

Dissertação de Mestrado

**EXPRESSÃO DA RHO1 GTPASE DE *SCHISTOSOMA*
MANSONI EM CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS**

Vinícius de Souza Góes

Janeiro de 2004
Vinícius de Souza Góes

EXPRESSÃO DA RHO1 GTPASE DE *SCHISTOSOMA* *MANSONI* EM CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial a obtenção do Título de Mestre em Ciências com ênfase em Imunologia

Orientador: Alfredo Miranda de Góes
Co orientador: Maria de Fátima Leite
Colaborador: Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte, Janeiro de 2004

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Dr. Alfredo Miranda de Góes, co-orientação da Dra. Maria de Fátima Leite¹ e colaboração do Dr. Evanguedes Kalaphothakis², com o suporte financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq).
- PRONEX (Finep).

1. Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG.
2. Departamento de Farmacologia do ICB/UFMG.

Dedico este trabalho:

Ao meu pai Alfredo, obrigado por sempre ter
acreditado em mim.

À minha mãe Ada: Eu Te Amo!

Aos meus irmãos Tércio e Túlio, obrigado pelo
ombro amigo.

Agradecimentos

Ao Prof. Alfredo Góes, exemplo de amor à profissão. Obrigado pela oportunidade, sempre me esforcei para nunca decepcioná-lo.

Ao Prof. Evanguedes Kalaphotakis cuja intervenção foi de primordial importância para a viabilidade deste projeto. Obrigado por ter compartilhado o seu conhecimento comigo

À Prof. Maria de Fátima Leite que co-orientou este trabalho como o entusiasmo de poucos. Pelos momentos de convivência e alegria: muito obrigado.

À Prof. Glória Franco, muito obrigado pelo sorriso, e claro, à biblioteca de cDNA cedida!

Ao Prof. Carlos Renato por ter-nos cedido o plasmídeo com a sequência da Rho.

À amiga Adriana pela convivência, paciência e atenção. Muito obrigado pela intervenção fundamental nos experimentos de FACS.

Ao amigo Bernardo pelos momentos de amizade.

Ao amigo Oscar, obrigado pela disponibilidade e pronta atenção nos experimentos de FACS.

À amiga Simone, obrigado pela ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Bernardo, Adriana, Cris, Viviane, Patrícia, Cláudia, Cíntia, Mayerson, Ana, Babi, Tércio, Elena, Peu, Dona Rai, Carol Barcelos, Diniz, Pedro: sem vocês eu nunca teria conseguido!

Aos meus novos colegas de trabalho: Dr. Luiz Eduardo, Dra. Shauma, Lila, Flávia, Stella, Dra. Christiane, Eliane, Camila, André e Joemerson.

Resumo

As células dendríticas possuem um papel determinante na indução de resposta imune primária. Estudos recentes tem demonstrado o papel importante destas células na indução de imunidade específica a doenças parasitárias, dentre elas a esquistossomose. Este fato despertou grande interesse do nosso grupo na manipulação de células dendríticas para desenvolver uma vacina celular que tem como objetivo induzir imunidade protetora contra o *Schistosoma mansoni*. Células dendríticas viáveis foram obtidas a partir do cultivo de precursores da medula óssea murina na presença das citocinas GM-CSF e IL-4. Em média, obteve-se por preparação 3×10^6 células/camundongo com morfologia típica. Destas, 77% conservam a capacidade intrínseca fagocítica. Na presença de LPS, observa-se um aumento de 78% do metabolismo celular, fato indicativo da transição do estado imaturo para o maturo. As células dendríticas foram transfectadas com plasmídeo contendo sequência codificadora para o antígeno Rho1 GTPase de *Schistosoma mansoni*. Esta proteína foi selecionada por ensaio de ELISA de uma biblioteca de cDNA de verme adulto, fato indicativo de seu potencial antigênico. Nosso modelo, permite a obtenção em torno de 10^5 a 10^6 células dendríticas transfectadas. Através de ensaios de imunofluorescência demonstrou-se o processamento e apresentação do antígeno recombinante na membrana dessas células. Estes resultados indicam novas perspectivas na utilização das células dendríticas transfectadas na indução de resposta imune protetora contra a esquistossomose em processos de imunização.

Lista de Abreviaturas

AST	Sequência antigênica transcrita
BSA	Albumina bovina sérica
CCR...	CC receptor de quimiocina (“CC chemokine receptor”)
CD...	Grupo de diferenciação
CpG	Citosina-fósforo-guanina
CTL	Linfócito T citotóxico
DEC-205	CD205
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fc γ R	Receptor para região constante de imunoglobulinas gama
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL2	Fluorescência do tipo 2 – fluorescência vermelha
FSC	Parâmetro citofluorométrico indicativo de tamanho celular
GM	Média geométrica
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IL...	Interleucina
INF...	Interferon
IPSE	Princípio inductor e IL-4 do ovo de <i>S. mansoni</i> (“IL-4-inducing principle from <i>S. mansoni</i> eggs”)
IPTG	Isopropil-tio- β -galactosídeo
kDa	Quilodalton
LFA-3	Antígeno linfocitário associado 3
LNFP III	Lacto-N-fucopentose III
LPS	Lipo-polissacarídeo
LTh	Linfócito T auxiliar
MBP	Proteína de ligação a manose
MHC...	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP...	Proteína inflamatória macrófágica (“Macrophage inflammatory protein”)
MLR	Reação linfocitária mista
MTT	“3-(4,5-demethyl-2-thiazolyl)-2.5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide”

OPD	Otofenilenodiamino
Pb	Pares de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGD2	Prostaglandina D2
PLG	“Poly(DL-Lactide-co-glycolide)”
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
RFP	Proteína vermelha fluorescente
RHO ^{ct}	39 aminoácidos C-terminais da proteína Rho GTPase do <i>S. mansoni</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SCF	Fator de Célula tronco (“Stem Cell Factor”)
SDS	Sódio dodecil sulfato
SEA	Preparação antigênica solúvel do ovo <i>S. mansoni</i>
SFB	Soro fetal bovino
SLC	Quimiocina secundária do tecido linfóide
SSC	Parâmetro citofluorométrico indicativo de granulosidade celular
SWAP	Preparação antigênica solúvel do verme adulto do <i>S. mansoni</i>
TCR	Receptor de antígeno do linfócito T
TEMED	N,N,N', N'-tetrametiletilenodiamio
Th...	Linfócito T auxiliar
TNF α	Fator de crescimento tumoral alfa
WHO	Organização mundial da saúde

Índice

Item	Página
1. Introdução	01
1.1 As células dendríticas	02
1.2 Aplicações terapêuticas	06
1.3 Células dendríticas e imunidade contra a esquistossomose mansônica	09
1.4 Indução de imunidade protetora contra a esquistossomose	12
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Metodologia	17
3.1 Produção de antígenos solúveis e obtenção de anticorpos policlonais.	18
3.2 Seleção de clones contendo cDNA codificadores para antígenos recombinantes de verme adulto do <i>S. mansoni</i> .	22 25
3.3 Preparação de cDNA de antígeno recombinante de SWAP para expressão em célula eucariota de mamífero.	29
3.4 Expressão heteróloga de Rho1 GTPase do <i>S. mansoni</i> em sistema procaríoto.	31
3.5 Cultivo e caracterização de células dendríticas.	
4. Resultados	36
4.1 Seleção de clones de cDNA codificadores de antígenos recombinantes de <i>S. mansoni</i> para expressão em células dendríticas.	37 47
4.2 Construções gênicas	54
4.3 Cultivo de células dendríticas	61
4.4 Transfecção das células dendríticas e expressão de proteína heteróloga	
5. Discussão	68
6. Conclusões	77
7. Perspectivas	79

8. Bibliografia	81
9. Apêndice 1	100
10. Apêndice 2	107

Lista de Figuras

Título	Página
Figura 1. Pareamento das ASTs com seus respectivos homólogos putativos de <i>S. mansoni</i>	43
Figura 1. Continuação.	44
Figura 2. Pareamento de ASTs com seus respectivos homólogos putativos de outros organismos.	45
Figura 2. Continuação.	46
Figura 3. Clone SmAST03.	47
Figura 4. Clonagem do fragmento RHO ^{ct} no vetor PCR2.1 topo.	50
Figura 5. Clonagem do fragmento RHO ^{ct} no vetor pcDNA3.1+.	51
Figura 6. Pareamento de RHO ^{ct} com Rho1 GTPase de <i>S. mansoni</i> .	52
Figura 7. Clonagem de Rho1 GTPase no vetor DsRed2.	53
Figura 8. Expressão de Rho1/RFP em células CHO.	54
Figura 9. Cultivo de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos.	57
Figura 10. Ensaio de MTT de células dendríticas cultivadas em diferentes tempos na presença de solução de MTT.	58
Figura 11. Determinação da viabilidade celular, por ensaio de MTT, do cultivo de células dendríticas estimulados, ou não, com LPS.	59
Figura 12. Visualização de fagocitose de esferas de látex conjugadas a FITC por células dendríticas.	60
Figura 13. Taxa de fagocitose das esferas – FITC por células dendríticas cultivadas com diferentes tratamentos.	56

Figura 14. Célula dendrítica cultivada após transfecção com plasmídeo DsRed2.	63
Figura 15. Determinação da viabilidade celular, por ensaio de MTT, de células dendríticas transfectadas com DsRed2 ou pcDNA3.1/RHO ^{ct} em diferentes tempos de cultivo.	64
Figura 16. Determinação da viabilidade celular, por ensaio de MTT, de células dendríticas transfectadas com DsRed2 em diferentes concentrações do reagente <i>effectene</i> .	65
Figura 17. Citometria de fluxo de células dendríticas transfectadas com DsRed2 ou DsRed2/Rho1.	66
Figura 18. Evidenciação da expressão de Rho1 GTPase e RHO ^{ct} na superfície de células dendríticas.	67

Lista de Tabelas

Título	Página
Tabela 1. Clones reativos nos ensaios de ELISA de captura.	38
Tabela 2. Categoria apresentada por ASTs selecionadas.	39
Tabela 3. Clones cujas ASTs apresentaram homologia significativa a nível protéico (BLASTX) com produtos gênicos de <i>S. mansoni</i> .	41
Tabela 4. Clones cujas ASTs apresentaram homologia significativa a nível protéico (BLASTX) com produtos gênicos de outros organismos.	42
Tabela 5. Intensidade de fluorescência e porcentagem de células dendríticas positivas para a expressão de Rho1/RFP.	62

1. Introdução

1.1 As células dendríticas

As células dendríticas compreendem um grupo heterogêneo de células que agregam subclasses com vias distintas de desenvolvimento, marcadores específicos e que prefazem funções diferenciadas. Evidências sugerem que existem pelo menos dois troncos principais de desenvolvimento que geram as (1) células dendríticas mielóides e (2) plasmocitóides (Cavanagh & Andrian, 2002).

As células dendríticas mielóides, caracterizadas pela expressão da integrina CD11c, abrangem a população clássica de células apresentadoras de antígenos capazes de ativar linfócitos T e em humanos consistem de uma população homogênea. Em camundongos, identifica-se um subtipo, as células dendríticas linfóides, caracterizadas pela expressão de CD8 α e por localizarem-se nas regiões ricas de linfócitos T dos órgãos linfóides secundários. As células dendríticas plasmocitóides não expressam CD11c e carecem de muitos marcadores da linhagem mielóide. Por outro lado, expressam altos níveis de IL-3R α (CD123) e CD62L (L-selectina), e possuem um papel significativo nas respostas imunes contra infecções virais por secretarem grandes quantidades de INF α (Chain, 2003; Cavanagh & Andrian, 2002).

Derivadas de precursores da medula óssea, as células dendríticas localizam-se nas barreiras externas do corpo, especialmente na epiderme e nas vias aéreas, nos espaços intersticiais de muitos órgãos, tecidos linfóides, sangue e circulação linfática aferente (Steinman & Nussenzweig, 2002; McWilliam et al., 1994; Kupiec-Weglinski et al., 1988; Schuler & Steinman, 1985; Katz et al., 1979). Encontram-se em três estágios de desenvolvimento: (a) precursoras de células dendríticas que circulam pela corrente sanguínea e linfática ou migram para os diversos tecidos alojando-se como (b) células dendríticas imaturas de alta capacidade fagocítica e endocítica permitindo a captura de antígenos; (c) células dendríticas maduras estão presentes nos tecidos linfóides secundários expressando níveis elevados de moléculas co-estimulatórias e complexos MHC-peptídeos, permitindo a apresentação de antígeno e ativação linfocitária (Banchereau & Steinman 1998).

Células dendríticas imaturas circulam através da corrente sanguínea distribuindo-se pelos diversos tecidos do corpo, particularmente, localizando-se em maior quantidade na epiderme e mucosas (trato gastrointestinal e respiratório). O padrão de migração é regido por um conjunto de estímulos quimiotáticos que varia

dependendo da linhagem e subtipo de célula dendrítica (Banchereau et al., 2000). A quimiocina MIP-3 α , produzido por células epiteliais, é o mais potente quimiotático de precursoras de células de Langerhans que expressam em sua membrana o receptor específico CCR6 que direciona a sua migração para o epitélio (Dieu-Nosjean, et al., 2000; Dieu-Nosjean, et al., 1999; Greaves, et al., 1997).

A quimiocina MIP-3 α possui um papel importante no processo inflamatório agudo instalado em superfícies mucosas. A secreção aumentada desta quimiocina em processos infecciosos e alérgicos causa o rápido recrutamento de precursores de células de Langerhans que se instalam nestes tecidos como células dendríticas imaturas, uma vez ativados, perdem a responsividade a MIP-3 α e são redirecionados para os tecidos linfóides secundários (Reibman et al., 2003; McWilliam et al., 1996; McWilliam et al., 1994).

Funcionalmente, as células dendríticas imaturas são caracterizadas pela extrema capacidade de capturar e processar antígenos, porém apresentam baixa capacidade de estimular linfócitos T. Para suprir esta função, são capazes de realizar altos níveis de macropinocitose constitutiva e endocitose mediada por receptores. Células Dendríticas expressam o receptor de manose e seu homólogo DEC-205 que consistem em receptores de lecitinas com múltiplos domínios de ligação a carboidratos permitindo a endocitose e fagocitose de antígenos que possuem resíduos de manose ou fucose (Cella¹ et al., 1997; Jiang et al., 1995). A presença de receptores para cadeias pesadas de imunoglobulinas Fc γ RI e Fc γ RII permitem a captura de imunocomplexos ou partículas opsonizadas (Fanger et al., 1996). Células dendríticas são capazes de exercer a fagocitose de partículas, fragmentos de células apoptóticas e necróticas além de diversos microorganismos e parasitas (Sher et al., 2003; Banchereau et al., 2000; Albert et al., 1998).

As partículas endocitadas ou fagocitadas são eficientemente direcionadas a compartimentos especializados no processamento e apresentação de antígenos. Células dendríticas possuem a característica única de produzir complexos MHCII-peptídeos estocados em compartimentos especializados – MIIC (do inglês: “*MHC class II-rich compartments*”). Em condições normais, complexos MHC-peptídeos são formados e constantemente reciclados nos MIICs. Na presença de antígenos, os MIICs convertem-se em compartimentos não-lisossômicos e fragmentos antigênicos são complexados com MHCII, que por sua vez são destinados à

superfície da célula, onde mantêm-se estáveis por dias (Banchereau & Steinman 1998; Cella² et al., 1997; Pierre et al., 1997).

As Células dendríticas apresentam antígenos exógenos pela via do MHC de classe I, particularmente importante na imunidade contra tumores, transplantes e infecções virais. A fagocitose de corpos celulares apoptóticos e posterior processamento permitem a apresentação de antígenos por MHCI e estimulação de linfócitos T citotóxicos (Banchereau et al., 2000, Albert et al., 1998).

A maturação de células dendríticas é um passo crucial para o processo imune. A relação complementar entre produtos inflamatórios, provenientes da resposta imune inata, e estruturas conservadas de microrganismos são responsáveis por este processo. Células dendríticas expressam muitos membros da família de receptores Toll, assim sendo, sensíveis a estímulos por produtos microbianos como o LPS, dupla fita de RNA, motivos CpG, flagelina e peptioglicanos. O processo endocítico mediada por receptores também promove estímulos de maturação. A secreção de prostaglandinas e das citocinas TNF α , IL-1, GM-CSF, INF α , INF β , INF γ , mediante a ativação da resposta imune inata, induzem o mesmo processo (Chain, 2003; Banchereau et al., 2000; Jonuleit et al., 1998).

Durante o processo de ativação, células dendríticas sofrem mudanças morfológicas, fenotípicas e funcionais que provocam a transição do estado imaturo, de captação antigênica, ao estado maturo de apresentação antigênica. Concomitante as mudanças fenotípicas, essas células migram para os órgãos linfóides secundários adquirindo capacidade de estimular linfócitos T. (Banchereau & Steinman 1998).

As mudanças morfológicas que acompanham o processo de maturação das células dendríticas incluem a perda de estruturas adesivas, reorganização do citoesqueleto e aquisição de alta mobilidade celular (Banchereau et al., 2000). Receptores de quimiocinas importantes nos processos inflamatórios, como o CCR6, possuem expressão regulada negativamente e são substituídos pela expressão positiva de CCR7, responsivo à SLC e MIP-3 β , que confere motilidade direcional aos nódulos linfáticos (Cavanagh & Andrian, 2002).

O processo de maturação de células dendríticas é acompanhado de reduzida capacidade de captação antigênica em contraste à expressão exacerbada de moléculas co-estimulatórias que interagem com receptores em células T para reforçar a adesão e sinalização. Cita-se a expressão de LFA-3/CD58, ICAM-

1/CD54, B7-2/CD86, CD40 (Cella¹ et al., 1997; Banchereau & Steinman 1998; Sallusto et al., 1995). As primeiras 24 horas de maturação são acompanhadas pelo aumento da expressão de complexos MHCII-peptídeo na superfície das células, resultado de intensa biosíntese de MHCII, redirecionamento dos compartimentos de MHCII reciclados à superfície e aumento da meia vida do complexo (Cella² et al., 1997; Cella¹ et al., 1997).

A soma desses fatores levam a transição da resposta imune inata para a resposta imune adaptativa. As interações entre células dendríticas maduras e linfócitos T criam um ambiente propício ao início da imunidade. Células dendríticas convertem as informações derivadas dos tecidos em sinais que promovem e dirigem a maturação dos linfócitos T. Assim, fornecem o primeiro sinal na forma do reconhecimento, pelos receptores de células T (TCR), dos peptídeos antigênicos derivados dos patógenos complexados às moléculas do MHC. O segundo sinal é derivado dos contatos entre moléculas co-estimulatórias e de adesão aos seus respectivos receptores, além de fatores humorais secretados por ambas as células. A combinação destes sinais resulta na ativação antígeno-específico de Linfócitos T e o desenvolvimento em células efetoras ou de memória (Banchereau et al., 2000; Banchereau & Steinman 1998; Cella¹ et al., 1997).

As Células dendríticas podem polarizar a natureza dos sinais de ativação de linfócitos T auxiliares CD4+ (LThs), direcionando a diferenciação para os perfis de linfócitos Th1 ou Th2. Essa polarização é dirigida pela natureza e intensidade dos estímulos assimilados pelos linfócitos T no ato de sua ativação, estes são sinais carregados pelas células dendríticas influenciados por fatores provenientes do sítio de entrada do patógeno e do próprio microrganismo envolvido (Kalinski et al., 1999). Desta forma, fatores como INF γ ou LPS são conhecidos por modularem a expressão positiva IL-12, polarizando uma resposta Th1. Por outro lado, prostaglandina E₂ em conjunto com outros fatores como IL-4 e OX40L modulam negativamente a expressão de IL-12 e direcionam a ativação de células Th2 (Morelle & Thomson 2003; Kalinski et al., 1999).

Linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) são células efetoras cruciais nas respostas imunes adaptativas contra tumores, infecções virais e patógenos intracelulares. A apresentação de peptídeos complexados no MHCI pelas células dendríticas, em conjunto com co-estimulação, resulta na ativação, expansão clonal e diferenciação em CTLs. A geração de CTL ocorre em condições dependentes e

independentes de linfócitos T auxiliares. Sobre condições limitantes, como por exemplo baixa frequência de precursores de Linfócitos T CD8+ antígeno específicos, níveis de antígeno subótimas e fraca resposta imune inata, a geração de CTL é dependente de LTh. LThs ativam as células dendríticas por interação CD40/CD40L aumentando sua capacidade de apresentação antigênica e co-estimulação que, em contrapartida, ativam CTLs. Células T auxiliares também secretam IL-2 que promovem expansão clonal e previnem anergia em CTLs (Malek, 2002; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998).

Existem indícios crescentes de que células dendríticas são responsáveis pelo auxílio na manutenção da tolerância central e periférica. Localizadas em regiões medulares circunscritas do timo, células dendríticas apresentam antígenos próprios aos linfócitos T impondo a distinção entre próprio/não próprio levando a deleção de células auto-reativas e na manutenção da tolerância central. Em complemento as falhas apresentadas pela tolerância central, células dendríticas participam da tolerância periférica. Células dendríticas imaturas de alta capacidade endocítica e fagocítica estão constantemente adquirindo e apresentando peptídeos de proteínas próprias, complexados aos MHCs, sem a presença de fatores co-estimulatórios induzidos por processos inflamatórios em tecidos não linfóides. Em conjunto, estas células estão em constante circulação entre os tecidos não linfóides e linfóides. Estes fatores permitem o reconhecimento de linfócitos T auto-reativos nos tecidos linfóides periféricos levando a sua deleção ou anergia (Steinman et al., 2003, Steinman & Nussenzweig 2002).

1.2 Aplicações terapêuticas

O sentido das células dendríticas é prover aos linfócitos T informações sobre antígenos específicos, na forma de complexos MHC/peptídeos e informações que sinalizam a ativação do sistema imune inato. Estes fatos vêm gerando grande interesse na sua utilização em estratégias imunoterapêuticas. Para tal, foi preciso manipular as células dendríticas *in vitro* para se obter quantidade suficiente de células e o subtipo ideal para induzir o perfil de resposta imune desejada, passo inicial, realizado por Inaba¹ e colaboradores, 1992.

Em sua publicação, Inaba¹ e colaboradores, caracterizaram células dendríticas murinas geradas a partir da proliferação de precursores MHCII

negativos provenientes do sangue periférico dependentes do suplemento de GM-CSF. Evidenciava-se a proliferação pela formação de colônias de células a partir do sexto dia de cultivo. Ao final da terceira semana observavam-se células dendríticas não aderentes com motilidade e morfologia típica. Estas eram potentes estimuladores de proliferação de linfócitos e eram capazes de migrar para regiões específicas do linfonodo ricas em células T (Inaba¹ et al., 1992).

Em uma segunda publicação, Inaba² e colaboradores, adaptaram a metodologia previamente descrita para precursores provenientes da medula óssea de camundongos. Neste caso, aproximadamente 5×10^5 células dendríticas eram obtidas da medula óssea extraída do conjunto de fêmur e tíbia de um único camundongo, cultivando-se em meio suplementado com GM-CSF por apenas seis dias. Desta forma, obtinham-se quantidades consideráveis de células dendríticas, em curto tempo de cultivo, próprios à utilização em ensaios de imunização *in vivo* (Inaba² et al., 1992).

As publicações supracitadas abriram caminho para inúmeras outras que abordaram metodologias aprimoradas para gerar células dendríticas permitindo o estudo das diversas vias de desenvolvimento. Assim, os precursores de células dendríticas presentes no sangue e na medula óssea foram identificados no sangue humano de cordão umbilical, cultivados na presença de GM-CSF e $TNF\alpha$, como células CD34+ que diferenciam ao longo de duas vias distintas, originando células de langerhans e células dendríticas relacionadas à derme (Cella¹ et al., 1997; Caux et al., 1996).

Monócitos CD14+ do sangue periférico representam outra fonte abundante de precursores que, dependendo do estímulo, podem polarizar sua diferenciação para células dendríticas. Monócitos cultivados na presença de GM-CSF e IL-4, desenvolvem-se em uma população homogênea de células dendríticas que apresentam características de células imaturas sensíveis a estímulos, como $TNF\alpha$, IL-1 ou LPS (Cella¹ et al., 1997; Bender et al., 1996).

O potencial das células dendríticas no estímulo da imunidade específica tornou-se de grande interesse na sua utilização em terapia de câncer. A habilidade das células dendríticas de gerar respostas imunes anticâncer *in vivo* tem sido documentados em diversos modelos experimentais e recentemente em ensaios clínicos humanos (O'Rourke et al., 2003; Fields et al., 1998; Zitvogel et al., 1996). A maioria dos experimentos consiste do isolamento *in vitro* de células dendríticas,

incubação destas com antígenos tumorais e injeção em animais singênicos como vacina anticâncer (Fong & Engleman, 2000). Células dendríticas carregadas com células tumorais apoptóticas ou necróticas, lisados de células tumorais, proteínas antigênicas, peptídeos imunodominantes derivados de antígenos tumorais, peptídeos sintéticos MHC classe I restrito e DNA ou RNA codificadores para antígenos tumorais tem demonstrado gerar resposta imune específica, atividade anti-tumor e regressão de tumores pré-estabelecidos (Schuler et al., 2003; Paczesny et al., 2001; Fong & Engleman, 2000; Fields et al., 1998; Zitvogel et al., 1996).

Seguindo os resultados promissores das vacinas antitumores, imunidade com células dendríticas foi aplicada em infecções parasitária. Camundongos imunizados com células dendríticas carregados com antígenos de *Toxoplasma gondii* apresentaram resposta imune celular, humoral e forte resistência à formação de cisto cerebral (redução de aproximadamente 70%) seguido de infecção (Bourguin et al., 1998). Da mesma forma, células dendríticas carregadas com antígenos de *Leishmania dovani* foram capazes de induzir resposta imune Th1 antígeno específico *in vivo* (Ahuja et al., 1999).

Evidencia-se também a aplicabilidade dos conhecimentos adquiridos sobre células dendríticas na imunidade induzida por vacinas de DNA. A vacinação por DNA é modo prático, barato, não infeccioso e eficaz na indução de resposta imune celular e humoral contra diversas doenças. Apesar de células dendríticas produzir resultados promissores na indução de uma resposta imune celular em camundongos, a resposta em humanos e em grandes animais é comparavelmente baixa e requer múltiplas imunizações com altas doses de DNA (Kirman & Seder, 2003). Intensos esforços visam potencializar os efeitos de vacinas de DNA em humanos e grandes animais.

A vacina de DNA tem seu efeito potencializado quando o antígeno é expresso por células dendríticas (Cochlovius et al., 2002). Assim, métodos que direcionam a assimilação do DNA administrado por células dendríticas aumentam a eficácia das vacinas. Cita-se como exemplo, a adsorção do DNA em PLG, uma partícula catiônica biodegradável que possui a capacidade de potencializar a vacina por induzir respostas de células T citotóxicas em camundongo, hamster e macacos rhesus. De outra forma, a administração de DNA codificadora para o antígeno concomitante a cDNA de citocinas (IL-2, IL-12, IL-15), fatores de crescimento (GM-

CSF, Flt-3L), moléculas coestimulatórias, fatores de transcrição e quimiocinas, chamados de adjuvantes genéticos, são capazes de potencializar e direcionar a resposta imune gerada (Kirman & Seder, 2003).

1.3 Células dendríticas e imunidade contra a esquistossomose mansônica

A esquistossomose consiste de uma infecção parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo, as três maiores espécies, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*, responsáveis pela infecção de, aproximadamente, 200 milhões de pessoas em 76 países dos territórios da África, Caribe, Ásia, Oriente Médio e América do Sul (Bergquist, 2002; WHO/CDT, 1998). No Brasil, estima-se que 12 milhões de pessoas estejam em risco ou infectadas com *S. mansoni*. As principais áreas afetadas compreendem os estados litorâneos das regiões nordeste e sudeste estendendo-se ao estado de Minas Gerais (Kloetzel, 1989).

O *S. mansoni* é uma espécie pertencente à família Schistosomatidae, caracterizada por agrupar trematódeos que apresentam dimorfismo sexual (Sambon, 1907). O ciclo de vida deste helminto ocorre em dois hospedeiros: um intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*, no qual a reprodução assexuada do parasita ocorre e o definitivo, um vertebrado, sendo o mais importante o homem, no qual desenvolvem-se as formas dimórficas adultas que se reproduzem sexuadamente. A infecção no homem se inicia pela penetração da cercaria através da pele. Durante este processo sofrem mudanças morfológicas e estruturais que originam a forma jovem do verme: o esquistossômulo (Gordon & Griffiths 1951). Os esquistossômulos de *S. mansoni* permanecem na epiderme durante 24 horas e, logo depois, atravessam a membrana basal e migram em direção aos vasos sanguíneos da derme. Da corrente sanguínea, migram até o pulmão e, em seguida, para o sistema porta hepático onde completam seu desenvolvimento. Então, machos e fêmeas acasalam-se e passam a residir nas veias mesentéricas. A maturidade sexual é atingida por volta da 6ª semana, quando a ovoposição se inicia (Miller & Wilson 1978; Stirewalt, 1974).

O mais importante agente nocivo decorrente da infecção reside nos ovos que não são eliminados nas fezes e ficam presos na mucosa intestinal ou são levados pelo fluxo sanguíneo para o fígado (Boros & Warren, 1970). Esses ovos retidos

(variando de 20 a 60% do total de ovos produzidos) representam um estímulo antigênico potente e contínuo, sendo circundados por células características da resposta inflamatória do hospedeiro originando o granuloma. Foram identificados linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas e epitelióides, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos como as principais células participantes da resposta granulomatosa (Sandor et al., 2003; Doughty et al., 1987; Moore et al., 1977; Warren et al., 1967). Acredita-se que a formação do granuloma seja uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos T sensibilizados por antígenos liberados pelo ovo (Sandor et al., 2003). A fibrose que se desenvolve em torno das ramificações da veia porta bloqueia a circulação sanguínea gerando hipertensão com congestão e edema no intestino e baço, e consequente esplenomegalia. A sobrecarga induz a formação de varizes esofagianas sujeitas à ruptura e hemorragias graves (Rey, 1991).

