

I - INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Dentre as espécies capazes de infectar o homem, cinco apresentam maior importância médica: *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi*. A distribuição mundial destas espécies é bastante diversificada (Figura 1). A espécie *S. haematobium* se instala no plexo venoso perivesical, ocasionando a esquistossomose urinária. As demais espécies se instalam no plexo venoso mesentérico do hospedeiro vertebrado ocasionando a esquistossomose intestinal (Gryseels *et al.*, 2006).

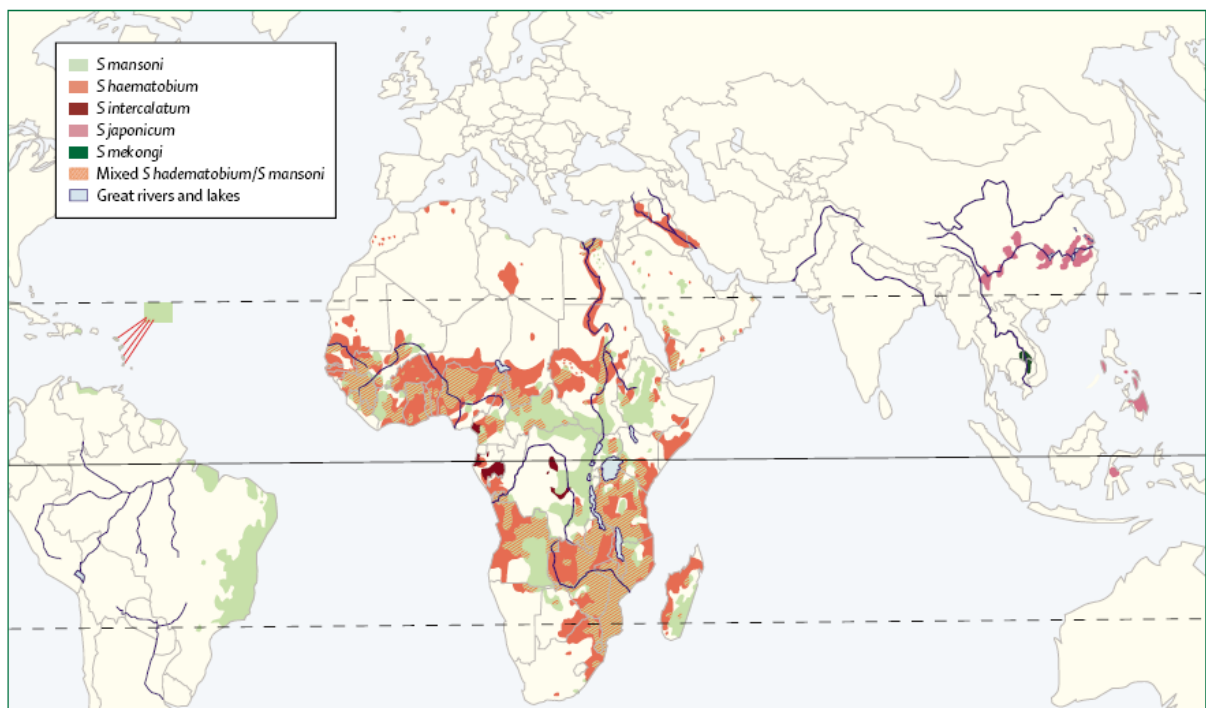


Figura 1: Distribuição mundial das principais espécies causadoras da esquistossomose humana (Modificado de Gryseels *et al.*, 2006).

A esquistossomose acompanha a humanidade há milhares de anos (David & Contis, 1996). Entretanto, essa doença permanece como uma das infecções parasitárias de maior prevalência, resultando em graves consequências econômicas e de saúde pública. Atualmente, a esquistossomose é endêmica em 74 países tropicais e subtropicais,

localizados na África, Ásia e América Latina. Dados recentes da Organização Mundial da Saúde indicam a existência de aproximadamente 700 milhões de pessoas sob risco de contaminação em todo o mundo, e, estima-se que mais de 207 milhões estejam 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-Saariana (Van Der Werf *et al.*, 2003).

No Brasil, os primeiros casos de pacientes com esquistossomose foram relatados em 1908, por Pirajá da Silva (Prata, 2008) e, ainda hoje, essa doença permanece como um importante problema de saúde pública. Atualmente, a doença é detectada em todas as regiões do país. As áreas endêmicas e focais abrangem 19 unidades federadas (Figura 2), atingindo os estados: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (com predominância no norte e nordeste do estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (Coura & Amaral, 2004). A área endêmica para esquistossomose no Brasil se encontra em expansão e estima-se que aproximadamente 25 milhões de habitantes estejam expostos ao risco de infecção e cerca de 1 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas (Schneider *et al.*, 2011).

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 (King, 2009). Especialmente em países subdesenvolvidos, os altos índices de ocorrência da 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.

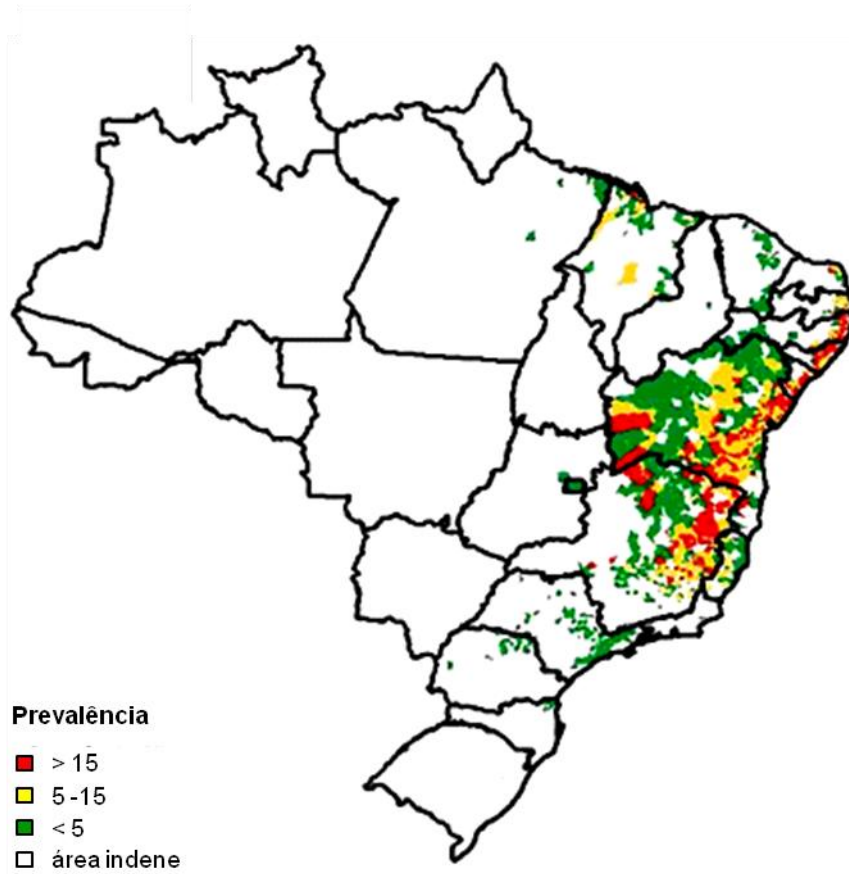


Figura 2: Distribuição da esquistossomose de acordo com a prevalência da infecção humana no Brasil (Modificado de Coura & Amaral, 2004).

1.2 A esquistossomose mansônica: agente etiológico e ciclo de vida

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, o caramujo do gênero *Biomphalaria*, no qual a reprodução assexuada do parasita ocorre, 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, as cercárias, penetram na pele do hospedeiro (Figura 3). Neste processo, as cercárias perdem a cauda bifurcada, as glândulas pré e pós acetabulares, dando origem à

forma jovem do verme, o esquistossômulo (Gordon & Griffiths, 1951). Em torno de 48 horas após a infecção, os esquistossômulos alcançam a corrente sanguínea 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 (Boros & Warren, 1970; Miller & Wilson, 1978). Cada fêmea produz diariamente cerca de 300 ovos (Von Lichtenberg, 1987). 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).

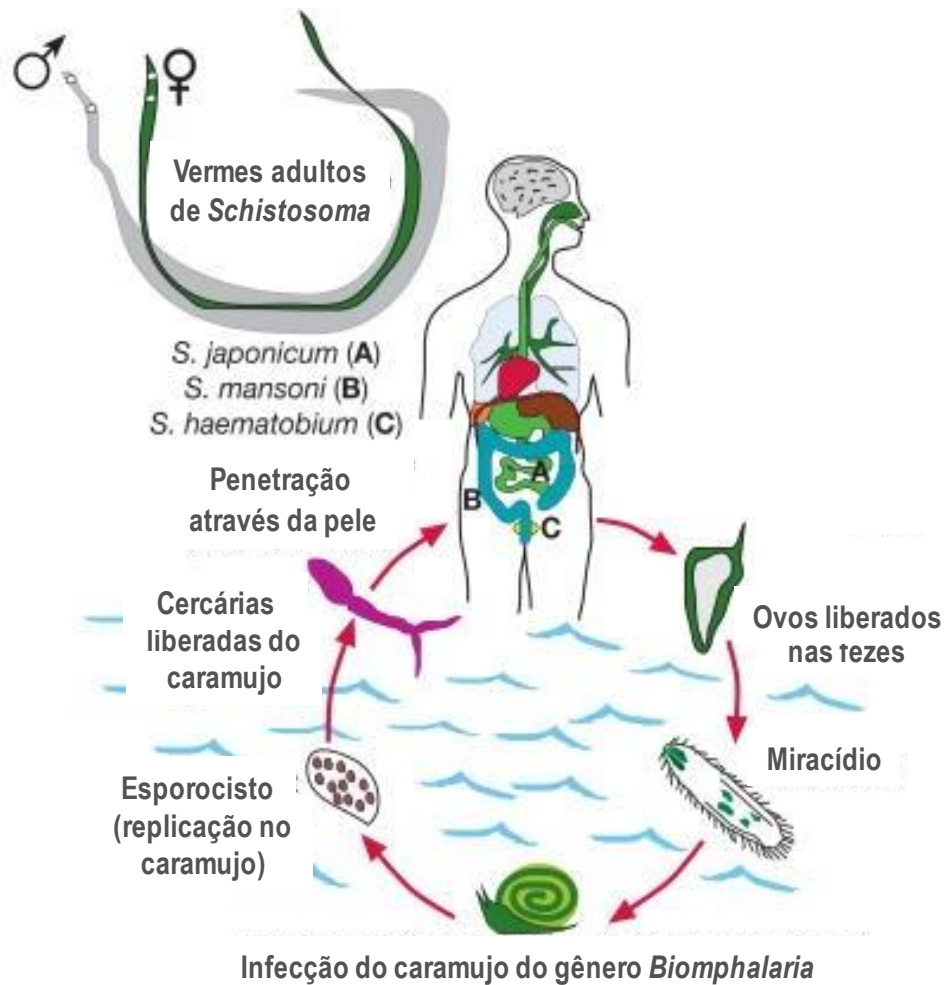


Figura 3: O ciclo de vida do *S. mansoni* (Modificado de Varki *et al.*, 2009).

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 no hospedeiro definitivo. 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 sanguíneo para o fígado (Boros & 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 (Warren & Domingo, 1967; Boros & Warren, 1970). A fibrose que se desenvolve em torno das ramificações da veia porta bloqueia a circulação sanguínea 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 (Gazzinelli *et al.*, 1987; Boros, 1989). As manifestações da fase aguda raramente ocorrem em indivíduos de áreas endêmicas devido às exposições pré-natal via transporte transplacentário (Carlier *et al.*, 1980; Novato-Silva *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 & 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 grave 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). A gravidade dos sintomas está relacionada tanto à intensidade da infecção quanto à resposta imune de cada indivíduo (Boros, 1989). Esta heterogeneidade nas respostas também é observada dentre as diferentes linhagens de camundongos, no modelo experimental da doença (Stadecker *et al.*, 2004).

1.4 A inflamação e a formação do granuloma

Durante o ciclo de vida do *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado, uma série de antígenos é secretada, excretada e/ou despreendida do parasita, levando a uma resposta inflamatória granulomatosa e à produção de altos níveis de anticorpos (Berggren & 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 & Boros, 1979).

A evolução do granuloma tem sido classificada em vários estádios de maturação, na infecção experimental e humana (Hsü *et al.*, 1972; Grimaud & Borojevic, 1986; Junqueira *et al.*, 1986; Lenzi *et al.*, 1998). Na infecção experimental murina, os granulomas podem ser classificados em cinco principais estádios de evolução: reativo inicial, exsudativo, exsudativo-productivo, produtivo e involutivo. À medida que o granuloma evolui, a intensidade da fibrose aumenta gradualmente e a celularidade total apresenta uma redução progressiva (Lenzi *et al.*, 1998). Ao longo do processo de maturação do granuloma também são

observadas alterações dinâmicas nas populações celulares. O estágio reativo inicial é caracterizado pelo acúmulo gradual de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao redor do ovo recentemente depositado. Cerca de 40 dias após a infecção, surgem os primeiros granulomas exsudativos que, além de macrófagos e eosinófilos, apresentam fibroblastos, linfócitos, neutrófilos, células plasmáticas e mastócitos. À medida que o granuloma amadurece no estágio exsudativo-produtivo, histiócitos e células epitelióides começam a aparecer na periferia e gradualmente substituem a zona leucocítica. Fibrócitos também aparecem na periferia da lesão e formam uma zona externa ao redor dos histiócitos e das células epitelióides. Durante o estágio produtivo os ovos do *Schistosoma* se degeneram e se desintegram. Fibrócitos e fibras de colágeno eventualmente se tornam mais proeminentes, e linfócitos, histiócitos, células plasmáticas e alguns eosinófilos formam uma zona adicional na periferia da lesão. Os fibrócitos e as fibras colágenas eventualmente se tornam a característica principal do granuloma, ao passo que os outros tipos celulares reduzem em número. Os granulomas no estágio involutivo são marcadamente reduzidos no tamanho e o ovo está tipicamente desintegrado, podendo se tornar calcificado. Após o estágio involutivo, o granuloma é substituído por placas fibróticas (Lenzi *et al.*, 1998; Burke *et al.*, 2009).

O processo de formação dos granulomas hepáticos se inicia quando antígenos originados dos ovos agem como estímulos da resposta inflamatória (Pearce, 2005). 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. A interação entre as APCs expressando MHC de classe II, peptídeos antigênicos do ovo e células T CD4⁺ específicas resulta na ativação das células T, expressão de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de outros leucócitos – notadamente eosinófilos – e na liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas (Stadecker, 1999). Desta resposta participam linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, células epitelióides,

eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (Von Lichtenberg, 1962; Moore *et al.*, 1977; Silva-Teixeira *et al.*, 1996).

Inicialmente, o granuloma hepático forma-se num contexto de citocinas Th1, entretanto, já nas primeiras 1-2 semanas de sua formação, a resposta imune torna-se polarizada para o perfil Th2 com a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A mudança para o perfil Th2 é essencial para que haja a prevenção da morbidade da doença e aumente a sobrevivência do hospedeiro (Pearce *et al.*, 2004). As citocinas Th2 estudadas isoladamente apresentam diferentes funções na patologia do granuloma hepático. Estudos com animais deficientes para IL-4, IL-13 ou duplo-deficientes em IL-4 e IL-13 demonstraram que IL-4 direciona o desenvolvimento da resposta granulomatosa, ao passo que IL-13 é a citocina pró-fibrótica chave no desenvolvimento da fibrose hepática associada à esquistossomose (Fallon *et al.*, 2000). A IL-4 é responsável pela determinação do tamanho do granuloma, indução da proliferação de linfócitos produtores de citocinas Th2 e também é importante para a produção de IL-5 e IL-13 por células associadas ao granuloma (Yamashita & Boros, 1992; Cheever *et al.*, 1994). Além disso, a IL-4 não contribui diretamente para o desenvolvimento da fibrose, porém, ela aumenta os efeitos da IL-13 na fibrogênese (Fallon *et al.*, 2000). A IL-4 e IL-13 também podem contribuir para o desenvolvimento da fibrose através da indução de macrófagos alternativamente ativados (Hesse *et al.*, 2001; Wilson, *et al.*, 2007). A IL-5 é necessária para o recrutamento de eosinófilos para o granuloma (Cheever *et al.*, 1991). Os eosinófilos são uma importante fonte de citocinas Th2, como a IL-13, e, portanto, a IL-5 contribui indiretamente para a polarização da resposta imune através do recrutamento dessas células (Rumbley *et al.*, 1999). A IL-10 tem um papel regulador chave durante a transição da resposta Th1 para a Th2 e também na prevenção do desenvolvimento de patologia grave, devido ao excesso das respostas Th1 ou Th2 (Wilson *et al.*, 2007). Nos estádios iniciais da formação do granuloma, a IL-10 atua na supressão da produção de citocinas Th1, tais como IFN- γ (Hesse *et al.*, 2004). Hoffmann e colaboradores (2000) também demonstraram que a IL-10 é essencial para prevenir respostas Th2

excessivas em camundongos deficientes para IL-10. Em contraste, o papel das citocinas Th1 na indução do granuloma e fibrose não é muito bem definido (Figura 4).

A composição e o tamanho do granuloma são determinados pela atividade de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos e o seu microambiente de citocinas (Stadecker, 1999). Dependendo da resposta celular desencadeada ao redor do ovo, o granuloma pode alcançar um volume equivalente a 100 vezes o volume do ovo. Essa resposta inflamatória produz a destruição do tecido local e é seguida pelo processo de fibrose, através da deposição de colágeno, e, posterior cicatrização da lesão. Como consequência da deposição de colágeno, pode ocorrer a obstrução de vasos sanguíneos e/ou linfáticos (Von Lichtenberg, 1962; Domingo & Warren, 1969; Cheever, 1972; Warren, 1973).

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 (Buchanan *et al.*, 1973; 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 grave parece resultar da inabilidade do hospedeiro em controlar ou modular as respostas imunológicas contra os antígenos liberados pelos ovos.

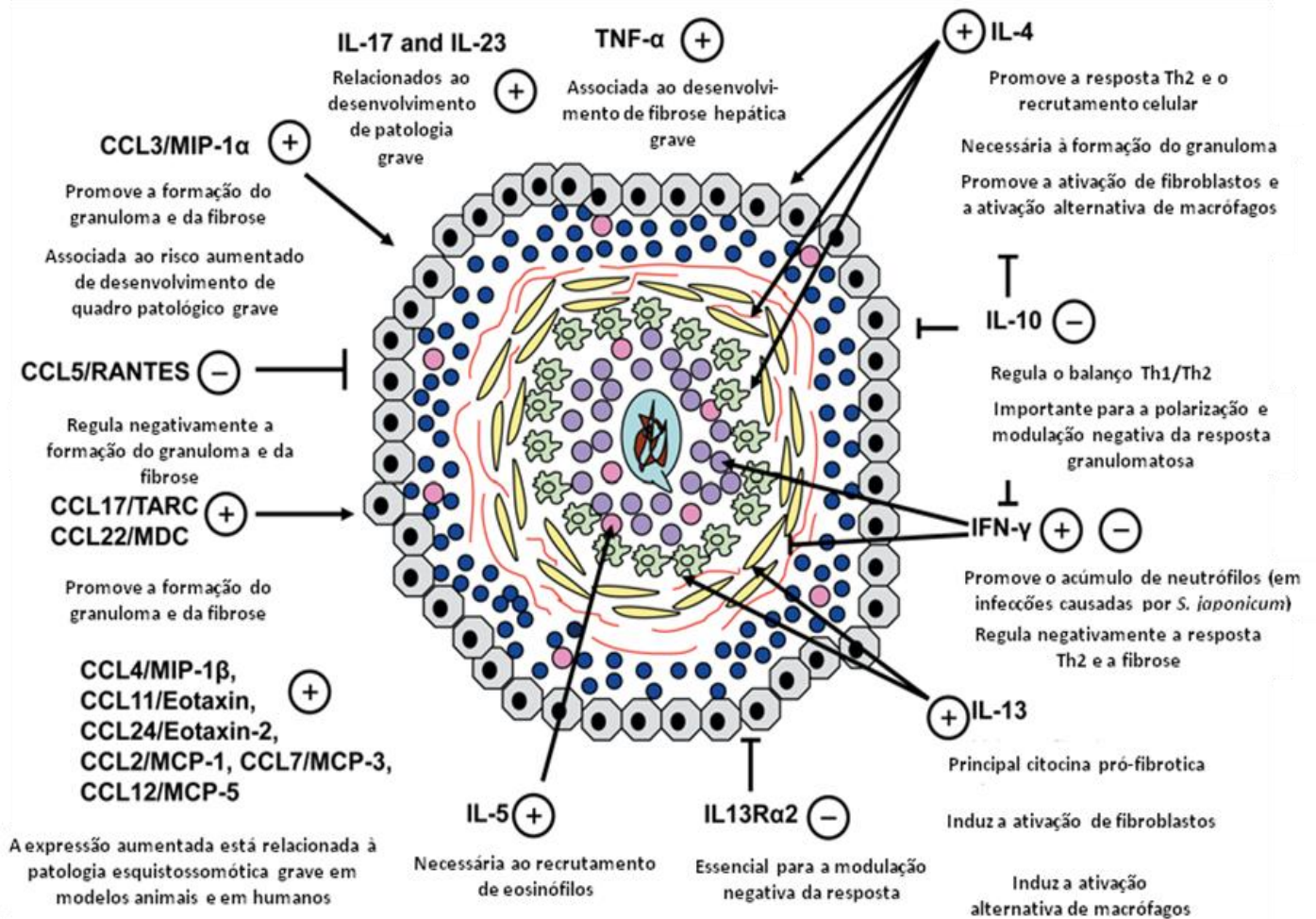


Figura 4: Principais componentes da resposta granulomatosa aos ovos de *Schistosoma* no fígado do hospedeiro definitivo e o papel das citocinas e quimiocinas que regulam essa resposta. Legenda (do centro do granuloma para a face externa): ovo, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, fibroblasto, fibras de colágeno, células CD4⁺/células B, hepatócitos. (Modificado de Burke *et al.*, 2009).

1.5 Resposta imune na esquistossomose

A infecção pelo *S. mansoni* representa um complexo desafio para o sistema imune do hospedeiro, principalmente porque o parasito apresenta diferentes estádios evolutivos e habita distintos nichos durante seu desenvolvimento no hospedeiro definitivo. A importância de se compreender os mecanismos envolvidos nessa patologia está no fato de que os

danos causados nos tecidos afetados são o resultado de um processo imunopatológico iniciado pela resposta imune do próprio hospedeiro contra antígenos do parasita. Nesse aspecto, tanto a imunidade inata quanto a adaptativa participam na defesa do hospedeiro.

1.5.1 Resposta imune inata

A imunidade inata pode ser entendida como o sistema de defesa inicial que reconhece motivos conservados encontrados tanto em animais quanto em plantas. As células apresentadoras de antígenos (APCs) têm um papel fundamental na resposta imune inata, uma vez que elas são capazes de reconhecer uma ampla variedade de estruturas características de patógenos, comumente denominados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Recentemente, foi demonstrado que as APCs reconhecem estes PAMPs através de receptores de reconhecimento padrões – PRRs (do inglês, “pattern recognition receptors”). Várias classes de PRRs, tais como TLRs (do inglês, “toll-like receptors”), RLRs (do inglês, “retinoic acid-inducible gene” – RIG-I “like receptors”) e NLRs (do inglês, “nucleotide-binding oligomerization domain” - NOD-“like receptors”) já foram identificadas (Kawai & Akira, 2009). Esses PRRs reconhecem várias classes de patógenos em diversos compartimentos celulares e ativam a liberação de citocinas inflamatórias e interferons do tipo I para a defesa do hospedeiro (Medzhitov & Janeway, 2000; Medzhitov, 2007).

A interação entre o *S. mansoni* e as células dendríticas (DCs), APCs profissionais, inicia-se pelo reconhecimento de componentes específicos da mistura antigênica do parasita encontrados pelo hospedeiro. Todos os estádios do ciclo de vida do *S. mansoni* produzem uma complexa variedade de moléculas – proteínas, carboidratos, lipídeos – muitas das quais já foram extensamente caracterizadas e qualquer uma delas pode ser considerada como candidato potencial para o reconhecimento imune inato durante a infecção, podendo desempenhar um papel importante no condicionamento das DCs

(Perona-Wright *et al.*, 2006). Nos estádios iniciais da infecção pelo *Schistosoma*, a cercária induz na pele uma reação inflamatória e influxo de células, incluindo as DCs (Hogg *et al.*, 2003; Mountford & Trottein, 2004). Existem também evidências que retratam a ativação e a maturação das DCs na pele, após a penetração das cercárias, determinada pela regulação positiva da expressão de MHCII e CD86 (Riengrojpitak *et al.*, 1998; Angeli *et al.*, 2001; Hogg *et al.*, 2003).

As DCs não são convencionalmente ativadas quando estimuladas com antígenos de diferentes estádios de vida do *S. mansoni*, tais como antígenos solúveis de esquistossômulos (SSA) e antígenos solúveis de verme adulto (SWAP) (Zaccone *et al.*, 2003; Trottein *et al.*, 2004). Por outro lado, BMDCs (células dendríticas derivadas da medula óssea), quando expostas ao material liberado por cercárias nas três primeiras horas após a transformação, (denominadas preparação liberada entre 0-3 horas, 0-3hRP), apresentam um estado parcial restrito de ativação se comparadas com as DCs estimuladas com SEA, ovos mortos ou SSA, mencionados anteriormente. Este estado de ativação intermediário é caracterizado pelo pequeno aumento na expressão de MHCII, CD40 e CD86 e pela produção de IL-6 e IL-12p40 (Jenkins & Mountford, 2005).

Muitos trabalhos têm demonstrado que as DCs podem se ligar aos componentes do *Schistosoma* tanto via TLRs quanto via Lecitinas do tipo C (DC-SIGN, Langerin) (Van Der Kleij *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003; Aksoy *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2005). Os antígenos solúveis do ovo (SEA) do *S. mansoni* são produtos derivados de helmintos mais bem caracterizados que contêm variados ligantes para os TLRs e influenciam as respostas das DCs. Um desses antígenos é a lacto-N-fucopentose III (LNFP III), um açúcar que contém o glicano Lewis^x, que é encontrado no SEA e interage com TLR4 para ativar seletivamente a sinalização via a cinase intracelular ERK nas DCs. LNFP III possui papel adjuvante Th2 pelo recrutamento de macrófagos supressores e o condicionamento de DC para promover a produção de IL-4 pelas células T CD4⁺ (Thomas *et al.*, 2003). Outro antígeno de SEA, a Lisofosfatidilserina (Lyso-PS) interage com TLR2 para induzir a diferenciação de células T

produtoras de IL-4 e IL-10. Dependendo do número de cadeias acil, a Lyso-PS do *Schistosoma* pode condicionar DCs de forma alternativa a promover tanto a polarização de células Th2 ou induzir especificamente células T reguladoras produtoras de IL-10 (Van Der Kleij *et al.*, 2002). Adicionalmente, já foi descrito que RNA de fita dupla derivado do ovo de *Schistosoma* constitui-se como ligante para TLR3 (Aksoy *et al.*, 2005). Estudo recente demonstrou que os antígenos de SEA podem produzir uma resposta imunomoduladora do granuloma através da supressão da secreção de TNF- α e IL-6 pelas DCs ativadas via TLR. Esse efeito imunomodulador foi explicado a partir da capacidade de SEA de bloquear o inflamassomo NLRP3 (do inglês, “NOD-like receptor containing pyrin domain”), através do aumento de potássio extracelular e, assim, impedir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ritter *et al.*, 2010).

1.5.2 Resposta imune adaptativa

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 (Joseph *et al.*, 1983; 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 parasita (Capron *et al.*, 1975; Joseph *et al.*, 1983; 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 com alta produção de IFN- γ por PBMC em resposta a estimulação com SEA e baixos níveis de produção de IL-10 e IL-5 em resposta ao mesmo antígeno (De Jesus *et al.*, 2004). 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, no entanto, apesar da baixa produção de IFN- γ , a neutralização desta citocina resulta em redução nos índices de proliferação. Já a neutralização de IL-10 com anticorpos específicos resulta em aumento da resposta proliferativa de PBMC em resposta à estimulação com SEA e SWAP (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998). Adição de anti-IL-4, mas não de anti-IL-5 leva a um decréscimo da resposta proliferativa de PBMCs e da formação do granuloma *in vitro*. (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1998). Na forma grave da esquistossomose, a forma hepatoesplênica, o bloqueio de IL-4 causa significativo decréscimo na resposta proliferativa e decréscimo na formação do granuloma *in vitro*. Ao contrário, a adição de anticorpos monoclonais anti-IL-10 no meio de cultura não alteram significativamente a resposta celular, mas a adição da forma recombinante da IL-10 é capaz de diminuir a resposta proliferativa observada nestes indivíduos (Corrêa-Oliveira, *et al.*, 1998). 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 (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 e colaboradores (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 (CD80) e B7.2 (CD86) (Corrêa-Oliveira, R *et al.*, 2000). Nesse grupo, as respostas imunes bem balanceadas seriam caracterizadas pela presença de respostas Th1 e Th2 mensuráveis, que são controladas devido à presença de atividade de células Treg. Isso também é refletido pelo balanço na distribuição dos isotipos IgG4 e IgE (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003).

Estudos em modelo murino têm ajudado a esclarecer quais seriam os perfis de resposta imune protetora (Wilson *et al.*, 2007). Em camundongos imunocompetentes, os estádios iniciais do *Schistosoma* (cercária e esquistossômulo) estimulam uma resposta de natureza Th1, durante as primeiras 4-5 semanas de infecção. Esta resposta é caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, TNF- α , IL-6 e IFN- γ , e por uma limitada expressão de IL-4. Somente quando a infecção progride e os primeiros ovos são produzidos, 5-6 semanas após a infecção, a resposta imune é gradualmente alterada para um perfil Th2 e torna-se fortemente polarizada oito semanas após a infecção (Pearce & Macdonald, 2002). No desenvolvimento da resposta Th2 ocorre uma expressiva produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e uma redução na produção de IFN- γ . É neste estágio que a resposta Th2 atinge o seu pico e a resposta granulomatosa apresenta-se mais exacerbada. Há um aumento nos níveis plasmáticos de IgE e de eosinófilos circulantes, o que resulta da produção das citocinas IL-4 e IL-5 (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991). É a expressão destas citocinas pelas células Th2 que provoca a mudança nas células B para a produção do isotipo IgE. A IL-4 e a IL-5 também atuam como fatores de crescimento e sobrevivência dos eosinófilos (Mosmann, 1992). Decorridas 12 semanas da infecção, ocorre uma redução significativa da resposta Th2 caracterizada por uma hiporesponsividade imunológica e um pequeno aumento na produção de IFN- γ (Grzych *et al.*, 1991). É nessa fase que são observados os menores granulomas (Fallon, 2000). Esta resposta persiste até

o final da infecção e contribui para a sobrevivência do hospedeiro (Grzych *et al.*, 1991). Assim como na resposta imune humana, IL-10 aparece como um fator determinante da imunomodulação da resposta murina (Sadler *et al.*, 2003).

A contribuição das citocinas tanto do perfil Th1 quanto Th2 na resposta granulomatosa tem sido discutido, sendo que fibrose e a maior parte da patologia associada ao granuloma são principalmente mediadas pela produção aumentada das citocinas do tipo Th2 em relação às aquelas do perfil Th1 (Cheever *et al.*, 1994; Reiman *et al.*, 2006). Camundongos deficientes na sinalização de IFN- γ apresentam redução no tamanho do granuloma e parecem transitar para fase crônica mais rapidamente (Rezende *et al.*, 1997). Por outro lado, IFN- γ têm mostrado uma forte atividade antifibrótica (Mukai *et al.*, 2006). Em contrapartida, excessivos níveis de IFN- γ podem causar grave patologia na esquistossomose (Hoffmann *et al.*, 2000).

A extrema polarização imune em direção a um perfil Th1 ou Th2 é prejudicial ou senão letal para o hospedeiro (Hoffmann *et al.*, 2000; Staderker *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007). No curso normal de infecção, células T CD4⁺ reguladoras (Treg) mantêm a homeostase imunológica controlando a magnitude da resposta imune a organismos invasores (Belkaid & 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). A nomenclatura corrente para células Treg inclui; células “Tr1” secretoras de IL-10, células Th3 secretoras de TGF- β e células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ (Shevach, 2002; Stassen *et al.*, 2004). 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 parasita (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 papel regulador durante a infecção por *S. mansoni* e regula de forma crítica a patologia no tecido hepático (Wynn *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 2000). Neutralização de IL-10 aumenta a produção de IFN- γ específico anti-SWAP em culturas de células de pacientes que são cronicamente infectados pelo *S. mansoni* (Araújo *et al.*, 1996; Araújo & Ferreira, 1997). Recentemente, foi demonstrado que IL-10 produzida por células T reguladoras e células Th2 coopera para suprimir o desenvolvimento de resposta Th1 na esquistossomose experimental (Hesse *et al.*, 2004; Mckee & Pearce, 2004). Um possível mecanismo para a supressão é a inibição por IL-10 da expressão de molécula co-estimulatória B7 induzida por antígeno do parasita (Flores-Villanueva *et al.*, 1996; King *et al.*, 1996). Mckee & Pearce (2004) relataram que IL-10 secretada por células CD4⁺ CD25⁺ e CD4⁺ CD25⁻ é importante para o controle da produção de IL-12 por células dendríticas e para a geração da resposta Th1 durante a infecção, ajudando a modificar o perfil de resposta imune para o tipo Th2. A fonte de IL-10 necessária para a polarização da resposta Th2 induzida por antígeno de ovo é alvo de considerável interesse atual. Trabalhos anteriores sugerem que células Th2 ou macrófagos produzam IL-10 (Sher *et al.*, 1991; Wynn *et al.*, 1998). Trabalhos recentes suportam esta visão e, além disso, eles destacam a importância de células T reguladoras 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; Mckee & Pearce, 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).

A recente descrição de um terceiro subtipo celular, Th17, e o seu envolvimento em uma variedade de doenças inflamatórias crônicas impulsionaram investigações acerca de seu papel na esquistossomose (Steinman, 2007). As células Th17 foram associadas ao desenvolvimento de patologia severa em camundongos polarizados para um perfil Th1 e camundongos CBA, os quais desenvolvem uma forte resposta inflamatória caracterizada por

elevados níveis de IFN- γ . Em seguida, foi demonstrado que a indução da patologia grave e a expressão de IL-17 em camundongos com a resposta imune polarizada para Th1 são dependentes da presença de IL-23, outra citocina característica do perfil Th17 (Rutitzky & Stadecker, 2006; Rutitzky *et al.*, 2008).

1.6 O papel do tegumento do *Schistosoma* na interação parasita-hospedeiro

O tegumento é a cobertura externa das diferentes formas evolutivas do *Schistosoma* e está relacionado com as complexas interações parasita-hospedeiro. O tegumento está envolvido na nutrição, evasão imune e modulação, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais (Loukas *et al.*, 2007).

O tegumento do *S. mansoni* difere morfológicamente e antígenicamente entre os diversos estádios de vida do parasita. A cercária possui uma membrana externa trilaminada com uma capa de material granular difuso e fibroso presente em sua superfície. Mitocôndrias estão esparsamente distribuídas através do tegumento da cercária (Abath & Werkhauser, 1996). Aproximadamente três horas depois da penetração, a membrana externa trilaminada da cercária é substituída quase completamente por uma membrana heptalaminada. A nova membrana é formada aproximadamente 30 minutos após a penetração a partir de vesículas multilaminadas originadas nas células subtegumentares que se fundem com a membrana plasmática do tegumento, liberando seu conteúdo sobre a superfície da membrana (Abath & Werkhauser, 1996). O tegumento do esquistossômulo sofre algumas modificações após a transformação, mas assemelha-se ao tegumento do verme adulto.

O tegumento do *Schistosoma* consiste em um sincício (não possui membranas laterais) citoplasmático (Mclaren & Hockley, 1977). Esse tecido está ligado na sua superfície basal por uma membrana plasmática convencional invaginada e possui em sua superfície apical uma aparência heptalaminada pouco usual. Esta última estrutura foi interpretada

como sendo uma membrana plasmática normal, sobreposta por uma bicamada secretada denominada membranocálice, por analogia com o glicocálice das células eucariotas (Wilson & Barnes, 1977). A matriz sincicial localizada abaixo do tegumento contém mitocôndrias e uma variedade de inclusões citoplasmáticas. Uma lâmina basal separa o sincício da camada muscular. Corpos celulares nucleados (cítos) estão situados abaixo das camadas musculares, conectados ao tegumento por canais citoplasmáticos alinhados por microtúbulos. A maquinaria de síntese protéica, constituída por ribossomos, retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi, está situada nos corpos celulares. Duas formas de inclusões de secreção, corpos discóides e vesículas multilaminadas, são produzidos nos corpos celulares e se direcionam ao tegumento através das conexões citoplasmáticas (Wilson & Barnes, 1974).

