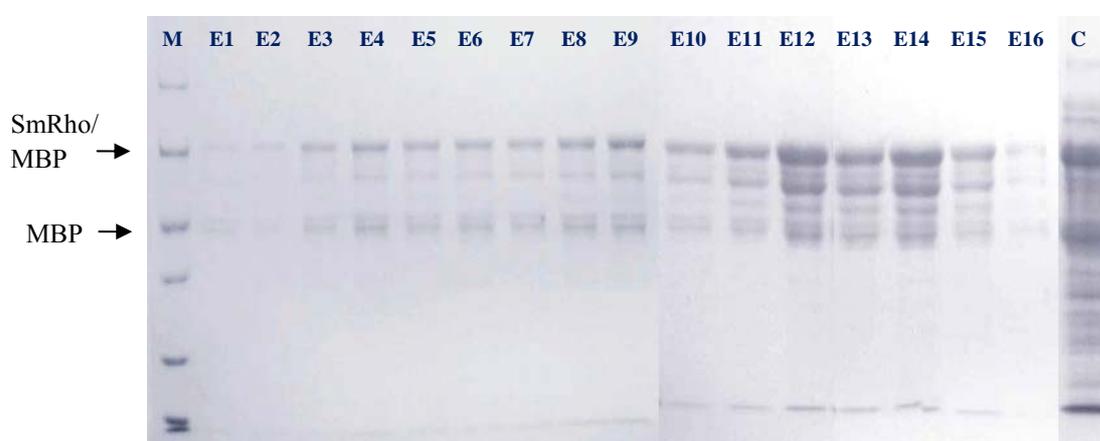


Figura 41: Visualização por gel de poliacrilamida de cada fração eluída durante a purificação da proteína SmRho/MBP. M refere-se ao marcador de peso molecular de proteína. As frações eluídas 1 a 16 são representadas respectivamente de E1 a E16. O controle (C) usado foi uma fração da expressão protéica que não foi submetida à purificação mostrando todas as proteínas bacterianas retiradas pela passagem na resina de amilose.

A fim de obter a proteína SmRho isoladamente submeteu-se a fração eluída 12, após dosagem, à clivagem com fator Xa durante 2, 4, 8 e 24 horas. A partir de 8 horas foi observada uma separação completa das frações MBP e SmRho (figura 42).

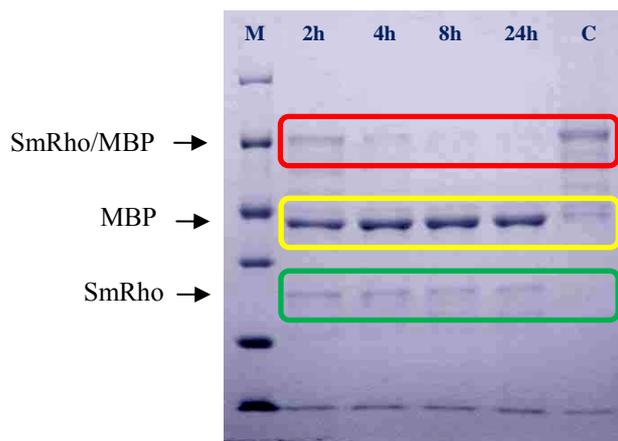


Figura 42: Gel SDS demonstrando a clivagem da proteína fusionada a partir da enzima fator Xa. Os tempos em que foram submetidos ao processo de isolamento estão demonstrados nas canaletas respectivas 2h, 4h, 8h e 24h. O marcador de proteína (M) foi colocado na primeira canaleta e o controle (C) utilizado foi uma fração da mesma proteína não submetida à enzima. Em vermelho está assinalado o tamanho correspondente a proteína fusionada, em amarelo o tamanho relativo a MBP isolada e em verde a SmRho.

Na tentativa de produzir em grande escala a proteína isolada SmRho, nova expressão foi realizada assim como uma purificação na coluna de amilose com modificações. Dessa forma, após a ligação da proteína SmRho/MBP na coluna, seguida de lavagem para retirada das demais proteínas bacterianas, não foi realizado o procedimento normal de eluição. Procedeu-se a inoculação no sistema da enzima fator Xa. A clivagem ocorreu por 48 horas. Dessa maneira, apenas a MBP permaneceria ligada e a SmRho poderia ser eluída primeiramente por meio da passagem de tampão de coluna. A solução contendo maltose seria usada posteriormente pra eluição da MBP. No entanto, foi verificado que na primeira eluição era retirada, também, a proteína MBP sendo dessa forma impossível separar essas duas frações por tal metodologia. Para realizar a imunização com a proteína SmRho foram usadas frações obtidas a partir do gel SDS. A fim de estimar a concentração da proteína que seria usada na imunização, foi preparado um gel com concentração gradativa conhecida de proteína BSA para comparação (dados não mostrados).