Observa-se, no decorrer da infecção por *S. mansoni*, uma redução gradual e espontânea do tamanho da inflamação granulomatosa ao redor dos ovos que continuamente são retidos, fenômeno denominado de modulação. As respostas vigorosas contra os antígenos dos ovos são moduladas e a infecção entra em uma fase crônica assintomática que, na maioria das vezes, persiste durante o curso da infecção (Colley, 1987; Andrade & Warren, 1964).

O *S. mansoni*, e seus produtos, são claramente capazes de ativar células dendríticas e esta interação é crucial no direcionamento da ativação dos linfócitos T e subsequente imunidade do hospedeiro à infecção (Angeli et al., 2001, Sato & Kamiya 1995; Dean et al., 1983). Observa-se que a exposição cutânea de cobaias a cercárias, normais ou atenuadas, de *S. mansoni* causa uma mudança na morfologia e distribuição de células de langerhans residentes no local da exposição. Durante o evento, ocorre um efluxo de células de langerhans da epiderme em direção aos linfonodos e o recrutamento de novos precursores de células dendríticas provenientes da corrente sanguínea (Sato et al., 1997; Sato & Kamiya 1995). O influxo de células nos linfonodos atinge um pico no 4º dia após a exposição, observando um número sensivelmente maior quando as cobaias eram expostas a cercárias atenuadas (Sato & kamiya 1998).

Neste modelo, o influxo de células dendríticas aos linfonodos é acompanhado por uma resposta proliferativa de linfócitos T. A resposta desencadeada por larvas atenuadas apresenta-se mais potente e prolongada (2-12

dias após infecção) em relação a larvas normais (3-8 dias após infecção) (Sato & Kamiya, 1998; Sato & kamiya, 1995). Em contrapartida, a disfunção no recrutamento de células dendríticas à epiderme ou linfonodo contribui para a falha da indução de resposta imune protetora seguido da vacinação com cercárias atenuadas (Sato & kamiya, 2001).

Em contraste, Angeli *et al.*, demonstraram que o *S. mansoni* é capaz de interferir no estado de ativação e habilidade migratória das células dendríticas. Os esquistossômulos residentes na epiderme do hospedeiro ativam as células de Langerhans locais, porém, inibem o padrão migratório em direção aos linfonodos. Observou-se que a presença de PGD₂, um dos produtos de secreção do esquistossômulo, inibe o processo de efluxo das células de Langerhans da epiderme mediada pelo fator inflamatório TNF α e subsequente acumulação nos linfonodos. Esse processo é transiente e perdura pelo tempo em que a fase juvenil do verme permanece na epiderme (Angeli *et al.*, 2001).

O *S. mansoni* induz o desenvolvimento de linfócitos T auxiliares com fenótipos Th1 ou Th2 através de seus efeitos sobre a ativação das células dendríticas (Jong *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1994). Camundongos infectados com esse parasita montam uma forte resposta Th2 essencial para a sobrevivência do hospedeiro (Brunet *et al.*, 1997). Análises detalhadas da resposta imune revelaram que os antígenos principais que dirigem a resposta Th2 são solúveis e liberados pelo ovo do verme (Jong *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1994; Pearce *et al.*, 1991). Extrato antigênico solúvel do ovo do *S. mansoni* (SEA) induz a ativação de células dendríticas que por sua vez direcionam a polarização de linfócitos Th2 (Jong *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2001). Observou-se que a molécula OX40L presente na superfície de células dendríticas, ativadas por SEA, é o principal fator indutor de células Th2 (Jong *et al.*, 2002).

Por outro lado, os componentes antigênicos do SEA conjugados a carboidratos são essenciais para polarizar a resposta Th2 induzindo a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e anticorpos IgE contra esse extrato. A desglicolisação do SEA através do tratamento com periodato foi capaz de anular essa habilidade (Okano *et al.*, 1999). O carboidrato LNFPIII (Lacto-N-fucopentaose III), componente predominante do SEA, conjugado covalentemente a albumina humana induz uma resposta específica com fenótipo Th2 (Okano *et al.*, 2001).

Recentemente, foi purificado um componente glicoprotéico antigênico do SEA, denominado de IPSE (do inglês: “*IL-4-inducing principle from S. mansoni eggs*”), com característica de provocar a produção de altas quantidades de IL-4 através da ativação de basófilos provenientes de doadores saudáveis, sendo assim, um provável polarizador da resposta Th2 (Schramm et al., 2003). Da mesma forma, glicoproteínas que possuem motivos de carboidratos alfa 3-fucose e beta 2-xilose geram uma forte resposta Th2 em camundongos e esses motivos de carboidratos mostraram-se importantes na indução dessa resposta (Faveeuw et al., 2003). A identificação de um receptor de lecitina denominado de DC-SIGN/CD209 (do inglês: “*DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*”), específico para motivos de carboidratos que possuem manose e fucose e são capazes de conjugarem-se a glicoproteínas de extrato solúvel do *S. mansoni* (SWAP), corroboram com a importância dos glicoconjugados na indução de resposta imune específica contra o parasita (Appelmelk et al., 2003). Da mesma forma, indícios sugerem um papel central de glicolípideos presentes no SEA, apresentados alternativamente via CD1d, na indução de uma resposta Th2 no decorrer da infecção por *S. mansoni* (Faveeuw et al., 2002).

1.4 Indução de imunidade protetora contra a esquistossomose

Até o momento, a esquistossomose tem sido efetivamente tratada com a utilização de quimioterápicos. O praziquantel é a droga escolhida para o tratamento da doença humana. Embora seu mecanismo de ação não tenha sido precisamente esclarecido, é sabido que esse composto induz influxo de cálcio no *S. mansoni* causando uma rápida e subsequente contração muscular (Redman et al., 1996). Apesar do aparente sucesso quimioterápico, é consenso a importância dada ao desenvolvimento de uma vacina anti-esquistossomótica de modo a reduzir a morbidade e a mortalidade associadas a essa patologia. A busca de novas estratégias de controle da doença se deve, em parte, a descoberta de cepas de *S. mansoni* resistentes ao praziquantel (Ismail et al., 1999; Kusel & Hagan, 1999).

O processo interativo entre o *S. mansoni* e o hospedeiro definitivo têm sido exhaustivamente estudado em humanos e modelos experimentais definidos. O desvendar da imunidade ao verme gerou a possibilidade de obter-se vacinas que objetivam induzir proteção a infecção pelo *S. mansoni*. Desta forma, as primeiras

abordagens de vacinas, que utilizavam formas evolutivas atenuadas do verme, foram substituídas pela caracterização de antígenos definidos como candidatos em potencial. Uma seleção de seis antígenos definidos, cujos genes já foram clonados e extensivamente caracterizados, foram incluídos no esforço conjunto da WHO/TDR em busca da vacina definitiva para a esquistossomose. Os antígenos compreendem em cinco proteínas intracelulares – glutationa S-transferase (28kDa), Paramiosina (97 kDa), IrV-5 (62 kDa), Triose fosfato isomerase (TPI-28 kDa) e Sm14 (14 kDa) – e apenas uma proteína integral de membrana – Sm23 (23kDa) (Bergquist 1995; Bergquist & Colley 1998). Porém, experimentos iniciais que visaram quantificar a resposta imune protetora apresentado por estes antígenos individualmente em murinos não apresentaram dados satisfatórios revelando a necessidade do contínuo processo em busca de novos antígenos (Bergquist & Colley 1998).

Dentro desse contexto, Hirsch & Goes, caracterizaram a fração PIII obtida a partir do extrato antigênico de verme adulto do *S. Mansoni* fracionado por cromatografia de troca iônica (Hirsch & Goes, 1996). Em camundongos imunizados, a fração PIII foi capaz de induzir uma alta resposta imune protetora evidenciado por ELISA, ensaios de proliferação celular e pelo número de vermes recuperados frente à infecção experimental com *S. mansoni*. (Hirsch et al., 1997). Foi demonstrado também que, em ensaios de indução de granuloma *in vitro*, a fração PIII gerou os menores granulomas comparados aos controles e demais frações, além de induzir o fenômeno de modulação dos granulomas hepáticos e pulmonares em camundongos imunizados (Hirsch & Goes, 1996; Hirsch et al., 1997). Estes dados levantaram o interesse em individualizar os componentes da fração PIII responsáveis pelos fenômenos de proteção e modulação dos efeitos patogênicos da esquistossomose. Deste modo, através de cromatografia de afinidade foi possível purificar a proteína denominada P24 (Gustavson et al., 1998). A imunização de camundongos com P24 e posterior infecção experimental causou uma redução de 67% de parasitas recuperados após a perfusão hepática e sensível redução do tamanho do granuloma hepático, efeito correlacionado a presença de IL-10 e óxido nítrico (Zouain et al., 2000; Oliveira et al., 1999; Gustavson et al., 1998). Foi verificada a reprodutibilidade dos resultados *in vitro* com PBMC humanos portadores da fase crônica da doença (Zouain et al., 2002). Usando outra abordagem, Gustavson e colaboradores descrevem a indução de imunidade

específica protetora e modulação granulomatosa em camundongos imunizados com macrófagos peritoneais carregados com PIII evidenciando a provável importância de células apresentadoras de antígenos na geração deste fenômeno (Gustavson et al., 2002).

Vacinas baseadas na expressão de genes de antígenos recombinantes (denominadas de vacinas de DNA) tem aberto uma nova era no processo de vacinação pela fácil formulação e produção (Fynan et al., 1993; Waine & McManus 1995). Essa estratégia tem sido usada em ensaios experimentais para avaliar a indução de imunidade protetora contra a esquistossomose. Da'dara e colaboradores (2002) descrevem a indução de imunidade humoral protetora específica, com a redução média de 42% de vermes, em camundongos imunizados com plasmídeos contendo o gene para a proteína Sm23. Da mesma forma, ensaios de imunização com o gene Sm32 induzem imunidade humoral específica além do efeito anti-fecundidade observado pela redução da deposição de ovos frente à infecção experimental com o parasita (Chlichlia et al., 2002).

A vacina de DNA se tem mostrado promissoras como alternativas às tecnologias existentes, porém, a eficácia da imunização esta relacionada às células transfectadas nos processos de imunização, envolvendo diretamente as células dendríticas (Steinman & Pope 2002; Cochlovius et al., 2002). Sendo assim, o crescente conhecimento de células dendríticas no processo da imunidade gerou o conceito destas como adjuvantes naturais, alvos para potencializar a resposta imune protetora. Estratégias que visam direcionar a transfecção para as células dendríticas e ativação das mesmas potencializam o processo de aquisição de imunidade. O presente trabalho se propõe a conjugar as duas vertentes atuais, vacinas de DNA e células dendríticas como adjuvantes. Esta abordagem visa produzir uma vacina celular *ex vivo* usando células dendríticas transfectadas com genes de antígenos do *S. mansoni*. Desta forma, nossos esforços se concentram no desenvolvimento de novas estratégias de imunidade protetora contra a esquistossomose, além de promover a identificação de novos antígenos candidatos a vacinas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produção e caracterização de células dendríticas de camundongos e sua utilização para a expressão de antígenos do *S. mansoni*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Seleção de antígeno recombinante da biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* pelo método de ELISA.

2.2.2. Estabelecimento do cultivo primário de células dendríticas da medula óssea murina.

2.2.3. Transfecção das células dendríticas com Rho1 GTPase e RHO^{ct} de *S. mansoni*.

2.2.4. Determinação da expressão de Rho1 GTPase e RHO^{ct} em células dendríticas transfectadas.

3. Metodologia

3.1. Produção de antígenos solúveis e obtenção de anticorpos policlonais

3.1.1. Produção de antígeno solúvel do verme adulto de *Schistosoma mansoni* (SWAP)

Camundongos BALB/c fêmeas entre 8 e 10 semanas de idade, adquiridos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), foram infectados, através de exposição cutânea, com 100 a 150 cercárias de *S. mansoni* cepa LE. Com o intuito de recuperar os vermes adultos, após 45 dias, os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático usando solução salina (1,17% NaCl) acrescido de 50 U/L de heparina (Smithers & Terry, 1965). Estes foram lavados três vezes com 0,15 M de tampão fosfato salina pH 7,2 (PBS) e conservados a -20°C .

Em seguida, os vermes adultos de *S. mansoni* foram submetidos à trituração mecânica em potter e o macerado centrifugado a 37,000 rpm por 1 hora a 4°C (Ultracentrífuga Sorvall OTD5B, rotor T875). O sobrenadante recuperado, SWAP, teve seu conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e alíquotas armazenadas a -70°C .

3.1.2. Produção de antígeno solúvel de *Escherichia coli* XLOLR

Células de *E. coli* XLOLR foram inoculadas em 100 mL de meio Lúria Bertani (LB) e cultivadas a 37°C , sob agitação constante (150 rpm), até a fase estacionária. Esta cultura foi centrifugada a $1,000 \times g$ por 10 minutos e a massa de células retida foi recolhida em 10 mL de 0,1 M de borato de sódio pH 8,0 contendo 1 M de NaCl. A suspensão de *E. coli* foi incubada com 5 mg de lisozima à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi acrescentado ao extrato 0,1 mg de DNase I pancreática e 20 μL de Triton X-100 e este foi incubado a 4°C por 1 hora. O lisado celular foi centrifugado a $1,000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante recolhido teve o pH ajustado para 9,0 com 1 N de NaOH. O antígeno solúvel de XLOLR foi alíquotado e acondicionado a -20°C .

3.1.3. Produção de Antígeno Solúvel de Fago λ

Uma amostra de 1 μL de fago λ foi adicionada à 200 μL de suspensão de *E. coli* XLOLR, homogeneizada e incubada a 37°C por 15 minutos. Em seguida, esta

suspensão foi adicionada a 3 mL de meio LB ágar 0,75%, homogeneizada e distribuída uniformemente sobre meio LB ágar 1,5% em placa de petri. A placa foi incubada a 37°C por 16 horas e, após este período, foram adicionados 4 mL de tampão SM (0,05 M de Tris-HCl contendo 10 mM de MgSO₄•7H₂O e 0,01% gelatina). A placa foi incubada sob agitação constante a 4°C por 12 horas. O tampão SM contendo o fago λ foi recolhido e acondicionado com clorofórmio a 4°C.

3.1.4. Obtenção de mistura de anticorpos anti-SWAP de pacientes humanos com esquistossomose

Alíquotas de soros humanos provenientes de pacientes de ambos os sexos e diferentes faixas etárias, que apresentavam quadro clínico de esquistossomose na fase clínica devidamente confirmados por equipes médicas e técnicas responsáveis através de exames médico – laboratoriais, foram reunidas em uma única amostra conservada a -20°C.

Os doadores foram conscientizados de que o sangue coletado seria utilizado em pesquisa básica com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a esquistossomose e que esta colaboração não lhes traria retorno imediato.

A metodologia e soros correspondem aos mesmos utilizados na dissertação de doutorado da Cláudia Soares Zouain, sendo aprovado pela Comissão de Ética do ICB/UFMG (Anexo 2).

3.1.5. Produção de imunoglobulinas policlonais anti-SWAP em coelho

Um coelho New Zeland (*Oryctolagus cuniculus*) com 3 meses de idade, adquirido junto à escola de Veterinária da UFMG, foi imunizado com SWAP. O procedimento de imunização consistiu de três injeções intramusculares, intercaladas por um período de 15 dias, com 200 µg de antígeno em emulsão com adjuvante completo de Freund na primeira imunização e nas subsequentes com adjuvante incompleto de Freund.

Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia auricular antes de cada injeção. Quinze dias após a terceira imunização, o sangue total foi obtido através de punção cardíaca e o soro armazenado a -20°C. A reatividade dos soros obtidos foi monitorado através de ensaios de ELISA.

3.1.6. Acoplamento de SWAP à resina CNBr Sepharose-4B

O acoplamento de SWAP à resina CNBr Sepharose-4B (Sigma) foi realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

3.1.7. Precipitação de imunoglobulinas humanas com sulfato de amônio

As imunoglobulinas da mistura de soros de pacientes foram precipitadas adicionando-se solução saturada de sulfato de amônio (concentração final de 50% v/v).

Foi adicionado à mistura de soros humanos, resfriado a 4°C e sob agitação constante, igual volume de solução saturada de sulfato de amônio. Após 1 hora de descanso em banho de gelo, esta mistura foi centrifugada a 5,000 × g a 4°C por 10 minutos. O precipitado foi ressuspendido completamente em solução de 50% de sulfato de amônio e centrifugado novamente. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida, as imunoglobulinas precipitadas foram solubilizadas em água deionizada, dialisadas contra PBS e acondicionadas a -20°C.

Os soros humanos utilizados foram provenientes da dissertação de Doutorado da Cláudia Soares Zouain e sua obtenção foi aprovada pela Comissão de Ética do ICB/UFMG (Anexo 2).

3.1.8. Purificação de Imunoglobulinas humanas anti-SWAP por Cromatografia de Afinidade

Com o intuito de eliminar contaminantes da solução de imunoglobulinas precipitadas de soros de pacientes, estas foram purificadas por cromatografia de afinidade.

A coluna de resina sepharose-4B acoplada a SWAP foi montada no sistema de cromatografia “Econo Low Pressure Chromatography System” (Biorad) e as amostras foram submetidas ao processo de purificação. A solução foi aplicada a coluna e as imunoglobulinas ligadas à matriz eluídas com tampão 0,1 M glicina-HCl pH 2,5 e, posteriormente, o pH foi neutralizado com tris (hidroximetil) aminometano. Em seguida, as imunoglobulinas purificadas foram liofilizadas, solubilizadas em água deionizada, dializadas contra PBS e acondicionadas a -20°C.

As imunoglobulinas livres de contaminantes tiveram suas reatividades antigênicas específicas caracterizadas e avaliadas por ELISA.

3.1.9. Dosagem protéica pelo método de Bradford

A cada poço de uma placa de microtitulação (Nunc) foram adicionados 20 μL da amostra a ser dosada e 180 μL de reagente de Bradford — 0,1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa com 5% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido fosfórico (filtrado em papel filtro número 1). Juntamente com as amostras, uma curva-padrão de 0,5 a 1,5 μg de proteína/20 μL foi feita utilizando-se uma solução padrão de albumina de soro bovina (Sigma). A preparação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz e os valores de absorbância determinados a 600 nm em leitor de ELISA (Elx 800, Bio-tek Instruments Inc.). A concentração protéica da amostra foi determinado empregando a equação da curva padrão, calculado pelo pacote estatístico MicroCal Origin V. 5.0.

3.1.10. ELISA indireto (do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”)

Conforme técnica descrita por Lunde *et al.* (1979), placas de microtitulação MaxiSorp™ Surface (Nunc) foram sensibilizadas com 1 μg de Ag/poço em tampão 0,05 M de carbonato/bicarbonato pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio foi realizado com 1,6% caseína em PBS contendo 0,05% Tween 20 à temperatura ambiente por 1 hora. Após nova lavagem, solução de anticorpos específicos ou antisoros, devidamente diluídos em PBS contendo 0,25% caseína, foram incubados a 37°C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas a 37°C por 1 hora com anti-Imunoglobulinas específicas conjugadas à peroxidase. As placas foram novamente lavadas e 100 μL de um tampão 0,15 M de citrato/fosfato pH 5,0 contendo 0,034% de ortofenilendiamino (OPD) e 2 μL de 32% H_2O_2 foram adicionados aos poços. A revelação foi interrompida, após 5 a 20 minutos de reação ao abrigo da luz, adicionando-se 20 μL /poço de ácido sulfúrico 2N. A leitura dos valores de absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek, Instruments Inc.).

Controles positivos e negativos foram devidamente realizados assim como ensaios sem antígeno e anticorpos como controle da adsorção inespecífica do conjugado.

3.2 Seleção de clones com cDNA codificadores para antígenos recombinantes de verme adulto do *S. mansoni*.

3.2.1. Biblioteca de cDNA unidirecional de verme adulto de *Schistosoma mansoni*

A biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni*, clonada no vetor Lambda ZAP II (Stratagene), foi gentilmente cedida pela Dra. Gloria Regina Franco do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG (Franco *et al*, 1995).

3.2.2. Excisão *in vivo* do vetor fagomídeo pBluescript SK

Uma colônia isolada de *E. coli* XL1-Blue MRF' e uma de *E. coli* XLOLR foram inoculadas separadamente em meio LB suplementado com 10mM de MgSO₄ e 0,2% de maltose, e crescidas sob agitação a 37°C por 16 horas. As culturas foram centrifugadas a 1,000 × g por 10 minutos e a densidade óptica das células XL1-Blue MRF' e XLOLR foi corrigida à DO_{600nm} 1,0 (8 × 10⁸ células/mL) com 10mM de MgSO₄.

Conforme instruções do fabricante (manual do ZAP-cDNA Synthesis Kit, Stratagene), 1 μL da biblioteca amplificada (3 × 10⁷ ufp) e 30μL do fago helper ExAssist (3 × 10⁹ ufp) foram misturados à 3,7 mL de suspensão de células XL1-Blue MRF' (3 × 10⁸ células) e esta foi incubada à 37°C por 15 minutos. Em seguida, 5 mL de meio LB foram acrescentados e a mistura foi novamente incubada à 37°C, sob agitação, por 2,5 horas. Após este período, a cultura foi aquecida à 70°C por 20 minutos e, posteriormente, centrifugada a 1,000 × g por 10 minutos. O sobrenadante foi diluído em tampão SM (10⁻¹ a 10⁻⁶) e 1 μL de cada diluição foi misturada, cada qual, à uma alíquota de 200 μL de suspensão de células XLOLR. Após uma incubação de 15 minutos à 37°C, a mistura foi distribuída em placas de petri com meio ágar LB contendo 100 μg/mL ampicilina e incubadas a 37°C por 16 horas. O título em ufc/mL foi calculado empregando-se a fórmula:

$$\frac{\text{Número de colônias (ufc)} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume plaqueado (\mu L)}} \times 1000 \mu\text{L/mL}$$

3.2.3. Seleção aleatória de clones através da estratégia de discriminação de cor azul/branco, indução e preparo de extrato antigênico

Após a titulação do Fagomídeo pBluescript excisado, células XLOR contendo o plasmídeo pBluescript foram semeadas em meio LB ágar, acrescido de 100 µg/mL ampicilina, 200 µg/mL X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), 250 µg/mL IPTG (Isopropylthiogalactoside), e incubadas a 37°C por 16 horas. Colônias de cor branca isoladas foram recolhidas da placa de origem com o auxílio de uma ponteira de plástico estéril e transferidas separadamente para 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL ampicilina e 0,5 mM IPTG. Estas culturas foram crescidas a 37°C, sob agitação (150 rpm), por 12 horas. Após este período, a cultura foi centrifugada a 1,600 × g durante 5 minutos a 4°C e as células XLOR transferidas para 0,5 mL de PBS acrescido de 0,5 mM de PMSF. A suspensão foi sonicada a 4°C, centrifugada a 1,600 × g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante acondicionado a -70°C. O mesmo procedimento foi realizado com colônias azuis para obtenção de extratos protéicos negativos.

3.2.4. ELISA de Captura do extrato antigênico de clones

Placas de microtitulação MaxiSorp™ Surface (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL de imunoglobulina humana anti-SWAP diluída à concentração final de 0,01 µL/poço em PBS por 16 horas a 4°C. Após a adsorção, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio foi realizado com 1,6% caseína em PBS contendo 0,05% Tween 20 à temperatura ambiente por 1 hora. Após nova lavagem, 100 µL dos extratos de XLOR induzidas foram incubados, em duplicata, a 37°C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas a 37°C por 1 hora com 100 µL de soro de coelho anti-SWAP diluído 1:100 em PBS contendo 0,25% de Caseína. Após lavagem, foi acrescentado anticorpos de cabra anti-IgG de coelho, diluído 1:10,000, conjugada a peroxidase e incubou-se a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente lavadas e 100 µL de tampão 0,15 M de citrato/fosfato pH 5,0 contendo 0,034% de ortofenilenodiamino (OPD) e 2 µL de 32% H₂O₂ foram adicionados aos poços. A revelação foi interrompida, após 20 minutos de reação ao abrigo da luz, adicionando-se 20 µL/poço de ácido sulfúrico 2N. A leitura dos valores de absorbância foi realizada a 495 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek, Instruments Inc.).

Foi estabelecido como controle positivo a reatividade dos anticorpos ao SWAP e controles negativos a reatividade a extratos antigênicos de *E. coli* XLOR, Fago λ e clones sem inserto induzidos a expressão de β -galactosidase. Foram realizados ensaios sem antígenos e anticorpos como controle da adsorção inespecífica do conjugado.

3.2.5. Purificação de DNA plasmidial

Os cDNAs selecionados foram multiplicados em *E. coli* XLOR cultivadas em 5 mL de meio LB-ampicilina a 37°C durante 16 horas, sob agitação. O DNA plasmidial foi extraído com o auxílio do “Qiaprep spin MiniPrep Kit” (Qiagen) conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.6. Sequenciamento parcial das extremidades 5' e 3' de cDNAs

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método da terminação da cadeia de DNA por incorporação de didesoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977) fazendo-se uso dos iniciadores senso – 5' CAGGAAACAGCTATGAC3' (M13R) – e antisense – 5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA3' (M13U) – conforme instruções do “ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (PE Applied Biosystems).

Após o sequenciamento cíclico* realizado em um aparelho controlador térmico programável da MJ Research, os produtos foram submetidos à eletroforese por capilaridade, no “ABI Prism 310 Genetic Analyzer” da PE Applied Biosystems, empregando-se a resina Pop 6.

* Descrição do sequenciamento cíclico:

- um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos;
- três ciclos iniciais de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos;
- quatro ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos;
- seguidos de 31 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos;
- um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

3.2.7. Análise de dados, pesquisa de homologia

Os dados de cada seqüência foram exportados para o programa Chromas v2.13 - Technelysium Pty (www.technelysium.com.au) e editados. Os cromatogramas foram inspecionados visualmente e aqueles apresentando baixa qualidade foram descartados; ambigüidades foram corrigidas quando possível; seqüências pertencentes ao vetor e cauda poli-A foram eliminadas manualmente. As ASTs editadas foram comparadas em nível protéico às seqüências depositadas no banco de dados “Nonredundant GenBank Protein” do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se o algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). As homologias apresentando “ $E \leq 10^{-5}$ ” (Nelson *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2001) foram consideradas significativas e após meticulosa inspeção visual da significância biológica do pareamento, as ASTs foram classificadas como genes supostamente identificados de *S. mansoni*. Por fim, ASTs que não possuíam qualquer homologia foram classificados como genes desconhecidos.

3.3. Preparação de cDNA de antígeno recombinante de SWAP para expressão em célula eucariota de mamífero

3.3.1. Preparação de bactérias *Escherichia coli* DH5 α quimicamente competentes

A exposição prolongada das células de *E. coli* DH5 α a íons de cálcio as tornam competentes à aquisição de DNA exógeno (Dagert & Erlich, 1974).

Uma colônia de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 10 mL de meio LB e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação constante (200 rpm). Após o tempo de incubação, 4 mL desta cultura foi transferida para 400 mL de meio LB contido em um erlenmeyer de 2 litros. Novamente, a cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante (200 rpm) até o princípio da fase log ($DO_{590} = 0,375$). Em seguida, alíquotas de 40 mL foram mantidas em tubos estéreis de propileno por 10 minutos em banho de gelo. As células foram centrifugadas a $1.600 \times g$ por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e cada sedimento gentilmente ressuspendido em 10 mL de solução de cloreto de cálcio (60 mM de $CaCl_2$, 15% de glicerol, 10 mM de HEPES, pH 7,0; esterilizado por autoclavagem) mantido resfriado em banho de gelo. As células foram centrifugadas a $1.100 \times g$ por 5 minutos a 4°C, o

sobrenadante foi descartado, cada sedimento ressuspensionado em 10 mL de solução de cloreto de cálcio gelada e a suspensão incubada por 30 minutos em banho de gelo. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a $1100 \times g$ por 5 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado, cada sedimento ressuspensionado em 2 mL de solução de cloreto de cálcio gelada e a suspensão mantida em banho de gelo por 24 h. Alíquotas de 250 μL foram conservadas a -70°C .

3.3.2. Transformação de células de *E. coli* quimicamente competentes com DNA plasmidial

Células de *E. coli* quimicamente competentes são eficientemente transfectadas com DNA plasmidial por choque térmico (Mandel & Higa, 1970). Sendo assim, 100 ng de DNA plasmidial, em um volume que varia de 10 a 25 μL , foram transferidos para um tubo – teste de fundo côncavo, acrescentou-se 100 μL de suspensão de células competentes e a reação foi incubada por 10 minutos em banho de gelo. Após o tempo de incubação, a reação foi transferida para um banho – maria à temperatura de 42°C , rigorosamente, por 2 minutos. Foram acrescentados 250 μL de meio LB e incubou-se a 37°C por 1 hora sob agitação constante (200 rpm). A cultura foi plaqueada em meio LB ágar contendo o antibiótico apropriado à resistência conferida pelo plasmídeo, incubou-se a 37°C por 16 horas.

Controles sem DNA plasmidial ou bactérias quimicamente competentes foram devidamente realizados para verificar a presença de contaminantes na reação.

3.3.3. Clonagem do inserto do clone SmAST03 no plasmídeo pcDNA 3.1 +

O inserto do clone SmAST03 foi escolhido para a expressão em células dendríticas, este codifica a porção carboxi terminal (C-terminal) da proteína Rho1 GTPase de *S. mansoni*. Para isso, o inserto foi transferido do plasmídeo pBluescript para o pcDNA 3.1 + (Invitrogen) de expressão em células eucariotas. O processo de clonagem consistiu em três etapas:

3.3.3.1. Amplificação do inserto RHO^{ct} por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com o intuito de amplificar a porção codificadora (RHO^{ct}) do inserto do clone SmAST03 contido no plasmídeo pBluescript, este foi submetido a reação em cadeia

da polimerase (PCR) fazendo-se uso dos iniciadores senso – 5'CCCGGGGATCCTATGTATGCCTTCTTTGAGTGTTTCAGC3' (RHO^{ct}F) – e antisenso – 5'TAGAGGGATCCCCTCAAATTAATCACACCTCCTCCTC3' (RHO^{ct}R) – que possuem sequência específica reconhecida pela enzima de restrição BamHI (sequência em itálico e sublinhada).

