



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Natan Raimundo Gonçalves de Assis

Dissertação de mestrado:

Avaliação da eficiência de vacinas de DNA contendo as sequências das proteínas Sm29 e a TSP-2 de Schistosoma mansoni em modelo murino

Dr. Sergio Costa Oliveira

Orientador

Dr^a Carina da Silva Pinheiro

Co-orientadora

Natan Raimundo Gonçalves de Assis

Avaliação da eficiência de vacinas de DNA contendo as sequências das proteínas Sm29 e a TSP-2 de Schistosoma mansoni em modelo murino

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Sergio Costa Oliveira

Co-orientadora: Dra. Carina da Silva Pinheiro

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte

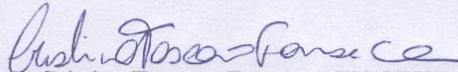
Fevereiro, 2012

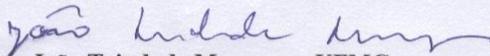


Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615

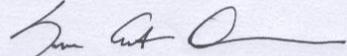


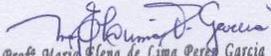
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATAN RAIMUNDO GONÇALVES DE ASSIS. Aos nove dias do mês de fevereiro de 2012 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “*Avaliação da eficiência de vacinas de DNA contendo as proteínas Sm29 e a TSP-2 de Schistosoma mansoni em modelo murino*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Prof. Sérgio Costa Oliveira da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Cristina Toscano Fonseca da Fundação Oswaldo Cruz, aprovado; Dr. João Trindade Marques da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Carina da Silva Pinheiro, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Sérgio Costa Oliveira, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 9 de fevereiro de 2012.


 Dra. Cristina Toscano Fonseca - FIOCRUZ


 Dr. João Trindade Marques - UFMG


 Dra. Carina da Silva Pinheiro - co-orientadora - UFMG


 Dr. Sérgio Costa Oliveira - orientador - UFMG


 Prof. Maria Elena de Lima Pared Garcia
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Este trabalho foi financiado com verbas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a Deus por tudo. Gostaria muito de agradecer também ao meu orientador Sérgio Costa Oliveira pela oportunidade a mim concedida, assim como a sua dedicação, profissionalismo e paciência. Não poderia deixar de agradecer também a minha co-orientadora Carina da Silva Pinheiro, a qual me suportou durante todo esse tempo, me ajudou, me ensinou e me corrigiu; Muito obrigado também Sérgio e Carina pelos momentos de diversão e descontração. Vocês são excelentes!

Nunca, em nada do que faça na minha vida, eu poderia deixar de agradecer a minha mãe e ao meu pai. Muito obrigado Mãe por me amar incondicionalmente, você é simplesmente a mãe mais perfeita do mundo! Pai, muito obrigado também por me amar incondicionalmente, muito obrigado também pelos valores e exemplo de seriedade e compromisso que aprendi com o senhor. Muito obrigado Pai e Mãe, amo vocês infinitamente! Muito obrigado também a todos os meus familiares e a algumas pessoas especiais que entraram na minha vida. Amo vocês também!

Não poderia deixar de agradecer também ao querido grupo da Xisto! Muito obrigado Vicente (Pai), Suellen (Irmã), Bárbara (Irmã) e Karinhinha (Irmã). Com esse grupo, fazer perfusões de 1000 animais, 700 placas de Elisa e 1000Kg de proteína recombinante fica muito fácil. Vocês são ótimos. Muito obrigado também a Adriana e ao Vicente que me acolhem nos finais de semana em BH.

Gostaria de agradecer também a todos os Lidianos pelos momentos super divertidos que vivemos juntos. Muito obrigado pelas piadas, pelas dancinhas e pelas besteiras. Vocês são espetaculares. Obrigado por tudo família Lidiana!

Gostaria muito de agradecer também a PEU, ao Marcos e ao Jamil, os quais sempre demonstraram eficiência, profissionalismo e boa vontade. Muito obrigado, sem vocês, esse trabalho não seria possível.

Jamais poderia deixar de agradecer a Sandra, a qual não me deixa engordar de tanto carregar caixas, brincadeira viu Sandra! Muito obrigado por esses anos de extrema dedicação e profissionalismo, além disso, muito obrigado também pelos momentos de atenção e carinho. Saiba que estou torcendo por você hoje e sempre.

Muito obrigado também a todas as pessoas que moram comigo. Muito obrigado Willian por tamanha boa vontade e altruísmo, você é uma pessoa de muito bom coração, e um bom amigo também. Muito obrigado Daniel pela companhia e força que sempre me forneceu cara, saiba que você também é um grande amigo. Gustavo, você não mora mais aqui, mas muito obrigado por ser um grande amigo também. Senhor Leonardo, além de amigo é pai, é irmão, é advogado, é conselheiro e ainda faz parte desse trabalho. Muito obrigado por tudo cara. Patrícia, você não mora aqui, mas já é da família, muito obrigado pelos inúmeros momentos de diversão, compreensão e companheirismo.

Muito obrigado a todas as pessoas que direta ou indiretamente estão relacionadas a esse trabalho e/ou a minha vida. Muito obrigado, sem amigos não sou ninguém! Obrigado também as agências de fomento CAPES e CNPq.

Sumário

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1-INTRODUÇÃO	15
1.1- Distribuição global da esquistossomose.....	15
1.2- Ciclo de vida.....	17
1.3- Formas clínicas da esquistossomose	19
1.4- Resposta imune na esquistossomose.....	20
1.4.1- Imunidade inata contra esquistossomose	21
1.4.2- Imunidade adaptativa contra esquistossomose	23
1.5- Desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica.....	25
1.5.1- Proteínas do tegumento como candidatos vacinais	27
1.5.2- Candidato vacinal Sm29	28
1.5.3- Candidato vacinal Tetraspanina-2 (TSP-2).....	29
1.6- Vacinas de DNA	30
1.6.1- Otimização de vacinas de DNA	32
1.6.2- Principais formas de administração de vacinas de DNA	33
1.7- Vacinas de DNA e a esquistossomose mansônica.....	36
2- JUSTIFICATIVA.....	41
3- OBJETIVO	43
3.1- Geral.....	43
3.2- Específicos	43
4- METODOLOGIA	44
4. 1- Animais e parasitas.....	44
4.2- Construções dos plasmídeos	44
4.3- Vacinas de DNA	46
4.4 Produção de Sm29 e quimera recombinantes.....	47

4.5- RT-PCR	47
4.5.1- Crescimento e Transfecção Celular	48
4.5.2- Extração de RNA total	49
4.5.3- Síntese cDNA	49
4.5.4- Escolha e Síntese dos Iniciadores	50
4.5.5- Amplificação do cDNA.....	50
4.6- Western blot	51
4.6.1- Transfecção celular.....	52
4.6.2- Extração Proteica	52
4.6.3- Western Blot.....	52
4.7- Imunização e infecção	53
4.8- Análise da carga parasitária	53
4.9- Contagem de ovos do <i>S. mansoni</i> retidos no Fígado	54
4.10- Análise de anticorpos anti-Sm29.....	54
4.11- Análise de citocinas	55
5- RESULTADOS	56
5.1- Avaliação transcricional das vacinas de DNA.....	56
5.2- Detecção de Sm29, TSP-2 e quimera em células BHK-21 transfectadas	58
5.3- Anticorpos anti-Sm29.....	61
5.4- Perfil de citocinas	63
5.5- Carga parasitária recuperada.....	67
5.6- Contagem de ovos no fígado	69
6- DISCUSSÃO.....	70
7- CONCLUSÃO	77
8- PERSPECTIVAS	78
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Lista de figuras

FIGURA 1 DISTRIBUIÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE AO REDOR DO MUNDO NO ANO DE 2009.....	15
FIGURA 2 CICLO DE VIDA DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	19
FIGURA 3 DESENHO ESQUEMÁTICO DO TEGUMENTO DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> E A POSSÍVEL LOCALIZAÇÃO DE ALGUMAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM TAL ESTRUTURA	27
FIGURA 4 PRINCIPAIS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS DE DNA	34
FIGURA 5 PUMVC3 (ALDEVRON).....	45
FIGURA 6 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS PLASMÍDEOS.....	46
FIGURA 7 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA	47
FIGURA 8 ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO CELULAR	49
FIGURA 9 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	51
FIGURA 10 AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS VACINAS DE DNA	58
FIGURA 11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA IN VITRO DAS VACINAS DE DNA POR WESTERNBLOT UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-SM29	59
FIGURA 12 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA IN VITRO DAS VACINAS DE DNA POR WESTERN BLOT UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-TSP-2	60
FIGURA 13 NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI-SM29.....	62
FIGURA 14 PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO	64
FIGURA 15 PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO E INFECÇÃO.....	66
FIGURA 16 VERMES RECUPERADOS.....	67
FIGURA 17 NÚMERO DE OVOS PRESENTES NO FÍGADO.....	69

Lista de tabelas

TABELA 1 SEQUÊNCIAS DE INICIADORES PARA O PROCEDIMENTO DE RT-PCR.....	50
TABELA 2 NÚMERO DE VERMES RECUPERADOS E PORCENTAGENS DE PROTEÇÃO.....	68

Lista de abreviaturas utilizadas neste trabalho

μg – Micrograma

μL – Microlitro

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

BHK-21- *Baby hamster kidney cells 21* (Células de rins de filhotes de hamster)

cDNA – DNA complementar

ConA – Concanavalina A

DNA – Ácido desoxiribonucléico

DP – Desvio Padrão

dsRNA – RNA de fita dupla

ELISA – Ensaio de absorção imunoenzimático

FABP – Proteína ligadora de ácido graxo

HRP – *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de rabanete)

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule 1* (Molécula de adesão intercelular)

ICL – Alça intracelular

IFN-γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

kDa – QuiloDalton

KLH – Hemocianina

KO – *Knockout*

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mM – Milímetro

mRNA – RNA mensageiro

nm – Nanometro

NO – Óxido Nítrico

PBS – Tampão salina fosfato

PMN - Polimorfonucleares

pmoles – Picomoles

RNA – Ácido ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

rt-PCR – Reação de polimerase em cadeia em tempo real

SEA – Antígenos de ovos de *Schistosoma mansoni*

SFB – Soro fetal bovino

SWAP – Preparado de antígenos de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

TGF- β – Fator de crescimento transformador β

Th1 – T *helper* 1 (Células T auxiliaries tipo 1)

Th17 – T *helper* 17 (Células T auxiliaries tipo 17)

Th2 – T *helper* 2 (Células T auxiliaries tipo 2)

TLR – Receptor do tipo toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1 – Receptor de fator de necrose tumoral I

tRNA – RNA transportador

RESUMO

Esquistossomose é uma importante parasitose mundial, afetando mais de 207 milhões de pessoas em 76 países ao redor do mundo e causando aproximadamente 250.000 mortes por ano. Atualmente, a estratégia adotada para o controle da esquistossomose é a utilização de quimioterápicos considerados de uso seguro, como por exemplo, Praziquantel. Porém, altas taxas de reinfecção após o tratamento limitam tal estratégia e pressupõe a necessidade de outras formas de controle como saneamento básico e vacinação. Visto a capacidade de gerar resposta imune humoral e celular de vacinas de DNA, tal estratégia é considerada como metodologia promissora no combate a esquistossomose. Sm29 e tetraspanina-2 são duas proteínas encontradas no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*, o que, em conjunto com os altos índices de proteção alcançados com a imunização em suas formas recombinantes, as tornam como potentes candidatos vacinais. Neste trabalho objetivamos criar, otimizar e avaliar em modelo murino vacinas de DNA contendo tais genes, sozinhas ou conjuntamente. Através de avaliações por rt-PCR e western blot, confirmamos que nossas vacinas de DNA apresentavam a capacidade de serem transcritas e traduzidas em células BHK-21. Quando avaliado a redução de vermes, conseguimos 17%, 21,9%, 31% e 24% nos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi obtida na contagem de ovos presentes no fígado. Quando avaliado o perfil da resposta imunológica, percebemos elevada produção das citocinas TNF- α e IFN- γ , e nenhuma produção significativa de IL-4 e IL-5, caracterizando uma resposta de perfil imunológico Th1. Quando avaliado os títulos de anticorpos anti-Sm29 no soro dos animais imunizados, não percebemos nenhuma produção significativa. Portanto, nossas vacinas de DNA apresentaram a capacidade de gerar uma resposta imune protetora contra esquistossomose mansônica, provavelmente através da produção de citocinas Th1, porém, estratégias futuras visando otimizar a resposta obtida necessitam ser realizadas.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an important parasitic disease worldwide affecting more than 207 million people in 76 countries around the world and causing about 250.000 deaths per year. Nowadays, the main strategy adopted for the control of schistosomes is the use of safe chemotherapy, as the use of praziquantel. However, the high rates of reinfection after the treatment restrict it as a strategy and assume the need for other forms of control like basic sanitation and vaccination. Because the ability to generate humoral and cellular immune response of DNA vaccines, such strategy is considered to be a promising approach against schistosomiasis. Sm29 and tetraspanin-2 are two proteins localized in *S. mansoni* tegument of adult worms and schistosomula, with high levels of protection achieved by the recombinant protein approach of immunization, what render them as powerful vaccine candidates. In this work we aim to create, optimize and evaluate in a murine model DNA vaccines carrying such genes, alone or together. By western blot and rt-PCR assessments, we confirm that our DNA vaccines presented the capacity to be transcribed and translated in BHK-21 cells. After immunization, we evaluate the number of worms reduction, We achieved 17%, 21,9% 31% and 24% on animals immunized with the plasmids pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2, respectively. No significant difference was achieved in the count of eggs in liver. When the profile of the immunological response was evaluated, we found high production of Th1 cytokines such TNF- α and IFN- γ , and no significant production of IL-4 and IL-5. When measured the levels of anti-Sm29 in serum of immunized mice, no significant production was perceived. Hence, our DNA vaccines showed the ability to generate a protective immune response against schistosomiasis, probably by the production of Th1 cytokines, however, future strategies aiming to optimize the response need to be performed.

1-INTRODUÇÃO

1.1- Distribuição global da esquistossomose

A esquistossomose afeta aproximadamente 207 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que destas, 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões desenvolvem a forma severa da doença (McManus & Loukas., 2008; WHO., 2011). Essa enfermidade apresenta distribuição focal ao redor do mundo, uma vez que a transmissão depende de caramujos hospedeiros específicos e atividades humanas que permitam a contaminação da água e conseqüente infecção (Gryssels *et al.*,2006; WHO., 2011). A distribuição global é representada na Figura 1.

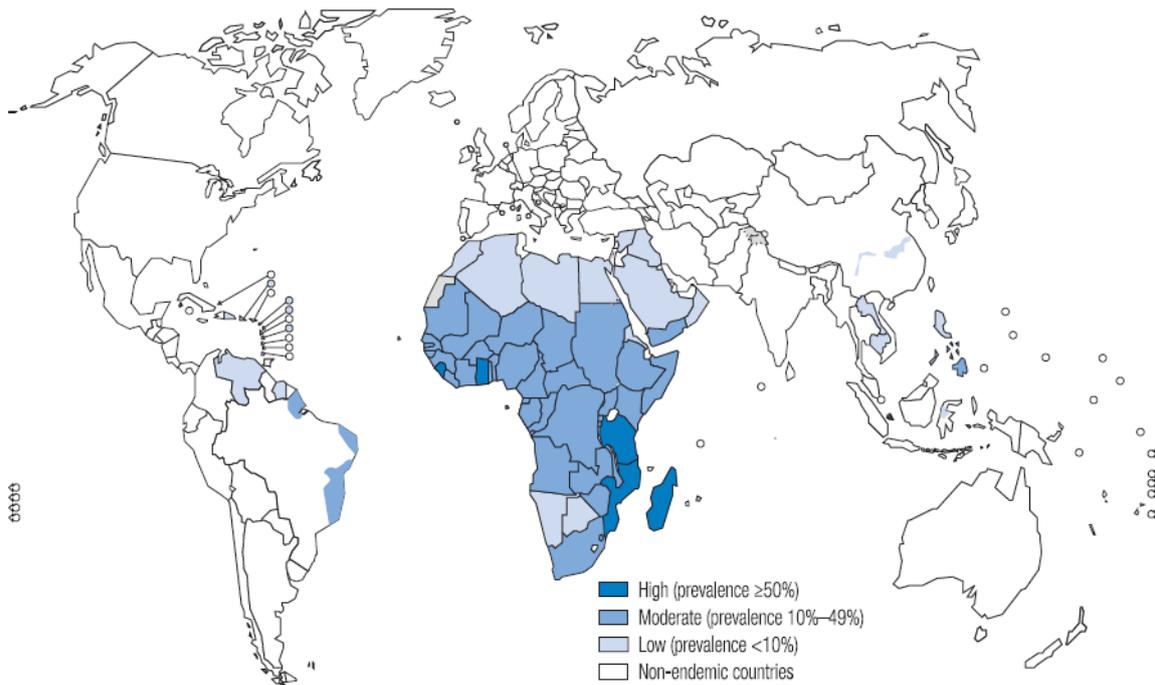


Figura 1 Distribuição da esquistossomose ao redor do mundo no ano de 2009 (Adaptado de WHO., 2011)

A esquistossomose é endêmica em áreas tropicais e subtropicais e afeta aproximadamente 76 países, sendo a esquistossomose mansônica encontrada principalmente em países subsaarianos, Egito, Líbia, Arábia peninsular, ilhas caribenhas, Venezuela e Brasil

(WHO.,2011; Engels *et al.*, 2008). Várias estratégias de controle de transmissão da esquistossomose vem sendo adotadas por várias agências governamentais e atingido resultados satisfatórios, como no Japão, Tunísia e a República Islâmica do Irã, porém, em países como Brasil e Venezuela, mesmo com esforços realizados pelos governos locais, o processo de transmissão da esquistossomose não foi ainda eficientemente controlada (WHO ,2011). Epidemiologicamente, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, são as espécies mais importantes, nas quais os esforços das pesquisas devem ser concentrados (Shabaan *et al.*, 2003). A esquistossomose mansonica endêmica é determinada principalmente pela distribuição do hospedeiro intermediário, caramujos aquáticos pulmonados do gênero *Biomphalaria* (Stelma *et al.*, 1993). A disseminação da esquistossomose no Brasil ocorreu devido às correntes migratórias que se deslocavam da costa do país para o seu interior, e a existência de hospedeiros intermediários, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, susceptíveis à infecção por *S. mansoni* (Coura & Amaral, 2004). A fixação do *S. mansoni* no Brasil ocorreu então, seguramente, devido ao encontro de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes à sua região de origem (Despres *et al.*, 1993). No Brasil a transmissão da esquistossomose ocorre em uma vasta área endêmica, que abrange desde o estado do Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, além de focos isolados em outras regiões do país (Coura & Amaral., 2004). A estratégia para o controle nas últimas duas décadas tem sido focada no tratamento dos grupos de alto risco, buscando reduzir a prevalência da forma clínica hepato-esplênica da esquistossomose intestinal (Barbosa & Coimbra Junior., 1992; Magnussen., 2003). Depois da malária a esquistossomose é a segunda doença tropical mais importante na área de saúde pública, causando cerca de 280.000 mortes anuais (King *et al.*,2006; Steinmann *et al.*,2006; Hotez *et al.*,2008). Atualmente, a principal forma de tratamento é a quimioterapia, sendo o praziquantel e a oxaminiquina as principais drogas contra o *S. mansoni*. Estudos realizados por Ferrari e colaboradores (2003), demonstraram que praziquantel foi mais eficiente que oxaminiquina

no tratamento de pacientes infectados com esquistossomose mansônica quando examinados por oograma quantitativo de mucosa retal, enquanto que nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois tratamentos quando análises fecais foram realizadas (Ferrari *et al.*,2003).

1.2- Ciclo de vida

Os vermes adultos são dióicos, apresentam corpo cilíndrico medindo de 7 a 20 mm em comprimento possuem ventosas ou sugadores ventral e oral, além de um complexo tegumento com um intestino cego e órgãos reprodutores (McManus & Loukas., 2008). O corpo dos vermes machos forma uma caneleta, conhecida como canal ginecóforo, local onde se aloja a fêmea que é mais longa e delgada do que o macho (Ross *et al.*,2002; Gryseels *et al.*, 2006). O ciclo de vida do *S. mansoni* se caracteriza pela presença de alternância de fase sexuada no hospedeiro vertebrado, principalmente o homem, e fase assexuada no hospedeiro invertebrado. Na esquistossomose mansônica, os ovos são liberados na água e liberam os miracídios, os quais guiados por estímulos químicos e luminosos penetram em caramujos, seus hospedeiros intermediários. Após penetrar no caramujo, o miracídio se multiplica assexuadamente em esporocistos multicelulares e posteriormente em cercárias com a característica cauda bifurcada. Um caramujo infectado por um miracídio pode liberar milhares de cercárias por dia, sendo a luminosidade e temperatura os estímulos necessários para tal liberação. As cercárias são formas nadantes livres que sobrevivem aproximadamente 72 horas ou até que encontrem o hospedeiro definitivo, no qual as cercárias penetram ativamente na pele através da secreção de enzimas e imunomoduladores pelas glândulas acetabulares. Esse processo dura em média 53 horas para a passagem pela epiderme e 18 horas pela derme e após tal evento, as cercárias perdem a cauda bifurcada e sofrem a substituição do tegumento. Atingindo a corrente sanguínea, os esquistossômulos semi-quiescentes (não apresentam consumo significativo

de eritrócitos) são direcionados a vasculatura pulmonar e posteriormente atingem os leitos capilares para alcançar o sistema porta hepático, onde se transformam em vermes jovens com característica capacidade de se alimentarem de eritrócitos. Estes maturam na veia porta hepática, entre 4 a 6 semanas, e migram para a região mesentérica intestinal, onde as fêmeas fazem a postura no nível da submucosa. Cada fêmea põe cerca de 400 ovos por dia, na parede de capilares e vênulas, e cerca de 50% desses ganham o meio externo. Os ovos colocados nos tecidos levam cerca de uma semana para tornarem-se maduros (míracidio formado), da submucosa chegam à luz intestinal e posteriormente são liberados junto as fezes, começando assim, o ciclo novamente (Gryssels *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2009; Wilson & Coulson., 2009). O ciclo de vida se encontra esquematizado na Figura 2.