4.12 Avaliação da resposta imune protetora dos camundongos vacinados frente à infecção desafio com cercárias

4.12.1 Quantificação da atividade protetora

Após a contagem dos vermes adultos recuperados foi determinada a atividade protetora contra a esquistossomose conferida por cada grupo testado. Revelou-se que as células dendríticas transfectadas tiveram uma taxa de proteção de 56,3%; ou seja, maior que todos os outros grupos avaliados. A recuperação dos vermes nos grupos que receberam o plasmídeo SmRho/TOPO, a proteína SmRho ou apenas as DCs foi também reduzida em relação ao controle de solução salina (figura 43).

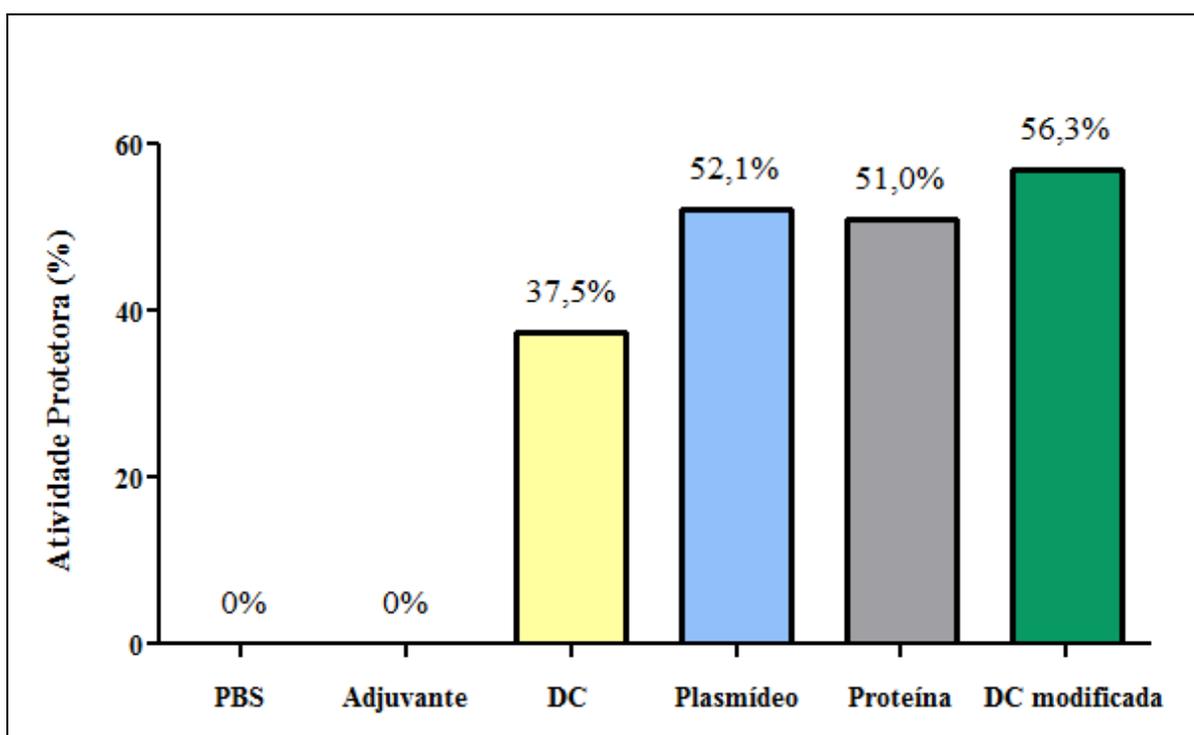


Figura 43: Capacidade protetora induzida contra a esquistossomose de cada grupo estudado, após 45 dias de infecção.

4.12.2 Análise da produção de anticorpos

Os testes revelaram a produção de anticorpos IgG total dos grupos imunizados. Os resultados da figura 44 mostram a reatividade dos anticorpos produzidos, após 15 dias da infecção desafio, contra a proteína fusionada SmRho/MBP. Os ensaios imunoenzimáticos com o objetivo de determinar se as IgG produzidas são capazes de reconhecer proteínas nativas (SWAP) de *S. mansoni* estão demonstrados na figura 45.