Uma quantidade de 20 ng do plasmídeo específico foi adicionado a 25 µL da mistura de reação (2,5 µmol de cada iniciador/reação, 1 u Taq DNA polimerase/reação, 25mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9,2, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 0,1mM Mistura de desoxirribonucleotídeos) e submetida ao seguinte programa no “PTC-100 Programmable Thermal Controller” da MJ Research:

1. 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos.
2. 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.
3. 1 ciclo final de extensão a 72°C por mais 10 minutos.

O produto da reação foi visualizado em gel de agarose 2% contendo 0,4 µg/mL de brometo de etídeo e comparado ao padrão de 100 pares de base (Invitrogen). A banda correspondente ao inserto (147 pares de base) foi excisado do gel de agarose, o DNA recuperado com o auxílio do “Qiaex II gel extraction Kit” (Qiagen), segundo protocolo recomendado pelo fabricante, e conservado a –20°C.

3.3.3.2 Clonagem do produto de PCR da RHO^{ct} no plasmídeo PCR 2.1 Topo

O plasmídeo de replicação, em células procariotas, PCR 2.1 topo (Invitrogen) possui um sistema único de clonagem baseado na presença de topoisomerase I covalentemente ligado, produtos de PCR podem ser facilmente clonados neste sistema. Sendo assim, 1 µL do produto de PCR purificado do SmAST03 foi usado na reação de ligação do plasmídeo PCR 2.1 topo de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Um volume de 5 µL desta reação de ligação foi utilizado em ensaio de transformação de células de *E. coli* DH5α. Foram selecionadas, 5 colônias positivas, para a presença de plasmídeo contendo o inserto (PCR2.1/RHO^{ct}), identificados em ensaios de PCR utilizando os iniciadores RHO^{ct}F, RHO^{ct}R, M13R, M13U e programa descrito no item anterior.

Cada colônia positiva foi amplificada em 100 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e o DNA plasmidial extraído com o auxílio do “Qiaprep spin Midiprep Kit” (Qiagen) segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

O inserto foi recuperado do plasmídeo através de digestão enzimática utilizando a enzima de restrição BamHI. Desta maneira, 500 ng de cada plasmídeo PCR2.1/RHO^{ct} foram adicionados a 100 µL da mistura de reação (30 u/reação BamH I, 50 mM/reação de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM/reação de MgCl₂, 100 mM/reação de NaCl, 200/reação µg/mL de BSA) e incubou-se a 37°C por 4 horas. Os produtos da digestão enzimática de PCR2.1/RHO^{ct} foram visualizados em gel de agarose 2% contendo 0,4 µg/mL de brometo de etídeo e comparados ao padrão 100 pares de base (Invitrogen). A banda correspondente ao inserto (RHO^{ct}/BamHI, 132 pb) foi excisado do gel de agarose, o DNA foi recuperado com o auxílio do “Qiaex II gel extraction Kit” (Qiagen), segundo protocolo recomendado pelo fabricante, e conservado a -20°C.

3.3.3.3 Clonagem de RHO^{ct} no plasmídeo pcDNA3.1+

O inserto RHO^{ct}/BamHI, produto da digestão do plasmídeo PCR2.1/RHO^{ct}, foi clonado no plasmídeo pcDNA3.1+. Este plasmídeo possui a capacidade de replicar-se e expressar genes em células eucariotas.

Uma quantidade de 5 µg de plasmídeo pcDNA 3.1+ foi adicionado a 100 µL da reação de digestão com a enzima de restrição BamH I (30 u/reação BamH I, 50 mM/reação de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM/reação de MgCl₂, 100 mM/reação de NaCl, 200µg/mL de BSA) e incubou-se a 37°C durante 4 horas. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% contendo 0,4 µg/mL de brometo de etídeo e comparado ao padrão Lambda Hind III (Invitrogen). A banda correspondente ao plasmídeo linearizado (pcDNA3.1/BamHI) foi excisado do gel, com uma lâmina de bisturi, e o DNA purificado com o auxílio do “Qiaex II gel Extraction Kit”.

Foi adicionado 200 ng/reação de pcDNA3.1/BamHI com 1 a 18 ng/reação de RHO^{ct}/BamHI em 20 µL da reação de ligação (1u/reação de DNA T4 Ligase, 50 mM/reação de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM/reação de MgCl₂, 1 mM/reação de ATP, 1 mM/reação de DTT, 5%(w/v)/reação polietileno glicol-8000) e incubou-se a 16°C por 18 horas. Após o tempo de incubação, as reações foram misturadas em apenas uma única amostra e o produto de ligação precipitado com 2 × o volume de etanol 95% e 100 mM de acetato de potássio a -80°C durante 2 horas. Em seguida, centrifugou-se a 12,000 × g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70%. Após nova centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo o produto de ligação pcDNA3.1/RHO^{ct}, foi ressuspendido em 5 µL de água MiliQ.

A totalidade do volume da reação de ligação foi utilizado em ensaio de transformação de células de *E. coli* DH5α quimicamente competentes. Foram selecionados 2 colônias de *E. coli* positivas para a presença do plasmídeo pcDNA3.1/RHO^{ct}, as bactérias foram amplificadas em 100 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e o DNA plasmidial extraído com auxílio do “Qiaprep spin Midiprep Kit”. A confirmação da clonagem foi realizada através de ensaios de PCR utilizando os iniciadores RHO^{ct}F, RHO^{ct}R, BGHR (5´TAGAAGGCACAGTCGAGG3´) e programa descrito no item 3.3.3.1. O sequenciamento do sítio de múltipla clonagem do plasmídeo foi efetuado para verificar a conservação da sequência do inserto RHO^{ct}, utilizou-se o iniciador BGHR e protocolo descrito no item 3.2.6. A sequência encontrada foi comparada às seqüências depositadas no banco de dados “Nonredundant GenBank Protein” do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se o algoritmo BLASTX e BLASTN.

3.3.4. Clonagem de Rho1 GTPase de *S. mansoni* no plasmídeo DsRed2

Com o intuito de realizar a expressão da proteína SmRho1 GTPase (NCBI: AF140785) em células dendríticas, a sequência gênica desta foi clonada no plasmídeo Ds2Red (Clontech). Para tanto, seguiu-se os mesmos passos realizados nos itens 3.3.3 fazendo-se uso dos iniciadores senso – 5´GCCCGGGATCC AACCATGGCGAGTGCGGTACGTAAGAAAC3´ (Rho1F) – e antisense – 5´GACCG GTGGATCCCGAATTAAATCACACCTCCTCCTC3´ (Rho1R) – para amplificar o gene previamente clonado no plasmídeo Pmal C2X (NE BioLabs), gentilmente cedido por Carlos Renato Machado do Lab. de Genética Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG.

3.4. Expressão heteróloga de Rho1 GTPase do *S. mansoni* em sistema procarioto

A sequência codificadora da proteína Rho1 GTPase foi clonada no plasmídeo Pmal C2X (PmalC2/Rho1) em fusão com o gene *malE* codificador para a proteína MBP (Santos, 2000).

3.4.1. Expressão de Rho1 GTPase em fusão com MBP

A expressão utilizando PmalC2X/Rho1 foi realizada segundo manual do fabricante (NE BioLabs). Desta forma, 500 mL de LB contendo 0,2% de glicose e 100 µg/mL de ampicilina foi inoculado com 10 mL de uma cultura saturada de bactérias contendo o plasmídeo recombinante, incubou-se a 37° C sob agitação (200 rpm). No instante em que as células obtiveram um crescimento de, aproximadamente, 2×10^8 células/mL ($A_{600} \sim 0,5$), foi acrescentado 0,6 mM de IPTG, incubou-se por mais 4 horas a 37° C sob agitação.

As células foram recuperadas por centrifugação a 4000 g por 10 minutos e o sedimento ressuspendido em 50 mL de tampão da coluna (20 mM de Tris HCl pH 7,4, 200 mM de NaCl, 1mM EDTA, 10 mM de 2-Mercaptoetanol, 1mM de azida). As células foram rompidas por 3 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria a 37° C) seguido por sonicação: 3 pulsos de 10 segundos com intervalos de 5 segundos a 30% de amplitude (Ultrasonic Processor GEX 600, CE). A suspensão foi centrifugada a 9000 g por 30 minutos e o sobrenadante conservado a - 20° C.

3.4.2. Cromatografia de afinidade em resina de amilose

Com o objetivo de purificar Rho1 GTPase fusionada a MBP (Rho1/MBP) e eliminar as proteínas bacterianas contaminantes, os sobrenadantes de cultura, induzidas à expressão da proteína recombinante, foram submetidos a cromatografia de afinidade.

A coluna de resina de amilose (NE BioLabs) foi acoplado ao sistema cromatográfico “Econo Low Pressure Chromatography System” (Biorad) e os sobrenadantes, diluídos 1:5 em tampão da coluna, aplicados. As proteínas que ficaram retidas na matriz foram eluídas com tampão da coluna acrescido de 10 mM de Maltose. A eficiência da purificação foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS em condições desnaturantes.

3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS

Conforme Laemmli (1970), a eletroforese em gel de poliacrilamida (5 cm X 8 cm X 0,5 mm) foi realizado em condições redutoras e desnaturantes.

O gel de separação a 10% foi preparado a partir de 1,7 mL de solução estoque 30:0,8 acrilamida/bisacrilamida, 1,3 mL de 1M Tris HCl pH 8,8, 0,05 mL de

10% SDS e 2 mL H₂O deionizada. A fim de preparar o gel de aplicação e concentração da amostra 3%, 500 µL da solução de acrilamida, 380 µL de 1M Tris HCl pH 6,8, 30 µL de 10% SDS e 2,1 mL de água deionizada foram misturados. A reação de polimerização de ambos os tipos de géis foi iniciada adicionando-se persulfato de amônio e TEMED (Sigma) nas concentrações finais de 0,1% (p/v) e 0,1% (v/v), respectivamente.

Diferentes amostras de purificação da proteína fusionada foram diluídas em tampão da amostra contendo 2% SDS e 5% 2-Mercaptoetanol, homogeneizadas e fervidas durante 5 minutos para completar a desnaturação. Estas foram aplicadas no gel de poliacrilamida, imerso em tampão de corrida (0,125 M tris/glicina contendo 0,1% SDS) e submetidos a 60 V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Um padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad) foi corrido simultaneamente às amostras.

Após a eletroforese, o gel foi corado com solução 0,15% de azul de comassie R-250 sob agitação e descorado, inicialmente, com solução de 50% metanol, 10% de ácido acético e, posteriormente, com solução de 5% metanol, 7,5% ácido acético.

3.4.4. Produção de imunoglobulinas policlonais anti-Rho1/MBP em coelho

Protocolo de acordo com ítem 3.1.5.

3.5. Cultivo e caracterização de células dendríticas

3.5.1. Produção do meio condicionado de células M3

Células M3 (CR009; Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ; www.huff.ufrj.br) provenientes de adenocarcinoma murino possuem como produto de secreção GM-CSF (do Inglês “**G**ranulocyte **M**acrophage – **C**olony **S**timulating **F**actor). Uma densidade de 5×10^5 células foram semeadas em frascos T25 (Nunc) contendo 5 mL de DMEM (Gibco) acrescido de antibióticos-antimicóticos (100 u/mL de penicilina G, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 0,05 mg/mL de gentamicina e 0,25 µg/mL de anfotericina b) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). As células foram cultivadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida a 5% de CO₂ durante 3 dias. Após este período, o meio condicionado foi retirado, centrifugado a 300 × g durante 10 minutos e o sobrenadante conservado a –20°C. As células remanescentes foram

repartidas, em novos frascos, para início de um novo ciclo de produção do meio condicionado.

3.5.2. Obtenção do meio condicionado de células XR63

Células XR63 (CR044; Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ; www.huff.ufrj.br) provenientes de linfoblastoma murino são transformadas com plasmídeo pBV-1MTHA contendo sequência codificadora para Interleucina-4 (IL-4) murino que confere a secreção constitutiva desta citocina. Uma densidade de 5×10^5 células foram semeadas em frascos T25 (Nunc) contendo 5 mL de RPMI 1640 (Sigma) acrescentado de antibióticos-antimicóticos (100 u/mL de penicilina G, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 0,05 mg/mL de gentamicina e 0,25 µg/mL de anfotericina b) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). As células foram cultivadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida a 5% de CO₂ durante 3 dias. Após este período, o meio condicionado foi retirado, centrifugado a $300 \times g$ durante 10 minutos e o sobrenadante conservado a -20°C. As células remanescentes foram repartidas, em novos frascos, para início de um novo ciclo de produção do meio condicionado.

3.5.3. Cultivo das células CHO

Células CHO (ATCC: CCL-61) foram semeadas, em uma densidade de 5×10^5 células, em frascos T25 (Nunc) contendo 5 mL de RPMI acrescentado de antibióticos-antimicóticos e 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida a 5% de CO₂ até atingir a confluência. Após este período, as células foram repartidas, em novos frascos, para início de um novo ciclo de cultivo.

3.5.4. Preparação de células dendríticas a partir de precursores de medula óssea murina

Células dendríticas provenientes de medula óssea foram preparadas de acordo com protocolo descrito por Son *et al*, 2002, com modificações. Assim, camundongos BALB/c, adquiridos junto ao Centro de Bioterismo do ICB/UFMG, foram sacrificados, por deslocamento cervical, e dissecados para retirar fêmur e tíbia. As extremidades destes foram cortadas e a medula óssea coletada após ter-se passado um fluxo de RPMI 1640 pelo interior dos ossos.

A medula óssea coletada foi pipetada sucessivamente para desfazer os agregados celulares, a suspensão filtrada em tela de nylon (ϕ 70 μm – Becton Dickinson labware), para retirar os debris ósseos, e centrifugada a $300 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sedimento recuperado contendo as células foi ressuspendido em solução de lise de hemácias (17 mM de Tris-HCL pH 7,2 contendo 140 mM NH_4Cl) durante 5 minutos a 37°C . Após 2 lavagens com RPMI 1640, 5×10^7 células foram cultivadas em frascos T75 contendo 15 mL de RPMI 1640 acrescidos de antibióticos, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 50 μM de 2-Mercaptoetanol, 1/100 de solução de aminoácidos não – essenciais (Gibco), 20% meio condicionado GM-CSF, 20% de meio condicionado IL-4 e 10% de soro fetal bovino (conjunto denominado: meio condicionado).

As células foram cultivadas durante oito dias em estufa a 37°C em atmosfera úmida a 5% CO_2 . A cada dois dias, a totalidade do meio foi retirado seguido pela adição de novo meio condicionado. Para induzir a maturação das células dendríticas, no sexto dia de cultivo, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Lipopolissacarideo (Sigma) foi adicionado ao meio de cultura.

Após o tempo de cultivo, as células não aderentes foram retiradas dos frascos e redistribuídas para o prosseguimento dos testes.

3.5.5. Ensaio de MTT

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

Foram adicionados 20 μL da solução de 5 mg/mL de MTT (Sigma) em PBS a 2×10^5 células/150 μL de meio contido em uma placa de microtitulação de 96 poços (Nunc). A placa foi incubada a 37°C por 2 horas, em seguida, acrescentou-se 70 μL da solução de 10% de SDS/HCl. Novamente, incubou-se a 37°C por 18 horas, para a completa dissolução do cristal de formazan, e a leitura dos valores de absorbância foi realizada a 600 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek, Instruments Inc.).

3.5.6. Ensaio de fagocitose de esferas de latex conjugadas a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

As células apresentadoras de antígenos são capazes de fagocitar esferas de latex, fato que pode ser utilizado para indiretamente verificar sua viabilidade funcional (Matsuno et al., 1996). Desta forma, 5×10^5 células dendríticas foram incubadas em 500 μL de meio condicionado acrescido de 1×10^8 esferas de latex (ϕ 0,2 μm) conjugadas a FITC (Polysciences. Inc.) durante 3 horas a 37°C em atmosfera úmida a 5% CO_2 . Após o tempo de incubação, as células foram separadas das esferas não fagocitadas através de gradiente de glicerol. O procedimento consistiu em acamar a suspensão celular em 1mL de 20% glicerol em 0,15 M PBS e centrifugar a $300 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 500 μL de 0,15 M PBS. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e, por fim, as células foram fixadas em PBS acrescido de 1% de paraformaldeído (solução fixadora de células) e a leitura realizada em microscópio de confocal (Zeiss Hall 100) e ótico de fluorescência (Olympus MO81).

3.5.7. Transfecção de células dendríticas com DNA plasmidial

A transfecção transiente de células dendríticas foi realizado com o auxílio do “Effectene Transfection Reagent” (Qiagen) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. Foi utilizado o plasmídeo DsRed2 e células CHO, para otimizar o protocolo de transfecção, e pcDNA3.1/RHO^{ct} e Dsred2/Rho1 para a expressão do fragmento RHO^{ct} e da proteína SmRho1 GTPase, respectivamente, em células dendríticas. A confirmação da expressão foi realizado por microscopia de fluorescência, ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência.

3.5.8. Análise citométrica de células dendríticas transfectadas

O plasmídeo DsRed2 codifica o gene da proteína RFP (do inglês “Red Fluorescent Protein”) que fluoresce em resposta ao estímulo luminoso de determinado comprimento de onda (563-582 nm). A expressão da RFP, em células eucariotas, pode ser monitorado por citometria de fluxo.

Uma densidade de 4×10^5 células dendríticas foram distribuídas em placas de 24 poços (Nunc) com 350 μL de meio condicionado e transfectadas com o plasmídeo DsRed2 ou DsRed2/Rho1 (RHO1 GTPase clonada em fusão com a

RFP; 3.3.4;), incubou-se a 37°C em atmosfera úmida a 5% CO₂ durante 48 horas. Após o tempo de incubação, as células foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 300 × g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com PBS, após nova centrifugação, ressuspendido em 500 µL de solução fixadora de células e transferidos para tubos de 1 mL.

A taxa de expressão da proteína RFP presentes em cada amostra foi determinado com o citômetro de fluxo FACSVantage (Becton Dickinson) e os dados analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8 (“Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry Application” – <http://facs.scripps.edu>).

3.5.9. Análise da expressão de Rho1 GTPase e RHO^{ct} por ensaio de Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência de células dendríticas transfectadas com DsRed2/Rho1 ou pcDNA3.1/RHO^{ct} foi realizado de acordo com protocolo descrito por Thompson, 1981 com modificações.

Células dendríticas normais ou transfectadas foram centrifugadas contra uma lâmina de vidro (25,4 X 76,2 X 1 mm) a 1000 rpm por 4 minutos (Statspin Cytofuge2 – Iris) e fixadas com metanol, resfriado a 4° C, por 5 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,5% de Triton X e bloqueadas com PBS contendo 0,25% de caseína e 5% de soro normal murino. Após nova lavagem, foi adicionado soro de coelho hiperimune para Rho1/MBP (3.4.4) diluído 1:50 em PBS contendo 0,25% de caseína e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas e incubadas por 1 hora (temperatura ambiente) com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho marcado com FITC (Calbiochem) diluída 1:100 (PBS contendo 0,25% de caseína). Após nova lavagem, as lâminas foram preparadas para leitura em microscopia ótica de fluorescência.

4. Resultados

4.1 Seleção de clones de cDNA codificadores de antígenos recombinantes de *S. mansoni* para expressão em células dendríticas

4.1.1. Triagem de clones da biblioteca de cDNA por ELISA de captura

Biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* são fontes de antígenos úteis ao estudo da esquistossomose. Sendo assim, 200 colônias de cor branca de *E. coli* XL0LR, contendo o vetor pBluescript, foram selecionadas aleatoriamente, induzidas à expressão do inserto clonado e submetidos à triagem por ELISA de captura. Nos ensaios, imunoglobulinas humanas anti-SWAP em conjunto com soro imune de coelho anti-SWAP foram usadas para capturar as proteínas antigênicas.

Dentre os 200 clones selecionados, inicialmente 40 (20%) obtiveram reatividades maiores em comparação a média apresentada pelos controles negativos. Após duas repetições, foi confirmado a reatividade de 38 clones (19%) (Tabela 1).

Tabela 1. Clones reativos nos ensaios de ELISA de captura

Clones*	Abs ^a	cDNA (pb) ^b	Clones	Abs	cDNA (pb)
SmAST02	0,348	>754	SmAST22	0,342	688
SmAST03	0,322	394	SmAST23	0,321	437
SmAST04	0,398	>694	SmAST24	0,329	692
SmAST05	0,345	>788	SmAST25	0,308	362
SmAST06	0,420	341	SmAST26	0,377	>765
SmAST08	0,332	360	SmAST27	0,315	716
SmAST09	0,308	700	SmAST28	0,292	103
SmAST10	0,299	545	SmAST29	0,314	>639
SmAST11	0,381	519	SmAST30	0,335	361
SmAST12	0,348	544	SmAST31	0,332	677
SmAST13	0,348	518	SmAST32	0,321	405
SmAST14	0,410	352	SmAST33	0,312	224
SmAST15	0,368	202	SmAST34	0,359	858
SmAST16	0,321	579	SmAST35	0,320	162
SmAST17	0,414	223	SmAST36	0,349	476
SmAST18	0,342	348	SmAST37	0,376	>853
SmAST19	0,341	310	SmAST38	0,346	621
SmAST20	0,354	257	SmAST39	0,360	479
SmAST21	0,343	160	SmAST40	0,372	284

(a) Absorbância (492 nm) de clones (*), selecionados aleatoriamente de biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni*, reativos no ELISA de captura. Os controles negativos apresentaram Abs média de 0,213 e o controle positivo Abs média de 0,447. (b) tamanho do inserto, em pares de bases nucleotídicas, de cada clone determinados após o sequenciamento.

4.1.2. Sequenciamento parcial de cDNA e análise de homologia de ASTs

O sequenciamento parcial das extremidades 5' e 3' de cDNAs resultou na produção de 44 etiquetas de sequências antigênicas (AST), com comprimento médio de aproximadamente 418 pb (apêndice 1), representando os 38 clones previamente selecionados por ELISA. A extremidade 3' foi sequenciada em 22 cDNAs que não apresentaram cauda poli-A na orientação 5', destas, 14 sequências superpuseram-se e, portanto, formaram transcritos contínuos. Sequências incompletas para ambas extremidades foram produzidas para os clones SmAST02, SmAST04, SmAST05, SmAST26, SmAST29 e SmAST37.

As ASTs adquiridas foram comparadas, a nível protéico, às sequências depositadas no banco de dados não redundantes da "GenBank" do NCBI empregando-se o programa BLASTX, no período de Julho de 2003 (Tabela 2). Dos clones sequenciados, 25/38 (65,8%) não exibiram homologia significativa ($E > 10^{-5}$) enquanto 12/38 (31,6%) apresentaram homologia significativa com valores de $E \leq 10^{-5}$. Descartou-se o clone SmAST05, homólogo a proteína β -galactosidase codificado pelo vetor.

Tabela 2. Categoria apresentada por ASTs selecionadas*.

Categoria de ASTs	Nº de clones	(%)
Homólogos putativos identificados		
(a) Pareamento com <i>S. mansoni</i>	07	18,4
(b) Pareamento com outros organismos	05	13,2
Não identificados	25	65,8
Vetor sem inserto	01	2,6
Total	38	100

(*) Comparação a nível protéico (BlastX) das AST selecionadas por ELISA de captura com sequências depositadas no GenBank.

No conjunto dos clones que apresentaram homólogos putativos relevantes, 7/12 (58,3%) formaram pareamentos significativos com proteínas descritas de *S. mansoni*. São incluídos nesta categoria homólogos às proteínas Rho GTPase (SmAST03), Poliubiquitina (SmAST10), Citocromo C oxidase subunidade III (SmAST22, SmAST23 e SmAST24) e antígenos candidatos a vacina Sm10 e Sm23 (SmAST25 e SmAST34, respectivamente). Por outro lado, 5/12 (41,7%) foram homólogos a proteínas descritas de outros organismos, incluem-se: o produto da

expressão dos genes CG7808-PB, CG7808-PC de *Drosophila melanogaster* (SmAST35 e SmAST40, respectivamente), similar a proteína ribossomal L27A de *S. japonicum* (SmAST19), similar a proteína hipotética MGC 1040 de *Homo sapiens* (SmAST02) e componente E1 da Desidrogenase de *Caenorhabditis elegans* (SmAST36).

Foram relacionados os valores de “E-value”, identidade, similaridade e “score” das ASTs citadas acima nas Tabelas 3 e 4, e o pareamento destas, com sequências homólogas do banco de dados, ilustradas nas Figuras 1 e 2.

4.1.3. Descrição do clone SmAST03

Após a triagem de ASTs e análise dos resultados, o peptídeo codificado no clone SmAST03 foi escolhido para ser expressado em células dendríticas. Este possui um cDNA de 394 pb compreendidos em 117 pb codificadores para os 39 aminoácidos C-terminais da proteína Rho1 GTPase de *Schistosoma mansoni* (RHO^{ct}) e 275 pb formadores da região 3' UTR e cauda poli-A do respectivo mRNA (Figura 3A).

A sequência de RHO^{ct} conserva dois motivos estruturais (Figura 3B) da proteína Rho1 GTPase de *S. mansoni*: o motivo SAK que participa da interação com a base guanosídica da GTP no sítio ativo e o motivo para prenilação, modificado neste organismo, CAAX (*Sm*: CDAX).

Tabela 3. Clones cujas ASTs apresentaram homologia significativa em nível protéico (BLASTX) com produtos gênicos de *S. mansoni*

Clone*	AST (pb) ^a	Abs ^b	Homólogo putativo ^c		E-value*	Iden (%)	Sim (%)	Score
			<i>(Schistosoma mansoni)</i>					
SmAST22	668	0,342	Citocromo C oxidase subunidade III		6e-95	156/165 (94)	156/165 (94)	804
SmAST34	839	0,359	Proteína de membrana integral de 23 kDa (Sm23)		1e-85	150/150 (100)	150/150 (100)	784
SmAST10	528	0,299	Poliubiquitina		5e-80	150/150 (100)	150/150 (100)	750
SmAST23	437	0,321	Citocromo C oxidase subunidade III		5e-77	140/145 (96)	140/145 (96)	723
SmAST24	668	0,329	Citocromo C oxidase subunidade III		2e-60	117/131 (89)	119/131 (90)	229
SmAST25	343	0,308	Antígeno estimulatório de Linfócitos T – Sm10 (provável cadeia leve de Dineína I)		6e-24	47/72 (65)	56/72 (77)	262
SmAST03	375	0,322	Rho GTPase		3e-16	39/39 (100)	39/39 (100)	196

*As ASTs que apresentaram homologia significativa com produtos gênicos de *S. mansoni* foram relacionados de acordo com o valor crescente do “E-value” que exprime o número de sequências do banco de dados que atingiria um determinado “score” ao acaso (Brenner *et al.*, 1998).

^a Comprimento da AST em pares de base.

^b “Abs” refere-se à absorvância (495 nm) da reatividade de cada clone no ELISA de captura.

^c A descrição do homólogo putativo, designado pelo programa BLASTX, é acompanhado dos valores de identidade (“Iden”), os quais referem-se ao número de resíduos de aminoácidos idênticos na comparação da AST com a sequência do banco de dados. Os valores de similaridade (“Sim”) referem-se ao número de resíduos de aminoácidos idênticos somados a de substituições conservadas.

Tabela 4. Clones cujas ASTs apresentaram homologia significativa em nível protéico (BLASTX) com produtos gênicos de outros organismos.

Clone*	AST (pb) ^a	Abs ^b	Homólogo putativo ^c (organismo)	E-value*	Iden (%)	Sim (%)	Score
SmAST19	290	0,341	Proteína ribossomal L17 (<i>Schistosoma japonicum</i>)	4e-46	84/89 (94)	89/89 (100)	466
SmAST02	410	0,348	Proteína Hipotética MGC 10540 (<i>Homo sapiens</i>)	5e-29	53/114 (46)	76/114 (66)	283
SmAST36	460	0,420	Componente E1 da Desidrogenase (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	2e-28	67/157 (42)	90/157 (57)	305
SmAST40	262	0,372	Clone CG7808-PC (<i>Drosophila melanogaster</i>)	4e-13	31/41 (75)	37/41 (90)	208
SmAST35	164	0,320	Clone CG7808-PB (<i>Drosophila melanogaster</i>)	1e-09	26/29 (89)	28/29 (96)	140

*As ASTs que apresentaram homologia significativa com produtos gênicos de outros organismos foram relacionados de acordo com o valor crescente do "E-value" que exprime o número de seqüências do banco de dados que atingiria um determinado "score" ao acaso (Brenner *et al.*, 1998).

^a Comprimento da AST em pares de base.

^b "Abs" refere-se à absorbância (495 nm) da reatividade de cada clone no ELISA de captura.

^c A descrição do homólogo putativo, designado pelo programa BLASTX, é acompanhado dos valores de identidade ("Iden"), os quais referem-se ao número de resíduos de aminoácidos idênticos na comparação da AST com a seqüência do banco de dados. Os valores de similaridade ("Sim") referem-se ao número de resíduos de aminoácidos idênticos somados a de substituições conservadas.

