

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÕES MOLECULAR E IMUNOLÓGICA  
PARCIAIS DAS PROTEÍNAS rP22 E rP44 DE *Schistosoma mansoni*  
E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PROTETORA NA  
ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

CÍNTIA MARTINS FAGUNDES REZENDE

CÍNTIA MARTINS FAGUNDES REZENDE

Tese de doutorado

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DAS  
PROTEÍNAS rP22 E rP44 DE *Schistosoma mansoni* E AVALIAÇÃO  
DA RESPOSTA PROTETORA NA ESQUISTOSSOMOSE  
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao colegiado do curso de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

2011

CÍNTIA MARTINS FAGUNDES REZENDE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DAS  
PROTEÍNAS rP22 E rP44 DE *Schistosoma mansoni* E AVALIAÇÃO  
DA RESPOSTA PROTETORA NA ESQUISTOSSOMOSE  
EXPERIMENTAL**

ORIENTADOR: DR. ALFREDO MIRANDA DE GÓES

Belo Horizonte

2011

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes, com o suporte das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG

E dos colaboradores:

Dr. Dawidson Assis Gomes<sup>1</sup>

Dr. Ronaldo Nagem<sup>2</sup>

Dra. Gerluza A. B. Silva<sup>3</sup>

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular II – UFMG

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Estrutural– UFMG

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia do Desenvolvimento– UFMG

<sup>4</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular - Centro de Pesquisas René Rachou

*"A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que  
deve fazer do seu próprio conhecimento."*

*Platão*

Dedico este trabalho aos meus pais, Célia e Aderval, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los.

A você Wagner, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias.

## **Agradecimentos**

---

Agradecimentos

Registro meus agradecimentos a todos os que compartilharam o trilhar de mais esse caminho percorrido, contribuindo, direta ou indiretamente, para que eu realizasse esta pesquisa, auxiliando-me e dando-me forças nos momentos em que mais precisei.

Minha gratidão, em primeiro lugar, a Deus, por estar comigo em todos os momentos iluminando-me, sendo meu refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis. A ele, minha eterna gratidão.

Agradeço, especialmente, à minha família, pelo apoio para que eu concretizasse essa pesquisa: minha mãe, meu pai, e minha irmã que foram incansáveis; e, em especial, meu esposo, Wagner, meu amor único e verdadeiro, que esteve sempre ao meu lado, entendendo-me nos momentos de ausência, dando-me apoio e carinho.

Ao professor Alfredo Góes, por todo apoio intelectual e moral. Pela oportunidade de crescimento a que me foi dada. Por tudo que me ensinou ao longo desses anos sobre a vida acadêmica e sobre a vida de verdade. Pelo carinho e compreensão diante das minhas faltas. Por ser o “chefinho” mais querido que já tive e que eu ainda vou ter, com certeza!!! Obrigada!!!

À Marina, pelo exemplo de “filha” e de amiga! Por estar sempre ao meu lado me apoiando. Pelas risadas, pelas lágrimas, pelos sucessos e pelos tropeços que fazem parte da caminhada. Dizem que os filhos ensinam lições inesquecíveis aos pais e você, com certeza, me ensinou o sentido da amizade verdadeira!!! Obrigada, filhota, amo você!!!

Agradeço à Betinha, minha amiga e exemplo de luta e amor!! Pela ligação de afeto que foi construída ao longo desses anos e que se fortalece a cada dia. Pela doçura de um brigadeiro, pelo carinho de um bombom de morango que alegra o espírito de todos do LICM. Por todo o apoio técnico no laboratório e no biotério!!

## ***Agradecimentos***

---

Ao Professor Dawidson Gomes pelo exemplo de esforço e de humildade. Por sempre estar disponível para me ajudar. Por me passar tantos ensinamentos e experiências. Pela ajuda nos experimentos de microscopia confocal. Pela parceria, amizade sincera e pelos bons conselhos!!

Ao Professor Ronaldo Nagem pela colaboração nos experimentos de purificação de proteínas, DC e DLS. Pelo entusiasmo que nos contagia sempre!