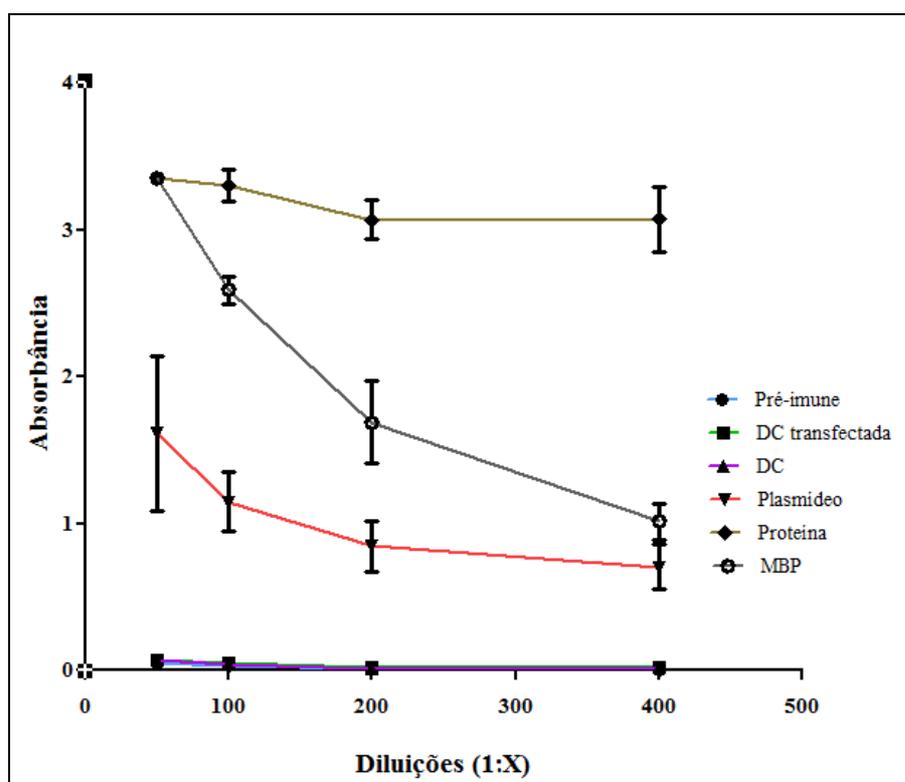


Figura 44: Respostas de IgG total contra SmRho/MBP. Placas de 96 poços apropriadas para ELISA foram sensibilizadas com a proteína fusionada purificada, para posterior reação com soros de camundongos C57BL/6 imunizados.

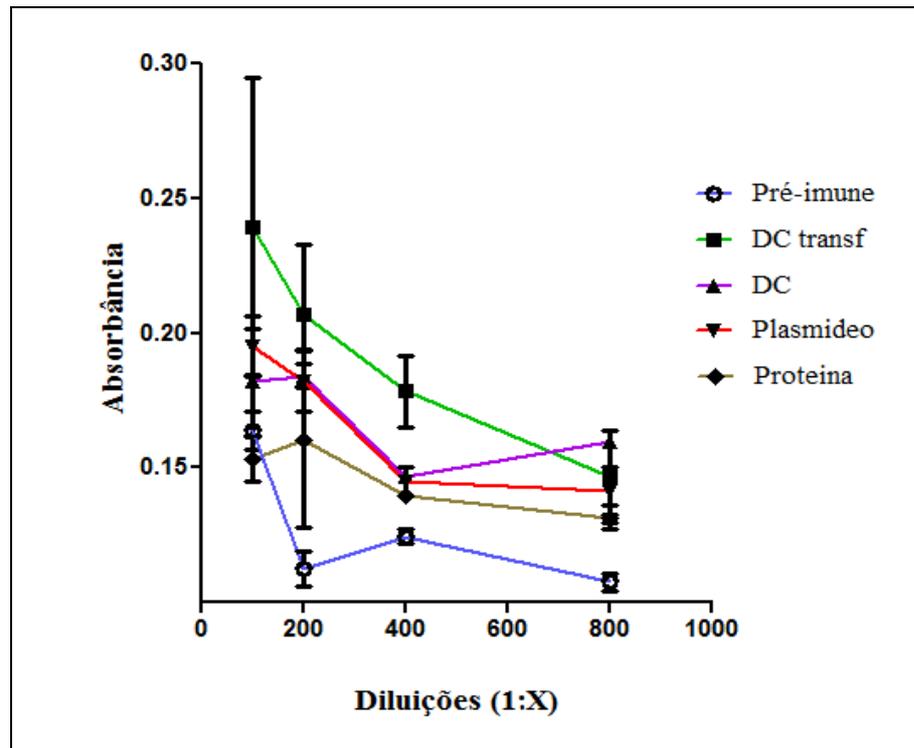


Figura 45: Respostas de IgG total contra SWAP. Placas de 96 poços apropriadas para ELISA foram sensibilizadas com 1,0 μ g/poço de SWAP, para posterior reação com soros de camundongos C57/BL06 imunizados.

5 –Discussão

A esquistossomose permanece como um problema significativo em muitos países tropicais em todo o mundo. Embora mecanismos de controle estejam atualmente disponíveis em várias áreas endêmicas, uma vacina que ofereça perspectivas de evitar a transmissão e reduzir os efeitos patológicos da infecção seria uma ferramenta valiosa para complementar os programas preventivos e representaria uma estratégia mais prática do que a quimioterapia. Entretanto, enquanto muitos antígenos candidatos têm sido descritos e testados em vários modelos animais, níveis insuficientes de proteção obtidos para alguns deles têm levado os pesquisadores a repensar o conceito de vacina na esquistossomose (Katz, 1999). Dentro desse contexto, foi proposta nesta dissertação o desenvolvimento de uma nova estratégia para o desencadear da imunidade protetora contra a esquistossomose.