O tegumento do *Schistosoma* desempenha um importante papel na sobrevivência dos vermes adultos no hospedeiro definitivo. Os vermes adultos co-evoluíram com seu hospedeiro mamífero de tal maneira que são capazes de sobreviver por até 40 anos nos vasos sanguíneos dos hospedeiros definitivos imunocompetentes (Harris *et al.*, 1984). A relação altamente adaptada entre o *Schistosoma* e seu hospedeiro parece envolver a exploração de sinais imunes e endócrinos do hospedeiro, além da captação de nutrientes, a fim de garantir o estabelecimento, crescimento e reprodução do verme (Escobedo *et al.*, 2005). Uma característica importante desses vermes é a presença de mecanismos de evasão da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa, a fim de proporcionar uma infecção crônica (Kusel *et al.*, 2007).

Vários mecanismos de evasão imune estão intimamente relacionados com o tegumento, incluindo “disfarce” molecular (aquisição de proteínas séricas do hospedeiro na superfície do parasita), “imitação” antigênica (produção de antígenos apropriados com epítopos similares ou idênticos aos do hospedeiro), degradação proteolítica das proteínas de ataque do hospedeiro, propriedades de rigidez biofísica da membrana e uma rápida renovação do tegumento (Abath & Werkhauser, 1996; Han *et al.*, 2009) (Figura 5). Embora

muitos desses mecanismos tenham como objetivo o escape da resposta imune do hospedeiro, paradoxalmente, muitos antígenos alvos da resposta imune contra o *Schistosoma* estão localizados no tegumento (Smithers *et al.*, 1989).

A identificação e a caracterização de proteínas associadas ao tegumento são essenciais para o entendimento da função dessa estrutura. Proteínas com diversas funções estão presentes no tegumento, incluindo transportadores de açúcares e aminoácidos, enzimas, proteínas do citoesqueleto e receptores (Braschi *et al.*, 2006). Entretanto, trabalhos realizados há mais de 20 anos, bem como os atuais, têm como foco principal a busca por moléculas que possam ser alvos da resposta imune protetora ou serem relevantes para o diagnóstico da esquistossomose (Xavier *et al.*, 1998). Nesse contexto, já foi demonstrado que o isolamento de membranas do tegumento dos vermes adultos e seu uso na vacinação de camundongos foram capazes de induzir proteção em modelo murino, após exposição à cercária irradiada, demonstrando que essas membranas contêm antígenos protetores (Smithers *et al.*, 1989). Além disso, anticorpos provenientes de camundongos vacinados com membranas tegumentares dos vermes adultos reconhecem antígenos da superfície do esquistossômulo jovem, demonstrando que existem proteínas que são conservadas entre estas duas fases do ciclo de vida do parasita (Simpson, 1990). Em parasitas em cultura, essas proteínas são liberadas de sua superfície em vesículas associadas a membranas (Simpson *et al.*, 1984; Pearce & Sher, 1989). De forma interessante, essas moléculas estão ligadas à superfície do esquistossômulo via âncoras de GPI (glicosilfosfatidil inositol) e são liberadas da superfície do parasita por tratamento com enzimas específicas para GPI.

Os recentes avanços no estudo da biologia molecular permitiram uma melhor caracterização do genoma, transcriptoma e proteoma do *S. mansoni*. Dessa forma, tornou-se possível realizar um inventário mais completo dos constituintes protéicos do tegumento e de sua superfície (Braschi *et al.*, 2006). Nesse aspecto, vários antígenos tegumentares já foram descritos, incluindo a P24, SmAQP e Sm200, além da Sm29 e da Sm-STP2 (Zouain *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008; Faghiri & Skelly, 2009). Tanto a P24

quanto Sm29 e Sm-TSP2 foram capazes de induzir proteção em modelo murino. Assim, em conjunto, esses estudos reforçam a idéia de que o tegumento do verme adulto constitui um importante alvo para a resposta imune e que o estudo de novas proteínas da superfície do parasita pode contribuir enormemente na descoberta de novos antígenos à vacina anti-esquistossomótica.

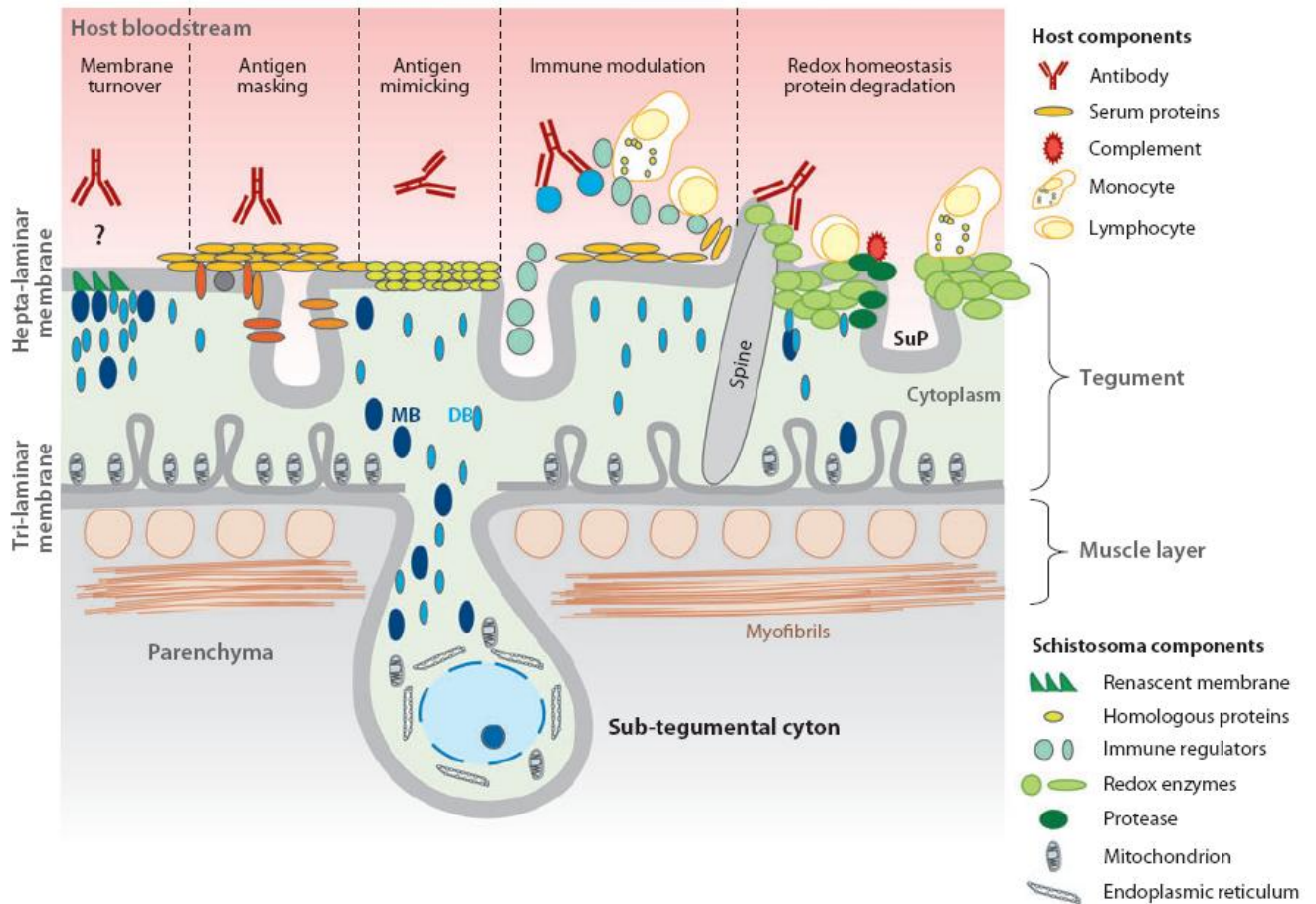


Figura 5: Esquema do tegumento do *Schistosoma* e modelo hipotético de algumas das estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro. A superfície do verme adulto é renovada continuamente através de vesículas abundantes denominadas corpos membranosos (MB) e corpos discóides (DB), que são sintetizados em corpos celulares nucleados (cítions) e transportados para a superfície (Modificado de Han et al., 2009).

1.7 Estratégias de controle da esquistossomose: o desenvolvimento de vacinas

Atualmente, a droga de escolha para o tratamento de infecções causadas por *S. mansoni* é o praziquantel (Katz, 2008). Vários mecanismos de ação foram atribuídos a esse quimioterápico. Acredita-se que o praziquantel promova a ruptura do tegumento do verme, com conseqüente exposição de antígenos ao ataque do sistema imune do hospedeiro (Ribeiro *et al.*, 2004). Também foi observado que o praziquantel é capaz de depletar os

estoques de glutathione do verme adulto (Ribeiro *et al.*, 1998), ou até mesmo interromper o funcionamento do sistema excretor desse parasita (Kusel *et al.*, 2006). Outro mecanismo proposto é a inibição de canais de cálcio, entretanto essa ação ainda não foi totalmente comprovada (Greenberg, 2005).

Embora o tratamento quimioterápico tenha se mostrado eficiente em reduzir a intensidade da infecção por *S. mansoni* durante o tratamento em massa das populações atingidas (Coura & Amaral, 2004), essa ação realizada de forma isolada, ainda é insuficiente no combate a possíveis reinfecções e aos danos provocados pela exacerbação da resposta imune na inflamação granulomatosa. Além disso, relatos de cepas de *S. mansoni* resistentes ao praziquantel reforçam a necessidade de se buscar novas estratégias de controle, tratamento e de prevenção da esquistossomose. Portanto, há um consenso entre os órgãos mundiais de saúde de que se faz necessário o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica (Ismail *et al.*, 1999; Kusel & Hagan, 1999). Acredita-se que a produção de uma vacina protetora, ou mesmo imunomoduladora da resposta granulomatosa, seja uma meta possível de ser alcançada, tendo em vista os casos descritos de resistência natural à infecção e reinfecção, além dos bons resultados obtidos em modelo experimental de vacinação com cercárias irradiadas (Minard *et al.*, 1978; Stek *et al.*, 1981; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2006; Mcmanus & Loukas, 2008).

Para o desenvolvimento de vacinas é essencial a identificação de antígenos que sejam capazes de induzir resposta imune específica, gerando células de memória. O avanço das técnicas utilizadas em imunologia e em biologia molecular, associado 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). O estudo de novos antígenos vacinais visa obter não somente moléculas capazes de induzir uma imunidade protetora nas diferentes fases da infecção, mas também de reduzir a morbidade através da diminuição do número de vermes, da supressão da produção de ovos ou da modulação da inflamação granulomatosa.

Diversas estratégias de vacinação vêm sendo utilizadas sendo que cada uma delas apresenta suas vantagens e desvantagens. Atualmente, têm se utilizado três tipos de antígenos 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 epítomos 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). Outro questionamento envolvendo o uso das vacinas de DNA se refere à segurança das construções gênicas a serem utilizadas nas preparações vacinais (Glenting & Wessels, 2005). 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 & 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 quanto à antigenicidade e imunogenicidade. A seleção de epítomos diminui a probabilidade de se utilizar sequências que sabidamente ativam mecanismos imunossupressores ou que ativam 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 inclusos em um antígeno protéico ou em um patógeno atenuado, geralmente utilizados nas vacinas convencionais (Purcell *et al.*, 2007). Apesar de todas as possibilidades descritas atualmente para a produção de vacinas, nenhum antígeno ou preparação antigênica obteve

níveis de proteção tão satisfatórios quanto aqueles alcançados pela vacinação utilizando cercárias atenuadas na esquistossomose experimental.

Há pouco mais de uma década, a Organização Mundial de Saúde, através do Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais incluiu os antígenos rlrV-5, GST 28kDa, TPI, paramiosina/Sm97,Sm23 e Sm14 nos programas de desenvolvimento de vacina contra esquistossomose (Bergquist, 1995). Porém, esses antígenos testados apresentaram níveis de proteção insuficientes durante os ensaios pré-clínicos (Oliveira *et al.*, 2008).

Uma alternativa empregada na produção de vacinas é a combinação de antígenos com capacidade protetora em uma formulação multi-antigênica (Romeih *et al.*, 2008). Dessa maneira, uma única preparação vacinal pode conter antígenos presentes em vários estádios de desenvolvimento do parasita e apresentar um amplo espectro de ação. Essa estratégia tem como objetivo a obtenção de níveis de proteção mais eficazes que aqueles obtidos individualmente pelos seus componentes antigênicos.

O fracionamento de extratos derivados de diversas formas evolutivas de *S. mansoni* também tem sido uma alternativa na busca de novos antígenos vacinais na esquistossomose (Hirsch & Goes, 1996; Zouain *et al.*, 2000; Teixeira De Melo *et al.*, 2010). Muitas frações protéicas derivadas de vermes adultos e esquistossômulos possuem atividade protetora e a caracterização de seus componentes se torna cada vez mais relevante para se produzir uma vacina anti-esquistossomótica.

1.8 Identificação de epítomos representativos de proteínas de interesse

Inúmeros trabalhos vêm sugerindo a utilização de peptídeos sintéticos que possam representar a atividade, função, imunogenicidade e proteção conferida pela proteína da qual eles são constituintes. Dentre as aplicações descritas para os peptídeos sintéticos estão: a utilização como inibidores de doenças alérgicas (Kinyanjui & Fixman, 2008), no

desenvolvimento de biomateriais (Cen *et al.*, 2008) e de fármacos (Romani *et al.*, 2008), no tratamento de doenças auto-imunes (Oshima *et al.*, 2007; Sela *et al.*, 2009), na utilização como adjuvantes (Moyle & Toth, 2008), no tratamento de distúrbios da coagulação (Castaman, 2008), como agentes antimicrobianos (Mátyus *et al.*, 2007), no tratamento de doenças reumáticas (Kessenbrock *et al.*, 2007), como ferramenta em diversos estudos da biologia (Berger & Alkhatib, 2007; Johnson *et al.*, 2007; Clérico *et al.*, 2008), em biologia sintética (Bromley *et al.*, 2008) e até mesmo em estudos de diferenciação e renovação de células tronco (Schugar *et al.*, 2007).

Uma importante aplicação dos peptídeos sintéticos, que tem sido demonstrada em diversos trabalhos, é a produção de anti-soros e vacinas (Coligan *et al.*, 2001; Grant, 2001; Carter, 2003; Belshe *et al.*, 2011). Para uma vacina ser efetiva, ela precisa desencadear tanto a resposta humoral quanto a resposta celular. Por isso, é de fundamental importância o mapeamento de epítomos para a escolha de peptídeos com potencial vacinal (De Groot, 2006).

Os epítomos são definidos como peptídeos derivados de um antígeno protéico que interagem com receptores de células B (imunoglobulinas) ou com receptores de células T, resultando na ativação de uma resposta imune (De Groot, 2006).

A primeira resolução cristalográfica de raio-X de um complexo antígeno-anticorpo mostrou que um epítomo é composto de aproximadamente 10 a 20 aminoácidos (Amit *et al.*, 1985), sendo que somente 4 a 5 resíduos de aminoácidos estão implicados na energia de ligação e determinam sua especificidade, enquanto os outros resíduos podem ser substituídos por outros e desempenham o papel de espaçadores (Geysen *et al.*, 1988).

Vários métodos de localização sistemática de epítomos vêm sendo desenvolvidos e empregados. Atualmente, esses métodos englobam diferentes domínios do conhecimento como a biofísica, a bioquímica, a biologia molecular e até mesmo a síntese química (Meloan *et al.*, 2000). Entretanto, a localização experimental destes epítomos é ainda hoje um processo complexo. A utilização de peptídeos representativos de antígenos protéicos,

combinada à análise através de ferramentas de bioinformática, é uma alternativa interessante e promissora.

Toda superfície acessível de uma proteína é tida como potencialmente antigênica. Portanto, as proteínas são formadas de um mosaico de epítomos virtuais. É uma tarefa difícil estimar o número de epítomos que uma proteína apresenta, pois esse número depende da existência de anticorpos contra várias regiões da proteína. A diversidade de epítomos reconhecidos em um mesmo antígeno ao longo da resposta imunológica é um fator essencial para a eficácia da resposta do anticorpo que levará à neutralização ou à destruição do patógeno (Revillard *et al.*, 1998).

Os epítomos podem ser segmentos contínuos na sequência primária da proteína, os chamados epítomos lineares, ou serem compostos por uma região na superfície tridimensional da proteína, os chamados epítomos conformacionais.

O epítomo de linfócitos B é definido como uma discreta região na superfície do antígeno que se liga à região variável de um anticorpo. A região de ligação do anticorpo é composta por três domínios hipervariáveis que podem variar na sequência e no tamanho de tal forma que anticorpos gerados por uma célula apresentam uma única interface (Blythe & Flower, 2005). Apesar da extrema variabilidade desta região, o sítio de ligação do anticorpo é mais hidrofóbico que a maioria da superfície das proteínas com uma predileção por resíduos de tirosina.

Os principais métodos de identificação de epítomos são: métodos imunoquímicos, como o método de Spot, estudos de cristalografia de raio-X e métodos de predição computacional.

A técnica de Spot é uma metodologia moderna que tem sido utilizada no estudo de mapeamento de epítomos (Laune *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2004). Esta técnica baseia-se na verificação da reatividade de anticorpos mono ou policlonais frente a peptídeos sintetizados sobre uma membrana de celulose (Frank, 2002) de forma a percorrer a sequência completa da proteína ou parte dela.

Os peptídeos localizados pela técnica de Spot podem ser sintetizados e empregados como ferramenta em imunizações (Magalhães *et al.*, 2011), imunodiagnósticos (Ferrer *et al.*, 2011), estudo de interações proteína-receptor (Zhang *et al.*, 2011) ou antígeno-anticorpo (Katagiri *et al.*, 2011). O peptídeo solúvel é obtido através da síntese sobre resina sólida, cujos aminoácidos utilizados estão com grupamento amino protegido pelo grupo Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila). Durante a síntese do peptídeo, ocorre a liberação da porção N-terminal do Fmoc pela ação da piperidina, enquanto o aminoácido seguinte tem sua carboxila ativada pela ação de DIPC (diisopropilcarbodiimida) e HOBT (hidroxibenzotriazol) para que ocorra a formação da ligação peptídica (Albericio & Carpino, 1997).

Aliados à técnica de Spot síntese, os métodos preditivos por meio da bioinformática vêm se desenvolvendo ao longo dos últimos 25 anos. Atualmente, mais de 31 programas/ algoritmos estão disponíveis para tais análises. A maioria destes baseia-se em parâmetros como: acessibilidade, hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade, antigenicidade, flexibilidade e tipos de estruturas secundárias (El-Manzalawy & Honavar, 2010). Todas as técnicas citadas acima são importantes ferramentas no estudo de proteínas previamente conhecidas por suas propriedades protetoras e visam a identificação de epítomos que podem ser úteis no desenvolvimento de novas vacinas.

1.9 A fração PIII e seus componentes: atividade protetora e imunomoduladora na esquistossomose experimental

Inúmeros estudos têm demonstrado que antígenos secretados e/ou expostos na superfície do verme adulto podem influenciar na resposta inflamatória gerada ao redor dos ovos durante a formação do granuloma. Esses componentes antigênicos já foram associados tanto à exacerbação da patologia (Ellner *et al.*, 1981) quanto ao controle do tamanho do granuloma (Boulanger *et al.*, 1981).

A caracterização do extrato solúvel de verme adulto de *S. mansoni* (SWAP) através do fracionamento em sistema de FPLC possibilitou o isolamento de seis frações dependentes da concentração de NaCl que foram enumeradas de I a VI e submetidas a ensaios imunológicos para se avaliar a imunogenicidade de cada uma delas (Hirsch & Goes, 1996).

Em ensaios de imunização de camundongos com as frações de SWAP, o grupo imunizado com a fração PIII apresentou uma maior redução no número de vermes recuperados do sistema porta-hepático em relação aos grupos imunizados com as demais frações de SWAP. Além disso, PIII inibiu a resposta granulomatosa no pulmão e no fígado, reduzindo o número e tamanho de granulomas nesses órgãos (Hirsch *et al.*, 1997). Esses resultados reforçaram a idéia de que antígenos de SWAP, da mesma forma que os antígenos de ovo, poderiam estar envolvidos na resposta granulomatosa e também na modulação dos granulomas durante a esquistossomose mansônica.

A fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na imunomodulação por PIII, Oliveira e colaboradores (1998) demonstraram que a imunização com esse antígeno é capaz de aumentar significativamente a produção de óxido nítrico (NO) pelas células do baço de camundongos imunizados, sugerindo um papel para essa molécula induzida por PIII. Além disso, PIII ativava um aumento na secreção de IL-10, mas não de IL-2 e INF- γ (Oliveira *et al.*, 1999).

Outra abordagem utilizada para avaliar o papel imunomodulador de PIII se baseou na vacinação de camundongos através de injeção intravenosa de macrófagos peritoneais e esplênicos previamente cultivados em meio contendo PIII (Gustavson *et al.*, 2002). Foram evidenciados granulomas significativamente menores no grupo de animais imunizados com macrófagos – PIII em comparação com aqueles que receberam SWAP, SEA ou BSA. A mesma resposta imunomoduladora de PIII foi verificada em ensaios de granuloma *in vitro*.

Com o objetivo de caracterizar os componentes de PIII, foi realizada a separação eletroforética seguida de ensaio de “western blot”. Através da reação de soros de coelhos

imunizados com PIII, foi possível visualizar o reconhecimento de bandas eletroforéticas de pesos moleculares variados (24, 35, 44 e 97 kDa) referentes aos componentes de PIII, denominados, respectivamente, de P24, P35, P44 e P97. Os antígenos P24 e P35 foram utilizados na imunização de camundongos BALB/c e induziram uma diminuição no tamanho do granuloma hepático após a infecção desafio (Gustavson *et al.*, 1998).

A caracterização molecular de alguns componentes de PIII foi estabelecida por Makarova e colaboradores (2003) através da construção de uma biblioteca de cDNA de verme adulto e a seleção dos preditos clones foi realizada utilizando soro de coelho anti-PIII. Os clones positivos foram sequenciados e as sequências obtidas foram comparadas àquelas já depositadas em banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Três proteínas foram identificadas: as proteínas Sm 21.7, frutose 1,6-bifosfato aldolase (1,6-FBPA) e Sm 22.3. Através de análises de “western blot” utilizando soros de coelho anti-P24 e anti-P44, evidenciou-se o reconhecimento específico das bandas referentes à Sm 22.3 e à 1,6-FBPA, respectivamente, o que permitiu a caracterização das proteínas P24 e P44 recombinantes (Makarova *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2008). De maneira semelhante, a proteína recombinante (r)P22, outro componente da fração PIII, foi identificada como sendo a proteína Sm21.7. Dentre essas três proteínas já caracterizadas, somente rP22 e rP44 apresentaram boas taxas de expressão em sistemas procariotos, e, por isso, foram escolhidas como objetos de estudo deste trabalho.

1.10 As proteínas rP22 e rP44 recombinantes de *S. mansoni*

O interesse crescente em identificar e caracterizar novos alvos para fármacos com ação anti-esquistossomótica ou novos componentes vacinais contra a esquistossomose tem motivado o estudo de novas proteínas de *S. mansoni*.

A proteína P44 de *S. mansoni* foi primeiramente identificada por El-Dabaa e colaboradores (1998) como sendo um componente da família das proteínas frutose 1,6-

bifosfato aldolases (1,6-FBA), enzimas importantes da via glicolítica. As enzimas dessa família de proteínas catalisam a transformação de frutose 1,6-bifosfato em gliceraldeído 3-fosfato e diidroxicetona-fosfato e são amplamente encontradas na natureza.

A proteína P44 é encontrada nas formas evolutivas do verme adulto, cercária, esquistossômulo de 5 e 25 dias e ovos de *S. mansoni*. Além disso, essa proteína já foi caracterizada como um componente do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* e está associada a porções do tegumento semelhantes a estruturas de cavéolas, conhecidas como complexos insolúveis a detergentes (do inglês, “detergent insoluble complexes” - DIC) (El-Dabaa *et al.*, 1998; Racoosin *et al.*, 1999).

Apesar da estrutura terciária da proteína P44 de *S. mansoni* ainda não ter sido descrita, várias proteínas da família das frutose 1,6-bifosfato aldolases já possuem sua estrutura tridimensional resolvida, o que pode auxiliar estudos de similaridade entre proteínas da mesma família. A estrutura mínima de uma cadeia da frutose 1,6-FBA apresenta motivos conservados de ligação ao fosfato e uma estrutura de TIM barril que contém resíduos de aminoácidos formando o domínio catalítico da enzima (Figura 6).

Em 2008, Marques e colaboradores testaram a proteína P44 recombinante em animais experimentais como antígeno vacinal na esquistossomose. A imunização com esse antígeno promoveu uma redução de 57% do número de vermes recuperados do sistema porta-hepático, além de reduzir em 50% o tamanho dos granulomas no fígado de camundongos imunizados.

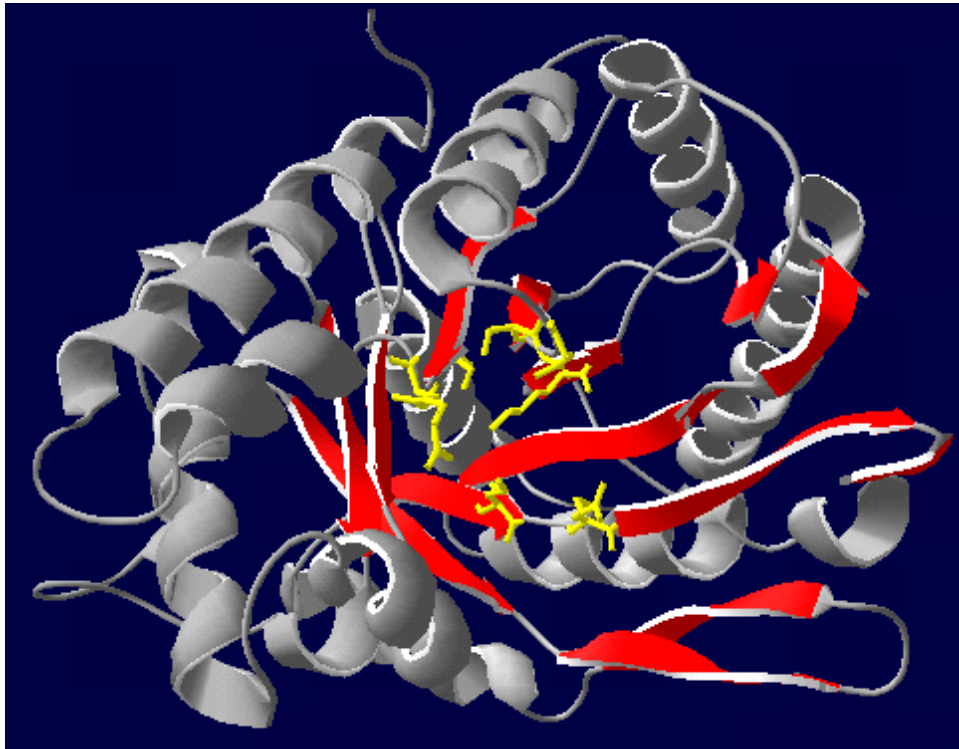


Figura 6: Representação da estrutura tridimensional da cadeia da frutose bifosfato aldolase C humana. Folhas β (em vermelho) formam a estrutura de TIM barril onde estão localizados os resíduos de aminoácidos que formam o domínio catalítico da enzima (em amarelo). Código PDB: 1XFB (<http://www.rcsb.org/>).

A proteína P22 é um constituinte de PIII, uma fração do SWAP, produzida em nosso laboratório e já conhecida apresentar atividade protetora e imunomoduladora na esquistossomose experimental (Hirsch & Goes, 1996). A capacidade protetora, assim como a caracterização bioquímica e imunológica da rP22 ainda não foram descritas. Portanto, o estudo de suas propriedades pode contribuir para a descoberta de novos antígenos protetores potencialmente úteis no desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica.

II - JUSTIFICATIVA

A vacinação vem sendo uma das estratégias de escolha para erradicar as infecções helmínticas, inclusive aquelas causadas pelo *Schistosoma mansoni*. Embora a quimioterapia promova uma pausa temporária da infecção, a reversão para altos níveis de infecção entre os indivíduos e as comunidades geralmente ocorre na ausência de um tratamento contínuo. A vacinação é considerada preferível a uma intervenção quimioterápica preventiva de longa duração. O controle dos hospedeiros intermediários tem se mostrado extremamente difícil, sendo que sua erradicação requer novas estratégias. Melhorias nas condições sócio-econômicas em habitação e saneamento básico não têm se materializado na maioria dos países atingidos, tendo como consequência a manutenção dos altos índices de infecções helmínticas. A vacinação, portanto, oferece a perspectiva de um processo simples para interromper a transmissão e evitar as doenças parasitárias (Bethony *et al.*, 2011).

Os requisitos ideais de uma vacina anti-esquistossomótica não estão relacionados somente à capacidade de redução do número e a fertilidade de vermes adultos de *S. mansoni*, mas também à capacidade de redução da morbidade associada à esquistossomose, através da regulação da resposta granulomatosa aos ovos que permanecem retidos nos tecidos hepático e intestinal do hospedeiro (Bergquist, 2004).

Uma das alternativas utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica é a clonagem dos genes codificadores de proteínas de *Schistosoma* que apresentaram altos índices de proteção em ensaios de imunização na esquistossomose experimental. Muitos antígenos recombinantes já foram testados e apresentaram taxas de proteção imunitária de aproximadamente 50%. Embora os índices de proteção obtidos até o momento não sejam satisfatórios, acredita-se que mesmo a redução parcial da carga parasitária poderia contribuir consideravelmente para a redução da morbidade e limitar a transmissão da doença (Capron *et al.*, 2002).

Levando-se em consideração os resultados promissores obtidos em ensaios de proteção e na imunomodulação da resposta granulomatosa *in vivo* e *in vitro* com PIII e com alguns de seus componentes, a produção e caracterização da resposta imunológica gerada

pela imunização individual ou combinada com as proteínas recombinantes P22 e P44 de *S. mansoni*, ambas constituintes de PIII, pode ser uma interessante alternativa na construção de uma vacina. Outra abordagem complementar ao estudo das proteínas rP22 e rP44 como antígenos vacinais é a investigação dos epítomos lineares de linfócitos B presentes na estrutura da rP22 e rP44 e que são predominantemente reconhecidos por soros de animais imunizados e por soros de pacientes esquistossomóticos, o que poderia auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na imunorregulação promovida por PIII, na identificação da contribuição individual de cada proteína da preparação multi-antigênica no processo de proteção, além de determinar as diferenças de respostas geradas na utilização da preparação antigênica em relação ao uso de cada um dos antígenos isolados.

Todo este trabalho visa desenvolver alternativas para o controle da esquistossomose mansônica, através da pesquisa de antígenos capazes de induzir resposta protetora e imunomoduladora da reação granulomatosa.

III - OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar, bioquímica e imunologicamente, as proteínas recombinantes rP22 e rP44 de *Schistosoma mansoni* e avaliar o seu potencial papel protetor na esquistossomose experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar e expressar as sequências codificadoras das proteínas rP22 e rP44 de *S. mansoni* em sistema para expressão em procarioto.
- Determinar o efeito protetor da vacinação com as proteínas rP22 e rP44, individualmente e associadas, na esquistossomose experimental.
- Avaliar as respostas imunes humoral e celular para as proteínas rP22 e rP44 na esquistossomose experimental.
- Caracterizar bioquimicamente a proteína rP22 através das análises de difração circular (CD) e espalhamento dinâmico da luz (DLS).
- Localizar a proteína rP22 nos tecidos de algumas formas evolutivas de *S. mansoni*.
- Predizer os epítomos lineares reconhecidos por linfócitos B nas estruturas da rP22 e rP44 e avaliar o reconhecimento dos epítomos pelo soro de animais imunizados com as proteínas recombinantes.
- Analisar o reconhecimento de anticorpos de pacientes esquistossomóticos frente aos epítomos das proteínas rP22 e rP44.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amplificação das sequências gênicas das proteínas rP22 e da rP44

As seqüências gênicas que codificam as proteínas rP22 e rP44 de *S. mansoni* foram amplificadas com iniciadores que contém regiões de recombinação necessárias ao uso do sistema escolhido, o sistema de clonagem “Gateway Technology” com Clonase II (“Invitrogen Life Technologies”, Carlsbad, EUA).

O sistema de clonagem “Gateway” se baseia nas reações de recombinação do fago lambda para facilitar a transferência de seqüências de DNA heterólogas (flanqueadas por sítios de recombinação modificados, *att*) entre vetores (Hartley *et al.*, 2000; Handbook, 2004). Esse sistema foi desenvolvido para a expressão da proteína fusionada a uma porção N ou C-terminal capaz de se ligar a colunas de afinidade, como a cauda de histidinas (His). A fusão à cauda de histidinas permite a purificação relativamente fácil da proteína, utilizando cromatografia de afinidade.

Além disso, os vetores compatíveis com esse sistema de clonagem e utilizados nesse trabalho contém um gene letal, o gene *ccdB* entre os sítios de recombinação. Se a seqüência gênica a ser clonada não se ligar ao plasmídeo, o gene *ccdB* permanece, e, uma vez que seu produto de expressão interfere no sistema de replicação bacteriano, a sua presença elimina aquelas bactérias que não contém o gene de interesse. Isso permite alta eficiência na seleção de clones positivos que contenham a seqüência clonada. O sistema Gateway é composto de duas reações de recombinação: BP e LR (Figura 7).

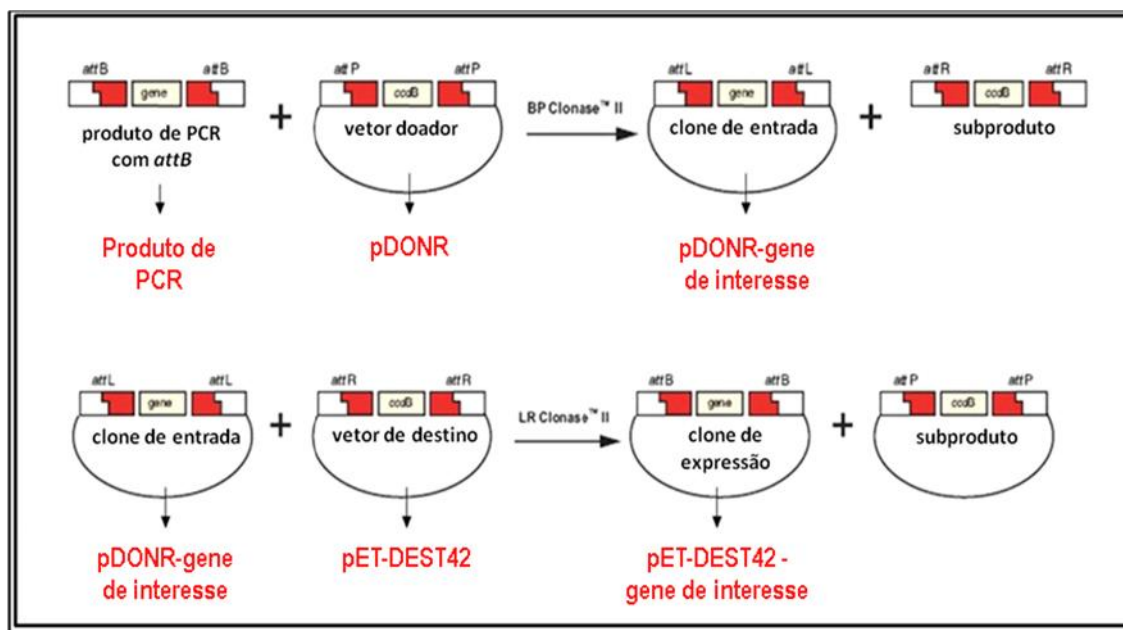


Figura 7: Esquema representando as reações de recombinação BP e LR e os vetores envolvidos. Adaptado do manual “Gateway Technology” with Clonase II (Handbook, 2004).

As seqüências gênicas da rP22 e rP44 identificadas previamente por Makarova (2003) foram utilizadas para o delineamento dos iniciadores específicos e foram amplificadas a partir do cDNA de verme adulto, através de PCR. Para a obtenção do cDNA, foi realizada a extração de RNA total do verme adulto, utilizando Trizol (Invitrogen Life Technologies) e seguindo as orientações do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro a 260nm (Eppendorf Biophotometer). A qualidade do RNA obtido foi avaliada pela relação $OD_{260}/OD_{280} > 1,6$ e a concentração das amostras variou entre 3,4 a 3,65 mg/mL. As amostras de RNA foram utilizadas para a produção de cDNA com o Kit da Fermentas Life Sciences, RevertAid™ H “Minus First Strand cDNA Synthesis”, seguindo as recomendações do fabricante.

Foi preparada uma reação de 50 μ L utilizando 130 ng do cDNA como DNA molde, 10 μ M de cada iniciador, 0,4u de Platinum Pfx DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies), 50mM de $MgSO_4$, 10mM da mistura de desoxinucleotídeos, e tampão de amplificação Pfx 10X que é fornecido pelo fabricante. A reação foi submetida aos seguintes ciclos:

Materials e Métodos

1. Ciclo inicial de desnaturação a 94 °C durante 3 minutos;
2. 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, anelamento a 52 °C durante 45 segundos e extensão a 68°C durante 1 minuto;
3. Ciclo final de extensão a 68°C durante 3 minutos.