À Juliana Barboza, minha querida Juju, por toda a disponibilidade e cooperação, nos experimentos de purificação de proteínas, mas, principalmente pelo carinho e amizade.

À Professora Gerluzia Silva, por disponibilizar o seu laboratório conosco do LICM, pela colaboração na confecção e fotodocumentação dos cortes histológicos.

Ao Francisco e à Íria, do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, por todo o apoio técnico na confecção e na fotodocumentação dos cortes histológicos. Pela amizade e pela disponibilidade.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira por fornecer os plasmas dos pacientes de área endêmica e à Dra Roberta Prado por ter fornecido os dados dos pacientes utilizados na pesquisa.

À Peu, por todo o apoio técnico nos experimentos de infecção e perfusão dos animais e pelos cuidados com o biotério. Pelos momentos de apoio e compreensão.

Ao Jamil, por disponibilizar reagentes e equipamentos em seu laboratório. Pela convivência tão agradável e alegre.

À Frank, Josy, Magda e Andrezza, do Laboratório de Imunobiologia, pelo apoio nos experimentos com animais e células.



## ***Agradecimentos***

---

À Adriana Bozzi, mais conhecida como Dri, pela amizade, pelo carinho, por perdoar os meus tropeços e ausências. Por ter me dado a oportunidade de ter a Marina como aluna e filha.

Ao Tércio pela amizade e pelos conselhos. Por me ensinar e me ajudar a entender o mundo da Biomol.

À Estefânia e Elis, por todo o carinho e apoio nas horas difíceis. Pelas conversas confortadoras, sempre repletas de palavras de encorajamento e força. Pela parceria nos longos experimentos com animais e células. Meu sincero agradecimento!

À Carol Reis, minha amiga e parceira de Schisto. Por todas as horas de alegria, de trabalho compartilhado, de apoio e carinho.

À Carol Angelis, a doçura em pessoa, por ser uma amiga formidável! Pelo apoio nos experimentos finais e pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Alessandra e Josy, amigas do peito, por estarem sempre ao meu lado. Por me apoiarem nos momentos difíceis da luta e por dividirem comigo tantos momentos de bons da vida!

À Nat, Luíza, Cris e Vivi Cristina, por serem as amigas mais divertidas que eu conheço. Pela alegria descontrolada, pela amizade que arrebatava a todos e pela luz que irradiam. Obrigada por tudo!!!

Aos amigos de Bases I e II por toda a amizade e carinho que ultrapassaram as portas da Baeta e continuaram se fortalecendo na convivência diária do departamento.

À Camila, por todo apoio que me deu nos experimentos de spot-síntese e também na correção da tese. Pela disposição em ajudar sempre e pela amizade.

À Celise e Grazi, por resolverem todos os assuntos relacionados à secretaria da pós-graduação.

## ***Agradecimentos***

---

Aos amigos do LICM de agora e de muitos anos, por tantos momentos de alegria compartilhados. Pelo aprendizado em conjunto. Por aceitarem as minhas limitações e me ensinarem tanto sobre tudo!!! À Cris, Tércio, Dri, Marina, Vivi Cristina, Natália, Vivi Gomide, Luíza, Alessandra, Silviene, Caryninha, Tetê, Elis, Carol Reis, Ju Lott, Juju Barboza, Maira, Naira, Carol Angelis, Josy, Alexandra, Ana Cláudia, Thaís, Betinha, Michele, Natássia, Mário, Paula, Débora, Luara, Jankerle, Fátima, Rafaela, Jonas, Marcela, Anne, Verônica, Carol Andrade, Carol Melo, Jerusa, Pedro, Carol Assis, Eliza, Mariana, Laura, Arthur, Bruno. Obrigada!!!