As células dendríticas têm sido usadas recentemente como vetor na construção de vacinas contra diversas condições patológicas e os resultados apresentados até agora se mostraram promissores. Visto a importância das DCs na indução da imunidade protetora através de imunização genética, propomos a sua utilização como vacina celular contra o *S. mansoni*.

Para a realização dos objetivos, o primeiro passo constituiu na obtenção das células dendríticas a partir de células tronco murinas. A medula óssea possui duas populações de células-tronco que coexistem de maneira funcionalmente interdependente: as células-tronco de estroma de medula óssea, com capacidade de aderência, e as células tronco hematopoiéticas, não aderentes à placa de cultivo. As células tronco de estroma, também denominadas mesenquimais, são capazes de formar condroblastos, osteoblastos, células endoteliais e adipócitos (Morales, 2007). Por sua vez, a linhagem hematopoiética é capaz de originar os progenitores mielóides e linfóides que correspondem às células de interesse desse estudo.

As células dendríticas mielóides podem ser originadas a partir das células hematopoiéticas com a inclusão da citocina GM-CSF no meio de cultura celular. Foi constatado que pequenas manipulações e sutis interferências como a quantidade de células plaqueadas, a manutenção da placa utilizada durante o cultivo e cuidados durante a troca do meio, são essenciais para a obtenção da linhagem desejada. Além disso, por análise fenotípica, comprovou-se que, a partir do décimo dia de cultivo, as células já são consideradas DCs imaturas. No entanto,

depois desse tempo, devido à manipulação e a sensibilidade à maturação, essas células mudam o fenótipo impossibilitando ensaios que necessitariam de características do seu estado inicial.

Em relação a seu estado maduro as DCs obtidas no décimo segundo dia de cultivo foram comparadas às células em que se induziu a maturação com LPS. Por meio da análise de citometria de fluxo observou-se perfil semelhante entre os dois tipos. No entanto, observou-se diferença significativa na expressão das moléculas do MHCII. A resposta a estímulos bacterianos como o LPS estimula o processamento do antígeno junto ao MHCII para apresentação aos LT CD4 (Wu e Liu, 2007). Em contraste, a maturação decorrente somente do tempo de cultivo é devida, provavelmente, aos estímulos de contato fornecidos pela manipulação. Dessa forma, há uma expressão aumentada das moléculas coestimulatórias, mas não há um reconhecimento e apresentação efetiva de um antígeno conhecido.

As células diferenciadas foram avaliadas, ainda, quanto a sua viabilidade e perfil metabólico por meio do ensaio de MTT. Nesse resultado foi demonstrado que, apesar de todas as células estarem viáveis, há uma diferença estatisticamente significativa na metabolização celular do décimo dia quanto aos outros grupos avaliados (dias de cultivo 11, 12 e células com maturação induzida). Esses dados são explicados pelo estado funcional imaturo das células nesse primeiro momento, corroborando com os dados fenotípicos apresentados.

A caracterização final das DCs foi seguida pela análise de sua funcionalidade. Para isso realizou-se o ensaio de fagocitose em que esperávamos que, como APC, fossem capazes de realizar efetivamente a incorporação de micropartículas marcadas. Na microscopia confocal demonstrou-se sua capacidade funcional sendo visualizada a presença de vários beads em uma mesma célula. No controle, que consistiu de igual linhagem celular inativada, não foi observado nenhuma incorporação, garantindo que esse procedimento necessitava de processo ativo da célula.

Após a caracterização fenotípica e funcional das DCs partimos para a construção genética a ser inserida nessas células. O cDNA escolhido foi o correspondente à proteína Rho1-GTPase. Evidências como a expressão elevada de Rho1-GTPase em parasitas adultos de *S. mansoni* e

hipóteses da sua participação em processos de maturação, assim como da sua importância no processo imunológico contra a esquistossomose incentivaram nosso estudo (Goes, 2003; Vermeire *et al.*, 2003). Com o objetivo de expressar o cDNA determinado foi necessária a clonagem em um vetor apropriado e o utilizado foi o *NT- GFP fusion TOPO TA*. Reações de PCR, digestão enzimática do plasmídeo e seqüenciamento confirmaram a clonagem.

O próximo passo foi a inserção, nas DCs, do plasmídeo SmRho/TOPO construído. Atualmente, a terapia genética utiliza dois tipos principais de entrega de genes denominados vetores virais e vetores não virais. Os vetores não virais, representados principalmente por métodos químicos de transferência de genes, apresentam diversas vantagens sobre os virais, ressaltando sua segurança imunológica e a facilidade de produção. Dentre os principais tipos de metodologias não virais estão os lipossomos catiônicos e as nanopartículas como a quitosana. Nesse trabalho além de testar esses dois métodos, inseriu-se a comparação com um método recente de introdução da sequência gênica que é baseado na utilização de proteínas da matriz celular. A padronização desse tipo de vetor mostrou-se dispendiosa nas DCs por motivos previamente conhecidos na literatura como: (1) a utilização de cultura primária na transfecção com vetores não virais apresenta baixa eficiência e (2) como toda APC, a DC tem a capacidade de processar o antígeno tornando a visualização da proteína fluorescente comumente breve e de difícil análise. Para minimizar esses problemas foram usadas as células HEK em alguns experimentos.