SmaAST22

Citocromo c oxidase subunidade III (NP_0662112)

T 217

E 6e-95 **S** 804 **I** 156/165(94%) **F** 156/165(94%) **F** +1

AST22: 103 FRKYVVDIFMLRISCKMAFWLFLARELIVFLTIIFFCCFWYIKGSSVAISYPLGIPILET 282
Ccos3: 38 FRKYVVDIFMLRISCKMAFWLFLARELIVFLTIIFFCCFWYIKGSSVAISYPLGIPILET 97

AST22: 283 YLLIMSSFFISAFHNLASVGRIFVYLSLVCSELLFFFAVDEFLNSVVNSLCDPYASC 462
Ccos3: 98 YLLIMSSFFISAFHNLASVGRIFVYLSLVCSELLFFFAVDEFLNSVVNSLCDPYASC 157

AST22: 463 FMLVGLHLHVLILGFGLYELSGFQLSFIRWKNMLIVYHFVD 597
Ccos3: 158 FMLVGLHLHVLILGFGLYELSGFQLSFIRWKNMLIVYHFVD 202

SmaAST34

Proteína integral de membrana de 23 kDa (AAA2900.1)

T 218

E 1e-85 **S** 784 **I** 150/150(100%) **F** 150/150(100%) **F** +2

AST34: 2 SFLGCCGAIKENVCMYAFLLVLLIAELAAAI VAVVYKDRIDSEIDALMTGALDKPT 181
Pim23: 69 SFLGCCGAIKENVCMYAFLLVLLIAELAAAI VAVVYKDRIDSEIDALMTGALDKPT 128

AST34: 182 KEITEFMNLIQSSFHCCGAKGPDYRGNVPA SCKEENLTYTEGCVSVFGAF LKRNLVIVA 361
Pim23: 129 KEITEFMNLIQSSFHCCGAKGPDYRGNVPA SCKEENLTYTEGCVSVFGAF LKRNLVIVA 188

AST34: 362 CVAFGVCFQLLSIVIAACCLGRQIKEYENV 451
Pim23: 189 CVAFGVCFQLLSIVIAACCLGRQIKEYENV 218

SmaAST10

poliubiquitina (AAD02414)

T 295

E 5e-80 **S** 750 **I** 150/150(100%) **F** 150/150(100%) **F** +2

AST10: 2 LVLRLRGGMQIFVKTLTGKTIITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLED 181
PoLin: 136 LVLRLRGGMQIFVKTLTGKTIITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLED 195

AST10: 182 GRILSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTIITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGI 361
PoLin: 196 GRILSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTIITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGI 255

AST10: 362 PPDQORLIFAGKQLEDGRILSDYNIQKEST 451
PoLin: 256 PPDQORLIFAGKQLEDGRILSDYNIQKEST 285

Figura 1. Pareamento de ASTs com seus respectivos homólogos putativos de *S. mansoni*. Clones antigênicos selecionados de biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* homólogos a proteínas deste organismo. T: tamanho em número de aminoácidos relativo a proteína homóloga; E: E-value; S: Score; I: identidade (amarelo); P: positividade (verde); F: base inicial do códon ("frame"); Aminoácidos não pareados destacados em vermelho; Inserções, deleções de aminoácidos ou códons terminadores destacados em cinza.

SmAST23

Citocromo c oxidase subunidade III (NP_0662112)

T 217

E 5e-77 S 723 I 140/145 (96%) P 140/145 (96%) F +1

AST23: 1 VLFFAVLPCIFFYHPFIMTVVLCV*VYLFRKYVW*DI FMLRISCKMAFWLFLARELIVFL 180
Ccos3: 10 VLFFAVLPCIFFYHPFIMTVVLCVWVYLFRKYVW*DI FMLRISCKMAFWLFLASELIVFL 69

AST23: 181 TIIFFCCFWYIKGSSVAISYPLGIPILETYLLIMSSFFISAFH*NLASV*GRIFVYLSLVC 360
Ccos3: 70 TIIFFCCFWYIKGSSVAISYPLGIPILETYLLIMSSFFISAFH*NLASV*GRIFVYLSLVC 129

AST23: 361 SLLFIFFAVDEFLNSVWNSLCDPYY 435
Ccos3: 130 SLLFIFFAVDEFLNSVWNSLCDPYY 154

SmAST24

Citocromo c oxidase subunidade III (NP_0662112)

T 217

E 2e-60 S 583 I 117/131 (89%) P 119/131 (90%) F +2

AST24: 2 FSLVNLVLFVAVLPCIFFYHPFIMTVVLCV*VYLFRKYVW*DI FMLRISCKMAFWLFLAR 181
Ccos3: 4 FSLVNLVLFVAVLPCIFFYHPFIMTVVLCVWVYLFRKYVW*DI FMLRISCKMAFWLFLAS 63

AST24: 182 ELIVFLTIIFFCCFWYIKGSSVAISYPLGIPILETYLLIMSSFFISAFH*NLASV*GRSLF 361
Ccos3: 64 ELIVFLTIIFFCCFWYIKGSSVAISYPLGIPILETYLLIMSSFFISAFH*NLASV*GRSLF 122

AST24: 362 IYHLFVPPYLF 394
Ccos3: 123 VYLSLVCSELF 133

SmAST25

Antígeno estimulatório de células T (Sm10: CAA67208)

T 89

E 6e-24 S 262 I 47/72 (65%) P 56/72 (77%) F +3

AST25: 30 QAEVVKICAEALETYNIEKDI AAFIKKECDKRYNPTWHCIVGRNFGSYVTHETQHFIYLY 209
AecT: 18 QETAVHTAAALDQYEIEKDVAAV I KKECDKRYNPTWHCIVGRNFGSYVTHETQHFIYLY 77

AST25: 210 LQAVATLAFKSG 245
AecT: 78 LQRAFLAFKSG 89

SmAST03

Rho GTPase (AAD31508)

T 193

E 3e-16 S 196 I 39/39 (100%) P 39/39 (100%) F +3

AST03: 3 YAFFECSAKTKEGVSDFVVAATRAALNSAKKRRRCDLI 119
RhoGT: 155 YAFFECSAKTKEGVSDFVVAATRAALNSAKKRRRCDLI 193

Figura 1. Continuação.

SmAST19

Similar a proteína ribossomal L27A (*Schistosoma japonicum*: AAP06225)

T 149

S 466 E 4e-46 I 84/89 (94%) P 89/89 (100%) F +2

AST19: 2 HYHLKRNPYYCPTINLDKIWSLVSQATYEKYRDSTDGKAPVIDCLRKGYFKVLGKGYLPK 181
PrL27: 61 HYHLKRNPYYCPTINLDKIWSLVSQATYEKYRDSTDGKAPVIDCLRKGYFKVLGKGYLPK 128

AST19: 182 VPVIVKARFFSRKAEKIKAVGGACILSA 268
PrL27: 121 VPVIVKARFFSRKAEKIRAVGGACVLTAA 149

SmAST02

Proteína hipotética MGC10540 (*Homo sapiens*: NP_115789)

T 176

E 5e-29 S 283 I 53/114 (46%) P 76/114 (66%) F +2

AST02: 65 ERLFSILQPNAAETRRKQINAWCQLVLNYFOSKKQFTLSVASIRDPSCPLFNNKSIQRSAS 244
Sbjct: 13 EPPFFETLQPNVDIRQKQLAAWCSLVLSFQRHLKQSSMTVMERQES—PLFNNVKLQRKLE 78

Query: 245 FELVDLILTELHKRGNLEWLDKSHINARIITWRIPPEEWADLIARWARSIGHSNSV 406
Sbjct: 71 VESIQIWLTELKKGKGNLEWLDKSKSSFLINWRRPEEWGKLIYQWVSRSGQNSV 124

SmAST36

Componente E1 da Desidrogenase e proteína transcetolase contendo domínio de ligação a piridina (115,5 kDa) (*Caenorhabditis elegans*: NP_500617.1)

T 1029

E 2e-28 S 305 I 67/157 (42%) P 90/157 (57%) G 2/157 (1%) F +2

AST36: 20 GTREVVLGMAHRGRNLNVLNVNLGKKPQDLFDEFAGKHKEHLGIGDVKYHMGFSSDF--QT 193
Sbjct: 386 GVDSEVLGMPHRGRNLNVLNVNCRQPLATILSQFSTLEPADESGGDVKYHLGVCTERLNRQ 365

AST36: 194 DGGIVHLALAFNPShLEIVSPVVI GSVRARLDRLDEPSSNKVLEIITHGDAAVIGQGVVQ 373
Sbjct: 366 SQKIVKIAVAVNPShLEIVDPVVMGKVRAEAFYAGDEKCDRTMAIILHGDAAPAGQGVVQ 425

AST36: 374 ETLNMSKARGYEVGGIVRIVINNOVGFTISNPLDARS 484
Sbjct: 426 ETENLDDLPSYTHGALHIVINNOIGFTI-DPRSSRS 461

Figura 2. Pareamento de ASTs com seus respectivos homólogos putativos de outros organismos. Clones antigênicos selecionados de biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* homólogos a proteínas de outros organismos. T: tamanho em número de aminoácidos relativo a proteína homóloga; E: E-value; S: Score; I: identidade (amarelo); P: positividade (verde); F: base inicial do códon ("frame"); Aminoácidos não pareados destacados em vermelho; Inserções, deleções de aminoácidos ou códons terminadores destacados em cinza.

SmAST40

CG7808-PC (*Drosophila melanogaster*: NP_651740.1)

T 208

E 4e-13 S 169 I 31/41 (75%) F 37/41 (90%) F +1

AST40: 109 VEEELKEAFVITGRILACISSRPGQGRADGYILEGKELEFY 231
Sbjct: 160 VEQALEDQFTSGRILACISSRPGQGRSDGYILEGKELEFY 200

SmAST35

CG7808-PB (*Drosophila melanogaster*: NP_733318.1)

T 209

E 1e-09 S 140 I 26/29 (89%) F 28/29 (96%) F +1

AST35: 1 RILACISSRPGQGRADGYILEGKELEFY 87
Sbjct: 173 RILACISSRPGQGRSDGYILEGKELEFY 201

Figura 2. Continuação.

A

```
1 ct TAT GCC TTC TTT GAG TGT TCA GCT AAG ACC AAG GAA
1 Y A F F E C S A K T K E
39 GGA GTC AGC GAT GTT TTC GTA GCA GCT ACT CGA GCC GCC
13 G V S D V F V A A T R A A
78 TTG AAT TCA GCG AAG AAG AAG AGG AGG AGG TGT GAT TTA
26 L N S A K K K R R R C D L
117 ATT tgatctccactggttctctaaattgtctagatttgattttccggtctc
39 I *
167 cgaaacatacattcccctcctaattcttcctcaggaccttaaattgctactt
219 ctatcggctgcgtgtttctttaacaatcatatTTTTTgTTTgccaacaagac
271 aatccattccgCGGaaatattgccatttatttttgccttggtactaaaata
323 gggcatgcctcatgtaacttatatttattgagaataaattactataatcagt
375 caaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

B