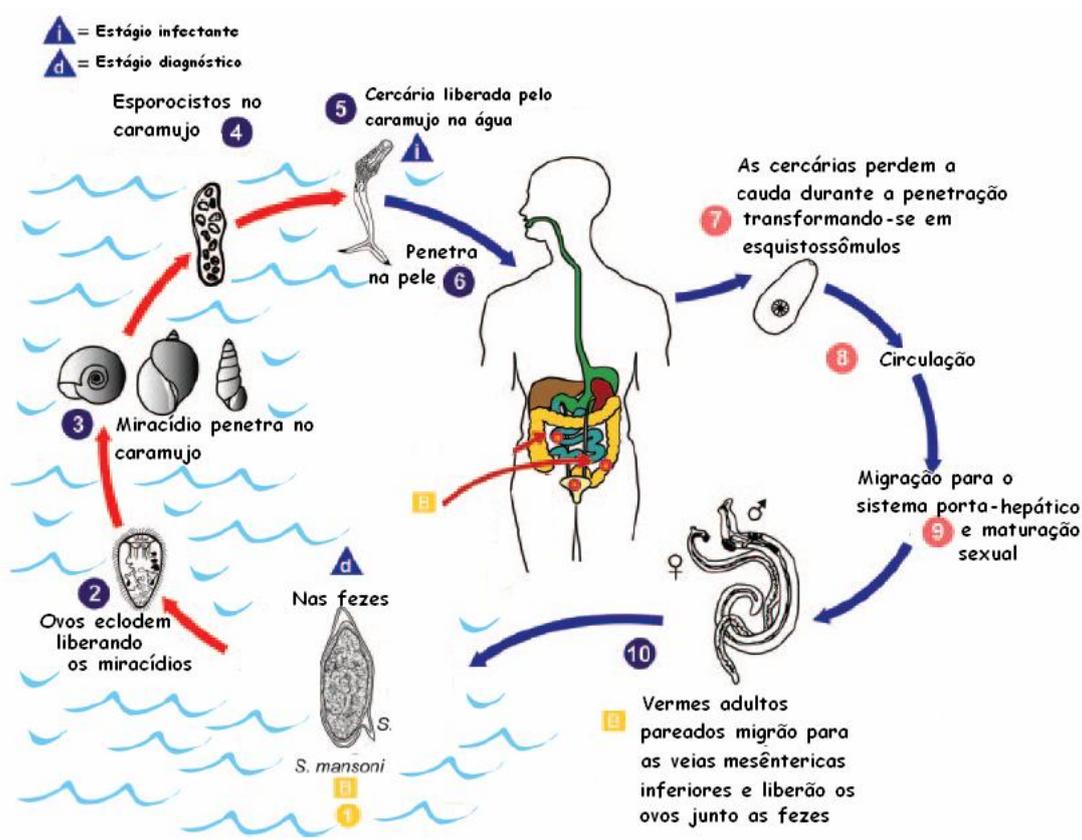


Figura 2 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Setas em vermelho correspondem à parte do ciclo que acontece na água e no hospedeiro invertebrado. Setas em azul correspondem à parte do ciclo que ocorre no hospedeiro vertebrado, no caso o homem. Adaptado de McManus & Loukas, 2008.

1.3- Formas clínicas da esquistossomose

Duas principais formas clínicas de esquistossomose mansônica são conhecidas em indivíduos infectados, a fase aguda e a fase crônica (Pearce & MacDonald., 2003, Caldas *et al.*, 2008).

A fase aguda da esquistossomose é caracterizada principalmente por reações de hipersensibilidade contra esquistossômulos migrantes e ovos, o que geralmente ocorre entre 16-90 dias após infecção (Lambertucci., 2010). A fase aguda da doença geralmente se desenvolve em indivíduos primariamente infectados, sejam eles visitantes ou pessoas habitantes de áreas endêmicas que porventura entrem em contato primário com o parasita (Caldas *et al.*, 2008). As manifestações clínicas mais comuns são febre, calafrios, fraqueza, perda de peso, dores de cabeça, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, tosse seca, hepatomegalia, esplenomegalia e lesões cutâneas, e em menores proporções ocorrem diarreias sanguinolentas, urticárias, edema periorbital e chiado (Lambertucci., 2010).

Os indivíduos portadores da fase crônica geralmente vivem em áreas endêmicas e entram em contato constante com a forma infectante do *S. mansoni*, contudo, são praticamente assintomáticos, e baseado no critério clínico, são classificados como portadores da forma intestinal ou hepatointestinal (Caldas *et al.*, 2008). Porém, uma pequena parcela dessa população desenvolve processos fibróticos, principalmente devido a forte reação granulomatosa contra ovos de *Schistosoma* que se encontram alocados em pequenos vasos presentes no fígado, ocasionando fibrose periportal de Symmer no fígado, conseqüentemente podendo causar hepatoesplenomegalia, fibrose periportal hepática e hipertensão porta, o que pode levar a formação de varizes esofageais e hematemese, e esses indivíduos são classificados como portadores da forma hepatoesplênica (Mwatha *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2006; Caldas *et al.*, 2008). A principal forma de se tentar melhorar tal

quadro é através de procedimento cirúrgico para remoção parcial do baço, o que muitas vezes pode ser utilizada como material de estudo (Oliveira *et al.*, 2000).

Em meados da década de 90, as principais metodologias para o diagnóstico das fases clínicas da esquistossomose baseavam-se principalmente em características físicas e epidemiológicas, o que tornava extremamente difícil a distinção entre indivíduos em fase aguda da doença de indivíduos portadores da fase crônica (Rabello, 1995). Estudos realizados por Beck e colaboradores (2008) mostraram que através de análises sorológicas por ELISA indireto é possível discriminar indivíduos infectados de forma aguda em relação a fase crônica, principalmente através dos níveis de IgA contra SEA (Antígenos provenientes de ovos de *Schistosoma sp.*) e IgM e IgG contra KLH (Hemocianina). Pode-se ainda diferenciar indivíduos infectados de forma aguda de indivíduos não infectados, através de análises dos níveis de IgG contra SWAP (Antígenos solúveis de vermes adultos) e SEA, porém, a sensibilidade dos testes sorológicos podem variar de acordo os antígenos utilizados e de acordo como os testes são realizados (Beck *et al.*, 2008; Jauréguiberry, 2010). Para a distinção entre indivíduos portadores das formas crônicas, as avaliações são feitas basicamente de acordo com o critério clínico (Caldas *et al.*, 2008).

1.4- Resposta imune na esquistossomose

O ciclo de vida do *S. mansoni* em seu hospedeiro definitivo envolve diferentes estágios, portanto, a resposta imune desencadeada pela infecção é bastante complexa. O primeiro contato do parasita com o sistema imunológico é durante a penetração das cercárias através da pele, as quais se transformam em esquistossômulos que caem na corrente sanguínea. Acredita-se que o principal foco de eliminação do parasita no hospedeiro seja o pulmão, onde respostas imunológicas efetivas conseguem eliminar esquistossômulos migrantes (Kassim *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1996). A resposta imune do hospedeiro contra o verme adulto é ineficiente, tendo este a capacidade de sobreviver no hospedeiro definitivo

por anos (Pearce & MacDonald, 2002). Com o início da ovoposição, os ovos liberados pela fêmea do parasita caem na circulação sanguínea e se depositam em diversos órgãos, sendo o fígado o mais comum entre eles. Esses ovos orquestram uma resposta imune local composta de macrófagos, eosinófilos e células T, ocasionando a formação de um granuloma ao redor dos ovos (Pearce & MacDonald, 2002).

No hospedeiro definitivo, os vermes do *S. mansoni* induzem tanto uma resposta imune inata quanto uma resposta imune adaptativa.

1.4.1- Imunidade inata contra esquistossomose

A primeira linha de defesa do sistema imune contra agentes infecciosos compreende a resposta imune inata. As células envolvidas na resposta inata contra agentes infecciosos são capazes de reconhecer microorganismos infectantes através de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) que são característicos destes microorganismos. O reconhecimento dos PAMPs pelo sistema imune é uma etapa crucial para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente, e tal reconhecimento é mediado por receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PRRs) presentes em células como macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento destes padrões moleculares por células da resposta imune inata desencadeia uma cascata de transdução de sinais intracitoplasmáticos que resultam na ativação de vários genes e expressão de citocinas como: IL-12 e TNF- α . As citocinas liberadas agem diretamente na determinação do tipo de resposta imune adaptativa desencadeada em resposta ao agente infeccioso, promovendo uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Janeway & Medzhitov, 2002). Entre os receptores da imunidade inata que reconhecem moléculas do *S. mansoni* se encontram a lectina ligadora de manana (MBL - *Mannan-Binding Lectin*), os receptores *scavengers* e alguns receptores do tipo *toll*.

MBL é uma proteína sérica do sistema imune inato constitutivamente expressa por hepatócitos. Essa proteína é capaz de se ligar a carboidratos presentes na superfície de cercárias e vermes adultos de *S. mansoni*, o que, em associação com as serino-protesases MASP-1 e MASP-2, apresentam a capacidade de ativar o sistema do complemento através da via dependente de MBL (Klabunde *et al.*, 2000).

Os receptores *scavengers* são glicoproteínas, presentes principalmente em macrófagos, que apresentam a capacidade de se ligarem a uma ampla gama de moléculas como dsRNA, LPS e lipoproteínas de baixo peso molecular (Janeway & Medzhitov, 2002). Esses receptores são capazes de se ligarem e removerem lipoproteínas de baixo peso molecular que se encontrem incorporadas pelo *S. mansoni*, possibilitando o reconhecimento do parasita pelo sistema imune (Xu *et al.*, 1993).

Receptores do tipo “Toll” (TLRs), são proteínas transmembrana que se caracterizam pela presença de repetições ricas em leucina flanqueadas por regiões ricas em cisteína em sua porção extracelular. A porção citoplasmática desses receptores é caracterizada por um domínio TIR (*Toll/IL-1 Receptor*), o qual é fundamental para a sinalização intracelular (Akira *et al.*, 2006). Os diferentes tipos de TLRs reconhecem diferentes ligantes associados a vários patógenos. Dentre esses receptores, TLR2, TLR3 e TLR4 são capazes de reconhecer moléculas do *S. mansoni* (Van der Kleij *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003; Aksoy *et al.*, 2005).

O receptor TLR2 presente em células dendríticas é capaz de reconhecer lisofosfatidilserina de ovos e vermes adultos do *S. mansoni*. A ligação dessas moléculas ao TLR2 desencadeia uma cascata de sinalização que promove a maturação de células dendríticas produtoras de IL-10, as quais são capazes de promover a diferenciação de células T precursoras em células T regulatórias (Van der Kleij *et al.*, 2002).

O RNA de fita dupla derivado do ovo de *S. mansoni* é reconhecido pelo TLR3 e tem a capacidade de induzir a produção das citocinas IL-12p70 e TNF- α , as quais apresentam a capacidade de diferenciar células precursoras em células de perfil Th1 (Aksoy *et al.*, 2005).

O receptor da imunidade inata TLR4 é capaz de reconhecer o carboidrato lacto-*N* fucopentose III (LNFPIII) presente em diversos estágios do ciclo de vida do *S. mansoni*. Esse carboidrato quando ligado ao receptor TLR4 promove a maturação e a diferenciação de células dendríticas secretoras de IL-4, as quais induzem a diferenciação de células precursoras em células Th2 (Thomas *et al.*, 2003).

1.4.2- Imunidade adaptativa contra esquistossomose

Vários estudos vêm demonstrando a importância de uma resposta imune adaptativa para uma proteção contra esquistossomose mansônica.

Em seres humanos, a resposta imune adaptativa pode variar de acordo com a fase clínica do hospedeiro. Durante o desenvolvimento da fase aguda é aparente o aumento na produção das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ , as quais caracterizam uma forte resposta imunológica de perfil Th1, e também aumento dos níveis dos anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e baixos níveis dos anticorpos IgM e IgG4 (Jassim *et al.*, 1987; De Jesus *et al.*, 2002). Porém, com o início da ovoposição, parece haver uma aparente modificação da resposta imunológica para um perfil Th2, o que se acredita ser basicamente mediado pela elevada produção da citocina IL-10 (Montenegro *et al.*, 1999). Durante o desenvolvimento da fase crônica, ocorre uma aparente modificação no perfil dos anticorpos, com aumento dos níveis de IgG4 e baixa na produção de IgG1, IgG2 e IgG3 (Jassim *et al.*, 1987).

A produção de citocinas Th2 pode também ser importante durante a infecção por *S. mansoni*. Estudos realizados em animais deficientes em IL-4 demonstram que, pode ocorrer um aumento exacerbado na produção de óxido nítrico (NO) durante a fase aguda da infecção, o que pode levar ao desenvolvimento de caquexia e morte, e durante a fase crônica, pode ocorrer também o acúmulo de ovos na região intestinal, os quais geram respostas imunológicas que lesam as paredes intestinais, podendo ocasionar endotoxemia e morte (Brunet *et al.*, 1997; Fallon *et al.*, 2000). Apesar de uma resposta Th2 aparentemente

ser importante para o hospedeiro durante os estágios iniciais da infecção, tal resposta pode também contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática e morbidade (Pearce & MacDonald., 2002). Estudos realizados em modelo murino por Fallon e colaboradores, em 2000, demonstraram o efeito pró-fibrótico das citocinas IL-4 e principalmente IL-13 no desenvolvimento da forma severa da doença (Fallon *et al.*,2000; Pearce & MacDonald., 2003). A citocina IL-13 em modelo murino vem sendo extensivamente correlacionada ao desenvolvimento da forma severa da esquistossomose, uma vez que camundongos deficientes para essa citocina apresentam considerável diminuição dos principais processos patológicos relacionados à infecção por *S. mansoni* (Fallon *et al.*, 2000). Em humanos, ainda não existe uma correlação entre desenvolvimento da forma severa da doença e IL-13, porém, a produção de citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-5, parece ser comum quando avaliado a resposta proliferativa de indivíduos residentes em áreas endêmicas (Araújo *et al.*, 1996). Entretanto, tal resposta parece ser muito controversa, com alguns trabalhos apresentando resultados contraditórios a tal ideia, como por exemplo, o trabalho realizado por Mwatha e colaboradores em 1998, o qual avalia o perfil de citocinas produzidos por PBMC de pacientes portadores da fase hepatoesplênica, e encontram aumento na produção de citocinas TNF- α e IFN- γ , redução de IL-5 e aumento na produção de receptores solúveis para TNF e da quimiocina ICAM-1, o que aparentemente indicaria a presença de uma resposta imunológica de perfil característico Th1 (Mwatha *et al.*,1998).

Vários estudos vêm demonstrando a importância de processos que regulem a exacerbação de uma resposta imune, e acredita-se que IL-10 desempenhe um papel essencial em tal controle em infecções por *S. mansoni* (Hoffmann *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2001). Experimentos realizados com camundongos duplamente deficientes para as citocinas IL-4 e IL-10 apresentam uma resposta imune polarizada Th1, com elevados níveis de produção de óxido nítrico (NO), aumento significativo de processos hepatotóxicos e maiores índices de mortalidade quando comparados aos animais deficientes somente para IL-4 (Hoffmann *et al.*, 2000). Quando avaliado o desenvolvimento patológico em animais duplamente

deficientes em IL-10 e TNF- α e IL-10 e IFN- γ , nota-se um aumento significativo no processo de deposição fibrótica, o qual foi caracterizado por uma resposta polarizada Th2, com aumento significativo na formação de granulomas e na mortalidade durante a fase crônica da doença (Hoffmann *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2001). Portanto, aparentemente a citocina IL-10 apresenta um papel crucial durante a infecção por *S. mansoni*, evitando que ocorram patologias severas mediadas por respostas polarizadas do tipo Th1 ou Th2.

Em modelo murino, uma resposta imune protetora contra esquistossomose aparentemente envolve tanto a imunidade celular quanto a humoral (Janckovick *et al.*, 1999). Acredita-se que essa resposta imune efetiva contra esquistossomose seja mediada pela produção das citocinas IFN- γ e TNF- α e aumento dos níveis de anticorpos IgG2a e IgG2b (Smythies *et al.*, 1992; Street *et al.*, 1999). As citocinas IFN- γ e TNF- α podem atuar na imunidade protetora contra esquistossomose através de mecanismos mediados pelo aumento da produção de óxido nítrico (NO), assim como, atuar na formação de uma resposta imunológica na região pulmonar, através mecanismo dependente de linfócitos e macrófagos, contra esquistossômulos migrantes (James *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1996). A atuação dos anticorpos IgG2a e IgG2b na proteção aparentemente se baseia em uma resposta imunológica mediada por eosinófilos e ativação do complemento contra esquistossômulos migrantes (Grzych *et al.*, 1982; Horta & Ramalho-Pinto, 1984).

1.5- Desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica

Devido a ineficiência do tratamento quimioterápico em evitar a reinfecção e ao surgimento de cepas de *S. mansoni* resistentes ao tratamento, estratégias de vacinação, sozinhas ou em conjunto com a utilização de quimioterápicos, podem ser a única maneira de se acabar com os principais problemas relacionados à esquistossomose mansônica (Mc Manus & Loukas, 2008). Devido a incapacidade do *Schistosoma sp.* se multiplicar dentro do hospedeiro definitivo, uma vacina que confira um nível de proteção de pelo menos 50%

e/ou efeito esterilizante nas fêmeas do parasita, seria eficiente na diminuição da morbidade e da transmissão da doença (Chan *et al.*, 1997; Mc Manus & Loukas, 2008).

Uma vacina antiesquistossomótica ideal, segundo Bergquist (1998), deve ser capaz de induzir altos níveis de proteção e/ou reduzir fecundidade e patologia, ser facilmente produzida em larga escala, ser segura para a utilização em humanos e facilmente incorporada a programas de imunização (Bergquist, 1998).

Diversas estratégias de vacinação já foram avaliadas contra a esquistossomose mansônica, porém, a utilização de cercárias irradiadas é a que induz maiores níveis de proteção em modelo murino, podendo chegar a 94% de redução na contagem de vermes após o desafio com cercárias não irradiadas (Wynn *et al.*, 1996). A resposta imune protetora gerada pela imunização com cercárias irradiadas parece estar diretamente relacionada à atuação das citocinas IFN- γ e TNF- α em conjunto a uma resposta humoral eficiente (Jankovick *et al.*, 1999; Street *et al.*, 1999). Apesar dos elevados níveis de proteção alcançados em camundongos, o uso dessa estratégia vacinal não se aplicaria em humanos, devido principalmente a possibilidade de o parasita recuperar sua forma infectante e aos elevados custos de produção e manutenção das cercárias irradiadas. Portanto, o modelo de imunização utilizando cercárias irradiadas é utilizado apenas em estudos dos mecanismos imunológicos responsáveis pela indução da imunidade protetora.

Diversos antígenos do *S. mansoni* já foram avaliados como candidatos vacinais, porém, nenhuma resposta imune protetora, com equivalente nível de proteção obtido pela imunização com cercárias irradiadas, foi alcançada (Mc Manus & Loukas, 2008). Vários pesquisadores acreditam que os principais alvos vacinais se encontram presente no tegumento do *S. mansoni* (Loukas *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2011).

1.5.1- Proteínas do tegumento como candidatos vacinais

O tegumento consiste de um sincício de células fundidas que cobrem todo o corpo de vermes adultos do *Schistosoma sp.*, e visto que tal estrutura se encontra presente em basicamente todos os vermes que habitam a circulação sanguínea, acredita-se que tal estrutura seja uma essencial adaptação para a sobrevivência em tal ambiente (Hellemond *et al.*,2006). O tegumento parece estar envolvido em processos como nutrição, evasão imune e modulação, excreção, osmorregulação, transdução de sinais e recepção sensorial e importantemente na perspectiva de desenvolvimento de uma vacina, constitui a interface de interação entre hospedeiro e parasita (Hellemond *et al.*,2006; Loukas *et al.*,2007). O desenho esquemático de tal estrutura se encontra na Figura 3.

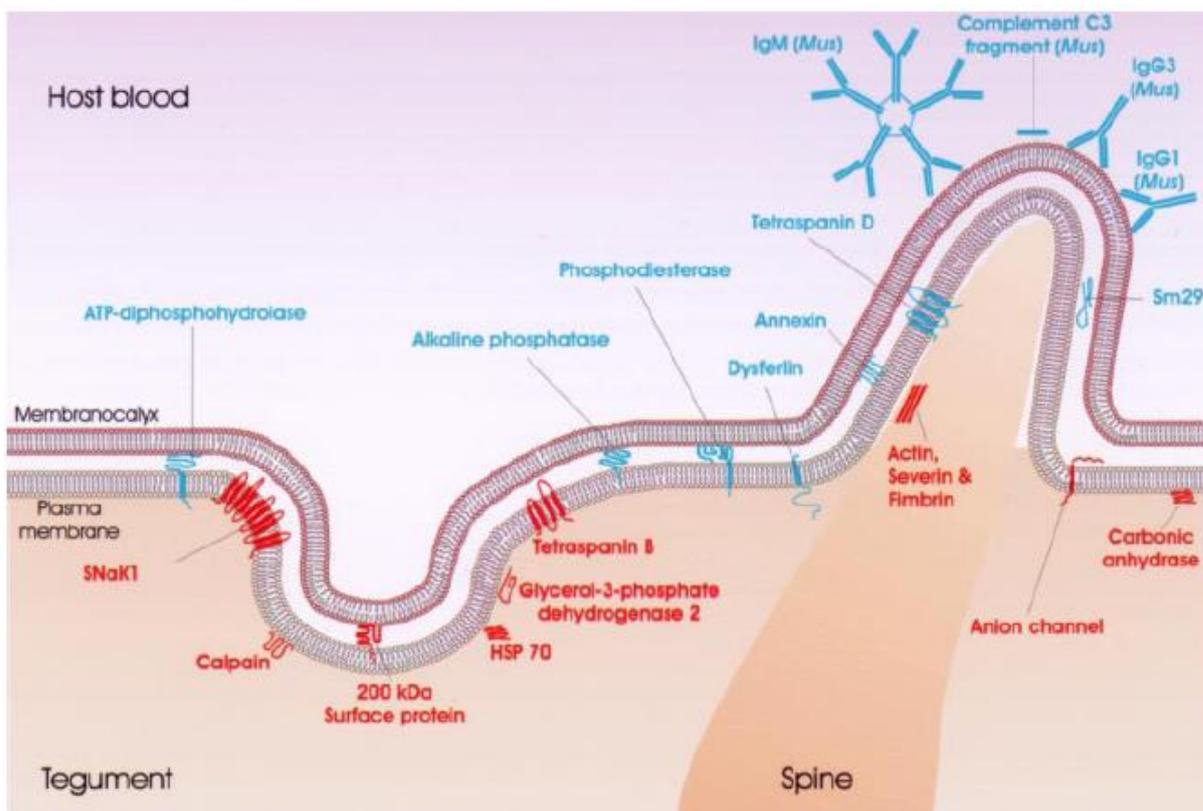


Figura 3 Desenho esquemático do tegumento do *Schistosoma mansoni* e a possível localização de algumas proteínas encontradas em tal estrutura. As proteínas em azul apresentam uma posição mais externa em relação às proteínas em vermelho (Braschi *et al.*, 2006).

