



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA

CAROLINA REIS DE OLIVEIRA

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO
NOVO SISTEMA DE LIBERAÇÃO VACINAL
CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE

Belo Horizonte – MG

2011

CAROLINA REIS DE OLIVEIRA

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO
NOVO SISTEMA DE LIBERAÇÃO VACINAL
CONTRA A ESQUISTOSSOMOSE**

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 – MG

2011

Este trabalho foi realizado no Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), cidade do Porto, Portugal, no Laboratório de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. O suporte financeiro foi cedido pelas seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

*“Depois de algum tempo, você aprende...
Que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser;
Que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto;
Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo;
E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito
mais longe depois de pensar que não se pode mais.
E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”
(William Shakespeare)*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

O meu sincero agradecimento a Deus e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Alfredo Goes, pela acolhida e pela confiança depositada em mim, pelos muitos ensinamentos, pelo incentivo constante, e pelos bons momentos de convivência que aumentaram cada dia mais minha admiração por sua pessoa;

À Dra. Ana Paula Pêgo, que me concedeu uma valiosa oportunidade de realizar uma parte muito importante do trabalho em seu laboratório. Apesar do curto período, pude aprender muito com esta pessoa tão competente, cujo apoio foi fundamental em várias etapas do trabalho;

À Dra. Olga Borges, que me acolheu tão bem em seu laboratório. Muito obrigada pela grande oportunidade, pelos muitos conselhos e ensinamentos, pela agradável convivência e pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dawidson Assis, por estar sempre aberto a discutir os experimentos, dando conselhos e auxiliando de forma excepcional em muitas etapas do trabalho;

Aos queridos amigos do LICM, por estarem sempre dispostos a auxiliar nos experimentos, pela maravilhosa convivência que tornam a nossa caminhada menos árdua, pelo suporte afetivo e intelectual e por formarem essa família tão unida que é o nosso lab. Agradeço em especial à Cíntia, Alessandra, Marina, Elis, Estefânia, Vivi e Ju Lott que não mediram esforços para me ajudar em etapas difíceis no decorrer deste trabalho;

Aos amigos do LICM2, que também fazem parte dessa família, e que estão sempre abertos a colaborar conosco;

À nossa querida, Betinha, por ser um anjo em nossas vidas, auxiliando na organização do laboratório, mas acima de tudo por seu carinho e atenção, e também por suas delícias culinárias que adoçam nosso dia a dia;

À toda minha família. Primeiramente aos meus pais, Maria do Carmo e Sebastião, pelo apoio incondicional, por jamais medirem esforços para a realização dos meus sonhos, e por serem um exemplo de vida para mim. Aos meus irmãos, Samuel e Eduardo, pelo

Agradecimentos

companheirismo, amizade e carinho. Aos meus avós, pela oração. A todos que sempre acreditaram em mim.

À amiga Ana Carolina, por ser tão presente na minha vida, por seu carisma, pelas conversas que sempre me traziam força e motivação;

À amiga Mariana, pelos muitos anos de amizade, pela alegria e pela confiança, por sempre estar pronta em ajudar e pela valiosa colaboração nas etapas finais deste trabalho;

Às amigas Terciane, Tamara, Natália, Dani, Rafa e Júlia, pelos momentos de descontração e pela maravilhosa convivência;

Ao Pedro, pelo amor, pelo companheirismo e pela compreensão durante toda esta etapa;

Aos amigos de Bases, pela amizade, por fazerem parte desta caminhada, e também por serem uma porta sempre aberta em seus laboratórios, quando uma ajuda é necessária. Em especial, à Marcela, pelos conselhos e pelas palavras de apoio.

Aos professores, Armando da Silva Cunha Junior e Carlos Alberto Pereira Tavares, por aceitarem participar desta banca;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia;

À CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos básicos e a importância da esquistossomose	1
1.2 A esquistossomose mansônica: agente etiológico e ciclo de vida	1
1.3 Patologia da esquistossomose mansônica no hospedeiro definitivo	3
1.3.1 A inflamação e formação do granuloma	5
1.4 A resposta imune na esquistossomose	6
1.5 Tentativas de controle da esquistossomose	8
1.5.1 Candidatos vacinais contra a esquistossomose	9
1.6 Estratégias de vacinação	11
1.6.1 Tipos de vacinas	11
1.6.2 Novas vias de administração e novas formulações vacinais	12
1.6.3 Biopolímeros e sistemas carreadores vacinais	14
1.6.4 Potencialização imune com adjuvantes funcionalizados a nanopartículas 16	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Construção do plasmídio pDEST42-Rho	20
3.1.1 Amplificação do gene da Rho1-GTPase de <i>S.mansoni</i>	20
3.1.2 Clonagem no vetor pDNOR e subclonagem no vetor de expressão pET- DEST42 20	20
3.2 Sequenciamento do fragmento inserido no pDEST42	23
3.3 Expressão da proteína Rho1-GTPase de <i>S. mansoni</i> em sistema procarioto 23	23
3.3.1 Mini-Expressão da proteína recombinante SmRho	23
3.3.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida - SDS/PAGE	24
3.3.3 Eletrotransferência de proteínas - <i>Western blotting</i>	24

3.3.4	Maxi-expressão da proteína recombinante Rho1-GTPase de <i>S. mansoni</i>	25
3.4	Purificação da proteína SmRho em coluna His Trap HP	25
3.5	Diálise.....	26
3.6	Determinação da concentração de proteínas	26
3.7	Avaliação do potencial imunogênico da proteína Rho1-GTPase de <i>S.mansoni</i>	26
3.7.1	ELISA	27
3.7.2	<i>Western Blotting</i>	27
3.8	Preparação das nanopartículas de quitosana-DNA.....	27
3.8.1	DNA plasmidial.....	28
3.8.2	Polímeros.....	28
3.8.3	Preparo dos complexos quitosana/DNA.....	29
3.8.4	Caracterização dos complexos	29
3.8.5	Testes <i>in vitro</i>	30
3.8.6	CHimi.....	31
3.8.7	Análise da influência do pH sobre as nanopartículas.....	31
3.9	Preparação de partículas de quitosana associadas à proteína SmRho e revestidas com alginato de sódio.....	32
3.9.1	Preparação das nanopartículas de quitosana	32
3.9.2	Adsorção da proteína SmRho	32
3.9.3	Revestimento das partículas com alginato de sódio.....	32
3.9.4	Avaliação da dessorção durante o processo de revestimento.....	33
3.9.5	Caracterização das nanopartículas de quitosana-proteína	33
3.10	Estudos de imunização.....	34
3.10.1	Animais.....	34
3.10.2	Grupos de tratamento	34
3.10.3	Preparo das amostras	35
3.10.4	Escala de imunizações e coleta dos soros	36
3.10	Análise da produção de anticorpos	36
3.10.1	Preparação antigênica solúvel de verme adulto (SWAP)	36
3.10.2	ELISA	37
3.11	Avaliação da resposta imune protetora dos camundongos vacinados frente à infecção desafio com cercárias.....	37
3.11.1	Cercárias	37

3.11.2	A infecção desafio	37
3.11.3	Perfusão.....	38
3.11.4	Quantificação da atividade protetora.....	38
3.12	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Clonagem dos gene codificador da proteína RHO1-GTPase de <i>S. mansoni</i> .	40
4.2	Determinação da seqüência de nucleotídeos.....	41
4.3	Expressão e purificação da proteína Rho1-GTPase de <i>S. mansoni</i>	43
4.3.1	Mini-expressão da proteína recombinante SmRho.....	43
4.3.2	Maxi-expressão e purificação da proteína recombinante SmRho.....	45
4.4	A proteína SmRho é reconhecida por soros de pacientes infectados com <i>S. Mansoni</i>	45
4.4.1	ELISA	45
4.4.2	<i>Western Blotting</i>	46
4.5	Caracterização dos nanocomplexos de quitosana/DNA.....	47
4.6	Transfecção.....	49
4.7	A influência do pH sobre os nanocomplexos.....	49
4.8	Caracterização das partículas de quitosana associadas com a proteína SmRho e revestidas com alginato de sódio.....	50
4.9	Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	52
4.10	Avaliação da resposta imune humoral.....	53
4.11	Avaliação da resposta imune protetora	59
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	73
7	PERSPECTIVAS.....	74
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	ANEXO.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

μg		Micrograma
μL		Microlitro
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
APC	Antigen presenting cell	Célula apresentadora de antígeno
AST	Antigenic sequence tag	Etiqueta de sequência antigênica
CCL	Chemokine ligant	Ligante de quimiocina
CCR	Chemokine receptor	Receptor de quimiocina
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucléico complementar
pDNA	Plasmid deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucléico plasmidial
CpG	Cytosine-phosphate-guanine	Citosina-fósforo-guanina
CpG ODN	Oligodeoxynucleotide with CpG motifs	Oligonucleotídeos com motivos CpG
DC	Dendritic cell	Célula dendrítica
pDC	Plamacytoid dendritic cell	Célula dendrítica plasmacitóide
DAB	Diaminobenzidine	Diaminobenzidina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Meio modificado de Dulbecco
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate	

ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay	Ensaio de absorção imunoenzimático
FAE	Follicle-associated epithelium	Epitélio folicular associado
GFP	Green fluorescent protein	Proteína fluorescente verde
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosina trifosfato
HEK	Human embryonic kidney cells	Células de rim embrionário humano
IFN	Interferon	Interferon
IL	Interleukin	Interleucina
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa		Kilo Dalton
mL		Mililitro
mM		Milimolar
Ng		Nanograma
NK	Natural killer cell	Células natural killer
nM		Nanomolar
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Phosphate-buffered saline	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase chain reaction	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	Fluoreto de fenilmetanosulfonil

RNA	Ribonucleic acid	Ácido ribonucléico
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Dodecil sulfato de sódio
siRNA	Small interfering RNA	Pequenos RNA's de interferência
TDR	Tropical Diseases, Special Programme for Research and Training	Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	
TGF- β	Transforming growth factor	Fator de crescimento transformante β
TLR	Toll-like receptor	Receptor do tipo toll
TNF	Tumor necrosis factor	Fator de necrose tumoral
U		Unidades de enzima
WHO	World Health Organization	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida do gênero <i>Schistosoma</i>	3
Figura 2: Funções do epitélio folicular associado	13
Figura 3: Mapa molecular do plasmídeo pDONR 221	21
Figura 4: Mapa molecular do plasmídeo pET-DEST42	22
Figura 5: Procedimento de infecção percutânea realizado com os camundongos anestesiados e imobilizados..	38
Figura 6: Amplificação da sequência codificadora da SmRho a partir do cDNA de verme adulto de <i>S. mansoni</i>	40
Figura 7: Confirmação da clonagem da sequência da SmRho no vetor pDONR 221 por PCR.....	41
Figura 8: Confirmação da clonagem da sequência da SmRho no vetor de expressão pET-DEST42 por PCR.....	41
Figura 9: Sequência de nucleotídeos obtida do ensaio de seqüenciamento	42
Figura 10: Alinhamento da sequência parcial do mRNA da Rho1-GTPase de <i>S. mansoni</i> e da sequência obtida da SmRho após o seqüenciamento.	43
Figura 11: Análise do ensaio de indução da expressão da Rho1-GTPase recombinante	44
Figura 12: Análise da expressão da proteína recombinante nas frações solúvel e insolúvel a 30°C e 37°C	44
Figura 13: Perfil protéico das frações coletadas durante a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade	45
Figura 14: Reatividade dos soros de pacientes controle, infectados tratados e não-tratados, contra os antígenos SmRho (A) e SWAP (B) observados por ELISA.....	46
Figura 15: Reatividade dos soros de pacientes infectados, tratados e não tratados, e controle, contra antígenos do <i>S. mansoni</i>	46
Figura 16: Retenção eletroforética pela CH M010 (A) e CH HMW (B) em gel de agarose 1%	47
Figura 17: Representação da média do tamanho das partículas dos complexos de quitosana como função da razão molar N/P	48
Figura 18: Representação do potencial zeta das partículas dos complexos de quitosana como função da razão molar N/P	48
Figura 19: Atividade de transfecção de células HEK 293 com os complexos formados com a CH M010 e CH HMW.	49
Figura 20: Medidas da média do tamanho (A) e do potencial zeta (B) das nanopartículas de CH M010 e CHimi.....	50

Figura 21: Medida do potencial zeta das partículas de quitosana, antes (NP) e após o revestimento (NPR)	52
Figura 22: Perfil de liberação da SmRho das nanopartículas de quitosana revestidas nos meios SGF (A) e SIF (B)	52
Figura 23: Resposta de anticorpos IgG total anti-Rho dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B)	54
Figura 24: Resposta de anticorpos IgG total anti-SWAP dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B)	55
Figura 25: Resposta de anticorpos IgG1 anti-Rho dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B)	56
Figura 26: Resposta de anticorpos IgG1 anti-SWAP dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B)	57
Figura 27: Resposta de anticorpos IgG2a anti-Rho dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B)	58
Figura 28: Resposta de anticorpos IgG2a anti-SWAP dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B)	59
Figura 29: Efeito protetor das diferentes formulações vacinais com as quais os camundongos C57BL/6 foram imunizados.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Antígenos selecionadas pela WHO/TDR como candidatos à vacina contra esquistossomose.	10
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação da sequência codificadora da SmRho.....	20
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento da sequência codificadora da SmRho.....	23
Tabela 4: Esquema dos grupos de tratamento das imunizações.....	35
Tabela 5: Eficiência de ligação das partículas de quitosana antes e após o revestimento	51
Tabela 6: Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de quitosana antes e após o revestimento	51

RESUMO

A esquistossomose permanece como uma das doenças mais prevalentes do mundo e até o momento não existe uma vacina efetiva contra a infecção do *Schistosoma mansoni*. Embora a vacinação oral possua numerosas vantagens sobre a injeção parenteral, a degradação das vacinas no trato gastrointestinal e sua baixa taxa de internalização no tecido linfóide associado ao epitélio intestinal, ainda limita o desenvolvimento das vacinas orais. A associação de vacinas com sistemas carreadores baseados em micro e nanopartículas pode prevenir sua degradação, aumentar o transporte das células M para a região das placas de Peyer e ainda promover a ativação do sistema imune. A quitosana tem se mostrado um carreador vacinal apropriado devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e sua facilidade de formar nanopartículas, quando associadas com proteínas e também com ácidos nucleicos. Para assegurar a estabilidade no trato gastrointestinal das nanopartículas que possuem o antígeno adsorvido em sua superfície, um processo de revestimento com alginato de sódio tem sido realizado com resultados promissores. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar nanopartículas associadas à proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni* e ao pDNA-Rho, que codifica a proteína Rho1-GTPase, sendo as primeiras revestidas com alginato de sódio, e avaliar a imunidade protetora induzida por essas formulações vacinais. A caracterização das nanopartículas mostrou que elas apresentam um tamanho e potencial zeta adequados para sua utilização como vacinas orais e ainda apresentaram boa estabilidade quando submetidas aos meios que simulam o fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF). As diferentes formulações preparadas, nas quais foi adicionado ou não o adjuvante CpG, foram administradas a camundongos C57BL/6, tanto por via oral quanto por via intramuscular. O grupo que apresentou maiores níveis de produção de anticorpos, avaliados por ELISA, foi o grupo imunizado via intramuscular com partículas de quitosana-proteína-alginato. No entanto esse grupo não apresentou uma proteção significativa após a infecção com cercárias. Entre os grupos imunizados por via oral, o grupo no qual administrou-se partículas de quitosana-proteína-alginato junto com partículas de quitosana-DNA, apresentou os melhores resultados, de forma geral. Esse grupo obteve quantidades consideráveis de anticorpos e ainda apresentou a maior porcentagem de proteção, com uma diminuição de 57% dos vermes recuperados. Portanto, pode-se concluir que embora as formulações administradas por via oral não tenha produzido altos níveis de anticorpos, a maioria apresentou um bom perfil protetor, mostrando o amplo potencial ainda a ser explorado na utilização de nanopartículas como sistemas carreadores vacinais.

ABSTRACT

Schistosomiasis remains one of the world's most prevalent diseases and until now there isn't an effective vaccine against the *Schistosoma mansoni* infection. Although oral vaccination has numerous advantages over parenteral injection, degradation of the vaccine in the gastrointestinal and low uptake in the gut-associated lymphoid tissue limit the development of oral vaccines. Association of the vaccine with carrier systems based on micro and nanoparticles may prevent its degradation, stimulate the M-cells to transport the vaccine to the dome of the Peyer's Patches and also promote the activation of immune system. Chitosan has been shown a suitable vaccine carrier because of its biocompatibility, biodegradability and its ability to easily form nanoparticles, when associated with protein and also with nucleic acids. To ensure the stability in the gastrointestinal tract of the nanoparticles that have the antigen adsorbed on its surface, a coating process with sodium alginate has been done with promising results. In this context, the aim of this study was to prepare and characterize nanoparticles associated with the protein Rho1-GTPase of *S. mansoni* (SmRho) and to the pDNA-Rho encoding the protein Rho1-GTPase, with the first one being coated with sodium alginate, and evaluate the protective immunity induced by these candidates of vaccine. The characterization of the nanoparticles showed that they had a size and zeta potential suitable for their use as oral vaccine and also the suspensions of the particles showed a good stability when exposed to simulate gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF). The various formulations prepared, with or without the addition of the adjuvant CpG, were administered to mouse C57BL/6, either orally or intramuscularly. The group that had the higher levels of antibody, as measured by ELISA, was the group immunized with alginate coated chitosan nanoparticles associated with SmRho administered by intramuscular route. However, this group showed no significant protection after the cercariae infection. Among the groups immunized by oral route, the one that was administered with alginate coated chitosan nanoparticles loaded with SmRho and chitosan-DNA particles, showed the best results in general. This group had considerable amounts of antibodies and also had the highest percentage of protection, with a decrease of 57% of the worms recovered. In conclusion, although the formulations administered orally has not produced high levels of antibodies, most had a good protective profile, showing the vast potential yet to be explored in the use of nanoparticles as vaccine carrier systems.

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 700 milhões de pessoas em risco de contaminação em todo o planeta. Dentro dessa estatística, mais de 207 milhões estão infectadas de forma contínua ou intermitente, sendo que 85% dessas pessoas vivem na África (World Health Organization (Who), 2010). Aproximadamente 280.000 mortes são atribuídas à esquistossomose apenas na África sub-Sahariana (Van Der Werf *et al.*, 2003). No entanto a doença é mais conhecida pela sua cronicidade e morbidade debilitante (King *et al.*, 2005).

No Brasil, os primeiros casos de pacientes com esquistossomose foram relatados em 1908, por Pirajá da Silva (Prata, 2008), e a partir daí, foram mapeadas as regiões brasileiras mais afetadas por essa doença, que compreendem atualmente os estados litorâneos das regiões nordeste e sudeste. A área endêmica para esquistossomose se encontra em expansão, abrangendo 19 estados com 25 a 30 milhões de habitantes expostos ao risco de infecção e cerca de 8 a 10 milhões de pessoas infectadas (Coura e Amaral, 2004).

A escassez de programas de saúde funcionais e de saneamento básico faz com que a esquistossomose seja, hoje, a principal helmintíase em termos de morbidade e mortalidade. Especialmente em países subdesenvolvidos, os altos índices de ocorrência de esquistossomose conduzem a um comprometimento na produtividade e qualidade de vida dos indivíduos infectados, além de provocarem inúmeras outras consequências no desenvolvimento sócio-econômico dos países onde ela ocorre (King, 2009).

1.2 A esquistossomose mansônica: agente etiológico e ciclo de vida

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”.

O *S. mansoni* é uma espécie pertencente à família Schistosomatidae, que se caracteriza por agrupar trematódeos que apresentam dimorfismo sexual. A disseminação da doença depende de dois hospedeiros: um intermediário, que no Brasil é representado principalmente pelo caramujo do gênero *Biomphalaria*, no qual ocorre a reprodução assexuada do parasita, e outro vertebrado definitivo, em particular o homem, no qual a reprodução do helminto ocorre de forma sexuada (Revisado por Neves, 2005).

A infecção inicia-se com a exposição à água contaminada, quando as larvas infectantes, cercárias, penetram na pele do hospedeiro. Neste processo, as cercárias perdem a cauda bifurcada, as glândulas pré e pós acetabulares, dando origem à forma jovem do verme, o esquistossômulo (Gordon e Griffiths, 1951). Cerca de 48 horas após a infecção, os esquistossômulos entram na corrente sangüínea e iniciam sua migração passiva, intravascular, passando pelo pulmão antes de alcançar o sistema porta hepático, onde completam seu desenvolvimento. Então, machos e fêmeas se acasalam, iniciando nova migração até seu sítio de residência nas veias mesentéricas, o que leva aproximadamente 2 a 3 semanas. Neste local, a maturidade sexual da fêmea é atingida por volta da 6ª semana, quando a ovoposição se inicia (Miller e Wilson, 1978). Cada fêmea produz diariamente cerca de 300 ovos (Von Lichtenberg, 1962). Alguns destes ovos movem-se através das paredes das vênulas, atravessam as paredes do intestino, alcançam o lúmen e são eliminados junto com as fezes. Os ovos que chegam ao ambiente externo precisam alcançar a água para eclodir e liberar o embrião, miracídio, que através da natação ativa, encontra seu hospedeiro intermediário, o caramujo. Neste, os miracídios transformam-se em esporocistos primários e, algum tempo depois (8 a 10 dias), em esporocistos secundários. Posteriormente, os esporocistos secundários migram para as glândulas digestivas do molusco e se reproduzem assexuadamente, dando origem às cercárias (Revisado por Neves, 2005).

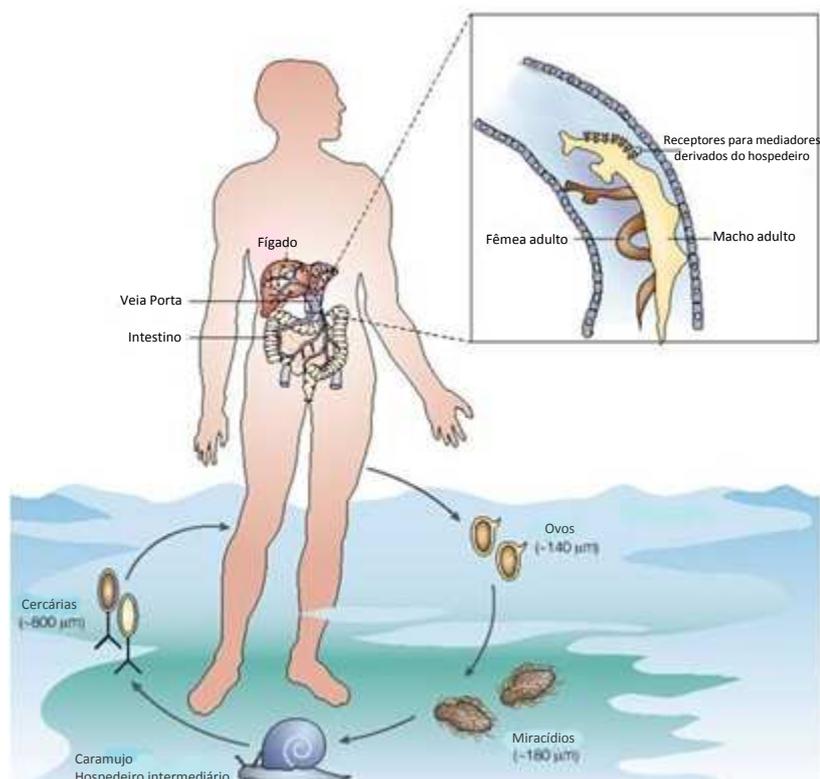


Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida do gênero *Schistosoma*. Adaptados de Pearce e MacDonald (2002).

Os 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 e Domingo, 1967).

Os vermes adultos podem habitar 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).

1.3 Patologia da esquistossomose mansônica no hospedeiro definitivo

As cercárias, os esquistossômulos, os vermes adultos e os ovos exercem papéis diferenciados na geração da patologia. A penetração das cercárias pode produzir uma reação alérgica inflamatória denominada dermatite cercariana, caracterizada por coceira e eritema. Assim como as cercárias, os esquistossômulos podem produzir uma

reação alérgica durante a sua migração pelo sistema hemolinfático do hospedeiro caracterizada por tosse e febre (El-Garem, 1998). Os efeitos patológicos gerados pelos vermes adultos, que vivem no sistema mesentérico do hospedeiro, são quase inexistentes. Porém, podem se observar febre prolongada, sudorese, mialgia e dores de cabeça logo após a ovoposição (El-Garem, 1998).

O mais importante agente nocivo decorrente da infecção reside nos ovos que não são eliminados nas fezes e ficam presos na mucosa intestinal ou são levados pelo fluxo sangüíneo para o fígado (Boros e Warren, 1970). Estes ovos retidos (variando desde 20 a 60% do total de ovos produzidos) representam um estímulo antigênico potente e contínuo, sendo circundados por células características da resposta inflamatória granulomatosa do hospedeiro (Boros e Warren, 1970; Warren e Domingo, 1967). A fibrose que se desenvolve em torno das ramificações da veia porta bloqueia a circulação sangüínea gerando hipertensão com congestão e edema no intestino e baço, e conseqüente esplenomegalia. A sobrecarga circulatória induz a formação de veias sujeitas à ruptura e hemorragias graves (Revisado por Rey, 2008).

Na esquistossomose humana é possível identificar duas fases de desenvolvimento do parasita, a fase aguda e a fase crônica, de acordo com o tempo de infecção e com a sintomatologia apresentada pelo hospedeiro definitivo (Boros, 1989). As manifestações da fase aguda raramente ocorrem em indivíduos de áreas endêmicas devido às exposições pré-natal via transporte transplacentário (Novato-Silva E *et al.*, 1992) e pós-natal devido às infecções repetidas. Os sintomas desta fase incluem febre, edema, tosse seca e persistente, diarréia e eosinofilia (Warren, 1973) e aparecem entre 2-10 semanas após a exposição às cercárias, coincidindo com o período migratório do esquistossômulo nos pulmões e fígado, maturação dos vermes e ovoposição nas veias mesentéricas. Na grande maioria dos casos, os sintomas são transitórios e espontaneamente desaparecem com a passagem da infecção ao estágio crônico. A fase crônica é classificada em forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Andrade e Van Marck, 1984). Pacientes com a forma intestinal constituem cerca de 90% da população infectada em áreas endêmicas. Normalmente, os pacientes com esta forma apresentam sintomatologia discreta e presença de mecanismos imunorreguladores da formação do granuloma. Embora não existam estudos detalhados relacionados à forma hepatointestinal, pacientes portadores desta forma clínica apresentam uma hepatomegalia não associada à esplenomegalia.

Uma pequena parte da população cronicamente infectada (variando de 1% a 10%) pode vir a desenvolver uma forma mais grave da doença, a forma clínica hepatoesplênica. Estes pacientes apresentam uma severa hepatoesplenomegalia devido à formação de intensa fibrose nos espaços periportais, associada à deposição

de ovos do parasita e formação de granulomas ao redor destes ovos retidos nos tecidos, principalmente no fígado (Warren, 1982).