Os iniciadores utilizados para a amplificação foram:

rP22

Direto:

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTT**CGAAGGAGATAGA**ACCATGGATAGTCC
AATGGAAAAATTTATT 3'

T_{anelamento}: 53 °C

Reverso:

5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTTACTTGGTGTACGCCAAG 3'

T_{anelamento}: 52 °C

rP44

Direto:

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTT**CGAAGGAGATAGA**ACCATGTACACGCTT
CCAACCTTAC 3'

T_{anelamento}: 52 °C

Reverso:

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATAAGCGTGATTAGCAACGAACAA 3'

T_{anelamento}: 52 °C

Os sítios *attB*, essenciais para a clonagem no sistema Gateway estão sublinhados. A seqüência “Shine Dalgarno”, que permite o reconhecimento da maquinaria de tradução da bactéria, está marcada em negrito.

As seqüências gênicas das proteínas rP22 e rP44 utilizadas na confecção dos primers estão representadas abaixo:

Sequência da nucleotídica da rP22

ATGGATAGTCCAATGGAAAAATTTATTCAACTTATTTAACTTTACTTCGTGATGGTGATGAACTGTTGAAACA
AGTAAATTAAGTGAAAGTTGTAGAAAAGAAAACTTGATATGAAACAAGTTAATGAGTGGATTGCTCTTTTCGAT
GTAGACAAAAGATCAAAAAATCACTTTTGAAGAATTTTGTCTGGTTTGGGATTGAAACAGAATGAAATGCGTATT
GAACGAAATCACATTAATACTGTACAGTCAGGTAGAGAACAAAGCTTACCAGAAGGAGTAAGCATTATCGCTTCA
ACAATGCCAAAACCAAAAACAAGTTGAAGTAACACAATTATTTAAAGATATATATAATGAAGTTAAAAAAGATCCT
GATATGAATAAAGTTGTAAAAACATTCAAAAGTGAATTAGAAAGACGTTATGGACGTGTATGGCAAGTGAATGCT
GTAACTCATTCACTACTGGGCAAGTTTCTCACATGAACCATCCAATCAATTCATTTCAATATGACAATAAAATC
ATACTTGCTTGGCGTACACCAAGTAACTAG

Sequência da nucleotídica da rP44

ATGTCACGCTTCCAACCTTACCTAACTGAAGTCAAGAGAATGACCTACGCCGAATTGCTCAAGCTATTTGTGCT
CCTGGCAAAGGAATTCTAGCAGCTGACGAAAGCACAGCCACAATGGGCAAAGACTTCAACAGATCGGCGTTGAA
AATAACGAAGAAAATCGTCGTCTGTACCGCCAGCTACTTTTTAGTGTGATCACAAGCTGGCCGAAAATATCTCT
GGAGTAATATTATTCGAAGAGACACTTCATCAAAGTCAGACGATGGAAAGACTCTTCCAACCTCTACTAGCTGAA
CGAAAATATCATAACCAGGAATAAAGGTTGATAAAGGTGTTGTTCCACTTGCAGGCACAGACAATGAGACAACA
CAGGGTCTTGATGATCTTGCTTCACGCTGTGCTGAATATTGGAGACTTGGATGCCGCTTCGCTAAGTGGCGTTGT
GTTTTGAAGATCTCTTCACACACACCCTCTTATCTAGCTATGCTCGAAAATGCTAATGTACTTGCACGTTACGCT
TCCATCTGTCAGCAGAATGGTTTGGTACCGATTGTTGAACCTGAGGTGCTTCCGTGATGGTGATCATGATTTACTA
ACTGCTCAGAGAGTAACAGAACAAGTTTTGGCATTCTGTGTACAAGGCTTTGGCCGACCATCATGTTTACTTAGAA
GGAACGCTTTTAAAACCAATATGGTTACTGCTGGACAGGCCTGCAAAAAAGCTTACACACCACAAGAAAATGCT
TTGGCTACTGTGCGAGCTCTTCAGCGCACAGTCCCTCCAGCTGTTCCAGGTATCACATTCTTGTCCGGAGGTCAA
TCAGAATTGGACGCTACTAAAAATCTGAACGAAATCAACAAGATTCGGGACCAAAGCCATGGGCACTCACTTTT
AGTTTTGGTCTGCTCTGCAGGCTTCAGTCTTAGCCACATGGAAGGGAAAGAAAGAAAATGTTTCATGCGGCTCAG
GAAGAGCTATTGAAATTTGGCCAAAAGCAAAATGGCGCTGCTGCTGTTGGCAAATTTGAAGGAAATATGGGAACTACT
TTGGGAGACAAAATCATGTTCTGTTGCTAATCACGCTTATTAA

4.2 Construção dos plasmídeos recombinantes pET-DEST42-rP22 e pET-DEST42-rP44

Os amplicons gerado para as sequências gênicas da rP22 e rP44 foram visualizados em gel de agarose 1%, corados com *Syber Safe* (Invitrogen Life Technologies) e purificados por precipitação com solução contendo 10% de PEG 8000 e 30 mM de MgCl₂, fornecida pelo fabricante.

Posteriormente, cada fragmento gênico foi clonado no plasmídeo pDONR 221 (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 *overnight* a 25 °C. Em seguida, adicionou-se 1 µL da solução de proteinase K (2 µg/µL), e a reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos para interromper o processo ligação. Todas as enzimas utilizadas foram fornecidas pelo fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Bactérias *Escherichia coli* TOP10 eletrocompetentes foram transformadas com os plasmídeos pDONR-rP22 e pDONR-rP44. Em cada 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 400 µL de meio LB líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%; pH 7,4) e a mistura foi deixada sob agitação por 1 hora a 37 °C para expressão do gene de resistência. Posteriormente, a mistura 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 do PCR de colônia utilizando o programa apresentado no item 4.1 e os iniciadores específicos para as seqüências da rP22 e rP44. Ao término da reação de PCR, foi realizado ensaio eletroforético em gel de agarose 1% para visualizar a presença dos insertos referentes às sequências nucleotídicas de rP22 e rP44.

Os clones que continham o plasmídeo com o inserto de rP22 ou rP44 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 dos clones contendo os plasmídeos recombinantes.

Os clones bacterianos contendo o vetor pDONR-rP22 ou pDONR-rP44 foram cultivados 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 5000 rpm, a temperatura ambiente, foi lisado e os plasmídeos recombinantes purificados com a utilização do Kit Mini-prep QIAprep Spin miniprep 150 (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

A construção obtida a partir da extração plasmidial foi utilizada para fornecer a seqüência nucleotídica a ser ligada ao vetor de expressão através dessa nova reação de recombinação (LR). Para isso, foram utilizados 150ng do plasmídeo recombinante pDONR-rP22 ou pDONR-rP44, 150 ng do vetor de destino pET-DEST42, cujo mapa encontra-se na Figura 8, tampão TE (Tris-EDTA) pH 8,0 para um volume final de 8µL e 2µL da enzima de recombinação LR Clonase II. Novamente, a reação foi incubada *overnight* a 25 °C. Em seguida, adicionou-se 1µL de proteinase K (2µg/µL) a 37°C por 10 minutos de modo a interromper o processo de ligação.

Os plasmídeos recombinantes obtidos através da ligação LR, foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21 por meio de eletroporação. O antibiótico ampicilina foi utilizado na concentração de 100 µg/mL como marcador de seleção. Os clones positivos, que continham a seqüência codificadora de cada proteína (rP22 ou rP44), foram selecionados por PCR de colônias utilizando os iniciadores específicos.

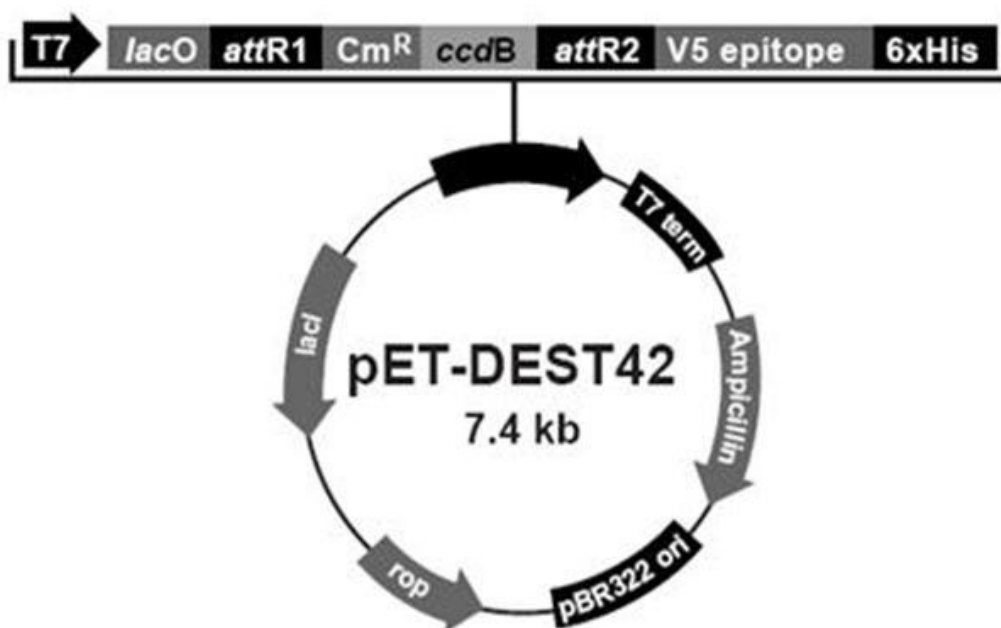


Figura 8: Mapa molecular do plasmídeo pET-DEST42. Neste plasmídeo, observam-se os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*, o gene letal *ccdB*, o V5 epitope e a cauda de histidinas C- terminal.

4.3 Sequenciamento dos fragmentos inseridos nos vetores pET-DEST42-rP22 e pET-DEST42-rP44

Para as análises de seqüenciamento, foi realizada a extração plasmidial de um clone contendo o vetor pET-DEST42-rP22 e outro contendo o vetor pET-DEST42-rP44. Para isso, os clones bacterianos contendo os vetores de interesse foram cultivados a 37°C durante 16 horas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina 100µg/mL. O precipitado bacteriano obtido, após 10 minutos de centrifugação a 5000 rpm, a temperatura ambiente foi lisado e os plasmídeos recombinantes purificados com a utilização do kit Mini-prep QIAprep Spin miniprep 150 (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Os sequenciamentos foram realizados 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 For MegaBACE DNA Analysis* (Amersham

Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando iniciadores T7 específicos para os plasmídeos:

T7 direto:

5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' $T_{\text{anelamento}}: 48^{\circ}\text{C}$

T7 reverso:

5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3' $T_{\text{anelamento}}: 51^{\circ}\text{C}$

Os dados das sequências dos clones da rP22 e rP44 foram exportados e editados no programa ClustalW2 – Multiple Sequences Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Esse método é capaz de separar fragmentos de DNA através de sua migração diferencial na agarose. A localização do DNA é realizada diretamente através dos fluoróforos brometo de etídio e *Syber safe* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) possível devido à afinidade desses componentes por seqüência de nucleotídeos.

O gel constituiu-se de 1% de agarose dissolvida por aquecimento em tampão TAE 1X (1,14 mL ácido acético glacial; 2 mL EDTA 0,5 M e 4,8 g/L Tris-base, pH 8,0). A esta solução adicionou-se brometo de etídio (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Após a polimerização, as amostras foram aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 80V. A visualização das bandas foi realizada utilizando-se radiação ultravioleta.

4.5 Mini-Expressão das proteínas rP22 e rP44

Clones de bactérias *E. coli* BL21 contendo os plasmídeos recombinantes pET-DEST42-rP22 e pET-DEST42-rP44 foram cultivados em 10 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, à 37 °C sob agitação de 150 rpm.

Após 16 horas, as culturas foram diluídas 1:10 em 10 mL de LB/ampicilina 100µg/mL sob agitação a 37 °C. Ao atingir a densidade ótica de 0,5 a 600nm (D.O.₆₀₀) foram adicionados 10 µL de IPTG 1M (USB Corporation, Cleveland, EUA) para induzir a expressão das proteínas recombinantes.

Alíquotas de 1 mL foram coletadas antes e após a indução (tempos 1 a 4 horas). Posteriormente, as alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

O restante das culturas obtido após 4 horas de indução (5 mL) foram centrifugados durante 10 minutos a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O precipitado de bactérias foi lisado pela adição de 0,25% de lisozima em 1 mL de PBS 0,15 M pH 8,4 seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Por fim, o meio foi submetido a 3 ciclos de 30 segundos de sonicação e repouso (*Ultrasonic processor*, Sigma, St. Louis, EUA) à 30% de amplitude.

Os extratos obtidos da mini-expressão foram centrifugados novamente a 10.000 rpm em centrífuga Sorvall RC5C rotor GSA durante 30 minutos, sendo o sobrenadante e o pellet submetidos à eletroforese SDS-PAGE 10 % para verificar a presença da proteína rP22 ou rP44 no pellet ou no sobrenadante.

4.6 Eletroforese em gel de Poliacrilamida – “SDS-PAGE”

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, como descrita por Laemmli (1970), no sistema da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). As proteínas foram fervidas por 10 minutos em tampão da amostra (SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,002% em 0,065 M Tris-HCl, pH 6,8) e separadas em gel contendo poliacrilamida (10%), bis-acrilamida (0,3%) e SDS (0,1%), em 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8. O gel de concentração foi constituído de poliacrilamida (3%), bis-acrilamida (3%) e SDS (0,1%) em 0,125 M Tris-HCl pH 6,8. Os géis

de separação e concentração foram polimerizados na presença de persulfato de amônio (0,1%) e TEMED (1:2.000, v/v). A separação foi realizada em tampão constituído de glicina (0,192 M), SDS (0,1%) e Tris (0,25 M) pH 8,5 em uma voltagem constante de 90 V. Após a eletroforese, os géis foram corados pelo azul de Coomassie, ou então transferidos para membranas de nitrocelulose.

Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi incubado por 2 horas em solução de metanol (15%), ácido acético (7%) e “Coomassie Brilliant Blue” R250 (0,5%). A seguir, a solução metanol 10% e ácido acético 5% foi utilizada para a remoção do excesso de corante. Os géis foram então fotografados.

4.7 Eletrotransferência de proteínas – “Western blot”

Segundo a técnica adaptada de (Towbin *et al.*, 1979), após a corrida eletroforética das proteínas de interesse, o gel de poliacrilamida 10% foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (BioAgency, São Paulo, Brasil), ambos embebidos em tampão 0,025 M de Tris, 0,192 M de glicina pH 8,5 e metanol 20%. O sistema foi colocado em uma cuba específica para eletrotransferência (BioRad, Hercules, EUA) sendo submetido à uma voltagem constante de 100 V durante 1 hora em banho de gelo. Após ser retirada do sistema, a membrana foi bloqueada por 1 hora em PBS 0,15 M contendo 1,6% de caseína.

Após três lavagens com tampão PBS 0,05M, Tween 0,05%, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo específico Ig anti-histag de camundongo (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) diluído 1:3.000 em PBS 0,15M contendo 0,25% caseína. Após mais um ciclo de três lavagens, foi adicionado anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – *whole molecule* – peroxidase conjugate, Sigma, St. Louis, EUA) na diluição de 1: 5.000 em PBS 0,15M contendo 0,25% caseína foi adicionado e incubado por 1 hora. Após mais um ciclo de lavagens, a membrana foi revelada em tampão contendo 3,3’aminobenzidina (DAB) 600 µg/mL, 10 µl/mL cloreto de

níquel e 1 µl/mL H₂O₂, diluídos em 20 mL de PBS 0,15 M. A reação foi interrompida com água deionizada e a membrana foi posteriormente fotografada.

4.8 Expressão das proteínas recombinantes rP22 e rP44

Os clones sequenciados de bactérias *E. coli* BL21 contendo o inserto correspondente da proteína foram selecionados e cultivados em 10 mL de meio líquido LB/ampicilina 100 µg/mL à 37 °C sob agitação. Após 16 horas, cada cultura foi diluída 1:100 em 1 litro de LB/ampicilina 100 µg/L sob agitação de 150 rpm a 37°C. Ao atingir a D.O.₆₀₀ de 0,5, 1 mL de IPTG 1 M foi adicionado para induzir a expressão da proteína recombinante.

Após 4 horas, o meio foi centrifugado durante 10 minutos a 5.000 rpm e o precipitado de bactérias expressando a proteína rP22 foi congelado e descongelado e posteriormente lisado com tampão de lise (1% sacarose, 1% Tween 20 e 1% glicerol em 50 mM Tris-HCl pH 7,4). As células induzidas com IPTG foram sonicadas por 3 ciclos de 30 segundos intercalados por repouso de 30 segundos e o lisado celular foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos em centrífuga Sorvall RC5C rotor GSA. O sobrenadante obtido foi estocado para ser utilizado nas etapas posteriores de purificação.

Já o precipitado de bactérias expressando a rP44, após 4 horas, foi lisado em PBS 0,15M pH 7,2 acrescido de fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF) (Sigma-Aldrich). 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 10.000 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido foi novamente ressuspensionado em PBS 0,15M com PMSF e EDTA e o procedimento mencionado anteriormente foi repetido 4 vezes. Após esses ciclos o precipitado obtido foi ressuspensionado em um tampão contendo 0,5M de NaCl, 30mM de imidazol e 0,9% de N-Laurilsarcosinato de sódio (Sigma-Aldrich) em 20mM de Na₂HPO₄ pH 7,4. Esse material foi estocado para ser utilizado nas etapas posteriores de purificação.

4.9 Purificação das proteínas rP22 e rP44 em coluna His Trap HP

Para a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade, cada material obtido 4.8 contendo imidazol, em uma concentração final de 30 mM, foi aplicado em coluna de níquel de 5 mL His Trap HP (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) conectada a AKTa Prime (GE Healthcare Biosciences).

Cada coluna foi previamente equilibrada com 25 mL de tampão de ligação contendo 0,5M NaCl e 30 mM imidazol em 20 mM de fosfato de sódio pH 7,4. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação até que nenhuma leitura espectrofotométrica fosse observada a 280 nm. Após esse período, a proteína foi eluída com tampão de ligação contendo, além de solução contendo 20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M de NaCl e imidazol 0,5 M pH 7,4.

As amostras recolhidas durante de cada eluição foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 20mM e NaCl 20 mM, em pH 7,4 para amostras de rP22 e rP44 que seriam utilizadas posteriormente nos ensaios de imunização, e em pH 6,8 para a amostra de rP22 que seria utilizada em ensaios de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico da luz (DLS – “dynamic light scattering”). Para estes últimos ensaios foi realizada nova purificação da amostra de rP22 através de cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (GE Healthcare Biosciences). A coluna foi conectada ao Akta Prime e previamente equilibrada com tampão fosfato pH 6,8 e NaCl 20 mM. A amostra de rP22 previamente purificada foi adicionada à coluna e foi posteriormente eluída no tampão fosfato 20mM e NaCl 1M pH 6,8.

4.10 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração das proteínas em solução foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Esse método baseia-se na coloração diferencial de proteínas em concentrações variadas e leitura em espectrofotômetro. As amostras de 20 µl

em diferentes diluições foram distribuídas em duplicata em placas de 96 poços com adição de 180 μL de reagente de Bradford (0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa contendo 5% etanol e 10% ácido fosfórico, filtrado em papel de filtro número 1). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA) no modo Absorvância 595nm, e os valores obtidos comparados com uma curva padrão de BSA 0,25 μg ; 0,5 μg ; 1,0 μg e 1,5 μg ; conforme a fórmula: [] proteína = Abs x Fc x Fd x Cv, no qual: (Abs – média das leituras das amostras em duplicata; Fc – fator de conversão – concentração de proteína para cada ponto da curva de BSA; Fd – fator de diluição; Cv – fator de correção de volume para obter-se a concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Outro método utilizado para dosagem das proteínas foi através da medida da absorvância a 280 nm. Como as proteínas já tiveram suas sequências primárias determinadas, o coeficiente de extinção molar de cada uma foi obtido no servidor ExPASy – ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Com o uso da seguinte fórmula: $A = \epsilon \cdot \tau \cdot c$, onde A, é a absorvância a 280 nm; ϵ , o coeficiente de extinção molar; τ , o caminho óptico da cubeta em cm, e c, a concentração molar da proteína. Para a rP22, $\epsilon = 31065 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para a rP44, $\epsilon = 35785 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.11 Espalhamento dinâmico da luz (DLS – *dynamic light scattering*) da proteína rP22

As análises estruturais por espalhamento dinâmico da luz (DLS) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo.

A proteína rP22 após ser purificada e dialisada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,8 e NaCl 20 mM foi submetida ao DLS e utilizada na concentração de 2,5 mg/mL. A amostra protéica foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para retirar qualquer material suspenso. Um volume de 90 μL do sobrenadante de cada proteína

foi colocado em uma cubeta de quartzo de 3 mm de caminho óptico. A cubeta foi acoplada ao aparelho DynaPro (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, EUA) com temperatura controlada em 18 °C. Os dados coletados após 300 medidas foram analisados no programa Dynamics V6. O valor médio do raio da molécula foi expresso em nanômetros e seu peso molecular em kDa.

4.12 Estudos de estrutura secundária da proteína rP22 por Dicroísmo circular (CD – *circular dichroism*)

Para estudos de estrutura secundária, a proteína rP22 foi utilizada na concentração de 0,25 mg/mL em tampão fosfato de sódio 2 mM, pH 7,4 e NaCl 2 mM. Essas amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente para retirar qualquer material suspenso. Um volume de 200 µL foi submetido ao dicroísmo circular.

Os espectros de dicroísmo circular foram medidos com o espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco corporation, Tóquio, Japão) com a temperatura variando de 20 a 80 °C em uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico, entre 190 a 260 nm de comprimento de onda. Cada espectro corresponde à diferença entre a média das 10 varreduras realizadas para cada proteína e as 5 varreduras realizadas para o tampão em que elas estavam diluídas.

Os parâmetros utilizados foram os seguintes: sensibilidade: standard (100 mdeg); início: 260 nm; fim: 190 nm; *data pitch*: 0,5 nm; modo de varredura: contínuo; velocidade de varredura de 50 nm/min; resposta de 4 s; raio de 1 nm e acumulação de 10 leituras.

4.13 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

4.13.1 Camundongos e coelhos

Camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade foram usados para infecção e obtenção das formas evolutivas do parasita (vermes adultos e ovos), bem como para os ensaios de proteção. Coelhos New Zealand com 8 semanas foram utilizados em ensaios de imunização para obtenção de soro imune à proteína rP22. Esses animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB. Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos éticos tendo sido avaliados e aprovados pelo CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal, N° do protocolo – 043/2008.

4.13.2 Cercárias

Cercárias da cepa LE de *S. mansoni* foram mantidas rotineiramente em caramujos *Biomphalaria glabrata* no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e preparados por exposição dos caramujos infectados à luz por 1 hora para induzir a eliminação de cercárias.

Para contagem das cercárias, 40 mL da suspensão foram transferidos para um béquer de 100 mL. Nesse béquer foi colocada uma lâmina de plástico rígido, perfurada e destinada a homogeneizar a suspensão, garantindo a distribuição uniforme das cercárias. Amostras de 0,5 mL da suspensão foram colocadas em placas de vidro quadriculadas onde as cercárias foram coradas com lugol para posterior contagem das mesmas.

4.14 Preparação antigênica solúvel de verme adulto (SWAP)

Camundongos C57BL/6 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 & 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). No sobrenadante obtido foi feita a dosagem de proteína, segundo Bradford (1976). Alíquotas foram armazenadas a -70°C, até o uso. O sedimento da primeira centrifugação foi levado a uma segunda extração, seguindo o mesmo procedimento.

4.15 Obtenção de soro de coelho imunizado com a proteína rP22

Soro anti-rP22 foi obtido de coelho imunizado por três vezes com 100 µg da proteína rP22 purificada, através de injeções intramusculares em intervalos de 15 dias para cada imunização. Na primeira imunização, o antígeno foi emulsificado com adjuvante completo de Freund e nas imunizações subseqüentes foi emulsificado com adjuvante incompleto de Freund. Sangue desse animal foi coletado antes da primeira imunização (pré-imune) e após cada uma delas, para a obtenção do soro.

4.16 Imunolocalização da proteína rP22 por microscopia confocal

Os fígados de camundongos infectados por *S. mansoni* foram removidos e os vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático para serem utilizados nas análises

de microscopia confocal. Os vermes adultos e os fígados fixados em DMSO-álcool metílico na proporção de 1:5 e submetidos a uma série de três imersões em álcool absoluto e duas em xilol nesta sequência, durante 30 minutos cada. Os tecidos foram embebidos em Paraplast Plus (Sigma, EUA) conforme recomendação do fabricante, submetidos a microcortes de 7 μm de espessura que foram fixados em lâminas. Os cortes foram desparafinizados em uma série de três imersões em xilol, álcool absoluto, álcool 95% e álcool 80%, lavados com água destilada e posteriormente lavados com PBS 0,15 M. Os cortes foram novamente fixados com solução de paraformaldeído 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois lavados com PBS 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Em seguida, os cortes foram bloqueados com BSA 1% diluídos em PBST e durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, por mais três vezes, os cortes foram lavados com PBST por 5 minutos cada e incubados com soro de coelho anti-rP22 diluído 1/50 em tampão de bloqueio durante 2 horas. O soro pré-imune de coelho foi utilizado como controle negativo. As amostras foram lavadas três vezes com PBST e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen, EUA) diluído 1/100 em tampão de bloqueio contendo a sonda Hoescht (Invitrogen, EUA) para corar os núcleos celulares, durante 1 hora ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas novamente com PBST e montadas com a adição de solução Hydromount (National Diagnostics, Atlanta, EUA) e uma lamínula sobre cada corte. Os cortes foram então visualizados em microscópio confocal Zeiss 510 Meta com a objetiva de imersão. Todos os parâmetros utilizados e configurações do microscópio foram mantidos para todas as amostras.

4.17 Imunização de camundongos e infecção desafio

Camundongos C57BL/6 foram distribuídos em cinco grupos, contendo 7 animais por grupo, para iniciar o esquema de imunizações. Os camundongos foram imunizados com três

doses de 50 µg de antígeno em intervalos de 15 dias entre cada dose. Somente o grupo Duas Proteínas (DP) foi imunizado com 25 µg de rP22 + 25 µg de rP44. A vacinação foi realizada através de injeção subcutânea de antígeno juntamente com 100 µg de *Corynebacterium parvum* e 1 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] como adjuvante. A tabela abaixo mostra a distribuição dos grupos:

Tabela 1: Esquema de imunização e infecção experimental em modelo murino

GRUPO	IMUNIZAÇÃO	INFECÇÃO
Salina	PBS 0,15M	25 cercárias
Adjuvante	<i>Corynebacterium parvum</i> e [Al(OH) ₃]	25 cercárias
SWAP	Adjuvante + SWAP	25 cercárias
rP22	Adjuvante + rP22	25 cercárias
rP44	Adjuvante + rP44	25 cercárias
Duas Proteínas (DP)	Adjuvante + rP22 + rP44	25 cercárias

Após 10 dias da última imunização, os grupos de camundongos a serem desafiados, receberam 25 cercárias viáveis por via percutânea. Contados 60 dias de infecção desafio, os animais foram sacrificados e o sistema porta-hepático foi perfundido para a obtenção dos vermes adultos. Foi realizada a retirada do fígado dos animais para análise histológica e para a contagem de ovos retidos no fígado. Os baços dos camundongos também foram extraídos para a realização de ensaios proliferação e dosagem de citocinas. Foi feita a coleta de sangue dos animais durante todo o processo de imunização/infecção, incluindo o soro pré-imune, como forma de monitorar a reatividade dos soros através de ELISA.

4.18 Recuperação de Vermes Adultos

Camundongos foram desafiados 10 dias após a terceira imunização através de exposição percutânea da pele do abdômen com 25 cercárias da cepa LE. Após 60 dias do início da infecção desafio, foi realizada a perfusão da veia porta dos camundongos usando solução NaCl 1,7% (solução salina) contendo heparina 0,05 U/mL para a recuperação dos vermes adultos (Smithers & Terry, 1965). Os níveis de proteção foram calculados comparando o número de vermes recuperados de cada grupo imunizado com o grupo controle (grupo adjuvante), usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de proteção} = 100 - (VE/VC) \times 100$$

VE= número de vermes recuperados no grupo experimental

VC= média do número de vermes recuperados no grupo controle

4.19 Determinação do número de ovos retidos no tecido hepático

Os fígados de camundongos dos grupos imunizados com rP22, SWAP, rP44 ou DP e desafiados com 25 cercárias, além dos grupos controle Salina e Adjuvante, foram removidos após 8 semanas de infecção para a determinação do número de ovos retidos no fígado. Para essa análise, foi utilizado o método adaptado de (Cheever & Powers, 1968) em que os fígados foram pesados e a porção correspondente ao lobo hepático esquerdo foi retirada, pesada e colocada individualmente em solução de KOH 5% para a completa digestão do tecido hepático durante 2 dias (Cheever & Powers, 1968). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm e lavadas três vezes com PBS 0,15 M para a retirada da porção lipídica. Após a última centrifugação, todo o líquido foi retirado e o precipitado foi ressuspenso em 5 mL de PBS 0,15 M. Uma alíquota de 50 µL de cada suspensão foi colocada em lâmina e coberta com uma lamínula para a contagem dos ovos ao microscópio óptico no aumento de 10X. A contagem foi feita em triplicata e a média das contagens foi

utilizada para determinar o número de ovos por grama (epg) de tecido hepático de cada animal.

4.20 Medida da área do granuloma e da fibrose hepática

O fígado dos camundongos, tanto dos grupos controle Salina e Adjuvante quanto dos grupos imunizados com as diversas preparações vacinais (SWAP, rP22, rP44 e DP) foram coletados 60 dias após a infecção para avaliar os efeitos da imunização na formação do granuloma. Os fígados foram fixados em DMSO-álcool metílico na proporção de 1:5 e submetidos a uma série de três imersões em álcool absoluto e duas em xilol nesta sequência, durante 30 minutos cada. Os tecidos foram embebidos em Paraplast Plus (Sigma, EUA) conforme recomendação do fabricante, submetidos a microcortes de 5 μm de espessura que foram fixados em lâminas. Para a análise da área dos granulomas, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e para a análise da área de fibrose, os cortes foram corados com Tricromo de Masson (Hirata et al., 1993); A área dos granulomas individuais foi obtida através do software MacBiophotonics Image J. Quinze granulomas de cada camundongo contendo um único ovo de *S. mansoni* bem definido foram escolhidos aleatoriamente utilizando o microscópio ótico no aumento de 10X. As imagens foram obtidas através da microcâmera JVC TK-1270/RGB. Utilizando a marcação digital, os resultados da área total de cada granuloma e da área de fibrose foram expressos em micrômetros quadrados (μm^2).

4.21 Ensaio de proliferação celular

Baços de camundongos dos grupos Salina, Adjuvante, SWAP rP22, rP44 e DP foram macerados individualmente para obtenção dos esplenócitos. As células do baço foram lavadas duas vezes em com meio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, EUA), através de

centrifugações sucessivas de 1200 rpm com duração de 10 minutos cada. Foi realizada a lise das hemácias com a adição de PBS 1,5 M estéril seguida imediatamente pela adição de água deionizada estéril para alcançar a concentração final de PBS 0,15 M. As células foram então centrifugadas, lavadas com meio RPMI e centrifugadas novamente. A concentração celular foi ajustada 1×10^6 células/poço em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 3,6 g/L de HEPES, piruvato de sódio (110 μg /mL), 100U/mL de penicilina G sódica, 100 μg /mL de sulfato de estreptomicina. As células foram distribuídas em placas de 96 poços, em triplicata, e estimuladas por 96 horas com SWAP (50 μg /mL), rP22 (50 μg /mL), rP44 (50 μg /mL), Duas Proteínas (25 μg /mL de rP22 + 25 μg /mL de rP44) e ConA (16 μg /mL). O mitógeno ConA foi utilizado como controle positivo da proliferação celular. No quarto dia de cultura, solução de MTT (5mg/mL) foi adicionada às placas que foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, durante 2 horas (Mosmann, 1983). As placas foram centrifugadas, com a retirada do sobrenadante e adição de solução de SDS/HCl 10%, para solubilização dos cristais de formazan, sendo novamente incubadas a 37°C. Após 12 horas de incubação, o sobrenadante da cultura foi transferido para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura espectrofotométrica das placas a 595nm para a determinação da concentração de formazan no meio. Foi calculado o índice de proliferação que corresponde à razão entre a densidade óptica das células na presença de cada estímulo (SWAP, rP22, rP44, DP e ConA) e a densidade óptica das células na ausência de estímulo (células incubadas somente com meio de cultura). O nível proliferação foi determinado a partir da equação abaixo:

$$IP = (\text{OD}_{550} \text{ de células na presença de estímulo} / \text{OD}_{550} \text{ de células na ausência de estímulo})$$

4.22 Dosagem de citocinas

Os experimentos de dosagem de citocinas foram realizados através cultura de esplenócitos obtidos individualmente de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas. Após a maceração dos baços dos camundongos, os esplenócitos foram isolados

e colocados em meio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, EUA) suplementado com 10% de SFB, 3,6 g/L de HEPES, piruvato de sódio (110 µg /mL), 100U/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, em placas de 24 poços, na concentração final de 5×10^6 células, na ausência de estímulo ou na presença dos seguintes estímulos: rP22 (50 µg/mL), SWAP (50 µg/mL), rP44 (50 µg/mL) e Duas Proteínas (25 µg/mL de rP22 + 25 µg/mL de rP44). Foi adicionada às culturas celulares a solução de polimixina B (30 µg/mL) para impedir completamente a produção de citocinas em resposta ao LPS (Farias, 2010). As culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ durante 72 horas. O sobrenadante da cultura foi coletado após 24 horas para dosagem de TNF-α, e 72 horas para a dosagem de IFN-γ, IL-4, IL-10 e TGF-β. Para titulação das citocinas, placas de microcultivo (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas por 18 horas, a 4°C, com anticorpos monoclonais anti-IL-4, anti-TNF-α, anti-IFN-γ, anti-IL-10 e anti-TGF-β (kits Duoset – R&D Systems, EUA). As placas foram lavadas três vezes com PBS 0,15 M contendo 0,05% Tween 20 (PBST) e a ligação não específica foi evitada pela incubação das placas por 1 hora, à temperatura ambiente, com 200 µL/poço de PBS 0,15 M contendo 1% BSA (Sigma). As placas foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100 µL/poço de cada sobrenadante de cultura, além da respectiva curva padrão fornecida pelo kit Duoset, numa diluição seriada apropriada em PBS 0,15 M com 1% BSA. Então, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100 µL/poço de anticorpo de detecção anti-IL-4, anti-IFN-γ e anti-TNF-α diluído em PBS 0,15 M 1%BSA (Duoset – R&D Systems). Novamente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com 100 µL/poço de estreptavidina conjugada à peroxidase diluída 1:2000 em PBS 1% BSA. As placas foram lavadas 3 vezes e a atividade enzimática foi revelada através da incubação com 100 µL/poço de solução reveladora contendo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 2N. A leitura das

placas foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Vermont, EUA) e os resultados foram expressos em pg/mL \pm desvio padrão.

4.23 ELISA para determinação dos níveis de anticorpos

A análise de anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a anti-rP22 e anti-rP44 foi realizada através da adaptação da técnica descrita por Lunde e colaboradores (1979) . Placas de microensaio de 96 poços (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com soluções contendo rP22 ou rP44 (10 μ g/mL) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6, e mantidas por 12 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS 0,05 M contendo 0,05% Tween 20 (PBST) e a ligação não específica foi evitada pela incubação das placas por 1 hora, à temperatura ambiente, com 200 μ L/poço de PBS 0,15 M com 1,6% caseína (Sigma). As placas foram lavadas 5 vezes com PBST e incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, com 100 μ L de soro de camundongo diluído em PBS 0,15 M contendo 0,25% caseína, na diluição de 1/800 para detecção de IgG total e de 1/400 para detecção IgG1 e IgG2a. Novamente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário por 1 hora, à temperatura ambiente. Anticorpos de cabra anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo, conjugados à peroxidase (Southern Biotech®, EUA), foram diluídos em PBS 0,15 M contendo 0,025% caseína, na diluição de 1/5000 para IgG total, e de 1:4000 para IgG1 e IgG2a. Após nova lavagem das placas com PBST, a reação de cor foi desenvolvida pela adição de 100 μ l por poço de solução reveladora de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e 0.04% de H₂O₂ por 15 minutos e interrompida com 50 μ l de solução de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA). As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O) \pm desvio padrão.