Várias proteínas presentes no tegumento já foram avaliadas em relação ao potencial protetor contra esquistossomose mansônica em modelo murino, dentre elas podemos citar a calpaína (Ahmad *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010), Sm21.7 (Ahmed *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2006), filamina (Cook *et al.*, 2004), Sm21.6 (Lopes *et al.*, 2009), fimbrina (Mohamed *et al.*, 1998; Romeih *et al.*, 2008), ECL (Nascimento *et al.*, 2007), glutathione peroxidase (Shalaby *et al.*, 2003), Sm29 (Cardoso *et al.*, 2008), TSP-2 (Tran *et al.*, 2006), dentre outras. Entre as proteínas presentes no tegumento já testadas, se destacam a Sm29 e a TSP-2.

1.5.2- Candidato vacinal Sm29

Estudos realizados por Cardoso e colaboradores (2006) demonstraram que Sm29 é uma proteína de ponto isoelétrico 8,08 e de massa molecular aproximada a 18,07 KDa com pouca similaridade com proteínas depositadas no databank, a não ser por algumas poucas proteínas presentes em *Schistosoma japonicum* (Cardoso *et al.*, 2006a; Cardoso *et al.*, 2006b). Sm29 possui um peptídeo sinal em sua porção N-terminal de aproximadamente 26 aminoácidos, uma hélice transmembrana na região C-terminal e 17 cisteínas que provavelmente formam oito pontes dissulfeto características de proteínas de membranas ou secretadas (Cardoso *et al.*, 2006b). Tal proteína possui três sinais de O-glicosilação e dois de N-glicosilação em sua estrutura, o que explica a massa molecular prevista de 29KDa (Cardoso *et al.*, 2006b). Resultados de microscopia confocal, confirmam a presença de Sm29 no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos e também em alguns tecidos internos de fêmeas adultas do *S. mansoni* (Cardoso *et al.*, 2006a; Cardoso *et al.*, 2006b; Cardoso *et al.*, 2008). A sequência de aminoácidos da Sm29 apresentou vários motivos bem conservados como o de toxinas tipo cobra (enovelamento rico em dissulfetos) e motivos de pequenas proteínas (ligantes de metais, hemes e pontes dissulfeto) (Cardoso *et al.*, 2006b).

A avaliação da sequência peptídica da Sm29 identificou 5 epítomos promíscuos de ligação a MHC-II de seres humanos, e quando avaliado o soro de indivíduos resistentes a reinfecção, nota-se maiores níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 anti-Sm29 do que indivíduos naturalmente susceptíveis (Cardoso *et al.*,2006a).

Quando utilizada como vacina recombinante em modelo murino, a proteína Sm29 foi capaz de gerar uma resposta humoral com altos níveis de IgG, IgG1 e IgG2a anti-Sm29, uma resposta celular de perfil Th1 com níveis elevados de IFN- γ , TNF- α , e IL-12, assim como alcançar níveis de 51%, 60% e 50% na redução de vermes, ovos presentes no intestino e número de granulomas, respectivamente (Cardoso *et al.*,2008).

Quando avaliada em sua forma recombinante em babuínos, a proteína Sm29 se demonstrou altamente imunogênica, visto os elevados índices de proliferação celular dos animais imunizados com essa proteína quando comparados ao grupo controle (dados não publicados).

Tais resultados indicam que Sm29 é um importante candidato vacinal contra esquistossomose mansônica.

1.5.3- Candidato vacinal Tetraspanina-2 (TSP-2)

Tetraspaninas consistem de uma larga superfamília de proteínas que provavelmente se encontram presentes em todos os metazoários (Kovalenko *et al.*, 2005; Cupit *et al.*,2011). Tais proteínas contêm quatro domínios transmembranas bem conservados (TM1-TM4), domínios intracitoplasmáticos N e C-terminais e duas alças extracelulares (EC-1 e EC-2) separadas por uma curta alça intracelular (ICL) (Kovalenko *et al.*,2005). Tetraspaninas tem a capacidade de se ligarem a uma grande gama de proteínas transmembranas, como integrinas, receptores e fatores de crescimento, moléculas de MHC II, proteínas da superfamília das imunoglobulinas a também com outras tetraspaninas, o que permite que

tais moléculas estejam envolvidas em diversos processos biológicos, como por exemplo, evasão imune e processos estruturais (Kovalenko *et al.*,2005; Cupit *et al.*,2011).

TSP-2 é uma proteína da família das tetraspaninas encontrada basicamente no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* e que possui homologia a receptores de superfícies de células B e células T (Tran *et al.*,2006). Trabalhos realizados por Tran e colaboradores (2010) demonstram que quando vermes adultos de *S. mansoni* tem sua produção de TSP-2 inibida pela ação de dsRNAs, processos relacionados a renovação do tegumento apical se tornam prejudicados, visto o aumento no número e tamanho de vacúolos da camada superficial, menor quantidade de inclusões citoplasmáticas e espessura mais fina de tal camada, e em esquistossômulos, o efeito do tratamento com dsRNAs contra TSP-2, faz com que o tegumento se torne mais fino, com maiores índices de invaginações e compartimentos celulares, e também foi demonstrado que a inibição de TSP-2 pode influenciar na sobrevivência de tais parasitas in vivo (Tran *et al.*,2010; Cupit *et al.*, 2011).

TSP-2 é fortemente reconhecida por anticorpos IgG1 e IgG3 de indivíduos naturalmente resistente a infecção, e quando utilizada na forma de vacina recombinante em modelo murino, tal proteína foi capaz de gerar elevados níveis de IgG1 e IgG2a anti-TSP-2 e também 57%, 64% e 69% de redução na contagem de vermes, ovos presentes no fígado e nas fezes respectivamente e devido ao fato da expressão de tal proteína parecer não estar sobre influência de muitos polimorfismos, ao contrário do que ocorre com a tetraspanina-2 de *S. japonicum*, tal proteína tem uma grande potencial como candidato vacinal (Tran *et al.*,2006; Cupit *et al.*,2011).

1.6- Vacinas de DNA

Wolff e colaboradores (1990) demonstraram que a administração via injeção intramuscular de plasmídeos, sob controle de promotor que permita a expressão gênica em células

eucarióticas, era capaz de levar a síntese proteica de genes repórteres sem a necessidade de maiores sofisticações da técnica (Wolff *et al.*,1990). Em 1992, De-Chu Tang e colaboradores, através da administração de plasmídeos em orelhas de camundongos foi capaz de perceber que a expressão da proteína heteróloga era capaz de gerar uma resposta humoral contra hormônio de crescimento humano (Tang *et al.*, 1992). Em 1993, Ulmer e colaboradores demonstraram que plasmídeos contendo a sequência de uma nucleoproteína conservada do vírus influenza era capaz de gerar resposta imune protetora percebida *in vivo* contra tal vírus, dando início assim, a metodologia de vacinação por DNA (Ulmer *et al.*, 1993).

Vacina de DNA é a designação relacionada à metodologia de imunização que ao invés de se utilizar de antígenos como forma de imunização se utiliza de genes que codifiquem tais antígenos (Donnelly, 2005). Normalmente, vacinas de DNA correspondem a vetores plasmidiais de origem bacteriana, os quais contenham genes heterólogos de interesse sob o controle de um forte promotor que capacite à expressão gênica em células de mamíferos (Garmory *et al.*, 2003). Devido tal expressão ocorrer em células de mamíferos, ao contrário de procedimentos de imunização com proteínas, o processo de síntese intracelular do antígeno codificado pelo plasmídeo permitirá que tal proteína sofra normais modificações pós-traducionais e que seja corretamente glicosilado (Shedlock & Weiner., 2000).

A metodologia de vacinação por DNA apresenta como principais vantagens: Versatilidade na construção dos plasmídeos; Produção relativamente simples e rápida; Facilidade de transporte e distribuição; As vacinas são relativamente seguras, uma vez que não existe a necessidade da utilização de organismos patogênicos; Estabilidade em temperatura ambiente e ainda apresenta a capacidade de estimular tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (Liu, 2003; Fioretti *et al.*, 2010; Liu, 2011). Entretanto, mesmo com todas essas vantagens, as vacinas de DNA geralmente apresentam baixa capacidade de transfecção *in vivo* e baixa imunogenicidade em animais de grande porte (Liu, 2003; Fioretti *et al.*, 2010; Liu, 2011).

Devido aos problemas encontrados relacionados à baixa capacidade transfectante e a carência de fortes respostas imunológicas em organismos de grande porte e humanos, grandes esforços são despendidos para aumentar a potência de vacinas de DNA, o que pode ir de tentativas para se aumentar a estabilidade, expressão e otimização de vias de administração (Garmory *et al.*, 2003; Liu, 2011).

1.6.1- Otimização de vacinas de DNA

Mesmo com o grande potencial das vacinas de DNA em induzirem diferentes tipos de resposta imunológica, baixo custo de produção, estabilidade e outras vantagens, a baixa capacidade de transfecção pode limitar a eficiência de tal estratégia, o que dita a necessidade de técnicas que otimizem o processo de transfecção ou aumentem a eficiência da produção protéica do plasmídeo, como por exemplo a inserção de uma sequência de Kozak ou otimização de códons (Ólafsdóttir *et al.*, 2008; Fioretti *et al.*, 2010; Liu., 2011).

Até 1981 acreditava-se que o início da tradução protéica em eucariotos ocorria quando a subunidade ribossômica 40S encontrava o primeiro 5' AUG 3' em um mRNA, porém, estudos realizados por Marilyn Kozak, no ano de 1981, demonstraram que nas sequências mais expressas, encontravam-se uma purina na posição -3 e uma guanina na posição +4, e trabalhos de avaliação de sequências não codificantes de 699 espécies de vertebrados no ano de 1987, também por Marilyn Kozak, demonstraram que existia uma sequência consenso para o início da tradução na maioria dos RNAs mensageiros, a qual correspondia basicamente a 5' GCCGCCACCAUGG 3', a qual ficou conhecida como sequência consenso de Kozak. A inserção de uma sequência consenso de Kozak na região 5' da sequência a ser produzida e utilizada como imunógeno, provavelmente será capaz de aumentar os índices de tradução do mRNA codificado, o que é almejado na metodologia de imunização por DNA devido aos baixos índices de transfecção (Kozak., 1981; Kozak., 1987; Garmory *et al.*, 2003; Ólafsdóttir *et al.*, 2008).

As proporções de tRNAs entre as espécies variam, e o uso de códons selecionados geralmente se encontra relacionado com a eficiência da expressão gênica, de modo que os genes mais expressos evitam a presença de códons correspondentes a tRNAs de menores frequências, portanto, diferenças entre códons preferenciais entre um organismo hospedeiro e um gene heterólogo podem afetar os níveis de expressão de vacinas de DNA (Garmory *et al.*,2003; Kutzler *et al.*,2008).

1.6.2- Principais formas de administração de vacinas de DNA

As principais formas de administração de vacinas de DNA são a intramuscular e a biobalística ou *gene gun*, como demonstrado na Figura 4. Outra metodologia promissora como forma de administração de vacina de DNA é a utilização da eletroporação.

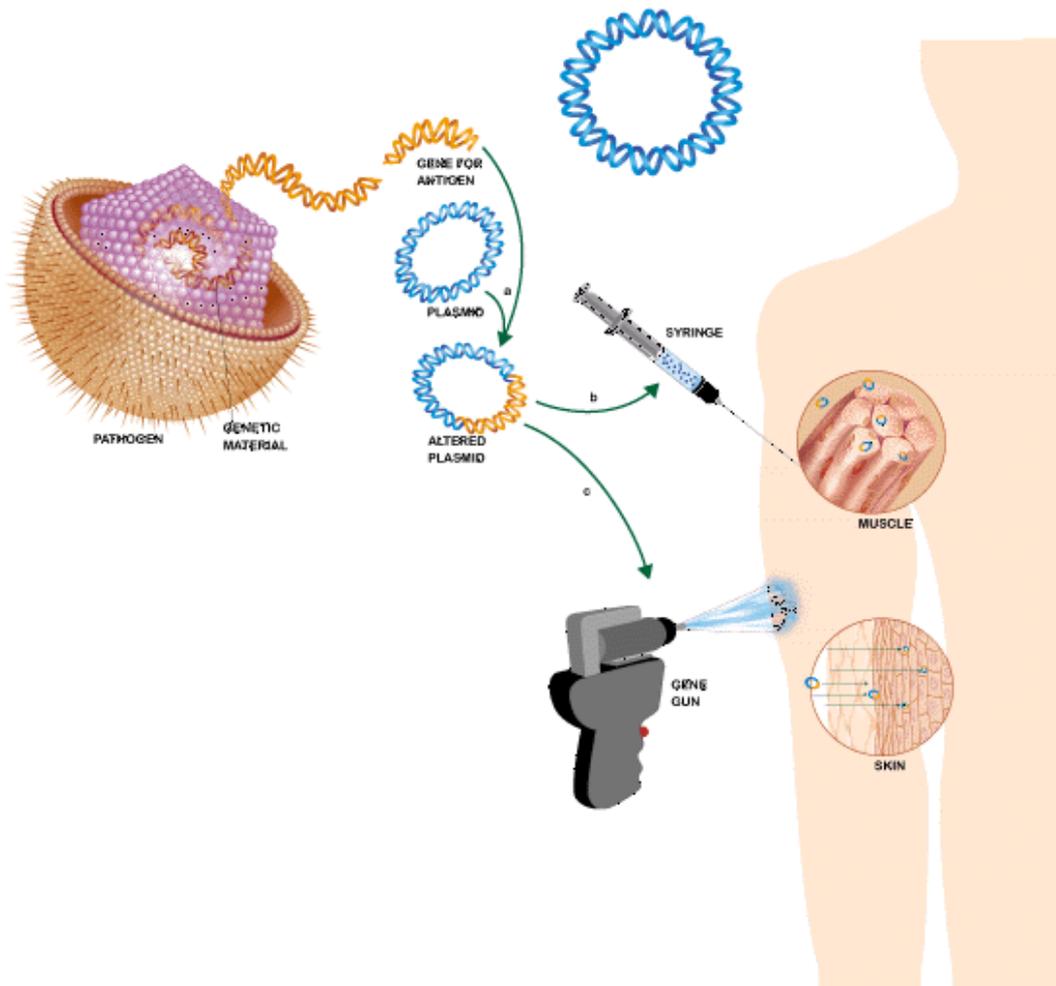


Figura 4 Principais vias de administração de vacinas de DNA. Após a obtenção do plasmídeo contendo o gene do antígeno de interesse, ele pode ser administrado por diversas vias. As duas principais vias de administração são a intramuscular e através de biobalística ou *gene gun*.

Em 1990, Wolff e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a administração de plasmídeos via injeção intramuscular era capaz de levar a expressão proteica sem a necessidade de tecnologias mais elaboradas (Wolff *et al.*, 1990). A partir de tal observação, vários estudos posteriores se utilizaram de tal técnica como forma de imunização gênica. Tal processo de imunização atua transfectando principalmente miócitos, porém, acredita-se que células apresentadoras de antígenos APCs também são transfectadas, as quais exercem papéis fundamentais na geração da resposta imune. O volume geralmente utilizado para a imunização excede a capacidade volumétrica do músculo anterior tibial de camundongos, o

que resulta na dispersão da vacina em toda a extensão do músculo, bainha epimisial e linfonodos circundantes (Dupuis, 2000).

Várias metodologias visam o aperfeiçoamento da administração e da transfecção celular pela rota intramuscular, como por exemplo, os sistemas Biojector®2000 e Mini-Ject™ e eletroporação in vivo. O sistema Biojector®2000 é formado por um aparato que é capaz de injetar o material desejado, tanto intramuscularmente quanto subcutaneamente, através de pressão gerada por gás CO₂ em uma maneira independente de agulhas (Bioject - <http://www.bioject.com/biojector2000.html>). O sistema Mini-Ject™ atua inserindo o material intramuscularmente, de maneira independente de agulhas, através de pressão gasosa gerada por reação química. Apesar de menos dolorosas que injeção muscular por intermédio de agulha, os sistemas de injeção Biojector®2000 e Mini-Ject™ aparecem como metodologias muito mais dispendiosas e não apresentam benefícios aparentes no que se relaciona a potencialização imunológica de vacinas de DNA (Rao., 2005).

Eletroporação ou Eletropermeabilização vem se mostrando como uma técnica com a capacidade de aumentar o potencial transfectante, níveis de expressão protéica e potencial imunogênico de vacinas de DNA (Dupuis *et al.*, 2000 ; Babiuk *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2008). A metodologia se baseia na geração de pulsos eletromagnéticos nos locais da injeção da vacina de DNA, o qual permite a maior permeabilização das células ao redor e conseqüentemente aumentando os níveis de transfecção celular (Aihara & Miyazaki., 1998) e com capacidade de gerar prolongada memória imunológica (Tsang *et al.*,2007). Apesar de se mostrar como tecnologia altamente eficiente no quesito imunogenicidade e potencial transfectante, a eletroporação pode ocasionar altas taxas de integrações cromossômicas, o que é indesejável para a vacinação por DNA, além do que, ainda se apresenta como tecnologia altamente dispendiosa, o que poderia limitar sua utilização em países menos desenvolvidos (Wang *et al.*, 2004; Liu., 2011).

Experimentos realizados por Williams e colaboradores, em 1991, demonstraram que partículas de ouro ou tungstênio cobertas com plasmídeos quando expelidas por pressão gerada por gás hélio eram capazes de transfectar células da pele e fígado, assim como, síntese de proteínas codificadas pelos plasmídeos, o que tornou tal metodologia indicada para procedimentos de imunização com DNA(Williams *et al.*, 1991). Tal metodologia, atualmente conhecida como gene gun ou biobalística vem sendo utilizada em pequenos animais com bons níveis imunogênicos e se mostra como metodologia promissora para imunização de animais de grande porte (Wang *et al.*, 2008).

1.7- Vacinas de DNA e a esquistossomose mansônica

Muitos pesquisadores acreditam que uma resposta imunoprotetora contra *S. mansoni* envolva tanto a imunidade celular quanto humoral, portanto, vacinas de DNA se tornam metodologia promissora de imunização, devido a sua capacidade de induzir ambos os componentes do sistema imune (Fonseca *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008).

A calpaína (Sm-p80) é uma proteína que se encontra relacionada ao processo de renovação da membrana externa do *S. mansoni*, processo esse utilizado com o intuito de escapar da resposta imune do hospedeiro (Ahmad *et al.*, 2009). Em 2009, Ahmad e colaboradores, utilizando o vetor pcDNA3 com a sequência de Sm-p80 obtiveram em camundongos C57BL/6 níveis de proteção equivalentes a 59% na redução da contagem de vermes e 84% na contagem de ovos do fígado, além de elevados níveis de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 e aumento significativo na produção de citocinas IL-2 e IFN- γ , o que pode indicar o direcionamento da resposta imunológica para o perfil Th1. Zhang e colaboradores em 2010, utilizaram em imunizações o vetor vr1020, o qual tem seu uso aprovado em seres humanos, e conseguiram níveis de aproximadamente 47% na redução da carga parasitária, o que foi acompanhado por elevados níveis de anticorpos IgG2b e citocinas IL-2 e IFN- γ , o que mais uma vez prediz um direcionamento de resposta imunológica para o perfil Th1 e também um

elevado nível de transcritos correspondentes as citocinas TGF- β e IL-17, o que pode estar relacionado a presença de uma resposta de perfil imunológico Th17 (Zhang *et al.*,2010). Sidiqqi e colaboradores em 2003, utilizando a injeção conjunta de plasmídeos codificantes para as citocinas IL-2 e IL-12 conseguiram aumentar os níveis de proteção (redução na contagem de vermes recuperados) do plasmídeo codificante para Sm-p80 de 39% para 57% e 45%, respectivamente, além de aumento nos níveis de IgG, IgG2a e IgG2b quando o DNA de IL-2 foi utilizado e aumento nos níveis de IgG e IgG2a quando o DNA de IL-12 foi utilizado (Sidiqqi *et al.*, 2003) Em 2009, Ahmad e colaboradores, utilizando-se do vetor pcDNA3, imunizaram babuínos (*Papio anubis*) e alcançaram 38% de redução na contagem de vermes recuperados e 32% de redução na contagem de ovos do fígado + intestino, altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-Sm-p80 e altos níveis de IL-2 e IFN- γ quando comparados com o grupo controle, o que mais uma vez prediz o direcionamento para uma resposta imunológica de perfil Th1 (Ahmad *et al.*,2009).

A proteína Sm23, da família das tetraspaninas, possui quatro domínios hidrofóbicos e se encontra ligada ao tegumento de vermes adultos através de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Köster & Strand., 1994). Quando avaliada como vacina de DNA, a sequência da proteína Sm23 inserida no vetor pcDNA alcançou níveis de proteção (redução de vermes adultos) indo de 25-44% e com elevados níveis de IgG, e IgG2a >IgG1 (Da'dara *et al.*, 2001). Quando administrados conjuntamente a vacina pcDNA-Sm23, os plasmídeos codificantes para as citocinas IL-12 (pNGVL3-mIL-12) ou IL-4 (pNGVL3-mIL-4) não apresentaram nenhuma diferença significativa na contagem de vermes adultos quando comparadas a vacina pcDNA-Sm23 sozinha. Porém, a coadministração do plasmídeo contendo a sequência de IL-12 foi capaz de reduzir os níveis de IgG1, enquanto que, a administração do plasmídeo codificante para IL-4 reduziu os níveis totais de IgG e IgG2a IgG1 (Da'dara *et al.*, 2001).