1.3.1 A inflamação e formação do granuloma

Durante o ciclo de vida do *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado, uma série de antígenos é secretada, excretada e/ou desprendida do parasita, levando a uma resposta inflamatória granulomatosa e à produção de altos níveis de anticorpos (Berggren e Weller, 1967). Essa resposta é um processo dinâmico, onde a população de células infiltradas no local varia com o decorrer da infecção (Stenger *et al.*, 1967; Chensue e Boros, 1979).

O processo de formação dos granulomas hepáticos se inicia quando antígenos, originados nas glândulas secretoras dos miracídios são liberados através de microporos localizados na casca dos ovos estimulando resposta inflamatória (Boros, 1989). Estes antígenos são transportados para órgãos linfóides através de vasos sanguíneos e linfáticos. Nestes órgãos, os antígenos são capturados, processados por células apresentadoras de antígenos (APCs) que incluem linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. Posteriormente, os antígenos são apresentados a linfócitos T associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Phillips e Lammie, 1986). Esta interação leva à ativação de células T, expansão clonal, secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos adicionais. Desta resposta participam linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, células epitelióides, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (Von Lichtenberg, 1962; Silva-Teixeira *et al.*, 1996)

As células recrutadas se acumulam em torno dos ovos dando origem ao granuloma propriamente dito, que pode apresentar um volume até 100 vezes maior do que os ovos. Há predomínio de eosinófilos e grande produção de IgE (Dent *et al.*, 1997). A destruição local dos tecidos é seguida de fibrose, um processo de cicatrização da ferida no qual os fibroblastos são conduzidos para a lesão e a conseqüente produção de colágeno resulta em cicatriz que pode ocasionar a obstrução de vasos sanguíneos e/ou linfáticos (Von Lichtenberg, 1962; Warren e Domingo, 1967). A reação granulomatosa é considerada um mecanismo necessário para conter os efeitos tóxicos das proteínas secretadas pelos ovos e evitar danos às células vizinhas, de modo a limitar a patologia da infecção (Doenhoff *et al.*, 1979). Porém, respostas celulares exacerbadas e sem controle provocam o aparecimento de fibrose e aumentam o risco de desenvolvimento de esplenomegalia característica da doença (Warren, 1982). Nesse sentido, o desenvolvimento de uma patologia severa

parece resultar da inabilidade do hospedeiro em controlar ou modular as respostas imunológicas contra os ovos.

1.4 A resposta imune na esquistossomose

O entendimento da resposta imune na patologia e na resistência natural à infecção é importante para compreender quais as características de uma resposta imune protetora na esquistossomose. A resposta imune humoral e celular na esquistossomose humana varia de acordo com a fase e forma clínica da doença. Pacientes na forma aguda da doença produzem altos níveis de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e baixos níveis de anticorpos IgM e IgG4 contra antígenos do esquistossômulo (Khalife *et al.*, 1986). Em humanos, IgG1, IgG3 e IgE são isotipos capazes de mediar à destruição de esquistossômulos *in vitro* na presença de eosinófilos, macrófagos e plaquetas por um mecanismo de citotoxicidade mediada por anticorpo (ADCC) e fixação de complemento, enquanto que IgM e IgG4 não são capazes de mediar à destruição do parasito (Khalife *et al.*, 1986). Quanto à resposta celular na fase aguda da doença, observa-se uma significativa resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a antígenos solúveis de ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) (Gazzinelli *et al.*, 1987). Indivíduos nesta fase da doença apresentam um perfil de resposta celular do tipo Th1 (Montenegro *et al.*, 1999) com alta produção de IFN- γ de PBMC em resposta a estimulação com SEA e baixos níveis de produção de IL-10 e IL-5 em resposta ao mesmo antígeno (De Jesus *et al.*, 2002). Na fase crônica da doença, indivíduos exibem uma baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3 e alta produção de IgG4 em resposta a antígenos do esquistossômulo e do verme adulto (Jassim *et al.*, 1987). Indivíduos que apresentam a forma clínica intestinal produzem menor quantidade de IFN- γ e maior produção de IL-10 em resposta à estimulação de PBMC com SEA e SWAP. Na forma severa da esquistossomose, a forma hepatoesplênica, o bloqueio de IL-4 causa significativo decréscimo na resposta proliferativa e decréscimo na formação do granuloma *in vitro*. Indivíduos hepatoesplênicos produzem baixas quantidades de IFN- γ e apresentam, em análise de citometria de fluxo, redução do percentual de células NK (Martins-Filho *et al.*, 1999). A fibrose hepática resultante da inflamação granulomatosa ao redor do ovo do *S. mansoni* depositado no fígado está diretamente associada a uma elevada produção de IL-13 (Ribeiro De Jesus *et al.*, 2004).

Alguns indivíduos em áreas endêmicas para a esquistossomose, apesar do contato constante com águas contaminadas, apresentam exames de fezes persistentemente negativos para a presença de ovos de *S. mansoni*. Estes indivíduos,

inicialmente descritos por (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998), são considerados indivíduos naturalmente resistentes (RN) à infecção pelo *S.mansoni* e, por causa disso, há um grande interesse em se estudar a resposta imune nesses indivíduos. Análises fenotípicas de PBMC de indivíduos RN por citometria de fluxo demonstram uma alta proporção de células CD3⁺, CD4⁺ e CD4⁺ CD28⁺, além de uma elevada expressão de B7.1 e B7.2 (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000). Ademais, as PBMC de indivíduos RN produzem elevados níveis de IFN- γ em resposta à estimulação com antígenos de cercária, verme adulto e ovo, indicando um envolvimento da resposta do tipo Th1 na imunidade protetora destes indivíduos (Viana *et al.*, 1994). Existem também indivíduos resistentes à reinfeção que apresentam um claro padrão de resposta celular do tipo Th2 com elevada produção de IL-5 e níveis não detectáveis de IFN- γ (Roberts *et al.*, 1993). Em indivíduos resistentes à reinfeção, observa-se um aumento da resposta proliferativa de PBMC em resposta a estimulação com SEA após o tratamento com oxaminiquine (Caldas *et al.*, 2000). Nestes indivíduos observa-se também um aumento nos títulos de IgE específicos para antígenos do tegumento de esquistossômulos e uma diminuição nos títulos de IgG4 específicos em relação aos indivíduos susceptíveis (Caldas *et al.*, 2000).

Estudos em modelo murino têm ajudado a clarear quais seriam os perfis de resposta imune protetora (Wilson e Coulson, 2006). Em camundongos imunocompetentes, a resposta imune a antígenos de *Schistosoma* manifesta uma mudança de Th1 na fase aguda para Th2 com o início da deposição de ovos com aproximadamente 42 dias após a penetração das cercárias (Revisado por Pearce e Macdonald, 2002). A contribuição de IFN- γ produzido por células Th1, e IL-4, IL-5 e IL-13, produzido por células Th2, na resposta granulomatosa tem sido discutida, sendo que a fibrose e a maior parte da patologia associada ao granuloma é principalmente mediada por produção aumentada das citocinas do tipo Th2 em relação àquelas do perfil Th1 (Reiman *et al.*, 2006).

Extrema polarização imune em direção a um perfil Th1 ou Th2 é prejudicial ou senão letal para o hospedeiro (Hoffmann *et al.*, 2000). No curso normal de infecção, células T CD4⁺ reguladoras (Treg) mantém a homeostase imunológica controlando a magnitude da resposta imune a organismos invasores (Belkaid e Rouse, 2005). Tais células Treg endógenas têm sido chamadas de células Treg naturais. Além das Treg naturais (Foxp3⁺), existem as Treg indutíveis (Foxp3⁻) que respondem em paralelo com os mecanismos efetores e também controlam a magnitude da resposta imune (Wilson *et al.*, 2007). Moléculas de lisofosfatidilserina (Lyso-PS) extraídas de vermes de *S. mansoni* e, em menor extensão de ovos, podem induzir ativamente células Treg

secretoras de IL-10 durante a infecção via sinalização TLR-2 em células dendríticas, sugerindo que células Treg podem ser diretamente induzidas por moléculas derivadas do parasito (Van Der Kleij *et al.*, 2002). Apesar da clara identificação de células Treg durante a infecção, ainda não está claro o mecanismo pelo qual as células Treg controlam a imunopatologia. A citocina IL-10 tem um claro papel regulatório durante a infecção por *S. mansoni* e regula de forma crítica a patologia no tecido hepático (Wynn *et al.*, 1998). A fonte de IL-10 necessária para polarização Th2 da resposta induzida por antígeno de ovo é alvo de considerável interesse atual. Trabalhos anteriores sugerem que células Th2 ou macrófagos produzam IL-10 (Wynn *et al.*, 1998). Trabalhos recentes suportam esta visão e, além disso, eles destacam a importância de células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ como fonte de IL-10, as quais podem suprimir a produção de IL-2 e o desenvolvimento da resposta Th1 e assegurar a polarização para Th2 durante a esquistossomose (Hesse *et al.*, 2004). Os mecanismos precisos de supressão mediados por Treg, além da secreção de IL-10, durante a infecção por *S. mansoni* permanece a ser elucidado (Wilson *et al.*, 2007).

1.5 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 e Colley, 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 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.

Para o desenvolvimento de vacinas é essencial a identificação de antígenos que sejam capazes de induzir uma resposta imune específica, gerando células de memória. O avanço das técnicas utilizadas em imunologia e em biologia molecular, associados aos novos conhecimentos do genoma do *S. mansoni*, têm contribuído para a identificação de novas moléculas com potencial para serem candidatas à vacina (Oliveira *et al.*, 2008). Obstáculos adicionais incluem o acesso a novos adjuvantes que podem ser requeridos para induzir uma resposta imune adequada e a dificuldade de conduzir estudos eficazes em larga-escala em áreas endêmicas (Hotez *et al.*, 2010).

1.5.1 Candidatos vacinais contra a esquistossomose

Inúmeros estudos têm sido feitos a fim 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). Há pouco mais de uma década, a Organização Mundial de Saúde (WHO), através do Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR), incluiu seis antígenos nos programas de desenvolvimento de vacina contra esquistossomose (Tabela 1). Porém, esses antígenos testados apresentaram níveis de proteção insuficientes durante os ensaios pré-clínicos (Oliveira *et al.*, 2008).

Tabela 1: Antígenos selecionadas pela WHO/TDR como candidatos à vacina contra esquistossomose. Adaptado de Bergquist (1998).

Antígeno	Função	Proteção (animais isogênicos)	Lugar de desenvolvimento	Estado legal	Referências
Glutathiona S-trasnferase (P28/GST)	Enzima	30-60	Instituto Pasteur, Lille, França	Patenteado	(Boulanger <i>et al.</i> , 1995)
Paramiosina (Sm97)	Proteína muscular	30	Case Western Reserve University, NIH, Cornell University, USA	Domínio público	(Pearce <i>et al.</i> , 1988)
IrV-5 (62 kDa)	Proteína muscular	50-70	Johns Hopkins School of Medicine, USA	Domínio público	(Soisson <i>et al.</i> , 1992)
Triose fosfato isomerase (TPI) (28kDa)	Antígeno de membrana	30-60	Harvard School of Public Health, Boston, USA	Domínio público	(Reynolds <i>et al.</i> , 1994)
Sm23	Proteína Integral de membrane	40-50	Johns Hopkins School of Medicine, Harvard School of Public Health, USA	Domínio público	(Reynolds <i>et al.</i> , 1992)
Sm14	Proteína que se liga a ácidos graxos	40-65	Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil	Patenteado	(Tendler <i>et al.</i> , 1996)

Dentro desse contexto, há a necessidade de buscar novos antígenos que sejam capazes de induzir melhores níveis de uma resposta imune 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* (Schüssler *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 (Kjøller 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, conseqüentemente, 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 Rho1-GTPase de *S. mansoni*, denominada de SmRho, nos processos imunológicos decorrentes da esquistossomose.

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

1.6 Estratégias de vacinação

O desenvolvimento de uma vacina enfrenta desafios importantes, tanto em questões tecnológicas quanto econômicas. Novas vacinas que sejam estáveis e econômicas, que requerem poucas doses, podendo ser administradas utilizando sistemas livres de agulhas são uma prioridade mundial. Uma vacina teórica ideal deve apresentar uma formulação e liberação adequada. A administração de vacinas por via oral, intranasal e transcutânea irá diminuir os riscos de doenças transmitidas por agulhas e pode eliminar a necessidade de pessoas treinadas e equipamentos estéreis. Um ponto crucial para o sucesso de uma vacina é a estratégia de liberação que será empregada. Atualmente, várias técnicas que envolvem vacinas de DNA, adjuvantes, micropartículas e plantas transgênicas estão sendo desenvolvidas e avaliadas. Embora, qualquer haja expectativa em qualquer avanço importante, estes sistemas têm potencial e levarão a imunização a um novo nível tecnológico (Azad e Rojanasakul, 2006).

1.6.1 Tipos de vacinas

Diversas estratégias de vacinação vêm sendo utilizadas sendo que cada uma delas apresenta suas vantagens e desvantagens. Atualmente, têm se utilizado três tipos de moléculas na produção de vacinas: proteínas recombinantes, DNA e peptídeos sintéticos. O uso de proteínas recombinantes tem como vantagens a sua obtenção em elevadas concentrações e por apresentarem caráter imunogênico. Entretanto, dependendo do sistema utilizado para a purificação das proteínas recombinantes, pode ocorrer a perda de alguns epítopos conformacionais das estruturas protéicas (Dalton *et al.*, 2003). De forma comparativa, as vacinas de DNA apresentam uma produção em larga escala mais simplificada e de baixo custo, além da vantagem das moléculas de DNA serem estáveis a temperatura ambiente, o que facilita o seu transporte e armazenamento. Entretanto, as vacinas de DNA geralmente apresentam capacidade imunogênica diminuída quando comparadas às proteínas que elas codificam (Katz, 1999; Pacífico *et al.*, 2006). Já a produção de vacinas de

peptídeos é baseada na identificação e síntese química de epítomos imunodominantes de antígenos vacinais previamente caracterizados e capazes de induzir resposta imune específica (Naz e Dabir, 2007). Peptídeos sintéticos apresentam benefícios como a imunização de animais com uma estrutura mínima, consistindo de um antígeno bem definido que pode ser completamente caracterizado com relação à antigenicidade e imunogenicidade. A seleção de epítomos diminui a probabilidade de se utilizar sequências que sabidamente ativam mecanismos imunossupressores ou que ativem mecanismos de autoimunidade. Entretanto, a utilização de peptídeos tão bem definidos pode levar ao problema de baixa imunogenicidade quando comparado com o grande número de epítomos incluídos em um antígeno protéico ou em um patógeno atenuado, geralmente utilizados nas vacinas convencionais (Purcell *et al.*, 2007).

1.6.2 Novas vias de administração e novas formulações vacinais

No início do século XXI, puderam-se observar diversas tendências notáveis no desenvolvimento de vacinas. Uma dessas tendências é a utilização de vias alternativas na administração de vacinas. A maioria das vacinas são hoje administradas por injeção parenteral, o que induz uma resposta imunológica sistêmica expressa por células B e T no sangue (Plotkin, 2005).

No entanto, existe um interesse em conferir maior segurança às campanhas de imunização usando sistemas livres de agulhas (O'hagan e Rappuoli, 2004). Além disso, a administração através das mucosas, particularmente a administração oral, tem sido apontada como a via mais natural para introdução de fármacos no organismo, a de mais fácil acesso e sem os inconvenientes de outras vias de administração, como os riscos de infecção por utilização de agulhas contaminadas, riscos de efeitos hemolíticos ou possível dor durante a administração. Para além disso, a via oral é sem dúvida a de melhor aceitação, nomeadamente pelas crianças que são a população alvo da maioria das vacinas. Acresce ainda referir que a vacinação em larga escala, num curto espaço de tempo, seria muito facilitada se tivéssemos vacinas orais em que, para a sua administração, não fossem necessários técnicos especializados. É o caso de situações de ameaças de surtos infecciosos ou, simplesmente, o caso de países em desenvolvimento que possuem escassez de recursos humanos e também financeiros (Borges, 2007).

Vacinas orais com formulações apropriadas podem estimular todos os braços do sistema imune e podem ser utilizadas para proteção contra patógenos que infectam

o hospedeiro pelas superfícies da mucosa assim como aqueles que infectam por outras vias (De Magistris, 2006).

No entanto, tem sido mostrado uma grande dificuldade em obter uma resposta imune protetora após uma vacinação oral, sendo que a vacina atenuada contra pólio apresenta-se como uma das poucas exceções (Holmgren e Czerkinsky, 2005). Por esta razão, apenas poucas vacinas atualmente aprovadas para o uso humano são administradas oralmente.

As razões para o insucesso no desenvolvimento de uma potente vacina oral é devido principalmente à degradação do antígeno no trato gastrointestinal (GI) e à ineficiente absorção no sítio de ação no intestino. As placas de Peyer são o principal alvo para as vacinas orais, e estão presentes principalmente no íleo. O epitélio intestinal que recobre as placas de Peyer é especializado em permitir o transporte de patógenos para o tecido linfóide associado. Esta função é realizada principalmente pelas células M (Lydyard e Grossi, 1998).

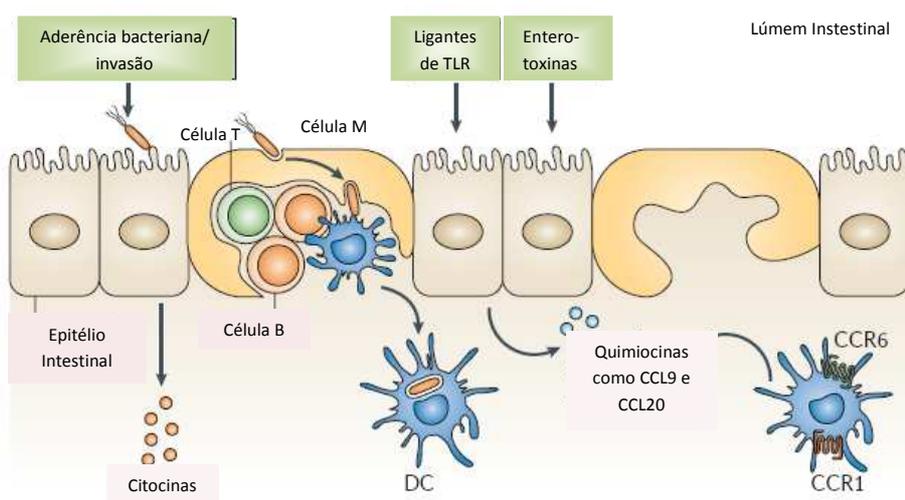


Figura 2: Funções do epitélio folicular associado. O epitélio folicular associado (FAE) contém células com microdobras (M) que são especializadas na endocitose e no rápido transporte transepitelial de antígenos intactos e microorganismos para bolsos intraepiteliais com contém células B e T e ocasionalmente, células dendríticas (DCs). A maioria das células do FAE são enterócitos com microvilosidade apical revestidos por uma espessa camada de glicocálix como borda em escova. Enterócitos do FAE não transportam antígenos, mas eles podem contribuir para a apresentação de antígenos pela detecção de patógenos e seus produtos no lúmen e a liberação de sinais de citocinas e quimiocinas para atrair e ativas células dendríticas. CCL, CC-ligante de quimiocina; CCR, CC-receptor de quimiocina; TLR-receptor do tipo toll. Adaptado de Neutra e Kozlowski, 2006. (Neutra e Kozlowski, 2006)

Porém, antes do antígeno alcançar as células M das placas de Peyer, ele tem que passar pelo estômago com seu baixo pH e várias enzimas ácidas que podem degradar o antígeno. Mesmo se a vacina é capaz de alcançar as placas de Peyer,

uma resposta imune nem sempre é ativada. O antígeno pode não alcançar o domínio das placas de Peyer devido a uma ineficiente internalização ou o antígeno não é potente o suficiente para estimular uma reação imune (De Alzpurua e Russeljones, 1998).

Vários estudos têm mostrado que pela associação de vacinas com sistemas carreadores nano ou microparticulados, a internalização pelas células M é aumentada e a degradação no trato GI é prevenida (Mishra *et al.*, 2010). Outro aspecto importante é que esses sistemas carreadores podem atuar como imunostimulantes ou adjuvantes, aumentando a imunogenicidade de antígenos fracos para ativar a resposta imune (Jabbal-Gill *et al.*, 1999)

Carreadores biodegradáveis e poliméricos mucoadesivos parecem ser os candidatos mais promissores para vacinas via mucosa. Vários polímeros de origem sintética e natural, como poliláctico-co-glicólico, quitosana, alginato, gelatina, etc., têm sido explorados pela eficiência na liberação de vacinas via mucosa e resultados significantes têm sido obtidos (Garg *et al.*, 2010).

1.6.3 Biopolímeros e sistemas carreadores vacinais

A quitosana é a forma deacetilada da quitina formada por copolímeros de glicosamina e N-acetilglicosamina ligados por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. A quitina é obtida do exoesqueleto de artrópodes marinhos, e é um dos polímeros mais abundantes da natureza. Os grupos amino primários da quitosana fornecem propriedades especiais que a tornam muito interessante para aplicações farmacêuticas. O peso molecular e o grau de acetilação determinam as propriedades da quitosana. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo e habilidade de abrir junções intercelulares, este polímero é um valioso carreador para vacinas orais (Ilium, 1998).

Além disso, a quitosana é capaz de formar nano e micropartículas facilmente, sendo que o tamanho das partículas é um dos parâmetros mais importantes que interfere na absorção pelas células epiteliais do intestino. Embora ainda existam controvérsias, o tamanho ótimo para as nanopartículas atravessarem as células M seria abaixo de $1\mu\text{m}$ (Ann Clark *et al.*, 2001) e mais precisamente abaixo de 200nm (Rieux *et al.*)

Adicionalmente, a preservação da estabilidade do antígeno durante o processo de encapsulação é também essencial para o desenvolvimento de um eficiente sistema de liberação controlada. Preparações brandas podem proteger o antígeno quando eles são incorporados durante a preparação das micropartículas. No intuito de evitar condições desnaturantes para as proteínas, as nanopartículas de quitosana podem encapsulá-las de forma passiva. Um exemplo de procedimento brando de

encapsulação foi descrito por Borges e colaboradores (2005) (Borges, Olga *et al.*, 2005). Este método também foi descrito por outros grupos que relataram boa capacidade de adsorção para diferentes substâncias (Mi *et al.*, 1999; Hejazi *et al.*, 2002).

No caso das partículas de quitosana que não são muito porosas, o antígeno será preferencialmente adsorvido na superfície da partícula. Isso pode causar problemas de estabilidade porque podem ocorrer processos como a dessorção ou o ataque dos antígenos pelas enzimas ou substâncias ácidas dos fluidos do trato gastrointestinal. Estes obstáculos podem ser superados pelo revestimento dessas partículas com um polímero ácido resistente, como o alginato de sódio (Borges, Olga *et al.*, 2005).

O alginato de sódio é um polímero composto de resíduos ácidos D-manurônicos e L-gulurônicos unidos linearmente por ligações glicosídicas 1,4 (Tønnesen e Karlsen, 2002). A ampla aplicabilidade farmacêutica do alginato é, em grande extensão, associada à sua capacidade formadora de gel. Cátions di- ou polivalentes (sendo o cálcio o exemplo mais largamente estudado) pode induzir a formação do gel pela formação de ligações cruzadas entre as unidades de ácido gulurônico (Tønnesen e Karlsen, 2002). O alginato de sódio tem sido usado na preparação de nanopartículas (González Ferreiro *et al.*, 2002), microesferas (Coppi *et al.*, 2002), microcápsulas (Esquisabel *et al.*, 2000) e “beads” (Kulkarni *et al.*, 2001) para liberação oral. Em particular, o uso de nano e micropartículas de alginato como um sistema de liberação de antígeno tem sido descrito em várias publicações e há alguns indícios de que o polímero é capaz de induzir uma resposta imune sistêmica e nas mucosas em uma variedade de espécies de animais pela administração oral e intranasal (Rebelatto *et al.*, 2001). Nos últimos anos o alginato de sódio também tem sido utilizado, com algumas vantagens, como material de revestimento de células. Parece que o revestimento atua como uma barreira contra a contaminação microbiana, e assim, melhora as perspectivas de sobrevivência das células revestidas (Kampf *et al.*, 2000). Em outro estudo, o revestimento foi realizado para proteger as células doadoras de mamífero contra os anticorpos e células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro, permitindo o transplante de células na ausência de imunossupressão (De Vos P e Cg, 2002).

Além de antígenos, também DNA plasmidiais, contendo sequências codificadoras de antígenos, podem ser associados com a quitosana e também são internalizados pelas células M das placas de Peyer (Singla e Chawla, 2001). A quitosana é capaz de formar facilmente complexos com DNA cujos tamanhos estão na faixa de 200 a 300nm e tem sido mostrado sua efetividade em proteger o DNA da

degradação (Moreira *et al.*, 2009). Vários autores já demonstraram a eficácia de nanopartículas de quitosana-DNA oralmente administradas em induzir uma resposta imune (Roy *et al.*, 1999; Chew *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2009).

1.6.4 Potencialização imune com adjuvantes funcionalizados a nanopartículas

A fim de aumentar a natureza imunestimulatória das vacinas de subunidades tradicionais, potenciadores imunes chamados “adjuvantes” são frequentemente usados. Adjuvantes são substâncias capazes de ativar reações imunes inflamatórias. Estas reações inflamatórias aumentam a imunogenicidade dos antígenos das vacinas de subunidades e facilitam a geração de uma resposta imunológica de memória (Look *et al.*, 2010).

A adsorção de antígenos em um sistema de liberação partículas pode direcionar os antígenos para o sítio de indução, idealmente para as placas de Peyer, mas estes podem não ser suficientes para ativar uma resposta imune apropriada, por não serem reconhecidos como uma partícula nociva (Neutra e Kozlowski, 2006).

Além de seu papel como veículos efetivos na entrega de antígenos, os sistemas de liberação de drogas em nanoescala podem ser modificados para apresentar adjuvantes e podem até mesmo agir como adjuvantes. Nanopartículas que iniciam a inflamação ou complementam a imunidade inata podem, assim, potencializar e direcionar a resposta imune adaptativa (Look *et al.*, 2010).

Os imunopotenciadores mais bem conhecidos para as mucosas são as enterotoxinas secretadas de *V. cholerae* e *E. coli*, toxina da cólera e enterotoxinas instáveis ao calor de *E. coli*. No entanto, estes tipos de adjuvantes tem se mostrado tóxicos para uso humano. Portanto, formas geneticamente modificadas tem sido engenheiradas para reduzir ou eliminar a toxicidade associada com a subunidade enzimática A destas toxinas (Douce *et al.*, 1995; Douce *et al.*, 1997). Além disso, muitos vetores vivos atenuados para a mucosa, incluindo poliovírus, adenovírus e bactérias entéricas estão atualmente em desenvolvimento e tem sido extensivamente revisados (Malkevitch e Robert-Guroff, 2004). Apesar da superioridade desses patógenos vivos atenuados como vacinas para as mucosas e como vetores vacinais, é devido em parte à sua habilidade de ativar múltiplas respostas imune inatas, que pontos de segurança e aceitabilidade retardarão o seu uso em humanos (Borges, 2007).