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	XIV
<b>Lista de Figuras</b> .....	XVII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	XX
<b>Resumo</b> .....	XXI
<b>Abstract</b> .....	XXIII
<b>I – Introdução</b> .....	1
1.1 A esquistossomose.....	2
1.2 A esquistossomose mansônica: agente etiológico e ciclo de vida.....	4
1.3 Patologia da esquistossomose mansônica no hospedeiro definitivo.....	6
1.4 A inflamação e a formação do granuloma.....	8
1.5 Resposta imune na esquistossomose .....	12
1.5.1 Resposta imune inata.....	13
1.5.2 Resposta imune adaptativa.....	15
1.6 O papel do tegumento do <i>Schistosoma</i> na interação parasita-hospedeiro.....	20
1.7 Estratégias de controle da esquistossomose: o desenvolvimento de vacinas.....	24
1.8 Identificação de epítomos representativos de proteínas de interesse.....	27
1.9 A fração PIII e seus componentes: atividade protetora e imunomoduladora na esquistossomose experimental.....	30
1.10 As proteínas rP22 e rP44 recombinantes de <i>S. mansoni</i> .....	32
<b>II – Justificativa</b> .....	35
<b>III – Objetivos</b> .....	38
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
<b>IV – Materiais e Métodos</b> .....	40
4.1 Amplificação das sequências gênicas das proteínas rP22 e da rP44.....	41
4.2 Construção dos plasmídeos recombinantes pET-DEST42-rP22 e pET-DEST42-rP44.....	45
4.3 Sequenciamento dos fragmentos inseridos nos vetores pET-DEST42-rP22 e pET-DEST42-rP44.....	47
4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	48

4.5	Mini-Expressão das proteínas rP22 e rP44.....	48
4.6	Eletroforese em gel de Poliacrilamida - SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	49
4.7	Eletrotransferência de proteínas – “Western blot”.....	50
4.8	Expressão das proteínas recombinantes rP22 e rP44.....	51
4.9	Purificação das proteínas rP22 e rP44 em coluna His Trap HP.....	52
4.10	Determinação da concentração de proteínas.....	52
4.11	Espalhamento dinâmico da luz (DLS – <i>dynamic light scattering</i> ) da proteína rP22.....	53
4.12	Estudos de estrutura secundária da proteína rP22 por Dicroísmo circular (CD – <i>circular dichroism</i> ).....	54
4.13	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	55
4.13.1	Camundongos e coelhos.....	55
4.13.2	Cercárias.....	55
4.14	Preparação antigênica solúvel de verme adulto (SWAP).....	56
4.15	Obtenção de soro de coelho imunizado com a proteína rP22.....	56
4.16	Imunolocalização da proteína rP22 por microscopia confocal.....	56
4.17	Imunização de camundongos e infecção desafio.....	57
4.18	Recuperação de Vermes Adultos.....	59
4.19	Determinação do número de ovos retidos no tecido hepático.....	59
4.20	Medida da área do granuloma e da fibrose hepática.....	60
4.21	Ensaio de proliferação celular.....	60
4.22	Dosagem de citocinas.....	61
4.23	ELISA para determinação dos níveis de anticorpos.....	63
4.24	População de estudo.....	64
4.25	Predição de epítomos lineares de linfócitos B.....	65
4.26	Construção da membrana contendo os peptídeos selecionados da rP22 e rP44.....	66
4.27	Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana.....	66
4.28	Análise da reatividade dos spots.....	67
4.29	Regeneração da membrana.....	67
4.30	Localização dos peptídeos antigênicos nas estruturas tridimensionais.....	68
4.31	Análise Estatística usada para grupos de animais experimentais.....	68
<b>V</b>	<b>– Resultados</b> .....	<b>69</b>