O método baseado em nanopartícula escolhido foi a partir da utilização da quitosana. A quitosana é um polímero natural de crustáceos que despertou interesse na pesquisa de produção de vacinas devido a características como biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e mínima citotoxicidade. (Corsi *et al.*, 2003). De fato, estudos têm mostrado que nanopartículas de quitosana e DNA podem ser formadas devido à carga catiônica do polímero ser capaz de ligar à carga negativa dos plasmídeos (Lee *et al.*, 1998). No entanto, atualmente, a eficiência de transfecção usando tal complexo ainda é baixa e, apesar de esperarmos que pudesse ser aumentada pela capacidade fagocítica das DCs, não apresentou resultados satisfatórios. Pela análise em microscopia confocal não foi visualizada nenhuma porcentagem de transfecção eficiente a partir do uso dessas micropartículas.

O segundo tipo de vetor testado tem sido extensivamente usado e baseia-se em lipídeos. Essa técnica consiste, geralmente, na formação de micelas contendo o DNA condensado em seu interior que possibilita a internalização da sequência genética na célula. O Effectene é um exemplo dessa classe de vetores e seus resultados mostraram baixa eficiência quando testados com células HEK e com células DCs (dados não mostrados). Além disso, foi observado que a terceira metodologia testada (GeneJuice) era mais eficiente para ambas as células.

O GeneJuice é composto de uma proteína celular atóxica e uma pequena quantidade de uma poliamina. A compactação do DNA e a neutralização da sua carga são facilitadas por tal formulação, e promovem a passagem do complexo através da membrana celular. A poliamina é capaz de promover, também, a endocitose do complexo GeneJuice-DNA. Entretanto, o mecanismo exato de transfecção não é completamente esclarecido. Foi observado pela microscopia confocal uma taxa de transfecção de cerca de 4 a 7% após 72 horas com esse reagente nas células dendríticas. Usualmente, essa incidência seria considerada baixa, mas levando-se em consideração a linhagem celular padronizada pode-se ressaltar o sucesso da metodologia.

Após a obtenção de células dendríticas viáveis contendo a sequência gênica SmRho, confirmada por PCR, foram realizados os ensaios de proteção contra a esquistossomose. A resposta das células dendríticas frente à complexidade do ciclo do *S. mansoni* é pouco compreendida (Perona-Wright *et al.*, 2006). A interação entre o parasita e a DC começa com o reconhecimento de determinados componentes antigênicos encontrados pelo hospedeiro. Entretanto, todas as fases do ciclo de vida de *S. mansoni* produzem uma gama complexa de moléculas (proteínas, hidratos de carbono e lipídios), algumas das quais têm sido extensivamente caracterizadas e poderiam ser consideradas potenciais candidatas para reconhecimento inato durante a infecção (Pearce, 2003). Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda não foi possível identificar com sucesso uma vacina candidata entre estas moléculas. Visto isso, objetivou-se comparar a proteção fornecida pela DC modificada e pela proteína SmRho, principalmente porque de ambas o potencial protetor é desconhecido.

Com o objetivo de produzir a proteína SmRho, realizou-se a clonagem no plasmídeo pMal-c2X. Seguiu-se reações de PCR, expressão em pequena escala e western blot que

confirmaram a presença da sequência de interesse e expressão da proteína fusionada SmRho/MBP. A purificação por coluna de amilose e clivagem com enzima fator Xa foi realizada para a obtenção da proteína pura SmRho. No entanto, observou-se que, mesmo após ter sido submetido a várias horas de contato com a enzima em coluna apropriada, no momento da primeira eluição, era eluída a SmRho isolada e frações consideráveis da proteína MBP, que deveria ficar retida. Visto isso, essa metodologia mostrou-se inviável e as imunizações com a SmRho foram realizadas a partir das frações separadas obtidas pelo gel de poliacrilamida.

Após obtenção das DCs diferenciadas e modificadas; do plasmídeo SmRho/TOPO, capaz de expressar em células eucariotas, e da proteína SmRho procedeu-se as imunizações usando como controles solução salina e adjuvante. A análise da indução da imunidade, conferida pelos grupos, foi realizada inicialmente pela avaliação do perfil de produção dos anticorpos IgG seguida pela avaliação do perfil protetor de cada vacina testada.

O primeiro resultado de reatividade dos anticorpos foi realizado com a sensibilização da placa de ELISA com a proteína fusionada SmRho/MBP. Os soros de animais referentes à inoculação das DCs não revelou a produção de imunoglobulinas totais assim como no pré-imune. No grupo em que foi inoculado o plasmídeo observou-se a produção de anticorpos sugerindo a captação desse DNA por células APC do animal que foram capazes de processar e apresentar o antígeno estimulando a produção de anticorpos pelos LB. A maior produção de IgG total foi induzida pela inoculação da proteína SmRho. Para garantir que a reatividade observada não era em função da produção de anticorpos anti-MBP, a placa foi sensibilizada com a proteína MBP pura. No entanto, mesmo tendo sido observado a presença desses últimos anticorpos eles estão em menor proporção. Dessa forma, concluiu-se que, apesar de haver produção de anticorpos anti-MBP, há uma produção considerável de anticorpos anti-SmRho.