Uma outra estratégia de vacinação atualmente explorada consiste em incorporar ligantes de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes em agentes infecciosos, que estimulam os receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) a fim de obter respostas inflamatórias. PRRs são

expressos em tecidos específicos de células epiteliais, bem como de células imunes, incluindo macrófagos, células dendríticas e células B. Os receptores do tipo toll (TLRs) são uma classe de PRRs que tem sido extensivamente estudada (Look *et al.*, 2010). Muitos adjuvantes imunoestimulatórios são ligantes de TLRs tais como lipopolissacarídeo (LPS), lipídio A monofosforil, DNA CpG, e peptídeos muramyl (De Jong *et al.*, 2007; Hamdy *et al.*, 2007; Hamdy *et al.*, 2008). Estes adjuvantes podem ser incorporados em nanocarreadores para estimular a resposta imune (Hamdy *et al.*, 2007; Chikh *et al.*, 2009).

1.6.4.1 Oligonucleotídeos CpG (CpG ODNs)

De acordo com a definição de Krieg (2006), motivos CpG são sequências de oligonucleotídeos de DNA que incluem uma sequência citosina-guanina não-metilada e certos nucleotídeos flanqueadores, que tem se mostrado capaz de induzir a resposta imune inata. O efeito adjuvante do CpG ODN tem sido estudado intensivamente nos últimos anos. Brevemente, CpG ODN estimula diretamente tipos de células imunes que expressam receptor do tipo toll 9 (TLR9), sendo que em humanos as células B e células dendríticas plasmacitóides (pDCs) são os tipos dominantes que expressam TLR9; enquanto que em camundongos, o TLR9 é também encontrado em células dendríticas mielóides (mDCs), macrófagos e monócitos (Mccluskie e Weeratna, 2006).

A ativação dessas células promove a produção de citocinas pró-inflamatórias e da via Th1 e a maturação/ativação de células apresentadoras de antígeno profissionais (APC) (Klinman, 2004). Estas ações permitem os CpG ODNs agir como adjuvantes imunes que podem acelerar e potencializar respostas imune antígeno específicas.

Três tipos de CpG ODNs tem sido identificados, tipo A, B e C, que diferem em suas atividades imunoestimulatórias (Krug *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 2005). CpG ODNs tipo A são capazes de induzir alta produção de IFN- α de células dendríticas plasmocitóides (pDC) mas são fracos estimuladores da sinalização de NF- κ B dependente de TLR9. CpG ODNs tipo B ativam fortemente células B mas são fracos para estimular a secreção de IFN- α . CpG ODNs tipo C combinam as características de ambos os tipos A e B e induzem uma alta produção de IFN- α de pDCs e uma forte estimulação de células B (Marshall *et al.*, 2005).

CpG ODNs tem sido apresentado como um adjuvante eficaz para a mucosa após administração por diferentes superfícies da mucosa como o trato respiratório (Mccluskie e Davis, 2000), o trato urogenitário (Gallichan *et al.*, 2001) e o trato

gastrointestinal (Mccluskie *et al.*, 2000), em combinação com diferentes antígenos (Mccluskie *et al.*, 2002).

Tem sido relatado que a situação ideal para atingir ótimos resultados como adjuvante é manter o CpG em contato físico próximo ao antígeno (Davis *et al.*, 1998). Isto pode ser feito encapsulando o CpG e o antígeno juntos no mesmo sistema de liberação. Além disso, se os polímeros usados para construir o sistema de entrega, como no caso da quitosana e do alginato, possuírem características imunoestimuladoras, então a formulação pode ter suas propriedades adjuvantes otimizadas (Borges *et al.*, 2005).

Diante de tudo o que foi abordado, o presente trabalho propõe a preparação da nanopartículas de quitosana associadas à proteína ou ao DNA, sendo as primeiras revestidas com alginato de sódio, como um novo sistema de liberação vacinal para a esquistossomose visando abordar uma via alternativa de imunização, a via oral, e o uso de novos adjuvantes, como o DNA CpG e ainda os próprios polímeros, a quitosana e o alginato.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar nanopartículas de quitosana associadas ao pDNA TOPO-RHO e à proteína Rho1-GTPase recombinante do *S. mansoni*, e avaliar o seu potencial em induzir uma imunidade protetora na esquistossomose.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonar, expressar e purificar a proteína Rho1-GTPase do *S. mansoni*;
- Preparar e caracterizar as nanopartículas de quitosana-DNA;
- Preparar e caracterizar as nanopartículas de quitosana-proteína revestidas com alginato de sódio;
- Imunizar os camundongos com as formulações contendo nanopartículas de quitosana-DNA e/ou nanopartículas de quitosana-proteína-alginato, associadas ou não ao CpG, pela via oral e intramuscular;
- Avaliar e comparar a resposta imune induzida pelas diferentes formulações vacinais, e pelas vias de administração, oral e intramuscular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção do plasmídeo pDEST42-Rho

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

A amplificação da sequência de interesse, a qual foi utilizada para clonagem no sistema Gateway Technology com Clonase II (Invitrogen, Carlsbad, USA), foi realizada através da PCR utilizando o cDNA de verme adulto. Foi preparada uma reação de 50µL utilizando 130 ng do plasmídeo como DNA molde, 1 pmol/µl de cada iniciador, 0,5U de Platinum Pfx DNA polimerase, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mmol/ µl da mistura dos 4 desoxinucleotídeos, 50 mM KCl, 1 mM DTT e 0,1 mM EDTA em 50 mM Tris-HCl pH 8,0, como tampão da enzima. A reação foi executada de acordo com o seguinte programa:

- 1- Ciclo inicial de desnaturação a 94 °C durante 2 minutos;
- 2- 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 1 minuto;
- 3- Ciclo final de extensão a 68 °C por 3 minutos

Os iniciadores utilizados para a amplificação estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação da sequência codificadora da SmRho.

Oligonucleotídeo	Sequência	Coordenadas
RHO1F	5'GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> GAAGG AGATAGAATGGCGAGTGCGGTACG 3'	"Forward"
RHO1R	5'GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> CAATTAA ATCACACCTCCTCCTT 3'	"Reverse"

- Os sítios *attB*, essenciais para a clonagem no sistema Gateway estão sublinhados.

3.1.2 Clonagem no vetor pDNOR e subclonagem no vetor de expressão pET-DEST42

O produto da PCR no tamanho de aproximadamente 600 pb foi purificado do gel de agarose com o “Pure Link™ Quick Gel Kit” (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante. Posteriormente o fragmento purificado foi clonado no plasmídeo pDONR 221 (Figura 3) pela reação de recombinação BP. Para isso, foram utilizados 150 ng do produto de PCR contendo a região *attB*, 150 ng do vetor pDONR e tampão TE pH 8,0 para um volume final de 8 µL. Foram adicionados 2 µL da enzima de recombinação BP Clonase II e a reação foi incubada durante noite a 25 °C.

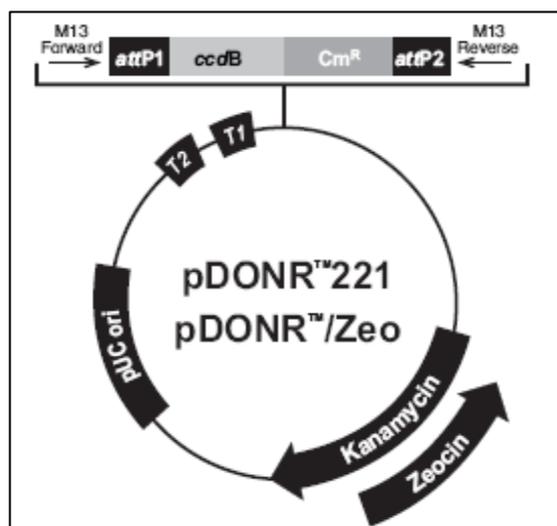


Figura 3: Mapa molecular do plasmídeo pDONR 221. Neste plasmídeo, observam-se os sítios de recombinação *attP1* e *attP2* e o gene letal *ccdB*.

Após esse tempo, adicionou-se 1 µL da solução de proteinase K (2 µg/µl) também fornecida pelo kit, e a reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos para finalizar a ligação.

Bactérias *E. coli* TOP10 eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo pDONR contendo a seqüência codificadora da SmRho. Na reação, 50 µL de bactérias *E. coli* TOP10 e 1 µL da reação de ligação BP contendo os plasmídeos recombinantes foram adicionados a uma cubeta apropriada e eletroporados a 1,8 V. Logo em seguida, foram adicionados 200 µL de meio LB líquido e as bactérias transformadas foram deixadas sob agitação por 1 h a 37 °C para expressão do gene de resistência. Posteriormente, a cultura foi plaqueada em meio seletivo LB/ágar 1,5% com 50 µg/ml de kanamicina e deixada em estufa, a 37 °C por 16 horas. Os clones obtidos foram analisados através da PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos para a seqüência da SmRho e o programa apresentado no item 3.1, seguido de ensaio eletroforético em gel de agarose para visualizar a presença do inserto.

Os clones que continham o plasmídeo com o inserto foram selecionados e cultivados por 16 horas em meio LB líquido com kanamicina na concentração de 50 µg/ml para a amplificação em pequena escala e armazenamento em meio LB: glicerol.

Um dos clones contendo o vetor pDONR-Rho foi cultivado a 37 °C durante 16 horas em 5 mL de meio LB líquido com kanamicina 50 µg/ml. O precipitado bacteriano obtido, após 10 minutos de centrifugação a 2300g, à temperatura ambiente (TA), foi lisado e os plasmídeos recombinantes purificados com a utilização do Kit Mini-prep QIAprep Spin 150 (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

O clone obtido da extração plasmidial foi utilizado para fornecer a seqüência nucleotídica a ser ligada no vetor de expressão através de uma nova reação de recombinação (LR). Para isso, foram misturados 150 ng do plasmídeo recombinante pDONR-Rho, 150 ng do vetor de destino pET-DEST42 (figura 4), tampão TE (Tris-EDTA) pH 8,0 para um volume final de 8 µL e 2 µL da enzima de recombinação LR Clonase II. Novamente, a reação foi incubada a 25 °C durante a noite.

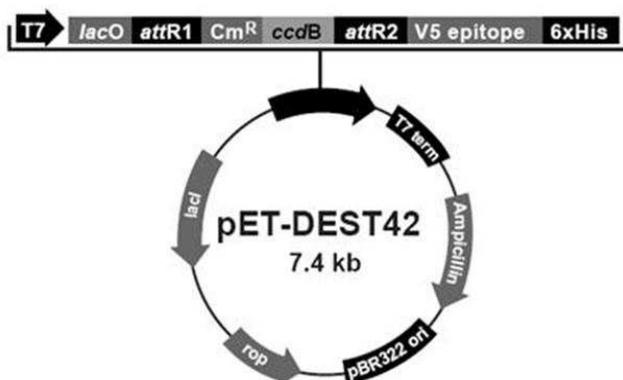


Figura 4: Mapa molecular do plasmídeo pET-DEST42. Nesta figura, pode-se observar os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*, o gene letal *ccdB*, o V5 epitopo e a cauda de histidinas C- terminal.

Após esse tempo, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2 µg/µl) a 37 °C por 10 minutos a fim de parar a reação de ligação.

Os plasmídeos recombinantes obtidos após a reação LR foram transformados em bactérias *E. coli* BL21 por meio da eletroporação. O antibiótico ampicilina foi utilizado na concentração de 100 µg/mL como marcador de seleção. Os clones positivos, que continham a seqüência codificadora da proteína, foram selecionados por PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos e o programa apresentado no item 3.1.

3.2 Sequenciamento do fragmento inserido no pDEST42

O seqüenciamento foi realizado pelo método didesoxiterminal (Sanger *et al.*, 1977) no núcleo de Análise do Genoma e Expressão Gênica (NAGE/ICB/UFMG) com o auxílio do *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit For MegaBACE DNA Analysis* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando iniciadores T7 específicos para o plasmídeo (Tabela 3):

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento da seqüência codificadora da SmRho.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Coordenadas
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	"Forward"
T7	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	"Reverse"

Os dados da seqüência do clone foram exportados e editados utilizando o programa Chromas v2.13 Technesium Pty (<http://www.technesium.com.au>). As seqüências nucleotídica e protéica foram comparadas às seqüências depositadas no banco de dados Genbank do NCBI utilizando-se os algoritmos BLASTn e BLASTx. As pesquisas de homologia foram realizadas no 2º semestre de 2008. Para o alinhamento das seqüências foi utilizado o programa EMBOSS *Pairwise Algorithms* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>).

3.3 Expressão da proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni* em sistema procarioto

Com o objetivo de expressar a proteína de interesse, utilizamos o plasmídeo pDEST-Rho, e a transformação foi feita por eletroporação em bactérias eletrocompetentes da cepa *Escherichia coli* BL21 pRARE. Treze clones foram escolhidos aleatoriamente e testados através da PCR usando os primers específicos da SmRho. Os clones positivos foram submetidos à análise da expressão através de mini-expressão e a confirmação foi feita por *Western Blotting*.

3.3.1. Mini-Expressão da proteína recombinante SmRho

Seis clones de bactérias *E. coli* BL21 pRARE contendo o plasmídeo pDEST-Rho e uma colônia da bactéria não transformada foram selecionados e cultivados

separadamente em 10 ml de meio líquido LB/ampicilina 100µg/ml, à 37° C sob agitação. Após 16 horas, a cultura foi diluída 1:100 em 20 ml de LB/ampicilina 100µg/ml sob agitação a 37°C. Ao atingir a D.O600 = 0.5 foi adicionado o IPTG na concentração final de 0,5mM para induzir a expressão das proteínas recombinantes. Alíquotas de 1 ml foram coletadas anteriormente à indução com o IPTG e a cada hora até 4 horas após a indução. Posteriormente as amostras recolhidas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes. Após as 4h de indução, o restante do volume de bactérias foi centrifugado a 3.200g por 10min a 4°C, congelado e descongelado três vezes, sonicado por 3 ciclos de 30 segundos intercalados com 30 segundos de repouso e centrifugados novamente a 12.850g por 15min. O sobrenadante obtido desta etapa, e o pellet, ressuspendido em PBS 0,15M, foram submetidos à eletroforese SDS/PAGE e *Western Blotting* para confirmar a expressão e a fração, solúvel ou insolúvel, em que a proteína foi expressa. Esse mesmo procedimento, foi realizado na temperatura de 30°C para a otimização das condições de expressão.

3.3.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida - SDS/PAGE

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em gel desnaturante de poliacrilamida com SDS. De acordo com as análises da seqüência do vetor e da seqüência da SmRho, a massa molecular esperada, predita pela ferramenta ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>), resultante da proteína recombinante (incluindo a cauda de poli-histidina C-terminal e o epítipo V5 do vetor) é de aproximadamente 26 kDa. As amostras obtidas da mini-expressão foram fervidas por 5 min em tampão da amostra (Sambrook *et al.*, 1989) e a separação foi feita em gel contendo poliacrilamida (10%), segundo Sambrook (1989). A corrida foi realizada usando um sistema de tampão Tris-glicina (Sambrook *et al.*, 1989) a 100 v por aproximadamente 1,5 horas. A expressão foi analisada com o auxílio do marcador de peso molecular Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas).

3.3.3 Eletrotransferência de proteínas - *Western blotting*

As amostras recolhidas da indução foram submetidas a um ensaio de *Western blotting* para confirmar a expressão da proteína de interesse. Após a corrida em gel SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™-C extra, Amersham) em tampão de transferência (Sambrook *et al.*, 1989) usando o sistema de transferência Mini Trans-blot (Bio-Rad) a 0,35 mA/cm² por 2

horas. A membrana foi então bloqueada por 1 h com PBS 0,15 M contendo 1,6% de caseína. Após o bloqueio, foi feita uma rápida lavagem com PBS-T (PBS 0,05M – Tween 0,05%) e a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His (SIGMA) (1:3000) por no mínimo 2 horas. Após três lavagens com PBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:5000) (Millipore) conjugado com peroxidase por 1 hora. Foram feitas novamente três lavagens com PBS-T e os blots foram revelados com DAB (3,3'-diaminobenzidina) (SIGMA) a uma concentração final de 1mg/mL em solução de PBS 0,15M, pH7,2; 0,03% H₂O₂; cloreto de níquel 0,05% (p/v). Para interromper a revelação, a membrana foi lavada com água bidestilada.

3.3.4 Maxi-expressão da proteína recombinante Rho1-GTPase de *S. mansoni*

Após confirmar a expressão da proteína recombinante por *Western Blotting* seguiu-se para a etapa de produção da proteína em larga escala. Para isso, bactérias *E. coli* BL21 pRARE contendo o clone recombinante foram cultivadas em 10 ml de meio líquido LB/ampicilina/cloranfenicol a 100 µg/ml e 34 µg/ml, respectivamente, a 37°C sob agitação. Após 16 horas, a cultura foi diluída 1:100 em 1 litro de LB acrescido de 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol e deixada sob agitação de 180 rpm a 37°C. Ao atingir a D.O.₆₀₀ de 0,5, foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0,5mM para induzir a expressão da proteína recombinante.

Após 4 horas de indução, o precipitado de bactérias expressando a proteína SmRho foi lisado em PBS 0,15M pH7,2 acrescido de 200 mM defenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF) e 5 mM de EDTA. As células induzidas com IPTG foram sonicadas por 5 ciclos de 30 segundos intercalados por repouso de 30 segundos e o lisado celular foi centrifugado a 12.850g por 10 minutos. O precipitado obtido foi novamente ressuspensionado em PBS 0,15M com PMSF e EDTA e o procedimento mencionado anteriormente foi repetido mais 4 vezes. Após os 5 ciclos o precipitado foi ressuspensionado em um tampão contendo 0,5M de NaCl, 30 mM de imidazol e 0,9% de N-Lauroylsarcosine sodium salt (SIGMA) em 20 mM de Na₂HPO₄ pH7,4. Esse material foi estocado para ser utilizado nas etapas posteriores de purificação.

3.4 Purificação da proteína SmRho em coluna His Trap HP

Para a purificação das proteína recombinante por cromatografia de afinidade, o material obtido no item anterior, contendo imidazol a uma concentração final de 30 mM, foi aplicado em uma coluna de níquel de 5 mL His Trap HP (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

A coluna de purificação foi previamente equilibrada com 25 ml de tampão de ligação contendo 0,5 M NaCl e 30 mM imidazol em 20 mM Na₂HPO₄ pH 7,4. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação até que nenhuma leitura fosse observada a 280 nm. Após esse período, a proteína foi eluída com tampão de eluição contendo, além de 20 mM de Na₂HPO₄ pH 7.4, 0,5 M de NaCl, e imidazol na concentração de 500 mM.

3.5 Diálise

Devido à alta concentração de sal em que a amostra foi eluída, era preciso dialisar a proteína purificada para que a mesma pudesse ser utilizada em outros ensaios. A membrana utilizada na diálise continha poros que permitiam a passagem de moléculas menores que 1000Da. A proteína recombinante purificada foi dialisada em 2L de tampão salina fosfato 0,15M pH 7,4 por aproximadamente 16 horas para remoção do imidazol. O tampão foi trocado pelo menos duas vezes e a solução final contendo a proteína foi estocada a 4 °C.

3.6 Determinação da concentração de proteínas

Após a confirmação da purificação pelas técnicas *Western blotting* e SDS-PAGE e seguido de diálise, a concentração da proteína SmRho foi determinada pelo Método de Bradford, utilizando soroalbumina bovina (BSA) (SIGMA) para a montagem da curva padrão.

3.7 Avaliação do potencial imunogênico da proteína Rho1-GTPase de *S. mansoni*

Após a obtenção da proteína SmRho purificada, desejava-se confirmar a imunogenicidade dessa proteína na infecção do *S. mansoni*. Para isso, soros de pacientes infectados foram testados em relação ao reconhecimento da proteína em questão pelos métodos de ELISA e *Western Blotting*.

3.7.1 ELISA

Para avaliar a reatividade da proteína Rho1-GTPase contra soros de pacientes infectados com o *S. mansoni*, foi realizado o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Para isto, placas de microtitulação MaxiSorp™ Surface (Nunc) de 96 poços foram sensibilizadas com 1 µg/100µL de Ag/poço, em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6, por 16 h, a 4°C. Foi utilizado como antígeno em uma placa a proteína SmRho e em outra placa, como controle positivo, a preparação antigênica solúvel de verme adulto – SWAP. 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 a 37°C por 1 hora, seguindo-se de novas lavagens.

Foram utilizados soros de pacientes normais, infectados e não tratados com a droga contra o parasita, e infectados e tratados com a droga, para avaliar a reatividade humoral frente à proteína Rho1-GTPase recombinante e ao SWAP. Os soros foram diluídos 1:200, 1:400, 1:800 em PBS 0,15M caseína 0,25% e foram incubados por 1 hora, seguindo de novas lavagens. As placas foram então incubadas com solução 1:10.000 de anticorpo secundário (IgG de cabra anti-Ig humana conjugada à peroxidase) (SIGMA).

Após novas lavagens, as placas foram incubadas com 100µL de solução tetrametilbenzidina (TMB) pré-corado (R&D) por 20 min. e a reação foi paralisada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 5%. A leitura dos resultados foi feita usando filtro de 450 nm, em um leitor de ELISA automático (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

3.7.2 *Western Blotting*

Ainda no intuito de avaliar a imunogenicidade da proteína SmRho, foi realizado um ensaio de *Western Blotting* no qual os soros de pacientes controle e infectados, tratados e não tratados, foram incubados com membranas de nitrocelulose contendo os extratos SWAP, SEA, antígenos de esquistossômulos e com a proteína SmRho recombinante. A preparação do gel de poliacrilamida e o ensaio de *Western Blotting* foram realizados conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

3.8 Preparação das nanopartículas de quitosana-DNA

3.8.1 DNA plasmidial

O plasmídeo *NT-GFP fusion TOPO TA* (Invitrogen) contendo a sequência codificadora da Rho1-GTPase de *S. mansoni* foi utilizado na preparação dos complexos. Esse clone recombinante permite detectar indiretamente a expressão da proteína SmRho pela visualização da proteína GFP, por microscopia confocal, cuja sequência está inserida *in frame* ao local de ligação da sequência de interesse. O plasmídeo contendo o inserto possui 6755pb e foi denominado pDNA-Rho.

A amplificação do plasmídeo foi realizada em *E. coli* DH5 α usando o QIAGEN Plasmid Maxi Kit. A concentração e pureza do plasmídeo foi obtida por análise espectrofotométrica. A razão entre a densidade ótica 260/280nm foi > 1.8 e < 2.0.

3.8.2 Polímeros

Para a preparação das nanopartículas foram utilizadas dois tipos de quitosana, uma quitosana gentilmente cedida pela Dra. Ana Paula Pêgo do Instituto de Engenharia Biomédica de Portugal, denominada de CH M010. Esse polímero possui um peso molecular de aproximadamente 121.000Da, um grau de acetilação de 16,4% e é fornecido pela empresa Medicarb (Suécia). E o segundo tipo se refere a uma quitosana fabricada pela Sigma, possui um peso molecular de aproximadamente 200.000Da e um grau de acetilação de 19,2%. Esta quitosana será denominada de quitosana de alto peso molecular, abreviado CH HMW (High Molecular Weight).

3.8.2.1 Purificação da quitosana

Para retirar as impurezas que possam estar presentes no produto comercial e que possam interferir na formação das nanopartículas e sua utilização *in vivo*, a quitosana deve ser previamente purificada. Para isto, a quitosana foi dissolvida em ácido acético 1% durante a noite sob agitação magnética. A solução foi filtrada em papel filtro e então precipitada com NaOH 1M. O precipitado foi lavado várias vezes com água MilliQ até que o pH da suspensão se igualasse ao da água. Em seguida, o pellet de quitosana foi ressuscitado em 5mL de água, congelado a -80°C e liofilizado.

3.8.2.2 Preparo da solução de polímeros

Para o preparo da solução de quitosana, o polímero foi previamente seco em estufa a vácuo a 60°C durante a noite. No dia seguinte, foram pesados 100mg de

quitosana e adicionados a aproximadamente 40mL de ácido acético 1% até a completa dissolução. Em seguida foi adicionado aproximadamente 40mL de tampão acetato 5mM, lentamente, sob agitação magnética e o pH foi acertado para 5.5 com NaOH 1M. O volume foi completado para 100mL com tampão acetato 5mM e a solução filtrada em papel filtro.

3.8.3 Preparo dos complexos quitosana/DNA

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, volumes iguais de pDNA-Rho (em 25mM de Na₂SO₄) e da solução de CH M010 ou CH HMW 0,1% (p/v) em 5mM de tampão acetato pH5.5, foram pré-aquecidos a 55°C por 10min e então a solução de quitosana foi adicionada ao DNA, gota a gota, sob vortex. Os complexos foram deixados em repouso 15min à temperatura ambiente para se estabilizarem antes do uso. Complexos com diferentes razões quitosana:DNA foram preparadas. O valor da razão (razão molar N/P) é expresso em termos do número de mols de grupos amino primários (N) da quitosana em relação aos grupos fosfatos (P) do DNA.

3.8.4 Caracterização dos complexos

3.8.4.1 Ensaio de retenção em gel

Os complexos foram preparados em várias razões molares N/P como descrito anteriormente; 2.5µg de pDNA-Rho foram usados na preparação dos complexos em um volume final de 50µL. Então, 20 µL de cada solução de complexo, junto com 4 µL de tampão de amostra (Fermentas) foram aplicados em gel de agarose 1%, com 0.05 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi feita a 80V por 45min, usando tampão Tris-acetato-EDTA (pH 8) como tampão de corrida.

3.8.4.2 Determinação do tamanho e potencial zeta dos complexos

Os complexos foram preparados usando 10µg de pDNA-Rho em várias razões molares (N/P), como descrito acima. Após a estabilização, os complexos foram diluídos para 1mL, usando tampão acetato 5mM (pH 5.5). O potencial zeta e o tamanho dos complexos foram medidos usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25°C.

3.8.5 Testes *in vitro*

3.8.5.1 Cultura de células

Células HEK 293T (ATCC) são células derivadas do rim embrionário humano e foram cultivadas em meio de cultura basal DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% PS (penicilina 10,000 U/mL e estreptomicina 10,000 mg/mL) (todos fornecidos pela Gibco), e mantidas a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂.

3.8.5.2 Transfecção

Os complexos de quitosana-DNA foram avaliados quanto a sua capacidade de transfecção. Para isso, células HEK foram plaqueadas 24h antes da transfecção, numa densidade de 2.7×10^4 células/cm² em placas de cultura (Greiner Bio-one, CellStar). O meio de cultura foi removido e substituído por 500 µL de meio completo fresco 2h antes da transfecção. Os complexos foram preparados como descrito anteriormente, nas razões molares (N/P) 12 e 18 e um volume de 100 µL foi adicionado às células. Em relação ao DNA, nesse experimento foi utilizado o plasmídeo pCMV-Sport β-gal (Invitrogen, 7853 pb), gentilmente cedido pela Dra Ana Paula Pêgo. Esse plasmídeo contém o gene repórter da β-galactosidase, que permite realizar o cálculo da eficiência da transfecção pelo ensaio da β-Gal. A concentração final do DNA foi 1.3µg/cm². Como controle positivo foi utilizado um polímero que possui uma alta eficiência de transfecção, o PEI (polietilenimino), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas na presença dos complexos por 24h, e a expressão gênica foi avaliada 48h após a transfecção. O meio de cultura das células foi trocado diariamente.