PARTE I: OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	70
5.1 Clonagem dos genes codificadores das proteínas rP22 e rP44 de <i>S. mansoni</i> .....	70
5.2 Expressão das proteínas recombinantes.....	76
5.3 Purificação das proteínas recombinantes.....	78
5.4 Análise da estrutura secundária da rP22.....	79
5.5 Imunolocalização da rP22 por microscopia confocal.....	80
PARTE II: UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA FORMULAÇÃO DE UMA VACINA NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....	82
5.6 Determinação dos níveis de proteção.....	82
5.7 Efeito da imunização sobre o granuloma hepático.....	84
5.8 Perfil de citocinas induzido pela vacinação com as proteínas recombinantes.....	87
5.9 Efeito das proteínas recombinantes na proliferação celular.....	91
5.10 Avaliação da resposta imune humoral através de ELISA.....	93
PARTE III: PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES DE LINFÓCITOS B DAS PROTEÍNAS rP22 E rP44 RECOMBINANTES E AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS FRENTE AOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS.....	97
5.11 Predição de epítomos lineares de linfócitos B.....	97
5.12 Reatividade dos soros murinos aos componentes peptídicos de rP22 e rP44.....	99
5.13 Reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos epítomos preditos das proteínas estudadas.....	107
<b>VI – Discussão.....</b>	<b>113</b>
<b>VII – Conclusão.....</b>	<b>127</b>
<b>VIII – Perspectivas.....</b>	<b>129</b>
<b>IX – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>131</b>
<b>X – Anexos.....</b>	<b>167</b>
10.1 Apresentação de trabalhos em congressos.....	168
10.2 Certificado de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	170
10.3 Publicação de artigo científico.....	171

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADCC	(do inglês: “Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity”)
APC	(do inglês: “Antigen presenting cell”)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol
BMDC	Células dendríticas derivadas da medula óssea
BSA	(do inglês: “Bovine serum albumine”)
BLAST	(do inglês: “Basic Local Alignment Tool”)
CBS	Tampão citrato
CD	(do inglês: “cluster of differentiation”)
CD	(do inglês: “Circular dichroism”)
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
COEP	Comitê de ética em pesquisa
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
DAB	3,3’diaminobenzidina
DB	(do inglês: “Discoid bodies”)
DC	(do inglês: “Dendritic cell”)
DC-SIGN	(do inglês: “Dendritic cell-specific C-type lectin”)
DLS	(do inglês: “Dynamic light scattering”)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
DP	Grupo Duas Proteínas - grupo imunizado com rP22 e rP44
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (“Enzyme linked immunosorbent assay”)
Fmoc	Fluorenil metil oxicarbonila

## ***Lista de Abreviaturas***

---

Foxp3	(do inglês: “Forkhead box P3”)
GPI	Glicofosfatidilinositol
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	(do inglês: “Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid”)
HOBT	Hidroxibenzotriazol
HsALDOC	Frutose-fosfato aldolase C de <i>Homo sapiens</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -tio-D-galactopiranosídeo
LB	Meio Luria Bertani
LNFP	Lacto-N-Fucopentose
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MB	Corpo membranoso
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NLRP3	(do inglês: “NOD-like receptor containing pyrin domain”)
NCBI	(do inglês: “National Center for Biotechnology Information”)
NK	Célula natural killer
NO	Óxido nítrico
OPD	Ortofenilenodiamino
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células sanguíneas do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PIII	Fração protéica da preparação solúvel de vermes adultos
PMSF	(do inglês: “Phenylmethanesulfonylfluoride”)

## ***Lista de Abreviaturas***

---

PRR	Receptor de reconhecimento padrão
RLR	Receptores do tipo RIG (do inglês: “Retinoic acid-inducible gene like receptors”)
RN	Indivíduos naturalmente resistentes
RNA	Ácido ribonucléico
rP22	Proteína P22 recombinante
rP44	Proteína P44 recombinante
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletrofores em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SEA	Preparação Antigênica Solúvel de Ovo
SSA	Antígeno solúvel de esquistossômulo
SWAP	Preparação antigênica solúvel de verme adulto
TAE	Tampão acetato/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TGF- $\beta$	(do inglês: “Transforming growth factor beta”)
TH	Célula T auxiliar
Th1	Célula T auxiliardo tipo I
Th2	Célula T auxiliary do tipo II
TLR	Receptor do tipo Toll
TMB	(do inglês: “3,3',5,5'-tetramethylbenzidine”)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T reguladora
WHO	(do inglês: “World Health Organization”)