4.24 População de estudo

Foram utilizadas, nesse estudo, amostras de plasma de pacientes diagnosticados com esquistossomose, fornecidas pelo Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou, coordenado pelo Prof. Dr Rodrigo Corrêa Oliveira. Os pacientes eram provenientes da cidade de São Pedro do Jequitinhonha, Minas Gerais. O diagnóstico da esquistossomose foi realizado pelas equipes médicas e técnicas responsáveis, através de exames médico-laboratoriais, incluindo exame clínico e exame parasitológico de fezes. Foram excluídos dessa pesquisa indivíduos que trabalhavam em período integral fora da área-alvo, mulheres com teste de gravidez positivo e indivíduos co-infectados por outros helmintos. Foram incluídos na pesquisa somente indivíduos residentes no distrito durante os últimos 24 meses; indivíduos que relataram não terem recebido nenhum tratamento com anti-helmínticos durante os últimos 24 meses; e que consentiram participar do estudo. Os indivíduos selecionados pertenciam a ambos os sexos e tinham idade entre 16 e 48 anos. O número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes (epg) dos pacientes esquistossomóticos variou entre 20 e 258. Todos os indivíduos, após a coleta, que apresentaram diagnóstico positivo para esquistossomose, foram tratados com praziquantel por via oral em dose única de 60 mg/Kg. Os pacientes excluídos dessa pesquisa e que apresentavam exame positivo para outras helmintoses também receberam tratamento específico. Os pacientes esquistossomóticos foram divididos em três grupos: indivíduos diagnosticados na fase aguda da doença; indivíduos diagnosticados na fase crônica da doença que apresentaram quadro de hepatoesplenomegalia ao exame clínico; indivíduos diagnosticados na fase crônica que não apresentavam quadro de hepatoesplenomegalia (pacientes crônicos intestinais). O controle negativo envolveu voluntários saudáveis do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG (ICB), sem histórico de esquistossomose e sorologicamente negativos nos ensaios de ELISA.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou – FIOCRUZ (CEPSH/CPqRR n° 25/2006). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por cada paciente antes da coleta de sangue. Todas as amostras de plasmas humanos utilizadas nesse trabalho estão esquematizadas na Tabela 2:

Tabela 2: Amostras de plasmas testadas em imunoenaios com peptídeos ligados à membrana

Fonte	Número de amostras
Indivíduos não infectados com <i>S. mansoni</i>	15
Pacientes esquistossomóticos na fase aguda da doença	15
Pacientes esquistossomóticos com a forma crônica intestinal	30
Pacientes esquistossomóticos com a forma hepatoesplênica	7

4.25 Predição de epítomos lineares de linfócitos B

O servidor BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) utiliza um banco de dados contendo 2479 epítomos contínuos, incluindo 654 epítomos imunodominantes e 1617 epítomos imunogênicos. Várias propriedades físico-químicas são utilizadas para determinar as regiões de maior probabilidade de serem reconhecidas por receptores de células B, assim como hirofobicidade, acessibilidade, flexibilidade, incidência de alças (voltas β), antigenicidade, polaridade e exposição superficial (Saha & Raghava, 2006). A seqüência de aminoácidos das proteínas recombinantes rP22 e rP44 de *S. mansoni* foram submetidas a análise no servidor BcePred. As regiões com maior propensão antigênica foram selecionadas e as seqüências dos peptídeos antigênicos de células B determinadas. Os peptídeos selecionados foram utilizados na construção de membrana de “Spot”-síntese.

4.26 Construção da membrana contendo os peptídeos selecionados da rP22 e rP44

Os peptídeos da rP22 e rP44 selecionados como prováveis epítomos lineares de linfócitos B foram sintetizados diretamente em uma membrana de celulose, através da técnica "Spot"-Síntese, adaptada como descrita por Frank (2002). A membrana contendo o arranjo de 44 spots foi preparada pela JPT Peptide Technologies GmbH, em Berlim, Alemanha. Os spots foram preparados em duplicata sendo que 16 spots correspondem às sequências peptídicas contidas na estrutura da rP22 e 28 spots às sequências peptídicas contidas na estrutura da rP44.

4.27 Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana

A membrana contendo os peptídeos de rP22 e rP44 foi lavada 3 vezes com PBS 0,15 M pH 7,3 por 5 minutos e, em seguida, colocada em solução de bloqueio contendo 3% BSA, 0,1% Tween em PBS 0,15 M por duas horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS 0,15 M contendo 0,1% Tween 20 por 10 minutos e incubada por 2 horas com os soros testes na diluição de 1/500 para os soros murinos e de 1/500 para os soros humanos. Os soros foram diluídos em solução de PBS 0,15 M contendo 1% BSA e 0,1% Tween 20. A membrana foi novamente lavada e incubada com o anticorpo secundário diluído em PBS 0,15 M contendo 1% BSA e 0,1% Tween 20 durante 1 hora. Para os ensaios com soros murinos foi utilizado anticorpo de coelho anti-Ig de camundongo na diluição 1/3000 e para os ensaios com soro humano foi utilizado anticorpo de coelho anti-Ig humana na diluição 1/5000, todos conjugados com fosfate alcalina. A membrana foi lavada 2 vezes com PBS 0,15 M contendo 1% Tween 20 e 1 vez com tampão citrato pH 7 (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,21% ácido cítrico mono hidratado) por 10 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução reveladora composta por MTT, BCIP e $MgCl_2$ dissolvidos em CBS pH 7. A revelação da membrana ocorreu durante 20 minutos sob agitação. Para avaliar a

reatividade inespecífica a membrana foi testada somente com a adição dos anticorpos secundários utilizados nos ensaios. Como controle da reatividade dos soros murinos, a membrana foi testada com soro de camundongos que receberam somente adjuvante durante o esquema de imunização, e como controle da reatividade dos soros humanos, a membrana foi testada com soros de indivíduos não infectados por *S. mansoni* e sorologicamente não reativos em ensaios de ELISA.

4.28 Análise da reatividade dos spots

A membrana foi escaneada na resolução de 600 dpi e analisada através do “software” MacBiophotonics image J através da sua imagem invertida. A intensidade de cada “spot” foi medida através de uma área circular delimitada e um pouco menor que a área de cada “spot”, e expressa como intensidade em pixels por área.

4.29 Regeneração da membrana

Ao final dos ensaios imunológicos, a membrana era submetida a um tratamento de regeneração, para sua posterior reutilização. Inicialmente, a membrana era lavada 3 vezes com N,N-dimetilformamida durante 10 minutos. Em seguida, a membrana era lavada 2 vezes com água deionizada por 2 minutos e incubada “overnight” com Reagente A (solução aquosa contendo 48% uréia e 2% SDS). Após esse período, a membrana foi lavada mais 2 vezes com Reagente A por 10 minutos e posteriormente lavada 3 vezes com Reagente B (etanol/ água deionizada/ ácido acético na proporção de 5/4/1) por 10 minutos. Esse procedimento permite a reutilização da membrana por 30-40 vezes para anticorpos policlonais e até 70 vezes para anticorpos monoclonais.

4.30 Localização dos peptídeos antigênicos nas estruturas terciárias das proteínas

Os peptídeos antigênicos, determinados pelo servidor BcePred, foram localizados e visualizados utilizando o programa livre Swiss-PdbViewer que pode ser facilmente acessado através do site (<http://swissmodel.expasy.org/>). A localização dos peptídeos nas estruturas terciárias (código PDB: 1XFB) auxilia na validação dos mesmos por demonstrar a acessibilidade dos epítomos aos receptores de células B.

4.31 Análise Estatística usada para grupos de animais experimentais

Para a análise de dois ou mais grupos utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA). A comparação das médias foi feita através do Teste de Bonferroni. Foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.0 para Windows.

V – RESULTADOS

PARTE I: OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

5.1 Clonagem dos genes codificadores das proteínas rP22 e rP44 de *S. mansoni*

A reação de PCR, utilizando cDNA de verme adulto de *S. mansoni* como molde e iniciadores específicos das sequências codificadoras da rP22 e rP44, resultou na amplificação das sequências de aproximadamente 552 e 1089 pares de bases, respectivamente, para rP22 e rP44, como demonstrado no ensaio eletroforético (Figura 9).

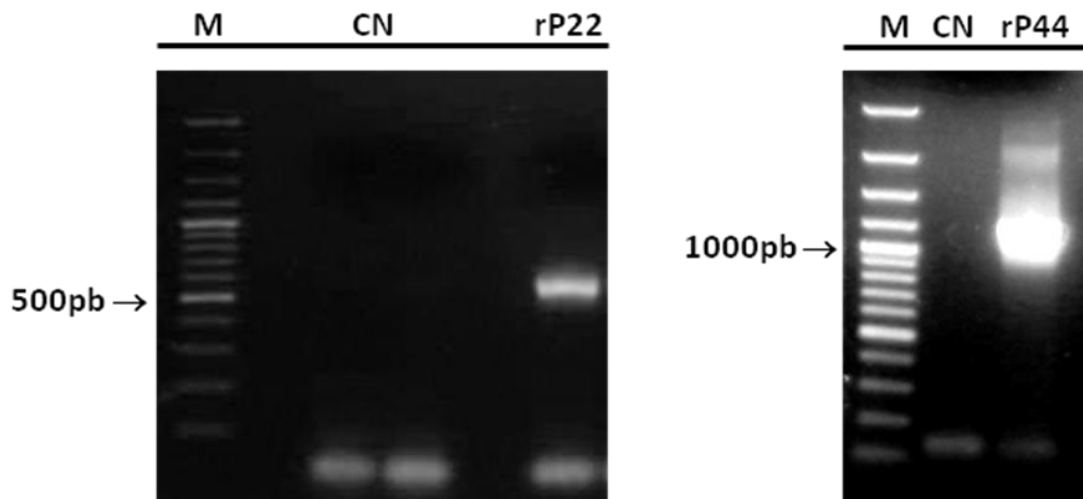


Figura 9: Géis de agarose 1% mostrando a amplificação das seqüências codificadoras da rP22 e rP44. M – padrão de peso molecular de 100 pb; CN – controle negativo; P22 - fragmento de aproximadamente 552 pb e P44 - fragmento de aproximadamente 1089 pb.

As sequências amplificadas foram então clonadas em vetores de expressão que expressam as proteínas recombinantes em fusão com cauda de histidina, o que facilita os processos posteriores de purificação. As sequências referentes à rP22 e rP44 foram clonadas individualmente no vetor pET-DEST42, através de reações de recombinação gênica pelo sistema Gateway Technology com Clonase II (Invitrogen, EUA), seguindo instruções do fabricante, onde a sequência gênica é primeiramente inserida no plasmídeo doador pDONR 221 e posteriormente transferido ao plasmídeo de expressão pET-DEST42.

Resultados

Após a clonagem, bactérias *E. coli* BL21 foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos pET-DEST42-rP22 e pET-DEST42-rP44 e os clones obtidos foram submetidos a PCR de colônia para a seleção dos clones positivos. Entre os clones positivos, um foi selecionado para cada proteína recombinante. O mesmo foi sequenciado e teve a expressão da proteína induzida. As sequências referentes à rP22 e a rP44 são mostradas nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

```
ATG GAT AGT CCA ATG GAA AAA TTT ATT CAA ACT TAT TTA ACT TTA CTT CGT GAT
M D S P M E K F I Q T Y L T L L R D
54
GGT GAT GAA ACT GTT GAA ACA AGT AAA TTA AGT GAA AGT TGT AGA AAA GAA AAA
G D E T V E T S K L S E S C R K E K
108
CTT GAT ATG AAA CAA GTT AAT GAG TGG ATT GCT CTT TTC GAT GTA GAC AAA GAT
L D M K Q V N E W I A L F D V D K D
162
CAA AAA ATC ACT TTT GAA GAA TTT TGT CGT GGT TTG GGA TTG AAA CAG AAT GAA
Q K I T F E E F C R G L G L K Q N E
216
ATG CGT ATT GAA CGA AAT CAC ATT AAA ACT GTA CAG TCA GGT AGA GAA CAA AGC
M R I E R N H I K T V Q S G R E Q S
270
TTA CCA GAA GGA GTA AGC ATT ATC GCT TCA ACA ATG CCA AAA CCA AAA CAA GTT
L P E G V S I I A S T M P K P K Q V
324
GAA GTA ACA CAA TTA TTT AAA GAT ATA TAT AAT GAA GTT AAA AAA GAT CCT GAT
E V T Q L F K D I Y N E V K K D P D
378
ATG AAT AAA GTT GTA AAA ACA TTC AAA AGT GAA TTA GAA AGA CGT TAT GGA CGT
M N K V V K T F K S E L E R R Y G R
432
GTA TGG CAA GTG AAT GCT GTA ACT CAT TCA TAC TGG GCA AGT TTC TCA CAT GAA
V W Q V N A V T H S Y W A S F S H E
486
CCA TTC CAA TCA ATT CAA TTT CAA TAT GAC AAT AAA ATC ATA CTT GCT TGG CGT
P F Q S I Q F Q Y D N K I I L A W R
540
ACA CCA AGT AAC
T P S N
552
```

Figura 10: Sequência nucleotídica e de aminoácidos do inserto de rP22. Sequência nucleotídica, em vermelho, e sequência deduzida de aminoácidos (representados por uma única letra), em verde, da rP22. O número de pares de bases se encontra à direita.

Resultados

```
ATG TCA CGC TTC CAA CCT TAC CTA ACT GAA GCT CAA GAG AAT GAC CTA CGC CGA
M S R F Q P Y L T E A Q E N D L R R 54
ATT GCT CAA GCT ATT TGT GCT CCT GGC AAA GGA ATT CTA GCA GCT GAC GAA AGC
I A Q A I C A P G K G I L A A D E S 108
ACA GCC ACA ATG GGC AAA AGA CTT CAA CAG ATC GGC GTT GAA AAT AAC GAA GAA
T A T M G K R L Q Q I G V E N N E E 162
AAT CGT CGT CTG TAC CGC CAG CTA CTT TTT AGT GCT GAT CAC AAG CTG GCC GAA
N R R L Y R Q L L F S A D H K L A E 216
AAT ATC TCT GGA GTA ATA TTA TTC GAA GAG ACA CTT CAT CAA AAG TCA GAC GAT
N I S G V I L F E E T L H Q K S D D 270
GGA AAG ACT CTT CCA ACT CTA CTA GCT GAA CGA AAT ATC ATA CCA GGA ATA AAG
G K T L P T L L A E R N I I P G I K 324
GTT GAT AAA GGT GTT GTT CCA CTT GCA GGC ACA GAC AAT GAG ACA ACA ACT CAG
V D K G V V P L A G T D N E T T T Q 378
GGT CTT GAT GAT CTT GCT TCA CGC TGT GCT GAA TAT TGG AGA CTT GGA TGC CGC
G L D D L A S R C A E Y W R L G C R 432
TTC GCT AAG TGG CGT TGT GTT TTG AAG ATC TCT TCA CAC ACA CCC TCT TAT CTA
F A K W R C V L K I S S H T P S Y L 486
GCT ATG CTC GAA AAT GCT AAT GTA CTT GCA CGT TAC GCT TCC ATC TGT CAG CAG
A M L E N A N V L A R Y A S I C Q Q 540
AAT GGT TTG GTA CCG ATT GTT GAA CCT GAG GTG CTT CCT GAT GGT GAT CAT GAT
N G L V P I V E P E V L P D G D H D 594
TTA CTA ACT GCT CAG AGA GTA ACA GAA CAA GTT TTG GCA TTC GTG TAC AAG GCT
L L T A Q R V T E Q V L A F V Y K A 648
TTG GCC GAC CAT CAT GTT TAC TTA GAA GGA ACG CTT TTA AAA CCC AAT ATG GTT
L A D H H V Y L E G T L L K P N M V 702
ACT GCT GGA CAG GCC TGC AAA AAA GCT TAC ACA CCA CAA GAA AAT GCT TTG GCT
T A G Q A C K K A Y T P Q E N A L A 756
ACT GTG CGA GCT CTT CAG CGC ACA GTC CCT CCA GCT GTT CCA GGT ATC ACA TTC
T V R A L Q R T V P P A V P G I T F 810
TTG TCC GGA GGT CAA TCA GAA TTG GAC GCT ACT AAA AAT CTG AAC GAA ATC AAC
L S G G Q S E L D A T K N L N E I N 864
AAG ATT CCG GGA CCA AAG CCA TGG GCA CTC ACT TTT AGT TTT GGT CGT GCT CTG
K I P G P K P W A L T F S F G R A L 918
CAG GCT TCA GTC TTA GCC ACA TGG AAG GGA AAG AAA GAA AAT GTT CAT GCG GCT
Q A S V L A T W K G K K E N V H A A 972
CAG GAA GAG CTA TTG AAA TTG GCC AAA GCA AAT GGC GCT GCT GCT GTT GGC AAA
Q E E L L K L A K A N G A A A V G K 1026
TTT GAA GGA AAT ATG GGA ACT ACT TTG GGA GAC AAA TCA TTG TTC GTT GCT AAT
F E G N M G T T L G D K S L F V A N 1080
CAC GCT TAT
H A Y
1089
```

Figura 11: Sequência nucleotídica e de aminoácidos do inserto de rP44. Sequência nucleotídica representada em vermelho e sequência deduzida de aminoácidos (representados por uma única letra) em verde, da rP44. O número de pares de bases se encontra à direita.

A comparação da sequência da rP22 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI mostrou que a mesma apresenta identidade total com a proteína Sm 21.7 de *S. mansoni* (Nº referência NCBI: XP_002569898) e, portanto, também apresenta domínio “mão-EF” e domínio de cadeia leve de dineína, como mostrado no alinhamento das sequências de aminoácidos das duas proteínas (Figura 12). A proteína rP22 não apresenta similaridade com proteínas humanas. Com relação à rP44, a comparação entre a sequência obtida e aquela já depositada em banco de dados (Nº referência NCBI: XP_002575564.1) mostrou que a mesma apresenta identidade total com a enzima frutose 1,6-bifosfato aldolase de classe I de *S. mansoni* (SmFBA), e, por isso, apresenta todos os domínios relacionados à atividade catalítica característica dessa classe de enzimas. O alinhamento entre as sequências da rP44 e SmFBA, as regiões que correspondem aos domínios do sítio ativo e o resíduo catalítico dessas proteínas são mostradas na Figura 13. A sequência protéica da rP44 também foi comparada às sequências de proteínas humanas catalogadas no banco de dados BLAST e apresentou 67% de identidade com a cadeia A da proteína frutose bifosfato aldolase C (HsALDOC - Nº referência NCBI: NP_005156.1).

Resultados

```
rP22      MDSPMEKFIQTYLTLRLRDGETVETSKLSESCRKEKLDMKQVNEWIALFDVDKDQKITFE 60
Sm21.7    MDSPMEKFIQTYLTLRLRDGETVETSKLSESCRKEKLDMKQVNEWIALFDVDKDQKITFE 60
          *****

rP22      EFCRGLGLKQEMRIERNHIKTVQSGREQSLPEGVSI IASTMPKPKQVEVTQLFKDIYNE 120
Sm21.7    EFCRGLGLKQEMRIERNHIKTVQSGREQSLPEGVSI IASTMPKPKQVEVTQLFKDIYNE 120
          *****

rP22      VKKDPDMNKVVKTFKSELERRYGRVWQVNAVTHSYWASFSHEPFQSIQFYDNKIILAWR 180
Sm21.7    VKKDPDMNKVVKTFKSELERRYGRVWQVNAVTHSYWASFSHEPFQSIQFYDNKIILAWR 180
          *****

rP22      TPSN 184
Sm21.7    TPSN 184
          ****
```

Figura 12: Alinhamento entre as proteínas rP22 e Sm 21.7 de *S. mansoni*. As sequências das proteínas rP22 e Sm 21.7 (Nº referência NCBI: XP_002569898) foram alinhadas utilizando programa ClustalW2. Os números ao final de cada linha indicam a posição dos resíduos de aminoácidos em cada proteína. Os motivos “mão-EF” estão destacados em cinza claro, os domínios da cadeia leve de dineína estão destacados em cinza escuro e os domínios provisórios de calmodulina estão sublinhados em vermelho. (*) Resíduos de aminoácidos idênticos em todas as sequências alinhadas.

Resultados

rP44	<u>MSRFQPYLTEAQENDLRRIAQAICAPGKGILAADESTATMGKRLQQIGVENNEENRRLYR</u>	60
SmFBA	<u>MSRFQPYLTEAQENDLRRIAQAICAPGKGILAADESTATMGKRLQQIGVENNEENRRLYR</u>	60
HsALDOC	<u>MPHSYPALSAEQKKELSDIALRIVAPGKGILAADESVSGSMAKRLSQIGVENTEENRRLYR</u>	60
	*.: * *: *:::* ** * *****..:*.***.*****.*****	
rP44	<u>QLLFSADHKLAENISGVILFEETLHQKSDDGKTLPTLLAERNIIPGIKVDKGVVPLAGTD</u>	120
SmFBA	<u>QLLFSADHKLAENISGVILFEETLHQKSDDGKTLPTLLAERNIIPGIKVDKGVVPLAGTD</u>	120
HsALDOC	<u>QVLFSADDRVKKCIGGVIFFHETLYQKDDNGVPFVRTIQDKGIVVGIKVDKGVVPLAGTD</u>	120
	*:*****.: : *.***:*.***:*.***:*.***. : : : :.***: *****	
rP44	<u>NETTTQGLDDLASRCAEYWRLLGCRFAKWRCVLKISSHTPSYLAMLENANVLARYASICQQ</u>	180
SmFBA	<u>NETTTQGLDDLASRCAEYWRLLGCRFAKWRCVLKISSHTPSYLAMLENANVLARYASICQQ</u>	180
HsALDOC	<u>GETTTQGLDGLSERCAQYKKGADFAKWRCVLKISERTPSALAILLENANVLARYASICQQ</u>	180
	.*****.*.:.***:* : *. *****.:*** **:******	
rP44	<u>NGLVPIVEPEVLPDGDHDLLTAQRVTEQVLAFVYKALADHHVYLEGTLLKPNMVTAGQAC</u>	240
SmFBA	<u>NGLVPIVEPEVLPDGDHDLLTAQRVTEQVLAFVYKALADHHVYLEGTLLKPNMVTAGQAC</u>	240
HsALDOC	<u>NGIVPIVEPEILPDGDHDLKRCQYVTEKVLAAVYKALSDHHVYLEGTLLKPNMVTPGHAC</u>	240
	:****:****** . * ***:*** *****:******.***:**	
rP44	<u>KKAYTPQENALATVRALQRTVPPAVPGITFLSGGQSELDATKNLNEINKIPGPKPWALTF</u>	300
SmFBA	<u>KKAYTPQENALATVRALQRTVPPAVPGITFLSGGQSELDATKNLNEINKIPGPKPWALTF</u>	300
HsALDOC	<u>PIKYTPEEIAMATVTALRRTVPPAVPGVTFLSGGQSEEEASFNLNAINRCPLPRPWALTF</u>	300
	:* *:* **:******:****** :*: *** **: * *:******	
rP44	<u>SFGRALQASVLATWKGKKENVHAAQEELLKLAKANGAAVGKFEGNMGTTLG--DKSLFV</u>	358
SmFBA	<u>SFGRALQASVLATWKGKKENVHAAQEELLKLAKANGAAVGKFEGNMGTTLG--DKSLFV</u>	358
HsALDOC	<u>SYGRALQASALNAWRGQRDNAGAATEEFIKRAEVNGLAAQGKYEGS-GEDGGAAQSLYI</u>	359
	*:******.* :*:~::~*. ** **:* * *:* ** **:*** . . :***:~	
rP44	ANHAY- 363	
SmFBA	ANHAY- 363	
HsALDOC	ANHAYL 365	

Figura 13: Alinhamento entre as proteínas rP44, frutose 1,6 bifosfato aldolase de *S. mansoni* (SmFBA) e frutose-bifosfato aldolase C de *Homo sapiens* (HsALDOC). As sequências das proteínas rP44, SmFBA (N° referência NCBI: XP_002575564.1) e HsALDOC (N° referência NCBI: NP_005156.1) foram alinhadas pelo programa ClustalW2. Os números ao final de cada linha indicam a posição dos resíduos de aminoácidos em cada proteína. A estrutura ativa mínima das frutose-bifosfato aldolases está sublinhada em cada sequência protéica. Os resíduos de aminoácidos que formam os domínios do sítio ativo estão destacados em cinza claro e o resíduo catalítico está destacado em cinza escuro. (*) Resíduos de aminoácidos idênticos em todas as sequências alinhadas. (:) Substituição conservativa e (.) substituição semiconservativa de resíduos de aminoácidos (-) ausência do resíduo de aminoácido numa dada posição em relação às outras sequências alinhadas.

5.2 Expressão das proteínas recombinantes

Os clones de *E. coli* transformados com o plasmídeo pET-DEST42-rP22 ou com o plasmídeo pET-DEST42-rP44 foram crescidos em meio líquido até atingir a D.O. 600 de 0.5 e foram induzidos com IPTG para expressão protéica.

A miniexpressão foi realizada com o objetivo de verificar se os clones transformados com os plasmídeos recombinantes eram capazes de expressar as proteínas de interesse. Através de gel SDS-PAGE, evidenciou-se a expressão das proteínas rP22 e rP44 (Figura 14). Na Figura 14 A, o aparecimento, após a indução (tempos 2, 3 e 4h), de uma banda de aproximadamente 26kDa e que está ausente no controle negativo (bactérias BL21 não transformadas) corresponde à expressão da proteína rP22. Na Figura 14B também foi visualizado o aparecimento de bandas de aproximadamente 44kDa, nos tempos de indução de 1 a 4 horas, que correspondem à expressão da rP44. O perfil das proteínas bacterianas demonstrou que tanto os clones expressando rP22 quanto os clones expressando rP44 já apresentavam uma produção basal dessas proteínas antes mesmo da indução com IPTG (tempos T0).

Para confirmar se as bandas de expressão evidenciadas por SDS-PAGE correspondiam realmente às proteínas recombinantes rP22 e rP44, foi realizado o ensaio de "Western Blot" utilizando anticorpo anti-His (GE Life Sciences, Inglaterra). O resultado está representado na Figura 15, mostrando que os clones selecionados realmente expressavam proteínas com cauda de histidina e as bandas detectadas no ensaio coincidiam com as bandas de expressão da rP22 (Figura 14A) e rP44 (Figura 14B). Também foi possível verificar que, após 4 horas de indução, a proteína rP44 é encontrada principalmente no sedimento da lise bacteriana e a proteína rP22 é detectada principalmente no sobrenadante da lise bacteriana.

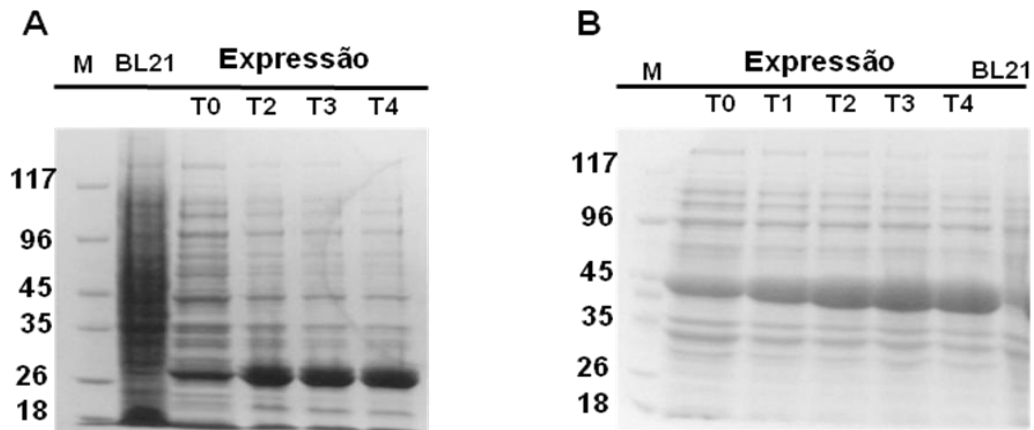


Figura 14: Géis de SDS-PAGE 10% corados por azul de Comassie, do perfil de expressão das proteínas rP22 e rP44. Aliquotas de 25 μ L de cada preparação bacteriana foram separadas em gel de poliacrilamida 10% sob condições redutoras e foram posteriormente coradas por azul de Comassie. (A) T1 a T4 - Tempos de expressão, em horas, de bactérias *E. coli* transformadas com pET-DEST42-rP22 (A) ou pET-DEST42-rP44 (B) após a indução com IPTG. M - marcador de peso molecular; BL21- bactérias *E. coli* BL21 não transformadas; T0 – clone não induzido com IPTG;

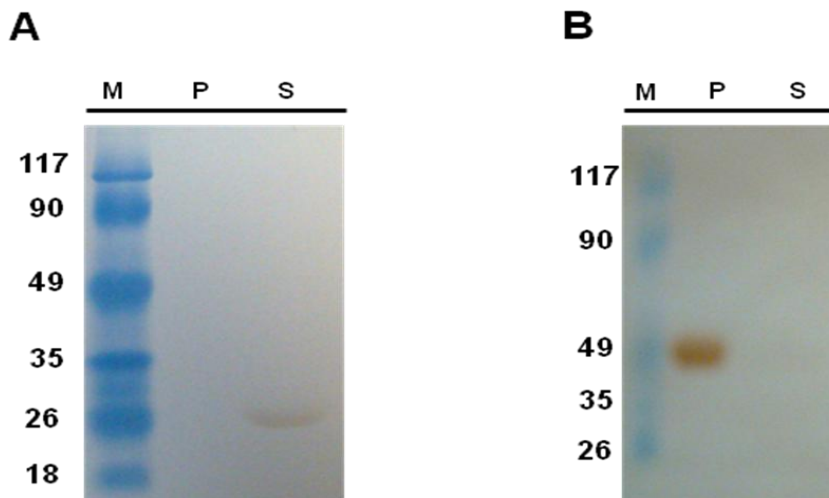


Figura 15: Análise de *Western blot* da expressão das proteínas rP22 (A) e rP44(B) utilizando anticorpo anti-cauda de histidina. Foram aplicados 20 μ L de amostras correspondentes ao tempo 4hs de indução da mini-expressão do clone C5 da rP22 e do clone C4 da rP44 (C4). O anticorpo anti-His foi diluído 1:5.000 em PBS-caseína. M - marcador de peso molecular; S – sobrenadante da lise bacteriana após 4 horas de indução; P – sedimento da lise bacteriana 4 horas de indução.

5.3 Purificação das proteínas recombinantes

Após a seleção dos clones que expressavam as proteínas rP22 e rP44 de *S. mansoni*, os mesmos foram induzidos novamente para se obter maiores concentrações das proteínas de interesse. As proteínas foram purificadas em colunas de níquel His Trap HP (GE Life Sciences, Inglaterra). O produto eluído da purificação da rP44 apresentou uma banda de aproximadamente 44 kDa de massa molecular (Figura 16A). O produto eluído da purificação da rP22 apresentou em seu perfil eletroforético uma banda de aproximadamente 26 kDa de massa molecular (Figura 16B). Após a cromatografia de afinidade, a proteína rP22 foi purificada por cromatografia de troca iônica (Figura 15C) e o produto utilizado nas análises de dicroísmo circular e DLS.

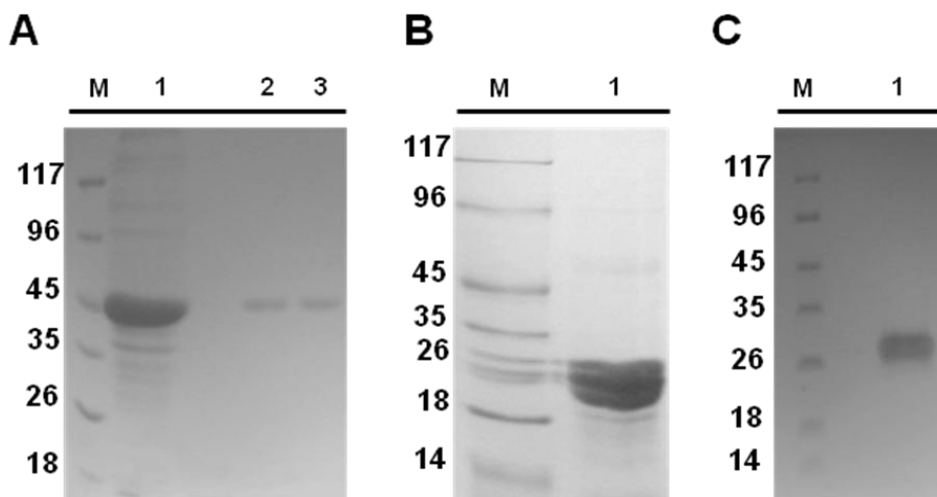


Figura 16: Gel de SDS-PAGE das proteínas purificadas rP44 e rP22. Aliquotas de 20 μ L de cada proteína foram separadas em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes, seguido por coloração por azul de Comassie. (A) Amostras da purificação da rP44 por cromatografia de afinidade: 1- primeira fração de rP44 coletada antes da eluição; 2 e 3 – frações eluídas da rP44. (B) 1- Fração da purificação da rP22 por cromatografia de afinidade; (C) 1- Fração da purificação de rP22 por cromatografia de troca iônica; M - marcador de peso molecular.

5.4 Análise da estrutura secundária da rP22

A análise da estrutura secundária da rP22 utilizando Dicroísmo Circular mostrou que a proteína, em tampão fosfato 2 mM pH 7,4, está enovelada e contém cerca de 30% de α -hélices, com perda de estrutura secundária com o aumento da temperatura (Figuras 17A e B). Em temperaturas acima de 60 °C, a quantidade de α -hélices diminui bastante e a quantidade de 'random coil' aumenta. Análises de DLS mostraram que 96,4% da massa da solução contendo a rP22 apresenta um raio de 2,6 nm o que corresponde a aproximadamente 32kDa, confirmando que a proteína rP22 se apresenta como um monômero (Figura 17C).

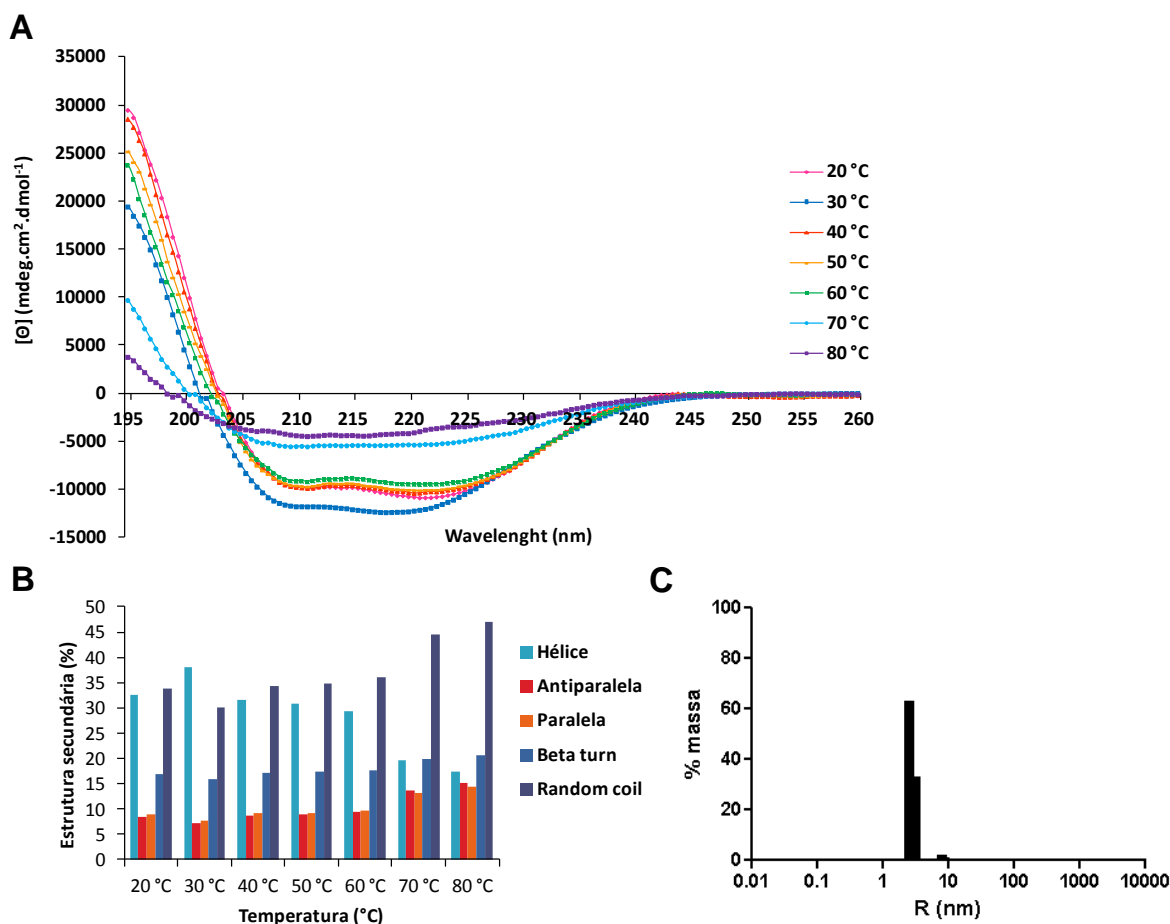


Figura 17: Análise de dicroísmo circular da rP22 (A-B) em diferentes temperaturas e análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS) (C). Em A, os dados foram plotados em função de elipcidade molar $[\theta]$ versus comprimento de onda (190 a 260nm) em temperaturas de 20 a 80 °C. Em B, o resultado da deconvolução do espectro obtido em A pelo programa CDNN versão 2.