Com o objetivo de determinar se as IgG produzidas seriam capazes de reconhecer proteínas nativas de *S. mansoni* avaliou-se a reatividade do soro dos animais imunizados frente ao SWAP. Contrário ao resultado anteriormente descrito, a maior reatividade foi observada nas DCs transfectadas. Isso significa que essas células foram capazes de produzir anticorpos contra o agente infeccioso mas não foram detectados no ensaio com a proteína fusionada

devido a presença da MBP em maior quantidade, que reduz a região de reconhecimento estérico da SmRho. Nesse caso, apenas altas concentrações de anticorpos anti-Rho são detectados. Nos demais grupos não foi observado diferença entre o grupo controle pré-imune, demonstrando que o reconhecimento é específico para a SmRho. Além disso, podemos inferir que pequenas quantidades de MBP, no gel que foi imunizado os camundongos do grupo denominado como proteína, induziram a potencialização da produção de anticorpos por ser essa proteína ligadora de maltose também imunogênica.

A última análise foi o perfil protetor contra a esquistossomose. Os grupos controle PBS e adjuvante (*C. parvum* + [Al (OH)₃]) não apresentam resposta imune protetora, conforme o esperado. Observou-se proteção, de 37%, no grupo em que foi inoculado apenas DCs, sugerindo o papel adjuvante protetor dessas células conforme descrito na literatura (Nencioni *et al.*, 2008). O plasmídeo de expressão em células eucariotas construído induziu proteção de 52%, possivelmente a partir da sua incorporação a células musculares e, principalmente, APCs e posterior expressão. A proteína SmRho conferiu proteção de 51%. Os resultados mostraram ainda, e principalmente, que o maior índice de proteção foi induzido pelas DCs modificadas, 56%, confirmando seu potencial papel como vetor vacinal. Perante esse resultado e a produção de anticorpos inferimos que a resposta proporcionada pela DC transfectada foi predominantemente celular.

Os resultados apresentados dão suporte à realização de estudos mais aprofundados e facilitam os esforços para a contínua busca de novas vacinas para quaisquer doenças. A compreensão mais completa da função da DC poderá permitir a concepção racional de tratamentos e/ ou medidas preventivas contra a esquistossomose e outras doenças em que há um desequilíbrio do sistema imune.

6 – Conclusões

A partir do cultivo de células tronco da medula óssea murina, na presença da citocina GM-CSF, foram obtidas células dendríticas viáveis imaturas no décimo dia de cultivo com características fenotípicas e funcionais conservadas.

As células dendríticas obtidas foram transfectadas eficientemente permitindo a expressão de genes heterólogos. O melhor método para transfecção dessas células é através do “GeneJuice Transfection Reagent” comparado à nanopartículas e metodologias lipossomais.

A proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni* garante uma proteção considerável de 51% contra a esquistossomose e pode ser comparada igualmente ao perfil protetor do plasmídeo construído com o seu gene codificador em um vetor de expressão de células eucariotas.

O uso de células dendríticas como vetor vacinal contra a esquistossomose garante um perfil protetor ao hospedeiro de 56%, relativamente maior do que comparado a proteção conferida pela mesma proteína apresentada pela DC.

7 – Referências Bibliográficas

Ahuja, S. S., R. L. Reddick, *et al.* Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. J Immunol, v.163, n.7, Oct 1, p.3890-7. 1999.

Albert, M. L., B. Sauter, *et al.* Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature, v.392, n.6671, Mar 5, p.86-9. 1998.

Ardavin, C., S. Amigorena, *et al.* Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. Immunity, v.20, n.1, Jan, p.17-23. 2004.

Banchereau, J., F. Briere, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.18, p.767-811. 2000.

Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, *et al.* Dendritic cells as vectors for therapy. Cell, v.106, n.3, Aug 10, p.271-4. 2001.

Banchereau, J. e R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, v.392, n.6673, Mar 19, p.245-52. 1998.

Belkaid, Y. e G. Oldenhove. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. Immunity, v.29, n.3, Sep, p.362-71. 2008.

Bergquist, N. R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.90, n.2, Mar-Apr, p.221-7. 1995.

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

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

Boulanger, D., A. Warter, *et al.* Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. Parasite Immunol, v.17, n.7, Jul, p.361-9. 1995.

Bourguin, I., M. Moser, *et al.* Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. Infect Immun, v.66, n.10, Oct, p.4867-74. 1998.

Bruna-Romero, O. e A. Rodriguez. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. Infect Immun, v.69, n.8, Aug, p.5173-6. 2001.

Capron, A., J. P. Dessaint, *et al.* Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. Science, v.238, n.4830, Nov 20, p.1065-72. 1987.