```
10 20 30
YAFFEC SAKTKEGVSDVFVAATRAALNSAKKKRRR CDLI
```

Figura 3. Clone SmAST03. (A) Sequência nucleotídica (394 pb) do cDNA do clone SmAST03; Em letras minúsculas, 5' parcial, 3' UTR e cauda poli A; Em letras maiúsculas, sequência codificadora de RHO^{ct} e aminoácidos correspondentes. (B) Sequência de aminoácidos de RHO^{ct} correspondentes aos últimos 39 aminoácidos de Rho1 GTPase de *Schistosoma mansoni*. Em destaque, sítio ativo SAK (amarelo) e sítio de Geranilgeranilação (vermelho).

4.2 Construções gênicas

4.2.1. Clonagem de RHO^{ct} no plasmídeo pcDNA3.1

Com o objetivo de expressar RHO^{ct} em células dendríticas, este foi clonado no plasmídeo pcDNA 3.1 de expressão em células eucariotas. Para isso, o inserto foi amplificado por PCR, a partir do clone SmAST03, utilizando os iniciadores RHO^{ct}F e RHO^{ct}R, gerando um fragmento de 147 pb que foi diretamente clonado no plasmídeo PCR2.1-Topo. Confirmando o sucesso da clonagem, ensaios de PCR foram realizados utilizando iniciadores específicos de RHO^{ct} e do plasmídeo, obtendo como resultado bandas correspondentes da amplificação com respectivos tamanhos teóricos esperados (Figura 4 [2-6]).

Realizou-se a digestão enzimática do plasmídeo PCR2.1/RHO^{ct} com BamHI (Figura 4 [7]), o inserto foi purificado e utilizado para a clonagem no plasmídeo pcDNA3.1. Novamente, ensaios de PCR, com iniciadores específicos de RHO^{ct} e do plasmídeo, e a digestão do plasmídeo pcDNA3.1/RHO^{ct} com BamHI confirmaram a clonagem (Figura 5). O sequenciamento de RHO^{ct} clonado evidenciou a ocorrência de duas mutações (Figura 6A) que culminaram na substituição da alanina (RHO^{ct}: A⁸, *SmRho*: A¹⁶²), parte integrante do motivo SAK, por uma valina (Figura 6B). salienta-se a manutenção do caráter apolar do aminoácido.

4.2.2. Clonagem de Rho1 GTPase no plasmídeo DsRed2

A sequência completa da Rho1 GTPase foi clonado, em fusão ao gene da proteína RFP, no plasmídeo DsRed2 de expressão em células eucariotas. Para tanto, o inserto foi amplificado por PCR, a partir do plasmídeo pCRT7/CT-Topo, utilizando os iniciadores Rho1F e Rho1R e o fragmento (609 pb) clonado diretamente no plasmídeo PCR 2.1-Topo. Clones positivos para a presença do inserto foram selecionados e utilizados em ensaios de digestão enzimática com BamHI.

O inserto purificado foi utilizado para a clonagem no plasmídeo DsRed2. Ensaios de PCR, com iniciadores específicos de Rho1 GTPase, e a digestão do plasmídeo DsRed2/Rho1 com BamHI confirmaram a clonagem (Figura 7). Reações de seqüenciamento, com iniciadores específicos do plasmídeo (RFPR:

5'GTACTGGAAGTGGGGGGACAG3'), confirmaram a conservação da sequência original de Rho1 GTPase.

Com o objetivo de acessar a funcionalidade da construção gênica realizada, células CHO foram transfectadas com DsRed2/Rho1. Uma densidade de 8×10^4 células foram transfectadas com 500 ng do plasmídeo DsRed2 ou DsRed2/Rho1 usando 1:25 do reagente transfecção effectene (1 μ g de DNA para cada 25 μ l de effectene). Após 24 horas de cultivo, foi verificado a presença de fluorescência vermelha da proteína RFP em células CHO transfectadas com DsRed2/Rho1 (Figura 8), confirmando a funcionalidade da proteína Rho1/RFP fusionada.

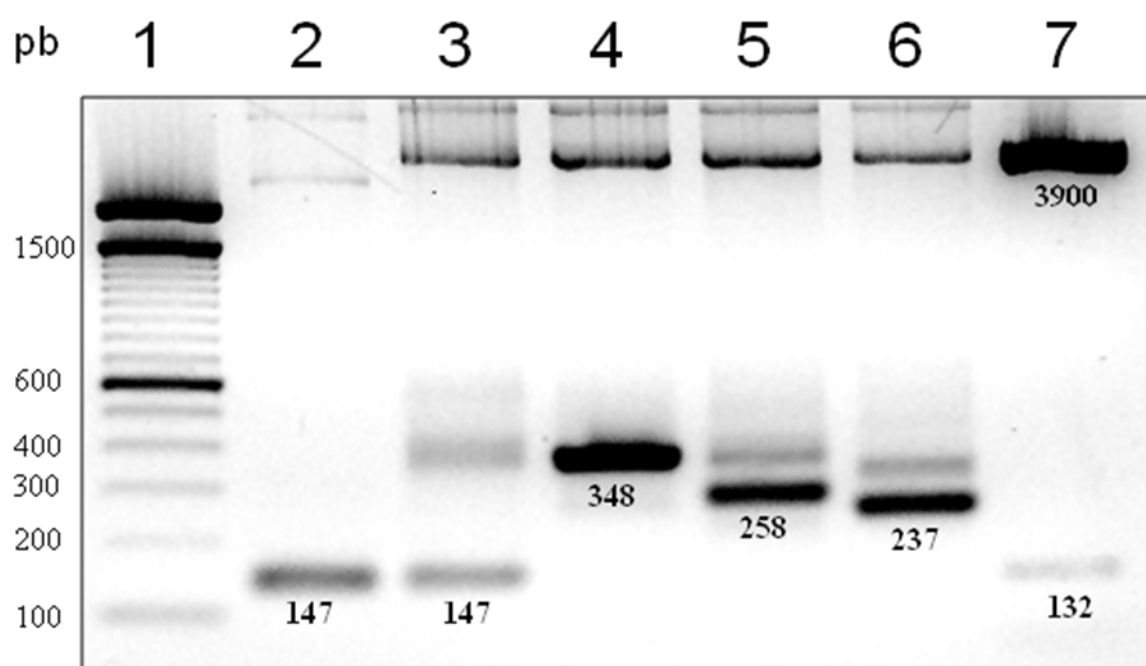


Figura 4. Clonagem do fragmento RHO^{ct} no vetor PCR2.1 topo.

Evidencia-se uma imagem em negativo do gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo; Observamos o padrão de 100 pares de base (1), reações de PCR realizadas com os plasmídeos pBlueScript/SmAST03 (2) e PCR2.1/RHO^{ct} (3-6) usando os primers RHO^{ct}F e RHO^{ct}R (2 e 3), M13R e M13U (4), RHO^{ct}F e M13U (5), RHO^{ct}R e M13R (6) e os produtos da digestão do plasmídeo PCR2.1/RHO^{ct} com a enzima de restrição BamHI (7). Tamanho teórico das bandas em pares de base.

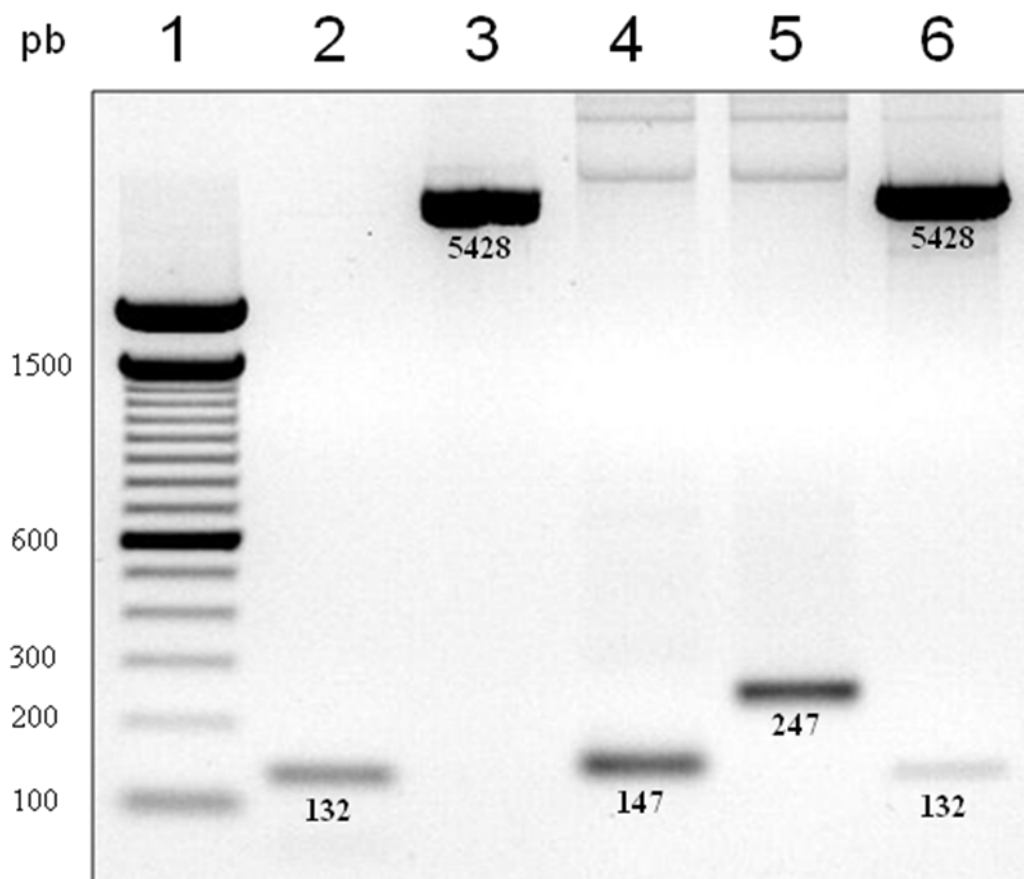


Figura 5. Clonagem do fragmento RHO^{ct} no vetor pcDNA 3.1+.

Observamos uma imagem em negativo do gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo contendo padrão 100 pares de base (1); fragmento RHO^{ct} (2) purificado da digestão de PCR2.1/RHO^{ct} com BamHI; plasmídeo pcDNA 3.1+ (3) digerido com BamHI; produtos da amplificação por PCR do plasmídeo pcDNA 3.1/RHO^{ct} usando os primers RHO^{ct}F e RHO^{ct}R (4), RHO^{ct}F e BGHR (5); produtos da digestão com BamHI do plasmídeo pcDNA 3.1/RHO^{ct} (6). Tamanho teórico das bandas em pares de base.

A

Rho GTPase (Rho1) (*Schistosoma mansoni*: AF1407851)

E 6e-56 **S** 112 **I** 118/120 (98%)

RHO ^{ct} : 1	TATGCCTTCCTTGAGTGTTCAG	TAAGACCAAGGAAGGAGTCAGCGATGTTTTTCGTAGCA	60
RhoGT: 479	TATGCCTTCCTTGAGTGTTCAG	TAAGACCAAGGAAGGAGTCAGCGATGTTTTTCGTAGCA	538
RHO ^{ct} : 61	GCTACTCGAGCCGCTTGAATTCAGCGAAGAAGAA	AGGAGGAGGTGTGATTTAATTGA	120
RhoGT: 539	GCTACTCGAGCCGCTTGAATTCAGCGAAGAAGAA	AGGAGGAGGTGTGATTTAATTGA	598

B

Rho1 GTPase (*Schistosoma mansoni*: AAD31508)

T 193

E 8e-15 **S** 192 **I** 38/39 (97%)

RHO ^{ct} : 1	YAFFECS	KTKEGVSDVFVAATRAALNSAKKRRRCDLI	117
RhoGT: 155	YAFFECS	KTKEGVSDVFVAATRAALNSAKKRRRCDLI	193

Figura 6. Pareamento de RHO^{ct} com Rho1 GTPase de *S. mansoni*.

Pareamento nucleotídico (A) e protéico (B) de RHO^{ct} com Rho GTPase de *S. mansoni*. Observamos a ocorrência de duas mutações nucleotídicas que resultaram na substituição de um aminoácido na sequência de RHO^{ct}. Notar a manutenção do caráter apolar do aminoácido. E: E-value; S: Score; I: identidade; P: positividade; Aminoácidos ou nucleotídeos pareados destacados em amarelo; Aminoácidos ou nucleotídeos não pareados destacados em vermelho.

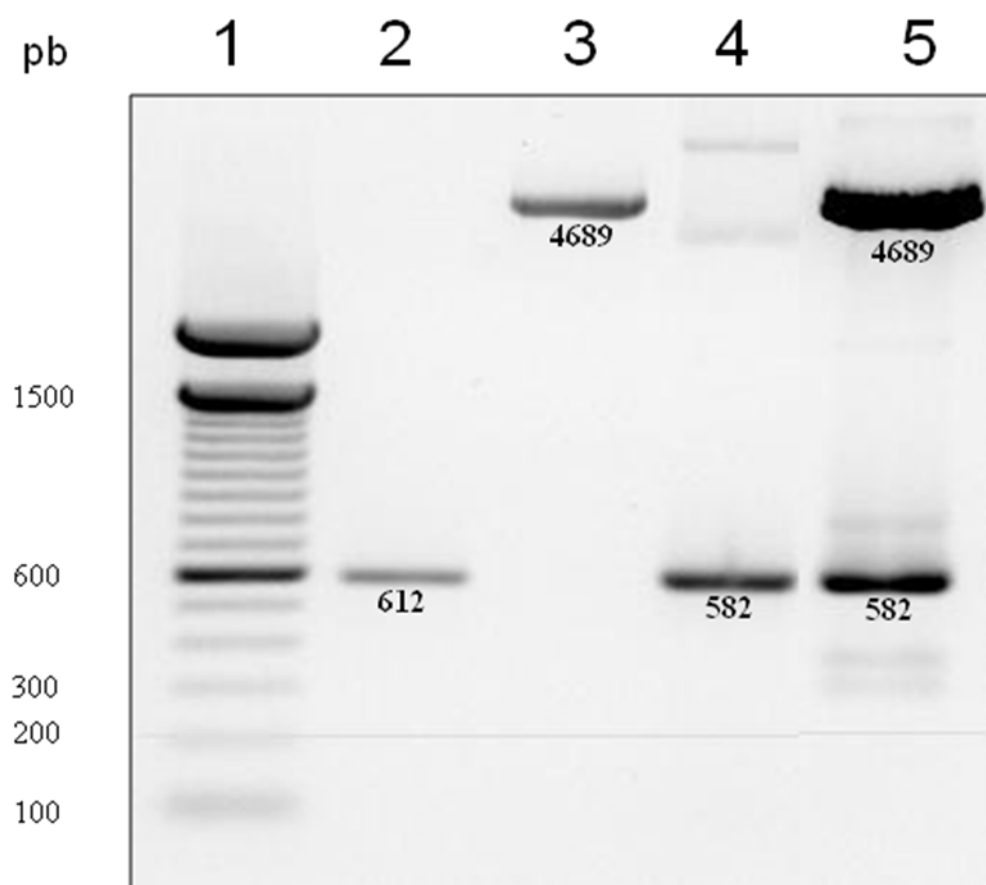


Figura 7. Clonagem de Rho1 GTPase no vetor DsRed2.

Observamos uma imagem em negativo do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo contendo padrão 100 pares de base (1); inserto Rho1 GTPase (2) purificado da digestão de PCR2.1/Rho1 com BamHI; plasmídeo DsRed2 (3) digerido com BamHI; produto da amplificação por PCR do plasmídeo DsRed2/Rho1 usando os primers Rho1F e Rho1R (4); produtos da digestão com BamHI do plasmídeo pcDNA 3.1/RHO^{ct} (6). Tamanho teórico das bandas em pares de base.

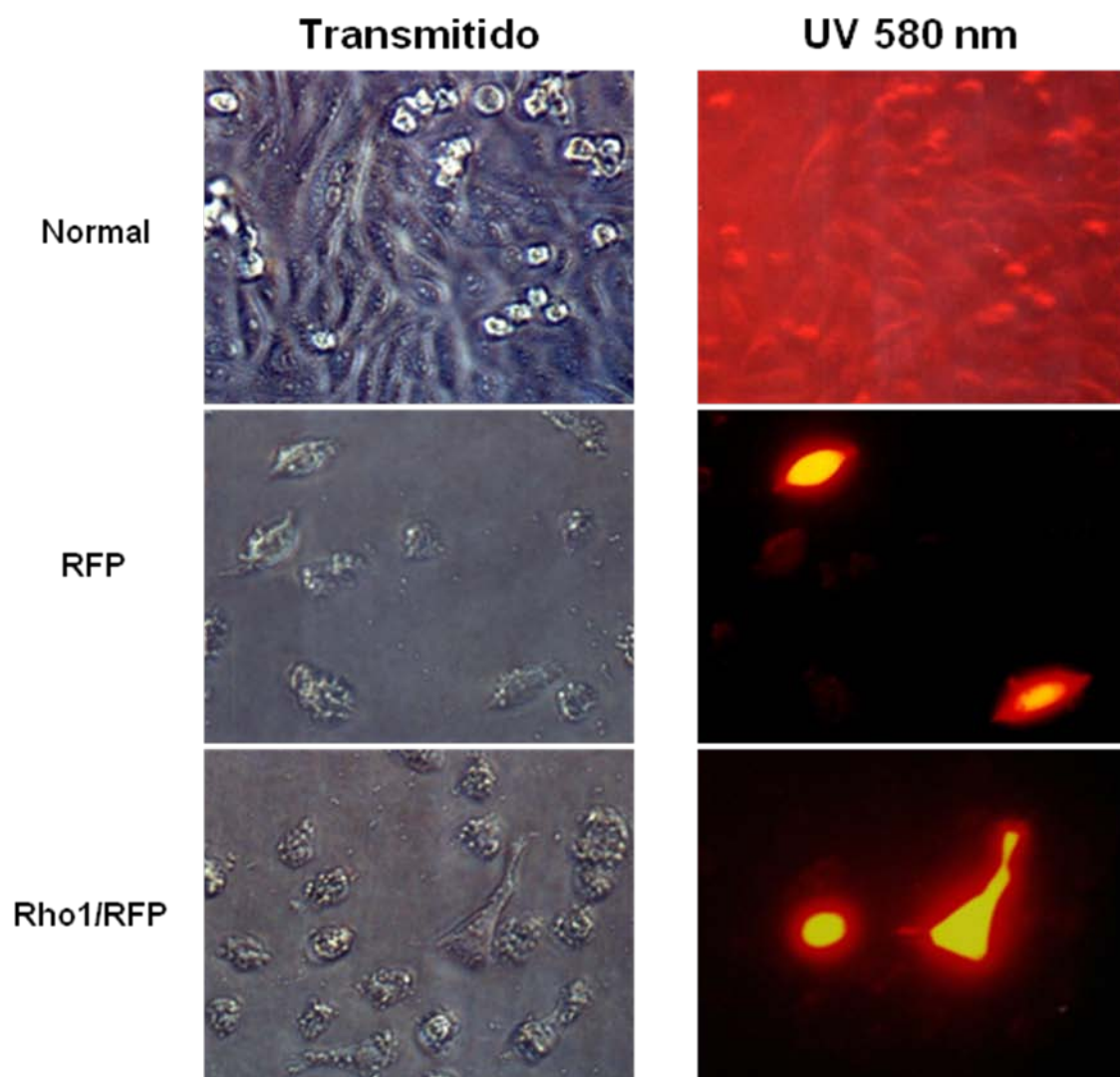


Figura 8. Expressão de Rho1/RFP em células CHO.

Células CHO foram transfectadas com os plasmídeos DsRed2 ou DsRed2/Rho1. Observa-se em microscopia ótica de fluorescência a expressão da proteína fluorescente RFP e da fusão Rho1/RFP, mostrando a funcionalidade da construção realizada com ambos genes. (Aumento de 300X)

4.3. Cultivo de células dendríticas

4.3.1. Extração e cultivo de medula óssea murina

Células tronco da medula óssea murina cultivados *in vitro* na presença de GM-CSF e IL-4 originam células dendríticas. Deste modo, em média, 3×10^7 células foram extraídas da medula óssea de 1 camundongo C57BL/6 ou BALB/c e cultivadas por 8 dias na presença destas citocinas, ao final do cultivo, obtinham-se em média 3×10^6 células dendríticas.

Do primeiro ao terceiro dia de cultivo observou-se células com morfologia esférico regular, muitas vezes, formando grumos que evidenciam a ocorrência de divisão celular. O quarto dia de cultivo era determinado pelo aparecimento de células de contorno irregular, granulosos e com projeções laterais, características típicas de células dendríticas, predominantes no oitavo dia de cultivo (Figura 9). Foi adicionado LPS no sexto dia de cultivo para induzir a maturação das células dendríticas.

4.3.2. Determinação da viabilidade das células dendríticas

Realizou-se o ensaio de MTT e de fagocitose das esferas de latex abordando, respectivamente, a viabilidade metabólica e a funcionalidade das células dendríticas cultivadas.

Células dendríticas cultivadas na presença, ou não, de LPS foram incubadas durante 2 horas com solução de MTT. Observou-se, progressivamente, a formação de cristais de formazan, indicativo da viabilidade metabólica das células (Figura 10). Ao final do tempo de incubação, as células em conjunto com o formazan foram dissolvidas e a absorbância da solução resultante determinada (Figura 11). As células tratadas com LPS apresentaram uma absorbância maior em relação às não tratadas, mostrando a maior formação de cristais de formazan.

Incubaram-se, durante 3 horas, esferas de látex conjugadas a FITC com células dendríticas cultivadas sem LPS. Ao final do tempo de incubação, observou-se, em microscopia de confocal, a presença de esferas na região citoplasmática das células mostrando sua capacidade fagocítica e viabilidade funcional (Figura 12). A porcentagem de células fagocíticas foi determinada pela contagem em

microscópio ótico de fluorescência, determinou-se a presença de, em média, 330/430 (76,74%) células fagocíticas (Figura 13). Diminui-se a taxa de fagocitose pela redução do metabolismo das células incubando-as a 0°C (83/547: 15,14%) ou inativando-as a 60°C (ausência de fagocitose).

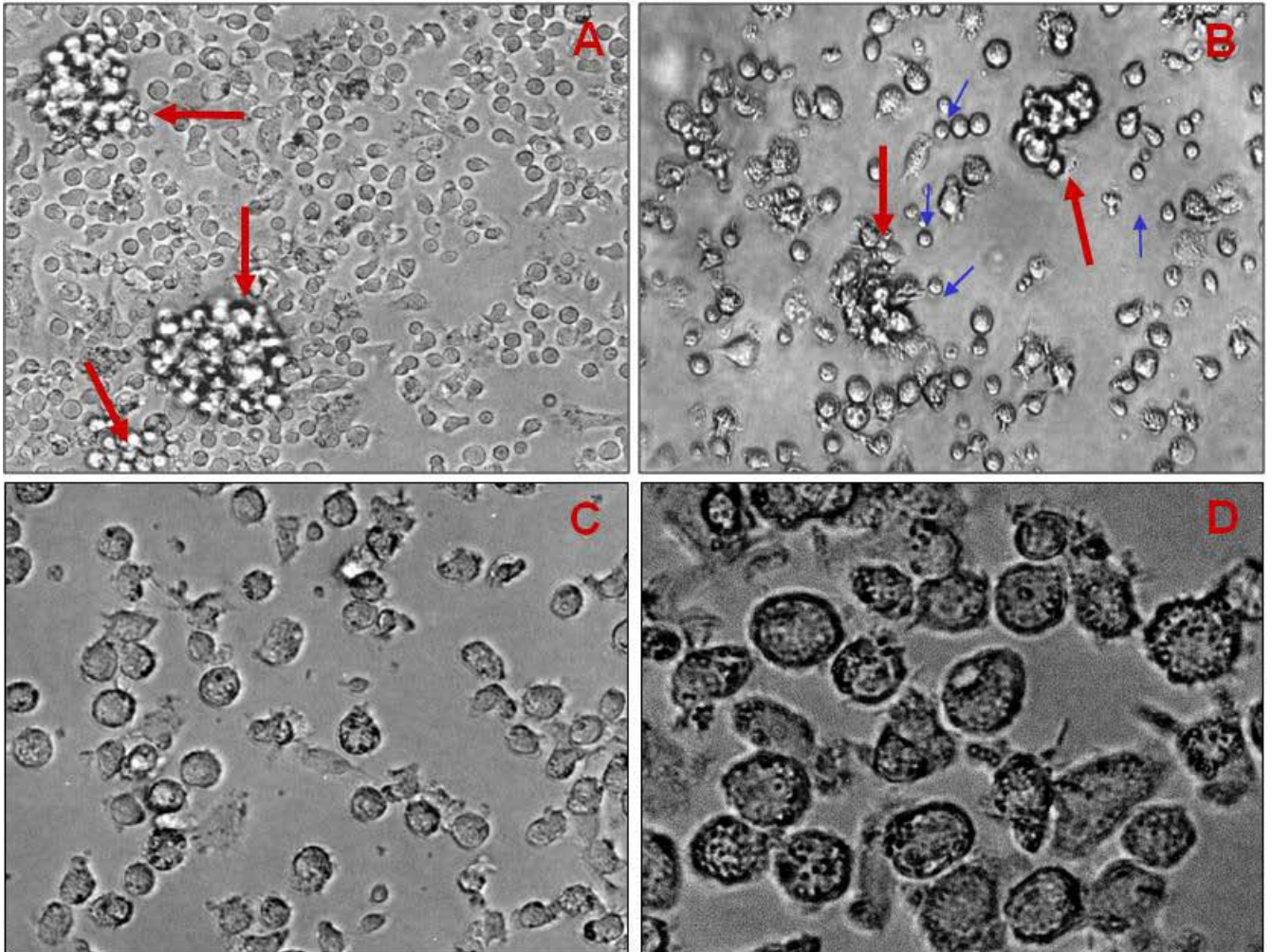


Figura 9. Cultivo de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos.

Observamos fotos representativas de diferentes cultivos de células dendríticas no aumento de 300X (A e B), 400X (C) e 600X (D). Em destaque, no 1º dia de cultivo (A), grupos de células em divisão (setas maiores) e células esféricas indiferenciadas por todo campo. No 5º dia de cultivo (B), grupos menores de células em divisão (setas maiores), presença de células esféricas indiferenciadas (setas menores) e, por todo campo, células com morfologia típica de células dendríticas – maiores, granulosas e com projeções laterais. No 8º dia de cultivo (C, D), observamos células dendríticas.

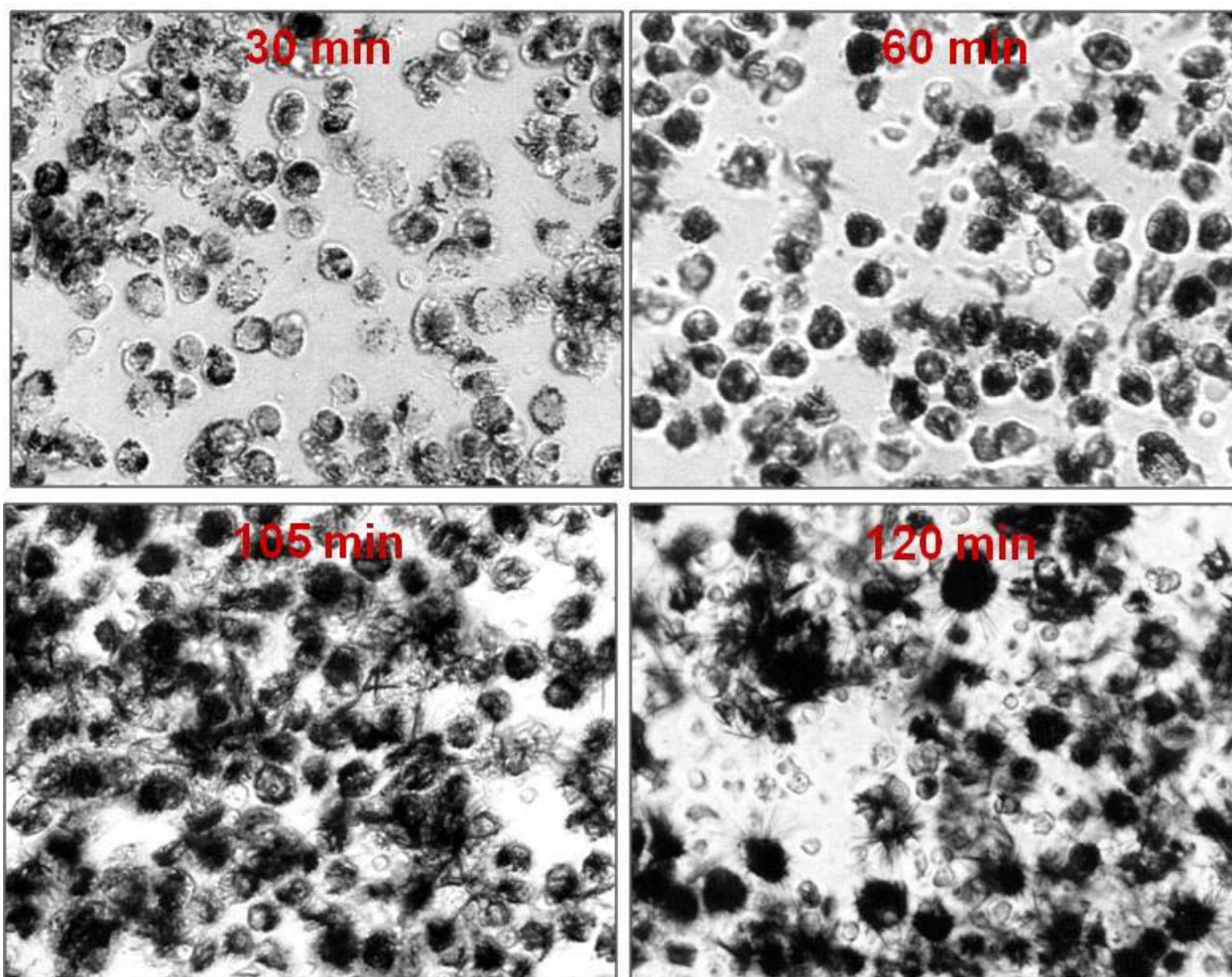


Figura 10. Ensaio de MTT de células dendríticas cultivadas em diferentes tempos na presença de solução de MTT.

Observamos a progressão da formação e deposição de cristais de formazan nas células dendríticas cultivadas, mostrando sua viabilidade metabólica (aumento 400X).

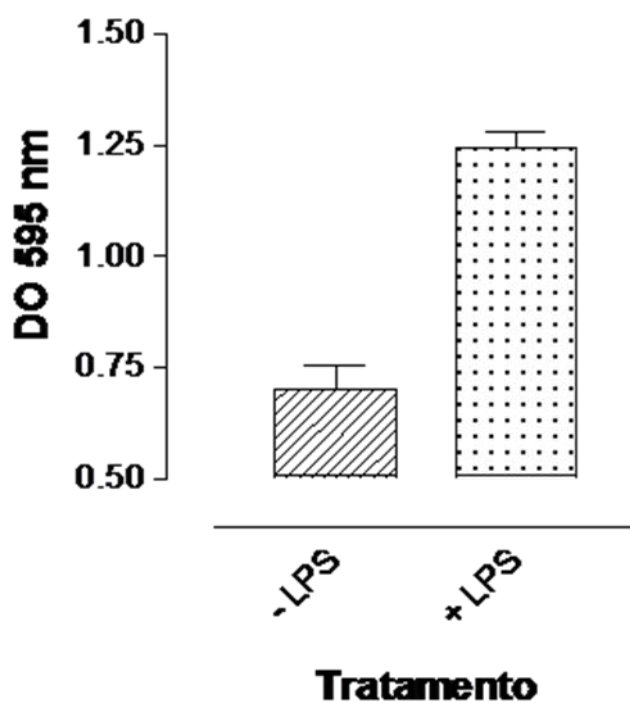


Figura 11. Determinação da viabilidade celular, por ensaio de MTT, do cultivo de células dendríticas estimulados, ou não, com LPS. Observa-se uma absorbância maior relativa às células tratadas com LPS, resultante de um metabolismo elevado característico de células dendríticas maduras.

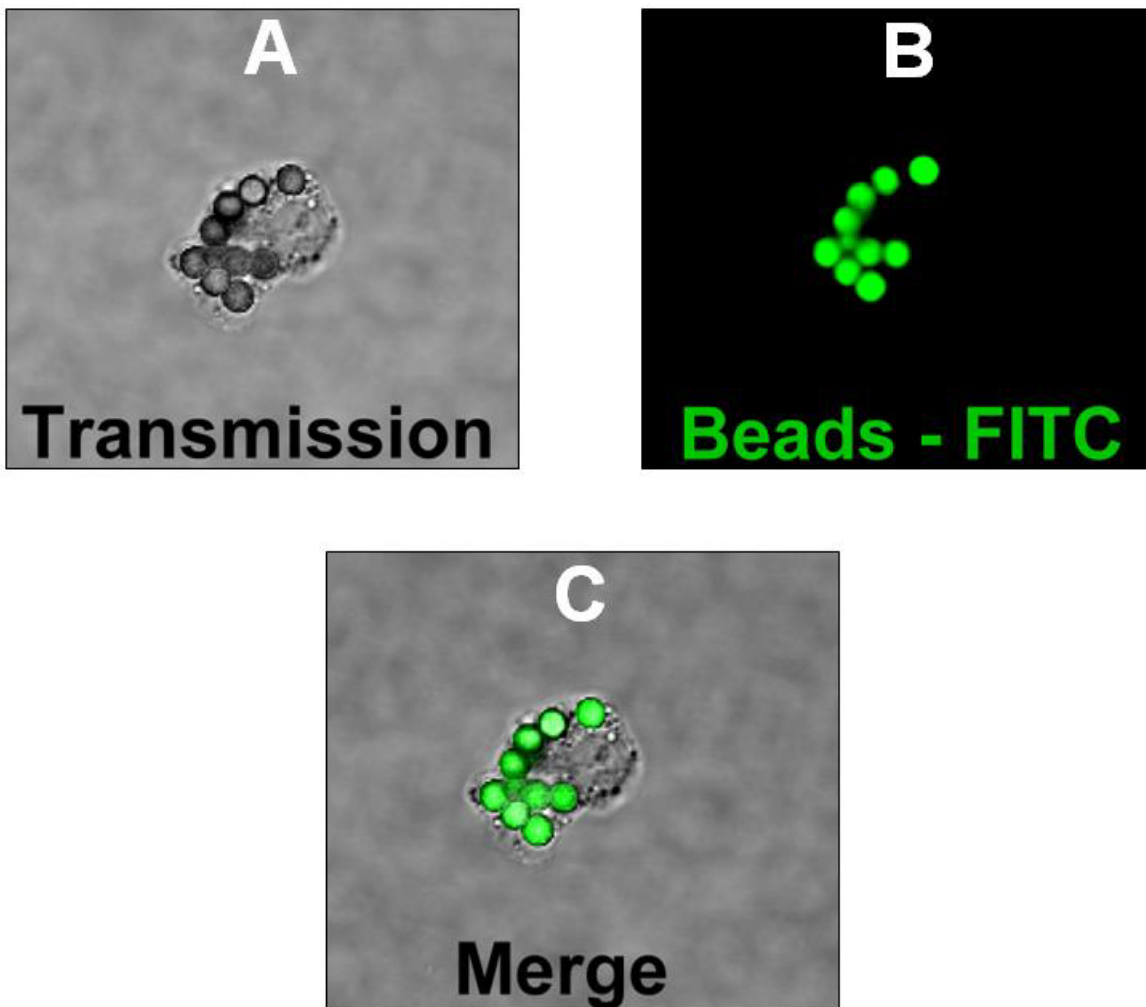


Figura 12. Visualização de fagocitose de esferas de látex conjugadas a FITC por células dendríticas..

Observa-se, em microscopia de confocal, (A) Célula dendrítica em luz transmitida no aumento de 630 X. (B) Florescência das esferas – FITC em consequência da incidência do laser a 488 nm. (C) Imagem sobreposta de A e B, a fluorescência das esferas – FITC coincide com a região citoplasmática da célula dendrítica, mostrando sua viabilidade funcional.

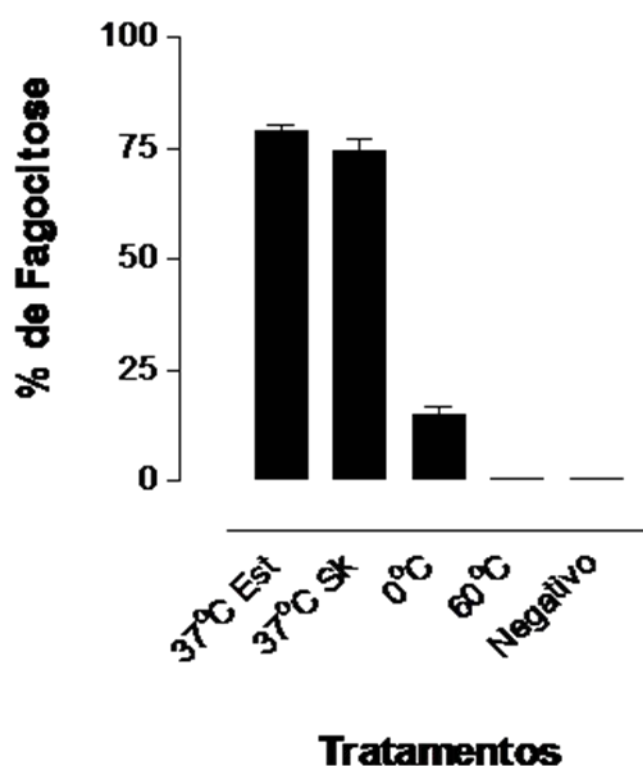


Figura 13. Taxa de fagocitose das esferas – FITC por células dendríticas cultivadas em diferentes tratamentos. Observa-se, em média, 76,74% de células fagocíticas, logo, células viáveis funcionalmente. Diminui-se o a taxa de fagocitose pela redução do metabolismo - 0°C (15,14%) - ou pela inativação das células - 60°C. Est – Estufa; Sk – Agitação.

4.4 Transfecção das células dendríticas e expressão de proteína heteróloga

4.4.1. Transfecção das células dendríticas com o plasmídeo DsRed2

Para determinar a habilidade das células dendríticas de expressarem proteínas heterólogas, estas foram transfectadas com o plasmídeo DsRed2 codificador da proteína RFP. Transfectou-se as células dendríticas com 500 ng do plasmídeo e 1:25 do reagente de transfecção effectene. Após 48 horas de cultivo, pela observação em microscopia de confocal, foi confirmado a expressão da proteína RFP pelas células dendríticas (Figura 14). A fluorescência emitida pela proteína RFP coincidiu com a região citoplasmática das células.

Porém, foi observado morte celular ocorrido nas culturas transfectadas com o reagente effectene. O ensaio de MTT de células dendríticas cultivadas após a transfecção com 1:25 de effectene mostrou a queda da viabilidade celular, independente do plasmídeo utilizado (DsRed2 ou pcDNA3.1/RHO^{ct}) (Figura 15). Variou-se, então, a relação do reagente de transfecção utilizado, de 1:25 a 1:10, e verificou-se a constância da viabilidade celular nas relações do reagente otimizados (1:12,5 e 1:10) (Figura 16).

4.4.2. Expressão de Rho1 GTPase e RHO^{ct} em células dendríticas

Células dendríticas foram transfectadas com os plasmídeos DsRed2/Rho1 e pcDNA3.1/RHO^{ct} e a expressão das proteínas recombinantes verificadas por citometria de fluxo e imunofluorescência.

Para determinar a expressão da proteína fusionada Rho1/RFP, 4×10^5 células dendríticas foram transfectadas com 0,4 a 1 μ g de DsRed2/Rho1, após 48 horas, determinou-se a expressão da proteína fusionada por citometria de fluxo. Desta forma, um fluxo contínuo e individual de células dendríticas foi passado no FACSVantage (Becton Dickinson) e o perfil da população determinado em gráficos de dispersão puntual analisando os parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 17A). A região de células que expressam a proteína RFP foi determinado em gráficos de dispersão puntual analisando os parâmetros SSC e FL2 (542-585 nm) do controle negativo (células transfectadas com 500 ng de DsRed2) (Figura 17B).

As regiões determinadas foram sobrepostas e avaliadas em histogramas analisando FL2 (Figura 17C, D). A intensidade da fluorescência e grau de positividade foi determinado comparando a média geométrica (GM) dos grupos testes em relação ao controle negativo. O percentual de células que expressam a proteína fluorescente foi acessado pela intercessão dos histogramas (Figura 17E).

As células dendríticas expressam a proteína fusionada Rho1/RFP (Tabela 5), observamos a falta de uniformidade na intensidade de expressão da proteína fusionada em relação a quantidade de plasmídeo utilizado. Obteve-se maior intensidade de fluorescência (GM: 31,33) e maior quantidade de células dendríticas positivas (27,83%) no uso de 1 µg de DsRed2/Rho1 para transfecção (Figura 17F).

Tabela 5. Intensidade de fluorescência e porcentagem de células dendríticas positivas para a expressão de Rho1/RFP

Grupos	DNA plasmidial (µg)		GM*	CD +(%) ^A
	Ds2Red	Ds2Red/Rho1		
Normal	—	—	15,72	—
RFP	0,5	—	18,23	6,67
1	—	0,4	19,48	10,26
2	—	0,6	18,59	9,1
3	—	0,8	18,24	7,92
4	—	1,0	31,33	27,83

(*) Média Geométrica representando a intensidade de fluorescência dos grupos estudados. (A) Porcentagem de células dendríticas positivas para a fluorescência de RFP ou Rho1/RFP.

Com o intuito de verificar a apresentação das proteínas Rho1 GTPase e RHO^{ct} na superfície das células dendríticas transfectadas, respectivamente, com DsRed2/Rho1 e pcDNA3.1/RHO^{ct}, estas foram usadas em ensaios de imunofluorescência. Assim, 2 x 10⁵ células dendríticas foram fixadas em lâminas de vidro e soro imune de coelho anti-Rho1 em conjunto com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho, marcado com FITC, utilizados para localizar as proteínas recombinantes. Evidenciou-se a localização das proteínas Rho1 GTPase e RHO^{ct} na superfície das células dendríticas (Figura 18). A expressão ocorre em locais pontuais e em diferentes intensidades na membrana das células, não foi observado fluorescência nos grupos Normal (ausência de transfecção) e RFP (transfecção com DsRed2).

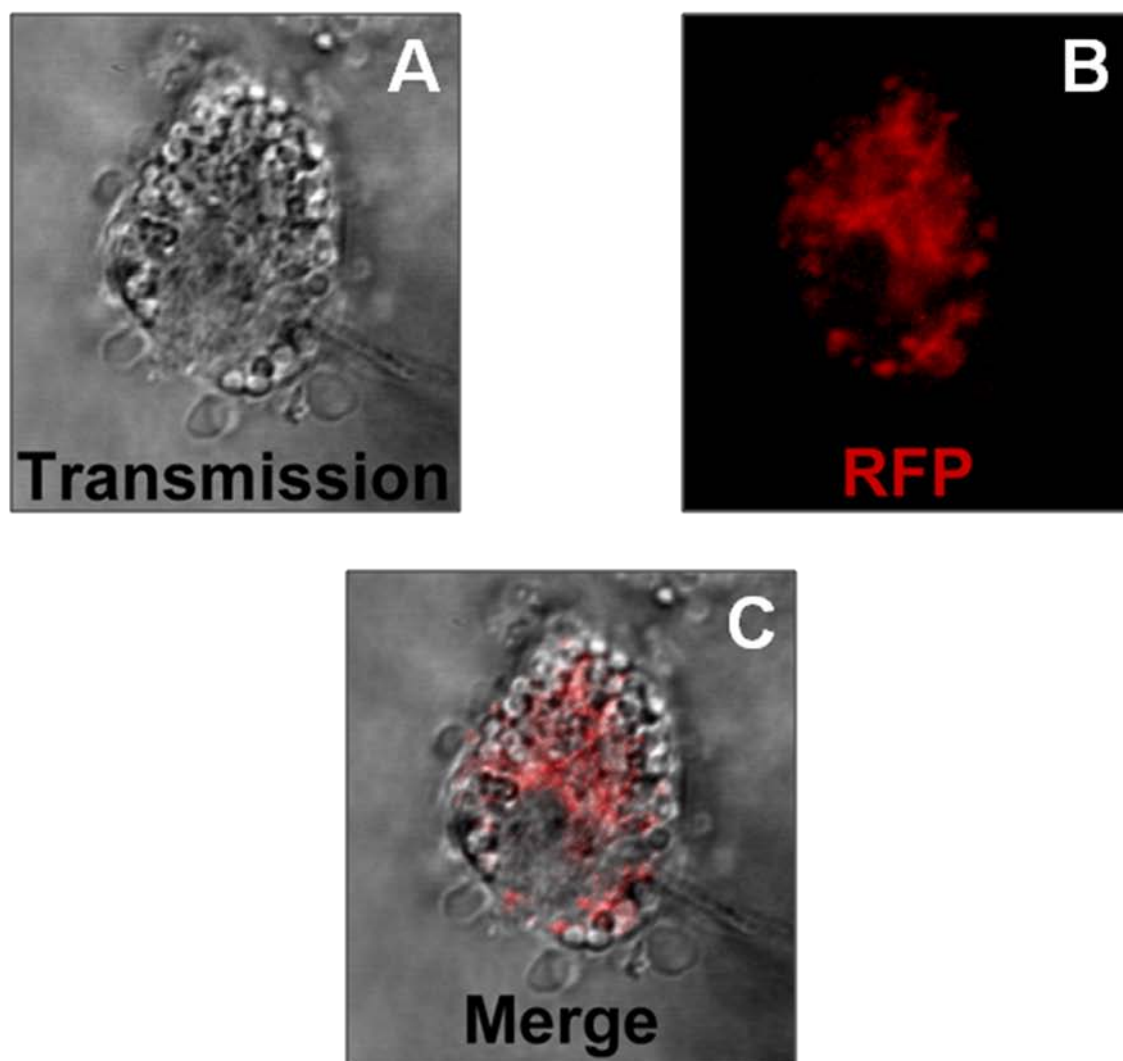


Figura 14. Célula dendrítica cultivada após transfecção com plasmídeo DsRed2.

Observa-se, em microscopia de confocal, uma célula dendrítica (A) em luz transmitida no aumento de 1200 X. (B) Fluorescência emitida pela proteína RFP em consequência da incidência do laser a 543 nm. (C) Imagem sobreposta de A e B, a fluorescência da RFP coincide com a região citoplasmática da célula dendrítica, mostrando que são capazes de expressar proteínas heterólogas.

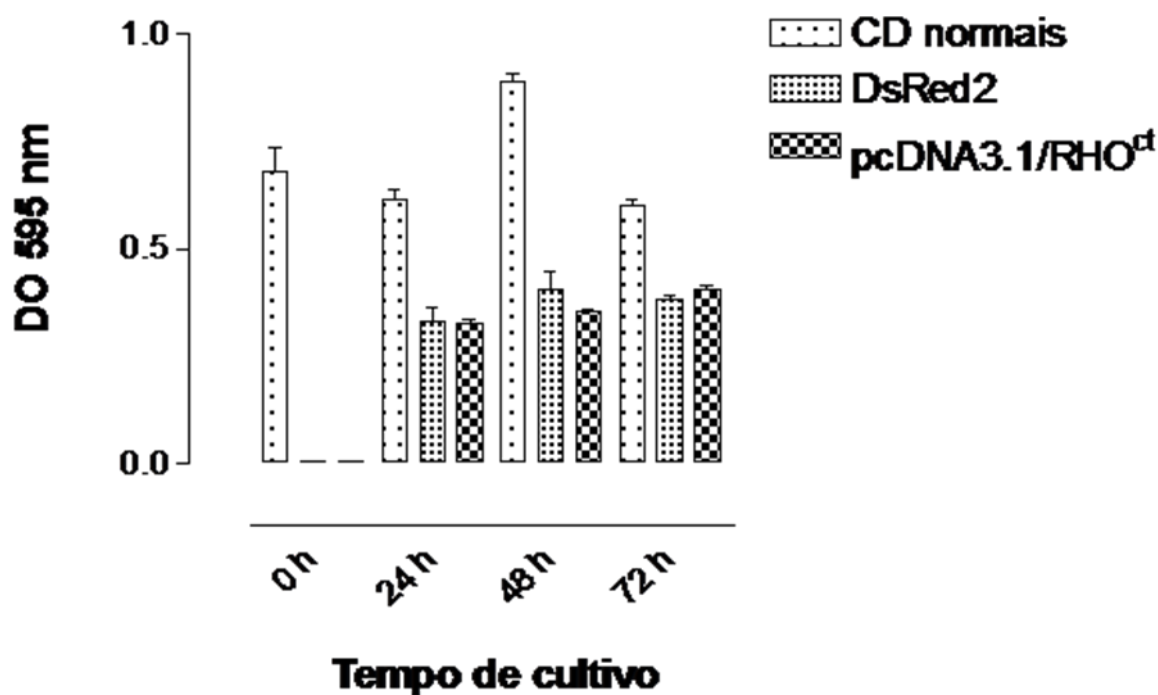


Figura 15. Determinação da viabilidade celular, por ensaio de MTT, de células dendríticas transfectadas com DsRed2 ou pcDNA3.1/RHO^{ct} em diferentes tempos de cultivo. Observar a queda da viabilidade celular após a transfecção, independente do plasmídeo utilizado. CD: células dendríticas.

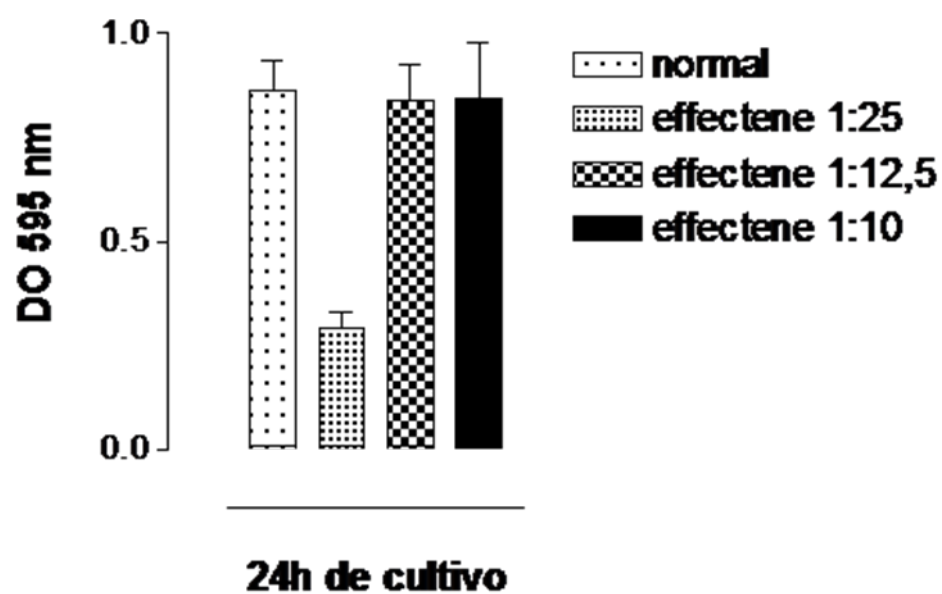


Figura 16. Determinação da viabilidade celular, por ensaio de MTT, de células dendríticas transfectadas com DsRed2 em diferentes concentrações do reagente *effectene*. Otimizado a concentração de reagente (1:12,5; 1:10) a viabilidade celular manteve-se constante.

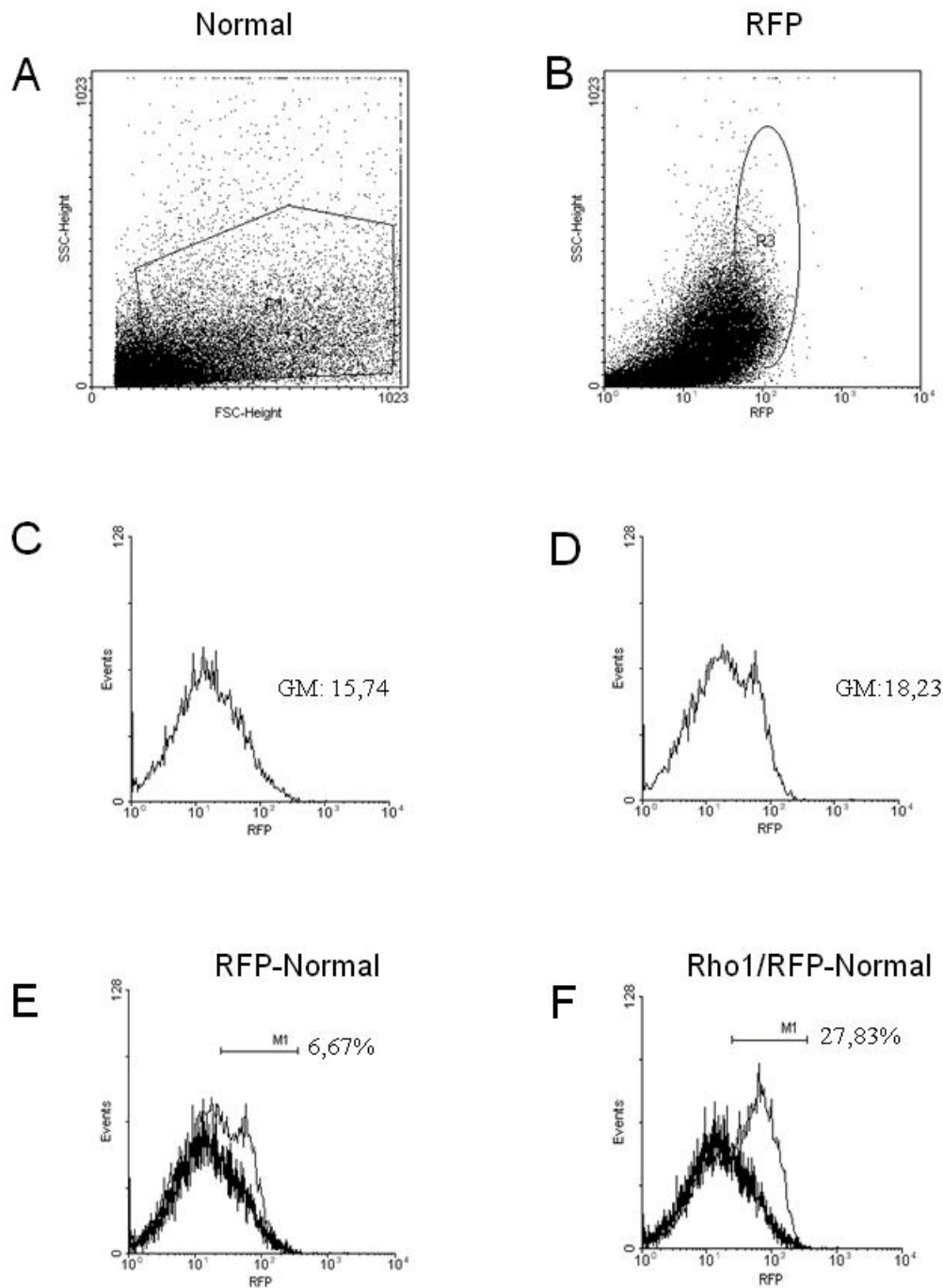


Figura 17. Citometria de fluxo de células dendríticas transfectadas com DsRed2 ou DsRed2/Rho1. Gráficos de dispersão puntual de FSC X SSC (A) e FL2 (RFP) X SSC (B) foram utilizados para determinar a população celular. O grau de positividade e intensidade de fluorescência foi determinado pela comparação da média geométrica apresentado pelos histograms de FL2 de cada grupo (C, D). Porcentagem de células que expressam RFP (E) e Rho1/RFP (F) foi acessado pela intercessão dos histogramas. GM: média geométrica.

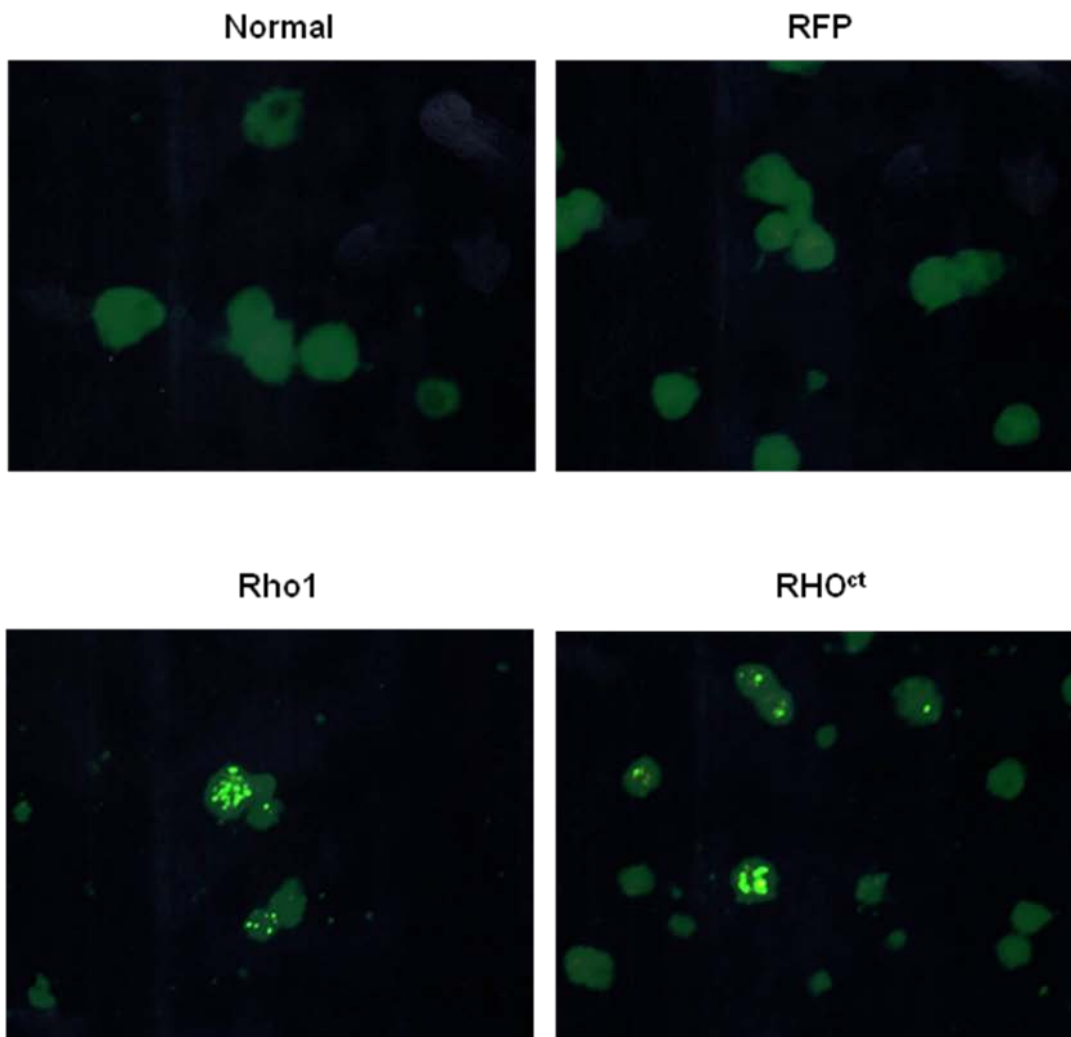


Figura 18. Evidenciação da expressão de Rho1 GTPase e RHO^{ct} na superfície de células dendríticas. Observa-se ensaio de imunofluorescência de células dendríticas transfectadas com DsRed2 (RFP), DsRed2/Rho1 (Rho1) e pcDNA3.1/RHO^{ct} (RHO^{ct}). Rho1 e RHO^{ct} apresentam fluorescência pontual de diferentes intensidades na superfície das células dendríticas. Aumento 300X

5. Discussão

A complexa interação entre o *S. mansoni* e seu hospedeiro definitivo é refletido no acúmulo do conhecimento científico gerado em décadas de estudo. Apesar, pouco se tem avançado na busca de métodos efetivos de controle e prevenção que substituam, ou complementem, o tratamento quimioterápico e técnicas dispendiosas de profilaxia. Os esforços concentram-se na busca de uma vacina definitiva que ofereça perspectivas de evitar a transmissão e reduzir os efeitos patológicos da doença (Katz, 1999). Entretanto, enquanto muitos antígenos candidatos foram descritos e testados em vários modelos animais, níveis sub-ótimos de proteção selecionaram apenas alguns destes para prosseguir no desenvolvimento de vacinas (Katz, 1999; Bergquist & Colley, 1998).

No entanto, com os resultados insatisfatórios nos níveis de proteção gerados em modelos murinos com os seis principais candidatos a vacina anti-esquistossomótica (Bergquist & Colley, 1998), tornou-se necessário buscar novos antígenos e estratégias de imunização que promovam uma resposta imune mais efetiva. Dentro deste contexto, foi proposto nesta dissertação o desenvolvimento de uma nova estratégia para induzir imunidade protetora contra a esquistossomose. Assim sendo, células dendríticas foram transfectadas com genes de antígenos do *S. mansoni* objetivando a sua utilização como vacina celular.

Para a realização dos nossos objetivos, o primeiro passo constituiu na utilização de anticorpos purificados de pacientes humanos esquistossomóticos na seleção de antígenos recombinantes do verme adulto do *S. mansoni* a partir de uma biblioteca de cDNA. Em nosso laboratório, esta técnica foi utilizada na identificação de potenciais candidatos a vacinação para a esquistossomose e paracoccidiodomicose (Makarova et al., 2003; Góes, 2002; Zouain et al., 1998).

Zouain e colaboradores (1998) realizaram a triagem de uma biblioteca de cDNA λ ZAP derivada de mRNA do verme adulto de *S. mansoni*. Antígenos recombinantes, expressos em bactérias *E. coli* transformados com fagos λ da biblioteca, foram adsorvidos em um disco de nitrocelulose diretamente da placa de cultura. Para a seleção, foi utilizado anticorpos humanos reativos a SWAP purificados por cromatografia de afinidade. Por esse processo, identificou-se 30 clones, sendo que 28 clones (93,3%) foram putativamente homólogos a genes do *S. mansoni*. Dentre eles, cita-se a identificação de clones codificadores para antígenos candidatos potenciais a comporem vacinas anti-esquistossomótia, como

a Catepsina B (Sm31), Catepsina L e GST 26 kDa (Dalton et al., 1996; Wright et al., 1991; Hoffmann and Strand, 1996).

Recentemente, Makarova e colaboradores (2003) realizaram a triagem de uma biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* por ELISA indireto. Objetivou-se a identificação de clones que expressam antígenos que compõem a fração PIII de SWAP. Para tal, foi utilizado na seleção anticorpos de coelho imunizados com esta fração. Por este processo foi identificado a proteína RP26 putativamente homóloga a Sm22.3. A RP26 mostrou-se capaz de discernir pacientes esquistossomóticos na fase aguda da doença, podendo ser usado como importante componente no imunodiagnóstico diferenciador da fase aguda e crônica da infecção por *S. mansoni* (Makarova et al., 2003).