Enzimas antioxidantes estão envolvidas na evasão de vermes adultos do *S. mansoni* à respostas imunes do hospedeiro envolvendo espécies oxidantes reativas (Mei & Lo Verde.,

1997). Dentre essas enzimas está a Cu/Zn superóxido dismutase, que se encontra presente principalmente no tegumento de vermes adultos (Mei & Lo Verde., 1997). Em 2003, Shalaby e colaboradores demonstraram que a imunização de camundongos C57BL/6 com o plasmídeo pcDNA contendo as sequências de Cu/Zn superóxido dismutase (CT-SOD) ou Cu/Zn superóxido dismutase com peptídeo sinal (SP-SOD) foram capazes de alcançar 44-60% e 22-45% de proteção, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle (Shalaby *et al.*, 2003). Outra proteína importante provavelmente envolvida na evasão do *S. mansoni* é a glutathione peroxidase, a qual se encontra presente também preferencialmente no tegumento de vermes adultos (Mei & Lo Verde., 1997). Quando avaliada em forma de vacina de DNA, a enzima nativa glutathione peroxidase (GPXbb) alcançou níveis de proteção de 23-55%, enquanto que a forma mutada (GPXm), a qual tinha um aminoácido selenocisteína substituído por uma cisteína em seu sítio catalítico, induziu apenas 25-35% de proteção na redução de vermes adultos quando comparada ao grupo controle (Shalaby *et al.*, 2003).

Outro candidato testado foi a proteína filamina, a qual possui homologia a proteína ligadora de actina humana e se encontra presente em vários estágios do desenvolvimento de *S. mansoni* e também no tegumento de vermes adultos (Cook *et al.*, 2004). Quando administrada na forma de vacina de DNA, a proteína filamina inserida no vetor pcDNA foi capaz de gerar 50% de redução na contagem de vermes, títulos elevados de IgG e IgG2a, IgG2b e IgG1 e aumento no percentual de células secretoras de IFN γ , IL-4, IL-5 e IL-10, o que é um indicativo de uma resposta de perfil misto Th1/Th2, quando comparada ao grupo controle (Cook *et al.*, 2004).

A Sm20.8, membro de uma família de proteínas solúveis encontradas no tegumento de *S. mansoni*, contém motivos EF-hands, os quais são característicos de proteínas ligadoras de cálcio, e é reconhecida como alvo antigênico em antisoro protetor (Mohamed *et al.*, 1998). Quando administrada como vacina de DNA pela via intramuscular em camundongos

C57BL/6 no vetor pcDNA, a proteína Sm20.8 induziu 28,5-30,8% de redução na contagem de vermes quando comparada ao grupo controle (Mohamed *et al.*, 1998).

A proteína Sm21.7 é encontrada principalmente no tegumento e nas camadas parenquimais de vermes adultos de *S. mansoni* e apresenta considerável potencial como antígeno para uma vacina anti-esquistossomótica (Ahmed *et al.*,2001). Quando avaliada como vacina de DNA, a sequência da proteína Sm21.7 , inserida no vetor pcDNA1, foi capaz de induziu 41,53% de proteção, altos níveis de IgG, redução de 62% e 67% na contagem de ovos presentes no fígado e intestino, respectivamente, e diminuição na contagem e tamanho de granulomas hepáticos quando comparados ao grupo controle (Ahmed *et al.*,2006). Fimbrina é uma proteína de aproximadamente 651 aminoácidos presente no tegumento de vermes adultos do *S. mansoni* com alta homologia a fimbrina de aves e plastina humana (Romeih *et al.*, 2008). Quando avaliada como vacina de DNA multivalente em conjunto com a proteína Sm21.7, ambas foram capazes de induzir 56% de redução na contagem de vermes, altos níveis de IgG, e 41,5 e 55,6% de redução na contagem de ovos no fígado e intestino respectivamente (Romeih *et al.*,2008).

A macromolécula ECL é uma proteína de aproximadamente 200kDa ligada por uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) ao tegumento de vermes adultos e também presente em diferentes estágios de vida do *S. mansoni* (Nascimento *et al.*, 2007). A imunização de camundongos com o plasmídeo pVAX contendo fragmento da proteína ECL foi capaz de alcançar 38,1% de proteção e níveis significativos de IgG, IgG1 e IgG2a, o que não foi observado para os anticorpos IgE e IgG3 (Nascimento *et al.*, 2007).

Outro importante candidato vacinal é a Sm14, a qual apresenta aproximadamente 14,8 KDa e com conhecida homologia a proteínas ligadoras de ácidos graxos, o que associado à incapacidade de síntese DE NOVO de ácidos graxos por tais vermes, indicam que tal proteína possa estar envolvida no processo de captação de metabólitos do hospedeiro (Moser *et al.*,1991). A proteína Sm14 quando utilizada como vacina de DNA no vetor pCI, foi

capaz de gerar uma resposta imunológica protetora com 40,5% de redução na contagem de vermes, altos níveis de IgG anti Sm14 e elevada produção de citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 quando comparada ao grupo controle (Fonseca *et al.*, 2006).

2- JUSTIFICATIVA

Mesmo com a existência de quimioterápicos efetivos contra esquistossomose mansônica, como por exemplo, o Praziquantel, ainda existe a propagação da esquistossomose para novas áreas (Mc Manus e Loukas.,2008). Uma eficiente distribuição de tal quimioterápico necessitaria de uma complexa estrutura que regularmente cobrisse todas as possíveis áreas de contaminação de uma região endêmica, o que aliado com a incapacidade de tal estratégia limitar a reinfeção, podem ditar que tal metodologia seja muito dispendiosa ou até impraticável (Mc Manus e Loukas.,2008). Além disso, estudos realizados por Gryssels e colaboradores (2006) demonstram que algumas cepas de *Schistosoma mansoni* desenvolvem a capacidade de resistência ao tratamento quimioterápico (Gryseels *et al.*, 2006). Assim como medida profilática, a vacinação seria um método ideal para o controle da esquistossomose, exclusivamente ou em combinação com quimioterápicos, sendo que a vacinação poderia atuar na redução da morbidade e também impactar a transmissão. (Bergquist *et al.*,2005; Zhang *et al.*,2007).

Sendo assim vários antígenos de *S. mansoni* já foram avaliados em relação ao potencial imunogênico, demonstrando diferentes percentuais de proteção alcançados, como proteínas do tegumento, calpaína, SODs (superóxido dismutases), filamina, ECL (Sm200), Sm25, Sm21.7, Smfimbrina, paramiosina, FABPs, (proteínas ligadoras de ácidos graxos) dentre outras (Mc Manus & Loukas., 2008; Pinheiro *et al.*, 2011).

Uma proteína presente no tegumento de vermes adultos já estudada por nosso grupo denominada de Sm29 se encontra entre os genes mais expressos no *Schistosoma mansoni*, e a localização estratégica de Sm29 em esquistossômulos e vermes adultos, e sua ausência em cercárias, sugere que a proteína exerça importante função na adaptação do parasito ao novo ambiente, o hospedeiro definitivo (Cardoso *et al.*, 2008). Cardoso e colaboradores (2008) através da imunização de camundongos com a proteína Sm29 alcançaram altos

níveis de redução na contagem de vermes adultos, de ovos na região intestinal e número de granulomas intestinais (51%, 60% e 50% respectivamente), sendo que tal proteína pode ser considerada como antígeno candidato para novas vacinas contra *S.mansoni*. (Cardoso *et al.*,2008). Porém, existe uma grande dificuldade de expressão da proteína Sm29 recombinante na forma solúvel, ditando assim, a necessidade da utilização de técnicas que tenham a capacidade de solucionar tal problema.

Outra proteína detentora de resultados promissores foi à proteína Tetraspanina-2, a qual se encontra presente no tegumento do *S. mansoni*, basicamente em vermes adultos e esquistossômulos, sendo que suas funções parecem estar relacionadas a renovação do tegumento e interações proteínas-proteína (Tran *et al.*,2010). Estudos realizados por Tran e colaboradores (2006) revelaram grande potencial imunogênico, com significativa redução da carga parasitária e ovos (57% e 64% respectivamente) obtidos através da imunização de camundongos com a proteína Tetraspanina-2 (Sm-TSP-2) (Tran *et al.*,2010).

Devido aos resultados poucos promissores apresentados até o momento no desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose mansônica, a junção de um ou mais antígenos na metodologia de imunização pode ser responsável pela potencialização dos níveis de proteção alcançados pelas proteínas em sua forma individual. (Romeih *et al.*, 2008).

Visto que aparentemente uma resposta imune contra a esquistossomose efetiva parece estar relacionada com resposta imune celular e humoral (Janckovick *et al.*,1999), que vacinas de DNA apresentam capacidade de estimular tais respostas, assim como outros componentes do sistema imunológico (Liu.,2011) e que tal metodologia de imunização pode resolver os problemas encontrados com a difícil solubilização de Sm29, visamos avaliar o potencial de tal metodologia como forma de imunização contra a esquistossomose mansônica murina utilizando os candidatos vacinais Sm29 e Tetraspanina-2, em sua forma individual, ou em forma de quimera ou vacina multivalente.

3- OBJETIVO

3.1- Geral

O objetivo deste trabalho é construir e avaliar a eficiência das vacinas de DNA contendo as sequências das proteínas Sm29 ou tetraspanina-2(TSP-2) do *S. mansoni*, separadas, na forma de quimera ou como vacina multivalente em modelo murino.

3.2- Específicos

Os objetivos específicos são:

- Construir os plasmídeos contendo a sequência das proteínas Sm29, Tetraspanina-2 e uma sequência quimérica proveniente da fusão de ambas
- Avaliar a transcrição e tradução das proteínas *in vitro* em células BHK21
- Analisar a resposta humoral induzida após as imunizações
- Determinar o perfil de citocinas induzidas através da dosagem de IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α e IL-10
- Avaliar os níveis de proteção alcançados com as Vacinas de DNA
- Determinar a influência das imunizações na deposição de ovos no fígado

4- METODOLOGIA

4. 1- Animais e parasitas

Camundongos fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram adquiridos do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais. Cercárias de *S. mansoni* (cepa LE) foram obtidas do Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz pelo método de estimulação luminosa a caramujos infectados para a liberação de cercárias. Número de cercárias e viabilidade foram determinados usando microscópio ótico antes da infecção. Todos os estudos utilizando-se animais experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) Protocolo nº 254/2010.

4.2- Construções dos plasmídeos

As sequências gênicas correspondentes as proteínas Sm29, TSP-2 e a forma quimérica de ambas foram sintetizadas no plasmídeo pUMVC3 (Aldevron), Figura 5, pela empresa Epoch Biolabs (Missouri, Texas, USA). As sequências gênicas foram inseridas no sítio múltiplo de clonagem entre as regiões correspondentes as enzimas de clivagem EcoRI(1102) e XbaI(1130) e sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV IE). Os insertos passaram por processo de otimização de sequência para expressão gênica em células de mamíferos e a sequência de KOZAK (5'GCCGCCACCATGG3') foi inserida na janela de leitura em cada um dos genes correspondentes.

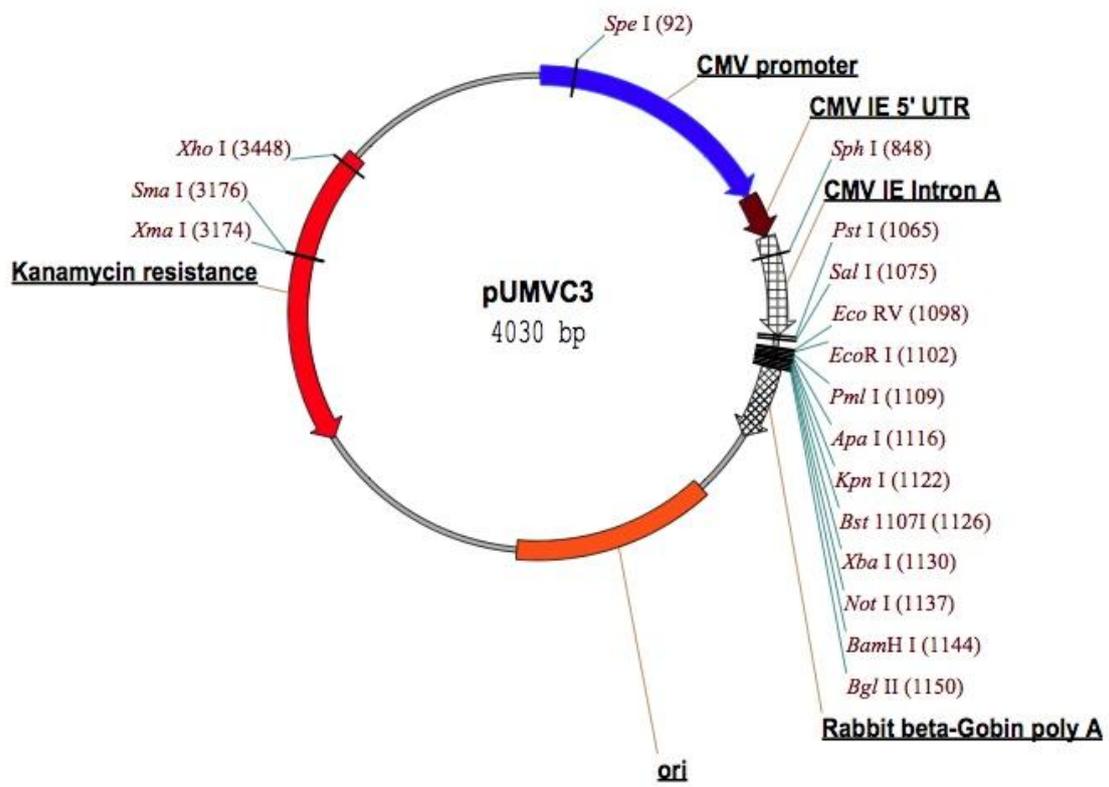


Figura 5 pUMVC3 (Aldevron)

4.3- Vacinas de DNA

As construções pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Quimera foram amplificadas na cepa bacteriana XL1-Blue e isoladas usando EndoFree Plasmid Giga Kit® (Qiagen, Valencia, CA) conforme manual do fabricante. Os plasmídeos foram ressuspensos em solução salina fosfato tamponado a uma concentração final de 1mg/mL para posteriores imunizações. A integridade dos plasmídeos foi avaliada em gel de agarose 1% corado com blue-green como demonstrado na figura 6.

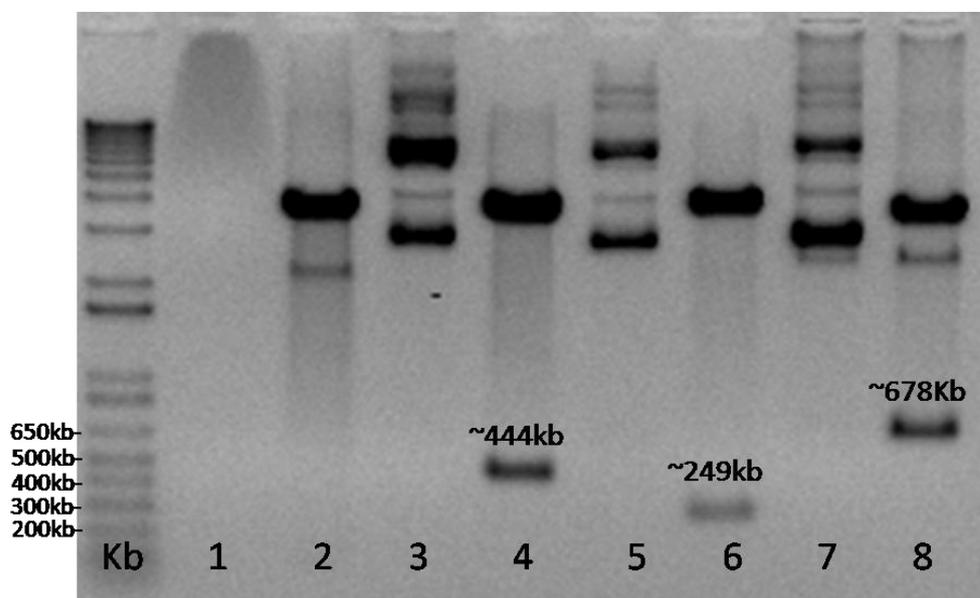


Figura 6 Avaliação da integridade dos plasmídeos. Gel de agarose 1% contendo as vacinas de DNA digeridas com as enzimas de restrição ECORI e XBAI. (1) - pUMVC3 não digerido, (2) - pUMVC3 digerido, (3) - pUMVC3/Sm29 Não digerido, (4) - pUMVC3/Sm29 digerido, (5) - pUMVC3/TSP-2 Não digerido, (6) - pUMVC3/TSP-2 digerido, (7) - pUMVC3/Quimera Não digerido e (8) - pUMVC3/Quimera digerido.

4.4 Produção de Sm29 e quimera recombinantes

As proteína Sm29 recombinante foi produzida de acordo com Cardoso *et al.*, 2006a. Rapidamente, o cDNA da proteína Sm29 ligado a uma cauda C terminal de histidina 6x foi produzido em *E. coli* utilizando o vetor de expressão pET21a (Novagen, NJ, USA). A proteína Sm29 recombinante foi purificada em uma coluna de afinidade e dializada em PBS pH 7.0.

4.5- RT-PCR

Para a avaliação transcricional das vacinas de DNA, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/quimera utilizando-se o agente transfectante lipofectamina2000, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente extraiu-se o RNA total das células transfectadas e sintetizou-se a fita de DNA complementar a partir de tal molde. O cDNA obtido foi utilizado para o protocolo de rt-PCR.

Resumidamente, o protocolo de RT-PCR se encontra esquematizado na Figura 7.

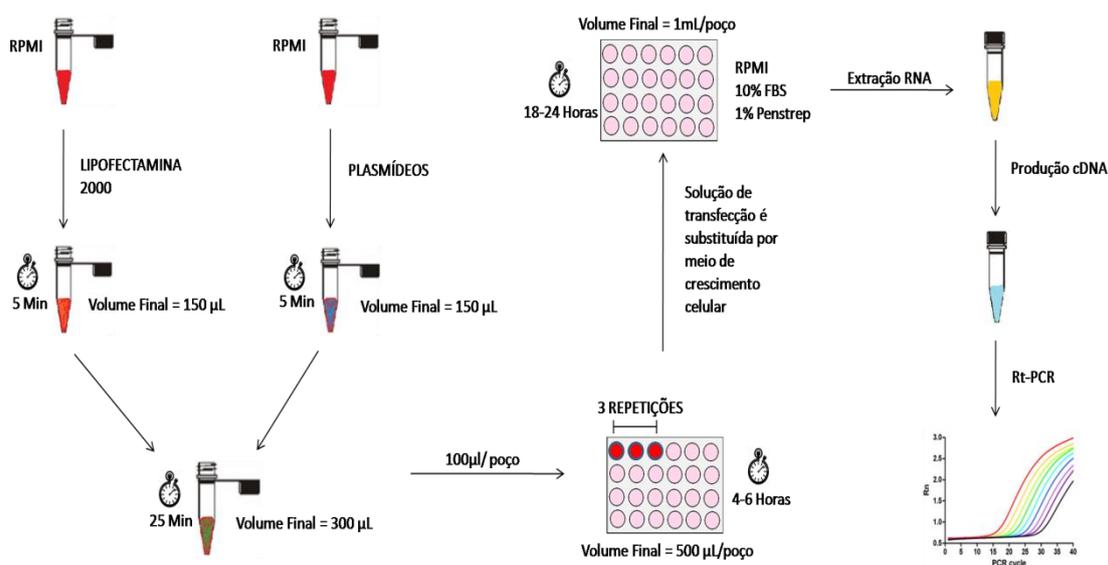


Figura 7 Protocolo para avaliação da transcrição gênica. Desenho esquemático do protocolo de transfecção celular. Plasmídeos pUMVC3 contendo as sequências das proteínas de interesse foram

utilizadas em conjunto com o agente transfectante LIPOFECTAMINA2000 para transfectar células BHK-21 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente extraiu-se RNA, o qual serviu de molde para a síntese de cDNA e posteriormente foi utilizado para quantificação do acúmulo de mRNA via RT-PCR.

4.5.1- Crescimento e Transfecção Celular

Células BHK-21 foram crescidas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (PenStrep), a uma temperatura de 37°C até atingir confluência igual ou equivalente a 80%. Posteriormente o meio foi substituído por RPMI contendo 0,5µg de cada plasmídeo emulsificado em lipofectamina, a uma proporção de 2:1, em triplicatas aos poços correspondentes como apresentado na Figura 8. Após 6 horas o meio transfectante foi substituído por meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (Penstrep) e armazenadas a 37°C para posterior utilização em ensaios de RT-PCR.