5.5 Imunolocalização da rP22 por microscopia confocal

Soro de coelho imunizado com a proteína recombinante rP22 foi utilizado em ensaios de imunolocalização da proteína P22 nativa, por microscopia confocal, em cortes histológicos de vermes adultos macho e fêmea de *S. mansoni*. O resultado evidenciou a localização e a elevada expressão da P22 nativa (verde) ao longo de toda porção tegumentar do macho e da fêmea de *S. mansoni* (Figuras 18D-N). Nenhuma fluorescência foi detectada em cortes incubados com soro de coelho pré-imune (Figuras 18A-C).

A localização da P22 no ovo de *Schistosoma* também foi verificada. Cortes histológicos de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* foram incubados com soro de coelho anti-rP22. Uma forte marcação (verde) foi detectada nas regiões de granuloma, onde se encontravam os ovos de *Schistosoma* e era proveniente da ligação dos anticorpos anti-P22 à superfície das larvas miracídio no interior dos ovos (Figuras 18T-V), demonstrando que a proteína P22 também é um componente do tegumento da larva miracídio. Também não ocorreu marcação nos cortes incubados com soro de coelho pré-imune (Figuras 18O-R).

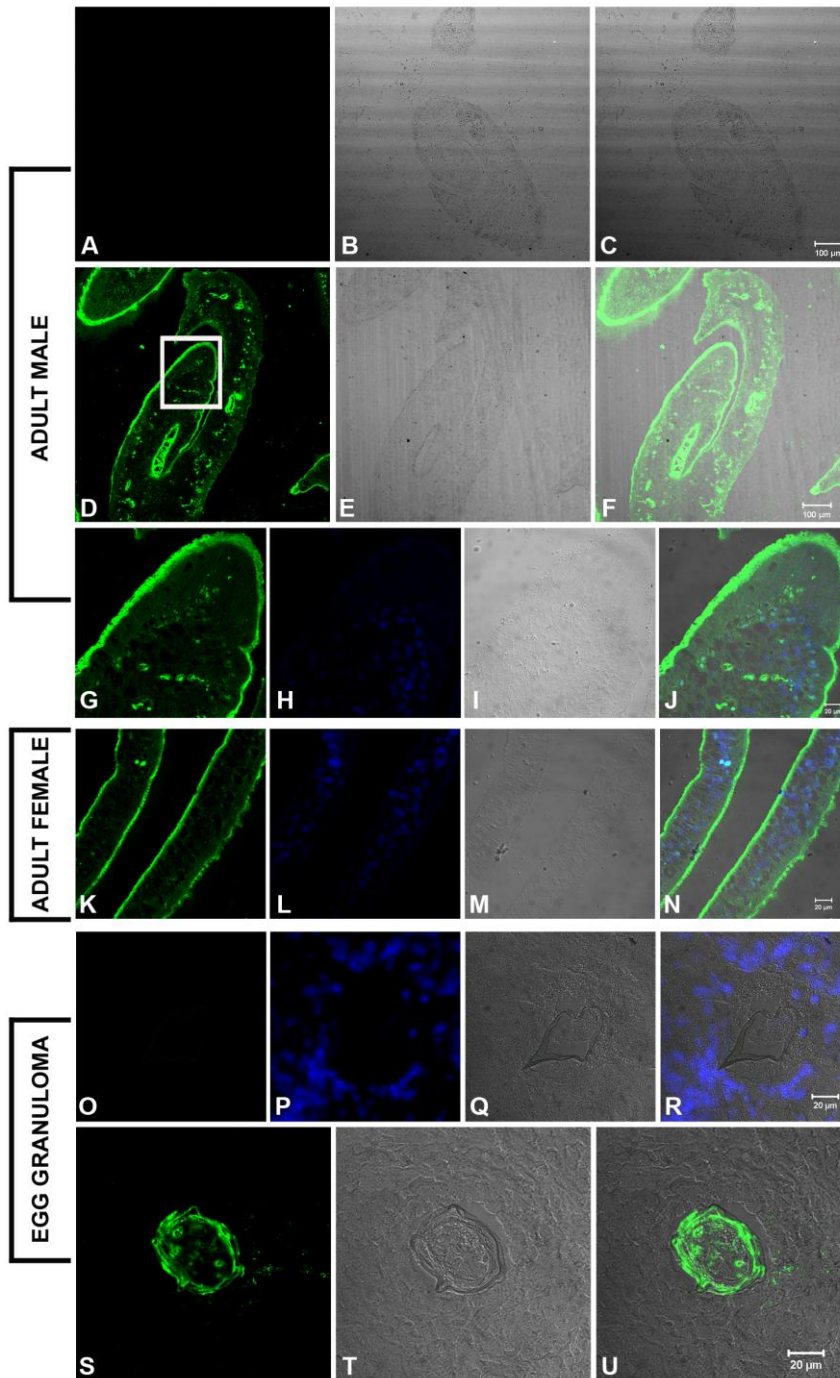


Figure 18: Ensaio de imunolocalização da proteína rP22 por microscopia confocal. Imagens de microscopia confocal e de contraste de fase correspondentes de machos (A-J) e fêmeas (K-N) de verme adulto, e miracídeos (O-U) dentro dos ovos de *S. mansoni* são mostradas. Anticorpos policlonais anti-P22 e anticorpos de cabra anti-Ig de coelho acoplados a Alexa 488 (verde) foram utilizados para a detecção da fluorescência da P22 nativa. Soro pré-imune de coelho foi usado como controle negativo para o verme adulto (A-C) e miracídio (O-R). Hoescht (azul) foi usado para a visualização do núcleo celular (H, J, L, N, P e R).

PARTE II: UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA FORMULAÇÃO DE UMA VACINA NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

5.6 Determinação dos níveis de proteção

Para avaliar o efeito da imunização com as proteínas recombinantes rP22 e rP44, individualmente ou combinadas, na esquistossomose experimental, camundongos C57BL/6 foram desafiados após 15 dias da última imunização. A perfusão dos animais, após 60 dias de infecção, mostrou que a imunização com as proteínas rP22, rP44 ou a combinação das duas proteínas promoveu uma redução do número de vermes recuperados, em relação aos animais que receberam unicamente adjuvante (Tabela 3). O grupo imunizado com SWAP também exibiu uma redução significativa do número de vermes. A porcentagem de proteção calculada em função do número de vermes recuperados no grupo adjuvante foi significativamente maior nos animais vacinados com as proteínas recombinantes rP22, rP44 ou com a combinação das mesmas. A contagem do número de ovos retidos no fígado dos animais também foi determinada. Para essa análise, os fígados foram coletados, após 60 dias de infecção, e uma porção representativa do fígado dos animais (todo o lobo esquerdo) foi pesada e digerida individualmente em solução de KOH 5% para a obtenção dos ovos. Os dados obtidos foram expressos em número de ovos por unidade de peso (g) de tecido hepático e a taxa de redução do número de ovos também foi estimada. Através dos resultados mostrados na Tabela 3, é possível verificar que somente o grupo imunizado com a associação das proteínas rP22 e rP44 foi capaz de reduzir significativamente o número de ovos por grama de tecido hepático em relação aos grupos Salina, Adjuvante, SWAP e rP44. O grupo imunizado com a proteína rP22 reduziu significativamente o número de ovos retidos no fígado com relação ao grupo Salina, mas não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo Adjuvante.

Tabela 3: Efeito protetor induzido pelas diferentes formulações vacinais

Grupos	Número de vermes recuperados (Média ± Desvio Padrão)	Número de ovos/g de tecido hepático (Média ± Desvio Padrão)
Salina	12.0 ± 1.3	6580 ± 454.7
Adjuvante (ADJ)	10.8 ± 1.6	5783 ± 800.5
SWAP	6.8 ± 1.6* (37%) ^a	5299 ± 869 (8.4%) ^b
rP22	5.3 ± 1.8* (51%) ^a	4481 ± 857.2 (22.5%) ^b
rP44	5.6 ± 2.1* (48%) ^a	5157 ± 1019 (10.8%) ^b
Duas Proteínas (DP)	5.2 ± 2.2* (52%) ^a	3381 ± 1174* [#] (41,5%) ^b

^a Representa a porcentagem de redução do número de vermes em relação ao grupo ADJ.

^b Representa a porcentagem de redução do número de ovos/g de tecido hepático.

* Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos ADJ e Salina (p<0.05).

[#] Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos ADJ, Salina, SWAP e rP44 (p<0.05)

5.7 Efeito da imunização sobre o granuloma hepático

O fígado dos animais imunizados e infectados foi removido para análise histológica, quantificação da área dos granulomas e da fibrose nesse tecido. A quantificação da área dos granulomas foi feita através do programa MacBiophotonics ImageJ, em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, e a quantificação da área de fibrose foi avaliada através do mesmo programa, em cortes histológicos corados com Tricromo de Masson. Tanto a análise histológica (Figura 19) quanto a análise quantitativa (Figura 20A) mostraram que os fígados dos animais imunizados com a rP22 apresentaram uma redução significativa da área dos granulomas hepáticos em relação ao grupo Adjuvante. As formulações vacinais contendo SWAP, rP44 e as duas proteínas produziram menores granulomas, mas não tão reduzidos quanto os evidenciados nos cortes histológicos dos animais que receberam a formulação contendo a rP22. A análise de fibrose mostrou que os animais vacinados com a proteína rP22 também exibiram as menores áreas de fibrose quando comparada ao grupo Adjuvante, Salina, SWAP e rP44 (Figura 20B). Houve uma redução da área de fibrose no fígado dos animais vacinados com SWAP, rP44 ou com a combinação de rP22 e rP44 em relação ao grupo Adjuvante. Não houve diferença significativa da área de fibrose entre os grupos SWAP e rP44 assim como não houve diferença significativa entre os grupos rP22 e Duas Proteínas.

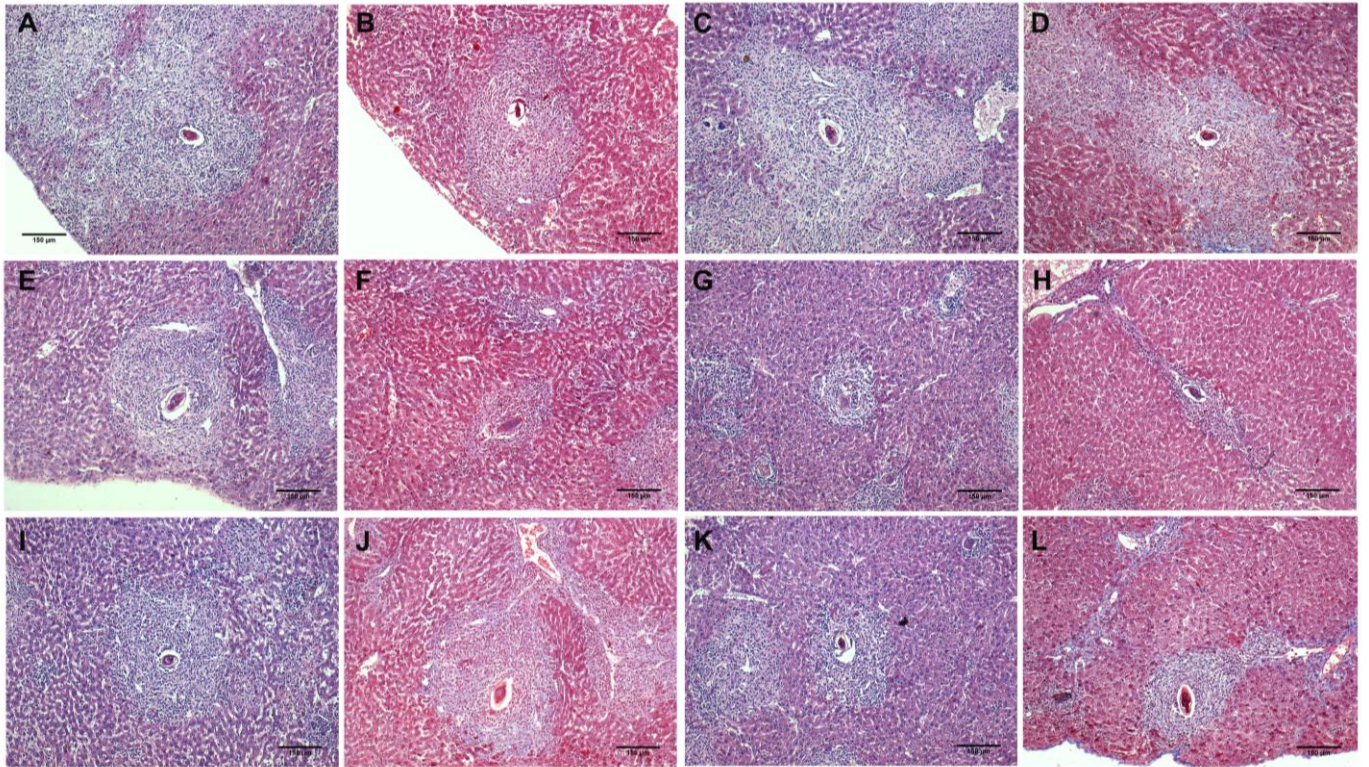


Figura 19: Fotomicrografia dos granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 desafiados com 25 cercárias de *S. mansoni*, após 60 dias de infecção. Os cortes histológicos de fígado foram corados com hematoxilina-eosina (A, C, E, G, I e K) ou Tricromo de Masson (B, D, F, H, J e L) para evidenciar o tamanho dos granulomas e a área de fibrose, respectivamente. Cortes histológicos dos grupos (A e B) controle - camundongos não imunizados que receberam somente salina; (C e D) grupo ADJ - camundongos que receberam somente adjuvante; (E e F) SWAP - camundongos imunizados com SWAP; (G e H) rP22 - camundongos imunizados com rP22; (I e J) rP44 - camundongos imunizados com rP44; (K e L) DP - camundongos imunizados com a combinação das proteínas rP22 e rP44. A barra preta indica a escala da foto e equivale a 150 µm.

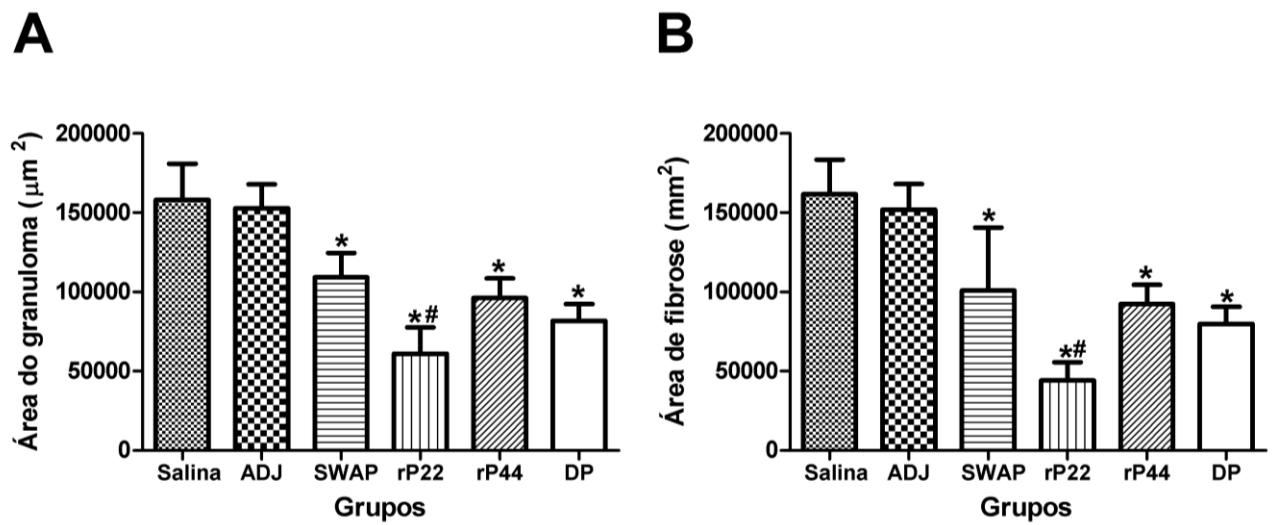


Figura 20: Medida da área do granuloma e da área de fibrose hepática em camundongos C57BL/6 8 semanas após a infecção desafio. (A) Distribuição do tamanho do granuloma e (B) da área de fibrose em cortes histológicos de fígado de camundongos não imunizados (grupo que recebeu somente salina); camundongos que receberam somente adjuvante (ADJ); e camundongos imunizados com SWAP, rP22, rP44 ou as duas proteínas (DP). Os resultados representam a média de aproximadamente 100 granulomas (μm^2) por grupo de sete animais, obtidas a partir de morfometria digital.* Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo adjuvante ($p < 0.05$). # Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo SWAP ($p < 0.05$)

5.8 Perfil de citocinas induzido pela vacinação com as proteínas recombinantes

Para se verificar o perfil de citocinas induzido pela imunização com as proteínas rP22 e rP44, individualmente ou combinadas, os baços de camundongos imunizados e desafiados foram extraídos e macerados para a obtenção de esplenócitos, que foram mantidos em cultura, em meio RPMI completo, na presença de vários estímulos. Esplenócitos foram plaqueados, na presença de: 5 μ g de SWAP, 5 μ g de rP22, 5 μ g de rP44, 2.5 μ g de rP22 + 2.5 μ g de rP44 ou 1.6 μ g de ConA. Os sobrenadantes da cultura de esplenócitos foram coletados, após 24 horas, para a dosagem de TNF- α , e após 72 horas, para a dosagem de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β , utilizando kit de ELISA Duoset (R&D Systems, EUA).

A partir da análise de produção de IFN- γ , foi possível verificar que esplenócitos de animais imunizados dos grupos rP22, rP44 ou Duas Proteínas (DP) apresentaram elevados níveis dessa citocina quando foram estimulados com rP22, SWAP e DP em relação aos esplenócitos não estimulados (controle). Também ocorreu uma produção significativa de IFN- γ por esplenócitos de animais imunizados com rP44 e estimulados em cultura com essa mesma proteína. Os maiores níveis de IFN- γ foram detectados em sobrenadante de esplenócitos estimulados *in vitro* com a proteína rP22, em todos os grupos imunizados (Figura 21).

Com relação à citocina TNF- α , foi detectada a produção significativa dessa citocina no sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com rP22 e DP de todos os grupos imunizados. Níveis significativos de TNF- α também foram detectados quando o esplenócitos do grupo rP44 foram estimulados *in vitro* com essa proteína (Figura 22).

Os valores obtidos na detecção de IL-4 mostraram que essa citocina foi produzida em níveis significativos somente quando os esplenócitos dos grupos rP22 e DP foram estimulados *in vitro* com SWAP. Não houve produção significativa de IL-4 em relação ao controle de esplenócitos não estimulados no grupo imunizado com rP44 (Figura 23).

Resultados

A produção da citocina IL-10 foi significativa elevada na presença de SWAP, rP22 ou DP na cultura de esplenócitos de todos os grupos de camundongos imunizados. O nível de IL-10, na presença de rP44, só foi significativamente diferente do controle no grupo imunizado com a proteína rP44 (Figura 24).

A citocina TGF- β também foi detectada no sobrenadante da cultura celular de esplenócitos, mas não apresentou diferença significativa em relação ao controle de células não estimuladas em nenhum dos grupos imunizados (Figura 25).

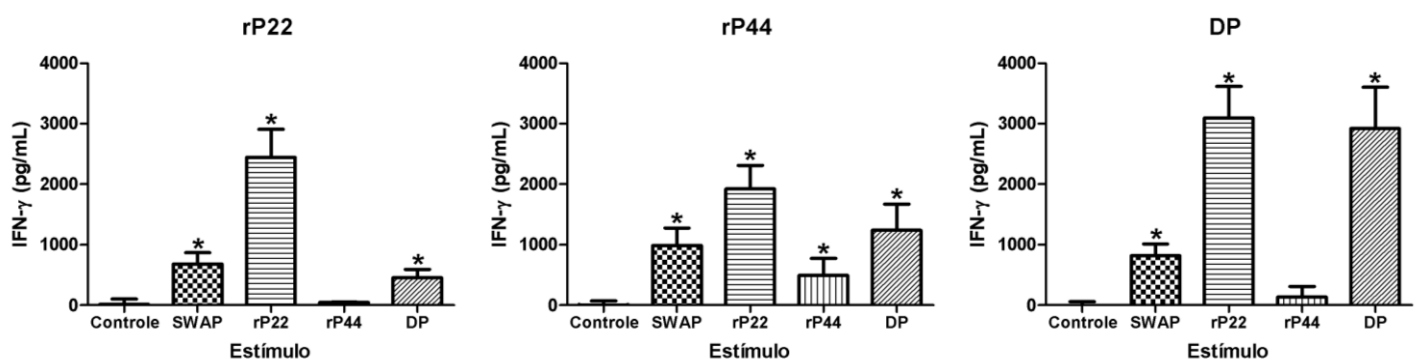


Figura 21: Nível de IFN- γ presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas. Os camundongos C57BL/6 foram desafiados e, após 60 dias de infecção, foi realizada a esplenectomia e 5×10^6 células/poço foram incubadas em meio RPMI completo por 72h, a 37° C e 5% CO₂. As células de foram colocadas na presença de SWAP, rP22, rP44 ou a combinação de rP22 e rP44 (DP). * Significativamente diferente quando comparado ao controle de esplenócitos não estimulados *in vitro* (P<0.05).

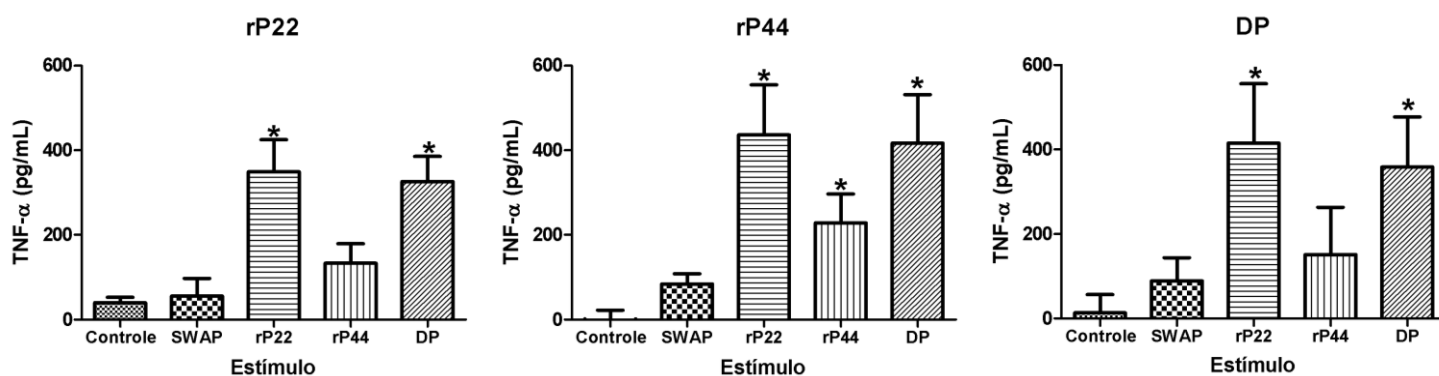


Figura 22: Nível de TNF- α presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas. Os camundongos C57BL/6 foram desafiados e, após 60 dias de infecção, foi realizada a esplenectomia e 5×10^6 células/poço foram incubadas em meio RPMI completo por 24h, a 37° C e 5% CO₂. As células de foram colocadas na presença de SWAP, rP22, rP44 ou a combinação de rP22 e rP44 (DP). * Significativamente diferente quando comparado ao controle de esplenócitos não estimulados *in vitro* (P<0.05).

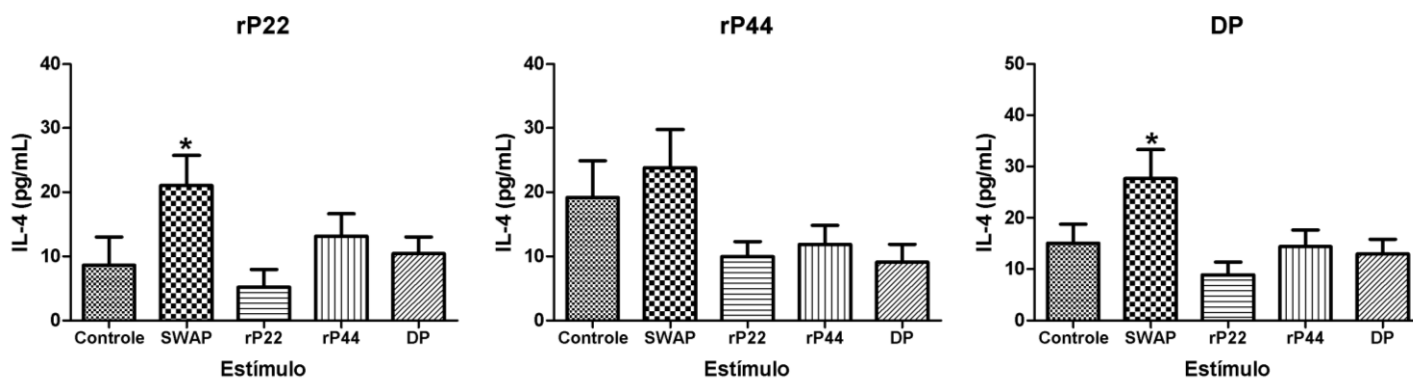


Figura 23: Nível de IL-4 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas. Os camundongos C57BL/6 foram desafiados e, após 60 dias de infecção, foi realizada a esplenectomia e 5×10^6 células/poço foram incubadas em meio RPMI completo por 72h, a 37° C e 5% CO₂. As células de foram colocadas na presença de SWAP, rP22, rP44 ou a combinação de rP22 e rP44 (DP). * Significativamente diferente quando comparado ao controle de esplenócitos não estimulados *in vitro* (P<0.05).

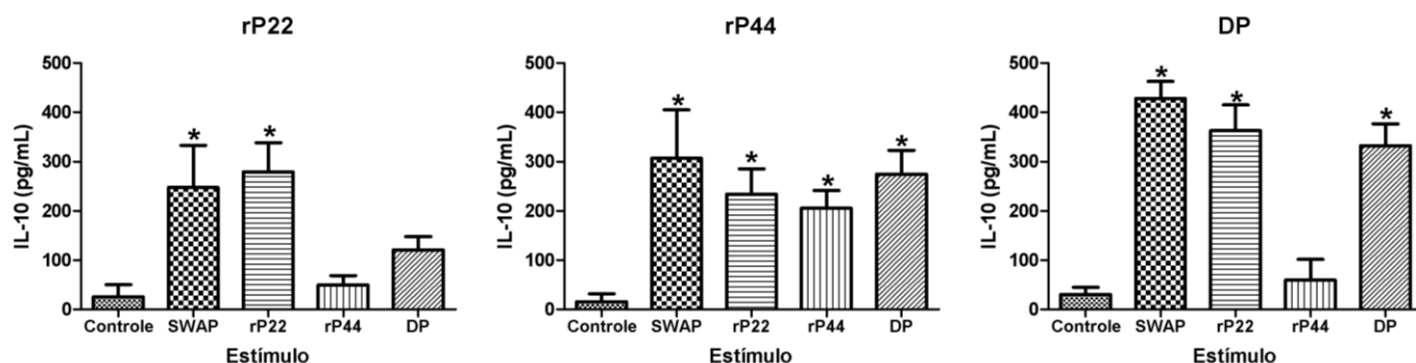


Figura 24: Nível de IL-10 presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas. Os camundongos C57BL/6 foram desafiados e, após 60 dias de infecção, foi realizada a esplenectomia e 5×10^6 células/poço foram incubadas em meio RPMI completo por 72h, a 37° C e 5% CO_2 . As células de foram colocadas na presença de SWAP, rP22, rP44 ou a combinação de rP22 e rP44 (DP). * Significativamente diferente quando comparado ao controle de esplenócitos não estimulados *in vitro* ($P < 0.05$).

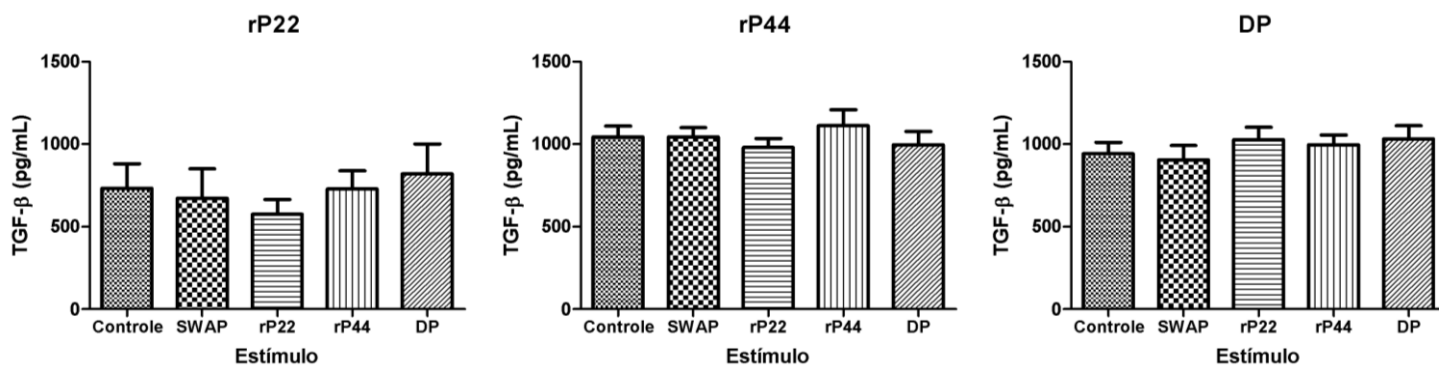


Figura 25: Nível de TGF-β presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou Duas Proteínas. Os camundongos C57BL/6 foram desafiados e, após 60 dias de infecção, foi realizada a esplenectomia e 5×10^6 células/poço foram incubadas em meio RPMI completo por 72h, a 37° C e 5% CO_2 . As células de foram colocadas na presença de SWAP, rP22, rP44 ou a combinação de rP22 e rP44 (DP). * Significativamente diferente quando comparado ao controle de esplenócitos não estimulados *in vitro* ($P < 0.05$).

5.9 Efeito das proteínas recombinantes na proliferação celular

Para avaliar o efeito das proteínas rP22 e rP44, combinadas ou individuais, na proliferação celular, esplenócitos extraídos de baços de camundongos imunizados com rP22, rP44 ou com as duas proteínas (DP), e posteriormente infectados, foram mantidos em cultura, em meio RPMI completo, na presença dos estímulos rP22, SWAP, rP44, DP ou ConA; ou mantidos em cultura na ausência de estímulo antigênico. Após 96 horas, foi adicionado MTT às culturas celulares e realizada a detecção do metabólito formazan no sobrenadante de cultura por espectrofotometria, a 550nm. A Figura 26 mostra a proliferação de esplenócitos provenientes dos grupos de camundongos imunizados frente aos antígenos de *Schistosoma*. O índice de proliferação (IP) dos esplenócitos de cada animal e para cada estímulo foi calculado.

A comparação entre os diferentes estímulos em cada grupo analisado revelou que o índice de proliferação foi menor quando as culturas celulares foram estimuladas *in vitro* com rP22 em relação aos estímulos SWAP, rP44 e ConA, em todos os grupos experimentais. Comparando-se o índice de proliferação para um mesmo estímulo, mas em grupos diferentes, verificou-se que a proliferação das células estimuladas com rP22 foi estatisticamente maior no grupo imunizado com essa mesma proteína ou com a combinação de rP22 e rP44. A proliferação dos esplenócitos na presença de rP44 só foi estatisticamente maior do que a proliferação detectada para o mesmo estímulo no grupo Salina. A proliferação celular em resposta à adição do antígeno SWAP na cultura foi maior nos grupos rP22, rP44 e DP quando comparada aos grupos Salina e Adjuvante (ADJ).

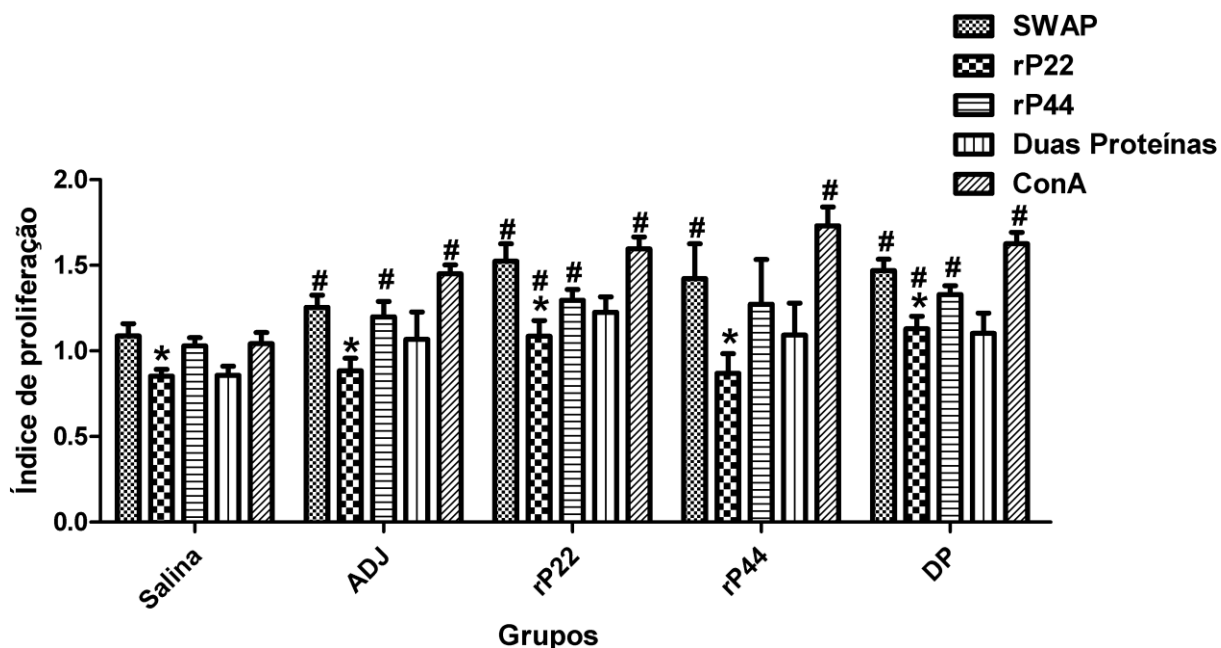


Figura 26: Proliferação de esplenócitos induzida por antígenos de *S. mansoni*. $1,0 \times 10^6$ células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços sem estímulo antigênico ou com SWAP, rP22, rP44, Duas Proteínas ou ConA, por 96 horas, a 37° C, e 5% CO₂. Solução de MTT (5mg/mL de PBS) foi adicionada às placas e as mesmas foram incubadas a 37° C, 5% de CO₂, durante 4 horas. Os cristais formados foram solubilizados com a adição de solução de SDS/ HCl 10%. O índice de proliferação (IP) foi calculado de acordo com a equação – $IP = (OD_{550} \text{ de células na presença de estímulo} / OD_{550} \text{ de células na ausência de estímulo})$. Os valores representam a média dos IPs \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. * Estatisticamente significativo quando comparado aos estímulos SWAP, rP44 e conA no mesmo grupo experimental ($p < 0.05$). # Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo Salina ($p < 0.05$)

5.10 Avaliação da resposta imune humoral através de ELISA

A produção de anticorpos IgG específicos anti-rP22 (Figura 27A) e anti-rP44 (Figura 27B) em camundongos imunizados e posteriormente desafiados foi avaliada por ELISA. Após três imunizações (dias 0, 15 e 30), níveis significativos de anticorpos IgG anti-rP22 e anti-rP44 foram detectados nos soros dos animais imunizados com essas proteínas. Os outros grupos não apresentaram níveis significativos de anticorpos contra essas proteínas (Figura 27).

Uma vez que a imunização com as proteínas rP22 e rP44 induziu a produção de altos níveis de IgG contra as mesmas, foram realizados ensaios de ELISA utilizando soros de animais imunizados com as proteínas recombinantes, juntas ou separadas, para determinar quais subclasses de IgG eram predominantes. O resultado encontra-se nas figuras 28 (anticorpos anti-rP22) e 29 (anticorpos anti-rP44). Níveis significativos de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a anti-rP22 foram detectados nos soros dos camundongos imunizados com a rP22 até 90 dias após a primeira imunização (tempo 0) e a vacinação dos animais com a rP22 induziu a produção de níveis mais altos de IgG1 do que de IgG2a (Figuras 28A e B). Níveis significativos de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a anti-rP44 também foram detectados nos soros de camundongos imunizados com essa proteína. Os níveis de IgG1 anti-rP44 se mantiveram elevados nos soros dos animais até 90 dias após a primeira imunização e foram produzidos em maior proporção quando comparados aos níveis de IgG2a. Os níveis de IgG2a, apesar de sofrerem um aumento após a vacinação, só se mantiveram significativamente elevados até 75 dias da primeira imunização (Figuras 29A e B). Os animais imunizados com a combinação das proteínas também produziram níveis significativos de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a, sendo que os níveis de IgG1 foram mais elevados que os de IgG2a tanto para anticorpos anti-rP22 quanto para anticorpos anti-rP44. Os níveis de IgG1 e IgG2a anti-rP22 foram maiores que os níveis detectados de IgG1 e IgG2a anti-rP44.