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1: Distribuição mundial das principais espécies causadoras da esquistossomose humana.....	2
Figura 2: Distribuição da esquistossomose de acordo com a prevalência da infecção humana no Brasil.....	4
Figura 3: O ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> .....	6
Figura 4: Principais componentes da resposta granulomatosa aos ovos de <i>Schistosoma</i> no fígado do hospedeiro definitivo e o papel das citocinas e quimiocinas que regulam essa resposta.....	12
Figura 5: Esquema do tegumento do <i>Schistosoma</i> e modelo hipotético de algumas das estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro.....	24
Figura 6: Representação da estrutura tridimensional da cadeia da frutose bifosfato aldolase C humana.....	34
Figura 7: Esquema representando as reações de recombinação BP e LR e os vetores envolvidos.....	42
Figura 8: Mapa molecular do plasmídeo pET-DEST42.	47
Figura 9: Géis de agarose 1% mostrando a amplificação das seqüências codificadoras da rP22 e rP44.....	70
Figura 10: Sequência nucleotídica e de aminoácidos do inserto de rP22....	71
Figura 11: Sequência nucleotídica e de aminoácidos do inserto de rP44....	72
Figura 12: Alinhamento entre as proteínas rP22 e Sm 21.7 de <i>S. mansoni</i> .	74
Figura 13: Alinhamento entre as proteínas rP44, frutose 1,6 bifosfato aldolase de <i>S. mansoni</i> (SmFBA) e frutose-bifostato aldolase C de <i>Homo sapiens</i> (HsALDOC).....	75
Figura 14: Géis de SDS-PAGE 10% corados por azul de Comassie, do perfil de expressão das proteínas rP22 e rP44.....	77

<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 15: Análise de <i>Western blot</i> da expressão das proteínas rP22 (A) e rP44(B) utilizando anticorpo anti-histidina.....	77
Figura 16: Gel de SDS-PAGE das proteínas purificadas rP44 e rP22.....	78
Figura 17: Análise de dicroísmo circular da rP22 (A-B) em diferentes temperaturas e análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS) (C).....	79
Figure 18: Ensaio de imunolocalização da proteína rP22 por microscopia confocal.....	81
Figura 19: Fotomicrografia dos granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 desafiados com 25 cercárias de <i>S. mansoni</i> , após 60 dias de infecção.....	85
Figura 20: Medida da área do granuloma e da área de fibrose hepática em camundongos C57BL/6 8 semanas após a infecção desafio.....	86
Figura 21: Nível de IFN- $\gamma$ presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas.....	88
Figura 22: Nível de TNF- $\alpha$ presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas.....	89
Figura 23: Nível de IL-4 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas.....	89
Figura 24: Nível de IL-10 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas.....	90

<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 25: Nível de TGF- $\beta$ presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas.....	90
Figura 26: Proliferação de esplenócitos induzida por antígenos de <i>S. mansoni</i> .....	92
Figura 27: Detecção de anticorpos anti-rP22 e anti-rP44 em soros de camundongos imunizados com antígenos de <i>S. mansoni</i> .....	94
Figura 28: Detecção de anticorpos anti-rP22 em soros de camundongos imunizados com antígenos de <i>S. mansoni</i> .....	95
Figura 29: Detecção de anticorpos anti-rP44 em soros de camundongos imunizados com antígenos de <i>S. mansoni</i> .....	96
Figura 30: Reatividade dos soros de camundongos aos peptídeos derivados da proteína rP22 após a imunização.....	100
Figura 31: Localização dos peptídeos mais reativos ao soro de animais imunizados com a proteína rP22.....	101
Figura 32: Reatividade dos soros de camundongos aos peptídeos derivados da proteína rP44 após a imunização.....	103
Figura 33: Alinhamento entre as proteínas rP44 e cadeia A da frutose-bifostato aldolase C de <i>Homo sapiens</i> (HsALDOC) e localização dos peptídeos mais reativos ao soro anti-rP44.....	105
Figura 34: Localização dos peptídeos mais reativos ao soro anti-rP44 no modelo da estrutura cristalina da frutose-bifostato aldolase.....	106
Figura 35: Reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos peptídeos derivados da proteína rP22.....	108
Figura 36: Reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos peptídeos derivados da proteína rP44.....	109