No presente trabalho, antígenos expressos por clones transformados com cDNA de verme adulto do *S. mansoni* foram selecionados por ELISA de captura. A fase sólida foi sensibilizada com anticorpos humanos reativos a SWAP purificados por cromatografia de afinidade. Este processo foi utilizado para a eliminação de anticorpos reativos aos componentes bacterianos e dos fagos presentes nas preparações, minimizando a reatividade cruzada durante o processo (Zouain et al., 1998). Desta forma, ao adicionar os extratos dos clones, os antígenos recombinantes do *Schistosoma* foram capturados seletivamente por reação específica dos anticorpos.

A triagem de 200 colônias gerou 38 ASTs sendo que 12 (32%) apresentaram-se homólogas a sequências protéicas correspondentes a 10 genes distintos caracterizados e depositados no banco de dados do NCBI. As ASTs foram divididas em dois grupos: genes identificados ou não do *S. mansoni*.

Dentre as ASTs que apresentaram pareamento com genes do *Schistosoma*, estão incluídos os insertos dos clones SmAST34 e SmAST25 homólogos a proteína integral de membrana de 23 kDa (Sm23) e antígeno estimulatório de Linfócitos T (Sm10: cadeia leve de Dineína I), respectivamente. O antígeno Sm23 é uma proteína integral de membrana expressa em todas as formas evolutivas do verme e em vários tecidos, incluindo o tegumento do verme adulto (Oligino et al., 1988; Harn et al., 1985). Em humanos e camundongos infectados apresenta-se altamente imunogênico e oferece proteção contra infecção desafio em camundongos imunizados (Koster et al., 1993; Jeffs et al., 1991; Da'dara et al., 2002). O Sm23 é um dos seis antígenos selecionados pela WHO para o desenvolvimento de vacina

anti-esquistossomótica (Bergquist & Colley et al., 1998). Originalmente, o antígeno Sm10 foi identificado como alvo do anticorpo monoclonal 709A2/2 produzido em camundongos imunizados com extrato do tegumento do verme adulto (Hoffmann & Strand, 1996). O Sm10 é expresso apenas na fase pulmonar e adulta do verme e está relacionado a cadeia leve de dineína, um componente de um complexo enzimático envolvido com vários aspectos da motilidade em microtúbulos (Hoffmann & Strand, 1996; Valee, 1993). A presença de clones homólogos a antígenos previamente descritos na literatura corroboram com a validação e eficácia do método de seleção utilizado.

Dentro do mesmo grupo, selecionou-se o clone SmAST03 que possui um incerto de 394 pb codificador para 39 aminoácidos com 100% de identidade à porção C-terminal da proteína Rho1 GTPase do *S. mansoni*. As Rho GTPases são integrantes da superfamília Ras de GTPases de baixo peso molecular ligados a membrana através de isoprenóides. Como outros membros da família, ciclaram entre dois estados conformacionais caracterizados pela ligação e hidrólise de GTP (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Na sua forma ativa (ligada a GTP), associam-se a proteínas alvos desencadeando cascatas de sinalização que interferem em muitos processos celulares: dinâmica do citoesqueleto, regulação transcricional, progressão do ciclo celular e tráfico de membranas, perante a hidrólise de GTP retornam ao estado inativo (ligado a GDP) (Kjoller & Hall, 1999).

Na esquistossomose, evidências indicam o envolvimento de proteínas de baixo peso molecular que se ligam a GTP nos processos de maturação e deposição de ovos pelas fêmeas de *S. mansoni* (Vandewaa et al., 1989; Chen et al., 1993; Schussler et al., 1997). A atividade das enzimas pertencente a essa família está diretamente relacionada a sua localização na região interna da membrana citoplasmática (Kjoller & Hall, 1999). A adição de um isoprenóide, como modificação pós-transducional, possui função de ancorá-las a membrana das células, o deslocamento destas implica na perda da reatividade (Kjoller & Hall, 1999). Foi observado que a inibição da produção dos isoprenóides, através do bloqueio da via metabólica do mevalonato, provoca a redução *in vitro* e *in vivo* da produção de ovos pelas fêmeas do Schistosoma e conseqüentemente no bloqueio dos efeitos patológicos da doença em camundongos infectados (Loeffler & Bennett, 1996; Chen et al., 1993). Chegou-se aos mesmos resultados pela utilização do inibidor BZA-5B da enzima preniltransferase responsável pela prenilação das proteínas

(Loeffler & Bennett, 1996). Estes fatos direcionaram nosso interesse na busca de uma melhor compreensão do envolvimento da Rho GTPase nos processos imunológicos desencadeados na esquistossomose.

A Rho1 GTPase (SMRHO) foi identificada primeiramente por Santos e colaboradores (1999) em um esforço de caracterizar o perfil de expressão gênica de cercarias utilizando-se da triagem aleatória de uma biblioteca de cDNA. Foi selecionado um clone altamente homólogo a genes de Rho GTPase de diversos organismos eucariotos (Santos et al., 1999). A sequência genômica e o cDNA completo deste gene foi clonado e sequenciado (Santos et al., 2002). A análise comparativa da SMRHO demonstrou a conservação dos principais motivos estruturais, com exceção da substituição do motivo de prenilação CAAX que possui o primeiro resíduo alifático substituído por um aminoácido polar (SMRHO: CDAX) (Santos et al., 2002).

Recentemente, Vermeire e colaboradores (2003) determinaram, por ensaios de Western Blot, a expressão elevada de Rho1 GTPase em parasitas adultos do *S. mansoni*, e, em maior abundância, nas fêmeas. Através de imunolocalização, determinou-se a expressão de Rho1 nos tecidos vitelínicos de vermes adultos fêmeas, corroborando a hipótese de sua participação em processos de maturação e deposição de ovos.

O nosso trabalho apresenta a primeira evidência da importância da Rho1 GTPase nos processos de imunidade contra a esquistossomose. A seleção do clone SmAST03, homólogo a esta proteína, através da reatividade com anticorpos humanos de pacientes com esquistossomose sugere o potencial antigênico desta proteína. Além disto, camundongos imunizados com proteínas recombinantes de Rho1 GTPase fusionados a MBP apresentaram 40% de resistências a infecção desafio com o parasita além da redução dos efeitos patológicos da doença (dados não mostrados)

A sequência codificadora do clone SmAST03 foi clonado no plasmídeo de expressão em células eucariotas. Reações de PCR e a digestão enzimática do plasmídeo confirmaram a clonagem, foi observada, por seqüenciamento, a ocorrência de duas mutações. Em um dos casos, a mutação derivou a substituição do aminoácido Alanina (Rhoct: A⁸; SMRHO: A¹⁶²) por uma Valina. A manutenção do caráter apolar do aminoácido substituído sugere a conservação da estrutura

terciária do peptídeo e inalteração dos epitopos do mesmo (Branden & Tooze, 1999).

A sequência nucleotídica completa a Rho1 GTPase foi clonada em fusão com a proteína fluorescente RFP e observou-se, por sequenciamento, a conservação da sequência do inserto. A funcionalidade da construção gênica foi demonstrada pela expressão da proteína fusionada em células CHO. Após 48 horas de cultivo, células CHO transfectadas com o plasmídeo DsRed2/Rho1 apresentaram fluorescência vermelha indicativo da expressão e conservação da funcionalidade da proteína RFP.

Estratégias alternativas de vacinação estão sendo desenvolvidas em vista das dificuldades encontradas na produção de vacinas protéicas (Fynan et al., 1993). Dentro deste contexto, vacinas de DNA vêm sendo utilizadas na tentativa de conferir proteção contra a infecção por *S. mansoni*. A sequência gênica da calpaina (p80) de *S. mansoni*, inserido em vetor de expressão em células eucariotas WRG7077, foi utilizado para a imunização de camundongos (Hota-Mitchell et al, 1999). Clonou-se três formas do cDNA da proteína: (1) com a região 5'UTR (WRG-full p80), (2) mutação para estabilização da proteína e sem a região 5'UTR (WRG-mut p80), (3) mutação para estabilização da proteína e com a região 5'UTR (WRG-mut p80). Em ensaios de infecção desafio com cercárias, o plasmídeo WRG-mut p80, inoculado por via intradérmica, conferiu 60% de proteção aos camundongos imunizados. A aquisição de proteção foi relacionada ao perfil de resposta Th2 e o estado de não-proteção à Th1/th0 (Hota-mitchell et al, 1999).

Por outro lado, Dupré e colaboradores (2001) descreveram a indução de proteção e redução dos efeitos patológicos contra a infecção do Schistosoma por vacinação simultânea com plasmídeo clonado com Sm28GST e IL-18, inoculados por via intramuscular. Foi observado que a imunização de camundongos com Sm28GST em conjunto com IL-18 levou ao aumento significativo da secreção de INF γ por células antígenos-específicos, estando o perfil Th1 relacionado ao estado de proteção. Por este processo, obteve-se 29,6% de proteção e 22,6% de redução na deposição de ovos (Dupré et al., 2001).

Evidências experimentais sugerem uma relação direta entre a aquisição de imunidade por vacinas de DNA e células dendríticas derivadas da medula óssea. Corr e colaboradores (1996) geraram camundongos de medula óssea quimérica H-2^{bx^d}, no qual, o recipiente foi reconstituído com medula óssea de doadores com o

MHC do haplotipo H-2^b ou H-2^d. Seguido da injeção intramuscular com DNA plasmidial clonado com sequência gênica da nucleoproteína do vírus da Influenza, com ambos epitopos H-2^b e H-2^d restritos, foi mostrado que a resposta CTL gerada era restrita ao MHC do haplotipo das células da medula doadora, e não do segundo haplotipo expresso pelos miócitos do camundongo recipiente. Em adição, Iwasaki e colaboradores (1997), usando camundongos chimeras semelhantes, determinaram que a resposta CTL resultante da injeção intradérmica de DNA plasmidial foi mediada pelas células da medula óssea transplantada. Assim, ambos, demonstrando que a restrição ao haplotipo do MHC é determinada pelas células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea. Duas formas de ativação são sugeridas para a ativação de células dendríticas via vacinação por DNA: (1) células dendríticas são diretamente transfectadas, expressam e apresentam os antígenos de interesse; (2) antígeno secretado ou células apoptóticas que expressaram o antígeno são macropinocitadas ou fagocitadas pelas células dendríticas que apresentam o antígeno de interesse (Coombes et al., 2001).

Visto a importância crítica das células dendríticas na indução de imunidade através de imunização genética, decidimos utilizar células dendríticas, cultivadas *in vitro*, e transfectadas com a sequência do antígeno Rho1 GTPase como um adjuvante celular para a aquisição de imunidade contra a esquistossomose.

Células dendríticas viáveis foram obtidas através do cultivo de células da medula óssea murina em meio de cultura acrescido de GM-CSF e IL-4 (Son et al., 2002, Fields et al., 1998). Son e colaboradores (2002), descreveram a obtenção de aproximadamente 3×10^7 células/camundongo com 89% de pureza em 9 dias de cultivo, comparativamente melhor ao método convencional, onde obtem-se 3×10^6 células/camundongo com 82% de pureza (Son et al., 2002; Inaba et al., 1992). Foi mostrado também que as células dendríticas cultivadas por este método apresentaram maiores níveis de expressão de CD86, MHC de classe II e CD40, estimulavam melhor a proliferação de células T allogênicas além de terem melhor capacidade de processamento e apresentação de antígeno (Son et al., 2002). As células dendríticas obtidas em nosso trabalho apresentaram morfologia estrelada típica, correspondente a projeções do corpo celular em várias direções, visualmente o citoplasma continha poucos grânulos eletrodensos e muitas vesículas claras. As observações morfológicas detectadas estão de acordo com as descrições da literatura científica (Inaba et al., 1992).

A maturação final das células dendríticas *in vivo* ocorre após a sua exposição a estímulos inflamatórios ou no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos tais como LPS, dupla fita de RNA ou motivos de DNA CpG (Banchereau et al., 2000). Após a ativação, células dendríticas são caracterizadas pela expressão do MHC classe II, moléculas co-estimulatórias, secreção de citocinas e migração (Banchereau et al., 2000; Kaisho et al., 2001). Um processo similar de maturação e ativação pode ser induzido *in vitro* pela adição de LPS (Jorgensen et al., 2002; Kaisho et al., 2001). Desta forma, o efeito estimulatório do LPS foi determinado sobre as células dendríticas geradas. A taxa metabólica das células dendríticas estimuladas com LPS mostrou-se 78% superior às células sem o estímulo. O aumento do metabolismo é característico de células dendríticas que entraram no estado de ativação, mostrando que a forma de cultivo gera células imaturas (Rescigno et al., 1999).

As células dendríticas geradas *in vitro* conservam a atividade intrínseca de fagocitose característica a esta classe de células apresentadoras de antígeno (Inaba et al. 1993; Matsumo et al., 1996). Inaba e colaboradores (1993) demonstraram que células dendríticas, no estágio primário de seu desenvolvimento correspondente às células imaturas, podem internalizar esferas de látex e partículas bacteriana, processo que desencadeia a maturação e aquisição de capacidade estimulatória de linfócitos T. Em nosso trabalho, cerca de 77% das células apresentaram fagocitose quando cultivadas na presença de partículas de látex. As células fagocíticas apresentaram morfologia típica de células dendríticas, sendo a fração de células não fagocíticas provável contaminante da cultura, células mortas ou em diferenciação (Son et al., 2002; Matsumo et al., 1996; Inaba et al., 1992).

As células dendríticas geradas *in vitro* e transfectadas por um método físico expressaram com sucesso o antígeno Rho GTPase do *S. mansoni*. A eficiência de transfecção depende do método utilizado e do tipo celular alvo. Até o momento, o vetor de adenovírus tem sido preferencialmente escolhido para alcançar a maior taxa de transfecção em células dendríticas (Jenne et al., 2001). Vetores de adenovírus podem realizar transfecções com eficiência superior a 90%, enquanto que métodos físicos não excedem a 30% (Jenne et al., 2001; Zhong et al., 1999). Porém, células transfectadas com adenovírus expressam, em conjunto com a proteína recombinante de interesse, antígenos virais altamente imunogênicos que levam a perda coordenada da expressão do transgene e o desenvolvimento de

resposta inflamatória que reduzem os efeitos de imunizações subsequentes (Yang et al., 1995; Irvine et al., 2000). Além disto, evidências sugerem que a alta relação de partículas virais por célula, utilizadas para a transfecção eficiente com o adenovírus, podem resultar na supressão da capacidade estimulatória das células dendríticas (Irvine et al., 2000).

O uso do reagente Effectene, após a otimização do processo de transfecção, gerou em média 27% de células dendríticas expressando Rho1/RFP em níveis detectáveis. Porém, o nível de células apresentando o antígeno pode ser maior, parcialmente por que células dendríticas que expressam genes de antígenos em níveis não detectáveis podem estimular respostas de linfócitos T antígeno-específicos e antígenos expressos endogenamente por células dendríticas podem ser transferidos para outras (Phillip et al., 1998; Knight et al., 1998). A confirmação da apresentação do antígeno específico Rho1 GTPase e RHO^{ct} na superfície das células dendríticas transfectadas foi acessada por ensaios de imunofluorescência.

Irvine e colaboradores (2000) descrevem a indução de resposta antígeno-específico em camundongos imunizados com células dendríticas transfectadas com CL22 associado a plamídeos com genes de antígenos virais ou tumorais. Observou-se que apenas 3,000 células dendríticas, expressando a NP (nucleoproteína) do vírus da Influenza A, foram necessárias para desenvolver uma resposta primária de células T citotóxicas antígenos-específicos em camundongos imunizados (Irvine et al., 2000). Nosso modelo, permite a obtenção de 10⁵ a 10⁶ células dendríticas transfectadas (processo de transfecção não otimizado e otimizado, respectivamente) gerando grandes perspectivas na indução de forte resposta imune protetora em processos de imunização.

6. Conclusões

- 6.1. A técnica de ELISA de captura mostrou-se eficaz na seleção de antígenos de verme adulto do *Schistosoma mansoni* a partir de uma biblioteca de cDNA.
- 6.2. O cultivo de células da medula óssea murina, na presença das citocinas GM-CSF e IL-4, gera células dendríticas imaturas viáveis que conservam suas características funcionais.
- 6.3. Células dendríticas cultivadas da medula óssea murina são transfectáveis e capazes de expressar genes heterólogos.
- 6.4. Células dendríticas cultivadas da medula óssea murina expressam Rho1 GTPase e RHO^{ct} do *S. mansoni* e estes são apresentados na membrana das células.

7. Perspectivas

- 7.1. Realizar ensaios de imunização de camundongos com células dendríticas que expressam o antígeno Rho1 e determinar eficiência de proteção frente a infecção desafio com o *S. mansoni*.
- 7.2. Identificar os epitopos antigênicos da Rho1 GTPase e fazer a expressão do peptídeo de interesse em células dendríticas.
- 7.3. Realizar vacinação multi-peptídica utilizando como adjuvante as células dendríticas.

8. Bibliografia

AHUJA SS., REDDICK RL., SATO N., MONTALBO E., KOSTECKI V., ZHAO W., DOLAN MJ., MELBY PC., AHUJA SK. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. **J. Immunol.** 163(7): 3890-3897 (1999).

ALBERT ML., SAUTER B., BHARDWAJ N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. **Nature**, 392: 86-89 (1998).

ALTSCHUL SF., LIPMAN DJ. Protein database searches for multiple alignments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 87(14): 5509-5513 (1990).

ALTSCHUL SF., MADDEN TL., SCHAFFER AA., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25(17): 3389-3402 (1997).

ANDRADE ZA., WARREN KS. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 58: 53-57 (1964).

ANGELI V., FAVEEUW C., ROYE O., FONTAINE J., TEISSIER E., CAPRON A., WOLOWCZUK I., CAPRON M., TROTTEIN F. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **J. Exp. Med.**, 193: 1135-1147 (2001).

APPELMELK BJ., VAN DIE I., VAN VLIET SJ., VANDENBROUCKE-GRAUKS CM., GEIJTENBEEK TB., VAN KOOYK Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. **J. Immunol.**, 170 (4): 1635-1639 (2003).

BANCHEREAU J., STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, 392: 245-252 (1998).

BANCHEREAU J., BRIERE F., CAUX C., DAVOUST J., LEBECQUE S., LIU Y., PULENDRAN B., PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Ver. Immunol.**, 18:767-811 (2000).

BARTON GM., MEDZHITOV R. Control of adaptive immune responses by toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, 14: 380-383 (2002).

BENDER A., SAPP M., SCHULER G., STEINMAN RM., BHARDWAJ N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. **J. Immunol. Methods**, 196(2): 121-35 (1996).

BERGQUIST NR. Controlling schistosomiasis by vaccination. A realistic option? **Parasitol. Today**, 11 (5): 191-194 (1995).

BERGQUIST NR., COLLEY DG. Schistosomiasis vaccine: research to development. **Parasitol. Today**, 14 (3): 99-104 (1998).

BERGQUIST NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **TRENDS Parasitol.**, 18 (7): 309-14 (2002).

BOROS DL., WARREN KS. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Exp. Med.**, 132: 448-507 (1970).

BOURGUIN I., MOSER M., BUZONE-GATEL D., TIELEMANS F., BOUT D., URBAIN J., LEO O. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. **Infect. Immun.**, 66 (10): 4867-4874 (1998).

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254 (1976).

BRANDEN C., TOOZE J. Signal Transduction. In *Introduction to protein structure*. Pp. 251-279. Garland Publishing, Inc. NY, USA. 2^a Edição (1998).

BRUNET LR., FINKELMAN FD., CHEEVER AW., KOPF MA., PEARCE EJ. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **J. Immunol.** 159(2): 777-85 (1997).

CAUX C., VANBERVLIET B., MASSACRIER C., DEZUTTER-DAMBUYANT C., DE SAINT-VIS B., JACQUET C., YONEDA K., IMAMURA S., SCHMITT D., BANCHEREAU J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. **J. Exp. Med.**, 184(2): 695-706 (1996).

CAVANAGH LL., ANDRIAN UHV. Travellers in many guises: the origins and destination of dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, 80: 448-462 (2002).

CELLA¹ M., SALLUSTO F., LANZAVECCHIA A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Curr. Opin. Immunol.**, 9: 10-16 (1997).

CELLA² M., ENGERING A., PINET V., PIETERS J., LANZAVECCHIA A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. **Nature**, 388: 782-787 (1997).