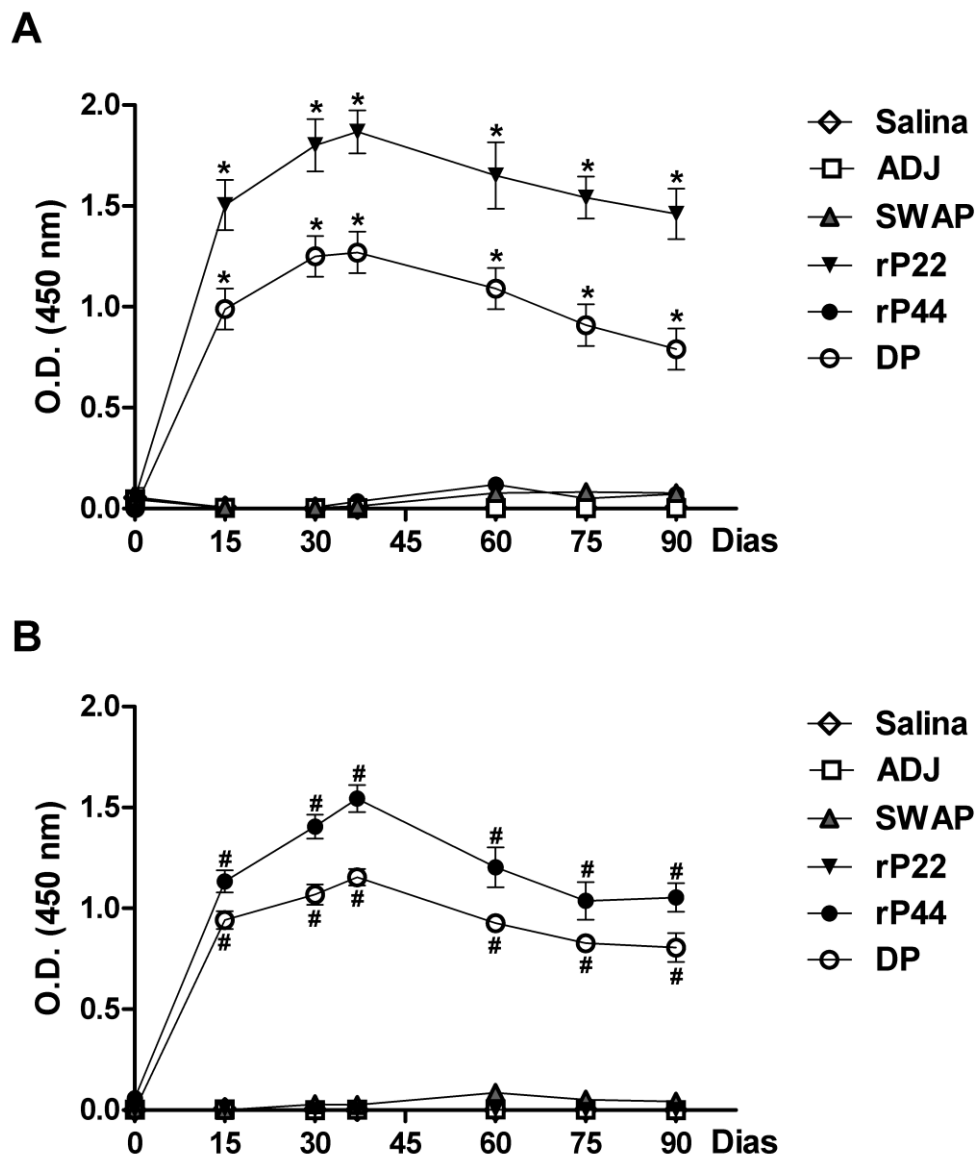


Figura 27: Detecção de anticorpos anti-rP22 e anti-rP44 em soros de camundongos imunizados com antígenos de *S. mansoni*. Soros de camundongos imunizados com rP22, rP44, SWAP ou Duas Proteínas e, posteriormente desafiados, foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1/800 para a detecção dos anticorpos IgG anti-rP22 (A) e anti-rP44 (B). Cada ponto representa a média e o desvio padrão da DO do soro de cinco animais de cada grupo em cada ponto. Para o ensaio, foi utilizado 1µg/poço da placa sensibilizada com rP22 (A) ou rP44 (B). * Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos Salina, ADJ, SWAP, rP44. # Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos Salina, ADJ, SWAP, rP22.

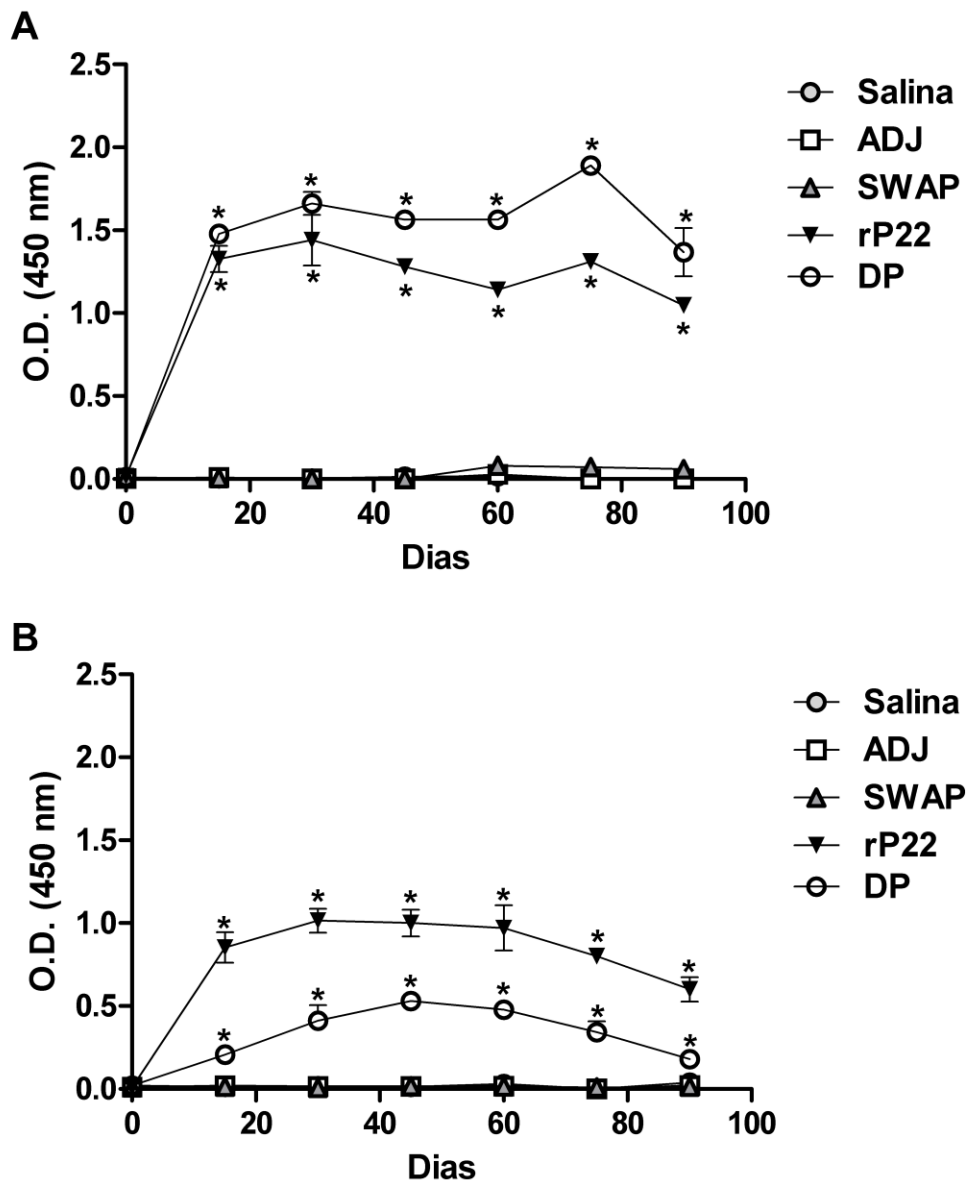


Figura 28: Detecção de anticorpos anti-rP22 em soros de camundongos imunizados com antígenos de *S. mansoni*. Soros de camundongos imunizados com rP22, rP44, SWAP ou Duas Proteínas e, posteriormente desafiados, foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1/400 para a detecção das subclasses IgG1(A) e IgG2a (B). Cada ponto representa a média e o desvio padrão do soro de cinco animais de cada grupo em cada ponto. Para o ensaio, foi utilizado 1µg/poço da placa sensibilizada com rP22. * Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos Salina, ADJ, SWAP, e rP44.

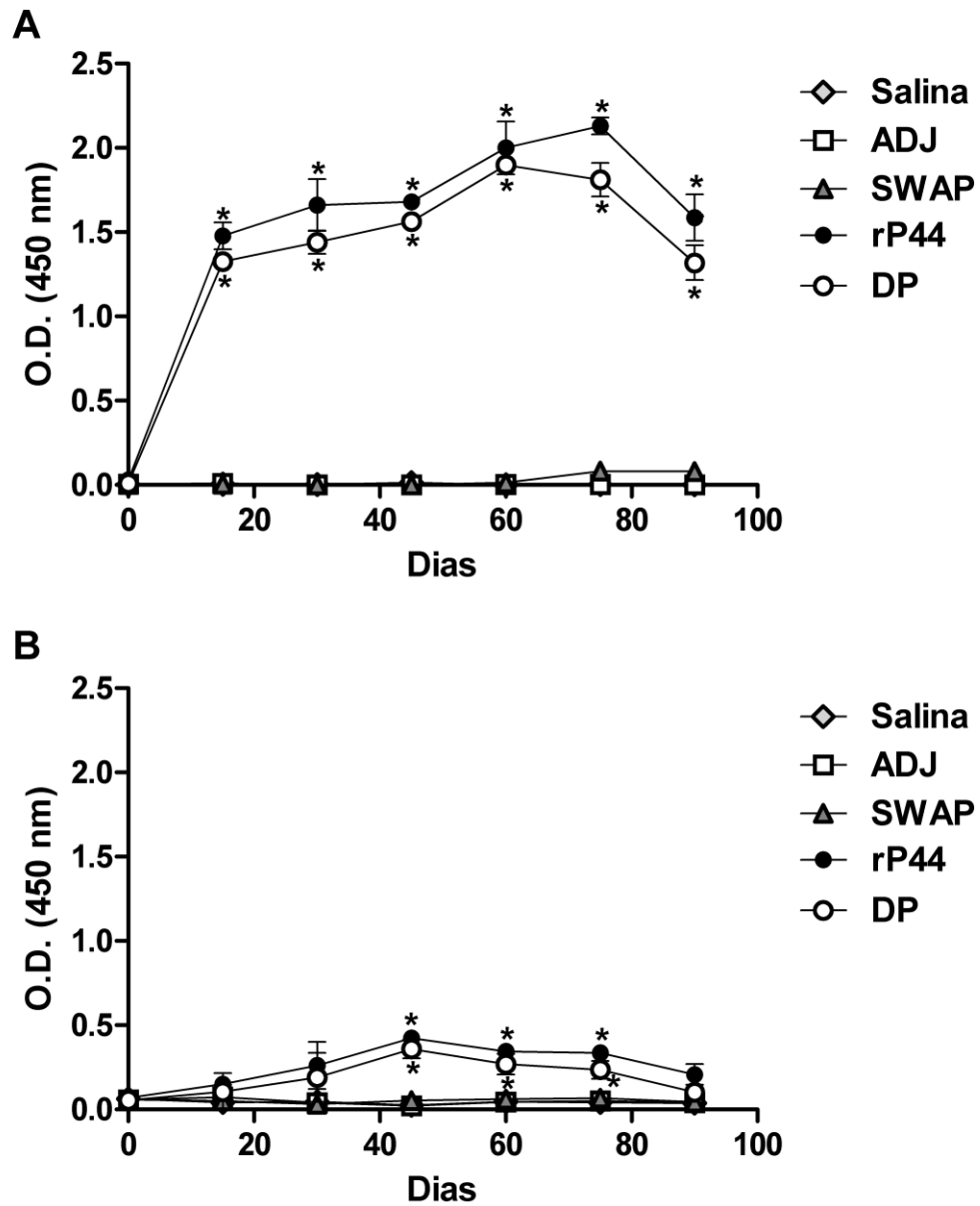


Figura 29: Detecção de anticorpos anti-rP44 em soros de camundongos imunizados com antígenos de *S. mansoni*. Soros de camundongos imunizados com rP22, rP44, SWAP ou Duas Proteínas e, posteriormente desafiados, foram utilizados em ensaios de ELISA na diluição de 1/400 para a detecção das subclasses IgG1(A) e IgG2a (B). Cada ponto representa a média e o desvio padrão do soro de cinco animais de cada grupo em cada ponto. Para o ensaio, foi utilizado 1µg/poço da placa sensibilizada com rP44. * Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos Salina, ADJ, SWAP, e rP22.

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

5.11 Predição de epítomos lineares de linfócitos B

Para determinar os principais epítomos das proteínas rP22 e rP44 envolvidos no reconhecimento por anticorpos durante a infecção por *S. mansoni*, foi realizada uma análise dos possíveis epítomos de células B encontrados nas seqüências. As seqüências de aminoácidos das proteínas rP22 e rP44 foram submetidas à análise no programa “on-line” “Bcepred” no site <http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>. O programa avalia várias propriedades físico-químicas como hidrofobicidade, acessibilidade, superfície exposta, propensão antigênica, flexibilidade, voltas e polaridade. A predição final dos epítomos é o resultado da combinação das propriedades de hidrofobicidade, flexibilidade, polaridade e superfície exposta, através do cruzamento de informações pelo método de redes neurais, que utiliza o banco de dados de epítomos de linfócitos B (BCIPEP). A Tabela 4 contém as seqüências dos peptídeos selecionados com o auxílio do servidor Bcepred.

Resultados

Tabela 4: Predição de epítomos de linfócitos B presentes nas estruturas das proteínas rP22 e rP44 de *S. mansoni*

Epítomos da proteína rP22			Epítomos da proteína rP44		
		Posição na estrutura primária			Posição na estrutura primária
1.	RGLGLKQNMRIERNH	64 - 80	1.	ERNIIPGIKVDKGVVP	100 - 116
2.	FKDIYNEVKKDPDMNK	114 - 130	2.	LSGGQSELDATKNLNE	271 - 287
3.	GVSIIASTMPKPKQVE	94 - 110	3.	AEYWRLGCRFAKWRCV	136 - 152
4.	DETVETSKLSESCRKE	20 - 36	4.	PGPKPWALTFSGRAL	291 - 307
5.	SGREQSLPEGVSIAS	85 - 101	5.	PNMVTAGQACKKAYTP	231 - 247
6.	KSELERRYGRVWQVNA	135 - 151	6.	GKGILAADESTATMGK	27 - 43
7.	EKFIQTYLTLLRDGDE	6 - 22	7.	ACKKAYTPQENALATV	239 - 255
8.	VNEWIALFDVDKQKI	42 - 58	8.	LFEETLHQKSDDGKTL	79 - 95
9.	SESCRKEKLDMKQVNE	29 - 45	9.	AQAICAPGKGILAADE	20 - 36
10.	FQSIQFQYDNKIILAW	164 - 180	10.	SDDGKTLPTLLAERNI	88 - 104
11.	YWASFSHEPFQSIQFQ	155 - 171	11.	GIKVDKGVVPLAGTDN	106 - 122
12.	VNAVTHSYWASFSHEP	148 - 164	12.	LATWKGKKENVHAAQE	311 - 327
13.	RNHIKTVQSGREQSLP	77 - 93	13.	QQIGVENNEENRRLYR	45 - 61
14.	NEMRIERNHIKTVQSG	71 - 87	14.	VHAAQEELLKLAKANG	321 - 337
15.	KDQKITFEFCRGLGL	53 - 69	15.	EGTLLKPNMVTAGQAC	225 - 241
16.	PKQVEVTQLFKDIYNE	105 - 121	16.	PLAGTDNETTTQGLDD	115 - 131
			17.	LVPIVEPEVLPDGDHD	183 - 199
			18.	SSHTPSYLAMLENANV	155 - 171
			19.	VLARYASICQQNGLVP	170 - 186
			20.	LNEINKIPGPKPWALT	284 - 300
			21.	NETTTQGLDDLASRCA	121 - 137
			22.	AQENDLRRIAQAICAP	11 - 27
			23.	FEGNMGTTLGDKSLFV	343 - 359
			24.	KALADHHVYLEGTLLK	215 - 241
			25.	RALQRTVPPAVPGITF	255 - 271
			26.	ATMGKRLQQIGVENNE	38 - 54
			27.	CRFAKWRCVLKISSHT	299 - 315
			28.	AKANGAAAVGKFEGNM	143 - 159

5.12 Reatividade dos soros murinos aos componentes peptídicos de rP22 e rP44

Para se verificar o reconhecimento dos prováveis epítomos lineares de linfócitos B derivados das proteínas p22 e p44 de *S. mansoni*, os peptídeos selecionados foram preparados através de “spot”-síntese em membrana de celulose e testados na presença dos soros de camundongos imunizados com as proteínas rP22 e rP44. Como controle da reação, foi utilizado o pool de soros de animais imunizados somente com adjuvante. O “pool” de soros de cada grupo de camundongos e do grupo controle foi colocado em contato com a membrana de spot na diluição de 1:500 e o resultado é mostrado nas Figuras 30 e 32. A quantificação da intensidade da reação foi feita através do programa MacBiophotonics ImageJ pela medida em “pixels” da área dos “spots”. Após a primeira reação utilizando a membrana de celulose, alguns “spots” permaneceram marcados, mesmo após o processo de regeneração e, portanto, foi descontado o valor em pixels dos spots que permaneceram marcados em todas as análises posteriores.

Os “spots” da rP22 que apresentaram maior reatividade frente ao pool de soros dos animais imunizados foram os de números 1, 2, 3, 6, 10, 11, 13, 14 e 16 (intensidade maior que 50 pixels) (Figuras 30B e C). A identificação dos peptídeos mais reativos dentro estrutura primária da rP22 mostrou que a posição deles coincide quase completamente com o domínio da cadeia leve de díneina presente nessa proteína (Figura 31), e pequena porção C-terminal do motivo “mão-EF” coincide com o peptídeo 1. Não foi possível verificar a posição desses peptídeos na estrutura espacial da proteína rP22, já que estrutura terciária de nenhuma proteína semelhante a ela foi descrita. Não ocorreu reação dos soros de animais que receberam somente adjuvante contra os peptídeos da rP22 (Figura 30A).

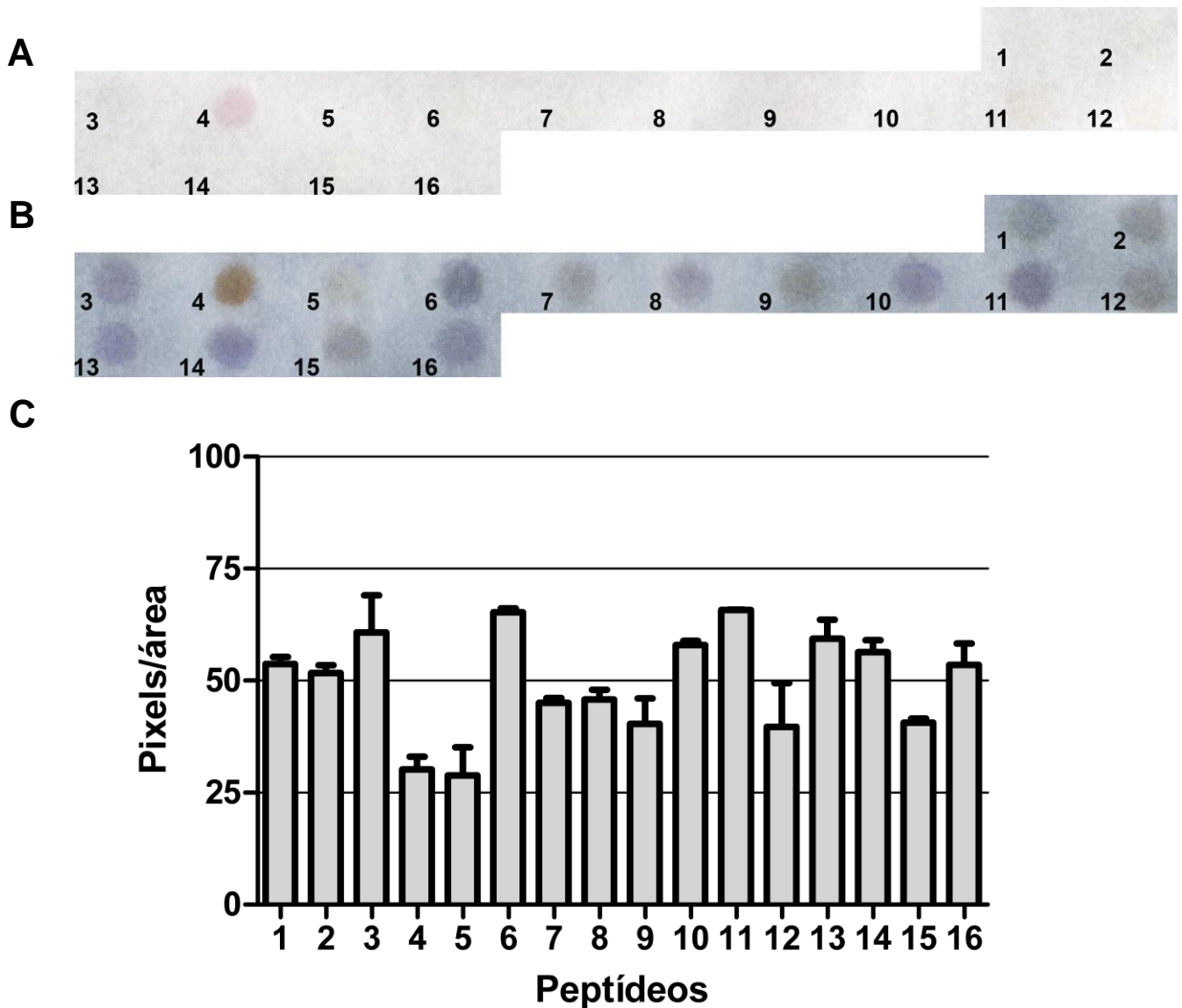


Figura 30: Reatividade dos soros de camundongos aos peptídeos derivados da proteína rP22 após a imunização. O pool de soros de 7 camundongos imunizados com a rP22 foi testado em membrana de celulose com peptídeos da rP22 covalentemente ligados na diluição de 1/500. (A) Controle negativo – membrana testada com soro de animais que receberam somente adjuvante. (B) Membrana testada com o “pool” de soros de camundongos imunizados com a rP22. A reatividade foi detectada através da ligação do anticorpo anti-Ig murino acoplado à enzima fosfatase alcalina (diluição 1:3000) e quantificada através do programa ImageJ (C). O valor em pixels obtido para cada spot em (A) foi descontado do valor obtido em (B) e representado em (C). Cada barra representa a média em pixels/área da duplicata de spots de um mesmo peptídeo.

Resultados

```

rP22      MDSPMEKFIQTYLTLRLDGDETVETSKLSESCRKEKLDMDQVNEWIALFDVDKDQKITFE 60
Sm21.7    MDSPMEKFIQTYLTLRLDGDETVETSKLSESCRKEKLDMDQVNEWIALFDVDKDQKITFE 60
          *****
          1      14      13      3      16      2
rP22      EFCRGLGLKQEMRIERNHIKTVQSGREQSLPEGVSIIASTMPKPKQVEVTQLFKDIYNE 120
Sm21.7    EFCRGLGLKQEMRIERNHIKTVQSGREQSLPEGVSIIASTMPKPKQVEVTQLFKDIYNE 120
          *****
          2      6      11      10
rP22      VKKDPDMNKVVKTFKSELERRYGRVWQVNAVTHSYWASFSHEPFOSIQFOYDNKILLAWR 180
Sm21.7    VKKDPDMNKVVKTFKSELERRYGRVWQVNAVTHSYWASFSHEPFOSIQFOYDNKILLAWR 180
          *****

rP22      TPSN 184
Sm21.7    TPSN 184
          ****
  
```

Figura 31: Localização dos peptídeos mais reativos ao soro de animais imunizados com a proteína rP22. As sequências das proteínas rP22 e Sm21.7 (Nº referência NCBI: XP_002569898) foram alinhadas utilizando o programa ClustalW. Os números ao final de cada linha indicam a posição dos resíduos de aminoácidos em cada proteína. A região que corresponde aos peptídeos mais reconhecidos pelo “pool” de soro de animais imunizados com a rP22 está destacada em amarelo e coincide quase completamente à região que corresponde ao domínio da cadeia leve da dineína (região sublinhada). Cada peptídeo está identificado por chave na estrutura da rP22 ou Sm 21.7. O domínio “mão-EF” está destacado em vermelho. (*) Resíduos de aminoácidos idênticos em todas as sequências alinhadas.

Os peptídeos mais reativos da proteína rP44 aos soros de camundongos imunizados com essa proteína foram os de números 1, 4, 5, 12, 13, 14, 21, 25, 26 e 27 (intensidade maior que 50 pixels) (Figura 32B e C). Também não ocorreu reação dos soros de animais que receberam somente adjuvante contra os peptídeos da rP44 (Figura 32A).

O alinhamento das sequências protéicas da rP44 e da frutose-bifosfato aldolase humana (HsALDOC) mostrou que a maior parte das regiões peptídicas mais reconhecidas pelo soro anti-rP44 apresenta alta % de identidade com a proteína humana, com exceção dos peptídeos de números 12 e 14 que apresentam identidade menor ou igual a 50% (Tabela 5 e Figura 33).

A localização dos peptídeos mais reativos na estrutura primária da rP44 mostrou que as sequências peptídicas de números 4, 26 e 27 coincidem com as regiões onde se encontram resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo da enzima e o peptídeo 5 está localizado imediatamente após o resíduo catalítico da enzima na sequência primária da rP44.

Outro parâmetro analisado foi a determinação da posição dos epítomos reativos ao soro anti-rP44 na estrutura espacial da proteína rP44. Para essa análise foi utilizado o programa SwissPdbViewer (<http://swissmodel.expasy.org/>). Utilizando como modelo espacial, a estrutura cristalina da cadeia A do tetrâmero da frutose-bifosfato aldolase cerebral humana (isoenzima C) (código PDB: 1XFB), que possui 67% de identidade com a sequência da rP44, foi possível verificar que os peptídeos reativos de números 12, 13, 14, 21 e 26 se encontram em regiões de α -hélice e alças na superfície da molécula. Os peptídeos de números 1, 4, 5, 25 e 27 são componentes de regiões de folhas β que formam a estrutura de TIM barril presente na estrutura da molécula e que está relacionada à sua atividade enzimática, uma vez que abriga os resíduos do domínio catalítico (Figura 34). Alguns peptídeos apresentam mais de um tipo de estrutura, como é o caso do peptídeo 4, 5 e 25.

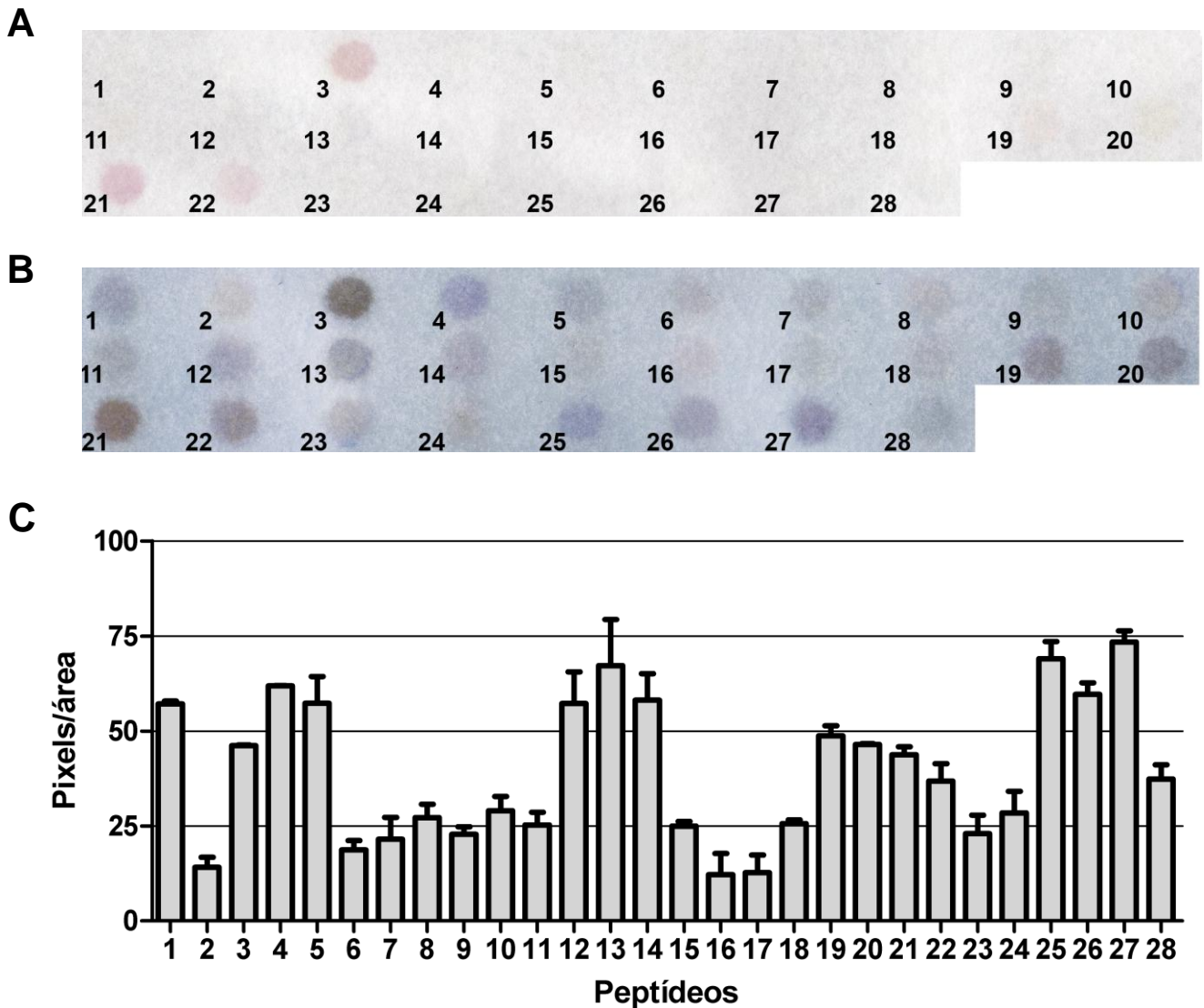


Figura 32: Reatividade dos soros de camundongos aos peptídeos derivados da proteína rP44 após a imunização. O pool de soros de 7 camundongos imunizados com a rP44 foi testado em membrana de celulose com peptídeos da rP44 covalentemente ligados na diluição de 1/500. (A) Controle negativo – membrana testada com soro de animais que receberam somente adjuvante. (B) Membrana testada com o “pool” de soros de camundongos imunizados com a rP44. A reatividade foi detectada através da ligação do anticorpo anti-Ig murino acoplado à enzima fosfatase alcalina (diluição 1:3000) e quantificada através do programa ImageJ (C). O valor em pixels obtido para cada spot em (A) foi descontado do valor obtido em (B) e representado em (C). Cada barra representa a média em pixels/área da duplicata de “spots” de um mesmo peptídeo.

Resultados

Tabela 5: Parâmetros associados aos peptídeos reativos ao soro anti-rP44 e presentes na estrutura da proteína rP44

Peptídeos (Nº)	Epítomos dominantes	% de identidade com Frutose-bifosfato aldolase C humana	Número de resíduos de aminoácidos que formam os domínios do sítio ativo
1	ERNIIPGIKVDKGVVP	68.75	-
4	PGPKPWALTFSGRAL	82.25	3
5	PNMVTAGQACKKAYTP	68.75	-
12	LATWKGKKENVHAAQE	37.5	-
13	QQIGVENNEENRRLYR	87.5	-
14	VHAAQEELLKLAKANG	50	-
21	NETTTQGLDDLASRCA	75	-
25	RALQRTVPPAVPGITF	82.75	-
26	ATMGKRLQQIGVENNE	68.25	1
27	CRFAKWRCVLKISSHT	75	2

Resultados

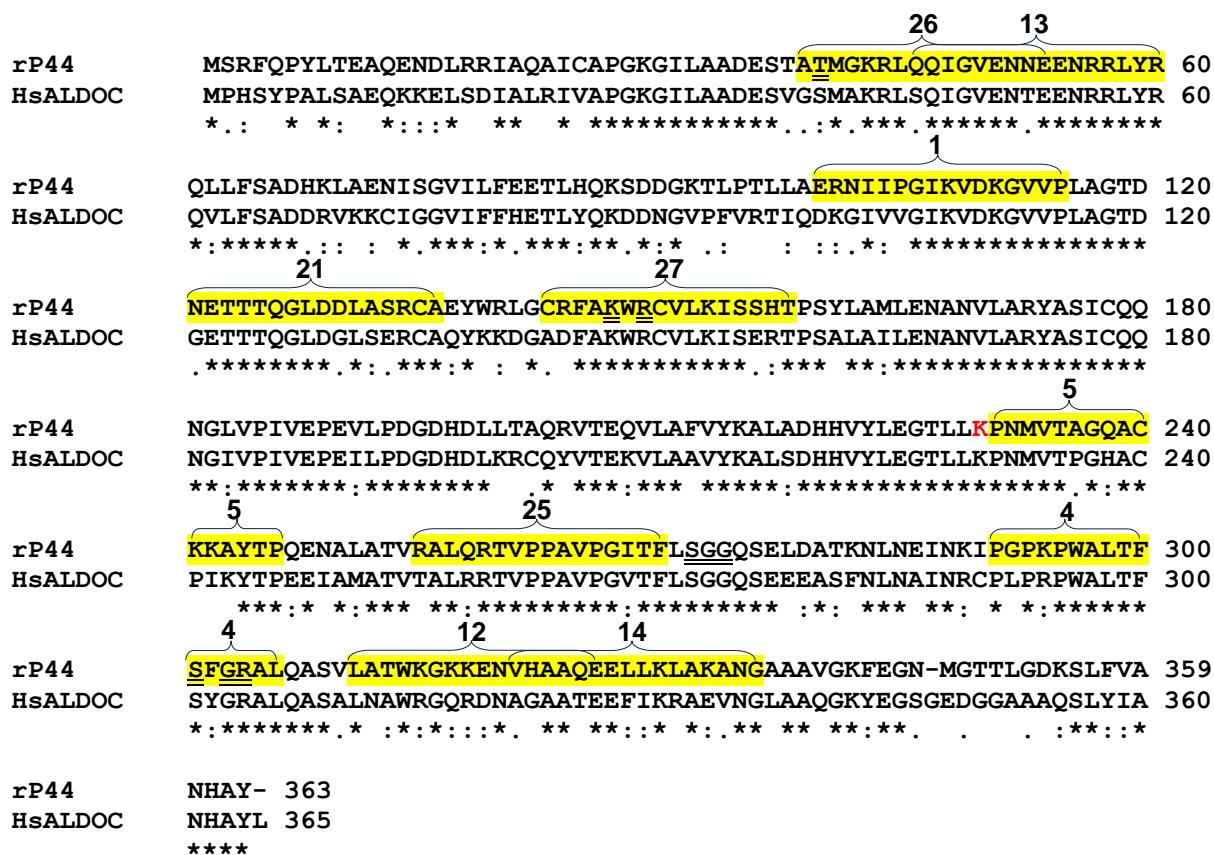


Figura 33: Alinhamento entre as proteínas rP44 e cadeia A da frutose-bifostato aldolase C de *Homo sapiens* (HsALDOC) e localização dos peptídeos mais reativos ao soro anti-rP44. As sequências das proteínas rP44 (Nº referência NCBI: XP_002575564.1) e HsALDOC (Nº referência NCBI: NP_005156.1) foram alinhadas utilizando o programa ClustalW. Os números ao final de cada linha indicam a posição dos resíduos de aminoácidos em cada proteína. Os resíduos de aminoácidos que formam os domínios do sítio ativo estão sublinhados e o resíduo catalítico está representado em vermelho. A região dos peptídeos mais reconhecidos pelo “pool” de soro de animais imunizados com a rP44 está destacada em amarelo e os peptídeos estão identificados por chaves. (*) Resíduos de aminoácidos idênticos em todas as sequências alinhadas. (:) Substituição conservativa e (.) substituição semiconservativa de resíduos de aminoácidos.