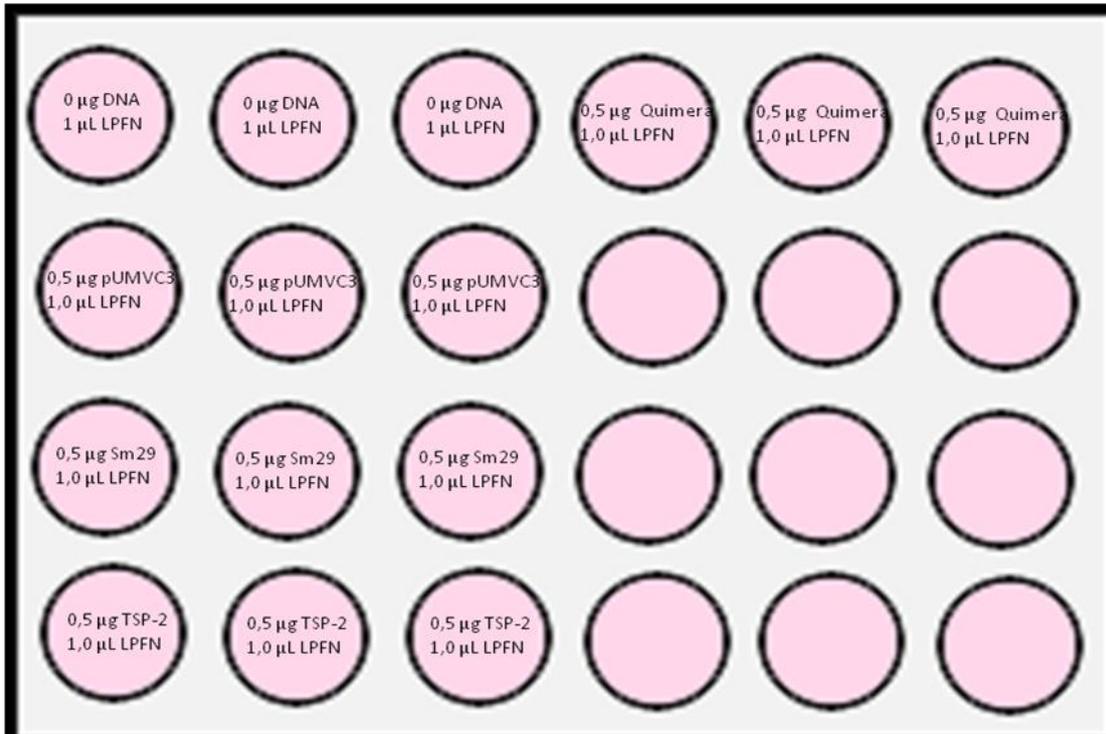


Figura 8 Esquema de transfecção celular. Desenho esquemático das concentrações de lipofectamina e plasmídeos para a transfecção celular.

4.5.2- Extração de RNA total

O RNA total foi obtido de células BHK-21 transfectadas com plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 +pUMVC3/TSP-2 através do kit Illustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi quantificado em nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

4.5.3- Síntese cDNA

A partir de uma quantidade de 1µg de RNA total molde produziu-se cDNA fita simples com o kit Illustra™ Ready-to-Go™ RT-PCR Beads (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.4- Escolha e Síntese dos Iniciadores

Iniciadores para a reação de RT-PCR foram desenhados através do programa PRIMER 3, processos de oligomerização ou dimerização foram analisados pelo programa OLIGO ANALYZER e possíveis ampliações inespecíficas foram verificadas através do programa PRIMER-BLAST(NCBI). Os primers escolhidos estão listados na Tabela 2.

	Sequência
Iniciador direto Sm29	5' CGGAATCCCCATAAACTTCC 3'
Iniciador reverso Sm29	5' CGGACAGCACTTTCTGGTTT 3'
Iniciador direto TSP-2	5' ACATCACAAGCGCACTGAAG 3'
Iniciador reverso TSP-2	5' CCCCCTCTTTAGAGCATGAA 3'
Iniciador direto Quimera	5' CCAAAGGACTATGGCGAAAA 3'
Iniciador reverso Quimera	5' GATGCTGACGCTAGTCACGA 3'

Tabela 1 Sequências de iniciadores para o procedimento de RT-PCR

4.5.5- Amplificação do cDNA

Para amplificação os cDNAs obtidos foram utilizados como material genético molde. Cada reação de RT-PCR realizada em triplicata foi constituída de 2µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 1µL de iniciador direto (10µM), 1µL de iniciador reverso (10µM) e 3µL de cDNA. As reações de amplificação foram conduzidas em equipamento ABI 7900 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. As reações que compreendem a faixa de 95%-105% de eficiência foram utilizadas aceitas para as análises posteriores.

Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500

System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi β -actina. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas.

4.6- Western blot

Para a detecção da Sm29, TSP-2 e da quimera proveniente da fusão de ambas, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/quimera utilizando-se o agente transfectante lipofectamina2000, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente extraíram-se as proteínas das células transfectadas, as quais foram corridas em gel de poliácridamida desnaturante e submetidas a análises de reconhecimento por anticorpos policlonais anti-Sm29 e anti-TSP-2. O protocolo se encontra esquematizado na Figura 9.

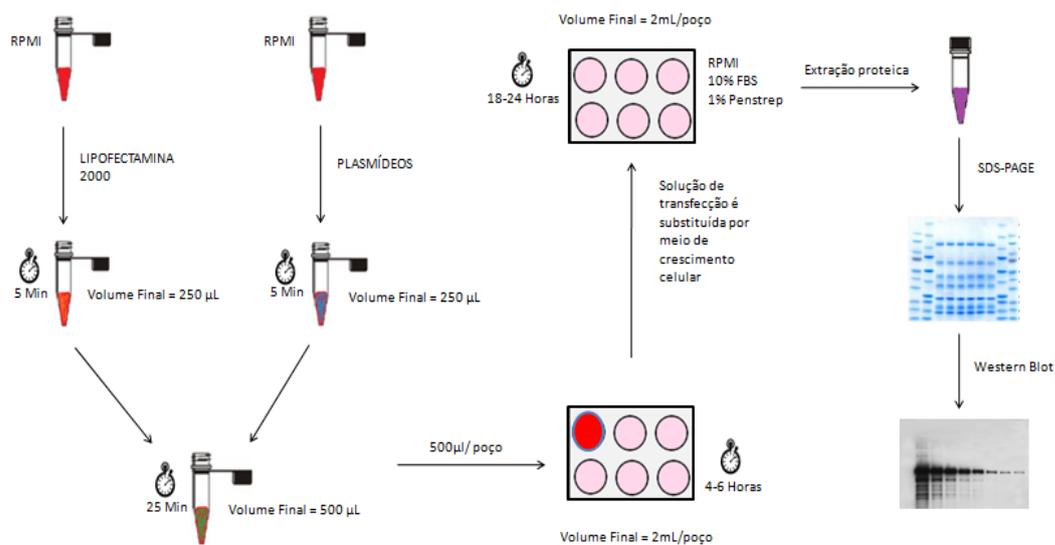


Figura 9 Protocolo para avaliação da expressão proteica. Desenho esquemático do protocolo de transfecção celular. Plasmídeos pUMVC3 contendo as sequências das proteínas de interesse foram

utilizadas em conjunto com o agente transfectante LIPOFECTAMINA2000 para transfectar células BHK-21 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente as proteínas totais foram extraídas e corridas em gel de poliacrilamida para posterior avaliação via western blot.

4.6.1- Transfecção celular

Células BHK-21 foram crescidas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (PenStrep), a uma temperatura de 37°C até atingir confluência igual ou equivalente a 80%. Posteriormente o meio foi substituído por RPMI contendo 1µg de cada plasmídeo emulsificado em lipofectamina, a uma proporção de 2:1. Após 6 horas o meio transfectante foi substituído por meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (Penstrep) e armazenadas a 37°C.

4.6.2- Extração Proteica

Proteínas totais foram extraídas utilizando-se o tampão de lise celular contendo 50mM de tris-HCl pH 7.4, 150mM de NaCl, 50mM de NaF, 10mM de β-Glicerofosfato, 0,1mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 1mM de ortovanadato de sódio e 1:100 de coquetel de inibidores de proteases (SIGMA, P8340). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas brevemente a 3000rpm para separar o sobrenadante dos debris celulares.

4.6.3- Western Blot

Para o ensaio de western blot, 20 µL de extrato proteico, obtido de acordo com a seção 4.5.2, foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida 15% e posteriormente transferidas a membrana de nitrocelulose e bloqueada overnight com PBST (tampão salina-fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20) e 5% de leite em pó desnatado. A membrana foi lavada durante 5 minutos por 3 vezes com PBST 0,05% e então incubou-se durante 60

minutos com soro de animais imunizados com as proteínas Sm29 e TSP-2 na diluição 1:200 contra as proteínas Sm29 e TSP-2, respectivamente. A membrana foi lavada novamente durante 5 minutos por três vezes com PBST 0,05% e incubada com anti-IgG total conjugado a HRP 1:2000 (Promega) por aproximadamente 60 minutos. Após nova lavagem em PBST 0,05% durante 5 minutos por 3 vezes, a membrana foi incubada durante 45 minutos em 2mL de reagente quimioluminescente da enzima HRP (MILLIPORE) conjugada ao anticorpo secundário. A reação foi analisada no aparelho STORM (GE Healthcare).

4.7- Imunização e infecção

Fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram divididas em grupos de dez animais cada. Cada animal recebeu 50µL de cardiotoxina (Sigma, Sant Louis, MO) a uma concentração de 10µM cinco dias antes da primeira imunização em cada músculo quadríceps. Cada animal foi imunizado com 50µL de solução PBS contendo plasmídeos a uma concentração de 1µg/µL em cada músculo quadríceps, o que equivale a 100µg de plasmídeo por animal, nos dias 0, 15, 30 e 45. Os grupos foram divididos em animais sendo imunizados com pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e o último grupo recebendo a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2. Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram anestesiados com quetamina 5%, xilazina 2% e NaCl 0,9% diluídos em água para injeção e desafiados através de exposição percutânea da pele abdominal por uma hora em água contendo 100 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE).

4.8- Análise da carga parasitária

Quarenta e cinco dias após a infecção, os vermes adultos foram recuperados através de perfusão da veia porta (Fonseca *et al.*, 2004 e Pacífico *et al.*, 2006) e o nível de proteção foi calculado comparando-se o número total de vermes recuperados de cada grupo em relação

ao grupo imunizado com o plasmídeo pUMVC3. A porcentagem de proteção foi calculada utilizando-se da seguinte fórmula:

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

4.9- Contagem de ovos do *S. mansoni* retidos no Fígado

Quarenta e cinco dias após a quarta imunização, todos os animais imunizados foram sacrificados e os fígados foram coletados. O lobo direito do fígado foi coletado e digerido com KOH à 5%. Cada fígado ficou submerso em 30mL de solução de lise contendo 5% de KOH por aproximadamente 16 horas. O material foi então centrifugado a 2400rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado três vezes com 30mL de solução salina estéril e centrifugado a 2400rpm durante cinco minutos. Ao final de todo o procedimento, adicionou-se 5mL de formol tamponado pH6,6 à 10%. A contagem de ovos foi realizada em quaduplicata em microscópio ótico (Olympus CX31) e o valor total foi apresentado como média de ovos por grama de fígado.

4.10- Análise de anticorpos anti-Sm29

Soro sanguíneo foi obtido em intervalos de 15 dias entre as imunizações e durante o período da infecção e armazenados a -20°C. A dosagem de anticorpos foi realizada pelo método de ELISA indireta. Microplacas Maxisorp de 96 poços (NUNC, Dinamarca) foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução a 25µg/mL de proteína Sm29 recombinante em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 a 4°C por 12 a 16 horas. As placas foram lavadas 3x com PBST (tampão salina-fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20) e posteriormente bloqueadas com 200µL/poço de PBST suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) a

temperatura ambiente por 2 horas. Após nova lavagem de 3x com PBST, adicionou-se 100µL/poço de cada soro a uma diluição 1:100 e manteve-se a temperatura ambiente durante 1 hora. As placas foram então lavadas 3x com PBST e adicionou-se 100µL/poço de anti-IgG mouse conjugado a peroxidase a uma diluição 1:5000 e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. As placas foram novamente lavadas 3x com PBST e a reação colorimétrica realizou-se pela adição de 100µL/poço de 200 pmoles de OPD (o-phenylenediamina, Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato, pH 5,0, e adicionado de 0,04% de H₂O₂, por 20 minutos. A reação foi parada pela adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico a 5%. A reação foi lida a 492nm em uma leitora de ELISA Multscan FC (Thermo Science).

4.11- Análise de citocinas

Esplenócitos foram isolados do baço de camundongos vacinados 10 dias após a quarta imunização com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2 e tratados com tampão acetato de potássio pH 7,2 (NH₄Cl 4,15 g 155mM, KHCO₃ 0,5g 10mM ,q.s.p. 500 mL) e lavados com salina estéril 3 vezes. Após lavados, os esplenócitos foram plaqueados em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor, 100U/mL de sódio penicilina G e 100µg/mL de sulfato de estreptomicina, a uma concentração de 1x10⁶ células/poço para análises de IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5 e IL-10. Os esplenócitos foram mantidos em cultura estimuladas somente com meio, ou rSm29 (5µg/poço), ou proteína quimérica recombinante proveniente da fusão de Sm29 com tetraspanina-2 (5µg/poço), ou Concanavalina A (ConA)(5µg/mL) ou LPS proveniente de *E. coli* (5µg/mL). Microplacas de 96 poços (Nunc) contendo os esplenócitos e correspondentes estímulos foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As culturas de sobrenadante foram coletadas após 24 horas de estímulo para análises de IL-4 e IL-5, após 48 horas de estímulo para análises de TNF-α e 72 horas

para análise de IFN- γ e IL-10. A análise de todas as citocinas foram realizadas através do kit ELISA Duoset (R&D Diagnostic) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

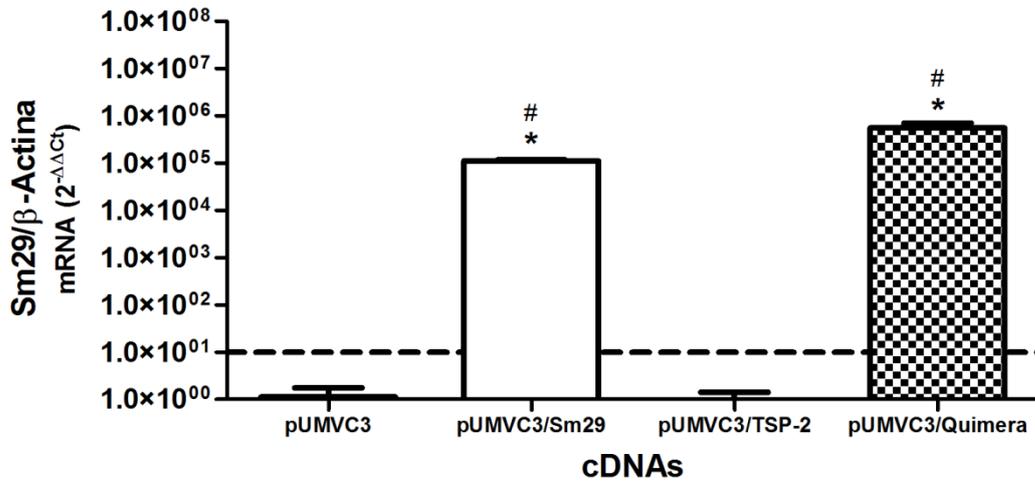
5- RESULTADOS

5.1- Avaliação transcricional das vacinas de DNA

Visando avaliar a capacidade transcricional das vacinas de DNA in vitro, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Quimera. RNA total foi extraído das células e utilizado para a síntese de cDNA, o qual foi utilizado posteriormente para avaliação transcricional pela metodologia de PCR em tempo real. Para a metodologia de PCR em tempo real foram desenhados conjuntos de primers que amplificam regiões específicas das sequências das proteínas Sm29, TSP-2 e uma dupla de primers que amplificam a região presente no plasmídeo pUMVC3/Quimera que corresponde a parte da Sm29 e parte da TSP-2. Os resultados provenientes da avaliação transcricional por PCR em tempo real se encontram representados na Figura 10.

A

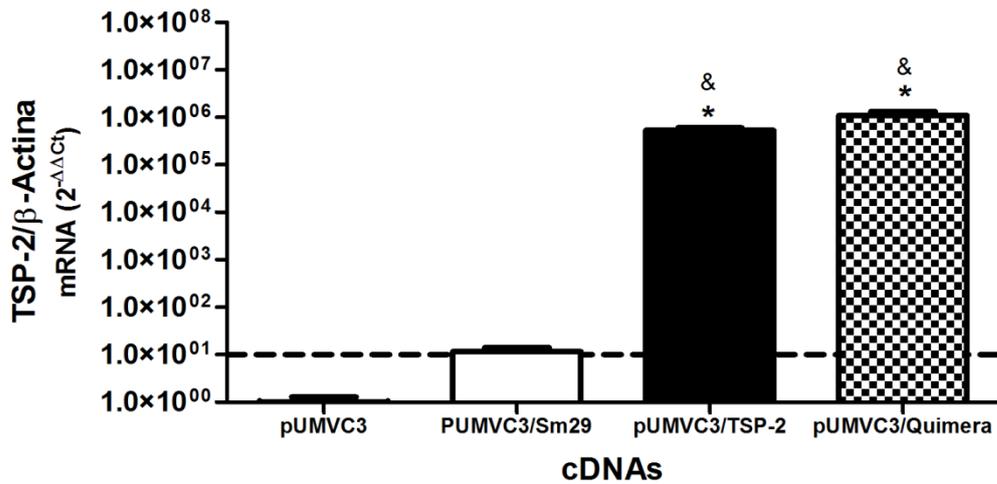
Sm 29 primers



* p<0,05 em relação ao grupo pUMVC3
p<0,05 em relação ao grupo pUMVC3/TSP-2

B

TSP-2 Primers



* p<0,05 em relação ao grupo pUMVC3
& p<0,05 em relação ao grupo pUMVC3/Sm29

C

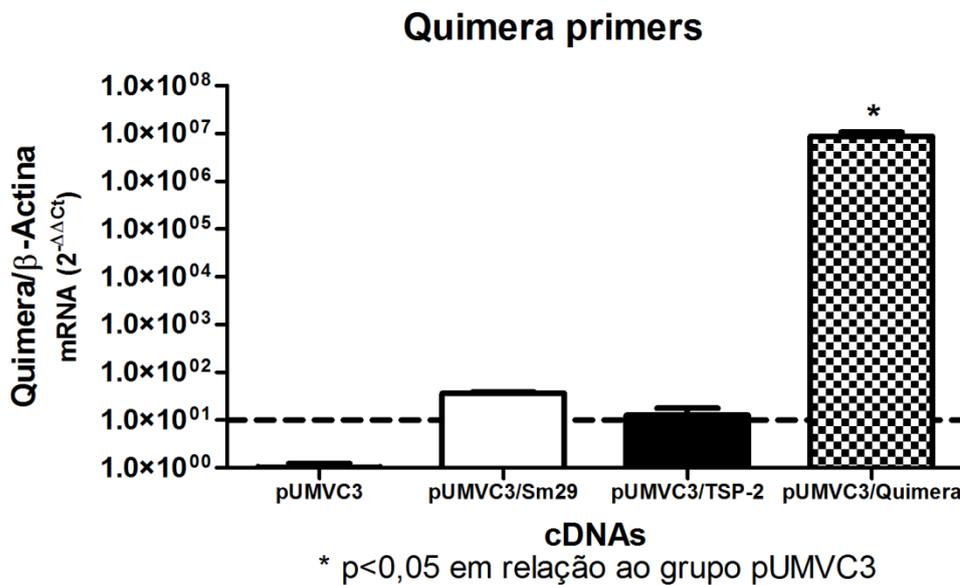


Figura 10 Avaliação transcricional das vacinas de DNA. (A) Resultado da amplificação proveniente de cDNA células transfectadas com todos os plasmídeos e com primers desenhados para a sequência de Sm29. (B) Resultado da amplificação proveniente de cDNA células transfectadas com todos os plasmídeos e com primers desenhados para a sequência de TSP-2. (C) Resultado da amplificação proveniente de cDNA células transfectadas com todos os plasmídeos e com primers desenhados para a sequência da quimera.

Quando utilizados os primers para Sm29, somente o cDNA proveniente das células transfectadas com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Quimera foi amplificado (Figura 10A). Os primers para TSP-2 só amplificaram cDNAs provenientes das células transfectadas com pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Quimera (Figura 10B) e os primers para Quimera só foram capazes de amplificar o cDNA obtido de células transfectadas com pUMVC3/Quimera (Figura 10C).

5.2- Detecção de Sm29, TSP-2 e quimera em células BHK-21 transfectadas

Células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Quimera e as proteínas totais foram extraídas e corridas em gel desnaturante de

poliacrilamida. Visando avaliar a expressão protéica das vacinas de DNA, realizou-se western blot com soros contendo anticorpos policlonais contra as proteínas Sm29 e TSP-2 e os resultados são apresentados na Figuras 11 e na Figura 12.