**LISTA DE TABELAS**

<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabela 1: Esquema de imunização e infecção experimental em modelo murino.....	58
Tabela 2: Amostras de plasmas testadas em imunoenaios com peptídeos ligados à membrana.....	65
Tabela 3: Efeito protetor induzido pelas diferentes formulações vacinais	83
Tabela 4: Predição de epítomos de linfócitos B presentes nas estruturas das proteínas rP22 e rP44 de <i>S. mansoni</i> .....	98
Tabela 5: Parâmetros associados aos peptídeos reativos ao soro anti-rP44 e presentes na estrutura da proteína rP44.....	104
Tabela 6: Reconhecimento diferencial dos peptídeos derivados da proteína rP22.....	111
Tabela 7: Reconhecimento diferencial dos peptídeos derivados da proteína rP44.....	112

### Resumo

A esquistossomose permanece como um grave problema de saúde pública nos países tropicais e é considerada uma das infecções parasitárias humanas mais importantes em termos de morbidade e mortalidade. Apesar das drogas utilizadas no tratamento da esquistossomose serem altamente eficazes na eliminação dos vermes adultos, elas não impedem os quadros de reinfecção e de formação do granuloma no fígado. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina é uma estratégia essencial para o controle da esquistossomose. Nosso grupo de pesquisas identificou as proteínas recombinantes (r) P22 e (r) P44 como componentes da fração PIII de verme adulto, conhecida por gerar proteção e imunomodulação da resposta granulomatosa na esquistossomose experimental. Clones contendo a sequência codificadora das proteínas rP22 e rP44 foram isolados da biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* utilizando soro de coelho anti-PIII. As sequências selecionadas apresentaram identidade completa com o antígeno Sm 21.7 e a proteína frutose 1,6-bifosfato aldolase de *S. mansoni*, respectivamente. Foram realizadas imunizações de camundongos com as proteínas recombinantes rP22 e rP44, combinadas ou individuais, para investigar a proteção gerada após a infecção desafio. Camundongos imunizados com rP22 e rP44, tanto combinadas com individuais, apresentaram uma diminuição significativa do número de vermes recuperados. Somente os camundongos imunizados com a combinação das proteínas apresentaram uma redução significativa do número de ovos retidos no tecido hepático. Análises histológicas dos cortes de fígado de camundongos revelaram que tanto a vacinação dos animais com rP22 quanto com a combinação rP22/rP44 produziram uma redução significativa do tamanho dos granulomas hepáticos e da área de fibrose, sugerindo que rP22 poderia contribuir para a regulação da hipersensibilidade granulomatosa em resposta aos ovos de *S. mansoni*. A imunidade protetora foi associada aos títulos elevados de anticorpos IgG específicos para rP22 e rP44; à produção aumentada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10; e aos baixos níveis de IL-4. Dessa forma, esses resultados demonstram que a produção de uma vacina composta pela combinação das proteínas rP22 e rP44 pode ser uma ferramenta útil na geração de proteção contra a esquistossomose. Além disso, a capacidade pronunciada da proteína rP22 em reduzir a patologia hepática poderia contribuir para a produção de uma vacina anti-esquistossomótica mais eficaz. Para caracterizar os epítomos relacionados à resposta humoral produzida após a imunização de animais experimentais com rP22 ou rP44, foi feita a predição dos epítomos lineares de linfócitos B encontrados na sequência primária da rP22 e rP44 e peptídeos de 16 resíduos de aminoácidos foram sintetizados em membrana de