Chen, G. Z. e J. L. Bennett. Characterization of mevalonate-labeled lipids isolated from parasite proteins in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v.59, n.2, Jun, p.287-92. 1993.

Coles, G. C., J. I. Bruce, *et al.* Drug resistance in schistosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.80, n.2, p.347. 1986.

Connolly, N. C., T. L. Whiteside, *et al.* Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. Clin Vaccine Immunol, v.15, n.2, Feb, p.284-92. 2008.

Corsi, K., F. Chellat, *et al.* Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. Biomaterials, v.24, n.7, Mar, p.1255-64. 2003.

Cui, Z. e R. J. Mumper. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. J Control Release, v.75, n.3, Aug 10, p.409-19. 2001.

Den Haan, J. M., S. M. Lehar, *et al.* CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. J Exp Med, v.192, n.12, Dec 18, p.1685-96. 2000.

Fanger, N. A., K. Wardwell, *et al.* Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J Immunol, v.157, n.2, Jul 15, p.541-8. 1996.

Fong, L. e E. G. Engleman. Dendritic cells in cancer immunotherapy. Annu Rev Immunol, v.18, p.245-73. 2000.

Garrett, W. S., L. M. Chen, *et al.* Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. Cell, v.102, n.3, Aug 4, p.325-34. 2000.

Gilboa, E. e J. Vieweg. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. Immunol Rev, v.199, Jun, p.251-63. 2004.

Goes, A. M. e F. J. Ramalho-Pinto. Protective immunity to *Schistosoma mansoni* in mice is dependent on antibody and complement but not on radiosensitive leukocytes. Immunol Lett, v.28, n.1, Apr, p.57-63. 1991.

Goes, A. M., Rocha, R. S., *et al.* Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol, v.11, n.6, Nov, p.695-711. 1989.

Goes, V S. Expressão da Rho1 GTPase de *Schistosoma mansoni* em células dendríticas murinas, Bioquímica e Imunologia (dissertação), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 108p, 2003

Gryseels, B., K. Polman, *et al.* Human schistosomiasis. Lancet, v.368, n.9541, Sep 23, p.1106-18. 2006.

Inaba, K., S. Turley, *et al.* The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. J Exp Med, v.191, n.6, Mar 20, p.927-36. 2000.

Kadowaki, N., S. Antonenko, *et al.* Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. J Exp Med, v.192, n.2, Jul 17, p.219-26. 2000.

Kalinski, P., C. M. Hilkens, *et al.* T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today, v.20, n.12, Dec, p.561-7. 1999.

Katz, N. [Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni]. Rev Soc Bras Med Trop, v.32, n.6, Nov-Dec, p.705-711. 1999.

King, C. H. Toward the elimination of schistosomiasis. N Engl J Med, v.360, n.2, Jan 8, p.106-9. 2009.

Kirchweger, G. Nanoparticles--the next big thing? Mol Ther, v.6, n.3, Sep, p.301-2. 2002.

Kjoller, L. e A. Hall. Signaling to Rho GTPases. Exp Cell Res, v.253, n.1, Nov 25, p.166-79. 1999.

Klechevsky, E., R. Morita, *et al.* Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. Immunity, v.29, n.3, Sep, p.497-510. 2008.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Lande, R., J. Gregorio, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature, v.449, n.7162, Oct 4, p.564-9. 2007.

Lee, K. Y., Kwon, I. C., *et al.* Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. J Control Release, v.51, n.2-3, Feb 12, p.213-220. 1998.

Lewis, S. A. e M. Strand. Characterization of proteins and immunogens released by adult *Schistosoma mansoni*. J Parasitol, v.77, n.2, Apr, p.263-71. 1991.

Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell, v.106, n.3, Aug 10, p.259-62. 2001.

Liu, Y. J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu Rev Immunol, v.23, p.275-306. 2005.

Loeffler, I. K. e J. L. Bennett. A rab-related GTP-binding protein in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v.77, n.1, Apr, p.31-40. 1996.

Lopez, M. N., C. Pereda, *et al.* Prolonged Survival of Dendritic Cell-Vaccinated Melanoma Patients Correlates With Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor {beta}-Expressing T Cells. J Clin Oncol, Jan 12. 2009.

Loukas, A. e J. M. Bethony. New drugs for an ancient parasite. Nat Med, v.14, n.4, Apr, p.365-7. 2008.

Lunde, M. N., E. A. Ottesen, *et al.* Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Am J Trop Med Hyg, v.28, n.1, Jan, p.87-91. 1979.

Lutz, M. B., N. Kukutsch, *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods 1999. 77-92 p.

Malek, T. R. T helper cells, IL-2 and the generation of cytotoxic T-cell responses. Trends Immunol, v.23, n.10, Oct, p.465-467. 2002.

Mao, H. Q., K. Roy, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. J Control Release, v.70, n.3, Feb 23, p.399-421. 2001.

Matsuno, K., T. Ezaki, *et al.* A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. J Exp Med, v.183, n.4, Apr 1, p.1865-78. 1996.