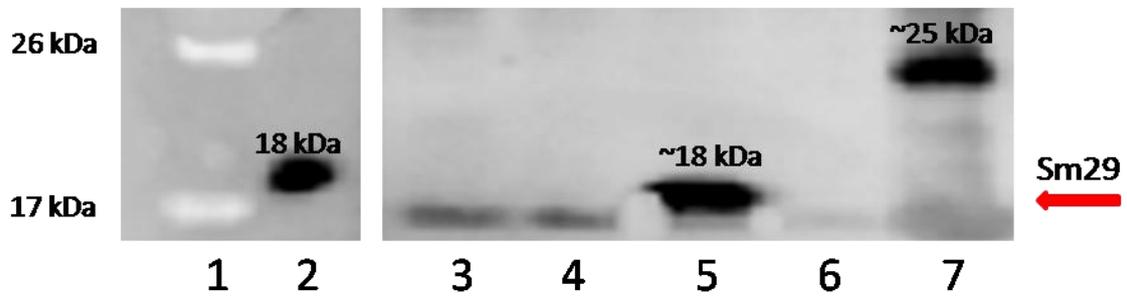
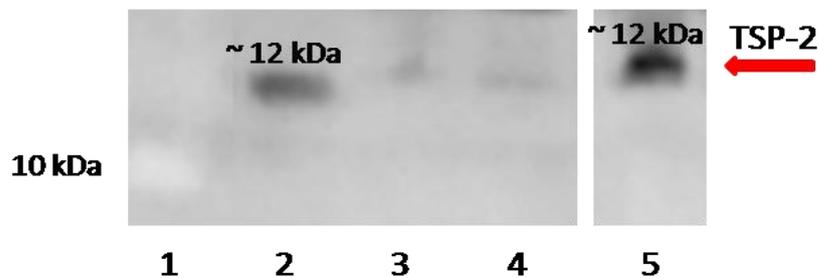


Figura 11 Avaliação da expressão protéica in vitro das vacinas de DNA por westernblot utilizando anticorpos policlonais anti-Sm29. (1) Padrão de peso molecular, (2) Sm29 recombinante, (3) Células BHK-21 não transfectadas, (4) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3, (5) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/Sm29, (6) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/TSP-2 e (7) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/Quimera



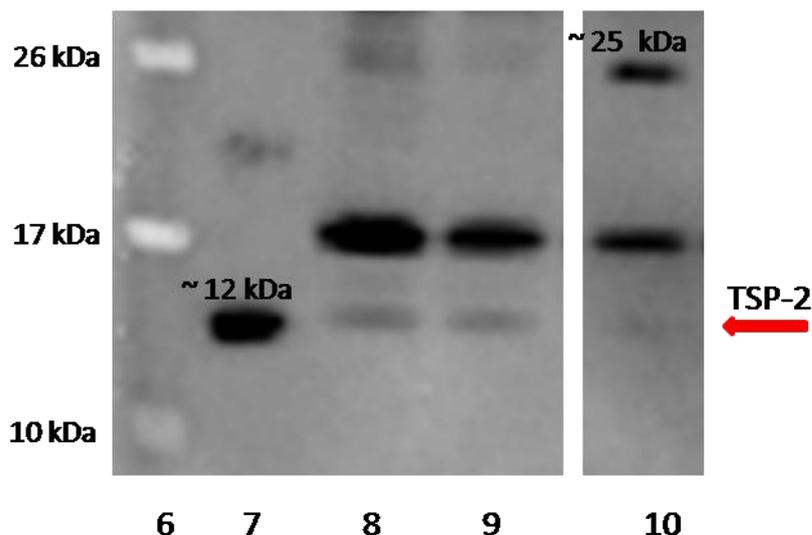


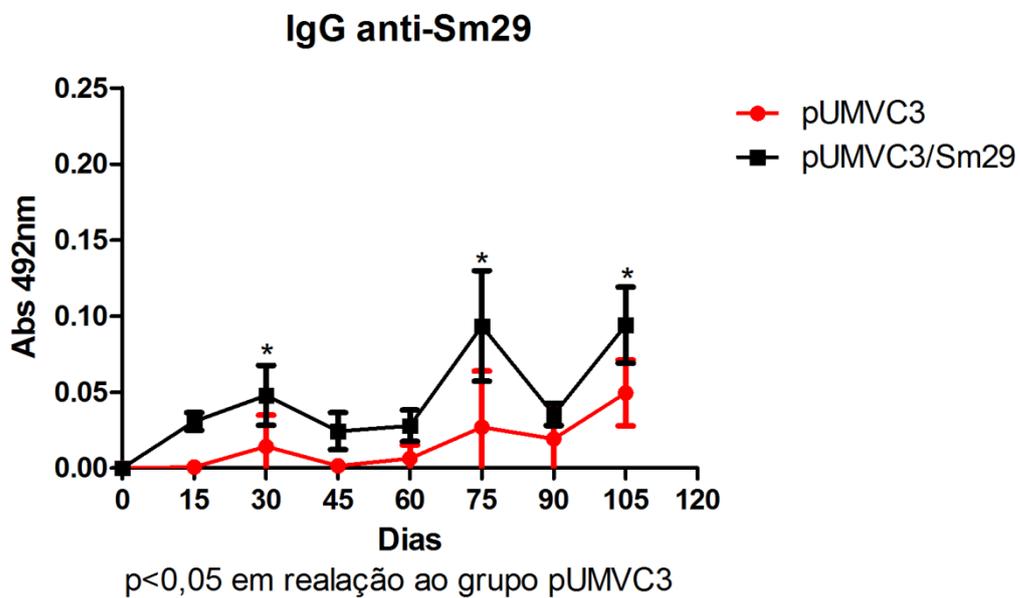
Figura 12 Avaliação da expressão protéica in vitro das vacinas de DNA por western blot utilizando anticorpos policlonais anti-TSP-2. (1) Padrão de peso molecular, (2) TSP-2 recombinante, (3) Células BHK-21 não transfectadas, (4) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3, (5) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/TSP-2, (6) Padrão de peso molecular, (7) TSP-2 recombinante, (8) Células BHK-21 não transfectadas, (9) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3 e (10) Células BHK-21 transfectadas com pUMVC3/Quimera.

Quando utilizamos anticorpos policlonais anti-Sm29 observamos a presença de bandas de aproximadamente 18kDa e 25kDa nos extratos protéicos obtidos de células transfectadas com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Quimera respectivamente. Similarmente, quando anticorpos policlonais anti-TSP-2 foram utilizados, somente os extratos das células transfectadas com pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Quimera apresentaram bandas características com 12kDa e 25kDa, respectivamente. Os pesos moleculares de 18kDa e 12kDa correspondem aos pesos das proteínas recombinantes Sm29 e TSP-2, respectivamente. Uma proteína de aproximadamente 25kDa foi reconhecida especificamente por soro anti-Sm29 e anti-TSP-2 nos extratos protéicos de células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/Quimera, o que nos permite dizer que a banda corresponde a proteína quimérica proveniente da fusão entre Sm29 e TSP-2.

5.3- Anticorpos anti-Sm29

Anticorpos anti-Sm29 foram dosados pelo método de ELISA indireto de amostras coletadas dos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Quimera, e pUMVC3, o qual foi nosso grupo controle. As amostras foram coletadas em intervalos de 15 dias e os níveis de IgG foram avaliados, e os resultados se encontram na Figura 13A e 13B.

A



B

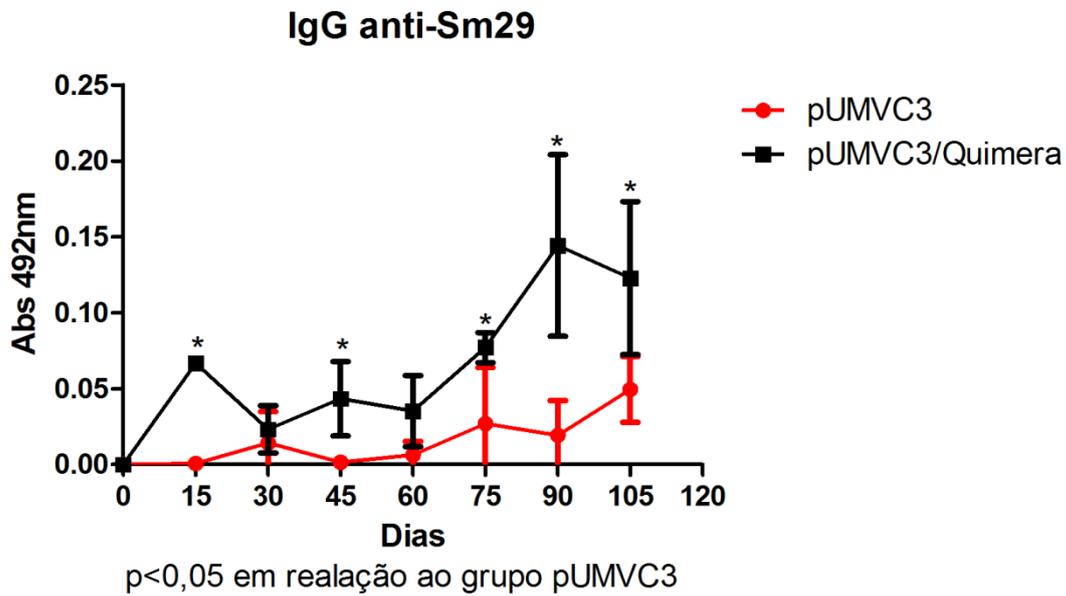


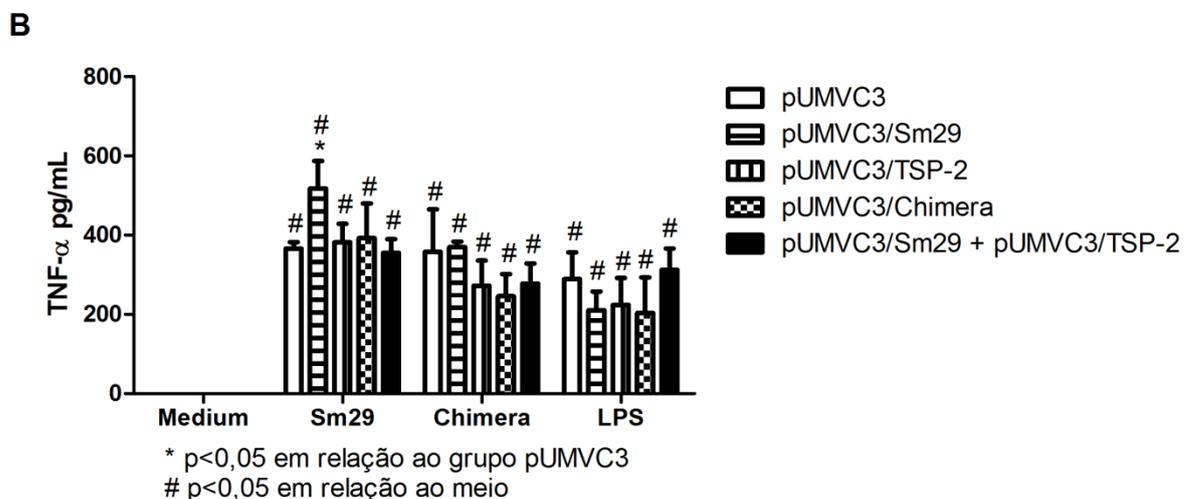
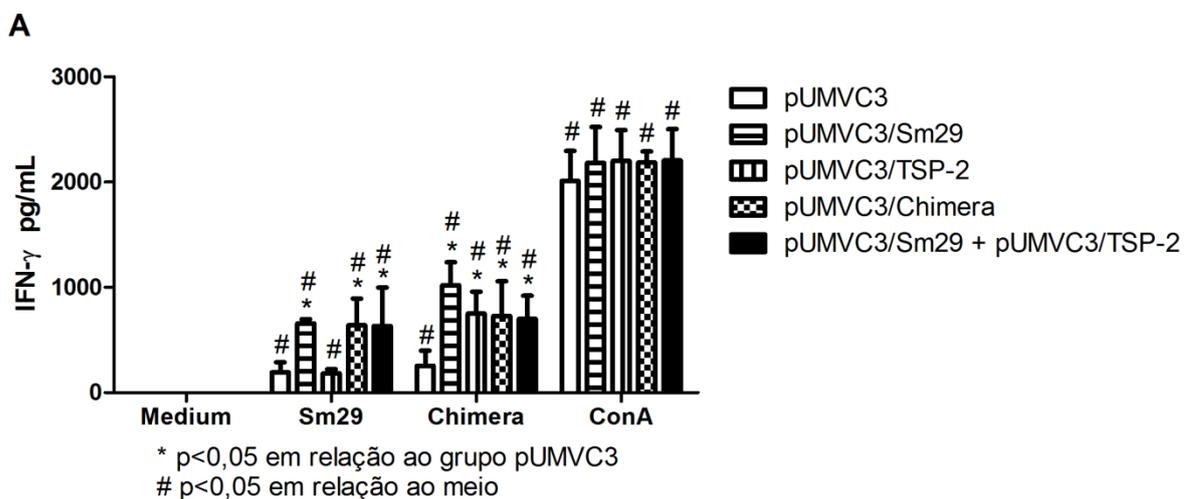
Figura 13 Níveis de anticorpos anti-Sm29. Média \pm DP de anticorpos anti-Sm29 dos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Sm29 (A) e pUMVC3/Quimera (B) comparados ao grupo controle pUMVC3.

Pode-se observar uma baixa produção de anticorpos anti-Sm29 nos grupos vacinados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/quimera. Porém, mesmo com os baixos títulos, esses níveis foram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle pUMVC3, o que demonstra que os animais foram imunizados de maneira eficiente.

Não utilizamos a proteína TSP-2 como antígeno nos ensaios de ELISA para dosagem de anticorpos, pois não tínhamos essa molécula recombinante à nossa disposição.

5.4- Perfil de citocinas

Coletou-se esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera, pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3, dez dias após a quarta imunização ou 45 dias após à infecção, e essas células foram cultivados em placas de 96 poços estimulados com meio, quimera recombinante, Sm29 recombinante, Concanavalina A ou LPS em períodos de 24, 48 ou 72 horas. O sobrenadante proveniente das culturas de esplenócitos foram coletados e as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 foram dosadas pelo método de ELISA indireto, e os resultados são apresentados na Figura 14 e Figura 15.



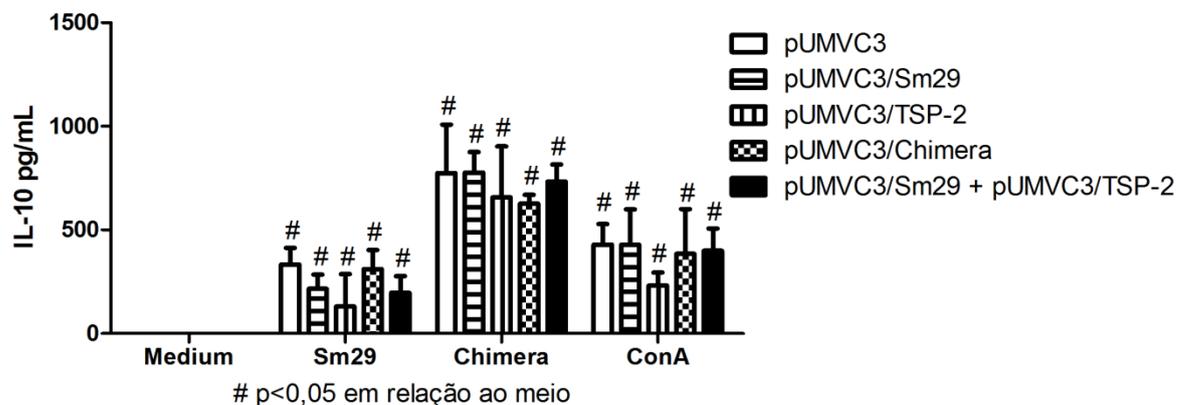
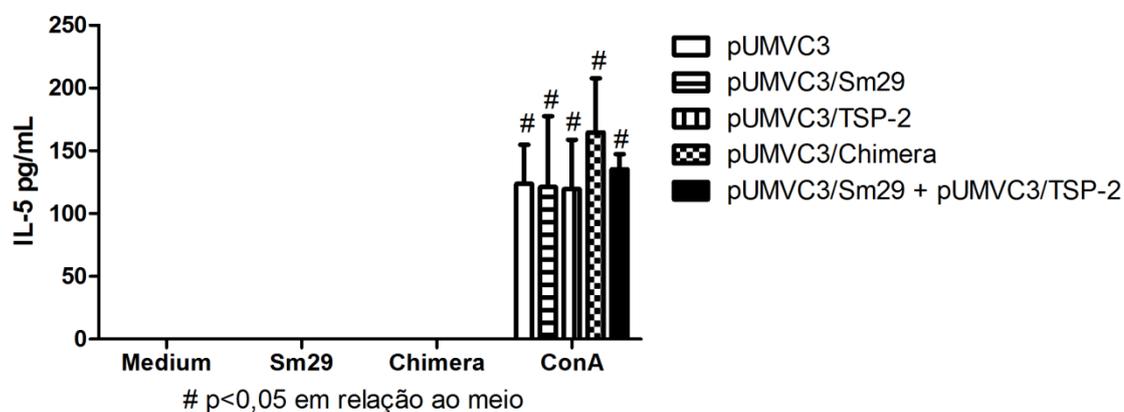
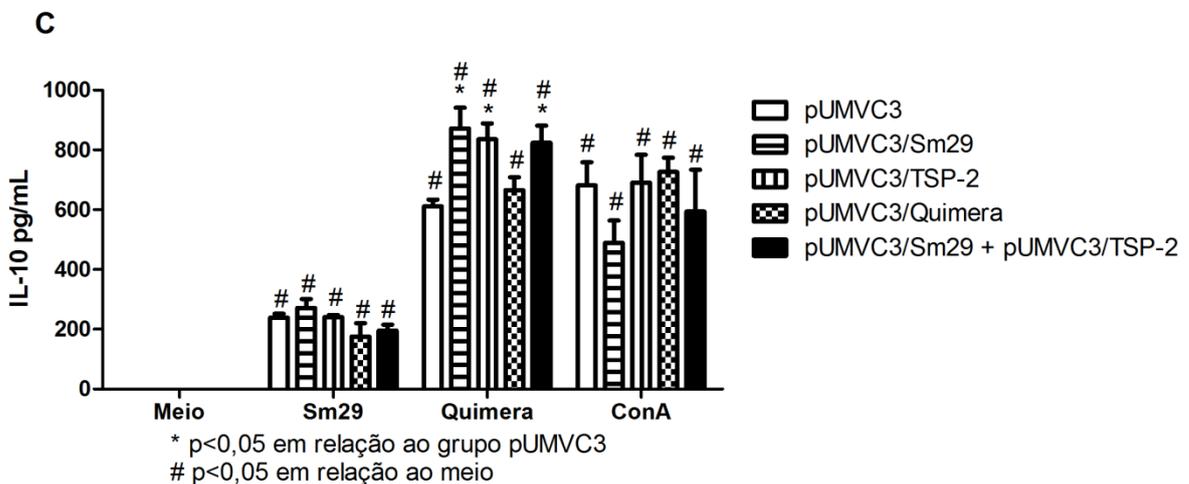
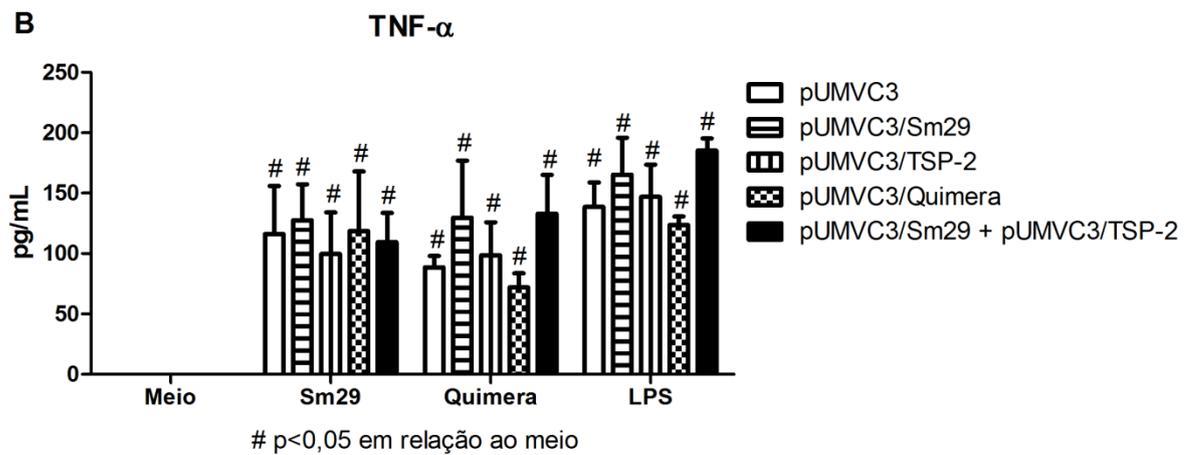
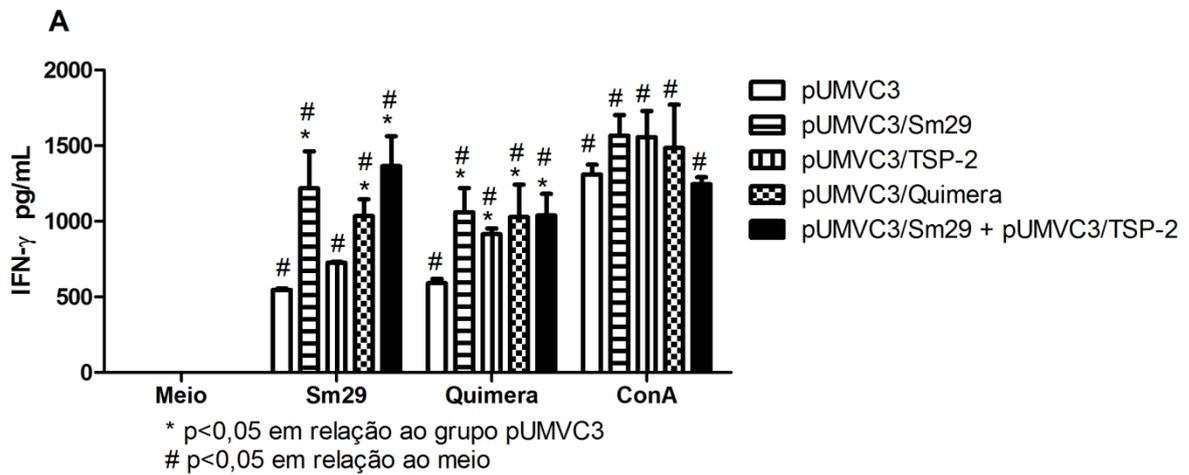
C**D**

Figura 14 Produção de citocinas após imunização. Média \pm DP de citocinas produzidas por esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2. Os esplenócitos foram estimulados com meio (controle) ou Sm29r, ou Quimera recombinante, ou ConA ou LPS.

Quando avaliada a produção de citocinas por esplenócitos dos animais imunizados, percebemos aumento significativo na produção de IFN- γ nas células dos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3 quando estimulados com Sm29r e nas células de todos os animais imunizados com a quimera recombinante. Somente as células dos animais imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Sm29 quando estimulados com Sm29r apresentaram um aumento significativo na produção de TNF- α quando comparado ao grupo controle. Obtivemos produção significativa

de IL-10 somente nos animais imunizados com pUMVC3/Quimera quando estimulados com quimera recombinante. Nenhuma produção significativa de IL-5 foi percebida em nenhum dos grupos avaliados.