CHAIN BM. Current issues in antigen presentation – focus on the dendritic cell. **Immunol. Letters**, 89(2-3): 237-241 (2003).

CHEN GZ., BENNETT JL. Characterization of mevalonate-labeled lipids isolated from parasite proteins in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 59(2): 287-292 (1993).

CHLICHLIA K., BAHGAT M., RUPPEL A., SCHIRRMACHER V. DNA vaccination with asparaginyl endopeptidase (Sm32) from the parasite *Schistosoma mansoni*: anti-fecundity effect induced in mice. **Vaccine**, 20: 439-447 (2002).

COCHIOVIUS B., STASSAR M., SCHREURS M., BENNER A., ADEMA G. Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. **Immunol Letters**, 80: 89-96 (2002).

COLLEY DG. Dynamics of the human immune response to schistosomes. **In: Bailliere's clinical tropical medicine and communicable diseases: schistosomiasis**, 2 (2): 315-332 (1987).

COOMBES BK, MAHONY JB. Dendritic cell discoveries provide new insight into the cellular immunobiology of DNA vaccines. **Immunol. Lett.**, 78(2): 103-111 (2001).

CORR M., LEE DJ., CARSON DA., TIGHE H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. **J. Exp. Med.**, 184(4): 1555-1560 (1996).

DA'DARA AA., SKELLY PJ., WANG M., HARN DA. Immunization with DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. **Vaccine**, 20: 359-369 (2002).

DAGERT M., EHRLICH SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. **Gene**, 6:23-28 (1974).

DALTON JP., CLOUGH KA., JONES MK., BRINDLEY PJ. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. **Infect. Immun.**, 64(4): 1328-1334 (1996).

DEAN DA., MURREL KD., SOUTAI X., MANGOLD BL. Immunization of mice with ultraviolet-irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae: a reevaluation. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 32 (4): 790-793 (1983).

DIEU-NOSJEAN MC., VICARI A., LEBECQUE S., CAUX C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. **J. Leukoc. Biol.**, 66(2): 252-62 (1999).

DIEU-NOSJEAN MC., MASSACRIER C., HOMEY B., VANBERVLIET B PIN JJ., VICARI A., LEBECQUE S., DEZUTTER-AMBUYANT C., SCHMITT D., ZLOTNIK A., CAUX C. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. **J. Exp. Med.**, 192 (5):705-717 (2000).

DIEU M., VANBERVLIET B., VICARI A., BRINDON J., OLDHAM E., AIT-YAHIA S., BRIERE F., ZLOTNIK A., LEBECQUE S., CAUX C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J. Exp. Med.**, 188:373-386 (1998).

DOUGHTY BL., GOES AM., PARRA JC., ROCHA RS., KATZ N., COLLEY DG., GAZZINELLI G. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in humans schistosomiasis. I. Granuloma formation and modulation around polyacrylamide antigen-conjugated beads. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82 (suppl 4): 47-54 (1987).

DUPRE L., KREMER L., WOLOWCZUK I., RIVEAU G., CAPRON A., LOCHT C. Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. **Vaccine**, 19(11-12): 1373-1380 (2001).
Erratum in: **Vaccine**, 19(25-26): 3606 (2001).

ETIENNE-MANNEVILLE S., HALL A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, 420(6916): 629-635 (2002).

FANGER NA., WARDWELL K., SHEN L., TEDDER TF., GUYRE PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. **J. Immuno.** 157(2): 541-8 (1996).

FAVEEUW C., ANGELI V., FONTAINE J., MALISZEWSKI C., CAPRON A., VAN KAER L., MOSER M., CAPRON M., TROTTEIN F. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice. **J. Immunol.**, 169: 906-912 (2002).

FAVEEUW C., MALLEVAEY T., PASCHINGER K., WILSON IB., FONTAINE J., MOLLICONE R., ORIOL R., ALTMANN F., LEROUGE P., CAPRON M., TROTTEIN F. Schistosome N-glycans containing core alpha – fucose and core beta 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice. **Eur. J. Immunol.**, 33 (5): 1271-1281 (2003).

FIELDS RC., SHIMIZU K., MULÉ JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 95: 9482-9487 (1998).

FONG L., ENGLEMAN EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Ver. Immunol.**, 18: 245-173 (2000).

FRANCO GR., ADAMS MD., SOARES MB., SIMPSON AJ., VENTER JC., PENA SD. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a direcional cDNA library. **Gene.** 152(2): 141-7 (1995).

FYNAN EF., WEBSTER RG., FULLER DB., HAYNES JR., SANTORO JC., ROBINSON HL. DNA vaccines: protective immunization by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 11578-11482 (1993).

GREAVES DR., WANG W., DAIRAGHI DJ., DIEU MC., SAINT-VIS B., FRANZ-BACON K., ROSSI D., CAUX C., McCLANAHAN T., GORDON S., ZLOTNIK A SCHALL TJ. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 α and is highly expressed in human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, 186 (6): 837-844 (1997).

GOES TS. Identificação de genes que codificam proteínas imunogênicas de células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* através da estratégia de etiquetas de sequências antigênicas. Belo Horizonte: UFMG. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (2002).

GORDON RM., GRIFITHS RB. Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of morphological changes observed in the newly penetrated larvae. **Am. Trop. Med. Parasitol.**, 45: 227-243 (1951).

GUSTAVSON S., ZOUAIN CS., ALVES JB., LEITE MF., GOES AM. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol. Int.**, 51(3): 259-269 (2002).

GUSTAVSON S., OLIVEIRA SC., ALVES JB., GOES AM. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection by antigens purified from PIII, a fraction of adult worm, associated to the downregulation of granuloma formation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93 (Suppl 1): 191-6 (1998).

HARLOW ED., LANE DP. Cell staining. In *Antibodies: A laboratory manual*. Pp. 359-420. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA (1988).

HARN DA., MITSUYAMA M., HUGUENEL ED., DAVID JR. *Schistosoma mansoni*: detection by monoclonal antibody of a 22,000-dalton surface membrane antigen which may be blocked by host molecules on lung stage parasites. **J. Immunol.** 135(3): 2115-20 (1985).

HIRSCH C., GOES AM. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. **Parasitology**, 112 (Pt 6): 529-35 (1996).

HIRSCH C., CARVALHO-QUEIROZ C., FRANCO GR., PENA SD., SIMPSON AJ., GOES AM. Evidentiatio of paramyosin (Sm97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, 92(5): 663-7 (1997).

HOFFMANN KF., STRAND M. Molecular identification of a *Schistosoma mansoni* tegumental protein with similarity to cytoplasmic dynein light chains. **J. Biol. Chem.**, 271(42): 26117-26123 (1996).

HOTA-MITCHELL S., CLARKE MW., PODESTA RB., DEKABAN GA. Recombinant vaccinia viruses and gene gun vectors expressing the large subunit of *Schistosoma mansoni* calpain used in a murine immunization-challenge model. **Vaccine**, 17(11-12): 1338-1354 (1999).

INABA¹ K., STEINMAN RM., PACK MW., HIKEKI^a, INABA M., SUDO T., WOLPE S., SCHULER G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. **J. Exp. Med.**, 175: 1157-1167 (1992).

INABA² K., INABA M., ROMANI N., AYA H., DEGUCHI M., IKEHARA., MURAMATSU S., STEINMAN RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, 176: 1693-1702 (1992).

INABA K., INABA M., NAITO M., STEINMAN RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. **J. Exp. Med.**, 178: 479-88 (1993).

IRVINE AS., TRINDER PKE., LAUGHTON DL., KETTERINGHAM H., McDERMOTT RH., REID SCH., HAINES AMR., AMIR A., HUSAIN R., DOSHI R., YOUNG LS., MOUNTAIN A. Effective nonviral transfection of dendritic cells and their use for *in vivo* immunization. **Nature Biotech.**, 18: 1273-8 (2000).

ISMAIL M., BOTROS S., METWALLY A., WILLIAM S., FARGHALLY A., TAO LF., DAY TA., BENNET JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 60 (6): 932-935 (1999).

IWASAKI A., TORRES CA., OHASHI PS., ROBINSON HL., BARBER BH. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. **J. Immunol.**, 159(1): 11-14 (1997).

JEFFS SA., HAGAN P., ALLEN R., COOREA-OLIVEIRA R., SMITHERS SR., SIMPSON AJ. Molecular cloning and characterization of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognized by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 46(1): 159-167 (1991).

JENNE L., SCHULER G., STEINKASSERER A. Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. **TRENDS Immunol.**, 22(2): 102-107 (2001).

JIANG W., SWIGGARD WJ., HEUFLER C., PENG M., MIRZA ^a, STEINMAN RM., NUSSENZWEIG MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. **Nature**, 375: 151-155 (1995).

JONG EC., VIEIRA PL., KALINSKI P., SCHUITEMAKER JH., TANAKA U., WIERENGA EA., YAZDANBAKHSH M., KAPSENBERG ML. Microbial compounds selectively induce Th1-cell-promoting or Th2-cell-promoting dendritic cells *in vitro* with diverse Th-polarizing signals. **J. Immunol.**, 168: 1704-1709 (2002).

JONULEIT H., KUHN U., MULLER G., STEINBRINK K., PARAGNIK L., SCHMITT E., KNOP J., ENK AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. **Eur. J. Immunol.**, 27(12): 3135-3142 (1997).

JORGENSEN TN., HAASE C., MICHELSEN BK. Treatment of an immortalized APC cell line with both cytokines and LPS ensures effective T-cell activation *in vivo*. **Scand. J. Immunol.**, 56:492-503 (2002).

KAISHO T., AKIRA S., Dendritic-cell function in Toll-Like receptor and MyD88-Knockout mice. **TRENDS Immunol.**, 22(2): 78-83 (2001).

KALINSKI P., HILKENS UM., WIERENGA EA., KAPSENBERG M. T-cell priming by type-I and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol. Today**, 20 (12): 561-567 (1999).

KATZ N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32(6): 705-711 (1999).

KATZ SI., TAMAKI K., SACHS DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. **Nature**, 282 (5736): 324-326 (1979).

KIRMAN JR., SEDER RA. DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? **Curr. Opin Immunol.**, 15(4): 471-476 (2003).

KJOLLER L., HALL A. Signaling to Rho GTPases. **Exp. Cell Res.**, 253(1): 166-179 (1999).

KLOETZEL K. Schistosomiasis mansoni in Brazil: Does social development sufficient? **Parasitol. Today**, 5 (12): 386-391 (1989).

KNIGHT SC., IQBALL S., ROBERTS MS., MACATONIA S., BEDFORD PA. Transfer of antigen between dendritic cells in the stimulation of primary T cell proliferation. **Eur. J. Immuno.**, 28: 1636-1644 (1998).

KOSTER B., HALL MR., STRAND M. *Schistosoma mansoni*: immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. **Exp. Parasitol.**, 77(3): 282-94 (1993).

KUPIEC-WECLINSKI JW., AUSTYN JM., MORRIS PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. **J. Exp. Med.**, 167: 632-645 (1988).

KUSEL J., HAGAN P., Praziquantel – its use, cost and possible development of resistance. **Parasitol. Today.**, 15 (9); 352-354 (1999).

LAEMMLI UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 224: 680-685 (1970).

LOEFFLER IK., BENNET JL. A rab-related GTP-binding protein in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 77(1): 31-40 (1996).

LUNDE MN., OTTESEN EA., CHEEVER AW. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28(1): 87-91 (1979).

MaCDONALD AS., STRAW AD., BAUMAN B., PEARCE EJ. CD8⁺ dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **J. Immunol.**, 167: 1982-1988 (2001).

MAKAROVA E., GOES TS., MARCATTO AL., LEITE MF., GOES AM. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. **Parasitol. Int.**, 52(4): 269-279 (2003).

MALEK TR. T helper cells, IL-12 and the generation of cytotoxic T-cell responses. **TRENDS Immunol.**, 23(10): 465-467 (2002).

MANDEL M., HIGA A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **J. Mol. Biol.**, 53(1): 159-162 (1970).

MATSUNO K., EZAKI T., KUDO S., UEHARA Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. **J. Exp. Med.**, 183(4): 1865-1878 (1996).

McWILLIAM AS., NELSON D., THOMAS JA., HOLT PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. **J. Exp. Med.** 179: 1331-1336 (1994).

McWILLIAM AS., NAPOLI S., MARSH AM., PEMPER FL., NELSON DJ., PIMM CL., STUMBLES PA., WELLS TNC., HOLT PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. **J. Exp. Med.**, 184: 2429-2432 (1996).

MILLER P., WILSON RA. A migration of schistosomulum of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, 80: 281-302 (1978).

MOORE DL., GROVE DI., WARREN KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: Quantification of cell population. **J. Pathol.**, 121: 41-50 (1977).

MORELLI AE., THOMSON AW. Dendritic cells under the spell of prostaglandins. **TRENDS Immunol.**, 24(3): 108-111 (2003).

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63 (1983).

NELSON MA., KANG S., BRAUN EL., CRAWFORD ME., DOLAN PL., LEONARD PM., MITCHELL J., ARMIJO AM., BEAN L., BLUEYES E. ET AL.. Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.**, 21: 348-363 (1997).

OLIGINO LD., PERCY AJ., HARN DA. Purification and immunochemical characterization of a 22 kilodalton surface antigen from *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 28(2): 95-103 (1988).

OLIVEIRA DM., GUSTAVSON S., SILVA-TEIXEIRA DN., GOES AM. Nitric oxide and IL-10 production induced by PIII-a fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm antigenic preparation – associated with downregulation of in vitro granuloma formation. **Hum. Immunol.**, 60(4): 305-311 (1999).

OKANO M., SATOSKAR AR., NISHIZAKI K., ABE M., HARM DA Jr. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. **J. Immunol.**, 163(12): 6712-6717 (1999).

OKANO M., SATOSKAR AR., NISHIZAKI K., HARM DA Jr. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. **J. Immunol.**, 167: 442-450 (2001).

O'ROURKE MG., JOHNSON M., LANAGAN C., SEE J., YANG J., BELL JR., SLATER GJ., KERR BM., CROWE B., PURDIE DM., ELLIOTT SL., ELLEM KA., SCHIMIDT CW. Durable complete clinical response in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. **Cancer Immunol. Immunother.**, 52 (6): 387-395 (2003).

PACZENSNY S., BERANGER S., SALZMANN J., KLATZMANN D., COLOMBO BM. Protection of mice against leukemia after vaccination with bone marrow-derived dendritic cells loaded with apoptotic leukemia cells. **Cancer Res.**, 61: 2386-2389 (2001).

PALUCKA K., BANCHEREAU J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. **Curr. Opin. Immunol.**, 14: 420-431 (2002).

PEARCE EJ., CASPAR P., GRZYCH JM., LEWIS FA., SHER A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med.**, 173(1): 159-166 (1991).

PHILIP R., BRUNETTE E., ASHTON J., ALTERS S., GADEA J., SORICH M., YAU J., O'DONOGHUE G., LEBKOWSKI J., OKARMA T., PHILIP M. Transgene expression in dendritic cells to induce antigen-specific cytotoxic T cells in healthy donors. **Cancer Gene Ther.**, 5: 236-246 (1998).

PIERRE P., TURLEY SJ., GATTI E., HULL M., MELTZER J., MIRZA A., INABA K., STEINMAN RM., MELLMAN I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. **Nature**. 388(6644): 787-92 (1997).

REIBMAN J., HSU Y., CHEN LC., BLECK B., GORDON T. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 28(6): 648-654 (2003).

REDMAN C., ROBERTSON A., FALLANO PG., MODHA J., KUSEL JR., DOENHOFF MJ., MARTIN RJ. Praziquantel: na urgent and exiting challenge. **Parasitol. Today**, 12: 14-20 (1996).

RESCIGNO M., GRANUCCI F., CITTERIO S., FOTI M., RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. **Immunol. Today**, 20: 200-203 (1999).

REY L. **Parasitologia**. Ed. Guanabara koogan, Rio de Janeiro (1991).

RIDGE JP., Di ROSA F., MATZINGER P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. **Nature**, 393: 474-478 (1998).

SABON LW. Remarks on *Schistosoma mansoni*. **J. Trop. Med. Hyg.**, 10: 303-304 (1907).

SALLUSTO F., CELLA M., DANIELI C., LANZAVECCHIA A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, 182: 389-400 (1995).

SANDOR M., WEINSTOCK JV., WYNN TA. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. **TRENDS Immunol.**, 24(1): 44-52 (2003).

SANGER F., NICKLEN S., COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 74(12): 5463-5467 (1977).

SANTOS TM., JOHNSTON DA., AZEVEDO V., RIDGERS IL., MARTINEZ MF., MAROTTA GB., SANTOS RL., FONSECA SJ., ORTEGA JM., RABELO EM., SABER M., AHMED HM., ROMEIH MH., FRANCO GR., ROLLINSON D., PENA SD. Analysis of the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* cercariae using

the expressed sequence tag approach. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 103(1): 79-97 (1999).

SANTOS TM. *Schistosoma mansoni*: Descoberta de novos genes e estudos de genômica funcional de uma Rho GTPase. Belo Horizonte: UFMG. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (2000).

SANTOS TM., MACHADO CR., FRANCO GR., PENA SD. Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 125(1-2): 103-112 (2002).

SATO H., KAMIYA H., Role of epidermal Langerhans cells in the induction of protective immunity to *Schistosoma mansoni* in guinea-pigs. **Immunology**, 84(2): 233-240 (1995).

SATO H., INABA T., KAMIYA H. Production of murine monoclonal antibodies to guinea pig leukocytes and immunohistochemistry of guinea pig skin exposed to *Schistosoma mansoni*. **Hybridoma**, 16(6): 529-536 (1997).

SATO H., KAMIYA H., Accelerated influx of dendritic cells into the lymph nodes draining skin sites exposed to attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* in guinea-pigs. **Parasite Immunol.**, 20: 337-343 (1998).

SATO H., KAMIYA H., Defect of protective immunity to *Schistosoma mansoni* infection in Mongolian gerbils involves limited recruitment of dendritic cells in vaccinated skin. **Parasite Immunol.**, 23: 627-632 (2001).

SCHRAMM G., FALCONE FH., GRONOW A., HAISCH K., MAMAT U., DOENHOFF MJ., OLIVEIRA G., GALLET J., DAHINDEN CA., HAAS H. Molecular characterization of an Interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Biol. Chem.**, 278 (20): 18384-18392 (2003).

SCHULER G., STEINMAN RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells *in vitro*. **J. Exp. Med.**, 161: 526-546 (1985).

SCHULER G., SCHULER-THURNER B., STEINMAN RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. **Curr. Opin. Immunol.**, 15: 138-147 (2003).

SCHRUSLER P., GREVELDING CG., KUNZ W. Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. **Parasitology**, 115(Pt 6): 629-634.

SHER A., PEARCE E., KAYE P. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. **Curr. Opin. Immunol.**, 15: 421-429 (2003).

SMITHERS SR., TERRY RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, 55(4): 695-700 (1965).

SON Y., EGAWA S., TATSUMI T., REDLINGER Jr., KALINSKI P., KANTO T. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. **J. Immunol. Methods**, 262: 145-157 (2002).

STEINMAN RM., POPE M., Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **J. Clin. Invest.**, 109: 1519-1526 (2002).

STEINMAN RM., NUSSENZWEIG. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 99 (1): 351-358 (2002).

STEINMAN RM., HAWIGER D., NUSSENZWEIG MC. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Ver. Immunol.**, 21: 685-711 (2003).

STIREWALT MA. *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomule. **In: Advances in Parasitology**, Academic Press, London, pp. 115-182 (1974).

TAKASAKI S., EMLING F., LEIVE L. Variants deficient in phagocytosis of latex beads isolated from the murine macrophagelike cell line J774. **J. Cell Biol.**, 98: 2198-2203 (1984).

THOMAS SW., RASMUSSEN SW., GLARING MA., ROUSTER JA., CHRISTIANSEN SK., OLIVER RP. Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis. **Fungal Genet. Biol.**, 33: 195-211 (2001).

VALLEE R. Molecular analysis of the microtubule motor dynein. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** 90(19): 8769-8772 (1993).

VANDEWAA EA., MILLS G., CHEN GZ., FOSTER LA., BENNETT JL. Physiological role of HMG-CoA reductase in regulating egg production by *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Physiol.**, 257(3 Pt 2): R618-625 (1989).

VERMEIRE JJ., OSMAN A., LOVERDE PT., WILLIAMS DL. Characterization of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, 33(7): 721-731 (2003).

WAINE GJ., McMANUS DP. Nucleic acids: vaccines of the future. **Parasitol. Today**, 11(3): 113-116 (1995).

WARREN KS., DOMINGO EO., COWAN RBT. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Am. J. Pathol.**, 51: 735-743 (1967).

WHO/CDT – World Health Organization. Division of Control of Tropical Disease. <http://www.who.ch/>, 1998.

WILLIAMS ME., MONTENEGRO S., DOMINGUES AL., WYNN TA., TEIXEIRA K., MAHANTY S, COUTINHO A., SHER A. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **J. Infect. Dis.**, 170(4): 946-54 (1994).

WRIGHT MD., HARRISON RA., MELDER AM., NEWPORT GR., MITCHELL GF. Another 26-kilodalton glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem. Parasitol.**, 49(1): 177-179 (1991).

YANG Y., LI Q., ERTL HCJ., WILSON JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. **J. Virol.**, 69(4): 2004-2015 (1995).