3.8.5.3 Avaliação da expressão do gene da β-galactosidase

Após 48 horas da transfecção, as células foram lavadas com PBS 0,15M e ressuspendidas em tampão de lise (Tris 0.25M, pH 8.0). A placa foi congelada a -20°C e descongelada a 37°C (1 a 2 ciclos). O material celular insolúvel foi separado por centrifugação e o sobrenadante foi coletado. Para determinar a atividade da β-galactosidase (β-gal) nas células transfectadas, o protocolo do ensaio de β-gal (Invitrogen, UK) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. O lisado das células não-transfectadas foi usado como branco. O conteúdo total de proteína do

lisado celular foi determinado pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA, Pierce, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A atividade de transfecção foi expressa em termos da atividade específica da β -gal (nmols de ONPG hidrolisado por min. por mg de proteína total).

3.8.6 CHimi

No intuito de aumentar a eficiência de transfecção da quitosana, o grupo da Dra. Ana Paula Pêgo, sintetizou uma quitosana modificada, na qual foi introduzida grupos imidazol em parte dos radicais amino por uma reação de amidação. Essa quitosana modificada, denominada de CHimi, nos foi novamente cedida pela Dra Ana Paula Pêgo, para a continuação dos trabalhos aqui apresentados, na expectativa de se obter melhores resultados.

3.8.7 Análise da influência do pH sobre as nanopartículas

3.8.7.1 Preparo dos complexos usando a CH M010 e a CHimi

Para avaliar a estabilidade dos nanocomplexos frente às variações bruscas de pH, foram feitas as medidas de tamanho e potencial zeta dos complexos em meios que simulam o fluido gástrico (SGF) e o fluido intestinal (SIF). Essas soluções foram preparadas segundo descrito na Farmacopéia Americana XXIV. Os complexos foram preparados usando 10 μ g de pDNA-Rho nas razões molares (N/P) 12 e 18, como descrito anteriormente. Foram preparados complexos com a CH M010 e com a quitosana modificada, CHimi.

3.8.7.2 Determinação do tamanho e potencial zeta dos complexos nos meios SGF e SIF

Após a estabilização, os complexos foram diluídos para 1mL com as soluções SGF e SIF. Também foram preparados complexos diluídos em tampão acetato 5mM, como referência. O potencial zeta e o tamanho dos complexos foram medidos usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). As medidas com tampão acetato foram realizadas em triplicata a 25°C e com os meios SIF e SGF, em triplicata a 37°C.

3.9 Preparação de partículas de quitosana associadas à proteína SmRho e revestidas com alginato de sódio

3.9.1 Preparação das nanopartículas de quitosana

Uma solução de quitosana 0,1% foi preparada segundo descrito no item 3.8.2.2 utilizando a CH M010. Volumes iguais (30mL de cada) da solução de quitosana e de uma solução de Na₂SO₄ 0,625% foram aquecidos separadamente a 55°C por 10 min. Em seguida a solução de sulfato de sódio foi adicionada à de quitosana, lentamente, sob vortex. As partículas ficaram se formando durante a noite sob agitação magnética. No dia seguinte, a solução foi centrifugada a 3200g por 20min a 18°C. As partículas foram ressuspensas em aproximadamente 1/8 do volume com água MilliQ.

3.9.2 Adsorção da proteína SmRho

Para a adsorção da proteína SmRho, 500µL da solução de partículas preparada anteriormente, foram distribuídos em eppendorfs, e a cada um foi adicionado 100µg da proteína SmRho, cuja concentração era de 1µg/µL. O branco foi feito adicionando-se o mesmo volume de PBS 0,15M. As partículas foram incubadas com a proteína por 1h a uma agitação de 100rpm. Todo o procedimento foi realizado a 18°C.

A eficiência de ligação da proteína às partículas de quitosana foi calculada de forma indireta, quantificando a proteína que permaneceu em solução. Logo, após a incubação, uma alíquota da suspensão de partículas foi centrifugada a 15700g por 30min e a proteína no sobrenadante foi quantificada pelo ensaio de BCA (Pierce, Rockford, USA). A absorbância das amostras foi corrigida subtraindo-se o valor da absorbância do branco, preparado exatamente nas mesmas condições. O valor da D.O. corrigido foi então usado para calcular a concentração usando uma curva preparada com padrões de ovoalbumina.

A eficiência de ligação (LE – “Loading Efficiency”) foi calculada de acordo com a equação seguinte, conforme descrito por Borges e colaboradores (2005):

$$LE (\%) = (\text{quantidade total de proteína} - \text{proteína não ligada}) / \text{quantidade total de proteína} * 100$$

3.9.3 Revestimento das partículas com alginato de sódio

O revestimento também foi realizado conforme descrito por Borges e colaboradores (2005). Resumidamente, o mesmo volume de uma solução de alginato de sódio 1% foi adicionado à suspensão de partículas de quitosana carregadas com a proteína SmRho. A adição foi feita gota a gota, sob vortex, e a suspensão incubada sob agitação magnética por 20min a TA. A suspensão foi então centrifugada por 30min a 370g e o sobrenadante foi descartado. Para formar as ligações cruzadas do alginato com a superfície das partículas, as partículas foram ressuspendidas em uma solução de CaCl_2 0.524mM e mantidas sob agitação por mais 10 min.

3.9.4 Avaliação da dessorção durante o processo de revestimento

Durante a incubação das partículas com o alginato de sódio, alíquotas da suspensão de partículas foram coletadas, centrifugadas a 15700g por 30min e a proteína no sobrenadante foi quantificada pelo ensaio de BCA, conforme descrito no item 3.9.2.

3.9.5 Caracterização das nanopartículas de quitosana-proteína

3.9.5.1 Determinação do tamanho e do potencial zeta

As suspensões de partículas ligadas à proteína SmRho, antes e após o revestimento com alginato de sódio, foram preparadas conforme descrito anteriormente, e diluídas em água MilliQ. Então foram feitas as medidas do potencial zeta e tamanho das partículas usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25°C.

Além disso, as suspensões de partículas também foram diluídas nos meios SIF e SGF, para avaliar a influência do pH sobre as partículas de quitosana-proteína revestidas com alginato. Essas medidas também foram feitas usando o Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) e foram realizadas em triplicata a 37°C.

3.9.5.2 Estudos de liberação da proteína *in vitro*

A liberação da proteína SmRho das partículas revestidas com alginato foi realizada nos meios SIF e SGF. As suspensões de nanopartículas foram adicionadas (1:4) em eppendorfs individuais contendo o meio de liberação previamente equilibrado a 37°C e colocado em um banho com agitação ajustado para 100rpm. Após

determinados intervalos de tempo, as amostras foram recolhidas e centrifugadas a 15700g por 15min. Os sobrenadantes foram coletados para dosagem da proteína em solução pelo ensaio de BCA. Para cada tempo, as amostras foram preparadas em triplicata e uma amostra de partículas sem proteína foi submetida às mesmas condições e utilizada como branco. Além disso, a proteína não-ligada na suspensão de partículas preparadas logo após o revestimento, também foi determinada para se calcular a quantidade de proteína encapsulada no início do ensaio de liberação.

3.10 Estudos de imunização

3.10.1 Animais

Camundongos C57BL/06 com 8 a 10 semanas de idade foram usados para os ensaios de imunização e proteção. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB. As metodologias envolvendo animais foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) (Anexo).

3.10.2 Grupos de tratamento

No intuito de avaliar como candidatos vacinais, a proteína SmRho ou o plasmídeo contendo a sua sequência codificadora, pDNA-Rho, associados ou não às nanopartículas de quitosana, e ainda, associados ou não, ao adjuvante CpG ODN, doze grupos de animais foram divididos de forma a avaliar cada formulação vacinal. As vias de imunização também foram avaliadas, sendo que a maioria dos grupos foi administrado pela via oral, por ser esta menos estudada no caso da esquistossomose e por apresentar algumas vantagens em relação às demais, como já discutido anteriormente. As imunizações orais foram feitas por gavagem. No entanto, dois grupos foram avaliados pela via intramuscular e foram utilizados para comparação dos resultados (Tabela 4).

Tabela 4: Esquema dos grupos de tratamento das imunizações.

Grupos	Abreviatura	Quantidade (proteína/CpG/DNA)	Nº de animais por grupos	Via de administração
Salina	Salina	200 µL	5	Oral
Nanopartículas de quitosana revestidas com alginato	Quitosana	200 µL	5	Oral
pDNA-Rho “naked” (sem quitosana)	DNA	50 µg	5	Oral
Rho1-GTPase recombinante em solução (sem quitosana)	Rho1-GTPase recombinante	50 µg	5	Oral
Nanopartículas de quitosana-pDNA-Rho	*CHimi-DNA	50 µg	5	Oral
Nanopartículas de quitosana-Rho-alginato	**CH-Rho-Algintato	50 µg	5	Oral
Nanopartículas de quitosana-CpG	**CH-CpG	10 µg	5	Oral
Nanopartículas de quitosana-Rho-CpG-alginato	**CH-Rho-CpG-Alg	50 µg/10 µg	5	Oral
Nanopartículas de quitosana-CpG- pDNA-Rho	*CHimi-CpG-DNA	10 µg/50 µg	5	Oral
Nanopartículas de quitosana-Rho-CpG-alginato + Nanopartículas de quitosana-pDNA-Rho	**CH-Rho-CpG-Alg + *CHimi-DNA	25 µg /10 µg + 25 µg	5	Oral
Nanopartículas de CHimi-pDNA-Rho	*CHimi-DNA	50 µg	5	Intramuscular
Nanopartículas de CH-Rho-Alginato	**CH-Rho-Algintato	50 µg	5	Intramuscular

*CHimi: Quitosana modificada (adição de um grupo imidazol em parte dos radicais amino) – É utilizada apenas quando associada ao DNA.

**CH: Quitosana sem modificação (M010).

3.10.3 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas próximo ao momento das imunizações, segundo os procedimentos descritos anteriormente, nos itens 3.8 e 3.9.

Já as amostras contendo CpG foram preparadas de forma semelhante ao que já foi descrito. Resumidamente, as nanopartículas de CH-CpG foram preparadas seguindo o protocolo das nanopartículas de CH-DNA, na razão molar (N/P) igual a 18.

Nas nanopartículas formadas por CHimi-CpG-DNA, o CpG foi adicionado ao pDNA/Rho antes de ser misturado à quitosana, sendo que a quantidade de quitosana usada foi a mesma usada na preparação dos complexos com razão molar (N/P) igual a 12. Foi feito um ensaio de retenção em gel para avaliar a ligação do CpG às nanopartículas (dados não mostrados).

As amostras de partículas de quitosana revestidas contendo CpG e proteína foram preparadas de acordo com o item 3.9, sendo que o CpG e a proteína foram adicionados simultaneamente às partículas de quitosana, incubados por 1h e então foi feito o revestimento, seguindo o protocolo descrito.

A ligação do CpG a essas partículas também foi avaliada por um ensaio de retenção em gel e adicionalmente, foi feita uma leitura do sobrenadante das partículas, coletado após centrifugação, em espectrofotômetro a 260nm (dados não mostrados).

3.10.4 Escala de imunizações e coleta dos soros

Os animais foram imunizados 3 vezes com intervalo de 15 dias entre as imunizações. As coletas dos soros foram feitas anteriormente à 1ª imunização, 7 dias após a cada imunização e a cada 15 dias após a infecção. Os soros foram coletados através de uma pequena incisão na cauda dos animais.

3.10 Análise da produção de anticorpos

Amostras de sangue de quatro camundongos de cada grupo foram coletadas e então, foi preparado um pool misturando volumes iguais de cada soro, com a finalidade de acompanhar os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a produzidos. A separação dos soros foi realizada por meio da centrifugação das amostras na rotação de 400g por 10 minutos. O monitoramento dos anticorpos foi feito por ELISA. Foi avaliada a reatividade dos anticorpos produzidos frente à proteína SmRho e contra proteínas nativas de *S. mansoni*, o SWAP.

3.10.1 Preparação antigênica solúvel de verme adulto (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% (solução salina) contendo heparina 0,05 U/mL (Smithers e Terry, 1965). Os vermes recuperados foram lavados exaustivamente em solução salina tamponada com fosfato, 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, rotor T875). No sobrenadante obtido foi feita a dosagem de proteína pelo 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.

3.10.2 ELISA

Como já mencionado, a proteína SmRho recombinante e o antígeno solúvel de verme adulto SWAP, foram usados para sensibilizar as placas de microtitulação MaxiSorpTM Surface (Nunc) de 96 poços na concentração de $1\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ de Ag/poço. Foi feita a diluição dos soros de 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800 para todos os grupos, exceto para o grupo de CH-Rho-Alginato via intramuscular, cuja leitura foi muito alta para estas diluições, extrapolando a faixa confiável de absorbância. Para este último grupo diluições de 1:1600; 1:3200 e 1:6400 foram feitas a fim de se obter valores de absorbância confiáveis. Serão apresentados os resultados apenas com a diluição 1:1600 do grupo CH-Rho-Alginato via intramuscular e 1:100 para os demais grupos. Os anticorpos secundários utilizados foram o anti-IgG total de camundongo (1:5000) (SIGMA), anti-IgG1 de camundongo (1:5000) (Southern Biotech) e anti-IgG2a de camundongo (1:5000) (Southern Biotech), todos conjugados com peroxidase. O restante do ensaio foi realizado conforme da descrito no item 3.7.1.

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

3.11.1 Cercárias

Cercárias de *S. mansoni*, obtidas de caramujos *B. glabrata* infectados, foram gentilmente doadas pelo Instituto de Pesquisa Renée Rachou. Para contagem das cercárias, 50 mL da suspensão das 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 $150\ \mu\text{L}$ da suspensão foram distribuídas em placas de vidro quadriculadas, onde as cercárias foram coradas com lugol para realização da contagem das mesmas.

3.11.2 A infecção desafio

Os doze grupos de camundongos foram infectados após sete dias da última imunização através da via percutânea. Nesse procedimento, os camundongos foram anestesiados com 20 μ l de uma solução de cetamina 57% combinada com xilazina 43%. A região ventral dos camundongos foi raspada e 150 μ l de água contendo aproximadamente 25 cercárias foram colocados em contato com a pele dos animais durante 1h para que ocorresse a infecção espontânea (figura 5).



Figura 5: Procedimento de infecção percutânea realizado com os camundongos anestesiados e imobilizados. As cercárias estão em contato com a pele do camundongo e delimitadas por meio de um anel de acrílico com um orifício circular.

3.11.3 Perfusão

Após 45 dias da infecção, os camundongos C57BL/6 foram sacrificados e tiveram o sistema porta-hepático perfundido, conforme a 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.

3.11.4 Quantificação da atividade protetora

A avaliação da atividade protetora de cada grupo foi analisada segundo protocolo descrito por Goes e Ramalho-Pinto (1991) (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:

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

3.12 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 e two-way ANOVA e o Bonferroni como pós-teste. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem dos gene codificador da proteína RHO1-GTPase de *S. mansoni*

Para amplificação da sequência codificadora da SmRho foi utilizado cDNA de verme adulto de *S. mansoni* como molde. Iniciadores contendo a sequência de recombinação *attB* que deve ser inserida na sequência do gene a ser clonado foram desenhados para amplificação da SmRho.

Inicialmente, a sequência gênica de interesse foi amplificada através da PCR apresentando uma banda de aproximadamente 600pb (Figura 6). O produto de PCR foi então purificado e utilizado na primeira reação de recombinação (reação BP). A reação de recombinação BP ocorre entre sítios *attB* presentes na sequência a ser clonada, e sítios *attP* presentes no primeiro vetor utilizado, o vetor doador pDONR (Figuras 3).

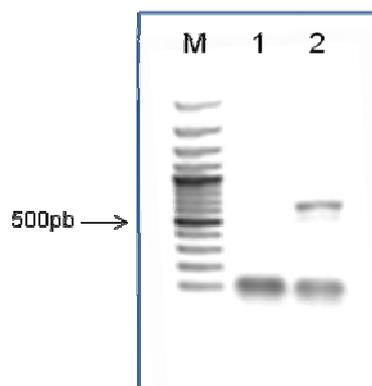


Figura 6: Amplificação da sequência codificadora da SmRho a partir do cDNA de verme adulto de *S. mansoni*. **M:** marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Fermentas); **1:** controle negativo; **2:** Sequência amplificada da SmRho.

O produto da reação de recombinação foi usado para transformar bactérias *E. coli* TOP10. Os clones resistentes que cresceram em placa LB-ágar/kanamicina foram utilizados na PCR de colônias. A figura 7 mostra que todos os clones selecionados foram positivos. O clone 5 foi escolhido para realizar a extração plasmidial e posterior ligação ao vetor de expressão.

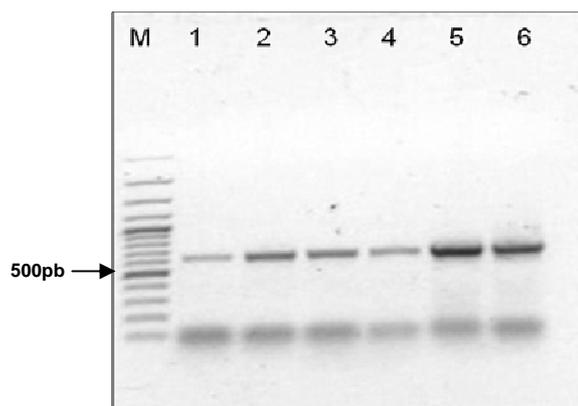


Figura 7: Confirmação da clonagem da sequência da SmRho no vetor pDNOR 221 por PCR. **M:** Marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Fermentas); **1 a 6:** fragmento da SmRho amplificado das colônias selecionadas.

Após obter o clones de entrada pDONR-Rho, a reação de recombinação LR (*attL X attR*) foi realizada para gerar os clones de expressão. O vetor escolhido foi o pET-DEST42 que permite a expressão da proteína com uma cauda de histidinas fusionada a sua extremidade C-terminal.

Novamente, os clones resistentes à ampicilina foram submetidos à PCR de colônias para confirmar a clonagem da sequência da SmRho no vetor de expressão. Pode-se observar que todos os clones testados foram positivos.

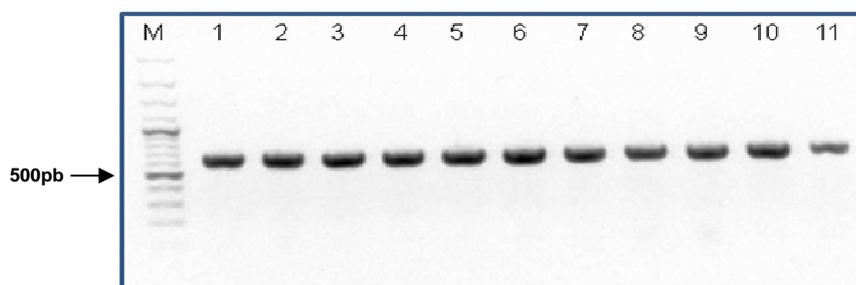


Figura 8: Confirmação da clonagem da sequência da SmRho no vetor de expressão pET-DEST42 por PCR. **M:** Marcador de 100 pares de bases DNA Ladder (Fermentas); **1 a 11:** Fragmento correspondente à sequência da SmRho amplificada a partir da PCR das colônias selecionadas.

4.2 Determinação da sequência de nucleotídeos

O sequenciamento do clone pET-DEST42-Rho foi realizado utilizando oligonucleotídeos universais T7 “forward” e T7 “reverse”. A análise do sequenciamento mostra que a sequência codificadora da SmRho foi inserida corretamente, de forma a permitir a expressão da proteína de interesse fusionada a uma cauda C-terminal de poli-histidinas.

```

ATGGCGAGTGCGGTACGTAAGAACTTGTTATTGTTGGAGATGGTGCATGCGGG
AAAACCTTGTTTACTTATTGTATTTCAGCAAAGACCAGTTTCCCGAAGTTTACGTTCC
TACTGTATTCGAAAACCTATGTTGCAGATATCGAAGTTGATAACAGACAAGTTGAAT
TAGCTCTCTGGGACACTGCTGGCCAAGAAGATTATGATAGGCTACGGCCACTTTC
TTATCCTGATACGGATGTAGTTCTGTTATGTTATAGTATTGATTCTCCCGATAGTTT
TGCAAACATTGAGGAAAAATGGTTACCAGAAATCCGTCATTTTTGTCCTGATGTTCC
CCATTGTCTTAGTTGGAAACAAAAAAGACTTACGACATGACGAGGCTACAAAGAA
TGAGCTACACAGAACCAAACTTCCCTGTCACCTTTTAACGAGGGTAAACAAGTA
GCTGAAAAGATTTCTGCTTATGCCTTCTTTGAGTGTTTCAGCTAAGACCAAGGAAG
GAGTCAGCGATGTTTTCGTAGCAGCTACTCGAGCCGCCTTGAATTCAGCGAAGAA
GAAGAGGAGGAGGTGTGATTTAATTGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATC
AATTCGAAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTA
CGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGA

```

Figura 9: Sequência de nucleotídeos obtida do ensaio de seqüenciamento. A seqüência marcada em azul representa a cauda de poli-histidina C-terminal e a seqüência em amarelo é referente ao V5 epitopo adicionada pelo vetor.

A seqüência obtida para a SmRho foi comparada com a seqüência depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e obteve praticamente 100% de alinhamento com a seqüência parcial do mRNA da Rho1-GTPase de *S. mansoni*, acesso AF140785, exceto pela substituição de uma citosina por uma timidina, levando a uma mutação silenciosa, na qual não houve alteração do aminoácido codificado (Figura 10).

SmRho	1	-----ATGGCGAGTGCGGTACGTAAGAACTTGTTATTGTTGGAGATGG	44
AF140785	1	GCAACAATGGCGAGTGCGGTACGTAAGAACTTGTTATTGTTGGAGATGG	50
SmRho	45	TGCATGCGGGAAAACCTTGTTTACTTATTGTATTTCAGCAAAGACCAGTTTC	94
AF140785	51	TGCATGCGGGAAAACCTTGTTTACTTATTGTATTTCAGCAAAGACCAGTTTC	100
SmRho	95	CCGAAGTTTACGTTCTACTGTATTTCGAAAACCTATGTTGCAGATATCGAA	144
AF140785	101	CCGAAGTTTACGTTCTACTGTATTTCGAAAACCTATGTTGCAGATATCGAA	150
SmRho	145	GTTGATAACAGACAAGTTGAATTAGCTCTCTGGGACACTGCTGGCCAAGA	194
AF140785	151	GTTGATAACAGACAAGTTGAATTAGCTCTCTGGGACACTGCTGGCCAAGA	200
SmRho	195	AGATTATGATAGGCTACGGCCACTTTCTTATCCTGATACGGATGTAGTTC	244
AF140785	201	AGATTATGATAGGCTACGGCCACTTTCTTATCCTGATACGGATGTAGTTC	250
SmRho	245	TGTTATGTTATAGTATTGATTCTCCCGATAGTTTTGCAAACATTGAGGAA	294
AF140785	251	TGTTATGTTATAGTATTGACTCTCCCGATAGTTTTGCAAACATTGAGGAA	300
SmRho	295	AAATGGTTACCAGAAATCCGTCATTTTTGTCCTGATGTTCCCATGTCTT	344
AF140785	301	AAATGGTTACCAGAAATCCGTCATTTTTGTCCTGATGTTCCCATGTCTT	350

todos os clones foram capazes de expressar a proteína recombinante de interesse, com um peso molecular de aproximadamente 26KDa.

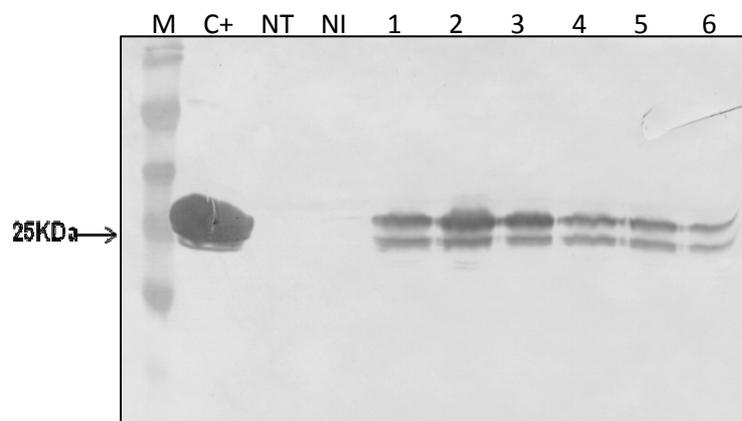


Figura 11: Análise do ensaio de indução da expressão da Rho1-GTPase recombinante. **M:** Padrão de peso molecular Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); **C+:** Proteína recombinante fusionada com cauda de histidina – peso molecular ~27KDa; **NT:** BL-21 pRARE não transformada com o plasmídeo pET-DEST42-Rho; **NI:** BL-21 pRARE transformada mas não induzida com IPTG; **1 a 6:** BL-21 pRARE transformadas com os clones 1 a 6, induzidas com IPTG 0,5mM por 4h a 37°C.

Posteriormente, foi avaliada em qual fração a proteína estava sendo expressa, fração solúvel ou insolúvel, e se a temperatura, poderia atuar de forma a alterar a expressão em uma fração ou em outra. Como pode ser observado na figura 12, a proteína recombinante foi expressa principalmente no pellet (fração insolúvel) obtido após a lise bacteriana, e a mudança de temperatura não alterou o perfil dessa expressão.

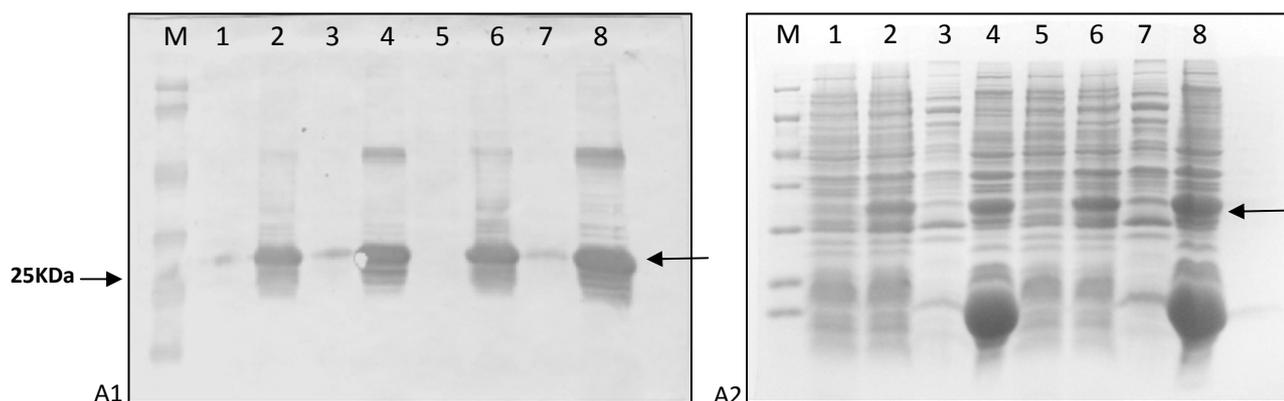


Figura 12: Análise da expressão da proteína recombinante nas frações solúvel e insolúvel a 30°C e 37°C. **A1:** Western blotting. **A2:** SDS-PAGE12% corado com azul de coomassie. **M:** Padrão de peso molecular Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); **1:** Indução 0h 30°C; **2:** Indução 4h 30°C; **3:** Sobrenadante após a lise – 4h indução/ 30°C; **4:** Pellet após a lise - 4h indução/ 30°C; **5:** Indução 0h 37°C; **6:** Indução 4h 37°C; **7:** Sobrenadante após a lise – 4h indução/ 37°C; **8:** Pellet após a lise - 4h indução/ 37°C.