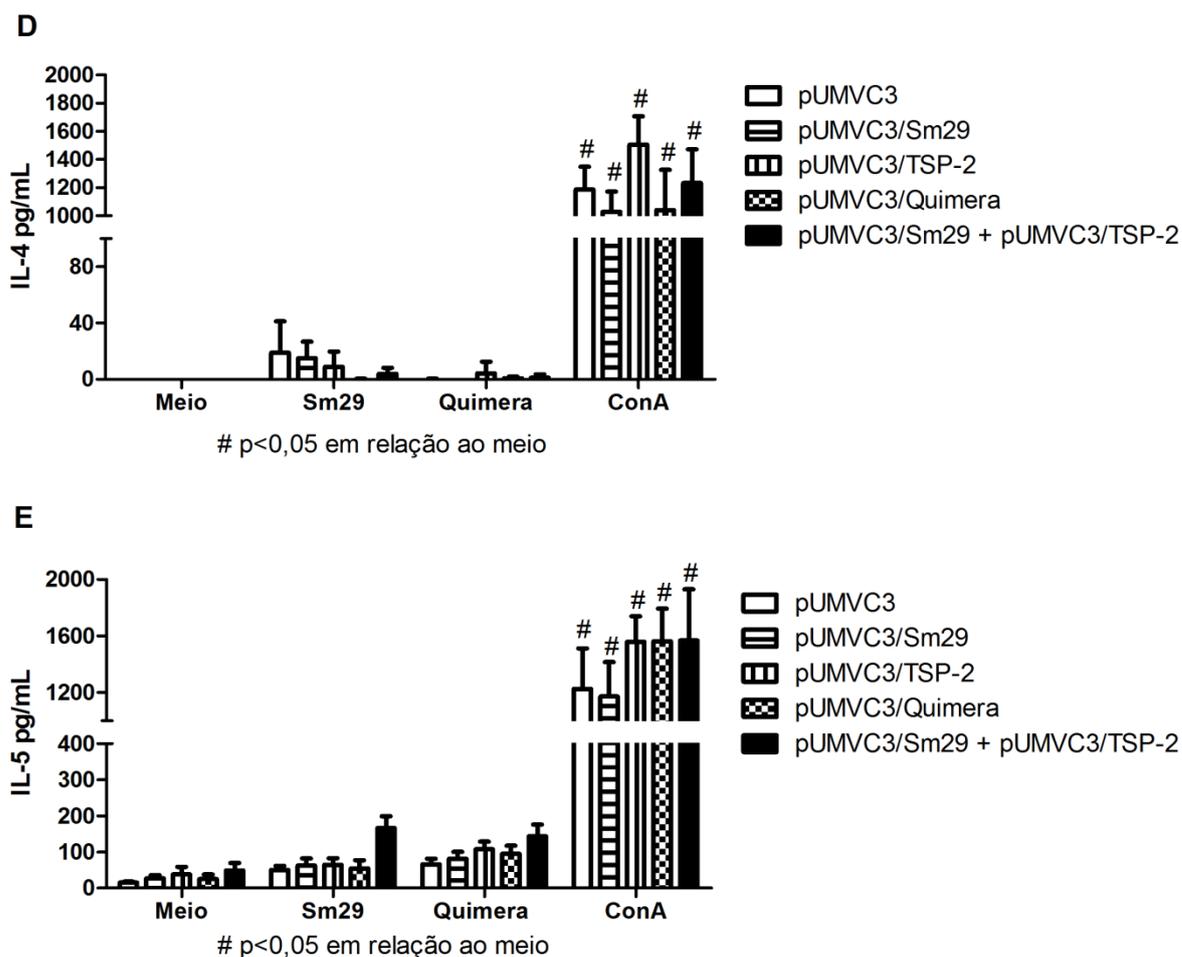


Figura 15 Produção de citocinas após imunização e infecção. Média \pm DP de citocinas produzidas por esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 e posteriormente desafiados com 100 cercárias durante 45 dias. Os esplenócitos foram estimulados com meio (controle) ou Sm29r, ou Quimera recombinante, ou ConA ou LPS.

Nos esplenócitos dos animais que foram imunizados e posteriormente desafiados, percebemos produção significativa de IFN- γ por todos os grupos imunizados quando estimulados com quimera recombinante, e pelos grupos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2 quando estimulados com Sm29r. Nenhuma diferença

significativa nos níveis de produção de TNF- α , IL-4 ou IL-5 foram percebidas em nenhum dos grupos imunizados.

As vacinas de DNA induziram um perfil imunológico Th1, com elevada produção de IFN- γ e TNF- α . A produção elevada das citocinas IFN- γ e TNF- α pode estar relacionada a uma resposta imune protetora contra *S. mansoni*, visto que, animais deficientes em tais citocinas apresentam menores índices de proteção quando imunizados com cercárias irradiadas (Jankovick *et al.*, 1999; Street *et al.*, 1999).

5.5- Carga parasitária recuperada

Quarenta e cinco dias após a última imunização, todos os animais infectados foram sacrificados e os vermes presentes nas veias mesentéricas intestinais foram recuperados pelo método de perfusão da veia porta hepática. Os resultados dos vermes recuperados encontram-se na Figura 16.

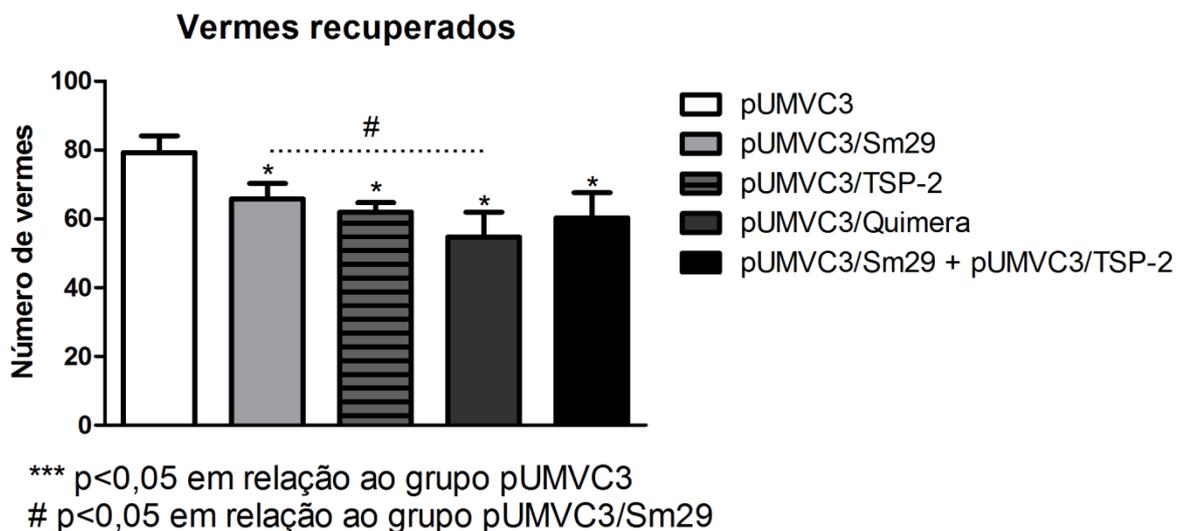


Figura 16 Vermes recuperados. Média \pm DP de vermes recuperados das veias mesentéricas de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2.

Todos os grupos de animais imunizados apresentaram níveis de redução de vermes significantes quando comparados ao grupo controle, sendo que os níveis de proteção foram 17,0%, 21,9%, 31% e 24% para os animais imunizados com pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2, respectivamente. As porcentagem de proteção estão representadas na Tabela 2.

Candidato	Vermes recuperados ± DP	Porcentagem de Proteção
pUMVC3	79,3± 4,8	-
pUMVC3/Sm29	65,8± 4,5	17,0 *
pUMVC3/TSP-2	61,9± 2,8	21,9 *
pUMVC3/Quimera	54,7± 5,8	31,0 *#
pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2	60,3± 5,8	24,0 *

*p<0,05 em relação ao grupo pUMVC3

#p<0,05 em relação ao grupo pUMVC3/Sm29

Tabela 2 Número de vermes recuperados e porcentagens de proteção. Número de vermes recuperados e porcentagens de proteção de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2.

Quando utilizados separadamente, os plasmídeos contendo as sequências de Sm29 e TSP-2 apresentam menores índices de proteção em relação aos animais que foram imunizados com o plasmídeo contendo a sequência quimérica ou quando administradas conjuntamente. Quando avaliados os níveis de proteção, os animais que foram imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Quimera apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de animais que foi imunizado exclusivamente com o plasmídeo pUMVC3/Sm29, o que demonstra o

potencial da utilização de proteínas quiméricas como forma de potencializar uma resposta imunológica.

5.6- Contagem de ovos no fígado

Quarenta e cinco dias após a quarta imunização todos os animais infectados foram sacrificados e coletaram-se os fígados para posterior contagem de ovos de *S. mansoni*. Os números de ovos encontrados estão representados na Figura 17.

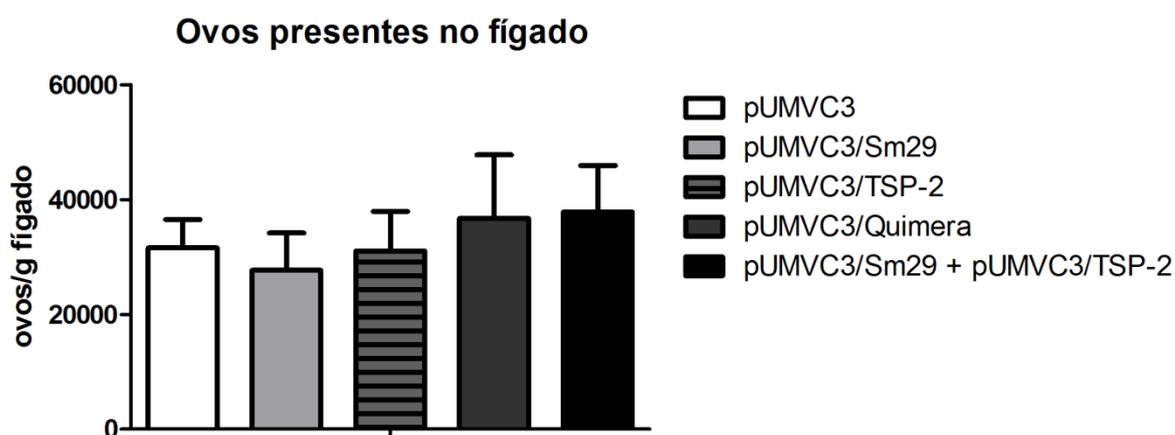


Figura 17 Número de ovos presentes no fígado. Média \pm DP de ovos presentes no fígado de animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3, pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e a mistura dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2.

Nenhum dos animais imunizados apresentaram redução significativa na contagem de ovos presentes no fígado quando comparados ao grupo controle pUMVC3. Porém, análises histopatológicas ainda estão em andamento.

6- DISCUSSÃO

Uma resposta eficiente contra a esquistossomose mansônica parece envolver uma efetiva resposta imune humoral e celular (Jankovick *et al.*,1999; Oliveira *et al.*, 2008). Vacinas de DNA apresentam a capacidade de ativar esses dois componentes da resposta imune do hospedeiro. Ademais, as vacinas de DNA têm a capacidade de produzir proteínas com conformações mais complexas, além do que, são de fácil produção, relativamente baratas e de fácil distribuição visto a alta estabilidade (Gurunathan *et al.*, 2000; Liu., 2003; Liu.,2011). Tal afirmativa se reflete nos resultados promissores apresentados com várias proteínas do *S. mansoni* testadas como vacinas de DNA, como por exemplo, Sm-p80, Smfimbria em conjunto com Sm21.7, Cu/Zn superóxido dismutase e filamina, as quais apresentaram 59%, 56%, 44-60% e 44-57% na redução de contagem de vermes, respectivamente (Shalaby *et al.*,2003; Cook *et al.*,2004; Romeih *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*,2009; Pinheiro *et al.*,2011). Portanto, a estratégia de vacinação com DNA se apresenta como metodologia promissora para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose mansônica.

Os maiores níveis de proteção alcançados contra a esquistossomose foram obtidos através da imunização com cercárias irradiadas, e o processo imunológico basicamente parece ocorrer na região pulmonar contra esquistossômulos migrantes (Wilson *et al.*,1996; Jankovick *et al.*,1999). Visto que as proteínas Sm29 e Tetraspanina-2 (TSP-2) se encontram preferencialmente no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos (Cardoso., *et al.*,2006a; Cardoso., *et al.*,2006b; Tran *et al.*,2006; Cardoso., *et al.*,2008) e os resultados promissores apresentados por essas moléculas como vacinas recombinantes (Tran *et al.*,2006; Cardoso., *et al.*,2008), tais proteínas são consideradas como potentes candidatos vacinais. E neste trabalho, avaliamos o potencial protetor de vacinas de DNA contendo as sequências correspondentes as proteínas Sm29, TSP-2 e a quimera proveniente da fusão de ambas.

Visando avaliar a capacidade de nossas vacinas de DNA produzirem os antígenos de interesse, transfectamos células BHK-21 e avaliamos a capacidade transcricional e de expressão protéica de nossas construções. Para a avaliação transcricional, extraímos o RNA total das células transfectadas e sintetizamos o cDNA, o qual foi utilizado posteriormente para a avaliação de acúmulo de mRNA por RT-PCR, e o que observamos foi a expressão significativa de Sm29, TSP-2 e quimera nas células transfectadas com pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2 e pUMVC3/Quimera quando utilizamos primers específicos para Sm29, TSP-2 e a região quimérica, respectivamente.

Para a avaliação da produção das proteínas, células BHK-21 foram transfectadas e o extrato protéico total foi coletado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida para posterior avaliação através do western blot. Os resultados demonstram que quando utilizamos soro anti-Sm29, detectamos uma banda com o mesmo tamanho característico da proteína recombinante de 18kDa somente nas células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/Sm29. Quando testamos o soro anti-TSP-2, detectamos uma banda característica com peso aproximado ao da proteína recombinante de 12kDa somente nas células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/TSP2. E quando avaliamos o extrato protéico das células transfectadas com o plasmídeo pUMVC3/Quimera, detectamos uma banda característica de aproximadamente 25KDa quando utilizamos tanto o soro anti-Sm29 quanto o soro anti-TSP-2, correspondente a quimera proveniente da fusão entre Sm29 e TSP-2. Tais resultados, conjuntamente aos resultados de transcrição gênica, demonstram que as vacinas de DNA testadas nesse estudo expressam o antígeno alvo.

Várias proteínas já foram avaliadas como candidatos vacinais e quando administradas como vacinas de DNA, algumas conseguem demonstrar níveis de redução de vermes acima de 50% em ensaios pré-clínicos, como por exemplo, Filamina, Cu/Zn superóxido dismutase e Sm-p80, sendo esta última, a indutora dos maiores índices de proteção (59% na redução de vermes e 84% de redução na contagem de ovos no fígado) (Shalaby *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2009a; Pinheiro *et al.*, 2011). Porém, quando avaliada em primatas

não humanos (*Papio anubis*), o potencial de tal candidato caiu para 38% de redução na contagem de vermes e 32% de redução na contagem de ovos presentes no fígado, o que torna necessário o desenvolvimento de novas estratégias vacinais que superem o baixo índice de proteção (Ahmad *et al.*,2009b). Nossos estudos demonstraram que as vacinas de DNA pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e a administração conjunta dos plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2 foram capazes de alcançar 17%, 21,9%, 31% e 24% de redução na contagem de vermes, respectivamente. Quando avaliados os níveis de proteção entre os grupos imunizados, percebemos uma diferença estatisticamente significativa entre os animais que foram imunizados com o plasmídeo pUMVC3/Quimera em relação aos que foram imunizados com pUMVC3/Sm29, o que demonstra que a utilização da proteína quimérica foi capaz de aumentar os níveis de proteção quando comparada a Sm29 sozinha.

Quando avaliados os níveis de anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados, percebemos uma baixa produção de anticorpos anti-Sm29 nos animais que foram imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/quimera, porém, tais níveis foram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, o que demonstra que os animais foram imunizados de maneira eficiente. Tal inabilidade de gerar uma resposta humoral elevada é diferente dos resultados obtidos por Cardoso e colaboradores em 2008, os quais demonstram a capacidade de tal proteína, quando administrada em sua forma recombinante, induzir um aumento significativo de anticorpos anti-Sm29 (Cardoso *et al.*,2008). Especulamos que a ineficiência de nossas vacinas de DNA em gerarem uma resposta humoral efetiva se encontre na dificuldade das proteínas heterólogas produzidas serem enviadas a membrana plasmática ou excretadas para o meio extracelular, uma vez visto que tais proteínas são de relativamente difícil solubilidade, o que impossibilitaria a interação com os receptores presentes nos linfócitos B. A adição de um peptídeo sinal poderia aumentar a capacidade de nossas vacinas de DNA gerarem uma resposta humoral eficiente (Gurunathan *et al.*,2000).

As vacinas de DNA testadas neste estudo induziram uma resposta imunológica de perfil Th1, o que foi demonstrado pela elevada produção de IFN- γ e TNF- α e nenhuma produção significativa de IL-4 e/ou IL-5. Tais dados se encontram em concordância com os resultados obtidos por Cardoso e colaboradores, em 2008, quando a proteína Sm29 recombinante foi avaliada como candidato vacinal e apresentou basicamente as mesmas características da resposta imunológica de perfil Th1 (Cardoso *et al.*, 2008). Em relação a proteína TSP-2, nenhum relato de avaliação da produção de citocinas por animais imunizados com tal proteína se encontram disponíveis. Vários fatores podem estar relacionados a indução da resposta Th1 nas vacinas de DNA testadas nesse estudo. Acreditamos que a presença de motivos CpG não metilados em nossos plasmídeos podem ter contribuído com tal resposta, visto que essas sequências não metiladas tem a capacidade de induzirem a liberação de citocinas pró-inflamatórias Th1, interferons e quimiocinas através de mecanismos mediados pela ativação de receptores *TL-9* (Hemmi *et al.*, 2000; Krieg, 2002). Outro fator importante que pode ter contribuído com a capacidade de gerar tal perfil de resposta imunológica é a escolha da rota de administração via intramuscular, a qual vem sendo demonstrada como indutora de respostas de perfil Th1 (Faurez *et al.*, 2010).

Vários estudos utilizando proteínas recombinantes ou a metodologia por vacinação de DNA vêm apresentando resultados relacionando o perfil Th1 com uma imunidade protetora contra esquistossomose mansônica, como exemplo, podemos citar os trabalhos envolvendo as proteínas Sm-p80, Sm29, *Stomatin like protein-2* e rP22, as quais apresentaram níveis elevados de proteção e esses resultados foram associados ao aumento na produção do IFN- γ e do TNF- α (Cardoso *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2009; Farias *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Rezende *et al.*, 2011). Trabalhos realizados com a proteína Sm23 demonstram uma possível relação entre imunidade protetora e o perfil Th1, pois quando administrada como vacina de DNA, apresenta um perfil Th1 e consegue níveis de proteção de 21-44%, porém, quando administrada em estratégia de *Prime-boost* (DNA-proteína) observa-se uma polarização para uma resposta Th2 e nenhum nível de proteção foi obtido (Da'dara *et*

al.,2002; Da'dara *et al.*,2003). Estudos imunizando camundongos deficientes para IFN- γ e TNF- α com cercárias irradiadas também correlacionam uma resposta imune protetora com o perfil Th1 de produção de citocinas (Smythies *et al.*, 1992; Wilson *et al.*,1996; Jankovick *et al.*,1999; Street *et al.*, 1999).

O envolvimento do IFN- γ na imunidade protetora contra o *S. mansoni* é bem descrito. Em 1992, Smythies e colaboradores, demonstraram que anticorpos anti-IFN- γ eram capazes de reduzir a resposta imune em camundongos imunizados com cercárias irradiadas (Smythies *et al.*, 1992). Wilson e colaboradores em 1996 e Jankovick e colaboradores em 1999, demonstraram que animais deficientes para o gene que codifica o IFN- γ ficavam menos protegidos quando imunizados com cercárias irradiadas. Acredita-se também que o IFN- γ desempenhe importante função no desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva contra esquistossômulos na região pulmonar. Esta afirmativa se baseia no fato de animais selvagens imunizados com cercárias irradiadas apresentarem um processo imunológico, envolvendo principalmente a formação de focos de linfócitos e macrófagos ao redor do parasita, capaz de impedir a movimentação dos esquistossômulos na região pulmonar, deslocando-os para as vias respiratórias com conseqüente eliminação dos vermes, enquanto que, animais deficientes para o IFN- γ se demonstram incapazes de direcionar a formação de tal processo imunológico de maneira eficiente (Wilson *et al.*,1996; Jankovick *et al.*,1999). Outro possível mecanismo de atuação do IFN- γ na resposta imunoprotetora é a ativação de macrófagos para eliminarem os vermes de uma maneira dependente de óxido nítrico (Jankovick *et al.*,1999). Nós também conseguimos demonstrar elevada produção de IFN- γ nos animais imunizados com pUMVC3/Sm29, pUMVC3/TSP-2, pUMVC3/Quimera e com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/TSP-2, e acreditamos que esse aumento de IFN- γ pode estar diretamente relacionada aos níveis de proteção alcançados.

Os animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Sm29 e pUMVC3/Quimera apresentaram elevada produção de TNF- α . A produção do TNF- α se encontra relacionada a resposta imune protetora contra o *S. mansoni*, visto que animais deficientes para o receptor

TNFRI (Receptor de fator de necrose tumoral I) não exibem níveis significativos de proteção quando imunizados com cercárias irradiadas (Street *et al.*,1999). Existe também um grande debate em relação a capacidade de tal citocina estar diretamente relacionada a formação de granulomas e também de sua atuação em conjunto a IFN- γ no aumento da produção de NO na resposta protetora a *S. mansoni*. (Amiri *et al.*, 1992; Cheever *et al.*,1999; Pearce & MacDonald., 2002). Portanto, a produção de TNF- α nos animais imunizados com a vacina de DNA pUMVC3/Sm29 pode estar relacionada ao nível de proteção alcançado.

Durante a resposta imunológica do hospedeiro contra agentes patogênicos, pode ocorrer a destruição do agente invasor de modo que patologias imunomediadas podem ser evitadas ou minimizadas. Porém, em situações onde o patógeno não consegue ser removido facilmente, como por exemplo, nas infecções por *S. mansoni*, o desenvolvimento de um processo patológico pode ser inevitável, a não ser que o organismo hospedeiro desenvolva mecanismos de equilíbrio entre a resposta imunológica gerada e o patógeno, e uma das principais estratégias adotadas para alcançar tal equilíbrio é a liberação de citocinas imunorregulatórias, como IL-10 (Hesse *et al.*,2003). Animais deficientes para IL-10 apresentam exacerbada patologia quando infectados por *S. mansoni*, o que indica que essa citocina pode apresentar papel imunorregulador no desenvolvimento da imunopatologia desenvolvida pela esquistossomose mansônica (Falcão *et al.*,1998; Hesse *et al.*,2003). Acreditamos que IL-10 pode estar relacionada a uma regulação do processo patológico dos animais imunizados, porém, necessitamos realizar as análises histopatológicas para avaliar tal afirmativa.