## **Resumo**

---

celulose pelo método de “Spot Synthesis”. Os imunoenaios revelaram que os soros de camundongos imunizados com a rP22 reagiram predominantemente com os peptídeos localizados na região do domínio da cadeia leve de dineína, na porção C-terminal da proteína rP22. Os soros de camundongos imunizados com a rP44 reagiram tanto com peptídeos localizados na superfície dessa proteína quanto com aqueles situados no domínio barril TIM e que contem resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade enzimática dessa proteína. A reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos nas formas aguda, crônica e hepatoesplênica aos peptídeos sintéticos derivados de rP22 e rP44 foi realizada e diferentes padrões de reatividade foram determinados para cada grupo de pacientes. A análise comparativa entre a reatividade dos soros humanos e de camundongos imunizados frente aos peptídeos derivados de rP22 e rP44 mostrou que a maior parte dos peptídeos mais reativos de rP22 e de rP44 foi reconhecida por ambos os soros. Somente o peptídeo 2 derivado da proteína rP22 reagiu preferencialmente ao soro de camundongos imunizados. Por fim, os resultados obtidos nos ensaios de proteção e no mapeamento dos epítomos lineares de linfócitos B fornecem novas perspectivas para a imunoterapia da esquistossomose.

**Abstract**

Schistosomiasis remains a significant public health problem in tropical countries and it is recognized as the most important human helminth infection, in terms of morbidity and mortality. Although the existing antischistosomal drugs are highly effective, they do not prevent reinfection or granuloma formation. Therefore, vaccine strategies are essential for the control of schistosomiasis. Our group has identified the recombinant (r) P22 and (r) P44 proteins, both components of the adult worm protein fraction PIII that has been shown to engender protective and immunomodulatory effects on murine schistosomiasis. cDNA clones encoding rP22 and rP44 were isolated from a *Schistosoma mansoni* adult worm cDNA library using anti-PIII rabbit serum; they exhibited complete identity with *S. mansoni* Sm21.7 antigen and fructose 1,6-biphosphate aldolase, respectively. Immunization with the recombinant proteins rP22 and rP44, alone or together, was assayed to investigate protection against challenge infection. Mice immunized with rP22 and rP44, either alone or together, exhibited significant decrease in adult worm burden. Only mice immunized with two proteins exhibited significant decrease in hepatic eggs. Histological analysis of mice liver sections showed that either rP22- or rP22/rP44- mice vaccination produced a significant reduction in liver granuloma size and fibrosis, suggesting that rP22 might contribute to down-modulate granulomatous hypersensitivity to *S. mansoni* eggs. Protective immunity in mice was associated with high titers of rP22- and rP44-specific IgG antibodies; elevated production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10; and a reduced level of IL-4. So, these findings indicate that rP22/rP44-based vaccine could be useful to elicit protection against schistosomiasis. Furthermore, the pronounced capacity of rP22 to reduce liver pathology could contribute to a more effective schistosomal vaccine.

To characterize epitopes associated with antibodies produced by mice immunization with rP22 or rP44, linear B-cell epitopes from rP22 and rP44 primary sequences were predicted and 16 mer peptides were prepared by Spot synthesis. Immunoassays revealed that sera from rP22-immunized mice reacted predominantly with peptides located in the dinein light chain domain present at the C-terminal region of rP22 protein. Sera from rP44-immunized mice reacted either with peptides located at the protein surface or with those located in the TIM barrel region, a domain also known to contain amino acid residues involved in the enzymatic function of this protein. The reactivity of sera from acute, chronic and hepatosplenic *S. mansoni* patients to synthetic rP22- and rP44-peptides was also assayed and different patterns of reactivity were determined for each group. Comparative analysis between human sera and mice-immunized sera reactivity to rP22- and rP44-peptides showed that the most reactive

## ***Abstract***

---

peptides from either rP22 or rP44 were recognized by both vaccinated mice sera and human sera. Only peptide 2 of rP22 protein preferentially reacted to sera from rP22-vaccinated mice. In conclusion, the results described for rP22 and rP44 B-epitope mapping may prove important in the vaccine research field and provide new prospects for immunotherapy of schistosomiasis.