4.3.2 Maxi-expressão e purificação da proteína recombinante SmRho

Para se obter quantidades maiores da proteína SmRho, foi realizada uma maxi-expressão do clone 3, do ensaio de mini-expressão, em meio LB contendo ampicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. Após 4h de indução com IPTG as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação e lisadas através de ciclos de sonicação. Após várias etapas de sonicação e centrifugação, o pellet da lise bacteriana foi utilizado na purificação da proteína através de cromatografia de afinidade.

A coluna His Trap HP, contendo níquel ligado à Sepharose, foi utilizada para a purificação da SmRho. A amostra eluída da coluna de afinidade foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE 10%, confirmando a presença de uma banda de aproximadamente 26 kDa (Figura13).

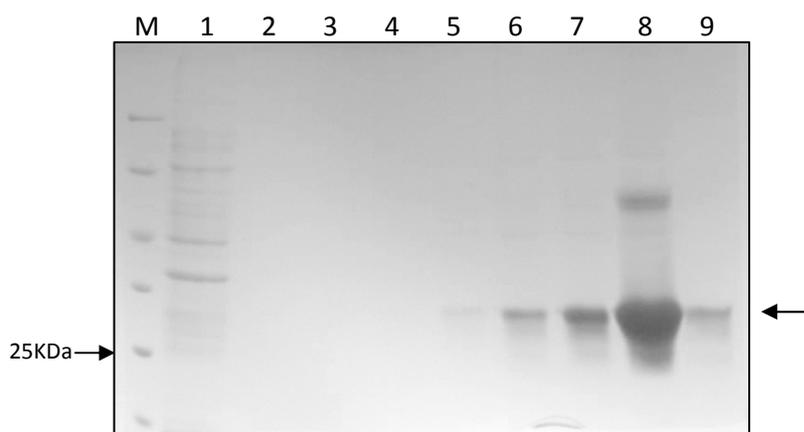


Figura 13: Perfil protéico das frações coletadas durante a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. **M:** Padrão de peso molecular Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); **1:** Volume não ligado; **2-5:** Lavagens com tampão contendo 30 mM de imidazol; **6-9:** frações da eluição com 500 mM de imidazol.

4.4 A proteína SmRho é reconhecida por soros de pacientes infectados com *S. Mansoni*

4.4.1 ELISA

A reatividade dos soros de pacientes infectados, tratados ou não com a droga contra o parasita, foi analisada em um ensaio imunoenzimático e o resultados obtido pode ser observado na figura 14. Pode-se verificar que os soros de pacientes controle, ou seja, não infectados, não apresentaram reação contra o antígeno, enquanto os

soros de pacientes infectados apresentaram boa reatividade, sendo do grupo tratado a maior reatividade observada.

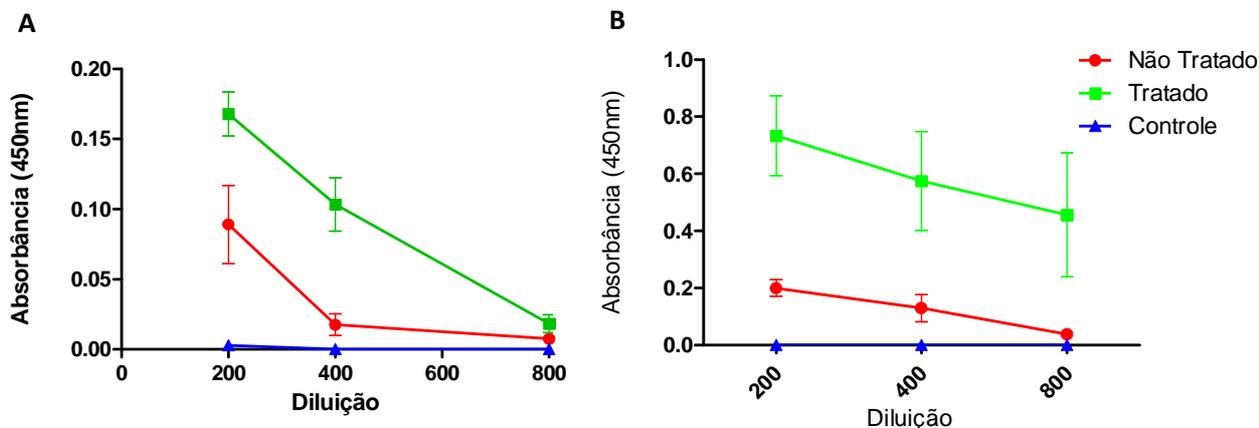


Figura 14: Reatividade dos soros de pacientes controle, infectados tratados e não-tratados, contra os antígenos SmRho (A) e SWAP (B) avaliados por ELISA (n=3 para cada grupo).

4.4.2 Western Blotting

A imunogenicidade da SmRho foi também confirmada pelo ensaio de *Western Blotting* corroborando com os dados acima citados. Podemos observar novamente a reatividade à proteína SmRho dos soros de pacientes tratados e não-tratados, não havendo reação no grupo controle. No grupo tratado pode-se observar uma banda no extrato de SWAP e SEA de peso molecular próximo ao da SmRho. Os soros com os quais foram incubados cada membrana estão assinalados acima das figuras.

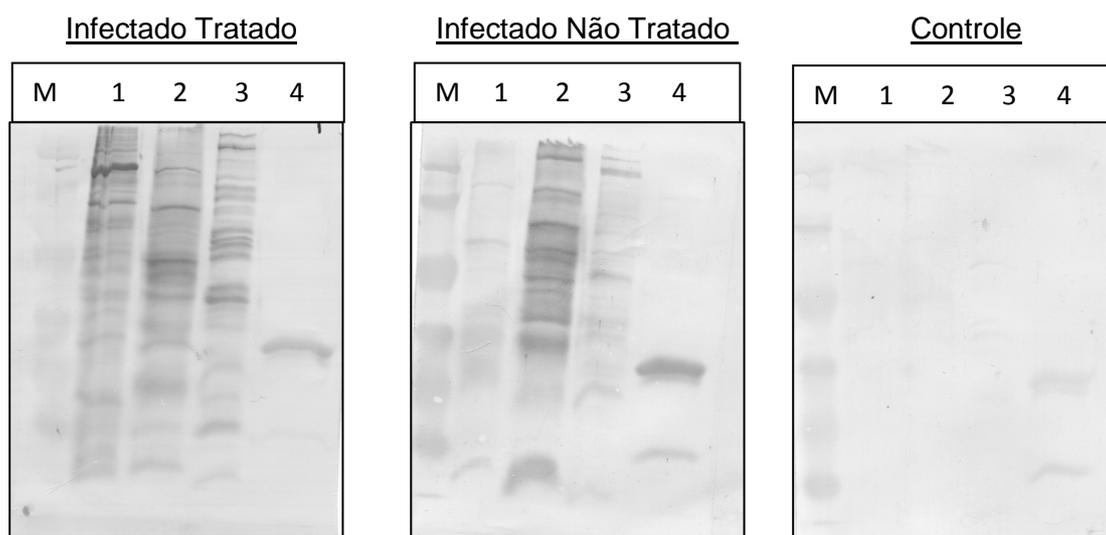


Figura 15: Reatividade dos soros pacientes infectados, tratados e não tratados, e controle, contra antígenos do *S. mansoni*. **M:** Padrão de peso molecular Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas).; **1:** SWAP; **2:** SEA; **3:** Antígenos de esquistossômulos **4:** Proteína Rho1-GTPase recombinante.

4.5 Caracterização dos nanocomplexos de quitosana/DNA

Para determinar a quantidade mínima de quitosana necessária para complexar todo o DNA plasmidial, várias quantidades de polímeros (CH M010 e CH HMW) foram misturados com soluções de DNA contendo uma quantidade fixa de plasmídeo e os complexos formados foram avaliados pela sua mobilidade eletroforética (figura 16). Na razão N/P de 0,5 há um excesso de DNA em relação à quitosana, logo o DNA “livre” é capaz de migrar no gel. Na razão N/P igual 1, o sistema ainda não é totalmente estável, e pode-se observar que um pouco de DNA está livre e penetra no gel. A partir da razão N/P igual a 2, o complexo apresenta-se totalmente estável, já que toda a quitosana é capaz de complexar o DNA e então as nanopartículas ficam retidas nas canaletas. Esse comportamento foi observado para os dois tipos de quitosana utilizados.

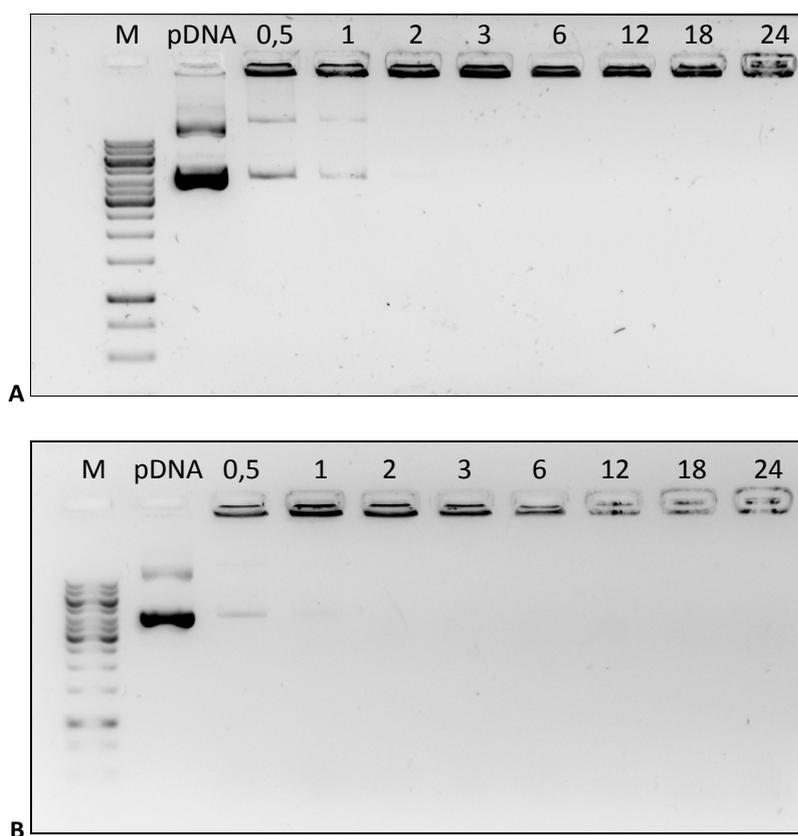


Figura 16: Retenção eletroforética pela CH M010 (A) e CH HMW (B) em gel de agarose 1%. **M:** Marcador gene ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas); **pDNA:** plasmídeo pDNA-Rho em solução; **0,5 – 24:** razões molares (N/P) testadas.

O tamanho e o potencial zeta dos complexos formados nas diferentes razões molares (N/P) também foram determinados. Em relação ao tamanho, na figura 17, pode-se observar que, para $N/P > 3$, complexos com um tamanho médio de partículas de ~260nm foram obtidos independentemente do polímero usado. Para razões N/P menores, o tamanho das partículas foi na escala de micrômetros.

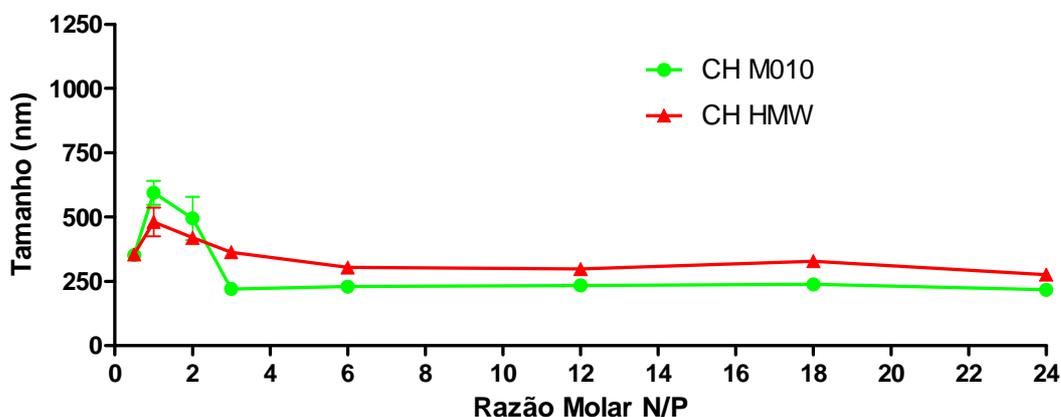


Figura 17: Representação da média do tamanho das partículas dos complexos de quitosana em função da razão molar N/P (as medidas foram realizadas a 25°C, pH 5.5; média \pm SD, n=3).

Em relação ao potencial zeta, os resultados obtidos estão apresentados na figura 18, e como pode ser observado, nas razões N/P de 0.5, onde há um excesso de DNA e na razão igual a 1, onde o sistema ainda não é totalmente estável, havendo DNA “livre”, os valores do potencial zeta apresentam-se negativos. A partir da razão N/P igual a 2, há um excesso de polímero em relação ao DNA, e por isso o valor do potencial passa a ser positivo e se estabiliza em torno de +20mV.

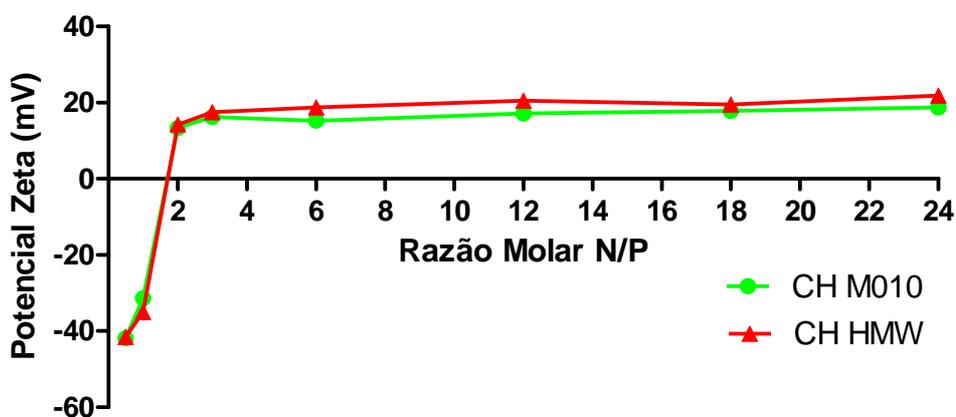


Figura 18: Representação do potencial zeta das partículas dos complexos de quitosana como função da razão molar N/P (as medidas foram realizadas a 25°C, pH 5.5; média \pm SD, n=3).

4.6 Transfecção

Para avaliar a capacidade dos complexos de quitosana-DNA de transfectar células HEK 293, foram preparados complexos usando a CH M010 e CH HMW, nas razões N/P 12 e 18 e a transfecção foi analisada após 48h, pelo ensaio de atividade da β -galactosidase. A transfecção mediada pelo agente transfectante PEI, o controle positivo, também foi avaliada. O resultado representativo está apresentado na figura 19. A maior atividade de transfecção foi observada com o PEI. Comparativamente, a atividade de transfecção com a CH M010 e com a CH HMW, foram bem mais baixas, sendo que a CH M010 apresentou um resultado um pouco melhor.

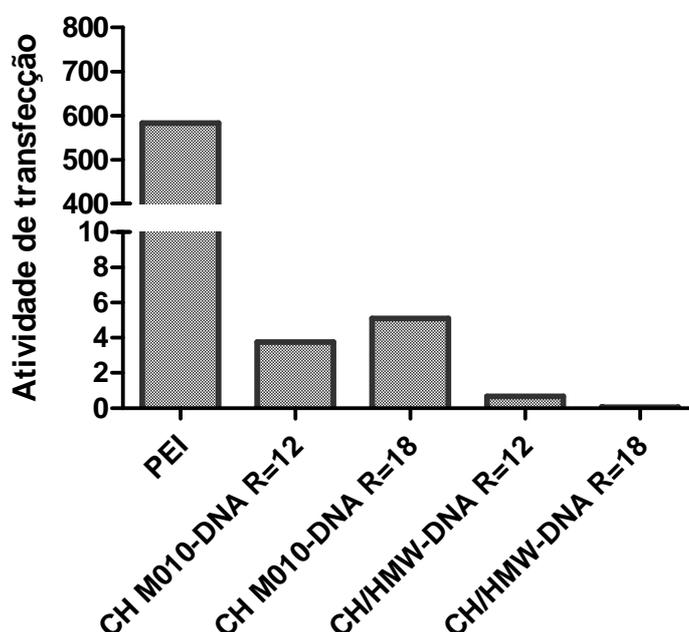


Figura 19: Atividade de transfecção (nmols de ONPG/ min/ mg de proteína total) avaliada após 48h da transfecção de células HEK 293 com os complexos formados com a CH M010 e CH HMW nas razões N/P iguais a 12 e 18, além do PEI, utilizado como controle positivo.

4.7 A influência do pH sobre os nanocomplexos

Diante da baixa atividade de transfecção observada no ensaio anterior, para os próximos ensaios passou a trabalhar apenas com a CH M010 e sua forma modificada, CHimi, que possui maior capacidade de transfecção e que nos foi gentilmente cedida pela Dra Ana Paula Pêgo.

A próxima etapa foi então avaliar a influência do pH sobre as nanopartículas de quitosana. Para isto, foram preparados complexos nas razões N/P 12 e 18, com a CH

M010 e CHimi, e esses complexos foram colocados em soluções que simulam o fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF), para então realizar as medidas de tamanho e potencial zeta.

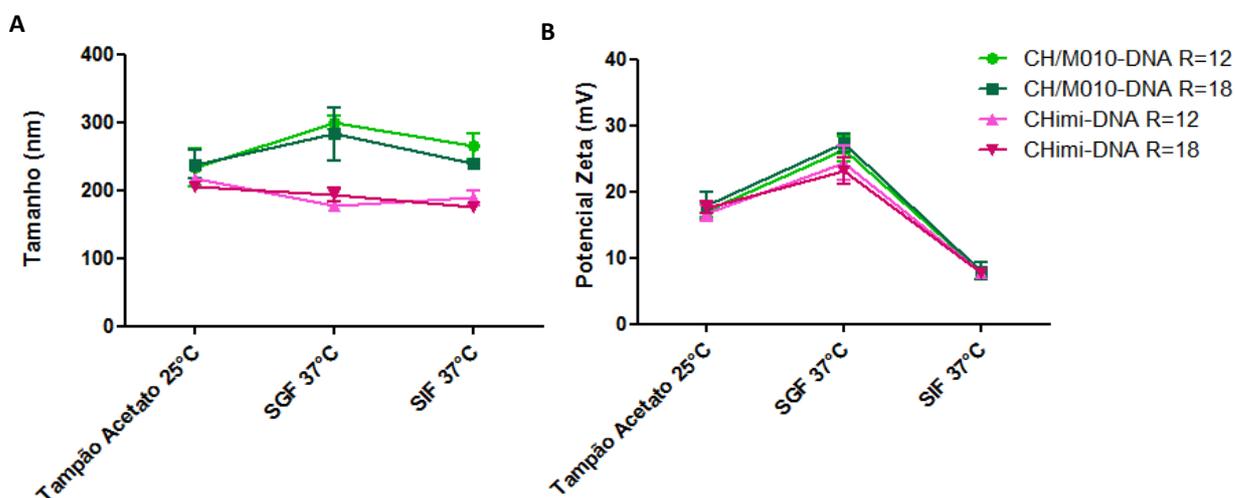


Figura 20: Medidas da média do tamanho (A) e do potencial zeta (B) das nanopartículas de CH M010 e CHimi, preparadas das razões N/P 12 e 18, em tampão acetato pH 5.5 a 25°C, meio SGF pH 1.2 a 37°C e meio SIF pH 6.8 a 37°C (média \pm SD, n=3).

Como pode ser analisado na figura 20, as nanopartículas de CH M010-DNA e de Chimi-DNA, apresentaram-se bastante resistentes às variações de pH dos meios SGF (pH 1.2) e SIF (pH 6.8), sendo que houve pouca alteração em relação ao seu tamanho, ou à sua carga global superficial, representada pelo potencial zeta.

4.8 Caracterização das partículas de quitosana associadas com a proteína SmRho e revestidas com alginato de sódio

A preparação desse tipo de partículas envolve três passos, que constituem a formação das nanopartículas de quitosana pela precipitação com Na_2SO_4 , a ligação com a proteína de interesse, a SmRho, passo que constitui na incubação da solução de partículas com a solução contendo a proteína por um determinado tempo, sob leve agitação, e por fim, a etapa de revestimento, em que é adicionado o alginato de sódio e a solução de CaCl_2 para a formação das ligações cruzadas do alginato com a superfície das partículas.

A eficiência com que esse processo ocorre pode ser avaliada pela ligação da proteína adicionada às partículas, antes e após o revestimento. Isso é feito após cada etapa, centrifugando-se a suspensão de partículas e quantificando-se a proteína do sobrenadante. Pode-se observar, pela tabela 5, que a encapsulação da proteína nas

partículas de quitosana antes do revestimento foi bastante alta, sendo que após o revestimento, houve uma significativa redução da eficiência de ligação da proteína.

Tabela 5: Eficiência de ligação das partículas de quitosana antes e após o revestimento.

	Eficiência de Ligação (média \pm SD) (n=3)
Partículas de quitosana ligada à proteína	95,5% \pm 0,91
Partículas de quitosana revestidas	76,6% \pm 3,09

Em relação às medidas de tamanho e do potencial zeta (tabela 6), as partículas apresentaram, antes do revestimento, um tamanho na escala de micrômetros e um potencial zeta positivo. Após o revestimento, houve uma redução no tamanho das partículas, que se apresenta na escala de nanômetros, e o potencial zeta passa a ser um valor negativo, como era esperado, devido ao excesso de cargas negativas do alginato.

Tabela 6: Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de quitosana antes e após o revestimento

	Tamanho (nm) média \pm SD (n=3)	Potencial zeta (mV) média \pm SD (n=3)
Partículas de quitosana ligada à proteína	1486,5 \pm 376,9	33,5 \pm 2,7
Partículas de quitosana revestidas	869,9 \pm 217,9	-38,6 \pm 3,8

Adicionalmente, o potencial zeta das partículas de quitosana revestidas foi determinado nos meio SGF e SIF a 37°C para avaliar se a mudança no pH da solução pode alterar as cargas superficiais dessas partículas. Conforme já citado, as partículas apresentaram um potencial positivo antes do revestimento, e negativo após o revestimento. O potencial permanece negativo no meio SGF, e já no meio SIF, o potencial zeta passa a apresentar novamente um valor positivo (figura 21), mostrando o importante papel do pH na determinação da carga superficial das partículas.

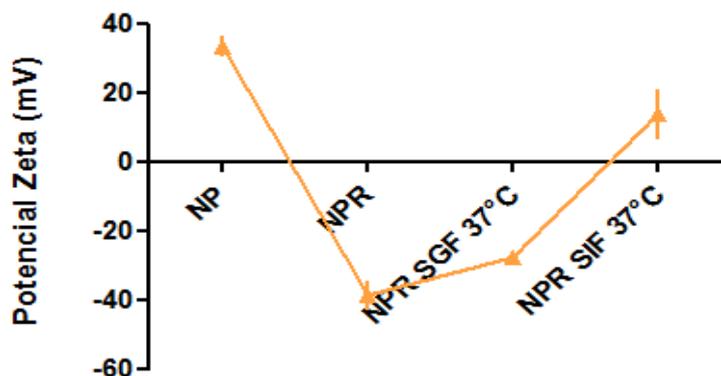


Figura 21: Medida do potencial zeta das partículas de quitosana, antes (NP) e após o revestimento (NPR), nos meios SGF pH 1.2 a 37°C e SIF pH 6.8 a 37°C (média \pm SD, n=3).

4.9 Ensaios de liberação *in vitro*

Estudos de liberação foram realizados para avaliar a estabilidade das partículas de quitosana revestidas e os diferentes perfis de liberação da proteína SmRho do sistema nos meios SGF e SIF a 37°C. Como pode ser observado na figura 22, no meio SGF, a porcentagem de proteína liberada foi inferior a 40% após 2h e no meio SIF, a porcentagem de proteína liberada foi inferior a 15%, mesmo após 20h de ensaio.

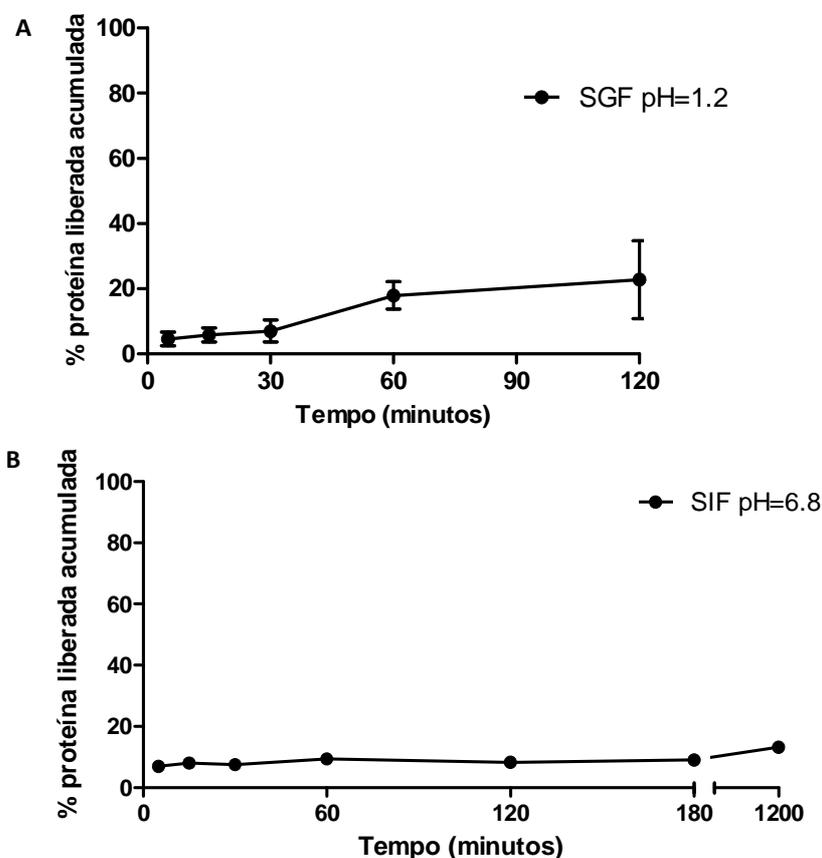


Figura 22: Perfil de liberação da SmRho das nanopartículas de quitosana revestidas nos meios SGF (A) e SIF (B) a 37°C (média \pm SD, n=3).