Quando avaliamos os números de ovos presentes no fígado, não percebemos nenhuma redução estatisticamente significativa dos animais imunizados quando comparados ao grupo controle. A citocina IL-4 parece estar relacionada com a passagem dos ovos de *S. mansoni* das veias mesentéricas para o intestino, o que foi demonstrado por Fallon e colaboradores em (2000), utilizando animais deficientes para tal citocina (Fallon *et al.*, 2000; Pearce & MacDonald., 2002). Portanto, especulamos que o aumento de IL-10 induzido por nossas

vacinas de DNA, a qual tem conhecida capacidade inibitória sobre a produção de citocinas Th2, inibiu a atuação de IL-4 na passagem dos ovos para o lúmen intestinal, provavelmente impedindo a ocorrência de uma variação significativa na contagem de tais ovos, mesmo quando ocorreu redução de vermes significativa.

Com base em todas estas informações, concluímos que a utilização de formas quiméricas em conjunto com a metodologia de imunização por DNA pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra esquistossomose mansônica.

7- CONCLUSÃO

As vacinas de DNA quando administrados intramuscularmente em camundongos C57BL/6, foram capazes de alcançar níveis significativos de redução de vermes adultos do *S. mansoni* quando comparados ao grupo controle, sendo que os maiores níveis de proteção foram alcançados pelos animais imunizados com os plasmídeos pUMVC3/Quimera e pUMVC3/Sm29 + pUMVC3/TSP-2. Esse trabalho valida o uso de quimeras como vacinas, visto o efeito aditivo do plasmídeo pUMVC3/Quimera em relação ao pUMVC3/Sm29. Apesar de tais características, não se obteve redução significativa do número de ovos presentes no fígado. Em resumo, podemos concluir que, as proteínas Sm29, TSP-2 e a forma quimérica de ambas, quando avaliadas como vacinas de DNA, sozinhas ou conjuntamente, se apresentam como importantes candidatos vacinais, porém, tal estratégia ainda necessita de estudos posteriores objetivando aumentar os níveis de proteção.

8- PERSPECTIVAS

Estudos posteriores utilizando-se de outras metodologias de imunização, assim como outros plasmídeos e estratégias prime-boost, apresentam a possibilidade de aumentar ou modificar as características da resposta imunológica aqui obtida, o que pode conseqüentemente ser responsável pelo aumento da resposta imunológica protetora almejada.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, G.; Torben, W.; Zhang, W.; Wyatt, M.; Siddiqui, A.A. Sm-p80-based DNA vaccine formulation induces potent protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 2009a Mar;31(3):156-161.

Ahmad, G.; Zhang, W.; Torben, W.; Damian, R.T.; Wolf, R.F.; White, G.L.; Chavez-Suarez, M.; Kennedy, R.C.; Siddiqui, A.A. Protective and antifecundity effects of Sm-p80-based DNA vaccine formulation against *Schistosoma mansoni* in a nonhuman primate model. *Vaccine.* 2009b May 11;27(21):2830-2837.

Ahmed, H.M.; Mahmoud R.H.; Sherif, S.A. Fahim, F.A.; Saber, M.A. Protection against *Schistosoma mansoni* infection with a recombinant schistosomula 21.7 kDa protein. 2001: 1-4.

Ahmed, H.M.; Romeih, M.H.; Shousha, T.S.A.; Dabaa, E. M.; Saber, M.A. DNA Immunization with the Gene Encoding SM21.7 Protein Protects Mice Against *Schistosoma mansoni* infections. *Journal of American Science.* 2006; 2(4): 59-69.

Aihara, H.; Miyazaki, J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol.* 1998 Sep;16(9):867-870.

Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801.

Aksoy, E.; Zouain, C.S.; Vanhoutte, F.; Fontaine, J.; Pavelka, N.; Thieblemont, N.; Willems, F.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Goldman, M.; Capron, M.; Ryffel, B.; Trottein, F. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem.* 2005 Jan 7;280(1):277-283.

Alves Oliveira, L.F.; Moreno, E.C.; Gazzinelli, G.; Martins-Filho, O.A.; Silveira, A.M.; Gazzinelli, A.; Malaquias, L.C.; LoVerde, P.; Leite, P.M.; Correa-Oliveira, R. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis *mansoni* in humans. *Infect Immun.* 2006 Feb;74(2):1215-1221.

Amiri, P.; Locksley, R.M.; Parslow, T.G.; Sadick, M.; Rector, E.; Ritter, D.; McKerrow, J.H. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*. 1992 Apr 16;356(6370):604-607.

Araujo, M.I.; de Jesus, A.R.; Bacellar, O.; Sabin, E.; Pearce, E.; Carvalho, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol*. 1996 Jun;26(6):1399-1403.

Babiuk, S.; Baca-Estrada, M.E.; Foldvari, M.; Middleton, D.M.; Rabussay, D.; Widera, G.; Babiuk, L.A. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. *J Biotechnol*. 2004 May 13;110(1):1-10.

Barbosa, F.S.; Coimbra Junior, C.E. Alternative approaches in schistosomiasis control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 4:215-220.

Beck, L.; Van-Lume, D.S.; Souza, J.R.; Domingues, A.L.; Favre, T.; Abath, F.G.; Montenegro, S.M. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Trop*. 2008 Nov-Dec;108(2-3):229-233.

Bergquist, N.R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Mar-Apr;90(2):221-227.

Bergquist, N.R.; Leonardo, L.R.; Mitchell, G.F. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol*. 2005 Mar;21(3):112-117.

Brunet, L.R.; Finkelman, F.D.; Cheever, A.W.; Kopf, M.A.; Pearce, E.J. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol*. 1997 Jul 15;159(2):777-785.

Caldas, I.R.; Campi-Azevedo, A.C.; Oliveira, L.F.; Silveira, A.M.; Oliveira, R.C.; Gazzinelli, G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop*. 2008 Nov-Dec;108(2-3):109-117.

Cardoso, F.C.; Macedo, G.C.; Gava, E.; Kitten, G.T.; Mati, V.L.; de Melo, A.L.; Caliari, M.V.; Almeida, G.T.; Venancio, T.M.; Verjovski-Almeida, S.; Oliveira, S.C. *Schistosoma mansoni*

tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(10):e308.

Cardoso, F.C.; Pacifico, R.N.; Mortara, R.A.; Oliveira, S.C. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. Clin Exp Immunol. 2006a Jun;144(3):382-391.

Cardoso, F.C.; Pinho, J.M.; Azevedo, V.; Oliveira, S.C. Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. Genet Mol Res. 2006b;5(4):609-618.

Chan, M.S.; Woolhouse, M.E.; Bundy, D.A. Human schistosomiasis: potential long-term consequences of vaccination programmes. Vaccine. 1997 Oct;15(14):1545-1550.

Cheever, A.W.; Poindexter, R.W.; Wynn, T.A. Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* with or without recombinant tumor necrosis factor alpha treatment. Infect Immun. 1999 May;67(5):2201-2208.

Cook, R.M.; Carvalho-Queiroz, C.; Wilding, G.; LoVerde, P.T. Nucleic acid vaccination with *Schistosoma mansoni* antioxidant enzyme cytosolic superoxide dismutase and the structural protein filamin confers protection against the adult worm stage. Infect Immun. 2004 Oct;72(10):6112-6124.

Correa-Oliveira, R.; Rodrigues Caldas, I.; Martins-Filho, O.A.; Carvalho Queiroz, C.; Lambertucci, J.R.; Renan Cunha-Melo, J.; Soares Silveira, A.; Prata, A.; Wilson, A.; Gazzinelli, G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. Acta Trop. 2000 Oct 23;77(1):141-146.

Coura, J.R.; Amaral, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(5 Suppl 1):13-19.

Cupit, P.M.; Steinauer, M.L.; Tonnessen, B.W.; Eric Agola, L.; Kinuthia, J.M.; Mwangi, I.N.; Mutuku, M.W.; Mkoji, G.M.; Loker, E.S.; Cunningham, C. Polymorphism associated with the *Schistosoma mansoni* tetraspanin-2 gene. Int J Parasitol. 2011 Oct;41(12):1249-1252.

Da'dara, A.A.; Skelly, P.J.; Wang, M.M.; Harn, D.A. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine*. 2001 Nov 12;20(3-4):359-369.

de Jesus, A.R.; Silva, A.; Santana, L.B.; Magalhaes, A.; de Jesus, A.A.; de Almeida, R.P.; Rego, M.A.; Burattini, M.N.; Pearce, E.J.; Carvalho, E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis*. 2002 Jan 1;185(1):98-105.

Despres, L.; Imbert-Establet, D.; Monnerot, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Aug;60(2):221-229.

Donnelly, J.J.; Wahren, B.; Liu, M.A. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol*. 2005 Jul 15;175(2):633-639.

Dupuis, M.; Denis-Mize, K.; Woo, C.; Goldbeck, C.; Selby, M.J.; Chen, M.; Otten, G.R.; Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Ott, G.; McDonald, D.M. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2850-2858.

Falcao, P.L.; Malaquias, L.C.; Martins-Filho, O.A.; Silveira, A.M.; Passos, V.M.; Prata, A.; Gazzinelli, G.; Coffman, R.L.; Correa-Oliveira, R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol*. 1998 Oct;20(10):447-454.

Fallon, P.G.; Richardson, E.J.; McKenzie, G.J.; McKenzie, A.N. 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*. 2000 Mar 1;164(5):2585-2591.

Faurez, F.; Dory, D.; Le Moigne, V.; Gravier, R.; Jestin, A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine*. 2010 May 21;28(23):3888-3895.

Ferrari, M.L.; Coelho, P.M.; Antunes, C.M.; Tavares, C.A.; da Cunha, A.S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bull World Health Organ.* 2003;81(3):190-196.

Fioretti, D.; Iurescia, S.; Fazio, V.M.; Rinaldi, M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:174378.

Fonseca, C.T.; Pacifico, L.G.; Barsante, M.M.; Rassi, T.; Cassali, G.D.; Oliveira, S.C. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. *Microbes Infect.* 2006 Aug;8(9-10):2509-2516.

Garmory, H.S.; Brown, K.A.; Titball, R.W. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther.* 2003 Sep 16;1(1):2.

Gryseels, B.; Polman, K.; Clerinx, J.; Kestens, L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006 Sep 23;368(9541):1106-1118.

Grzych, J.M.; Capron, M.; Bazin, H.; Capron, A. In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J Immunol.* 1982 Dec;129(6):2739-2743.

Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:927-974.

Han, Z.G.; Brindley, P.J.; Wang, S.Y.; Chen, Z. *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:211-240.

Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):740-745.

Herbert, D.R.; Orekov, T.; Perkins, C.; Finkelman, F.D. IL-10 and TGF-beta redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):7214-7220.

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.* 2000 Jun 15;164(12):6406-6416.

Horta, M.F.; Ramalho-Pinto, F.J. Subclasses of rat IgG active in the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1984 Dec;133(6):3326-3332.

Hotez, P.J.; Brindley, P.J.; Bethony, J.M.; King, C.H.; Pearce, E.J.; Jacobson, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1311-1321.

James, S.L.; Glaven, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol.* 1989 Dec 15;143(12):4208-4212.

Janeway, C.A., Jr.; Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Jankovic, D.; Wynn, T.A.; Kullberg, M.C.; Hieny, S.; Caspar, P.; James, S.; Cheever, A.W.; Sher, A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *J Immunol.* 1999 Jan 1;162(1):345-351.

Jassim, A.; Hassan, K.; Catty, D. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol.* 1987 Nov;9(6):627-650.

Jaureguiberry, S.; Paris, L.; Caumes, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Mar;16(3):225-231.

Kassim, O.O.; Dean, D.A.; Mangold, B.L.; Von Lichtenberg, F. Combined microautoradiographic and histopathologic analysis of the fate of challenge *Schistosoma mansoni* schistosomula in mice immunized with irradiated cercariae. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Aug;47(2):231-237.

King, C.H.; Sturrock, R.F.; Kariuki, H.C.; Hamburger, J. Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. *Trends Parasitol.* 2006 Dec;22(12):575-582.

Klabunde, J.; Berger, J.; Jensenius, J.C.; Klinkert, M.Q.; Zelck, U.E.; Kremsner, P.G.; Kun, J.F. *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Exp Parasitol*. 2000 Aug;95(4):231-239.

Koster, B.; Strand, M. *Schistosoma mansoni*: Sm23 is a transmembrane protein that also contains a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Arch Biochem Biophys*. 1994 Apr;310(1):108-117.

Kovalenko, O.V.; Metcalf, D.G.; DeGrado, W.F.; Hemler, M.E. Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct Biol*. 2005;5:11.

Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. 1987 Aug 20;196(4):947-950.

Kozak, M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res*. 1981 Oct 24;9(20):5233-5252.

Krieg, A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:709-760.

Kutzler, M.A.; Weiner, D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet*. 2008 Oct;9(10):776-788.

Lambertucci, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Jul;105(4):422-435.

Liu, M.A. DNA vaccines: a review. *J Intern Med*. 2003 Apr;253(4):402-410.

Liu, M.A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*. 2011 Jan;239(1):62-84.

Lopes, D.O.; Paiva, L.F.; Martins, M.A.; Cardoso, F.C.; Rajao, M.A.; Pinho, J.M.; Caliari, M.V.; Correa-Oliveira, R.; Mello, S.M.; Leite, L.C.; Oliveira, S.C. 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*. 2009 Jun 24;27(31):4127-4135.

Loukas, A.; Tran, M.; Pearson, M.S. Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int J Parasitol.* 2007 Mar;37(3-4):257-263.

Magnussen, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. *Acta Trop.* 2003 May;86(2-3):243-254.

Malaquias, L.C.; Falcao, P.L.; Silveira, A.M.; Gazzinelli, G.; Prata, A.; Coffman, R.L.; Pizziolo, V.; Souza, C.P.; Colley, D.G.; Correa-Oliveira, R. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand J Immunol.* 1997 Oct;46(4):393-398.

McManus, D.P.; Loukas, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Jan;21(1):225-242.

Mei, H.; LoVerde, P.T. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp Parasitol.* 1997 May;86(1):69-78.

Mohamed, M.M.; Shalaby, K.A.; LoVerde, P.T.; Karim, A.M. Characterization of Sm20.8, a member of a family of schistosome tegumental antigens. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Oct 30;96(1-2):15-25.

Mohammed, A.Z.; Edino, S.T.; Samaila, A.A. Surgical pathology of schistosomiasis. *J Natl Med Assoc.* 2007 May;99(5):570-574.

Moser, D.; Tandler, M.; Griffiths, G.; Klinkert, M.Q. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J Biol Chem.* 1991 May 5;266(13):8447-8454.

Mwatha, J.K.; Kimani, G.; Kamau, T.; Mbugua, G.G.; Ouma, J.H.; Mumo, J.; Fulford, A.J.; Jones, F.M.; Butterworth, A.E.; Roberts, M.B.; Dunne, D.W. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol.* 1998 Feb 15;160(4):1992-1999.

Nascimento, E.J.; Amorim, R.V.; Cavalcanti, A.; Alves, V.F.; Nakazawa, M.; Pereira, V.R.; Lucena-Silva, N. Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Feb;102(1):21-27.

Olafsdottir, G.; Svansson, V.; Ingvarsson, S.; Marti, E.; Torsteinsdottir, S. In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence. *Acta Vet Scand*. 2008;50:44.

Oliveira, S.C.; Fonseca, C.T.; Cardoso, F.C.; Farias, L.P.; Leite, L.C. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop*. 2008 Nov-Dec;108(2-3):256-262.

Pearce, E.J.; MacDonald, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jul;2(7):499-511.

Pinheiro, C.S.; Martins, V.P.; Assis, N.R.; Figueiredo, B.C.; Morais, S.B.; Azevedo, V.; Oliveira, S.C. Computational vaccinology: an important strategy to discover new potential *S. mansoni* vaccine candidates. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:503068.

Rabello, A. Acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Mar-Apr;90(2):277-280.

Rezende, C.M.; Silva, M.R.; Santos, I.G.; Silva, G.A.; Gomes, D.A.; Goes, A.M. Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: effects on granuloma down-modulation and cytokine production. *Immunol Lett*. 2011 Dec 30;141(1):123-133.

Romeih, M.H.; Hassan, H.M.; Shousha, T.S.; Saber, M.A. Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* infection by multivalent DNA vaccine. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008 Apr;40(4):327-338.

Ross, A.G.; Bartley, P.B.; Sleight, A.C.; Olds, G.R.; Li, Y.; Williams, G.M.; McManus, D.P. Schistosomiasis. *N Engl J Med*. 2002 Apr 18;346(16):1212-1220.

Shabaan, A.M.; Mohamed, M.M.; Abdallah, M.S.; Ibrahim, H.M.; Karim, A.M. Analysis of *Schistosoma mansoni* genes using the expressed sequence tag approach. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(1):259-268.

Shalaby, K.A.; Yin, L.; Thakur, A.; Christen, L.; Niles, E.G.; LoVerde, P.T. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine.* 2003 Dec 8;22(1):130-136.

Shedlock, D.J.; Weiner, D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol.* 2000 Dec;68(6):793-806.

Siddiqui, A.A.; Phillips, T.; Charest, H.; Podesta, R.B.; Quinlin, M.L.; Pinkston, J.R.; Lloyd, J.D.; Pompa, J.; Villalobos, R.M.; Paz, M. Enhancement of Sm-p80 (large subunit of calpain) induced protective immunity against *Schistosoma mansoni* through co-delivery of interleukin-2 and interleukin-12 in a DNA vaccine formulation. *Vaccine.* 2003 Jun 20;21(21-22):2882-2889.

Steinmann, P.; Keiser, J.; Bos, R.; Tanner, M.; Utzinger, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006 Jul;6(7):411-425.

Stelma, F.F.; Talla, I.; Polman, K.; Niang, M.; Sturrock, R.F.; Deelder, A.M.; Gryseels, B. Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in northern Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Dec;49(6):701-706.

Street, M.; Coulson, P.S.; Sadler, C.; Warnock, L.J.; McLaughlin, D.; Bluethmann, H.; Wilson, R.A. TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *J Immunol.* 1999 Oct 15;163(8):4489-4494.

Tang, D.C.; DeVit, M.; Johnston, S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992 Mar 12;356(6365):152-154.

Thomas, P.G.; Carter, M.R.; Atochina, O.; Da'Dara, A.A.; Piskorska, D.; McGuire, E.; Harn, D.A. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003 Dec 1;171(11):5837-5841.

Tran, M.H.; Freitas, T.C.; Cooper, L.; Gaze, S.; Gatton, M.L.; Jones, M.K.; Lovas, E.; Pearce, E.J.; Loukas, A. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathog.* 2010 Apr;6(4):e1000840.

Tran, M.H.; Pearson, M.S.; Bethony, J.M.; Smyth, D.J.; Jones, M.K.; Duke, M.; Don, T.A.; McManus, D.P.; Correa-Oliveira, R.; Loukas, A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med.* 2006 Jul;12(7):835-840.

Tsang, C.; Babiuk, S.; van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Babiuk, L.A.; Griebel, P. A single DNA immunization in combination with electroporation prolongs the primary immune response and maintains immune memory for six months. *Vaccine.* 2007 Jul 26;25(30):5485-5494.

Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Friedman, A.; et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993 Mar 19;259(5102):1745-1749.

Vaillant, B.; Chiaramonte, M.G.; Cheever, A.W.; Soloway, P.D.; Wynn, T.A. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):7017-7026.

van der Kleij, D.; Latz, E.; Brouwers, J.F.; Kruize, Y.C.; Schmitz, M.; Kurt-Jones, E.A.; Espevik, T.; de Jong, E.C.; Kapsenberg, M.L.; Golenbock, D.T.; Tielens, A.G.; Yazdanbakhsh, M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48122-48129.

Van Hellemond, J.J.; Retra, K.; Brouwers, J.F.; van Balkom, B.W.; Yazdanbakhsh, M.; Shoemaker, C.B.; Tielens, A.G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *Int J Parasitol.* 2006 May 31;36(6):691-699.

Wahl, S.M.; Frazier-Jessen, M.; Jin, W.W.; Kopp, J.B.; Sher, A.; Cheever, A.W. Cytokine regulation of schistosome-induced granuloma and fibrosis. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1370-1375.

Wang, S.; Zhang, C.; Zhang, L.; Li, J.; Huang, Z.; Lu, S. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine*. 2008 Apr 16;26(17):2100-2110.

Wang, Z.; Troilo, P.J.; Wang, X.; Griffiths, T.G.; Pacchione, S.J.; Barnum, A.B.; Harper, L.B.; Pauley, C.J.; Niu, Z.; Denisova, L.; Follmer, T.T.; Rizzuto, G.; Ciliberto, G.; Fattori, E.; Monica, N.L.; Manam, S.; Ledwith, B.J. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther*. 2004 Apr;11(8):711-721.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. "First WHO report on neglected tropical diseases". 2010. 129-135

Williams, R.S.; Johnston, S.A.; Riedy, M.; DeVit, M.J.; McElligott, S.G.; Sanford, J.C. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 1;88(7):2726-2730.

Wilson, R.A.; Coulson, P.S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends Parasitol*. 2009 Sep;25(9):423-431.

Wilson, R.A.; Coulson, P.S.; Betts, C.; Dowling, M.A.; Smythies, L.E. Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology*. 1996 Feb;87(2):275-282.

Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-1468.

Wynn, T.A.; Reynolds, A.; James, S.; Cheever, A.W.; Caspar, P.; Hieny, S.; Jankovic, D.; Strand, M.; Sher, A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *J Immunol*. 1996 Nov 1;157(9):4068-4078.

Xu, X.; Remold, H.G.; Caulfield, J.P. Potential role for scavenger receptors of human monocytes in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Am J Pathol*. 1993 Mar;142(3):685-689.

Zhang, L.; Yang, X.; Yang, Y.; Zhao, J.; Yang, J.; Liu, F.; Zhang, Z.; Wu, G.; Su, C. Characterization of a partially protective B-cell epitope within the 62 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007 Oct;39(10):770-778.

Zhang, W.; Ahmad, G.; Torben, W.; Siddiqui, A.A. Sm-p80-based DNA vaccine made in a human use approved vector VR1020 protects against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mouse. *Parasite Immunol*. 2010 Apr;32(4):252-258.