Melief, C. J. Cancer immunotherapy by dendritic cells. Immunity, v.29, n.3, Sep, p.372-83. 2008.

Moll, H. Dendritic cells as a tool to combat infectious diseases. Immunol Lett, v.85, n.2, Jan 22, p.153-7. 2003.

Morales, M. M. Terapias Avançadas - células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo: Atheneu. 2007. 336 p.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Murphy, A., J. A. Westwood, *et al.* Gene modification strategies to induce tumor immunity. Immunity, v.22, n.4, Apr, p.403-14. 2005.

Nencioni, A., F. Grunebach, *et al.* The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. Crit Rev Oncol Hematol, v.65, n.3, Mar, p.191-9. 2008.

Neves, D.P. Parasitologia Humana. 8ª edição. São Paulo, Livraria Ateneu, 2000.

Oliveira, S. C., C. T. Fonseca, *et al.* Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. Acta Trop, v.108, n.2-3, Nov-Dec, p.256-62. 2008.

Pearce, E. J. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. Acta Trop, v.86, n.2-3, May, p.309-313. 2003.

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

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

Perona-Wright, G., Jenkins, S. J., *et al.* Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol, v.36, n.6, May 31, p.711-721. 2006.

Reynolds, S. R., C. E. Dahl, *et al.* T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. J Immunol, v.152, n.1, Jan 1, p.193-200. 1994.

Reynolds, S. R., C. B. Shoemaker, *et al.* T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. J Immunol, v.149, n.12, Dec 15, p.3995-4001. 1992.

Romano, G., P. Michell, *et al.* Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. Stem Cells, v.18, n.1, p.19-39. 2000.

Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

Santos, T. M., D. A. Johnston, *et al.* Analysis of the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* cercariae using the expressed sequence tag approach. Mol Biochem Parasitol, v.103, n.1, Sep 20, p.79-97. 1999.

Schuler, G., B. Schuler-Thurner, *et al.* The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol, v.15, n.2, Apr, p.138-47. 2003.

Schussler, P., C. G. Grevelding, *et al.* Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. Parasitology, v.115 (Pt 6), Dec, p.629-34. 1997.

Sher, A., E. Pearce, *et al.* Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. Curr Opin Immunol, v.15, n.4, Aug, p.421-9. 2003.

Shortman, K. e Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol, v.7, n.1, Jan, p.19-30. 2007.

Smithers, S. R. Recent advances in the immunology of schistosomiasis. Br Med Bull, v.28, n.1, Jan, p.49-54. 1972.

Smithers, S. R. e R. J. Terry. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology, v.55, n.4, Nov, p.695-700. 1965.

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

Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. Mt Sinai J Med, v.68, n.3, May, p.160-6. 2001.

Steinman, R. M., Hawiger, D., *et al.* Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.21, p.685-711. 2003.

Steinman, R. M. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. Immunity, v.29, n.3, Sep, p.319-24. 2008.

Stockinger, B., T. Zal, *et al.* B cells solicit their own help from T cells. J Exp Med, v.183, n.3, Mar 1, p.891-9. 1996.

Sturrock, R. F. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? Mem Inst Oswaldo Cruz, v.96 Suppl, p.17-27. 2001.

Tendler, M., C. A. Brito, *et al.* A Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.1, Jan 9, p.269-73. 1996.

Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

Vermeire, J. J., A. Osman, *et al.* Characterisation of a Rho homologue of Schistosoma mansoni. Int J Parasitol, v.33, n.7, Jul, p.721-31. 2003.

Warren, K. S., E. O. Domingo, *et al.* Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am J Pathol, v.51, n.5, Nov, p.735-56. 1967.

World health organization (WHO), Schistosomiasis, Ficha de informação 115, 2007

Wu, L. e Liu, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. Immunity, v.26, n.6, Jun, p.741-750. 2007.

Xia, D., T. Moyana, *et al.* Combinational adenovirus-mediated gene therapy and dendritic cell vaccine in combating well-established tumors. Cell Res, v.16, n.3, Mar, p.241-59. 2006.

Yang, L. e D. Baltimore. Long-term in vivo provision of antigen-specific T cell immunity by programming hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.12, Mar 22, p.4518-23. 2005.

Zhu, B., Y. Qie, *et al.* Chitosan microspheres enhance the immunogenicity of an Ag85B-based fusion protein containing multiple T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis. Eur J Pharm Biopharm, v.66, n.3, Jun, p.318-26. 2007.

Anexos

ANEXO 1: Consentimento do Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 204/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Vacinação de camundongos com células dendríticas modificadas contendo o gene da RHO1 Gtpase de Schistosoma mansoni**", que tem como responsável **Alfredo de Miranda Goes**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 03/2008**.

Este certificado expira-se em **12/ 03 / 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 204/2007**, related to the project entitled "**Mice vaccination with dendritic cells expressing RHO 1 GTPase of Schistosoma mansoni**", under the supervision of **Alfredo de Miranda Goes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 12, 2008**.

This certificate expires in **March 12, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Março de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3489-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)