4.10 Avaliação da resposta imune humoral

Para avaliar o potencial imunogênico das formulações citadas no item 3.10.2, foi feita a imunização dos camundongos e posterior avaliação dos níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a produzidos. A produção desses anticorpos foi avaliada por ELISA sendo que os antígenos SmRho e SWAP foram utilizados para sensibilizar as placas. As diluições dos soros utilizadas nas dosagens dos IgGs foram de 1/100 para todos os grupos, exceto para o grupo G12 (quitosana-proteína-alginato via intramuscular) frente à SmRho, que precisou ser diluído 1:1600 devido à alta produção de anticorpos deste grupo. Os gráficos foram separados em um grupo contendo as nanopartículas preparadas com proteína e o outro contendo as nanopartículas com DNA, para facilitar o entendimento. Os primeiros gráficos representam a produção de IgG total em relação ao tempo. As datas das imunizações e da infecção desafio estão indicadas por setas.

Ao analisar a figura 23(A), pode-se observar que o grupo que mais se destacou na produção de anticorpos foi o grupo da formulação em que se juntou as nanopartículas de quitosana contendo proteína e CpG e as nanopartículas de quitosana-DNA, nos tempos de 15 e 30 dias. O grupo CHimi-DNA também apresentou uma significativa produção de anticorpos no tempo de 15 dias e todos os grupos apresentaram uma menor produção de anticorpos comparado com o grupo salina no ponto após a infecção. Na figura 23(B) observa-se uma produção elevada de anticorpos do grupo de nanopartículas de quitosana-proteína imunizados via intramuscular, principalmente levando-se em conta que a diluição deste grupo(1:1600) é maior que a dos demais grupos (1:100). Novamente, após a infecção, a maioria dos grupos tiveram uma redução na produção de anticorpos, se comparado ao grupo salina, exceto para o grupo CH-Rho-Alg (Via intramuscular).

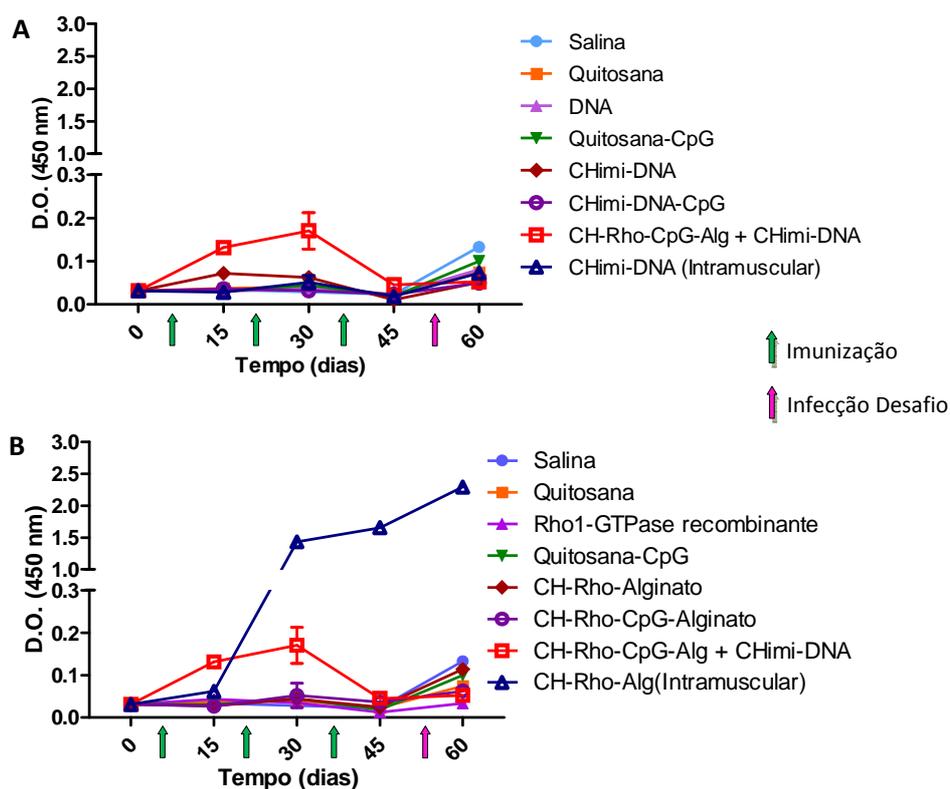


Figura 23: Resposta de anticorpos IgG total anti-Rho dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B). Os ELISA's foram realizados a partir de um pool de soros obtido pela mistura de volumes iguais do soro de cada camundongo, coletados a cada 2 semanas, de seus respectivos grupos. Os valores representam a média das densidades óticas ($D.O \pm SD$; $n=3$).

Já a dosagem dos anticorpos produzidos contra o SWAP foi bem inferior em praticamente todos os grupos (figura 24, A e B), o grupo DNA em solução via oral apresentou uma diferença significativa no tempo de 15 dias e o grupo de quitosana também foi significativo em relação ao grupo salina no tempo de 60 dias. Novamente foi observada uma redução na produção de anticorpos após a infecção para a maioria dos grupos, exceto para o grupo quitosana.

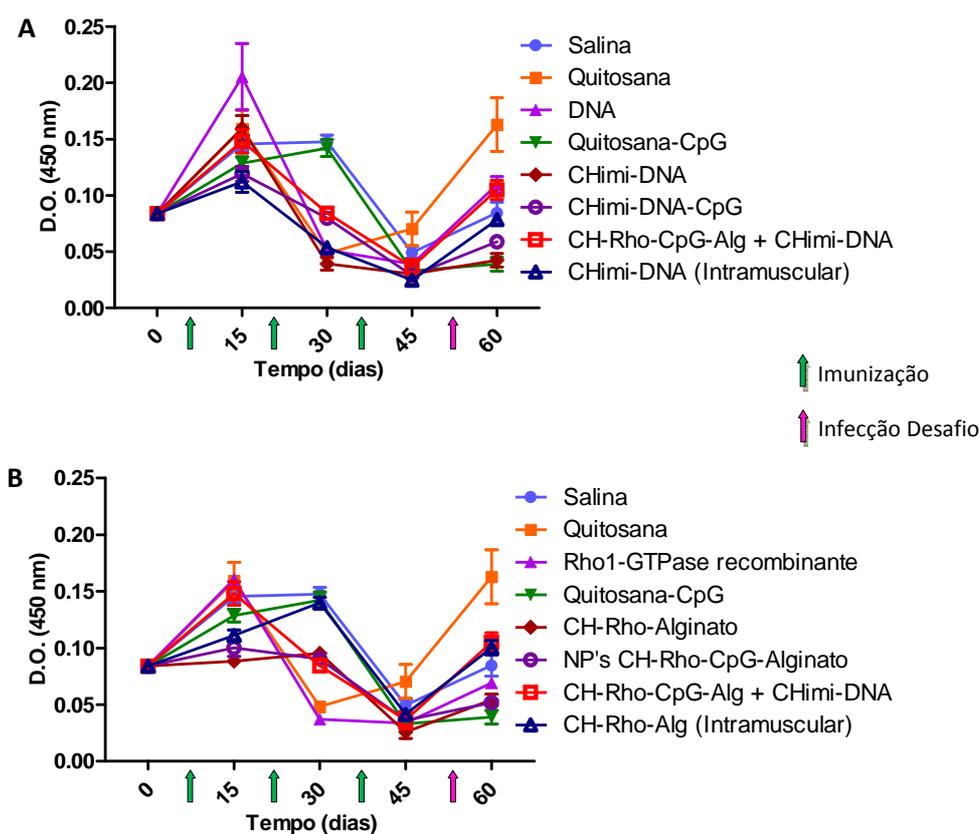


Figura 24: Resposta de anticorpos IgG total anti-SWAP dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B). Os ELISA's foram realizados a partir de um pool de soros obtido pela mistura de volumes iguais do soro de cada camundongo, coletados a cada 2 semanas, de seus respectivos grupos. Os valores representam a média das densidades óticas (D.O \pm SD; n=3).

Os gráficos a seguir representam a produção de anticorpos da subclasse IgG1 frente à proteína SmRho e ao SWAP. Na figura 25(A) pode-se observar que as diferenças significativas são devido a uma redução na produção de anticorpos, se comparado ao grupo salina. Apenas os grupos quitosana e CHimi-DNA apresentaram um aumento significativo de anticorpos no tempo de 60 dias. Em relação à figura 25(B) o único grupo que apresentou uma produção significativa de anticorpos foi o CH-Rho-Alg (Intramuscular), que por sua vez, apresentou altos níveis de anticorpos detectados a partir do tempo de 30 dias.

Na figura 26(A) pode-se observar que os grupos que apresentaram uma produção significativa de anticorpos IgG1 anti-SWAP foram os grupos CHimi-DNA-CpG e CHimi-DNA (Intramuscular) no tempo de 15 dias. Após a infecção desafio, o grupo quitosana apresentou um aumento significativo na produção de anticorpos, assim como o grupo CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA, sendo que este último,

apresentou uma produção ainda mais elevada de anticorpos IgG1 anti-SWAP. Na figura 26(B), os grupos que se destacaram significativamente foram o grupo CH-Rho-Alg (Intramuscular) e o grupo CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA, já mencionado acima.

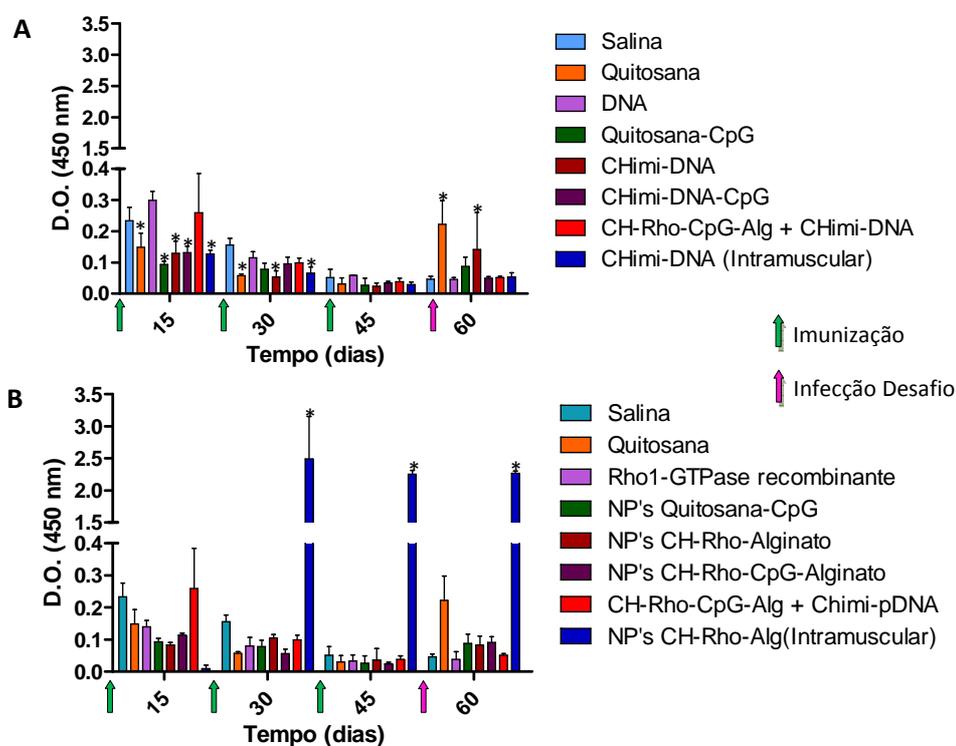


Figura 25: Resposta de anticorpos IgG1 anti-Rho dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B). Os ELISA's foram realizados a partir de um pool de soros obtido pela mistura de volumes iguais do soro de cada camundongo, coletados a cada 2 semanas, em seus respectivos grupos. Os valores representam a média das densidades óticas ($D.O \pm SD$; $n=3$). As diferenças significativas ($p<0.05$) estão indicadas por (*) comparados com o grupo salina dentro de cada período de tempo.

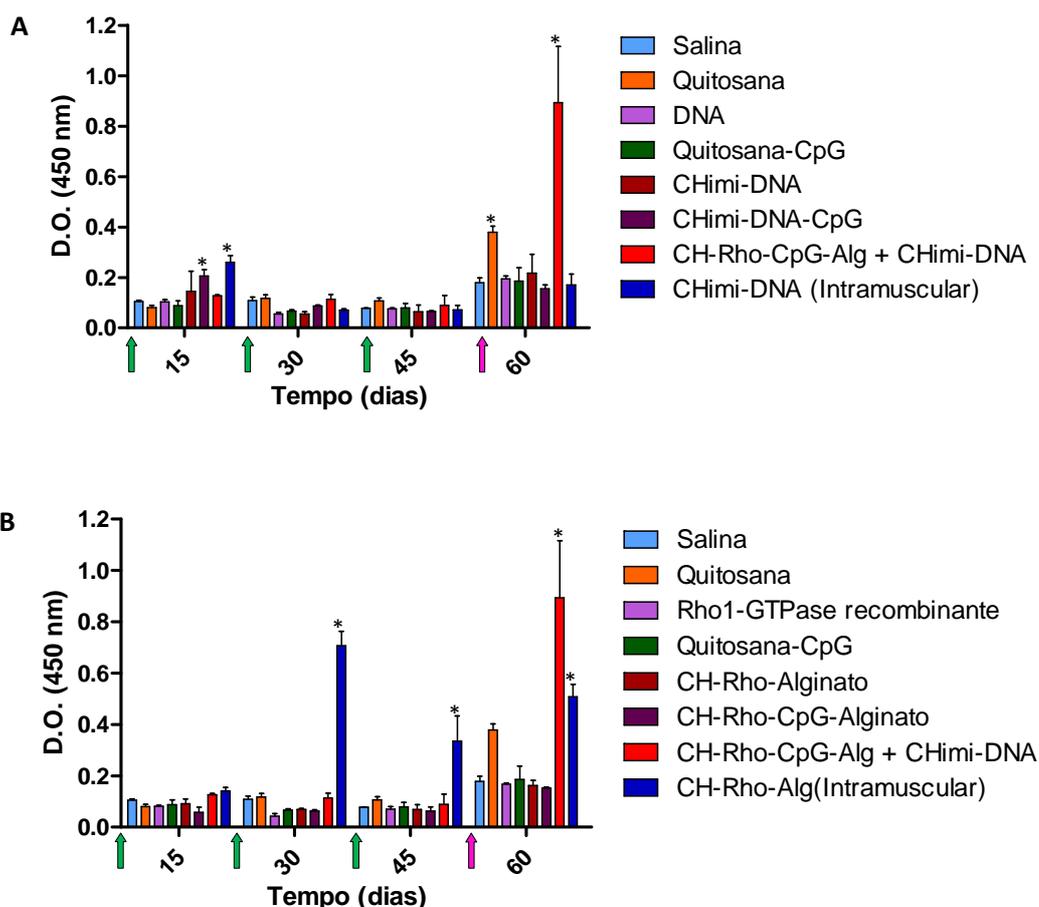


Figura 26: Resposta de anticorpos IgG1 anti-SWAP dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B). Os ELISA's foram realizados a partir de um pool de soros obtido pela mistura de volumes iguais do soro de cada camundongo, coletados a cada 2 semanas, em seus respectivos grupos. Os valores representam a média das densidades óticas (D.O \pm SD; n=3). As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas por (*) comparados com o grupo salina dentro de cada período de tempo.

Em relação à produção de anticorpos da subclasse IgG2a anti-Rho, pode-se observar pela figura 27 (A e B) que as diferenças significativas foram devido a uma redução na produção de anticorpos, comparando-se com o grupo salina, para todos os grupos, exceto para o grupo CH-Rho-Alg (Intramuscular), que novamente apresentou uma produção elevada de anticorpos.

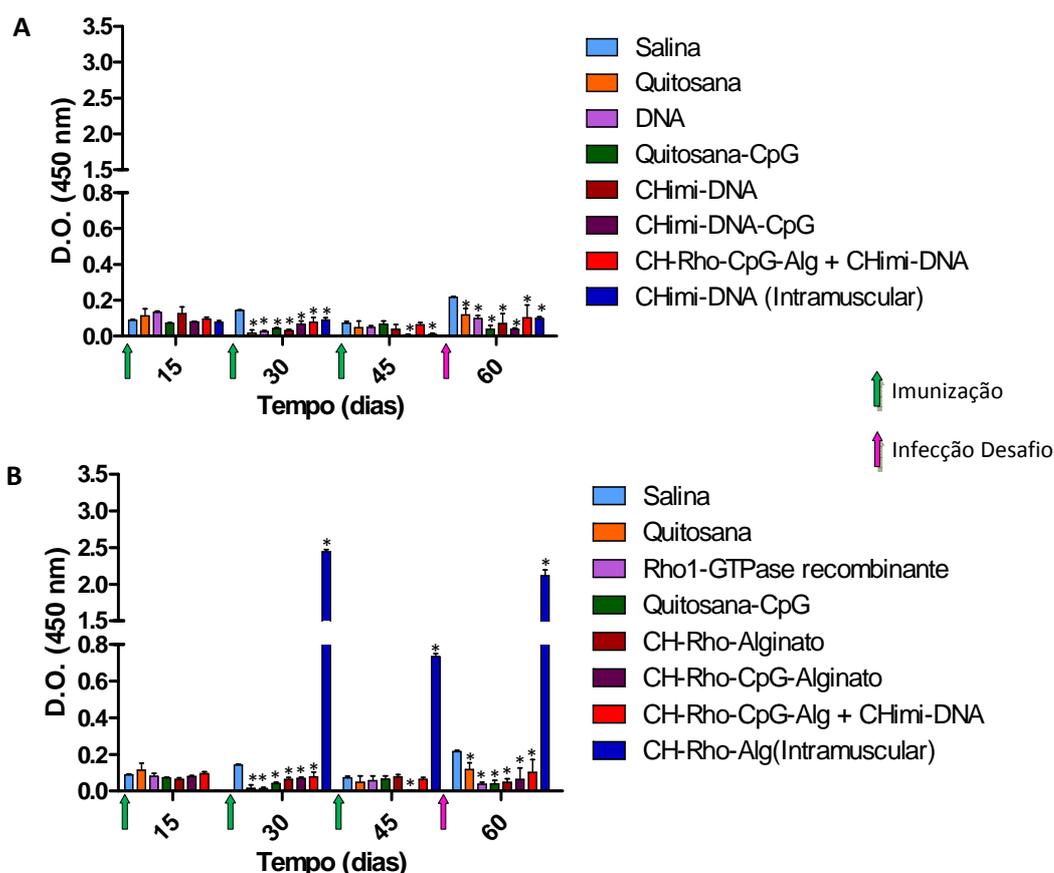


Figura 27: Resposta de anticorpos IgG2a anti-Rho dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B). Os ELISA's foram realizados a partir de um pool de soros obtido pela mistura de volumes iguais do soro de cada camundongo, coletados a cada 2 semanas, em seus respectivos grupos. Os valores representam a média das densidades óticas (D.O. \pm SD; n=3). As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas por (*) comparados com o grupo salina dentro de cada período de tempo.

Por fim, analisando os grupos que se destacaram significativamente por um aumento na produção de anticorpos IgG2a anti-SWAP, pode-se observar, pela figura 28(A), que foram os grupos CHimi-DNA, CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA e CHimi-DNA (Intramuscular) no tempo de 30 dias, e após a infecção, o grupo CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA. Com relação à figura 28(B), os grupos CH-Rho-CpG-Alg, CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA, e CH-Rho-Alg (Intramuscular) apresentaram um aumento significativo no tempo de 30 dias. No tempo de 60 dias, como já citado, o grupo CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA apresentou uma produção significativa de anticorpos.

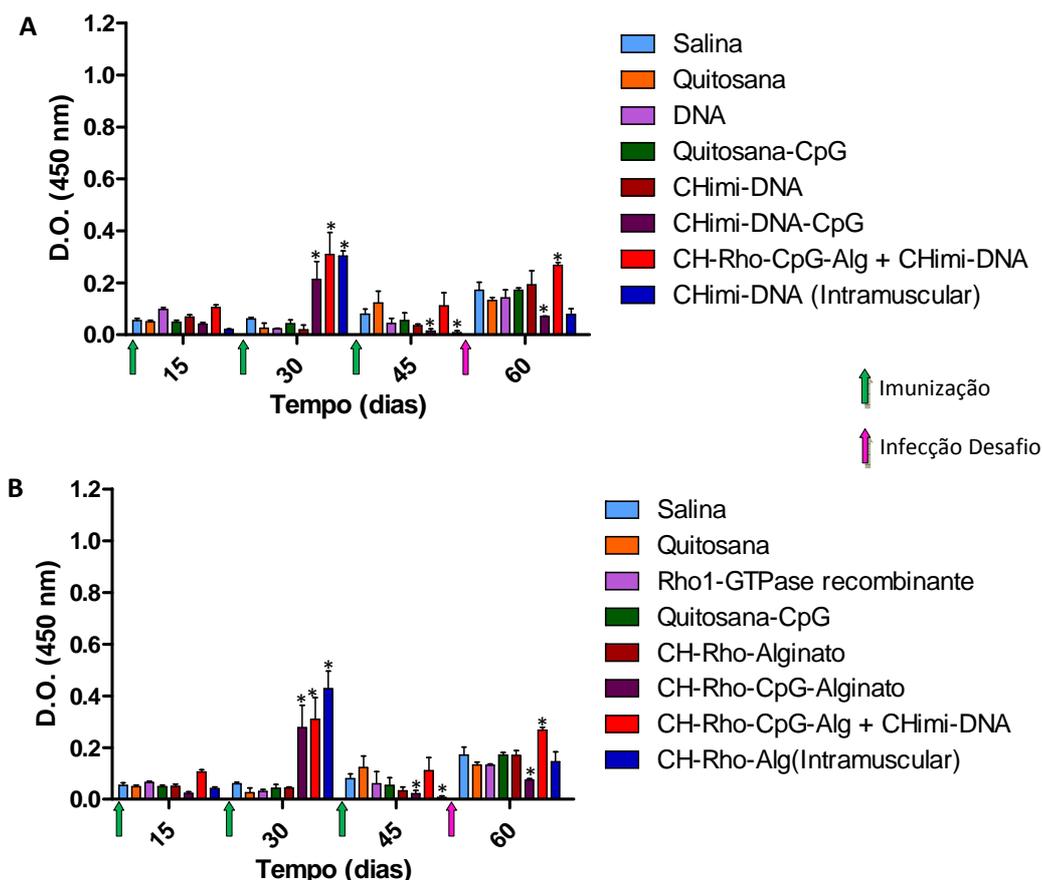


Figura 28: Resposta de anticorpos IgG2a anti-SWAP dos camundongos imunizados com as formulações contendo DNA(A) e contendo a proteína SmRho(B). Os ELISA's foram realizados a partir de um pool de soros obtido pela mistura de volumes iguais do soro de cada camundongo, coletados a cada 2 semanas, em seus respectivos grupos. Os valores representam a média das densidades óticas (D.O \pm SD; n=3). As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas por (*) comparados com o grupo salina dentro de cada período de tempo.

4.11 Avaliação da resposta imune protetora

O efeito protetor da imunização com as diversas formulações contendo DNA ou a proteína SmRho, associados com as partículas de quitosana, foi investigado através da imunização de camundongos C57BL/6 fêmeas, seguida de infecção desafio com 25 cercárias. Após 45 dias de infecção, a perfusão foi realizada e a imunidade protetora foi avaliada. O grupo que conferiu maior proteção foi o grupo em que foi associado as nanopartículas de quitosana-proteína com as nanopartículas de quitosana-DNA ("CH-Rho-CpG-Alg + CHimi-DNA"). Essa formulação, administrada oralmente, obteve 57% de proteção. A formulação CH-Rho-Alg foi a segunda que conferiu maior proteção, com 55% de redução dos vermes recuperados. Os grupos CHimi-CpG-DNA e CH-Rho-CpG-Alg também apresentaram uma redução significativa na recuperação dos vermes. Interessantemente, os grupos adjuvantes Quitosana e Quitosana-CpG

também apresentaram uma proteção significativa, comparando-se com o grupo controle Salina. Os grupos imunizados intramuscular não apresentaram uma redução significativa na recuperação dos vermes.

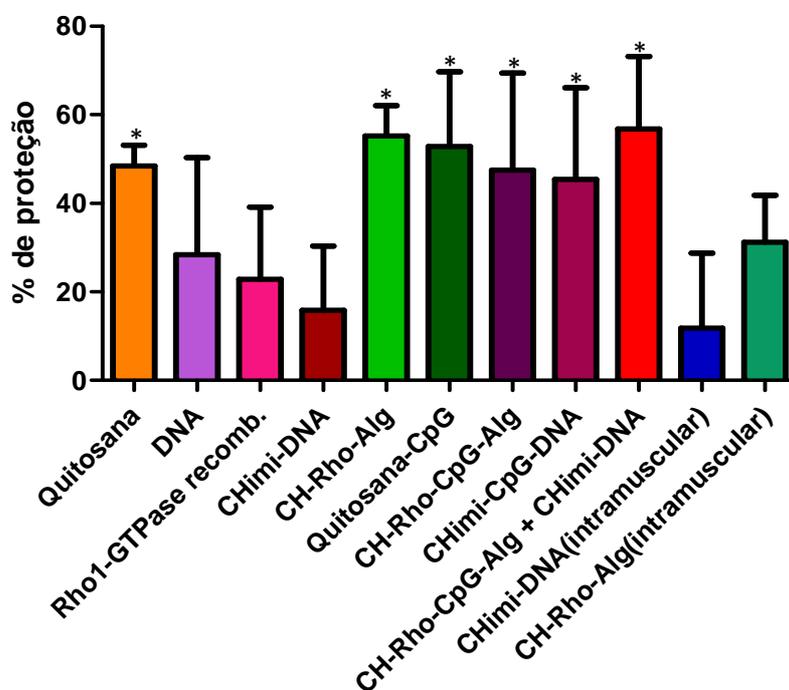


Figura 29: Efeito protetor das diferentes formulações vacinais com as quais os camundongos C57BL/6 foram imunizados. Após 45 dias da infecção desafio foi feita a perfusão e os vermes foram recuperados do sistema porta-hepático dos animais (n=3). A porcentagem de proteção corresponde à porcentagem de redução do número de vermes recuperados em relação ao grupo controle. % de proteção= (média do controle-experimental/média do controle) x 100. *Significativamente diferente quando comparado ao grupo controle salina (P < 0,05).