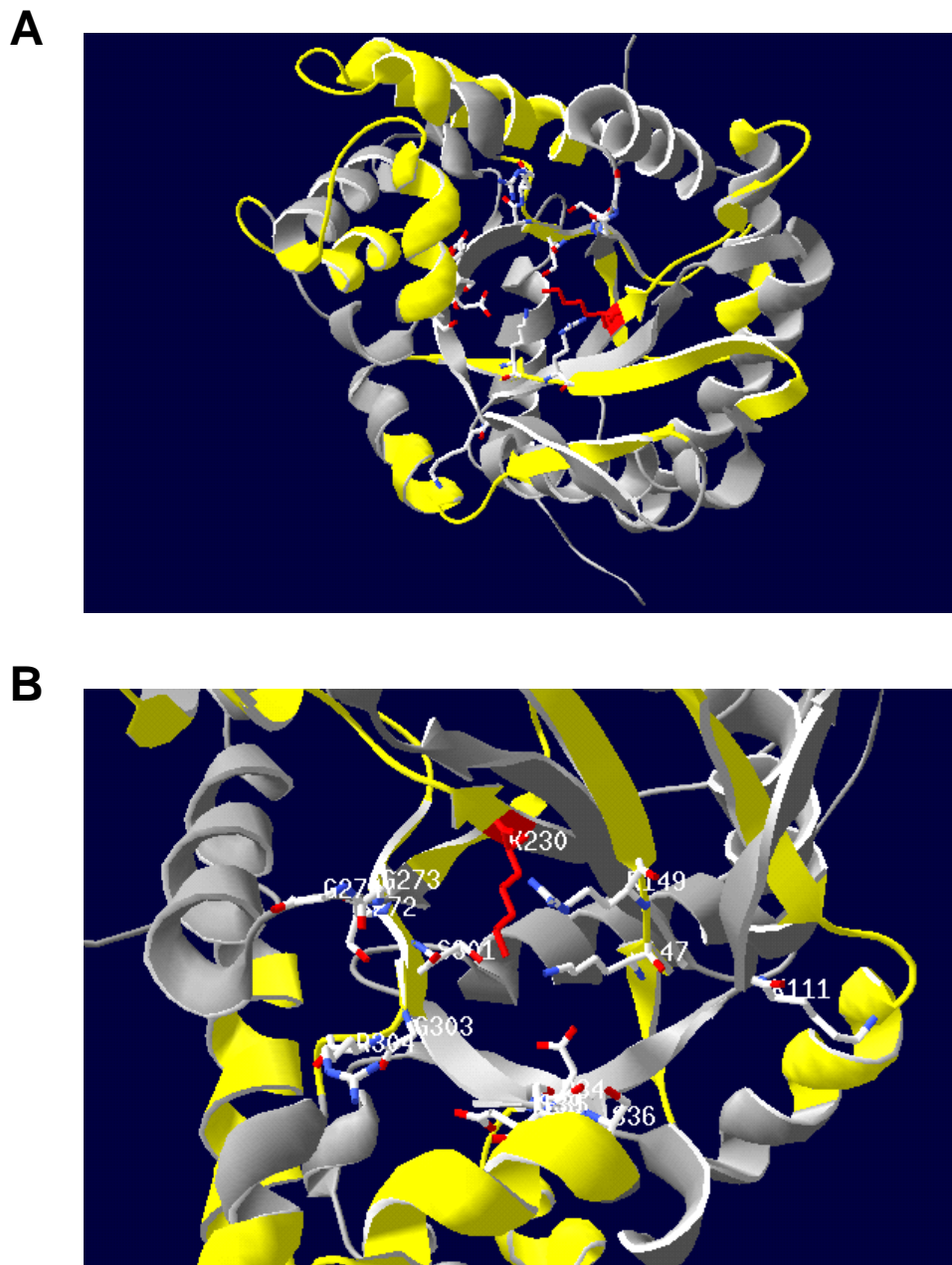


Figura 34: Localização dos peptídeos mais reativos ao soro anti-rP44 no modelo da estrutura cristalina da frutose-bifostato aldolase. (A) Representação da cadeia A da frutose-bifostato aldolase C que foi utilizada na localização dos peptídeos da rP44 mais reativos ao soro anti-P44, destacados em amarelo, utilizando programa SwissPdbViewer. (B) No maior aumento pode-se visualizar o resíduo catalítico está representado em vermelho e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do domínio catalítico da enzima.

5.13 Reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos epítomos preditos das proteínas estudadas

Os peptídeos preditos como epítomos lineares de linfócitos B e preparados através de spot-síntese em membrana de celulose foram testados na presença dos soros de pacientes esquistossomóticos com diferentes formas clínicas: aguda, crônica intestinal, crônica hepatoesplênica. Como controle da reação, pool de soros de pacientes não infectados foi utilizado. Uma vez que o pool de soros de pacientes não infectados reconhecia os peptídeos presentes na membrana de forma fraca, com valores menores que 25 pixels, foram considerados reativos somente os peptídeos que apresentassem valores de reatividade maiores que 50 pixels. O pool de soros de cada grupo de pacientes foi colocado em contato com a membrana de spot na diluição de 1:500.

Os peptídeos derivados da proteína rP22, assim como os peptídeos derivados da proteína rP44, apresentaram um padrão de reconhecimento bastante variado frente aos os soros de pacientes com diferentes formas clínicas (Figuras 35 e 36).

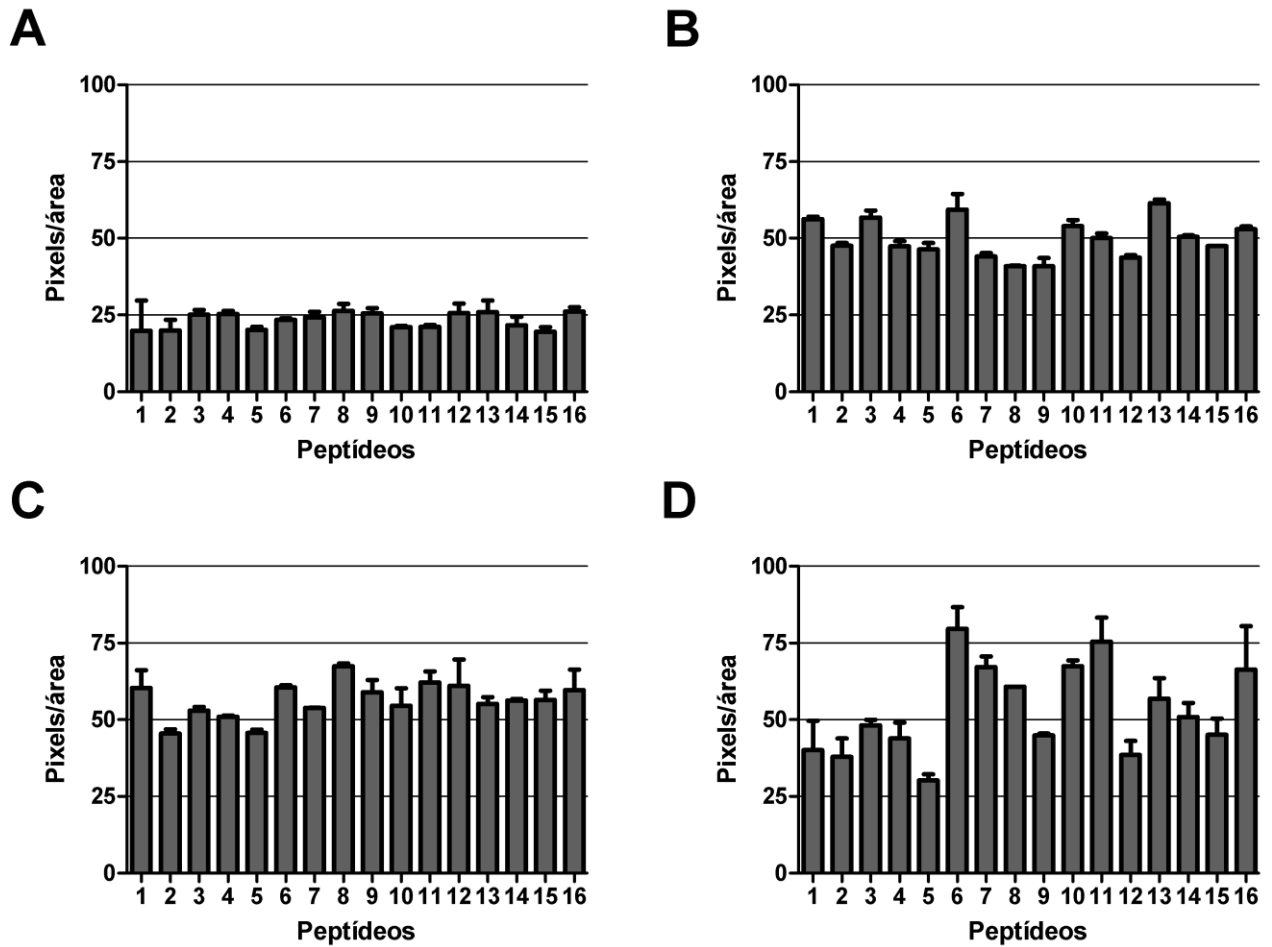


Figura 35: Reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos peptídeos derivados da proteína rP22. A reatividade dos soros foi medida através do software Image J pela intensidade de cor dos spots correspondentes aos peptídeos da proteína rP22. (A) Pool de soros de pacientes não infectados com *S. mansoni*; "pool" de soros de pacientes esquistossomóticos nas formas aguda (B), crônica intestinal (C) e crônica hepatoesplênica (D). A reação positiva foi detectada através da ligação do anticorpo anti-Ig humano acoplado à enzima fosfatase alcalina (diluição 1:5000). Cada barra representa a média em pixels/área da duplicata de spots de um mesmo peptídeo.

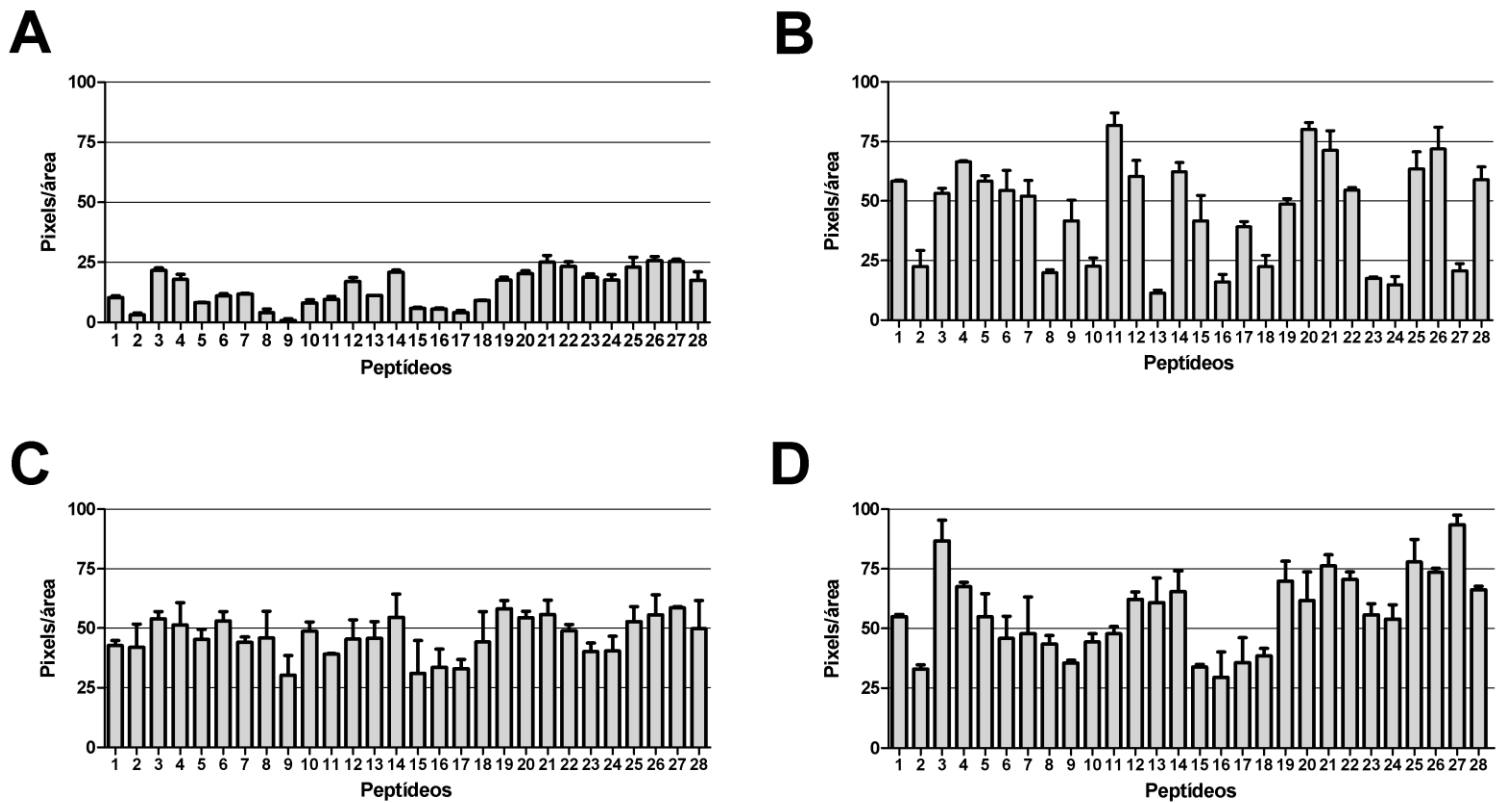


Figura 36: Reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos peptídeos derivados da proteína rP44. A reatividade dos soros foi medida através do software Image J pela intensidade de cor dos spots correspondentes aos peptídeos da proteína rP44. (A) Pool de soros de pacientes não infectados com *S. mansoni*; “pool” de soros de pacientes esquistossomóticos nas formas aguda (B), crônica intestinal (C) e crônica hepatoesplênica (D). A reação positiva foi detectada através da ligação do anticorpo anti-Ig humano acoplado à enzima fosfatase alcalina (dilução 1:5000). Cada barra representa a média em pixels/área da duplicata de spots de um mesmo peptídeo.

Através de análise comparativa entre os peptídeos da rP22 mais reconhecidos pelos soros de pacientes esquistossomóticos (Tabela 6) foi possível verificar que os peptídeos de números 6, 10, 11, 13, 14 e 16 são reconhecidos pelo pool de soros de todas as formas clínicas. Já os peptídeos 4, 9, 12 e 15 reagiram somente com o soro de pacientes crônico intestinais. Os peptídeos 7 e 8 foram reconhecidos por soros de pacientes crônicos intestinais e hepatoesplênicos enquanto os peptídeos 1 e 3 reagiram somente com soros de pacientes agudos e crônicos intestinais.

A comparação da reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos com a reatividade dos soros de camundongos imunizados com rP22 frente aos peptídeos reativos dessa proteína mostrou que o peptídeo 2 só foi reconhecido pelo soro murino imunizado. Todos os outros peptídeos reativos ao soro anti-rP22 de camundongos imunizados foram reconhecidos em pelo menos dois pools de soros de formas clínicas diferentes. A reatividade dos soros ao peptídeo 5 foi menor que 50 pixels/área tanto em animais imunizados com a rP22 quanto em pacientes esquistossomóticos.

A análise da reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos aos peptídeos da proteína rP44 mostrou que os peptídeos 3, 4, 14, 20, 21, 25 e 26 foram reconhecidos pelo pool de soros de todas as formas clínicas (Tabela 7). O peptídeo 11 reagiu somente com o pool de soros de pacientes da forma aguda enquanto os peptídeos 13, 23 e 24 reagiram somente com o pool de soros de pacientes hepatoesplênicos. Os peptídeos 1, 22 e 28 reagiram tanto com os soros de pacientes agudos quanto com os soros de pacientes hepatoesplênicos, e o peptídeo 6 reagiu com soros de pacientes agudos e crônicos intestinais. Os peptídeos 19 e 27 reagiram com os soros de pacientes crônicos intestinais e hepatoesplênicos, mas não foram reativos aos soros de pacientes na forma aguda da esquistossomose.

A reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos e dos soros de camundongos imunizados com rP44 frente aos peptídeos reativos dessa proteína também foi comparada. Todos os peptídeos reativos ao soro anti-rP44 de camundongos imunizados

Resultados

foram reconhecidos em pelo menos dois pools de soros de formas clínicas diferentes. A reatividade dos soros aos peptídeos 7, 8, 9, 10, 16, 17 e 18 foi menor que 50 pixels/área tanto em animais imunizados com a rP44 quanto em pacientes esquistossomóticos.

Tabela 6: Reconhecimento diferencial dos peptídeos derivados da proteína rP22

Peptídeos	Reatividade dos soros			
	Camundongos imunizados com rP22	Pacientes		
		Agudo	Crônico intestinal	Crônico hepatoesplênico
1	•	•	•	
2	•			
3	•	•	•	
4			•	
5				
6	•	•	•	•
7			•	•
8			•	•
9			•	
10	•	•	•	•
11	•	•	•	•
12			•	
13	•	•	•	•
14	•	•	•	•
15			•	
16	•	•	•	•

• Representa a reatividade do “pool” de soros acima de 50 pixels/área.

Resultados

Tabela 7: Reconhecimento diferencial dos peptídeos derivados da proteína rP44

Peptídeos	Reatividade dos soros			
	Camundongos imunizados com rP44	Pacientes		
		Agudo	Crônico intestinal	Crônico hepatoesplênico
1	•	•		•
2				
3		•	•	•
4	•	•	•	•
5	•	•		•
6		•	•	
7				
8				
9				
10				
11		•		
12	•	•		•
13	•			•
14	•	•	•	•
15		•		
16				
17				
18				
19			•	•
20		•	•	•
21	•	•	•	•
22		•		•
23				•
24				•
25	•	•	•	•
26	•	•	•	•
27	•		•	•
28		•		•

• Representa a reatividade do “pool” de soros acima de 50 pixels/área.

VI – DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária debilitante que representa um dos principais problemas de saúde pública em áreas endêmicas como África, América do Sul e sudeste asiático (Chitsulo *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2011). Uma vez que os programas atuais de controle da esquistossomose utilizados para a redução da mortalidade e morbidade têm se mostrado inadequados, ou até mesmo ineficazes, há um consenso de que o desenvolvimento de uma vacina protetora apropriada seria uma ferramenta importante a ser conjugada às estratégias de controle vigentes.

Inúmeras pesquisas têm buscado o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica através de ensaios de proteção que utilizam como antígenos vacinais preparações multiprotéicas obtidas de vários estádios de vida do *S. mansoni*. A purificação de antígenos nativos, assim como a produção de antígenos recombinantes, também são importantes alternativas utilizadas na busca de antígenos com potencial protetor na esquistossomose. Além disso, as recentes publicações do genoma de *S. mansoni* e de *S. japonicum* trouxeram à comunidade científica uma enorme quantidade de dados a serem explorados na pesquisa de novos candidatos à vacina (Berriman *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009). Neste contexto, nosso laboratório identificou uma fração protéica protetora, conhecida como PIII, obtida a partir do fracionamento da preparação antigênica solúvel de verme adulto – SWAP. Além de reduzir a carga parasitária, a fração PIII também foi capaz de reduzir a área da inflamação granulomatosa em modelos murinos de imunização (Hirsch & Goes, 1996; Hirsch *et al.*, 1997; Gustavson, S *et al.*, 1998).

A fração PIII de verme adulto de *S. mansoni* é composta por várias proteínas, sendo que algumas delas já foram isoladas e apresentaram diferentes graus de proteção e regulação da resposta granulomatosa descritas para fração de origem. As proteínas P24 e P35 nativas, além das proteínas P44 e P97 (paramiosina) recombinantes, são alguns dos componentes de PIII cujas atividades protetora e imunomoduladora já foram identificadas (Pearce *et al.*, 1988; Gustavson, S *et al.*, 1998; Zouain *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2008).

O isolamento de clones presentes na biblioteca de cDNA de verme adulto utilizando soro anti-P111 possibilitou a identificação de sequências codificadoras de proteínas ainda pouco estudadas e que poderiam ser úteis na pesquisa por novos candidatos à vacina contra esquistossomose (Makarova *et al.*, 2003). Uma das sequências identificadas correspondia à sequência codificadora da uma proteína de aproximadamente 22kDa, que foi denominada rP22. Outra sequência gênica identificada correspondia à proteína rP44, uma frutose 1,6-bifosfato aldolase. Considerando-se a necessidade de se desenvolver novas estratégias para o controle da esquistossomose, o presente trabalho visou estudar a resposta protetora individual ou combinada das proteínas rP22 e rP44 de *S. mansoni* na infecção experimental.

Para a obtenção das proteínas foi utilizada a técnica de recombinação gênica. Os avanços da engenharia genética permitem a produção em larga escala de fragmentos protéicos de organismos complexos em bactérias, a partir da inserção de plasmídeos recombinantes.

O plasmídio escolhido para a clonagem das sequências gênicas das proteínas rP22 e rP44 foi o pET-DEST-42. Esse plasmídeo permite a obtenção das proteínas de interesse em fusão com uma cauda de histidina, o que facilita os processos posteriores de purificação (Hartley *et al.*, 2000).

As estratégias de clonagem, expressão e purificação adotadas permitiram a obtenção das proteínas puras com diferentes graus de rendimento, sendo que a proteína solúvel rP22 foi purificada em maiores quantidades que a proteína insolúvel rP44. Após a purificação, as proteínas foram utilizadas em ensaios de proteção. A proteína rP22, ainda pouco estudada quanto à sua função, estrutura e localização celular, foi utilizada em ensaios de determinação da sua estrutura secundária e em ensaios de imunolocalização.

Inicialmente, a sequência primária da proteína rP22 foi determinada e apresentou identidade completa com o antígeno Sm 21.7. A proteína Sm 21.7 foi descrita inicialmente por Francis e colaboradores (1992) e denominada como “antígeno dominante de vacina”

porque era reconhecida preferencialmente pelo soro de camundongo imunizado com cercárias irradiadas em relação ao soro de camundongo infectado.

A proteína rP22 apresenta um domínio “mão EF” que se liga ao cálcio na sua estrutura entre os resíduos de aminoácidos 41 e 66. O domínio “mão EF” está presente em um grupo de antígenos parasitários importantes, tais como Sm 22.6 e Sm 21.6 (Fitzsimmons *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2009). Essas proteínas são reconhecidas por anticorpos de camundongos imunizados com cercárias atenuadas e pelo soro de pacientes esquistossomóticos resistentes à reinfeção. Acredita-se que as proteínas com o motivo “mão EF” possam atuar como componentes do citoesqueleto ou estar envolvidas em mecanismos de transdução de sinais e de divisão celular (Kim *et al.*, 2011).

A proteína rP22 também apresenta um domínio de cadeia leve de dineína na sua porção C-terminal, entre os resíduos de aminoácidos 81 e 181. Proteínas que contêm esse domínio podem estar relacionadas às funções do citoesqueleto, tais como: a motilidade de vesículas e organelas, contração muscular e manutenção do arcabouço estrutural do tegumento do parasita (Braschi *et al.*, 2006).

O conhecimento da estrutura, função e localização das proteínas envolvidas em atividades essenciais às células pode contribuir grandemente para a identificação de novos alvos moleculares e no desenvolvimento de novos fármacos. Através dos ensaios de espalhamento dinâmico da luz (DLS) e dicroísmo circular (CD) foi possível determinar que a estrutura da proteína rP22 apresenta grande estabilidade térmica e se organiza na forma de um monômero composto por aproximadamente 30% de α -hélices. Em temperaturas próximas a 60°C, a porcentagem de regiões “random coil” aumenta na estrutura da rP22, e, concomitantemente, é verificada uma diminuição na porcentagem de α -hélices, sugerindo que a estrutura conformacional dessa proteína se mantém estável abaixo desse valor. Proteínas que possuem boa estabilidade física e apresentam estrutura monomérica podem ser mais facilmente utilizadas na preparação de formulações farmacêuticas, devido à redução na formação de agregados protéicos durante os processos de manipulação e

armazenamento. A formação de agregados protéicos em formulações protéicas de uso terapêutico ou profilático tem sido relacionada ao aparecimento de reações adversas (Malvern, 2011). Portanto, as características físicas da rP22 podem favorecer a sua possível utilização em formulações vacinais ou ensaios de imunodiagnóstico.

Além do estudo estrutural da rP22, foi determinada a localização dessa proteína nos tecidos de verme adulto e miracídio de *S. mansoni*. Por meio de análises de microscopia confocal verificou-se que a rP22 é uma proteína tegumentar altamente expressa na superfície de vermes adultos machos e fêmeas, além de ser muito expressa na superfície do miracídio contido no ovo de *S. mansoni*. É interessante destacar que a proteína rP22 é um componente do tegumento, mas não é secretada pelas células e também não é uma proteína transmembrana, pois não apresenta região de peptídeo sinal nem domínio transmembrana em sua estrutura (Rezende *et al.*, 2011). É provável que a rP22 seja uma proteína citoplasmática das células tegumentares de *S. mansoni*. Corroborando esses resultados, Braschi e colaboradores (2006) examinaram um grande número de proteínas tegumentares com domínio dineína, através de análises proteômicas, e concluíram que a camada imediatamente abaixo da membrana plasmática de células tegumentares é rica em homólogos de dineína que se organizam formando complexos macromoleculares.

Proteínas tegumentares como a rP22 são fontes importantes de antígenos parasitários para o desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica, principalmente porque o tegumento é uma camada dinâmica que interage com as células do hospedeiro e está envolvido em inúmeras funções, tais como a nutrição, excreção, osmorregulação, transdução de sinais, além da evasão imune e modulação (Jones *et al.*, 2004; Van Van Hellemond *et al.*, 2006).

Muitos estudos têm demonstrado que algumas proteínas tegumentares são capazes de produzir altos níveis de proteção na esquistossomose experimental murina (Zouain *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2008; Farias *et al.*, 2010). A proteína rP44 também já foi identificada como uma proteína tegumentar presente em vários estádios de vida do *S. mansoni* (El-

Dabaa *et al.*, 1998). Em ensaios de imunização com a rP44, realizados em nosso laboratório, foi evidenciada uma redução de 67% do número de vermes recuperados do sistema porta-hepático (Marques *et al.*, 2008). A possibilidade de se alcançar um nível de proteção maior que aquele obtido pela imunização individual utilizando a proteína rP44 estimulou a nossa busca por uma associação entre a proteína rP44 e outro antígeno com características protetoras. A formulação proposta foi então a da combinação entre a proteína rP44 e a proteína rP22 de *S. mansoni*.

A - Utilização das proteínas rP22 e rP44 na formulação de uma vacina na esquistossomose experimental

Neste trabalho investigamos a indução da resposta imune protetora das proteínas recombinantes rP22 e rP44 utilizadas individualmente ou combinadas em formulações vacinais. Para isso, as proteínas foram combinadas aos adjuvantes hidróxido de alumínio e *Corynebacterium parvum* para imunizar camundongos C57BL/6. O hidróxido de alumínio é descrito como sendo capaz de induzir, tanto em humanos como em modelos experimentais, uma alta produção de imunoglobulinas e de IL-4, característicos de uma resposta tipo Th2 (Lindblad, 2004). Já o *C. parvum* é um importante estimulador da resposta imune celular (Th1), induzindo a produção de IFN- γ e ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos (Soong *et al.*, 1995).

A imunização dos animais com as proteínas recombinantes individuais ou combinadas foi capaz de reduzir o número de vermes recuperados na perfusão em aproximadamente 50%, demonstrando a capacidade protetora das proteínas rP22 e rP44. A redução do número de vermes recuperados do sistema porta-hepático produzida pela imunização com a formulação das proteínas combinadas não mostrou um efeito aditivo de proteção em relação ao uso individual das mesmas nas formulações vacinais.

A resposta imunológica direcionada contra o *S. mansoni* envolve a participação da resposta imune humoral e celular (Jankovic *et al.*, 1999). Os camundongos imunizados com as proteínas recombinantes, juntas ou separadas, produziram níveis elevados de IgG contra todas as proteínas utilizadas nas imunizações, sendo que os níveis de IgG permaneceram estáveis ao longo da infecção. Os camundongos vacinados com a rP22 produziram níveis significativos de IgG1 e IgG2a, sendo que os níveis de IgG2a sofreram uma diminuição ao longo da infecção. A produção significativa de IgG1 e IgG2a também foi detectada nos soros dos animais imunizados com a rP44, entretanto, os níveis de IgG2a sofreram uma redução importante durante a infecção desafio a ponto de não serem significativos ao final da infecção. A imunização com a combinação de proteínas estimulou a produção de IgG1 e IgG2a anti-rP22 e anti-rP44, sendo que os níveis dessas imunoglobulinas foram maiores contra a rP22.

A influência de diferentes citocinas na produção de anticorpos e expressão de isotipos já foi bem documentada (Snapper & Paul, 1987; Esser & Radbruch, 1990; Finkelman *et al.*, 1990). IFN- γ é o principal indutor da secreção de IgG2a (Banchereau & Rousset, 1992), enquanto IL-4 tem sido associada à produção de IgG1 em camundongos.

Apesar de ainda não haver um consenso em relação ao tipo de resposta imune protetora apropriada na esquistossomose, sabe-se que tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular apresentam mecanismos efetores importantes para o controle da infecção (Wynn & Hoffmann, 2000). Os mecanismos de ação dos anticorpos no combate a infecções incluem a neutralização de antígenos, o aumento da fagocitose e da toxicidade mediada por células, a ativação do complemento, a inibição do crescimento, aderência, ou efeitos antimicrobianos diretos (Buissa-Filho *et al.*, 2008). Além disso, a resposta imune humoral e celular na esquistossomose humana varia de acordo com a fase e forma clínica da doença. (Joseph *et al.*, 1983; Khalife *et al.*, 1986).

Em relação à resposta imune celular, foi demonstrado que a proteção conferida aos animais imunizados com cercárias irradiadas pode estar associada tanto ao perfil Th1, ao

perfil Th2 ou ao balanço entre perfis Th1/Th2 (Wynn & Hoffmann, 2000). O envolvimento de IFN- γ na imunidade protetora induzida pela vacinação de animais com cercárias irradiadas já é bastante descrito (Hewitson *et al.*, 2005). O tratamento de camundongos vacinados com anticorpos monoclonais anti- IFN- γ impediu completamente a indução de imunidade protetora (Smythies *et al.*, 1992). O uso de camundongos knockout para IFN- γ obteve resultados semelhantes e confirmou o papel essencial de IFN- γ na imunidade protetora na esquistossomose experimental (Wilson *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que os animais imunizados com rP22 e rP44, associadas ou não, produziam níveis significativos de IFN- γ , sugerindo que o efeito protetor das proteínas recombinantes poderia estar relacionado à elevada produção de IFN- γ por esses animais. Além disso, a adição de rP22 à cultura de esplenócitos imunizados com as proteínas recombinantes promoveu um aumento da produção de IFN- γ por essas células.

Durante a infecção de camundongos pelo *S. mansoni* ocorre uma alteração do perfil de produção de citocinas durante as diferentes fases da doença. Na fase aguda da infecção, ocorre a produção predominante de citocinas características da resposta Th1. Com o início da ovoposição, as células T CD4⁺ passam a produzir predominantemente citocinas da resposta Th2, o que caracteriza a fase crônica da doença (Wynn *et al.*, 1998; Pearce & Macdonald, 2002). O aumento da produção de citocinas do perfil Th2 está relacionado à geração de fibrose e à patologia associada ao granuloma. A manutenção de níveis elevados de IFN- γ durante a transição para a fase crônica da doença pode ter contribuído para o balanço da resposta Th2 predominante durante a fase crônica, uma vez que ocorreu uma redução significativa da fibrose e da área dos granulomas dos grupos imunizados com rP22 ou com as duas proteínas.

Na pesquisa de novos antígenos candidatos à vacina anti-esquistossomótica, não somente a atividade protetora deve ser levada em consideração, mas também a capacidade desse antígeno em contribuir para a redução de morbidade associada à doença (WHO, 2005). As reações granulomatosas que ocorrem ao redor dos ovos de *Schistosoma*

representam o principal problema relacionado à patologia da esquistossomose, e a intensidade dessas reações está relacionada à morbidade gerada no hospedeiro (Wynn & Cheever, 1995; Stadecker & Hernandez, 1998; Abath *et al.*, 2006). Na esquistossomose murina, a patologia é induzida pela reação granulomatosa dirigida por células CD4⁺ do tipo Th2 em resposta aos ovos retidos no tecido hepático. As citocinas IL-4 e IL-13 do perfil Th2 contribuem, respectivamente, para o aumento resposta granulomatosa e da fibrose enquanto as citocinas IL-10, IL13R α 2 e IFN- γ limitam o seu desenvolvimento (Fallon *et al.*, 2000; Hesse *et al.*, 2004; Mentink-Kane *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007).

Nesse estudo, as análises histológicas dos cortes de fígado de camundongos vacinados com a rP22 ou com a combinação das duas proteínas revelaram que houve uma redução significativa da área dos granulomas e da fibrose nesse tecido. A imunização dos camundongos com a rP44 reduziu significativamente a área do granuloma hepático, mas não foi capaz de reduzir a fibrose nesse tecido. A redução da área granulomatosa pode estar associada à baixa produção de IL-4 detectada para todos os grupos imunizados com as proteínas recombinantes. Outro fator que pode ter contribuído, em parte, para a redução da área do granuloma foi a significativa produção de IL-10 verificada em todos os grupos imunizados com as proteínas recombinantes, especialmente naqueles que receberam a rP22 como antígeno vacinal. Além disso, a produção de IL-10 foi estimulada pela adição *in vitro* de rP22 à cultura de esplenócitos de todos os grupos imunizados. Esses resultados sugerem que a redução da área e da fibrose associada ao granuloma presentes nos grupos imunizados com a rP22 podem estar associadas à produção mais elevada de IL-10 nesses grupos. Resultados semelhantes foram evidenciados na imunização de camundongos com a fração PIII, sugerindo que a proteína P22 nativa pode desempenhar um importante papel na regulação do granuloma produzida por PIII (Zouain *et al.*, 2000).

A citocina TNF- α apresenta atividade pró-inflamatória e está envolvida no recrutamento de células efetoras para a região do granuloma em resposta aos estímulos contínuos dos ovos de *Schistosoma* retidos no fígado (Burke *et al.*, 2009). A alta produção

desta citocina foi verificada nos grupos imunizados com rP22, rP44 ou a combinação das duas proteínas. Os níveis aumentados dessa citocina foram evidenciados principalmente pela adição *in vitro* da proteína rP22. Entretanto, a elevada produção de TNF- α não impediu que ocorresse a redução da área do granuloma e da fibrose nos animais imunizados com rP22. É possível que o balanço entre a produção de citocinas imunomoduladoras e TNF- α tenha impedido que essa última promovesse um aumento da inflamação granulomatosa e de uma resposta pró-fibrótica.

A proliferação *in vitro* de esplenócitos foi avaliada e os resultados obtidos foram analisados para cada grupo de camundongos testados. Verificou-se que os esplenócitos de todos os animais proliferaram mais em resposta aos estímulos antigênicos do que na ausência deles (índice de proliferação encontrado foi sempre maior que 1). Curiosamente, a adição de rP22 às culturas de esplenócitos de todos os grupos testados induziu essas células a proliferarem menos que em resposta aos outros estímulos antigênicos. É provável que a atividade antifibrótica e de redução do granuloma promovida por rP22 tenha alguma relação com capacidade dessa proteína em diminuir a proliferação dos esplenócitos *in vitro*. Entretanto, a participação de outras citocinas e mediadores da reação granulomatosa em resposta à imunização com proteína rP22 precisa ser mais bem avaliada para que essa relação se torne bem estabelecida.

Outro parâmetro associado à morbidade na esquistossomose é o número de ovos retidos no tecido hepático. Quanto maior é a retenção de ovos no fígado, maior é a resposta granulomatosa, e, mais grave se torna a inflamação gerada nesse órgão (Capron *et al.*, 2002). A imunização dos camundongos com as proteínas rP22 e rP44 associadas foi capaz de reduzir significativamente o número de ovos retidos nos fígados desses animais enquanto a imunização utilizando as proteínas individuais não diminuiu significativamente o número de ovos retidos.

Todos os resultados demonstraram o grande potencial do uso combinado das proteínas rP22 e rP44 ou do uso isolado da proteína rP22 na formulação de uma vacina

anti-esquistossomótica protetora e capaz de reduzir os efeitos de morbidade associados à esquistossomose.

B - Predição de epítomos lineares de linfócitos B das proteínas rP22 e rP44 recombinantes e avaliação da reatividade dos soros frente aos peptídeos selecionados

Inúmeras pesquisas vêm se desenvolvendo na busca por uma vacina anti-esquistossomótica. Avanços significativos na tecnologia de vacinação nas últimas décadas permitiram a construção de vacinas que promovam intensa imunidade humoral e celular (Hotez *et al.*, 2010). Entretanto, para se implementar efetivamente estes avanços numa vacina anti-esquistossomótica é necessário saber que estratégia de imunização promoverá uma resposta imune mais efetiva.

Uma das alternativas para o desenvolvimento de novas vacinas é a utilização de peptídeos representativos de antígenos protetores. Uma vacina peptídica ideal deve conter epítomos capazes de induzir resposta protetora para a maioria dos indivíduos dentro de uma população geneticamente heterogênea, e excluir aqueles epítomos que causem imunopatologia ou resposta indesejada (Purcell *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foi evidenciada a atividade protetora das proteínas rP22 e rP44 de *S.mansoni* na esquistossomose experimental. Para caracterizar os epítomos relacionados à resposta humoral produzida após a imunização de animais experimentais com as proteínas rP22 e rP44, realizou-se a predição dos epítomos lineares de linfócitos B encontrados na sequência primária dessas proteínas e os peptídeos selecionados foram sintetizados em membrana de celulose pelo método de "Spot".

Através de imunoensaios utilizando soros de camundongos imunizados com a rP22 foi possível verificar que os peptídeos mais reativos eram aqueles que se localizavam predominantemente na região do domínio da cadeia leve de dineína, na porção C-terminal da proteína. É provável que ligação dos anticorpos anti-rP22 ao domínio dineína dessa

proteína possa interferir em funções essenciais das células tegumentares e promover danos ao tegumento do parasita.