ZHONG L., GRANELLI-PIPERNO A., YONWON C., STEINMAN RM. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, 29: 964-972 (1999).

ZITVOGEL L., MAYORDOMO JI., TJANDRAWAN T., DeLEO AB., CLARKE MR., LOTZE MT., STORKUS WJ. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T Helper cell 1-associated cytokines. **J. Exp. Med.**, 183: 87-97 (1996).

ZOUAIN CS., AZEVEDO VA., FRANCO GR., PENA SD., GOES AM. Identification of genes encoding *Schistosoma mansoni* antigens using an antigenic sequence tag strategy. **J. Parasitol.**, Dec; 85(6): 1307-1310 (1998).

ZOUAIN CS., GUSTAVSON S., OLIVEIRA SC., AZEVEDO VA., ALVES JB., GOES AM. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. **Vaccine**, 19(9-10): 1218-1224 (2000).

ZOUAIN CS., GUSTAVSON S., SILVA-TEIXEIRA DN., CONTIGLI C., RODRIGUES V JR., LEITE MF., GOES AM. Human immune response in schistosomiasis: the role of P24 in the modulation of cellular reactivity to *Schistosoma mansoni* antigens. **Hum. Immunol.**, 63(8): 647-656 (2002).

9. Apêndice 1

SmAST02 410 pb 5'

CGATTCTTGGCCCTTAATGTCCTTGACGCCGGGCAATGATGTTATTTGGCCATGGCAATACAATTTTCCGCGCTTT
TTTCACTTCTTCAACCAAATGCTGAGACTCGTCGCAAACAAAATAAATGCCCTGGTGTGAGTTAGTCCCTTAATTAT
TTTTCAAAGTAAAAAGCAGTTTACACTGAGTGTGCAAGTATTTCTGTATCCCTCCTGTCTCTTTTTAATAACAA
AAGTATCCAACGCTCAGCCAGCCAGAAATTAGTTGACCTCATTTTGAAGTACTGACATAAGCGTGGAAATCTTG
AGTGGCTTGACAGGTCATACCAATGCCAGGATTATATGGCGGACTCCTGAAGAATGGGCTGATCTTATCGCG
AGATGGGCCCGATCCACTGGCCACAGCAATTCAGTTTGTGA

SmAST02 344 pb 3'complementar

AATCTCAAGCTGGTGGGTTTATTTTCACTTCCGCTATAACAAAACCTAAAATTTGTTCTTTGATTATCCCTA
GACCGTCGTACATAACGATAGTGTGCAACTTTATATCAATCCGATTTCCAAGTGTTTTTTGGCTGCACAAGGTTT
CAATAAATAATCCAGTACGACGTCTAACGTGAATTATGAATAATCCTGCTGACCCCTGTAGACTTTTTATTTT
TTCTTTTGTACTAGTAGTCCTTTTTTAAATACGGTTTTTTATTGAGTTAAACCCTGTATGTAATAATATGTA
ATAAATGGGAAATTTAATTTACCAATCTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST03 394 pb

CTTATGCCCTTTTGTAGTGTTCAGCTAAGACCAAGGAAGGAGTGCAGCGATGTTTTCTGTAGCAGCTACTCGAGCC
GCCTTGAATTCAGCGAAGAAGAAGAGGAGGAGGTGTGATTTAATTTGATCTCCACTGTTCTCTAAATTTGTCTAG
ATTTGATTTTCCGGTCTCCGAAACATACATTCCTCCCTAATCTTCCCTCAGGACCTTAAATTTGTACTTCTAT
CGGCTGCGTGTCTTTAACCAATCATATTTTTGTTTTGCCAACAAGACAATCCATTCCGCGAAATATTTGCCA
TTTTATTTTTGCTTGGTACTAAAATAGGGCATGCCTCATGTAACCTTATATTTATTGAGAATAAATTTACTATAAT
CAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST04 378 pb 5'

GTGTTTTTACATACTCATGTATTTCCAGAATAGACAAATCAGTCAACCTTTAACACAACCTTTAACCCACGCT
GCTATTCATCTGGAATACATGTACTTTCGCTCCTTCCCTTTGATTTCTTTACTATCTAAATGAATATATATGTA
TATTTCAGCGCACATCTTAAATTTTACTGTTGTAAATAAAATGTTTTGCATTGTTTTTTTTCGTTCTTTCAATG
TCAGTCATTAATTTTATTTACTATCATTTAATTTTCCCTTTGTTAGTATTTCTTCAACAATGTTCCAAATA
TATTCTGTAGTATATCCTTTCGCGATTTGGTATCAAAAATGATTATTTTTTTCAATAgAAAGCAATGTTTTTTTCT
TGCTCCGT

SmAST04 316 pb 3'complementar

CTTATCTTTTATTATTTACCCCCCTCCCCACCTATAATCCCTGCCCTAACCTGTGATCTCTGTGAAAAATAATTA
CCATATTTATAGTACCGTATTACCCTATTTTGTCTTAAACAGCTTACTACTTCTCTTTCATCCCTTCCCTGTTTTCT
TAATCCTTCACTCCATGTATTTTCTATGGAGTGTATGGATCTGGTTCATATTTCATGATGCAATTAAGAAT
TGTGCATCATTTATTATTACTATTAGTAAAGATTGTAATGCTAATGATCAATATATAATAATTTTGTTTTACAG
TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST06 341 pb

ATAGTTTCTCCATGGGAAGTTTAAAGGAAATATCATTTCTCAATGTATTTGTTTtagAAATAACAAACAAACA
CTTTCTTTTATACTAATATATGAATGAATACAATTTTACAGAAGAAAAGATTACAGAAAGACAGAGATAGA
TATATCCCCCCCCCTGTAAGTATAACAAAATTTAAATCTTTTTTTTCTTTTACAAAATTTGTTTTCTCCCGGT
TTCTTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTATGAATTTGTACGTTTAAAGTACAACCTTACTCATTTATTGAATAATAAAACAA
AGTTTAAAGAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST08 360 pb

TAAGATTGAGACAATTTGATGTTATTTTGCAAAATGTATTTGTCTAATGGATGGTTATCAGAATTTGAGTGAGATAG
TCTGTAATTTGTTCTTAAATACATTCATTGTCTCCATTCGTTTTTTCATTCACTACAAGAGTATAGTTGAAACT
CAAGTAAATGTGAATTTACATCTGATTTGATGAGTTAATAAATAATTTTATGTTATATTTCTTTTATTATTTCA
CTCTGTGATAAATGATTAAGATAAATTTTGAATATGTACTTTCCCTCGTTCTGTTCCCTTGACAACAATTTCAA
ATAAAAAAAAAACCTTTTTTTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST09 700

GGAAAAATTTATAGGTTTTGATAATAAAATTTTTCTTGTAAGGGGGTACCCTTACAGAATTTTCAAATTTTCCTTT
TATTGCTCTAAAATTAGGTATCAATTGAGGTAATTTTACTTGAGAAAATTTTTGATAAATTAGGTGTTCAACTGTG
GTTGATTTTTTTGGATGATAGATTTATTAATAAATATTTAAAAGGTATAGTCAATTGTGGTAGAAAGGTAATAGGAT
TTATAGGGTTACCTTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTAT
AGTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTT
TCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTAT
AGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCC
TTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTATCTTTTAG
TATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTA
TAGTACGGTAGGTGGGTAAAAA

SmAST10 545 pb

CTTGGTGTTCGCTCTTCGTGGTGGTATGCAGATTTTTGTGAAGACATTGACTGGTAAAACGATCACTTTGGAAG
TTGAGCCGAGTGACACCATTGAGAATGTGAAGGCCAAGATCCAAGATAAAGAAGGGATTCCACCTGATCAACAA
CGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTAGAAGATGGTCGCACATTGTCTGATTACAATATCCAGAAAGAGTCCAC
TCTTCACTTGGTGTTCGCTCTTCGTGGTGGTATGCAGATTTTTGTGAAGACATTGACTGGTAAAACGATCACTT
TGGAAGTTGAGCCGAGTGACACCATTGAGAATGTGAAGGCCAAGATCCAAGATAAAGAAGGGATTCCACCTGAT
CAACAACGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTAGAAGATGGTCGCACATTGTCTGATTACAATATCCAGAAAGA
GTCCACTCTACACTTGGTGTTCGCTCTTCGTGGAGGTTAACTTTAATTTTTGTTCAATTAACCTTAATAACGTTT
AATTTAACTTAAAAA

SmAST11 519 pb

GTATTCACTTAAACATGCATGTGATGTTCTAGCACCATCTAACAAGAGAAGCAAATCGAAAGTAAAGTCAACTA
GTGATGTTTCCACTATTGATTTCCGCCACGAGTAGTAGCAATACTAGTACTGCTACTGGTAGTGATGCTAATATT
GTCCAATTATTATGTACAAAAACCACAACAAAACCACCTGAAGAGGTCAAAGTGAAAAATGTATTAAGAGAGA
TATAATAATCAATGAATAATTATATTCCTATTTACCCCATCTTTATTTCCCTTATTTTTCCCTTTCAATGTTATG
GTAAGTGTATTGCTTACTGCAACATTAATTCATCTTTATTTATTACCCATATATTTACTTTCATATTTAGCTGAA
TAGATGTTTTTTGTAACAAAGTTTTTCAGAAATTACATAATACGTGTGCTGAAAATGAGTATTTTGTCCCTTTTAT
GCGAATTGTTTAAATATTATAGTTTAAACATCGAATAAATGATGGTTAAATGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A

SmAST12 544 pb

GTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATATTTACACATTTACTTTATTTATTTGTTTTGCTCAAAATTAATTTACTGTGA
AACGAGTTAATGAGTGTATAAACTCACAAATGTCTTCTTATGTTTTTGGTTTTTTCAGCTTTCTTAGGAAGAAGT
ACAGCTTGAATATTTGGCAAACTCCACCTTGTGCTATTGTAACCTCCACCAATAATTTGTTTAATTTCTTCATC
ATTTCTTATAGCTAATTTGATAGTACGAGGAATAATACGTGTCTTCTTATTGTCTCTTGCTGCATTGCCAGCTA
ATTTCAACACTTCAGCAGCTAGATATTTAGAACGGCTGCTAAATAAACTGGAGCACCAGCTCCAACACGTTCA
GCATAATTGCCCTTTCTCAGGAGTCTATGAACACGACCAACAGGGAATTGTAATCCAGCAGCAGATCGACT
TTTTGCCCTAGCGCGTGTCTTACCACCTTTTCCCTCGTCCGCTCATGATACCGCGTTAAGTATATTTATTTAGTT
AATCTCTAGTAAAAA

SmAST13 518 pb

GTATATGTCATGAGAGATGTCACGTAATCAAACGATAGAACCCTCCTATCCCTCAAAATTATCTACTGCCTTC
CATCTGGTACCGCATTATTTGTTGGAGTGCTTGTGTTATTCTGAAGATGAACTTTAAACCATGTGTTCTTGTCTT
CTCGTGCAACCTCAACTGCCCTTTCCCTGATCTCTAAGCGTTTGCCAAACACATTGTTTCTTGTGTTTCAAAATT
TTGTCATAGTTGTAAGTACTCGTATACCTAATACGCGCCATAAGTTGCATGTAATGGGGATTGTCAGATCAATGCTCA
ACTAATTGAACAAAAAACATTTAAAGCTCATTTTTCTTTGTTCCCTGAAAGGTTCAATATATTGTACTTCAATTTT
CGGTATCTCTTCCAAAAATTTCTCTGTGATGAACGTTTTCAAAGGCCGTGTTACCATTTTTTAAAGTTTTCATCCC
TTTTAAATTTGAGTAAACTCGGCAAAATAAATGTGATCGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST14 352 pb

GTCTATAAAAAAGTTTAACTTTTTTGTCTTGTATAAGTTATTTTACAGTCATCTTTCATAATTATTTATCATCG
ACGCCTGCTTATTCATGTTGGTATGTTTTGCTTTTACATTTTGTGGTTACGTAATAGTGACAATAATGAACAGT
AAAGAAAAAAGGAAAAATGTTTATACTGGTATTTCTTGTAAATTCATTTATACCAGGAAAATTCCTCATTTTGTAA
TTGAACTTTGTATTGAGAACTATTTCTTATGCCCTTTTATAAATCTGTATAAAAAATTTACGTGTTAATTTTGG
GTTATAATTTATATACATATAAATATATATGATATCTTAAAAA

SmAST15 202 pb

CGCCATCAGGGATCTGTTGTAAAACCTGATTATCGTAAATTGGTCTCTAACAGTATATGGTGTAAAGCCCTATGACT
GGATGCAGGTAAAGTAATGCTTGTTCACGATGCTCGCTTTACCCATATCTGCTAGAGTATGACACATCTAAG
TTTGTAGTTTATTCTAAAGCAAATATAACATGTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST16 579 pb

TCATGATTCATTGAGGTATTATAGGTTATTCTATTTCCCGAAAGGTTCTCGATTTTATATAGTTTCATTCTGTTA
ATTATAGTTAGTTGGTGAGGTTGGATAAGTTACTAAGTAAGTATAATTAGAGAACTATGTAGGTAGTGATAAA
TTATTTCGTGTGATCTGATATCTGGTTAGTGACTTTATTTATCGAACCCTAGGGAATAGCTGAGTGTGTTGGTTAT
TTAGGACAGAGATTTGTAATTATTATGTGATAGGGTCTGAGATTAAGATTGCTTTAGGTTAGTAAAGTTATTT
ACATAGCTTAGAAGATTGATTAATAAAAAATCTTGTGGTTAAGAGAGGTCATTTAGTAAAATTAGATATATAAT
GATGGTGGAAATAAGTAGGTTAGATTATTGATTGTTTTCTTTTTTTCAGTATTGCCTCAACTGTTTATTAACAACA
TTGCTATTAGTTAATTGTTTAAATAGTAAGGCCCTGCTCAGTGAAGAAGTTTGTTTAAATAGCCGCGATTATTGAT
CGTGCTAAGGTAGCATAATATATAGTCTTTTAAATTGTAGACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST17 223 pb

GAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCATCTAAACCTTATACACCTAGTAAATTATAACACTCCCACTACTCACT
TCTATATACTAAGTACTATCACTACCAACATTAATAATCTCAAAACCAATACACTAAACCCATGTATCAACCC
AACACTAATCTCCTAACCAATCGATCAAGTAA
A

SmAST18 348 pb

AGTCGTTCTTCAAGAACTGAAATTTGGTAAACAGGATTTCCAGTCTAGAAGAACAATATCAAACTCATTGGAAC
TACTCAAGATATGACAAGATATGCTAGACTTTTAGCTGAAGAAGTTCAACGTGGGGCTGTAAATGCTGAATTAC
TTGAAAATTCATCAATAAATAATATCTAATTATTCTGAACTGAAAGAAATGGCTGGACATATGAATCAGTCA
AAACATTTAACATCTTTGGCTCGTCGGCGTCGTTTTGCAGAAAGAGTGCCTTTTCTTTCTAGCATTTTCATTTTT
CTTTTAAAGTTGTGGAACATATTTTTTACATAGGATACCTATGGGATATTCG

SmAST19 310 pb

CCATTATCATCTTAAAAAGAAACCCCTACTACTGTCCAACAATTAACCTTGGATAAAAATATGGTCCTTAGTGTCG
AAGCAACGTACGAAAAGTATAGAGACTCCACTGATGGTAAAGCTCCAGTCATAGATTGTTTGCAGCAAGGGTTAC
TTTAAAGTCTTAGGCAAGGGATATCTTCCAAAGGTACCAGTTATTGTCAAAGCTCGGTTCTTCTCTCGGAAAGC
AGAAGAAAAAATCAAAGCAGTTGGGGGAGCTTGTATATTATCTGCATAAATAAATTTAGCCCTGGGTAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST20 257 pb

AGGACAGGGGAGAGGTCCTATTGATCTGTTTATTACTACCTCGATGTTGGCTTGTGTAACCTTTTCGGTGTAGAG
GCTGGAAAAGGAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATCTTCATGAGTTGAGTTAAGACCGGTGTAAGCCAGGTTGGTTC
TTATCTATAAATTGGTTCTAATTAGTACGAAAGGATTTATAGAATACAGTGTTCCTGTACGCATAGGAATAGGAA
GTATACACGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST21 160 pb

TATTTTTTATAACTTCCATGATTTCAATTTTGATAATTTTTTATTTAGTGGACATATAGATTGAAAAATATTT
TGCTATTCATGATTACTTCTTTCTTTTTTTGTAATATTTAAAGAAAAAGAAATAGAAAAGCTAAAGAAGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAA

SmAST22 688 pb

TTTCTTTAGTAAATTTAGTATTATTTTTTTCGGGTGCTTCCCTGCATATTTTTTTATCATCCGTTTATTATGTAC
AGTTGTTTTGTGTGATGAGTTTACTTGTTCGCAAGTATGTAGTTTGAGATATATTTATGTTACGGATTAGTT
GTAAGATGGCGTTTTGGTTGTTTTTAGCTAGGGAGTTAATTGTTTTTCTTACTATAATTTTTTGTGTTTTTGG
TATATTAAGGGTTCTAGCGTTGCAATTTCTTATCCATTAGGTATTCCTATTCTAGAAACCTACTTGTGATAAT
GTCTTCTTTTTTTTATTTCTGCTTTTTCATAGAAATTTGGCTAGTGTAAAAGGTCGTATCTTTGTTTATTTATCAC
TTGTTTGTTCCTTATTTATTTATTTTTTTTGGCTGTGGATGAATTTTTGAATAGTGTAGTTAATTTCTTTGTGTGAT
CCATATTATGCGAGTTGTTTTATGTTGGTTGGATTACATCTCAGGCATGTTATTTTAGGTAGGTTTGGTTTATA
TGAGTTATCAGGTTTTCAGTTGTCAGATTTATTCGTTGGAAGAATAAAATGTTAATAGTGTATTGACATTTTG
TTGATTATATAGACTCTTGGTTTATTTAGTAGTATATATAGTTTCATTTATAGTTTAAATATGATTTAATTTGGT
TTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST23 437 pb

GTATTATTTTTTTGCGGTGCTTCCTTGCATATTTTTTTATCATCCGTTTATTATGACAGTTGTTTTGTGTGTATG
AGTTTACTTGTTCGCAAGTATGTAGTTTGAGATATATTTATGTTACGGATTAGTTGTAAGATGGCGTTTTGGT
TGTTTTTAGCTAGGGAGTTAATTTGTTTTTCTTACTATAATTTTTTTGTTGTTTTTGGTATATTAAGGGTTCTAGC
GTTGCAATTTCTTATCCATTAGGTATTCCTATTTCTAGAAAACCTACTTGTGATAATGTCTTCTTTTTTTATTTTC
TGCTTTTCATAGAAAATTTGGCTAGTGTAAAAGGTCGTATCTTTGTTTATTTATCAGTTGTTTGTTCCTTATTAT
TTATTTTTTTTTGCTGTGGATGAATTTTTGAATAGTGTAGTTAATTTCTTTGTGTGATCCATATTATGC

SmAST24 692 pb

CTTTTCTTTAGTAAATTTAGTATTATTTTTTTGCGGTGCTTCCTTGCATATTTTTTTATCATCCGTTTATTATGA
CAGTTGTTTTGTGTGTATGAGTTTACTTGTTCGCAAGTATGTAGTTTGAGATATATTTATGTTACGGATTAGT
TGTAAGATGGCGTTTTGGTTGTTTTTAGCTAGGGAGTTAATTTGTTTTTCTTACTATAATTTTTTTGTTGTTTTTG
GTATATTAAGGGTTCTAGCGTTGCAATTTCTTATCCATTAGGTATTCCTATTTCTAGAAAACCTACTTGTGATAA
TGCTTCTTTTTTTATTTCTGCTTTTCATAGAAAATTTGGCTAGTGTAAAAGGTCGTATCTTTGTTTATTTATCAC
TTGTTTGTTCCTTATTATTTATTTTTTTTTGCTGTGGATGAATTTTTGAATAGTGTAGTTAATTTCTTTGTGTGAT
CCATATTATGCGAGTTGTTTTATGTTGGTTGGATTACATCTCAGGCATGTTATTTTAGGTAGGTTTGGTTTTATA
TGAGTTATCAGGTTTTCAGTTGTCTAGATTTATTCGTTGGAAGAATAAAAATGTTAATAGTGTATTGACATTTTG
TTGATTATATATGACTCTTGGTTTATTTAGTAGTATATATAGTTTCATTTATAGTTTAAATATGATTTAATTTGGT
TTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST25 362 pb

GCAAGCTGAAGTAGTGAAAAATTTGTGCTGAAGCTTTGGAAACATATAACATTGAGAAGGATATTGCTGCTTTTA
TTAAAAAGAATGCGACAAGAGATACAATCCAACCTGGCATTGTATAGTTGGCAGAAATTTGGCAGTTACGTG
ACCCATGAAACCAAACATTTTATCTACTTGTACCTTGGACAGGTCGCAATTTCTGCTTTTAAATCTGGATGATT
GATTTGTATAACCTATACATAAAAATCCCAAACCTTATCGTTTTTTTTTACTGCCTTTGTTGTATCGACCAGTTGTC
TAACGTCTAAATAAGCCAACATAAAAATCAATTTGAAATATTTAAACTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST26 311 pb 5'

CTGTCTTTGTTTTTGAATAGTGGTTTCGGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTGGTGGGGGTTAAAGTATAGGATTAAGT
TAATTTAATGGTAAGTAAAAATGATTTCCGAAAAAAGACCTAAATTTGTGTTATATATATAATATATACAATTAT
AATATAGAAGGAGAAAAAGATGTAAAAATAGGATTTAGGGAGGAGGAAAACCTATAGGTTTGTATAATAAATTTT
TCTTGTAAGGGGGTACCCTTACAGAAATTTCAAATTTTCCTTTTATTGCTCTAAAATTAGGTATCAATTGAGGTA
ATTTTACTTGAGAAA

SmAST26 454 pb 3' complementar

TAGTCAATTGGGGTAGAAAAGGTAATAGGATTTATAGGGTTACCTTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATA
CTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCT
TTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATC
GTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTCCC
TTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAG
TGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTACGGTAGGTGGGTAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA

SmAST27 716 pb

TGTATGTTCTGTCTTTGTTTTTGAATAGTGGTTTCGGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTGGTGGGGGTTAAAGTATA
GGATTAAGTTAATTTAATGGTAAGTAAAAATGATTTCCGAAAAAAGACCTAAATTTGTGTTATATATATAATATA
TACAATTATAATATAGAAGGAGAAAAGATGTAAAAATAGGATTTAGGGAGGAGGAAAATTTATAGGTTTTGATA
ATAAATTTTTCTTGTAAGGGGGTACCCTTACAGAAATTTCAAATTTTCCTTTTATTGCTCTAAAATTAGGTATCA
ATTGAGGTAATTTTACTTGAGAAAATTTTTGATAATTAGGTGTTCAACTGTGGTTGATTTTTTGGATGATAGAT
TTATTAATAATATAAAGGTATAGTCAATTTGTGGTAGAAAAGGTAATAGGATTTATAGGGTTACCTTCCCTTGG
TTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTT
ATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACT
CCTTTAGTCTTTTATGATTTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTT
TAGTATTATCGTCTATAGTACGGTAGGTGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST28 103 pb

GACGAAATAGCCATCTAGAGTTTTCGGAATATGTTGTAAAGATTTTCTAAGAAACCGATTTATATACAGTTCCG
TATGACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST29 233 pb

TTCTTGACGATGAGAGTTTTGGTCGTGCCCTTGTTGCTCTTTTGTATTCTTTAGTTGATGCTATTGAATTGCC
ATAACACCGAAAACTTGTTTAGATGTTTGCCTCACTAAATTTGATGGGGCTGAAGAAGATGCGTGTCCAGAGG
CTGTGTCTGTCAAACCTTGAATTCATTACCAGCGACATTTACTTTGTGAGGAATCTTGTGATGATGTATACAAGC
CGGATACAAAAG

SmAST29 416 pb 3' complementar

CAAATTATTTGAGAATATTTTCGTTTTTTTTCAATAATTGTGATAAACACATTATTTCTGTTGTCATCATCATAAC
ACTCACTTGCTCATGAATACATTTGGAGTAAACACTCAAATTTCTCACGTTTTTGTCAATTATCCCCTTATTTTGGACC
GATTTTCTGTGTTGTTGCTTTTGGTCTATGCTATTGTGTTTTGTCACCTCCTCAAACACTAAGGTAAATAATGAACT
GGAACACGTTTTTTTGTGGCCCTATTTTATGGACCGAATGATTTCTTTCTTGTCTTGTGCTCTCATATTAATA
ACTGTTCATCCCCCTGGATCTTTTTTTTTCTGATCGCGTTATTTTTCATAAACTGTTCCCTTGTATTATTGTTTTCA
ATAAAATATTTCTTAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST30 361 pb

TTTCGTCCGGGGAACGTGTACATTAAAGAGATGGTCCGCTAAATATTTCACTATAATTAGATTTGTTAGTGTAT
ATCCGTTTGTATATTTACATTTAGAGATAATAAGTGAGTAAATATTCGGTAATTTAAGACAGGTCTATATGCTG
CTAATATTATAGGTTGTTATGCGTTACATTTATAAAAAATAGTAGATGAAATTTACTCAGATTTAGGACTCGGAA
GTAGGGGTTAATAGTATGTTATCTCGAAGGTTGAAATAGTTTACGTACACATCGCCCGACAATCTCGACAATA
AGTTGAGTTAAGTCGTAACATGGTAGTGCTTGAAGAATCAGGCGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST31 677 pb

TCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGCTTGATCAAGATGTTATTTTTTTAGGTGCGTGTGTGTATGTATGCG
CGCGCGTGTGTGTATCTATGGATATAATTCACATTTGTTTGTGTTGTTGGGTTTTTTTTTAAAAAATTTTTTTT
TGTTTTCTACTAATATTGATTACATAAATTTCTACTGTTATTTAATTAATCATTATTTATTTGTGAATACATGC
TCGTTTTGATGATCATTATTTATTTAGTCGTTATGGCTAAGTTCTTTCTCATTGAAC TAGATTAGATTCGGG
CTTTTTTTTATACATAAATTTCACTTGACAACAGCAACAACAACAAAAAGAAAAAAGAAAAACAGAGAAA
AAAATCTATACAAAAACATGAATAATTTCTCTTTTTCTATTTTTCGGTTAATCGTTTATATGTTTCTTCTTTTTT
TTTTTTTTTTCATAGTGTCTGTTTTCCCTCTTGCCATAGATCATTGTTTTCTATGTTTTGTTGTTTTGTTTT
TTTTGTATGTTTTAACTTTATATTAATATTTGTTTTATGAAATATTAATTAGATCATAGTAACAAGCAGGTAAAC
CAAATGTTTATTTTTTTGTTCTTTTTTTTTTGTTTTTTTTACAAATAAATGAGTTTAGTTTTGTTATCTAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA

SmAST32 405 pb

GGAGGAGGAAAAATTTATAGGTTTTGATAATAAATTTTTCTTGTAAGGGGTACCCTTACAGAATTTTCAAATTT
TCCTTTTATTGTCTAAAAATAGGTATCAATTGAGGTAATTTTACTTGAGAAATTTTTTGATAATTAGGTGTTCA
ACTGTGGTTGATTTTTTTGGATGATAGATTTATTAATAAATATTAAGGTATAGTCAATTGTGGTAGAAAGGTAA
TAGGATTTATAGGGTTACCTTCCCTTGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATC
GTCTATAGTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTA
CGGTAGGTGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST33 224 pb

GTTACCTTCCCTTGGTTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCT
TGGTTTCTTAGTGTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTTCTTAGT
GTTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTACGGTAGGTGGGTAAAAAAAAAAAAAAAA
AA

SmAST34 858 pb

GAGTTTTCTGGGTTGTTGTGGAGCCATAAAGGAAAACGCTCTGCATGCTGTATATGTATGCGTTCTTCCCTCGTCCG
TACTTCTGATGTGAGTTGGCCGCTGCCATAGTTGCAGTTGTTTTACAAAGATAGGATCGATTGAGAAATTTGAT
GCATTAATGACTGGTGTCTGGATAAACCGACAAAAGAGATAACTGAATTCATGAATTTGATTCAATCATCATT
CCATTGCTGTGGAGCCAAAGGCCCTGATGATTATCGTGGTAACGTGCCAGCCTCGTGCAAAGAAGAGAATTTGA
CCTATACCGAAGGCTGTGTATCTGTCTTTGGAGCATTCTTAAAAACGCAACCTGGTGATTGTTGCCCTGTGTTGCA
TTTTGGTGTATGCTTTTTTCCAGTTGTTAAGCATTGTTCATAGCCTGCTGTTTGGGTCGCCAAATAAAGGAGTATG
AGAATGTGTAACACTGCAAAGAAAACAGTATGATGTTTATCAATCCCGTTCTGTTTTCCCTCTGGCTTTTATGA
AATGTTGCTTTTTTATGCTAGATAAATGTGCTTGGCTAATAATCGTGTACTCGACTTCGTTTACGATATAA
TTATTATACTTAAATATGATACTGTCTATTCTCATTTTCACTTATCATTTCTTATAACCAATGAGCTGCATTGA
TTCCCTGGTATTTACCTACAACTGATGACAAATCATCTTCATTTTTATGGTGTGTCTTATAACATTTCTCGTT

TATATAATTTTAAGTCTTTGGTATACCTTTTGTTTTACAGACCGCTTATTTTGCCGCCACAGCATTAGACATTT
CTTGTATAAATTAATTCCTTAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST35 162 pb

CGTCTGTTAGCTTGTATATCCTCTAGACCTGGTCAAATCGGTCGAGCAAATGGTTATATTCGAAGGCAAAGA
GTTGGAGTTTTTATTCAAAGAACTAAAAGTTAAAAAAGCAAATAAATTTCTTTGAAAATAAATTTTCTAGGA
AAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST36 476 pb

CTGGCAACAGCGGCACCCGCGAAGTGGTCTCGGGATGGCGCACCGTGGTGCCTGAAACGTGCTGGTGAACGTG
CTGGGTAAAAAACCAGCAAGACTTGTTCGACGAGTTCGCCGGTAAACATAAAGAACACCTCGGCACGGGTGACGT
GAAATACCACATGGGCTTCTCGTCTGACTTCCAGACCGATGGCGGCCCTGGTGCACCTGGCGCTGGCGTTTAAAC
CGTCTCACCTTGAGATTGTAAGCCCGGTAGTTATCGGTTCTGTTTCGTGCCCGCTGACAGACTTGATGAGCCG
AGCAGCAACAAAAGTGTGCCAATCACCATCCACGGTGACGCCGAGTGACCGGGCAGGGCGTGGTTCAGGAAAC
CCTGAACATGTGAAAAGCGGTGGTTATGAAGTTGGCGGTACGGTACGTATCGTTATCAACAACCAGGTTGGTT
TCACCACCTCTAATCCGCTGGATGCCCGTTCT

SmAST37 418 pb 5'

TAAAGTGATAGTCTATTATCTGAATTTAGTTTAGTGGTTAGGAACCCATTGTTACATTATTAGACGGAAAGAC
CCCAAGAGCTTTTTTTGTGTTAGATTTGTTTGGGGTAAATGTAGATTATTCATTTATTTTATAGATCCTTTATGG
ATAAAGGATAAAAGTTACCTTGGGGATAACTGAGTAAAGGACAGGGAGAGGTCCATTGATCTGTTTATTACTAC
CTCGATGTTGGCTTGTGAACTTTTCGGTGTAGAGGCTGAAAAGGAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATCTTCAT
GAGTTGAGTTAAGACCGGTGTAAGCCAGGTTGGTTCCTTATCTATAATTGGTTCTAATTAGTACGAAAGGATTAT
TAGAATACAGTGTTCGTACG
CATAGGAATAGGAAGTATACACGGGT

SmAST37 435 pb 3' complementar

TAAAGTGATAGTCTATTATCTGAATTTAGTTTAGTGGTTAGGAACCCATTGTTACATTATTAGACGGAAAGAC
CCCAAGAGCTTTTTTTGTGTTAGATTTGTTTGGGGTAAATGTAGATTATTCATTTATTTTATAGATCCTTTATGG
ATAAAGGATAAAAGTTACCTTGGGGATAACTGAGTAAAGGACAGGGAGAGGTCCATTGATCTGTTTATTACTAC
CTCGATGTTGGCTTGTGAACTTTTCGGTGTAGAGGCTGAAAAGGAAGTCTGTTTCGACTTTTAAATCTTCAT
GAGTTGAGTTAAGACCGGTGTAAGCCAGGTTGGTTCCTTATCTATAATTGGTTCTAATTAGTACGAAAGGATTAT
TAGAATACAGTGTTCGTACGCATAGGAATAGGAAGTATACACGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST38 621 pb

TGACATTATAAGCGTCATGAAATCCTTTTAAAGTTGGCTATTGCATTTTTTCGTTTGTCTTTTCTTCTATGAATTT
TTATATTATCATTCCCTTATTTCATTTTGTAAATTTTACGTGCTTCATTTTCGTTGTTACATTTACCAGTATGTCGT
TGTAATTTTATTTAGATTTTAAATTTATTTGCTTTGTGGTTTCAATCTTTTCAATTTATCCACTCTCTAAACTTGATG
TCGGATCATTGTAGAATTTGTGTAGATCACTATTCGAATGAAAACCTTACCTACCCCTTACTTCTATCATGGTTA
TTATTATGTTTGTGAATAATATCAATGTTATGTTATCAGTTTACCTAATTTCTAACTTGGCAAATTAATAACA
AACCTGCTTAAAGTACCACAAAAATTTAATTAGTTATTGCACCCTCGATCTAAATTCCTTTGATTATTTCTTCTC
TCTCTCTTTTATCTGTGTGTGTATCAGTTTTTCGTTTACTTCTCTCATAATTTTATTTCAAATAACTGAGTTG
CTACTTGATGTTTATTATTTAATTGCCCTGTTATGAAAGTCAGTATAATGAACAAATGAAATAAATACCCAAT
AATTTTTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST39 479 pb

TATAGGGTTACCTTCCCTTGGTTTCTTAGTGTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATA
GTCCCTTGGTTTCTTAGTGTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTT
CTTAGTGTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTATATA
GCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTATAGCCATACTCCT
TTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAG
TATTATCGTCTATAGTCCCTTGGTTTCTTAGTGTATAGCCATACTCCTTTAGTCTTTTAGTATTATCGTCTA
TAGTACGGTAGGTGGGTCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SmAST40 284 pb

AGGAAGAGTTTTGTTGAAGAAACGCAGCAAGTCCGCCCTTGAAAAGTATGAAACTCGTCAGGCTTTGTTTTAAG
CAAACGTAGAAGAGCTTTTAAAAGAAGCATTTGTTACAGGTCGTCTGTTAGCTTGTATATCCTCTAGACCTGGT
CAAATCGGTCGAGCAGATGGTTATATTCGAAGGCAAAGAGTTGGAGTTTTTATTCAAAGAACTAAAAGTTAA
AAAAGCAAAATAAATTTCTTTGAAAATAAATTTTCTAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10. Apêndice 2