5 DISCUSSÃO

Uma vacina contra a esquistossomose que pudesse ser usada em áreas endêmicas definitivamente complementaria o tratamento com a droga e as outras estratégias de controle, e ajudaria imensamente na redução dos níveis de transmissão desta doença. Vários grupos ao redor do mundo tem trabalhado no desenvolvimento de vacinas de subunidades para a esquistossomose mas até agora nenhum deles tem conseguido níveis de proteção consistentes e reproduzíveis independentemente, que são aceitáveis para o uso humano (Mcmanus e Loukas, 2008).

A seleção de um adjuvante adequado e um sistema de liberação para ajudar na estimulação de uma resposta imune apropriada é um passo crítico na via de desenvolvimento e emprego de uma eficiente vacina antiesquistossomótica, sendo que várias abordagens já foram testadas, com algum sucesso (Mcmanus e Loukas, 2008).

Além disso, a busca por vias alternativas de administração de vacinas, que confirmam maior segurança, tem se intensificado nos últimos anos. A via de administração pelas mucosas é atrativa por aumentar a aceitabilidade da população e ser de fácil aplicação, além de evitar contaminações recorrentes do uso de seringas. Adicionalmente, a vacinação pela mucosa pode resultar em uma resposta celular e humoral, ambas sistêmica e local (Bivas-Benita *et al.*, 2003).

Dentro desse contexto, foi proposto nesta dissertação o desenvolvimento de uma nova estratégia em busca da indução de uma imunidade protetora contra a esquistossomose, associando o antígeno e/ou seu DNA codificador, na presença ou não do adjuvante CpG, com polímeros biodegradáveis, para a formação de nanopartículas a serem administradas oralmente.

Para alcançarmos os objetivos o primeiro passo foi a clonagem e expressão da proteína recombinante usada como antígeno, a SmRho, em sistema procarioto. Para isso, a sequência codificadora da proteína SmRho foi amplificada a partir de cDNA de verme adulto e clonada primeiramente no vetor de clonagem pDNOR221 e então subclonada no vetor de expressão pET-DEST42, do sistema Gateway. Esse vetor adiciona uma cauda de poli-histidina na porção C-terminal da proteína, o que facilitou os passos posteriores de purificação.

Após a obtenção do clone pET-DEST42-Rho, foi feito o sequenciamento usando iniciadores universais T7. A análise de homologia da sequência obtida com as sequências depositadas no banco de dados GenBank mostrou um alinhamento de praticamente 100% com a sequência parcial do mRNA da Rho1-GTPase de *S. mansoni*, acesso AF140785, exceto pela substituição de uma citosina por uma

timidina, levando a uma mutação silenciosa, na qual não houve alteração do aminoácido codificado. A sequência clonada corresponde a uma sequência parcial do mRNA da Rho1-GTPase de *S. Mansonii* que constitui a principal ORF codificadora. A sequência completa do cDNA contém também uma longa porção 3' não traduzida, que é uma característica conhecida dos transcritos de *S. mansonii* (Santos *et al.*, 2002). A sequência genômica contém, além da ORF idêntica à SmRho, três pequenos íntrons (número de acesso AF140785 no GenBank). Todos os íntrons interrompem a sequência de leitura da proteína SmRho (Santos *et al.*, 2002). A pesquisa de homologia com o gene da RHO A humana, apresentou uma identidade de 76%, fato que poderia limitar a utilização desse antígeno como candidato vacinal. No entanto, obtendo-se resultados promissores com a proteína completa, pode-se experimentar uma vacina de peptídeos baseada nos epítomos imunodominantes da SmRho e que não são compartilhados com a proteína Rho A humana.

Para a expressão da proteína SmRho foi preciso utilizar uma bactéria da linhagem *E. coli* BL21 pRARE que aumenta a expressão de genes alvos que contêm códons raros de *E. coli* que poderiam, de outra forma, impedir a tradução. Análises da sequência codificadora da SmRho indicaram que a Rho1-GTPase é enriquecida em códons raros para arginina e glicina, numa proporção ainda maior que a maioria das sequências codificadoras do genoma de *S. mansonii* ricas em A/T (Milhon e Tracy, 1995). Enquanto Arg é codificada por 0,91% de códons AGA ou AGG e Gly por 1,97% das vezes em *E. coli*, em *S. mansonii* 43% dos resíduos de Arg e 43% dos resíduos de Gly são expressos por estes códons raros. A expressão da SmRho foi aumentada em cerca de 10 vezes pela co-transformação com o plasmídeo RIG que codifica genes de tRNAs raros (Vermeire *et al.*, 2003).

A linhagem BL21 pRARE, utilizada neste trabalho, é uma linhagem modificada pois contém o plasmídeo pRARE, derivado do plasmídeo RIG, que codifica genes de tRNA para todos os códons “problemáticos” raramente usados que codificam os aminoácidos Arg, Ile, Gly, Leu e Pro, exceto para Arg CGA/CGG (Novy *et al.*, 2001). Dessa forma, foi possível obter bons níveis de expressão, que nos permitiu purificar a proteína com homogeneidade e quantidades suficientes para realizar todos os ensaios de preparo das nanopartículas, ensaios de liberação e de imunização, além dos ELISA's.

Em seguida, foi analisado a reatividade de soros de pacientes infectados e controle, frente à proteína SmRho para confirmar o caráter imunogênico da mesma. Em ambos os ensaios realizados, tanto por ELISA quanto por *Western Blotting*, a proteína foi efetivamente reconhecida pelos soros de pacientes infectados, o que não aconteceu com os soros do grupo controle. Além disso, o reconhecimento foi maior

nos pacientes tratados com a droga, em relação aos não-tratados, o que provavelmente se deve à exposição da proteína do parasita após o tratamento com a droga. Isso evidencia a importância da associação do tratamento quimioterápico com o processo de imunização. Esse resultado, confirma então, o potencial da proteína SmRho para ser utilizada como candidato vacinal para a esquistossomose, conforme sugerido também por outros autores (Santos *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 1999).

A próxima etapa constituiu-se, então, da preparação das nanopartículas de quitosana. Polissacarídeos e outros polímeros catiônicos tem sido recentemente usados na indústria e pesquisa farmacêutica por suas propriedades de controlar a liberação de antibióticos, DNA, proteínas, drogas de peptídeos ou vacinas. Eles também tem sido extensivamente estudados como carreadores não-virais de DNA e siRNA para a entrega de genes e terapia (Masotti e Ortaggi, 2009; Mao *et al.*, 2010). A quitosana é um dos mais estudados já que ela é capaz de promover uma liberação prolongada das drogas incorporadas (Masotti e G., 2009). Além disso, os sistemas baseados em quitosana possuem carga catiônica, biodegradabilidade e biocompatibilidade, assim como propriedades mucoadesivas e capacidade de aumentar a permeabilidade. No entanto, a eficiência de transfecção da quitosana é muito baixa para aplicações clínicas. Estudos indicam que a eficiência de transfecção depende de uma série de parâmetros baseados na formulação da quitosana, como o peso molecular da quitosana, seu grau de desacetilação, a razão de cargas da quitosana para o DNA/siRNA (razão N/P), o pH, aditivos, as técnicas de preparação de partículas de quitosana/ácidos nucleicos e as vias de administração (Mao *et al.*, 2010).

Para a formação das nanopartículas de quitosana foi usada a metodologia de coacervação complexa em que as nanopartículas se formam espontaneamente devido à combinação de duas soluções de cargas opostas, causando interação e precipitação (Mao *et al.*, 2001). Em relação à caracterização das nanopartículas, pôde-se observar que as razão molares dos grupos amino da quitosana em relação aos grupos fosfatos de DNA são essenciais para a obtenção de sistemas estáveis. Analisando-se os ensaios de retenção em gel, observa-se que a partir da razão N/P igual a 2, os complexos ficam retidos na canaleta, mostrando que todo o DNA está associado com a quitosana e isso ocorre para ambos os tipos de quitosana utilizados. Em relação ao tamanho e ao potencial zeta, a partir da razão N/P igual a 3 os complexos alcançam uma estabilidade, sendo que o tamanho médio das nanopartículas estabiliza-se em torno de 250 – 300nm e o potencial zeta em torna de +20mV. Partículas maiores e populações polidispersas foram observadas apenas em razões molares N/P mais baixas. Outros autores também tem relatado um maior tamanho na razão molar 1 (a

condição em que o potencial zeta dos complexos está perto da neutralidade), que pode ser explicada pela instabilidade do sistema coloidal (Moreira *et al.*, 2009). Sob estas condições a população de partículas é muito heterogênea, e a carga e o tamanho característicos dos complexos favorecem a formação de grandes agregados (Mao *et al.*, 2001). Para partículas preparadas pelo método de coacervação, o tamanho relatado varia entre 150 e 500nm (Mao *et al.*, 2001). Os resultados obtidos no presente estudo, corroboram, portanto, com o que tem sido observado. Além disso, o tamanho dos complexos possui importância crucial na internalização pelas células. Um tamanho menor dos complexos tem a vantagem de entrar nas células por endocitose e/ou pinocitose, aumentando, portanto, a taxa de transfecção (Mansouri *et al.*, 2004).

Estudos de transfecção foram realizados em células HEK 293 e conforme esperado, a taxa de transfecção com os complexos de quitosana/DNA foi bastante baixa, comparando-se com a taxa de transfecção obtida pelo PEI, um polímero catiônico que geralmente apresenta altas taxas de transfecção, mas possui citotoxicidade significativa. A baixa eficiência de transfecção é bem conhecida e por isso, vários trabalhos tem sido realizados no intuito de modificar a estrutura da quitosana, a fim de aumentar a sua solubilidade, estabilidade e assim aumentar a capacidade de transfecção. Existem modificações hidrofílicas como a associação como o PEG (Jiang *et al.*, 2006) e a quitosana quaternizada (TMC) (Thanou *et al.*, 2002); modificações hidrofóbicas como a quitosana alquilada (Liu *et al.*, 2003) e a quitosana conjugada ao ácido esteárico (Hu *et al.*, 2006); adição de ligantes como a quitosana conjugada com transferrina (Zhang *et al.*, 2006) e a quitosana manosilada (Amidi *et al.*, 2007).

Adicionalmente à baixa estabilidade nos fluidos biológicos e a internalização por células não específicas, acredita-se que a baixa habilidade de transfecção da quitosana se deve ao escape ineficiente dos endossomos no citoplasma devido ao seu fraco efeito próton esponja, sustentado pelas diferenças das capacidades tamponantes entre o PEI e a quitosana. Sabe-se que o escape dos complexos dos endossomos é um passo crítico para exercer os efeitos terapêuticos das drogas geneticamente transfectadas. Dentro desse contexto, Moreira e colaboradores (2009) sintetizaram uma quitosana na qual foi introduzida grupos imidazol por uma reação de amidação, a fim de aumentar a capacidade tamponante da quitosana. Dessa forma, com a quitosana modificada, denominada CHimi, foram obtidos níveis de transfecção próximos aos obtidos com o controle positivo, o PEI. Como mencionado anteriormente, devido a uma colaboração entre os grupos de pesquisa, a quitosana modificada nos foi gentilmente cedida, para a continuação do trabalho.

Foram então preparadas nanopartículas de quitosana/DNA usando a CH M010 e a CHimi para se avaliar a influência da pH sobre as partículas em relação ao

tamanho e ao potencial zeta. Os resultados obtidos foram bastante interessantes pois as nanopartículas mostraram-se resistentes ao pH dos meios que simulam o fluido gástrico, pH 1.2, e o fluido intestinal, pH 6.8. As nanopartículas preparadas com ambos os tipos de quitosana apresentaram comportamento semelhante, com pouca variação no tamanho e no potencial zeta. Esse estudo, ainda não realizado por outros grupos de pesquisa, pelo menos ao nosso conhecimento, mostra que essas nanopartículas provavelmente não serão degradadas durante a passagem pelo trato gastrointestinal podendo chegar intactas ao seu sítio alvo de absorção, no caso desse estudo, as placas de Peyer.

Em relação à preparação das nanopartículas de quitosana-proteína o protocolo é bastante diferente do que foi feito para preparar as partículas de quitosana-DNA. O preparo constitui primeiramente da formação das nanopartículas de quitosana através da precipitação com sulfato de sódio, que tem sido descrito por vários autores, sendo que, neste trabalho, foi utilizada uma metodologia adaptada daquela descrita por Borges e colaboradores (2005). O processo de adsorção das partículas com a proteína de interesse, a SmRho, é um processo bastante brando, que pode ser alcançado pela incubação da solução de partículas com a solução contendo a proteína. A adsorção da proteína ocorre então devido às interações eletrostáticas dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxilas da proteína. O ponto isoelétrico da proteína em questão, favorece essa interação, pois permite que a proteína apresente uma carga total negativa no pH em que ocorre a adsorção. Isso se confirmou pela análise da eficiência de ligação da proteína com as partículas de quitosana, que foi em torno de 95%. O processo de revestimento, também se apresenta como uma etapa importante, pois se deve manter a estabilidade do sistema, ou seja, deve ser adicionada uma quantidade adequada de alginato, que não cause precipitação ou aglomeração das partículas. Novamente seguindo o protocolo de Borges e colaboradores (2005), conseguimos encontrar uma quantidade de alginato que era capaz de realizar o revestimento e não desestabilizar o sistema de partículas. Outro parâmetro importante foi avaliar a dessorção da proteína durante o processo de revestimento. A adição da solução de alginato de sódio na suspensão de partículas carregadas com a proteína resultou um novo equilíbrio de adsorção caracterizado por uma concentração diferente de proteína e pela presença do alginato, que passa a competir pelas interações com as cargas da superfície das partículas de quitosana. Diante disso, a eficiência de ligação após o revestimento apresentou um decréscimo significativo, ficando em torno de 76%, sendo, no entanto, um valor ainda maior do que o obtido por Li e colabores (2008), que obtiveram uma LE em torno de 66% e de Borges e colaboradores (2005), que obtiveram uma LE em torno de 60%.

A caracterização das nanopartículas foi feita em relação ao tamanho e potencial zeta das partículas antes e após o revestimento. As partículas carregadas com proteína apresentaram um tamanho na escala de micrômetros e após o revestimento, um tamanho na escala de nanômetros. Foi observado também, uma alta polidispersidade de ambos os tipos de partículas, sendo esta uma desvantagem da técnica, já relatada por outros autores (Borges, Olga *et al.*, 2005).

A estabilidade de muitos sistemas coloidais está diretamente relacionada com a magnitude do seu potencial zeta. Em geral, se o valor do potencial zeta é grande, o sistema coloidal será estável. Ao contrário, se o potencial zeta das partículas é relativamente pequeno, o sistema coloidal irá aglomerar (Borges, Olga *et al.*, 2005). A medida do potencial das partículas antes do revestimento apresentou um valor positivo, em torno de 34mV, conforme era esperado, devido ao excesso de cargas positivas das partículas de quitosana. Após o revestimento das partículas com alginato de sódio, pôde-se observar uma inversão do potencial zeta, que passou para aproximadamente -39mV, o que novamente era esperado, devido ao excesso de cargas negativas do alginato de sódio. Essa inversão no valor do potencial zeta é um indício de que o revestimento realmente ocorreu e também já foi relatado por outros autores (Borges, O. *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

Assim como foi feito com as nanopartículas de quitosana-DNA, fizemos a medida do potencial zeta nos meios que simulam o fluido gástrico (SGF - pH 1.2) e o fluido intestinal (SIF - pH 6.8) para analisar se o pH do meio externo influenciaria as características das partículas, e assim, a estabilidade do sistema. Pôde-se observar que as nanopartículas revestidas em meio SGF sofrem pouca alteração no valor do potencial zeta, passando de aproximadamente -39mV para -30mV, permanecendo, portanto, com um valor negativo. No entanto, quando se colocou as partículas em meio SIF, foi observado uma inversão do potencial zeta, que passou agora, a apresentar um valor positivo, em torno de +15mV. Esse estudo, ainda não realizado por outros autores até o nosso conhecimento é muito importante e apresentou um dado interessante nessa última etapa. Esse resultado mostra que, apesar de inicialmente as partículas revestidas possuírem um potencial zeta negativo, quando elas chegam ao sítio de absorção no intestino, terá ocorrido uma inversão nesse potencial zeta devido à influência do pH, que levou, provavelmente à dissolução da camada de alginato. Vários autores acreditam que as partículas devem apresentar uma carga superficial positiva para facilitar a interação com a membrana das células e então aumentar a internalização dessas partículas (Gao *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011) Portanto, o fato das nanopartículas chegarem ao seu sítio de absorção com um

potencial positivo pode ser uma característica vantajosa pois poderá facilitar a internalização das nanopartículas pelas células M das placas de Peyer.

Segundo George e Abraham (2006), uma vez que as partículas passam para o pH mais alto do trato gastrointestinal, o alginato é convertido em uma camada viscosa solúvel, sendo que, uma rápida dissolução das matrizes de alginato em faixas de pH mais altas pode resultar em uma rápida liberação da proteína. No entanto, os resultados obtidos com os nossos estudos de liberação da proteína em meio SIF não mostraram esse comportamento.

Foram feitos ensaios de liberação da proteína nos meios SGF e SIG a 37°C a fim de avaliar os perfis de liberação da proteína SmRho e também de avaliar a estabilidade do sistema frente à meios com diferentes pH's, forças iônicas e na temperatura fisiológica. No meio SGF houve uma liberação gradual da proteína, sendo que, após 2h de ensaio, cerca de 30% da proteína havia sido liberada. Após decorrido esse tempo, acredita-se que as partículas já tenham passado pelo estômago e portanto, o sistema apresentou-se bastante resistente à influência do meio ácido. Apesar de usarem um sistema semelhante, Borges e colaboradores (2007) obtiveram uma taxa de liberação de mais de 90% da proteína em meio SGF após o mesmo período de tempo. O perfil de liberação da proteína SmRho no meio SIF apresentou um resultado ainda melhor, pois após 20h de ensaio, cerca de apenas 15% da proteína havia sido liberada. Esse resultado também foi melhor do que obtido por Borges e colaboradores (2005) e Li e colaboradores (2008), que tiveram cerca de 40% da proteína liberada. Novamente, o sistema em estudo apresentou-se estável diante das interferências do meio SIF, sendo que, mesmo tendo ocorrido dissolução de uma parte da camada de alginato, como suposto anteriormente, houve pouca dessorção da proteína SmRho das partículas.

Após extensa caracterização das nanopartículas de quitosana-DNA e de quitosana-proteína-alginato, sendo que os resultados apresentaram características favoráveis para que esse sistema fosse utilizado como carreador de DNA ou do antígeno (proteína SmRho), e ainda buscando uma via menos invasiva de administração de vacinas, os camundongos foram então imunizados utilizando as formulações acima citadas, e ainda, associadas ou não, ao adjuvante CpG. A maioria dos grupos foi administrado via oral, mas dois grupos foram imunizados via intramuscular como via de referência.

Apesar das inúmeras vantagens da imunização via mucosa em relação às imunizações via intramuscular ou subcutânea, a indução de uma alta produção de anticorpos é um processo difícil de ser alcançado pela primeira via de administração. A análise da indução de uma resposta imune humoral, conferida pelos grupos, foi

realizada pela avaliação do perfil dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a produzidos devido a cada vacina testada. Com o objetivo de determinar se as IgG's produzidas seriam capazes de reconhecer proteínas nativas de *S. mansoni* avaliou-se também a reatividade dos soros dos animais imunizados frente ao SWAP, além da SmRho recombinante. Os resultados serão discutidos por grupo para facilitar o entendimento.

O grupo de animais imunizados apenas com as nanopartículas de quitosana revestidas (grupo quitosana), mas sem associação com DNA ou proteína, apresentou uma resposta significativa de anticorpos IgG1 anti-Rho e anti-SWAP, observada após a infecção. Isso sugere que a quitosana e também o alginato, podem ter atuado como adjuvantes, ativando uma resposta imune inata, e quando houve a infecção, e então vários antígenos foram expostos, uma resposta imune adquirida foi formada. O papel da quitosana como adjuvante, e em menor proporção o do alginato, vem sendo abordado recentemente e será discutido com mais detalhes adiante.

O grupo imunizado apenas com DNA em solução obteve uma pequena produção de anticorpos IgG total anti-SWAP, enquanto o grupo imunizado apenas com a proteína SmRho em solução não apresentou nenhuma produção significativa, mostrando que essas moléculas administradas isoladamente via oral, não são capazes de ativar o sistema imune.

Um resultado aparentemente incoerente foi o grupo imunizado com nanopartículas de quitosana-CpG não se destacar na produção de anticorpos em nenhum ensaio avaliado, sendo que as nanopartículas de quitosana sem o CpG tiveram uma produção considerável em alguns ensaios. Isso pode ser explicado, pois as nanopartículas de quitosana-CpG foram preparadas pelo mesmo protocolo utilizado na preparação das partículas de quitosana-DNA. Por esse método, são obtidas um número muito menor de partículas do que pelo método usado no preparo de nanopartículas com proteína, que por sua vez, são revestidas com alginato, o que também pode ter contribuído para a ativação do sistema imune. No momento do preparo, a presença das nanopartículas pode ser observada a olho nu pela formação de uma solução turva, o que ocorre na preparação das partículas de quitosana para proteína. No entanto, a solução contendo as nanopartículas de quitosana-DNA é praticamente transparente, de onde se conclui, que a quantidade de nanopartículas ali presente é bem inferior.

Apesar disso, o papel de adjuvante do CpG junto com as demais nanopartículas também não se destacou muito. Em relação ao grupo imunizado com as nanopartículas de quitosana-DNA, houve uma produção significativa de anticorpos na dosagem de IgG total e IgG1 anti-Rho em alguns ensaios. Enquanto que o grupo imunizado com partículas de quitosana-CpG-DNA se destacou na produção de

anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP nos tempos de 15 e 30 dias, respectivamente. Já o grupo imunizado com as nanopartículas de quitosana-CpG-proteína-alginato, apresentou uma produção significativa de anticorpos apenas na dosagem de IgG2a anti-SWAP no tempo pós-infecção.

Entre os grupos administrados via oral, aquele que alcançou uma maior produção de anticorpos foi o grupo imunizado com a formulação que combinava as nanopartículas de quitosana-CpG-proteína-alginato e as nanopartículas de quitosana-DNA. Essa estratégia foi realizada a fim de tentar aumentar o tempo de exposição do antígeno, já que inicialmente seria exposto o antígeno propriamente dito (proteína SmRho), e o DNA transcrito após certo tempo, proporcionaria novamente o estímulo antigênico. Além disso espera-se que a liberação das moléculas das nanopartículas ocorra de forma gradual, contribuindo para aumentar o período de exposição do antígeno.

No geral, as formulações administradas oralmente induziram, na maioria das vezes, uma diminuição da produção dos anticorpos. Esse é um resultado que pode ocorrer quando é feita a administração de antígenos por via oral. No entanto, uma falta de resposta sistêmica para antígenos administrados oralmente (tolerância oral) pode adversamente afetar a vacinação oral ou, por outro lado, pode ser usada como uma possível terapia em pacientes que hiper-respondem a um antígeno (Foster e Hirst, 2005). No contexto de muitas infecções parasitárias crônicas, a patologia resultante da infecção do parasita é frequentemente relacionada mais a uma resposta imune inflamatória aos antígenos do parasita do que a infecção propriamente dita (Lebens *et al.*, 2003). Diante disso, alguns autores tem buscado vacinas que atuam de forma a modular a resposta imunopatológica causada pelos antígenos do parasita. No caso da esquistossomose em que a maior característica patológica é o desenvolvimento de uma reação granulomatosa, dependente de células T, ao redor dos ovos do parasita que ficaram retidos no fígado, intestino e vários outros órgãos do hospedeiro, esta estratégia apresenta-se promissora e tem sido abordada por alguns autores (Baras *et al.*, 1999; Lebens *et al.*, 2003). O papel imunomodulador das formulações preparadas neste trabalho, poderá ser analisado posteriormente, pela análise do tamanho do granuloma e do perfil de citocinas produzido, experimentos que se constituem como perspectivas do presente trabalho.

Em relação aos grupos imunizados via intramuscular, o grupo imunizado com CHimi-DNA apresentou uma produção significativa de anticorpos apenas no ensaio de IgG1 anti-SWAP, no tempo de 15 dias. Essa baixa quantidade de anticorpos induzidos pode ser uma característica da própria vacina de DNA, que tem se mostrado mais eficiente da indução de uma resposta imune celular, tanto de linfócitos T CD8+

citotóxicos quanto de linfócitos T CD4+ auxiliares (Revisado por Moreira-Filho *et al.*, 2004). Além disso, a quantidade de plasmídeo utilizada na imunização (50 µg) pode ter sido pequena, já que, pela via intramuscular a maioria dos autores utilizam 100 µg de plasmídeo, como foi feito por exemplo por Zhang e colaboradores (2010), que obtiveram altos títulos de anticorpos após a imunização com uma vacina de DNA.

Por fim, o grupo imunizado via intramuscular com as nanopartículas de quitosana-proteína revestidas com alginato foi o que apresentou maiores níveis de anticorpos, sendo que ambos os níveis de IgG1 e IgG2a anti-Rho foram bastante elevados, numa proporção praticamente equivalente, que mostra uma resposta mista Th1/Th2. Os níveis de IgG1 anti-SWAP também foram significativos, sendo que os de IgG2a anti-SWAP foi significativo em apenas um dos tempos analisados, mostrando, independentemente, que os animais imunizados com a SmRho são capazes de reconhecer a proteína na forma nativa do verme. Um dado interessante foi que as nanopartículas foram administradas sem a adição de nenhum outro adjuvante, o que nos sugere que tanto a quitosana como o alginato de sódio atuaram como adjuvantes. As propriedades adjuvantes de nanopartículas de quitosana revestidas com alginato foram primeiramente reportadas por Olga e colaboradores (2007), quando foi feita a imunização subcutânea dessas partículas associadas ao antígeno de superfície da hepatite B. No entanto, Borges e colaboradores obtiveram uma resposta predominantemente Th2 por esse sistema, e apenas quando foi acrescentado o CpG às nanopartículas, obteve-se então, uma resposta mista Th1/Th2.

De modo geral, o desenvolvimento de adjuvantes novos e seguros é necessário não apenas para o ambiente mais desafiador das superfícies da mucosa, mas também para a vacinação parenteral, a fim de maximizar a eficácia das novas vacinas e das já disponíveis (O'hagan e Rappuoli, 2004).

Dentro desse contexto e devido às suas propriedades únicas e interessantes, que tem sido revisada recentemente em vários artigos (Prego *et al.*, 2005; Chopra *et al.*, 2006), a quitosana e nanopartículas de quitosana tem sido usada como sistemas carreadores para vacinação associadas a vários antígenos e administradas por diferentes rotas via mucosa (Cui e Mumper, 2001; Lubben *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2010). Entretanto, seu potencial como adjuvante para vacinação parenteral tem sido menos estudado. Em um estudo recente (Zaharoff *et al.*, 2007), uma solução de quitosana foi explorada como um adjuvante para vacinação subcutânea de camundongos com um antígeno modelo. Foi demonstrado que a quitosana foi capaz de aumentar os títulos de anticorpos específicos em mais de 5 vezes e a proliferação de linfócitos CD4+ específicos em mais de 6 vezes.