A utilização dos soros de camundongos imunizados com a rP44 em imunoenaios revelou que a maior parte das regiões peptídicas mais reconhecidas pelo soro de camundongo anti-rP44 apresenta alta porcentagem de identidade com a proteína frutose-bifosfato aldolase C humana (HsALDOC). Devido à grande semelhança entre alguns dos epítomos reativos da rP44 e da HsALDOC, existe a possibilidade de que o uso desses peptídeos como componentes de uma vacina possa produzir uma resposta imune capaz de não somente reconhecer esses epítomos no tegumento do parasita, mas também em células do próprio hospedeiro (Purcell *et al.*, 2007). Portanto, esses resultados podem auxiliar na escolha dos peptídeos mais adequados ao desenvolvimento de uma vacina baseada na utilização de epítomos da P44.

Um antígeno é reconhecido por anticorpos através da sua superfície (Dimmock & Hardy, 2004). Utilizando o modelo da estrutura cristalina da frutose-bifostato aldolase foi possível verificar que os peptídeos mais reativos da rP44 eram encontrados nas regiões de α -hélice ou de alças presentes na superfície dessa proteína. Outros peptídeos reativos da rP44 eram encontrados nas regiões de folhas β que compõem o domínio barril TIM presente na estrutura da proteína. O domínio barril TIM contém resíduos de aminoácidos do sítio catalítico e está envolvido na atividade enzimática da P44. A ligação dos anticorpos anti-rP44 às regiões de superfície ou ao domínio barril TIM dessa proteína poderia impedir estericamente o sítio ativo da enzima e comprometer o seu funcionamento. É provável que a diminuição da atividade enzimática da P44 possa produzir uma importante alteração do balanço energético das células tegumentares do parasita, através da inibição da via glicolítica da qual essa enzima faz parte, e promover a morte celular nesse tecido.

Estudos anteriores demonstraram que a P22 e a P44 são reconhecidas pelo soro de pacientes esquistossomóticos (Fitzsimmons *et al.*, 2007; Mutapi *et al.*, 2011). A reatividade dos soros de pacientes esquistossomóticos nas formas aguda, crônica e hepatoesplênica

aos peptídeos sintéticos derivados de P22 e P44 foi realizada e diferentes padrões de reatividade foram determinados para cada grupo de pacientes.

Alguns peptídeos mais reativos foram reconhecidos pelo soros de somente um ou dois dos grupos de pacientes. A seleção desses peptídeos pode servir como importante ferramenta em pesquisas voltadas para o diagnóstico diferencial das formas clínicas da esquistossomose. Para tal, se faz necessária a avaliação individual da reatividade do soro de cada paciente aos peptídeos escolhidos e determinação da sensibilidade e especificidade do método.

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. Vários peptídeos da rP22 e da rP44 que foram reativos aos soros humanos exibiram baixa reatividade aos soros murinos, e alguns peptídeos apresentaram baixa reatividade para ambos os soros. Essas diferenças de reatividade podem ser úteis no estudo de imunogenicidade de epítomos e pode auxiliar na escolha de peptídeos que possam compor uma vacina anti-esquistossomótica.

A atividade protetora produzida por determinados epítomos pode não ter relação com sua capacidade imunogênica. Alguns estudos reforçam a idéia de que muitos dos epítomos considerados imunogênicos ao longo de um processo infeccioso não são necessariamente epítomos que apresentem atividade protetora. Isso acontece provavelmente porque o parasita possui mecanismos de escape da resposta efetora do sistema imune do hospedeiro que garantem a sua sobrevivência e reprodução (Schofield, 1990; Caoili, 2011). No presente estudo, foram identificadas algumas regiões peptídicas derivadas das proteínas rP22 e rP44 que apresentaram baixa reatividade aos soros de camundongos imunizados com essas proteínas, e, alta reatividade aos soros de pacientes esquistossomóticos. É provável que esses peptídeos possam estar envolvidos nos mecanismos de evasão do sistema imune do

hospedeiro humano promovidos pelo parasita durante a infecção pelo *S. mansoni*. Em contrapartida, peptídeos pouco reconhecidos pelo soro humano, mas muito reconhecidos pelo soro de animais imunizados podem vir a ser antígenos potenciais no desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica. Portanto, a determinação da reatividade dos soros frente aos peptídeos da rP22 e rP44 pode auxiliar na escolha dos peptídeos componentes de uma vacina de acordo com o grau de reatividade produzido para cada um deles. Além disso, a imunização de animais experimentais com peptídeos de baixa, média ou alta reatividade pode ser, futuramente, uma alternativa que ajudará a esclarecer a relação entre imunogenicidade e proteção produzida pelos peptídeos derivados de rP22 e rP44 na infecção pelo *S. mansoni*.

VII – CONCLUSÃO

Através do presente trabalho, foi possível concluir que as técnicas de recombinação gênica empregadas para expressão e purificação das proteínas recombinantes rP22 e rP44 foram eficientes, apresentando uma boa produtividade, com a obtenção de proteínas puras e com bom rendimento. A utilização da proteína rP22 em ensaios de imunolocalização demonstrou que ela é uma proteína tegumentar, assim como a proteína rP44. Além disso, a proteína rP22 foi descrita como um monômero e demonstrou ter boa estabilidade estrutural a variações de temperatura.

A imunização de animais experimentais com a combinação das proteínas rP22 e rP44 mostrou ser uma boa estratégia de vacinação, uma vez gerou a redução do número de vermes recuperados do sistema porta-hepático dos animais imunizados, promoveu uma redução do número de ovos retidos no fígado dos animais, além de diminuir a área dos granulomas e a área de fibrose hepática. A resposta protetora desencadeada pela vacinação com as proteínas rP22 e rP44 foi caracterizada pela ativação da resposta humoral, com a produção de altos níveis de anticorpos, e pela ativação da resposta celular, com a elevada produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10, e pela baixa produção de IL-4.

Além disso, as proteínas rP22 e rP44 foram utilizadas em estudos de predição de epítopos de linfócitos B, e os peptídeos selecionados foram reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados e de pacientes esquistossomóticos com diferentes formas clínicas. O estudo da reatividade dos peptídeos com os soros de animais imunizados demonstrou que os anticorpos específicos para rP22 reconhecem preferencialmente a sua região C-terminal contendo o domínio de cadeia leve de dineína, enquanto os anticorpos anti-rP44 reconhecem preferencialmente regiões na superfície da proteína ou regiões envolvidas com a atividade enzimática dessa proteína. Ademais, as diferenças de reatividade entre o soro humano e murino frente aos peptídeos da rP22 e rP44 evidenciadas podem auxiliar na busca de novas estratégias para o controle da esquistossomose.

VIII – PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho pretendemos:

1. Redigir os artigos sobre o uso combinado das proteínas rP22 e rP44 nos ensaios de proteção e sobre a reatividade dos soros murinos e humanos aos epítomos preditos.
2. Sintetizar os peptídeos da rP22 e rP44 mais reativos ao soro de camundongo, na forma solúvel.
3. Acoplar os peptídeos solúveis em proteína carreadora e utilizar a preparação em ensaios de imunização.
4. Avaliar o papel protetor da preparação de peptídeos na infecção por *S. mansoni*.
5. Sintetizar os peptídeos diferencialmente reconhecidos pelos soros de paciente esquistossomóticos na forma solúvel e testá-los através de ELISA.
6. Predizer os epítomos de linfócitos T.
7. Sintetizar os peptídeos preditos e avaliar a resposta *in vitro* de PBMCs de pacientes esquistossomóticos.

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABATH, F.; WERKHAUSER, R. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. **Parasite Immunol**, v. 18, n. 1, p. 15-20, 1996.
2. ABATH, F. G. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitol**, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.
3. AKSOY, E. et al. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 1, p. 277-283, 2005.
4. ALBERICIO, F.; CARPINO, L. A. Coupling reagents and activation. **Methods Enzymol**, v. 289, p. 104-26., 1997.
5. AMIT, A. G. et al. X-ray diffraction studies of an anti-azophenylarsonate antibody and of an antigen-antibody complex. **Ann Inst Pasteur Immunol**, v. 136C, n. 1, p. 121-129, 1985.
6. ANDRADE, Z. A.; VAN MARCK, E. Schistosomal glomerular disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 499-506, 1984.
7. ANGELI, V. et al. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **J Exp Med**, v. 193, n. 10, p. 1135-1148, 2001.

8. ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. Paleoparasitology of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 92, n. 5, p. 717, 1997.
9. ARAÚJO, M. I. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 6, p. 1399-1403, 1996.
10. BANCHEREAU, J.; ROUSSET, F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. **Adv Immunol**, v. 52, p. 125-262, 1992.
11. BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 353-360, 2005.
12. BELSHE, R. B. et al. Safety and Immunogenicity of Influenza A H5 Subunit Vaccines: Effect of Vaccine Schedule and Antigenic Variant. **J Infect Dis**, v. 203, n. 5, p. 666-673, 2011.
13. BERGER, E. A.; ALKHATIB, G. HIV gp120 interactions with coreceptors: insights from studies with CCR5-based peptides. **Eur J Med Res**, v. 12, n. 9, p. 403-407, 2007.
14. BERGGREN, W. L.; WELLER, T. H. Immuno-electrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma Mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 16, n. 5, p. 606-612, 1967.

15. BERGQUIST, N. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 221-7, 1995.
16. BERGQUIST, R. **Prospects for schistosomiasis vaccine development**. TDR News. 71, 2004.
17. BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.
18. BETHONY, J. M. et al. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunol Rev**, v. 239, n. 1, p. 237-270, 2011.
19. BLYTHE, M. J.; FLOWER, D. R. Benchmarking B cell epitope prediction: Underperformance of existing methods. **Protein Sci**, v. 14, n. 1, p. 246-248, 2005.
20. BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 2, n. 3, p. 250-269, 1989.
21. BOROS, D. L.; WARREN, K. S. 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.

22. BOULANGER, D. et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol**, v. 13, n. 5, p. 473-490, 1981.
23. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
24. BRASCHI, S. et al. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1471-1482, 2006.
25. BROMLEY, E. H. C. et al. Peptide and Protein Building Blocks for Synthetic Biology: From Programming Biomolecules to Self-Organized Biomolecular Systems. **ACS Chem Biol**, v. 3, n. 1, p. 38-50, 2008.
26. BUCHANAN, R. D.; FINE, D. P.; COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni* infection in mice depleted of thymus-dependent lymphocytes. II. Pathology and altered pathogenesis. **Am J Pathol**, v. 71, n. 2, p. 207-218, 1973.
27. BUISSA-FILHO, R. et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3321-3328, 2008.

28. BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009.
29. CAOILI, S.E. B-cell epitope prediction for peptide-based vaccine design: towards a paradigm of biological outcomes for global health. **Immunome Res**, v. 7, n.2, p.1-13, 2011.
30. CAPRON, A. et al. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Nature**, v. 253, n. 5491, p. 474-475, 1975.
31. CAPRON, A. et al. Prospects for A Schistosome Vaccine. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v. 2, p. 281-290, 2002.
32. CARDOSO, F. C. et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e308, 2008.
33. CARLIER, Y. et al. Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni*-Infected african parturients and their newborn children. **Am J Trop Med and Hyg**, v. 29, n. 1, p. 74-81, 1980.
34. CARTER, J. M. Production of Anti-Peptide Antisera. In: (Ed.). **Curr Protoc Immunol**: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

35. CASTAMAN, G. Desmopressin for the treatment of haemophilia. **Haemophilia**, v. 14, p. 15-20, 2008.
36. CEN, L. et al. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. **Pediatr Res**, v. 63, n. 5, p. 492-496 2008.
37. CHEEVER, A. W. Pipe-stem fibrosis of the liver. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 66, n. 6, p. 946-948, 1972.
38. CHEEVER, A. W.; POWERS, K. G. Counting of *Schistosoma mansoni* eggs in feces. Comparison of a filtration technique and a dilution technique. **J Parasitol**, v. 54, n. 3, p. 632-633., 1968.
39. CHEEVER, A. W. et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **J Immunol**, v. 153, n. 2, p. 753-759, 1994.
40. CHEEVER, A. W. et al. Analysis of egg granuloma formation in *Schistosoma japonicum*-infected mice treated with antibodies to interleukin-5 and gamma interferon. **Infect Immun**, v. 59, n. 11, p. 4071-4074, 1991.
41. CHENSUE, S. W.; BOROS, D. L. 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, p. 291-299, 1979.

42. CHITSULO, L.; LOVERDE, P.; ENGELS, D. Focus: Schistosomiasis. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 1, p. 12-13, 2004.
43. CLÉRICO, E. M.; MAKI, J. L.; GIERASCH, L. M. Use of synthetic signal sequences to explore the protein export machinery. **Biopolymers**, v. 90, n. 3, p. 307-319, 2008.
44. COLIGAN, J. E.; TAM, J. P.; SHAO, J. Production of Antipeptide Antisera. In: (Ed.). **Curr Protoc Neurosci**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
45. CORRÊA-OLIVEIRA, R. 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.
46. CORRÊA-OLIVEIRA, R. 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.
47. COURA, J.; AMARAL, R. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-19, 2004.
48. DALTON, J. P. 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.

49. DAVID, A. R.; CONTIS, G. Paleopathology on schistosomiasis in Egyptian mummies. **Parasitol Today**, v. 12, n. 4, p. 167-167, 1996.
50. DE GROOT, A. S. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 5-6, p. 203-209, 2006.
51. DE JESUS, A. et al. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3391-3397, 2004.
52. DIMMOCK, N. J.; HARDY, S. A. Valency of antibody binding to virions and its determination by surface plasmon resonance. **Rev Med Virol**, v. 14, n. 2, p. 123-135, 2004.
53. DOENHOFF, M. 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, p. 260-273, 1979.
54. DOMINGO, E. O.; WARREN, K. S. Pathology and pathophysiology of the small intestine in murine schistosomiasis mansoni, including a review of the literature. **Gastroenterology**, v. 56, n. 2, p. 231, 1969.
55. EL-DABAA, E. et al. Cloning and characterization of *Schistosoma mansoni* fructose-1,6-bisphosphate aldolase isoenzyme. **J Parasitol**, v. 84, n. 5, p. 954-960, 1998.

56. EL-GAREM, A. A. Schistosomiasis. **Digestion**, v. 59, n. 5, p. 589-605, 1998.
57. EL-MANZALAWY, Y.; HONAVAR, V. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. **Immunome Res**, v. 6, n. Suppl 2, p. S2, 2010.
58. ELLNER, J. et al. Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 126, n. 1, p. 309-312, 1981.
59. ESCOBEDO, G. et al. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 588-593, 2005.
60. ESSER, C.; RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. **Annu Rev Immunol**, v. 8, n. 1, p. 717-735, 1990.
61. FAGHIRI, Z.; SKELLY, P. J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. **FASEB J**, v. 23, n. 8, p. 2780-2789, 2009.
62. FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2585-2591, 2000.

63. FARIAS, L. P. et al. *Schistosoma mansoni* Stomatin Like Protein-2 Is Located in the Tegument and Induces Partial Protection against Challenge Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e597, 2010.
64. FERRER, E. et al. Diagnostic epitope variability within *Taenia solium* 8kDa antigen family: Implications for cysticercosis immunodetection. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 1, 78-85, 2012 , epub 2011.
65. FINKELMAN, F. D. et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, v. 8, n. 1, p. 303-333, 1990.
66. FITZSIMMONS, C. et al. Factors affecting human IgE and IgG responses to allergen-like *Schistosoma mansoni* antigens: molecular structure and patterns of *in vivo* exposure. . **Int Arch Allergy Immunol**, v. 142, p. 40–50, 2007.
67. FLORES-VILLANUEVA, P. et al. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen- specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. **J Immunol**, v. 156, n. 9, p. 3315-3320, 1996.
68. FRANCIS, P.; BICKLE, Q. Cloning of a 21.7-kDa vaccine-dominant antigen gene of *Schistosoma mansoni* reveals an EF hand-like motif. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 50, n. 2, p. 215-24, 1992.

69. FRANK, R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. **J Immunol Methods**, v. 267, n. 1, p. 13-26, 2002.
70. GAZZINELLI, G. et al. Immune response in different clinical groups of Schistosomiasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 95-100, 1987.
71. GEYSEN, H. M.; MASON, T. J.; RODDA, S. J. Cognitive features of continuous antigenic determinants. **J Mol Recognit**, v. 1, n. 1, p. 32-41, 1988.
72. GLENTING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 26, 2005.
73. GOES, A. et al. Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol**, v. 11, n. 6, p. 695-711, 1989.
74. GORDON, R. M.; GRIFFITHS, R. B. 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.
75. GRANT, G. A. Synthetic Peptides for Production of Antibodies that Recognize Intact Proteins. In: (Ed.). **Curr Protoc Immunol**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

76. GREENBERG, R. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **Int J Parasitol**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2005.
77. GRIMAUD, J. A.; BOROJEVIC, R. Portal fibrosis: intrahepatic portal vein pathology in chronic human schistosomiasis mansoni. **J Submicrosc Cytol**, v. 18, n. 4, p. 783-93, 1986.
78. GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.
79. GRZYCH, J. et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, n. 4, p. 1322-1327, 1991.
80. GUSTAVSON, S. et al. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection by antigens purified from PIII, a fraction of adult worm, associated to the downregulation of granuloma formation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 191-196., 1998.
81. GUSTAVSON, S. et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol Int**, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2002.

82. HAN, Z.-G. et al. Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 10, n. 1, p. 211-240, 2009.
83. HANDBOOK. **Gateway® Technology with Clonase™ II Version A** 2004.
84. HARRIS, A.; RUSSELL, R.; CHARTERS, A. A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 78, n. 3, p. 385-388, 1984.
85. HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. **Genome Res**, v. 10, n. 11, p. 1788-1795, 2000.
86. HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-Arginine metabolism. **J Immunol**, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.
87. HESSE, M. 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, p. 3157-3166, 2004.
88. HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol**, v. 27, n. 7-8, p. 271-280, 2005.

89. HIRSCH, C.; GOES, A. M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro. **Parasitology**, v. 112, n. Pt 6, p. 529-35, 1996.
90. HIRSCH, C. et al. Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. **Parasitology**, v. 115, n. Pt1, p. 21-8, 1997.
91. HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. 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, p. 6406-6416, 2000.
92. HOGG, K. G. et al. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infect and Immun**, v. 71, n. 6, p. 3563-3571, 2003.
93. HOTEZ, P. J. et al. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. **Nat Rev Micro**, v. 8, n. 11, p. 814-826, 2010.
94. HSÜ, S. Y. et al. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 66, p. 89-97, 1972.

95. ISMAIL, M. et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 6, p. 932-5, 1999.
96. JANKOVIC, D. et al. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN- γ -dependent effector mechanisms. **J Immunol**, v. 162, n. 1, p. 345-351, 1999.
97. JASSIM, A.; HASSAN, K.; CATTY, D. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol**, v. 9, n. 6, p. 627-50, 1987.
98. JENKINS, S. J.; MOUNTFORD, A. P. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 395-402, 2005.
99. JOHNSON, D. et al. Glucokinase activators: molecular tools for studying the physiology of insulin-secreting cells. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1208-1210, 2007.
100. JONES, M. K. et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host–parasite interactions. **BioEssays**, v. 26, n. 7, p. 752-765, 2004.

101. JOSEPH, M. et al. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. **Nature**, v. 303, n. 5920, p. 810-812, 1983.
102. JUNQUEIRA, L. C. et al. Morphological, histochemical and biochemical observations on the connective tissue matrix of in situ and isolated hepatic granulomas in experimental murine schistosomiasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 80, n. 1, p. 27-41, 1986.
103. KATAGIRI, Y. U. et al. GalNAc β 1,3-linked paragloboside carries the epitope of a sperm maturation-related glycoprotein that is recognized by the monoclonal antibody MC121. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 406, n. 3, p. 326-331, 2011.
104. KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 705-711, 1999.
105. KATZ, N. The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 69-71, 2008.
106. KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **Int Immunol**, v. 21, n. 4, p. 317-337, 2009.
107. KESSENBROCK, K. et al. Synthetic peptides: the future of patient management in systemic rheumatic diseases? **Curr Med Chem**, v. 14, n. 26, p. 2831-2838, 2007.

108. KHALIFE, J. 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.
109. KIM, Y.-J. et al. Identification and characterization of a novel 21.6-kDa tegumental protein from *Clonorchis sinensis*. **Parasitol Res**, p. 1-6, 2011.
110. KING, C. et al. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. **J Immunol**, v. 156, n. 12, p. 4715-4721, 1996.
111. KING, C. H. Toward the elimination of schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 2, p. 106-109, 2009.
112. KINYANJUI, M. W.; FIXMAN, E. D. Cell-penetrating peptides and proteins: new inhibitors of allergic airways disease This review is an invited paper from 2007 ICRH Leadership in Science: a Forum for Trainees and New Investigators. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 86, n. 1-2, p. 1-7, 2008.
113. KUSEL, J.; HAGAN, P. Praziquantel – Its Use, Cost and Possible Development of Resistance. **Parasitol Today**, v. 15, n. 9, p. 352-354, 1999.
114. KUSEL, J. et al. The effects of drugs, ions, and poly-L-lysine on the excretory system of *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 293-298, 2006.

115. KUSEL, J. R.; AL-ADHAMI, B. H.; DOENHOFF, M. J. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanisms of adaptation. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1477-1526, 2007.
116. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
117. LAUNE, D. et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **J Immunol Methods**, v. 267, n. 1, p. 53-70, 2002.
118. LENZI, H. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1:141-51, n. Suppl 1, p. 141-51, 1998.
119. LINDBLAD, E. B. Aluminium compounds for use in vaccines. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 5, p. 497-505, 2004.
120. LOPES, D. O. et al. Sm21.6 a novel EF-hand family protein member located on the surface of *Schistosoma mansoni* adult worm that failed to induce protection against challenge infection but reduced liver pathology. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4127-4135, 2009.

121. LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 3-4, p. 257-263, 2007.
122. LUNDE, M. N.; OTTESEN, E. A.; CHEEVER, A. W. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, n. 1, p. 87-91, 1979.
123. MAGALHÃES, A. et al. Prophylactic and Therapeutic Vaccination using Dendritic Cells Primed with Peptide 10 derived from the 43 kDa Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Vaccine Immunol**, 2011.
124. MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHSH, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 733-744, 2003.
125. MAKAROVA, E. et al. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. **Parasitol Int**, v. 52, n. 4, p. 269-279, 2003.
126. MALVERN. **Application note: Enhanced Protein Aggregation Detection Using Dual Angle Dynamic Light Scattering**. MALVERN 2011.
127. MARQUES, H. H. et al. Protective effect and granuloma down-modulation promoted by RP44 antigen a fructose 1,6 bisphosphate aldolase of *Schistosoma mansoni*. **Immunobiology**, v. 213, n. 5, p. 437-446, 2008.

128. MARTINS-FILHO, O. A. 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.
129. MÁTYUS, E.; KANDT, C.; TIELEMAN, D. P. Computer simulation of antimicrobial peptides. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 26, p. 2789-2798, 2007.
130. MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ Cells Contribute to Th2 Polarization during Helminth Infection by Suppressing Th1 Response Development. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1224-1231, 2004.
131. MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ Cells Contribute to Th2 Polarization during Helminth Infection by Suppressing Th1 Response Development. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1224-1231, 2004.
132. MCLAREN, D.; HOCKLEY, D. Blood flukes have a double outer membrane. **Nature**, v. 269, n. (5624), p. 147-149., 1977.
133. MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 225-242, 2008.
134. MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.

135. MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C., JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol Rev**, v. 173, n. 1, p. 89-97, 2000.
136. MELOEN, R. H.; PUIJK, W. C.; SLOOTSTRA, J. W. Mimotopes: realization of an unlikely concept. **J Mol Recognit**, v. 13, n. 6, p. 352-359, 2000.
137. MENDES, T. M. et al. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 617-624, 2004.
138. MENTINK-KANE, M. M. et al. IL-13 receptor α 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 2, p. 586-590, 2004.
139. MEYER, S. et al. DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. **J Biol Chem**, v. 280, n. 45, p. 37349-37359, 2005.
140. MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of schistosomulum of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 281-302, 1978.
141. MINARD, P. et al. Immunization of Mice with Cobalt-60 Irradiated *Schistosoma Mansoni* Cercariae. **Am J Trop Med Hyg**, v. 27, n. 1, p. 76-86, 1978.

142. MOORE, D. L.; GROVE, D. I.; WARREN, K. S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: Quantitation of cell populations. **J Pathol**, v. 121, n. 1, p. 41-50, 1977.
143. MOSMANN, T. R. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. **Ann N Y Acad Sci**, v. 664, n. 1, p. 89-92, 1992.
144. MOSMANN, T.R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **J Immunol Meth**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
145. MOUNTFORD, A. P.; TROTTEIN, F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 5, p. 221-226, 2004.
146. MOYLE, P. M.; TOTH, I. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 5, p. 506-516, 2008.
147. MUKAI, T. et al. Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon- γ . **Liver International**, v. 26, n. 8, p. 1006-1014, 2006.
148. MUTAPI, F. et al. Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 3, p. 181-192, 2011.
149. NAZ, R.; DABIR, P. Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. **Front Biosci**, v. 12, p. 1833-1844., 2007.

150. NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.
151. NOVATO-SILVA, E.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G. 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.
152. OLIVEIRA, D. et al. Immunization with PIII, a fraction of *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigenic preparation, affects nitric oxide production by murine spleen cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 175-180, 1998.
153. OLIVEIRA, D. M. et al. Nitric oxide and IL-10 production induced by PIII—A fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm antigenic preparation—associated with downregulation of in vitro granuloma formation. **Hum Immunol**, v. 60, n. 4, p. 305-311, 1999.
154. OLIVEIRA, S. C. et al. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 256-262, 2008.
155. OSHIMA, M.; DEITIKER, P.; ATASSI, M. Z. Targeting the antigen-binding site of HLA-restricting alleles in treatment of autoimmune disease. **Crit Rev Immunol**, v. 27, n. 3, p. 271-288, 2007.
156. PACÍFICO, L. G. 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.

157. PEARCE, E. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, p. 159-166, 1991.
158. PEARCE, E.; MACDONALD, A. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.
159. PEARCE, E.; SHER, A. Three major surface antigens of *Schistosoma mansoni* are linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol. **J Immunol**, v. 142, n. 3, p. 979-984, 1989.
160. PEARCE, E. J. et al. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. **Proc Natl Acad Sci**, v. 85, n. 15, p. 5678-5682, 1988.
161. PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunol Rev**, v. 201, n. 1, p. 117-126, 2004.
162. PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunol**, v. 27, n. 7-8, 265-270, 2005.
163. PERONA-WRIGHT, G.; JENKINS, S. J.; MACDONALD, A. S. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 6, p. 711-721, 2006.

164. PRATA, A. Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, p. 689-691, 2008.
165. PURCELL, A. W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. 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.
166. RACOOSIN, E. L.; DAVIES, S. J.; PEARCE, E. J. Caveolae-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 104, n. 2, p. 285-297, 1999.
167. REIMAN, R. M. et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1471-1479, 2006.
168. REVILLARD, J.-P. et al. Apoptosis: potential for disease therapies. **Immunol Today**, v. 19, n. 7, p. 291-293, 1998.
169. REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
170. REZENDE, C. M. et al. Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: Effects on granuloma down-modulation and cytokine production. **Immunol Lett**, v. 141, n. 1, p. 123-133, 2011.

171. REZENDE, S. A. et al. Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**, v. 65, n. 8, p. 3457-61, 1997.
172. RIBEIRO, F. et al. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 229-236, 1998.
173. RIBEIRO, F. et al. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 46, p. 231-233, 2004.
174. RIENGROJPITAK, S.; ANDERSON, S.; WILSON, R. A. Induction of immunity to *Schistosoma mansoni*: interaction of schistosomula with accessory leucocytes in murine skin and draining lymph nodes. **Parasitology**, v. 117 n. Pt 4, p. 301-9, 1998.
175. RITTER, M. et al. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. **Proc Natl Acad Sci**, v. 107, n. 47, p. 20459-20464, 2010.
176. ROMANI, L. et al. IL-17 and Therapeutic Kynurenines in Pathogenic Inflammation to Fungi. **J Immunol**, v. 180, n. 8, p. 5157-5162, 2008.
177. ROMEIH, M. H. et al. Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* infection by multivalent DNA vaccine. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 40, n. 4, p. 327-338, 2008.

178. RUMBLEY, C. A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J Immunol**, v. 162, n. 2, p. 1003-1009, 1999.
179. RUTITZKY, L. I. et al. IL-23 Is Required for the Development of Severe Egg-Induced Immunopathology in Schistosomiasis and for Lesional Expression of IL-17. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2486-2495, 2008.
180. RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 327-330, 2006.
181. SADLER, C. H. et al. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 4, p. 880-888, 2003.
182. SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins**, v. 65, n. 1, p. 40-48, 2006.
183. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
184. SCHNEIDER, M. C. et al. Elimination of Neglected Diseases in Latin America and the Caribbean: A Mapping of Selected Diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 2, p. e964, 2011.

185. SCHOFIELD, L. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, 1990.
186. SCHUGAR, R. C.; ROBBINS, P. D.; DEASY, B. M. Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. **Gene Ther**, v. 15, n. 2, p. 126-135, 2007.
187. SELA, U. et al. The role of dendritic cells in the mechanism of action of a peptide that ameliorates lupus in murine models. **Immunology**, v. 128, n. 1pt2, p. e395-e405, 2009.
188. SHER, A. et al. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J Immunol**, v. 147, n. 8, p. 2713-2716, 1991.
189. SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.
190. SILVA-TEIXEIRA, D.; DOUGHTY, B.; AM., G. 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.
191. SIMPSON, A. Schistosome surface antigens: developmental expression and immunological function. **Parasitol Today**, v. 6, n. 2, p. 40-45, 1990.

192. SIMPSON, A. et al. The modulation of expression of polypeptide surface antigens on developing schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 133, n. 5, p. 2725-2730, 1984.
193. SMITHERS, S. et al. Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. **Parasite Immunol**, v. 11, n. 4, p. 301-318, 1989.
194. SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695-700, 1965.
195. SMYTHIES, L.; COULSON, P.; WILSON, R. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. **J Immunol**, v. 149, n. 11, p. 3654-3658, 1992.
196. SNAPPER, C.; PAUL, W. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-947, 1987.
197. SOONG, L. et al. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 63, n. 9, p. 3559-66, 1995.

198. STADECKER, M. J. The development of granulomas in schistosomiasis: genetic backgrounds, regulatory pathways, and specific egg antigen responses that influence the magnitude of disease. **Microbes Infect**, v. 1, n. 7, p. 505-510, 1999.
199. STADECKER, M. J. et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunol Rev**, v. 201, n. 1, p. 168-179, 2004.
200. STADECKER, M. J.; HERNANDEZ, H. J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunol**, v. 20, n. 5, p. 217-221, 1998.
201. STASSEN, M.; SCHMITT, E.; JONULEIT, H. Human CD(4⁺)CD(25⁺) regulatory T cells and infectious tolerance. **Transplantation**, v. 77, n. (1 Suppl), p. 23-25., 2004.
202. STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat Med**, v. 13, n. 2, p. 139-145, 2007.
203. STEK, M.; DEAN, D. A.; CLARK, S. S. Attrition of schistosomes in an Irradiation-Attenuated Cercarial Immunization Model of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 30, n. 5, p. 1033-1038, 1981.
204. STENGER, R. J.; WARREN, K. S.; JOHNSON, E. A. 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.

205. TEIXEIRA DE MELO, T. et al. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. **Parasite Immunol**, v. 32, n. 11-12, p. 749-759, 2010.
206. THOMAS, P. G. et al. Maturation of Dendritic Cell 2 Phenotype by a Helminth Glycan Uses a Toll-Like Receptor 4-Dependent Mechanism. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 5837-5841, 2003.
207. TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
208. TRAN, M. H. et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat Med**, v. 12, n. 7, p. 835-840, 2006.
209. TROTTEIN, F. et al. A type I IFN-dependent pathway induced by *Schistosoma mansoni* eggs in mouse myeloid dendritic cells generates an inflammatory signature. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3011-3017, 2004.
210. VAN DER KLEIJ, D. et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J Biol Chem**, v. 277, n. 50, p. 48122-48129, 2002.

211. VAN DER WERF, M. J. 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.
212. VAN HELLEMOND, J. J. et al. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **Inter J Parasitol**, v. 36, n. 6, p. 691-699, 2006.
213. VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009.
214. 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.
215. VON LICHTENBERG, F. V. Consequences of infections with schistosomes. In: OLLISON, D. S., A. J. G. (Ed.). **The Biology of Schistosomes: From Genes to Latrines**.
216. : London: Academic Press, 1987. p.185.
217. WALTER, K. et al. Increased human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni in vivo* is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens. **J Immunol**, v. 177, n. 8, p. 5490-5498, 2006.
218. WARREN, K. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: *in vivo* models. **Immunol Rev**, v. 61, p. 189-213, 1982.


219. WARREN, K. S. Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology? **J Infect Dis**, v. 127, n. 5, p. 595-609, 1973.
220. WARREN, K. S.; DOMINGO, E. O. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. . **Am J Pathol**, v. 51, n. 5, p. 735-743, 1967.
221. WHO. **Scientific working group on schistosomiasis: report of the scientific working group meeting**. World Health Organization. Geneva: 14-16 November 2005. 2005
222. WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007.
223. WILSON, N. J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 950-957, 2007.
224. WILSON, R.; BARNES, P. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. **Parasitology**, v. 68, n. 2, p. 239-258, 1974.
225. WILSON, R.; BARNES, P. The formation and turnover of the membranocalyx on the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 61-71, 1977.

226. WILSON, R. et al. Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. **Immunology**, v. 87, n. 2, p. 275-82, 1996.
227. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**. 115, F. D. I. 2010.
228. WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr Opin Immunol**, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995.
229. WYNN, T. A. 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, p. 4473-4480, 1998.
230. WYNN, T. A.; HOFFMANN, K. F. Defining a Schistosomiasis Vaccination Strategy - Is it really Th1 versus Th2? **Parasitol Today**, v. 16, n. 11, p. 497-501, 2000.
231. XAVIER, E. et al. The tegument of *Schistosoma mansoni*: genes, antigens and the host-parasite relationship. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. Suppl 1, p. 85-86, 1998.
232. YAMASHITA, T.; BOROS, D. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 149, n. 11, p. 3659-3664, 1992.

233. ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 5, p. 1439-1449, 2003.
234. ZHANG, H. G. et al. Gαq-protein carboxyl terminus imitation polypeptide GCIP-27 attenuates proliferation of vascular smooth muscle cells and vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 10, p. 1527-1532, 2011.
235. ZHOU, Y. et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 345-351, 2009.
236. ZOUAIN, C. S. et al. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1218-1224, 2000.

X – ANEXOS

4th Vaccine
and ISV Annual Global Congress
3-5 October 2010 Vienna, Austria

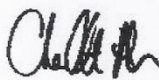



Certificate of Presentation

We hereby confirm that
Cintia Martins Fagundes Rezende

Presented
a poster

At The 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress
3-5 October, 2010 – Vienna, Austria


Charlotte Alman
For and on behalf of ELSEVIER Ltd



ELSEVIER

4th Vaccine
and ISV Annual Global Congress
3-5 October 2010 Vienna, Austria



Certificate of Attendance

We hereby confirm that
Cintia Martins Fagundes Rezende

Attended
The 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress
3-5 October, 2010 – Vienna, Austria


Charlotte Alman
For and on behalf of ELSEVIER Ltd



ELSEVIER



IMUNO09

B A H I A - B R A S I L

XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia
X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica
Ano da França no Brasil

September 23-26 Pestana Bahia Hotel

Certificate

We certify that

REZENDE CMF; SILVA MR; GOES AM

attended the XXXIV Congress of the Brazilian Society for Immunology
and X International Symposium on Allergy and Clinical Immunology

as author(s) of the following abstract - poster:

**SCHISTOSOMA MANSONI PROTEIN P22 IS ABLE TO INDUCE PROTECTION
AGAINST PARASITE INFECTION**

Salvador - Bahia - Brazil - September 26th, 2009

Aldina Barral
Aldina Barral
President SBI

SBI
Sociedade Brasileira de Imunologia

Mario Siqueira Elong
Maria Ilma Araújo
President ASBAIC

ASBAIC
Associação Brasileira de Alergia e Imunologia Clínica

VAC 7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 43/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Construção, expressão e caracterização imunológica de uma proteína quimérica derivada dos antígenos P22, P24 e P44 de Schistosoma mansoni: avaliação da imunidade protetora e modulação do granuloma hepático na esquistossomose experimental**", que tem como responsável(is) **Alfredo Miranda Góes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/05/2008**.

Este certificado expira-se em **28/05/2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 43/2008**, related to the project entitled "**Construction, expression and immunological characterization of a quimeric protein from P22, P24 and P44 Schistosoma mansoni antigens: evaluation of protective immunity and modulation of hepatic granuloma in experimental schistosomiasis**", under the supervisors of **Alfredo Miranda Góes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 28, 2008**.

This certificate expires in **May 28, 2008**.

Belo Horizonte, 3 de Junho de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)