Com relação ao alginato de sódio alguns trabalhos mostram que micropartículas de alginato são internalizadas por células M da mucosa (Periwal *et al.*, 1997) e induzem uma resposta imune sistêmica e nas mucosas numa variedade de espécies animais após a administração oral (Bowersock *et al.*, 1996). Além disso, micropartículas de alginato podem servir não apenas como sistema carreador, mas também como adjuvante, já que tem sido mostrado que o alginato induz a produção de citocinas como TNF- α , IL-6, e IL-1 (Fujihara e Nagumo, 1993) e aumenta a produção de anticorpos semelhante a outros adjuvantes tais como o adjuvante incompleto de Freund e o hidróxido de alumínio (Bowersock *et al.*, 1996).

A última análise foi o perfil protetor dessas formulações contra a infecção do *S. mansoni*. As análises foram feitas comparando-se os vermes recuperados em cada grupo com o grupo controle salina. Os grupos imunizados intramuscular tanto com a proteína SmRho quanto com o DNA, associados às nanopartículas, não apresentaram uma redução significativa na recuperação dos vermes. Isso nos mostra, que apesar da grande quantidade de anticorpos produzidos pelo grupo CH-Rho-Alg(intramuscular) essa resposta não está diretamente relacionada com a proteção contra a infecção. Entre os grupos imunizados via oral, apenas os grupos DNA e Rho1-GTPase recombinante, e o grupo CHimi-DNA, não apresentaram uma proteção significativa. Todos os demais grupos apresentaram uma porcentagem de proteção superior a 45%, o que novamente mostra que apenas a produção de anticorpos não determina um bom perfil protetor, já que a maioria dos grupos imunizados oralmente apresentou uma baixa produção de anticorpos.

Notavelmente, os grupos imunizados com as partículas de quitosana, e quitosana-CpG apresentaram também um perfil significativo de proteção. Esse dado nos leva a inferir que o papel adjuvante dessas moléculas pode ativar uma resposta imune inata importante na proteção contra a infecção. Um trabalho recentemente realizado por Aldridge e colaboradores (2010) mostra que o CpG é capaz de estimular uma imunidade protetora em camundongos imunizados com larvas de *Taenia crassiceps*. Neste estudo, os camundongos foram tratados com CpG para determinar quando a estimulação de uma resposta inata inflamatória poderia conferir uma resistência ao crescimento da larva. As fêmeas tratadas mostraram uma redução de 54% enquanto os machos apresentaram 73% de redução do número de larvas. Além disso o trabalho mostra o papel importante de macrófagos e neutrófilos na indução da proteção. Em relação à quitosana e ao alginato, ainda não existem trabalhos abordando o papel desses polímeros nesse contexto, sendo que mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Finalmente, os grupos que mais se destacaram na redução da recuperação dos vermes foram os grupos quitosana-proteína-alginato, com 55% de proteção, e o grupo que combinava as nanopartículas de quitosana-CpG-proteína-alginato e as nanopartículas de quitosana-DNA, que obteve 57% de proteção. Esse último grupo vem atendendo às expectativas, pois apresentou uma considerável produção de anticorpos e também um bom perfil protetor. Análises posteriores de outros parâmetros como a redução do tamanho do granuloma, a contagem dos ovos recuperados e o perfil de citocinas, poderá fornecer mais informações a respeito do real potencial dessa formulação como um candidato vacinal para a esquistossomose.

Dessa forma, embora a imunização com as formulações via oral não tenha produzido altos níveis de anticorpos, a maioria apresentou um bom perfil protetor, sendo que a busca por uma vacina contra a esquistossomose visa alcançar um perfil protetor, que diminua os índices de infecção, mas que por outro lado também seja imunomodulador, de forma a diminuir a patologia gerada pelos granulomas. Ainda que o alcance desse objetivos seja um grande desafio, é importante destacar que a utilização das nanopartículas como sistemas carreadores de vacinas possuem um amplo potencial a ser explorado, inclusive pelas suas propriedades adjuvantes, que as tornam úteis também na imunização pelas vias parenterais. Diante disso, mais estudos devem ser realizados a fim de se encontrar uma vacina efetiva, sendo por este mecanismo ou por outro, para a esquistossomose e também para outras doenças que causam um desequilíbrio no sistema imune.

6 CONCLUSÕES

- As nanopartículas de quitosana foram eficientes na complexação do DNA e apresentaram um tamanho e potencial zeta adequados para sua utilização como formulação vacinal via oral, além de apresentarem-se resistentes às interferências externas dos meios que simulam o fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF);
- A encapsulação da proteína SmRho pelas nanopartículas de quitosana também foi eficiente, obtendo cerca de 94% de eficiência antes e 76% após o revestimento;
- As nanopartículas de quitosana-proteína-alginato também apresentaram características favoráveis à sua utilização como sistema carreador vacinal, como tamanho e potencial zeta adequados, e pouca dessorção da proteína quando submetidos aos meios SGF e SIF, por diferentes períodos de tempo;
- Os animais imunizados com a formulação quitosana-proteína-alginato via intramuscular, apresentaram uma produção de altos níveis de anticorpos, tanto IgG1 quanto IgG2a, caracterizando uma resposta de perfil misto Th1/Th2;
- Os grupos imunizados via intramuscular não apresentaram redução significativa na recuperação dos vermes;
- A formulação que apresentou melhores resultados, de forma geral, foi aquela em que se combinou nanopartículas de quitosana-CpG-proteína-alginato e com as nanopartículas de quitosana-DNA, pois os animais imunizados apresentaram uma considerável produção de anticorpos e ainda apresentaram a maior porcentagem de proteção, que foi de 57%.

7 PERSPECTIVAS

- Analisar os cortes histológicos dos granulomas formados em cada grupo imunizado e infectado, avaliar número e tamanho;
- Realizar a contagem dos ovos após a digestão de parte do fígado retirado dos animais imunizados e infectados, e comparar com os dados do granuloma;
- Avaliar o perfil de proliferação dos esplenócitos frente aos estímulos da SmRho recombinante e SWAP, além dos controles positivo e negativo, Concavalina A e meio de cultura, respectivamente;
- Avaliar o perfil de citocinas produzido pelos esplenócitos frente aos estímulos SmRho, SWAP e SEA, além do controle meio de cultura;
- Correlacionar os resultados a fim de selecionar um(s) candidato(s) com maior(es) potencial(is) vacinal(is) e realizar estudos que complementem os resultados até então alcançados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldridge, J. R., E. C. Johnson, *et al.* CpG stimulates protective immunity In Balb/cJ mice infected with larval *Taenia crassiceps*. J Parasitol, v.96, n.5, p.920-928. 2010.

Amidi, M., S. Romeijn, *et al.* N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. Vaccine, v.25, p.144 - 153. 2007.

Andrade, Z. A. e E. Van Marck. Schistosomal glomerular disease (a review). Mem Inst Oswaldo Cruz, v.79, p.499-506. 1984.

Ann Clark, M., H. Blair, *et al.* Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells. Vaccine, v.20, n.1-2, p.208-217. 2001.

Azad, N. e Y. Rojanasakul. Vaccine Delivery - Current Trends and Future. Curr Drug Deliv, v.10, p.137-146 2006.

Baras, B., M. Benoit, *et al.* Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a *Schistosoma mansoni* antigen. Infect. Immun., v.67, n.5, May 1, 1999, p.2643-2648. 1999.

Belkaid, Y. e B. T. Rouse. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat Immunol, v.6, n.4, p.353-360. 2005.

Berggren, W. L. e T. H. Weller. Immuno-electrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma Mansoni*. Am J Trop Med Hyg, v.16, n.5, September 1, 1967, p.606-612. 1967.

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

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

Bivas-Benita, M., M. Laloup, *et al.* Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. Int J Pharm, v.266, n.1-2, p.17-27. 2003.

Borges, O., G. Borchard, *et al.* Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. Int J Pharm, v.299, p.155 - 166. 2005.

Borges, O. M. F. O uso de nanopartículas de quitosano, revestidas com alginato como adjuvante do antigénio da hepatite B na vacinação através das mucosas oral e nasal. Tese de doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra - Portugal, 2007.

Boros, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. Clin. Microbiol. Rev., v.2, n.3, July 1, 1989, p.250-269. 1989.

Boros, D. L. e K. S. Warren. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. J Exp Med, v.132, n.3, p.488–507. 1970.

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, p.361-369. 1995.

Bowersock, T. L., H. Hogenesch, *et al.* Oral vaccination with alginate microsphere systems. J Control Release, v.39, n.2-3, p.209-220. 1996.

Caldas, I., R. Correa-Oliveira, *et al.* Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. Am J Trop Med Hyg, v.62, n.1, January 1, 2000, p.57-64. 2000.

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

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

Chen, L., J. M. Mccrate, *et al.* The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. Nanotechnology, v.22, n.10, p.105708. 2011.

Chensue, S. W. e D. L. Boros. Population dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation, and granulomas of mice infected with *Schistosoma Mansoni*. Am J Trop Med Hyg, v.28, n.2, March 1, 1979, p.291-299. 1979.

Chew, J.L., Wolfowicz, C.B., *et al.* Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen, Der p 1 for oral vaccination in mice. Vaccine 21, 2720-2729. 2003.

Chikh, G., S. D. De Jong, *et al.* Synthetic methylated CpG ODNs are potent in vivo adjuvants when delivered in liposomal nanoparticles. Int Immunol, v.21, n.7, July 1, 2009, p.757-767. 2009.

Chopra, S., S. Mahdi, *et al.* Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. J Pharm Pharmacol, v.58, n.8, p.1021-1032. 2006.

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

Coppi, G., V. Iannuccelli, *et al.* Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. J Microencapsul, v.19, n.1, p.37-44. 2002.

Corrêa-Oliveira, R., I. R. Caldas, *et al.* Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. Acta Trop, v.77, n.1, p.141-146. 2000.

Corrêa-Oliveira, R., L. Malaquias, *et al.* Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. Braz J Med Biol Res, v.31, n.1, p.171-7. 1998.

Coura, J. e R. Amaral. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, p.13-19. 2004.

Cui, Z. e R. Mumper. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. J Control Release, v.75, p.409 - 419. 2001.

Dalton, J. P., P. J. Brindley, *et al.* Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. Int J Parasitol, v.33, n.5-6, p.621-640. 2003.

Davis, H. L., R. Weeranta, *et al.* CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. J Immunol, v.160, n.2, January 15, 1998, p.870-876. 1998.

De Alzpurua, H. J. e G. J. Russeljones. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. J. Exp. Med., v.167, p.440-451. 1998.

De Jesus, A., A. Silva, *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute Schistosomiasis mansoni. J Infect Dis, v.185, n.1, January 1, 2002, p.98-105. 2002.

De Jong, S., G. Chikh, *et al.* Encapsulation in liposomal nanoparticles enhances the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG ODN. Cancer Immunol Immun, v.56, n.8, p.1251-1264. 2007.

De Magistris, M. T. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. Adv Drug Deliv Rev, v.58, n.1, p.52-67. 2006.

De Vos P, H. e B. H. Cg. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. J Biomed Mater Res, v.60, n.2, p.253-259. 2002.

Dent, L., G. Munro, *et al.* Eosinophilic interleukin 5 (IL-5) transgenic mice: eosinophil activity and impaired clearance of *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol, v.19, n.7, p.291-300. 1997.

Doenhoff, M., R. Musallam, *et al.* *Schistosoma mansoni* infections in T-cell deprived mice, and the ameliorating effect of administering homologous chronic infection serum: I. Pathogenesis. Am J Trop Med Hyg, v.28, n.2, March 1, 1979, p.260-273. 1979.

Douce, G., M. Fontana, *et al.* Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. Infect Immun, v.65, n.7, p.2821-8. 1997.

Douce, G., C. Turcotte, *et al.* Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. P Natl Acad Sci USA, v.92, n.5, February 28, 1995, p.1644-1648. 1995.

El-Garem, A. A. Schistosomiasis. Digestion, v.59, n.5, p.589-605. 1998.

Esquisabel, A., R. M. Hernandez, *et al.* Effect of lecithins on BCG-alginate-PLL microcapsule particle size and stability upon storage. J Microencapsul, v.17, n.3, p.363-372. 2000.

Foster, N. e B. H. Hirst. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. Adv Drug Deliv Rev, v.57, n.3, p.431-450. 2005.

Fujihara, M. e T. Nagumo. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. Carbohydr Res, v.243, n.1, p.211-216. 1993.

Gallichan, W. S., R. N. Woolstencroft, *et al.* Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against Herpes simplex virus-2 in the genital tract. J Immunol, v.166, n.5, March 1, 2001, p.3451-3457. 2001.

Gao, H., W. Shi, *et al.* Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *P Natl Acad Sci USA*, v.102, p.9469-9474. 2005.

Garg, N. K., S. Mangal, *et al.* Mucosal Delivery of Vaccines: Role of Mucoadhesive/Biodegradable Polymers *Recent Pat Drug Deliv Formul*, v.4, n.2, p.114-128. 2010.

Gazzinelli, G., M. Montesano, *et al.* Immune response in different clinical groups of Schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.82, p.95-100. 1987.

George, M., e Abraham, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan -- a review. *J Control Release* 114, 1-14. 2006.

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

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. *Immunology Letters*, v.28, n.1, p.57-63. 1991.

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

González Ferreiro, M., L. Tillman, *et al.* Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. *Int J Pharm*, v.239, n.1-2, p.47-59. 2002.

Gordon, R. M. e R. B. Griffiths. Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of morphological changes observed in the newly penetrated larvae. *Am Trop Med Parasitol*, v.45, p.227-243. 1951.

Hamdy, S., P. Elamanchili, *et al.* Enhanced antigen-specific primary CD4⁺ and CD8⁺ responses by codelivery of ovalbumin and toll-like receptor ligand monophosphoryl lipid A in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, v.81A, n.3, p.652-662. 2007.

Hamdy, S., O. Molavi, *et al.* Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine*, v.26, n.39, p.5046-5057. 2008.

Hejazi, R., e Amiji, M. Stomach-specific anti-H. pylori therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. Int J Pharm 235, 87-94. 2002.

Hesse, M., C. A. Piccirillo, *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. J Immunol, v.172, n.5, March 1, 2004, p.3157-3166. 2004.

Hoffmann, K. F., A. W. Cheever, *et al.* IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. J Immunol, v.164, n.12, June 15, 2000, p.6406-6416. 2000.

Holmgren, J. e C. Czerkinsky. Mucosal immunity and vaccines. Nat Med, v.11, p.45-53. 2005.

Hotez, P.J., Bethony, J.M., *et al.* Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. Nat Rev Micro v.8, p. 814-826. 2010

Hu, F., M. Zhao, *et al.* A novel chitosan oligosaccharide-stearic acid micelles for gene delivery: Properties and in vitro transfection studies. Int J Pharm, v.315, n.1-2, p.158-166. 2006.

Ilium, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm Res, v.15, n.9, p.1326-1331. 1998.

Jabbal-Gill, I., W. Lin, *et al.* Potential of polymeric lamellar substrate particles (PLSP) as adjuvants for vaccines. Vaccine, v.18, n.3-4, p.238-250. 1999.

Jassim, A., K. Hassan, *et al.* Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. Parasite Immunol, v.9, n.6, p.627-50. 1987.

Jiang, X., H. Dai, *et al.* Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions. J Gene Med, v.8, n.4, p.477-487. 2006.

Kampf, N., C. Zohar, *et al.* Alginate coating of *Xenopus laevis* embryos. Biotechnol Progr, v.16, n.3, p.497-505. 2000.

Katz, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. Rev Soc Bras Med Trop, v.32, p.705-711. 1999.

Khalife, J., M. Capron, *et al.* Immunity in human schistosomiasis mansoni: regulation of protective immune mechanism by IgM blocking antibodies. J Exp Med, v.164, n.5, p.1626-1640. 1986.

- King, C. H. Toward the elimination of schistosomiasis. New Engl J Med, v.360, n.2, p.106-109. 2009.
- King, C. H., K. Dickman, *et al.* Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. The Lancet, v.365, n.9470, p.1561-1569. 2005.
- Kjøller, L. e A. Hall. Signaling to Rho GTPases. Exp Cell Res, v.253, n.1, p.166-179. 1999.
- Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. Nat Rev Immunol, v.4, n.4, p.249-259. 2004.
- Krieg, A. M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.6, p.471-484. 2006.
- Krug, A., S. Rothenfusser, *et al.* Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α/β in plasmacytoid dendritic cells. European Journal of Immunology, v.31, n.7, p.2154-2163. 2001.
- Kulkarni, A. R., K. S. Soppimath, *et al.* In-vitro release kinetics of cefadroxil-loaded sodium alginate interpenetrating network beads. Eur J Pharm Biopharm, v.51, n.2, p.127-133. 2001.
- Lebens, M., J. Sun, *et al.* A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection. Vaccine, v.21, n.5-6, p.514-520. 2003.
- Li, G., Liu, Z., *et al.* Induction of Th1-type immune response by chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen Der p 2 for oral vaccination in mice. Cell Mol Immunol v.6, p.45-50. 2009.
- Li, X., X. Kong, *et al.* Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. BMC Biotechnol, v.8, n.1, p.89. 2008.
- Liu, W. G., X. Zhang, *et al.* N-alkylated chitosan as a potential nonviral vector for gene transfection. Bioconjugate Chem, v.14, n.4, p.782-789. 2003.
- Loeffler, I. K. e J. L. Bennett. A rab-related GTP-binding protein in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v.77, n.1, p.31-40. 1996.

Look, M., A. Bandyopadhyay, *et al.* Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world. Adv Drug Deliv Rev, v.62, n.4-5, p.378-393. 2010.

Lubben, M., G. Kersten, *et al.* Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Vaccine, v.21, p.1400 - 1408. 2003.

Lydyard, P. e C. Grossi. The lymphoid system. London: Mosby. 1998 (Immunology)

Malkevitch, N. V. e M. Robert-Guroff. A call for replicating vector prime-protein boost strategies in HIV vaccine design. Expert Rev Vaccines, v.3, p.105-17. 2004.

Mansouri, S., P. Lavigne, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. Eur J Pharm Biopharm, v.57, n.1, p.1-8. 2004.

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

Mao, S., W. Sun, *et al.* Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. Adv Drug Deliv Rev, v.62, n.1, p.12-27. 2010.

Marshall, J. D., K. L. Fearon, *et al.* Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species. DNA Cell Biol, v.24, n.2, p.63-72. 2005.

Martins-Filho, O. A., J. R. Cunha-Melo, *et al.* Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. Digest Dis Sci, v.44, n.3, p.570-577. 1999.

Masotti, A. e O. G. Chitosan micro- and nanospheres: fabrication and applications for drug and DNA delivery. Mini Rev Med Chem, v.9, n.4, p.463-9. 2009.

Masotti, A. e G. Ortaggi. Chitosan micro- and nanospheres: fabrication and applications for drug and DNA delivery. Mini Rev Med Chem, v.9, n.4, p.463-9. 2009.

Mccluskie, M. J. e H. L. Davis. Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. Vaccine, v.19, n.4-5, p.413-422. 2000.

Mccluskie, M. J. e R. D. Weeratna. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants. 2006 (Immunopotentiators in modern vaccines)

Mccluskie, M. J., R. D. Weeratna, *et al.* CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. Vaccine, v.19, n.7-8, p.950-957. 2000.

Mccluskie, M. J., R. D. Weeratna, *et al.* Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. FEMS Immunol Med Mic, v.32, n.3, p.179-185. 2002.

Mcmanus, D. P. e A. Loukas. Current status of vaccines for schistosomiasis. Clin. Microbiol. Rev., v.21, n.1, January 1, 2008, p.225-242. 2008.

Mi, F., S. Shyu, *et al.* Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. Biomaterials, v.20, n.17, p.1603-1612. 1999.

Milhon, J. L. e J. W. Tracy. Updated codon usage in *Schistosoma*. Exp Parasitol, v.80, n.2, p.353-356. 1995.

Miller, P. e R. A. Wilson. Migration of schistosomulum of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. Parasitology, v.77, n.3, p.281-302. 1978.

Mishra, N., A. K. Goyal, *et al.* Recent advances in mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymeric carriers. Expert Opin Ther Pat, v.20, n.5, p.661-679. 2010.

Montenegro, S. M. L., P. Miranda, *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. J Infect Dis, v.179, n.6, June 1, 1999, p.1502-1514. 1999.

Moreira-Filho, C. A., C. F. M. Menck, *et al.* Genômica. São Paulo: Atheneu. 2004

Moreira, C., H. Oliveira, *et al.* Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. Acta Biomater, v.5, n.8, p.2995-3006. 2009.

Naz, R. e P. Dabir. Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. Front Biosci, v.1, n.12, p.1833-44. 2007.

Neutra, M. R. e P. A. Kozlowski. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nat Rev Immunol, v.6, n.2, p.148-158. 2006.

Neves, D. P. Parasitologia Humana. Rio de Janeiro: Atheneu. 2005

- Novato-Silva E, Gazzinelli G, *et al.* Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. Scand J Immunol., v.35, n.4, p.429-37. 1992.
- Novy, R., D. Drott, *et al.* Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. Newsletter of Novagen. 12 2001.
- O'hagan, D. T. e R. Rappuoli. Novel approaches to vaccine delivery. Pharm Res, v.21, n.9, p.1519-1530. 2004.
- Oliveira, S. C., C. T. Fonseca, *et al.* Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. Acta Trop, v.108, n.2-3, p.256-262. 2008.
- Osman, A., Niles, E. G., *et al.* Characterization of the Ras homologue of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 100, 27-41. 1999.
- Pacífico, L. G., C. T. Fonseca, *et al.* Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter interleukin-10 production. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101, p.365-368. 2006.
- 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. P Natl Acad Sci USA, v.85, n.15, August 1, 1988, p.5678-5682. 1988.
- Pearce, E. J. e A. S. Macdonald. The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol, v.2, n.7, p.499-511. 2002.
- Periwal, S. B., T. J. Speaker, *et al.* Orally administered microencapsulated reovirus can bypass suckled, neutralizing maternal antibody that inhibits active immunization of neonates. J Virology, v.71, n.4, p.2844-2850. 1997.
- Phillips, S. M. e P. J. Lammie. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. Parasitol Today, v.2, n.11, p.296-302. 1986.
- Plotkin, S. A. Vaccines: past, present and future. Nat Med. 2005.
- Prata, A. Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, v.41, p.689-691. 2008.
- Prego, C., D. Torres, *et al.* The potential of chitosan for the oral administration of peptides. Expert Opin Drug Del, v.2, n.5, p.843-854. 2005.

Purcell, A. W., J. McCluskey, *et al.* More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. Nat Rev Drug Discov, v.6, n.5, p.404-414. 2007.

Rebelatto, M. C., P. Guimond, *et al.* Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles. Vet Immunol Immunop, v.83, n.1-2, p.93-105. 2001.

Reiman, R. M., R. W. Thompson, *et al.* Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. Infect. Immun., v.74, n.3, March 1, 2006, p.1471-1479. 2006.

Rey, L. Parasitologia: parasitos e doenças. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008

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, 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, p.3995-4001. 1992.

Ribeiro De Jesus, A., A. Magalhaes, *et al.* Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. Infect Immun, v.72, n.6, June 1, 2004, p.3391-3397. 2004.

Rieux, A., E. G. E. Ragnarsson, *et al.* Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. Eur J Pharm Sci, v.25, n.4-5, p.455-465. 2005.

Roberts, M., A. E. Butterworth, *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. Infect. Immun., v.61, n.12, December 1, 1993, p.4984-4993. 1993.

Roy, K., H. Q. Mao, *et al.* Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. Nat Med, v.5, n.4, p.387-391. 1999.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular Cloning - A laboratory manual plainview. 1989

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

Santos, T. M., C. R. Machado, *et al.* Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. Mol Biochem Parasitol, v.125, n.1-2, p.103-112. 2002.

Schüssler, P., C. 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, p.629-34. 1997.

Silva-Teixeira, D., B. Doughty, *et al.* Human schistosomiasis: modulation of in vitro granulomatous hypersensitivity and lymphocyte proliferative response by macrophages undergoing differentiation. Scand J Immunol., v.44, n.5, p.522-9. 1996.

Singla, A. K. e M. Chawla. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. J Pharm Pharmacol, v.53, n.8, p.1047-1067. 2001.

Smithers, S. R. Recent advances in the immunology of schistosomiasis. Brit Med Bull, v.28, n.1, January 1, 1972, 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, p.695-700. 1965.

Soisson, L. M. A., 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, p.3612-3620. 1992.

Stenger, R. J., K. S. Warren, *et al.* An ultrastructural study of hepatic granulomas and schistosome egg shells in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Exp Mol Pathol, v.7, n.1, p.116-132. 1967.

Sturrock, R. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? Mem Inst Oswaldo Cruz, v.96, 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. P Natl Acad Sci USA, v.93, n.1, January 9, 1996, p.269-273. 1996.

Thanou, M., B. I. Florea, *et al.* Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. Biomaterials, v.23, n.1, p.153-159. 2002.

Tønnesen, H. H. e J. Karlsen. Alginate in Drug Delivery Systems. Drug Dev Ind Pharm, v.28, n.6, p.621-630. 2002.

- Van Der Kleij, D., E. Latz, *et al.* A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. J Biol Chem, v.277, n.50, December 13, 2002, p.48122-48129. 2002.
- Van Der Werf, M. J., S. J. De Vlas, *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. Acta Trop, v.86, n.2-3, p.125-139. 2003.
- Vermeire, J. J., A. Osman, *et al.* Characterisation of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol, v.33, n.7, p.721-731. 2003.
- Viana, I., A. Sher, *et al.* Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.88, n.4, p.466-70. 1994.
- Von Lichtenberg, F. V. Host response to eggs of *Schistosoma mansoni*. I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. Am J Pathol, v.41, p.711-731. 1962.
- Warren, K. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: *in vivo* models. Immunol Rev, v.61, p.189-213. 1982.
- Warren, K. S. Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology? J Infect Dis, v.127, n.5, May 1, 1973, p.595-609. 1973.
- Warren, K. S. e E. O. Domingo. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am J Pathol, v.51, n.5, p.735-743. 1967.
- Wilson, M. S., M. M. Mentink-Kane, *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. Immunol Cell Biol, v.85, n.2, p.148-154. 2007.
- Wilson, R. A. e P. S. Coulson. Schistosome vaccines: a critical appraisal. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101, p.13-20. 2006.
- World Health Organization (Who). Schistosomiasis. F. D. I. 115 2010.
- Wynn, T. A., A. W. Cheever, *et al.* IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. J Immunol, v.160, n.9, May 1, 1998, p.4473-4480. 1998.
- Zaharoff, D. A., C. J. Rogers, *et al.* Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. Vaccine, v.25, n.11, p.2085-2094. 2007.

Zhang, H., S. Mardyani, *et al.* Design of biocompatible chitosan microgels for targeted pH-mediated intracellular release of cancer therapeutics. Biomacromolecules, v.7, n.5, p.1568-1572. 2006.

Zhang, W., G. Ahmad, *et al.* Sm-p80-based DNA vaccine made in a human use approved vector VR1020 protects against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mouse. Parasite Immunol, v.32, n.4, p.252-258. 2010.