

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* como potencial
antígeno imunoprotetor e identificação de novos alvos para teste de
diagnóstico e vacina contra esquistossomose**

por

Paola Rezende Patrocínio

Belo Horizonte

Agosto/2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* como potencial
antígeno imunoprotetor e identificação de novos alvos para teste de
diagnóstico e vacina contra esquistossomose**

por

Paola Rezende Patrocínio

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
título de Mestre em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Rosiane A. da Silva Pereira

Coorientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca

Belo Horizonte

Agosto/2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P314a Patrocínio, Paola Rezende.
2014

Avaliação da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* como potencial antígeno imunoprotetor e identificação de novos alvos para teste de diagnóstico e vacina contra esquistossomose / Paola Rezende Patrocínio. – Belo Horizonte, 2014.

XXI, 104 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 112-125

Dissertação (mestrado) – Tese para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose/prevenção & controle 2. *Schistosoma mansoni*/enzimologia 3. Western Blotting/métodos I. Título. II. Pereira, Rosiane Aparecida da Silva (Orientação). III. Fonseca, Cristina Toscano (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* como potencial
antígeno imunoprotetor e identificação de novos alvos para teste de
diagnóstico e vacina contra esquistossomose**

por

Paola Rezende Patrocínio

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (Presidente)

Prof. Dra. Cristina Toscano Fonseca

Prof. Dra. Caroline Junqueira Giusta

Prof. Dra. Sophie Yvette Leclercq

Suplente: Dra. Ester Roffê Santiago

Dissertação defendida e aprovada em: 04/08/2014

*“Terminar o momento,
Encontrar o final da jornada em cada passo do caminho,
Viver o maior número de boas horas,
É sabedoria.”*

- Ralph Waldo Emerson

Dedicatórias

Dedico à minha família!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus e à Mãezinha do céu que sempre intercederam no meu caminho e me ajudaram a finalizar mais esta etapa em minha vida. E em seguida, agradeço a minha família porque ela sempre foi e sempre será minha prioridade em qualquer situação. Obrigada pelo apoio que sempre tive.

À minha orientadora Dra. Rosiane A. da Silva Pereira que sempre acreditou em mim e me deu oportunidades no meu caminho profissional.

À minha coorientadora Dra. Cristina Toscano Fonseca que aceitou entrar neste projeto do mestrado e que me deu todo apoio e orientação.

À Dra. Ângela Volpini e ao Dr. Guilherme Corrêa Oliveira que abriram as portas do laboratório para mim desde o começo e sempre estiveram disponíveis quando precisei.

Ao professor Marcelo Caliaro da UFMG que possibilitou a análise dos granulomas em seu laboratório e sempre esteve disponível para esclarecer as minhas dúvidas.

Às minhas amigas Maíra, Fernanda Sales e Karina que sempre me ajudaram em algum experimento com um sorriso no rosto. Elas me proporcionaram muitos momentos divertidos e conversas agradáveis.

Às minhas grandes amigas Núbia e Sandra que estiveram comigo durante todo este tempo me ajudando em experimentos e esclarecendo dúvidas, além da amizade que conseguimos construir que vai além do local de trabalho.

Às meninas do LESQ, Clarice e Flávia que sempre me receberam de portas abertas no laboratório e estiveram disponíveis para me ajudar inúmeras vezes. À Dra. Neusa Araújo que realizou conosco todas as perfusões sempre com muita perfeição.

À minha amiga Tati que aceitou estar comigo durante os experimentos de imunizações e que sempre esteve disponível para esclarecer minhas dúvidas. Pelas nossas conversas e desabafos, o meu muito obrigada!

Ao Guilherme que sempre esteve presente no dia-a-dia me dando apoio, além de sempre ter me ajudado quando eu precisei. Obrigada pelo amor e companheirismo em todas as horas.

À Joyce, Rosana e Kênia pela organização do laboratório.

À Mariana e Elisângela que demonstraram estar sempre disponíveis nos experimentos de sequenciamento, além das diversas conversas e momentos de risos que tivemos.

À querida Juvana que sempre esteve perto de mim, me proporcionando momentos de reflexão, além de trocas de experiências.

À Fernanda Ludolf e Marina pelas idéias e sugestões em nossas reuniões.

À Luciana, Caroline e Lara que me ajudaram efetivamente nos experimentos sempre com muita boa vontade.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou que proporcionou a execução deste projeto.

À Pós-graduação do Centro de Pesquisa René Rachou pelo apoio durante este tempo.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todas as outras pessoas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular que com certeza de alguma forma contribuíram para meu projeto ou para a minha formação profissional e pessoal.

Às Plataformas PDTIS de proteoma e sequenciamento pelo apoio técnico.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o nosso convite

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVI
RESUMO.....	XX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Esquistossomose	22
1.1.1 Aspectos gerais	22
1.1.2 Ciclo de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i>	23
1.1.3 Patologia da esquistossomose mansônica	25
1.1.4 Controle e tratamento da esquistossomose.....	25
1.1.5 Resistência à infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	26
1.1.6 Imunobiologia da esquistossomose	27
1.1.7 Vacinas	29
1.1.8 Vacina contra esquistossomose	31
1.1.9 Proteoma dos Schistosomas	36
1.1.10 Fosfoglicerato mutase	37
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos Específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Análises <i>in silico</i> da fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansoni</i>	45
4.2 Material biológico: camundongos e parasitos	45
4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA	46
4.4 Amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase	46
4.5 Purificação e ligação dos fragmentos de DNA ao vetor de expressão	48
4.6 Transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i>	49
4.7 Sequenciamento de DNA dos clones positivos	49
4.8 Expressão e análise de proteínas recombinantes em células HEK 293T.....	50

4.8.1	Transfecção transiente de células HEK 293T por lipossomos	50
4.8.2	Extração de proteínas a partir da lise das células HEK 293T transfectadas	51
4.9	Análise da expressão de SmPGM pelas células HEK 293T por <i>Western blotting</i>	52
4.10	Imunização de camundongos com vacina de DNA	52
4.11	Recuperação de vermes adultos	54
4.12	Contagem do número de ovos retidos no intestino e no fígado	54
4.13	Avaliação da fecundidade de fêmeas	54
4.14	Exame Parasitológico HPJ (Hoffman, Pons e Janner)	54
4.15	Avaliação da imunidade humoral induzida pelas formulações vacinais	55
4.16	Avaliação da imunidade celular induzida pelas formulações vacinais	55
4.17	Área e número de granulomas hepáticos.....	57
4.18	Protocolo de imunização com peptídeos sintéticos da proteína SmPGM.....	57
4.19	Análises estatísticas.....	58
4.20	Extração de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos de <i>Schistosoma mansonii</i>	58
4.21	Eletroforese bidimensional (2DE).....	59
4.22	<i>Western blotting</i> bidimensional (2D-WB)	60
4.23	Identificação das proteínas por espectrometria de massas	61
5	RESULTADOS	63
5.1	Análises de sequência e análise funcional da proteína fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansonii</i> por bioinformática.....	63
5.2	Análise <i>in silico</i> do potencial antigênico da fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansonii</i>	65
5.3	Predição da estrutura terciária da fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansonii</i> ...	70
5.4	Amplificação da região codificadora da fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansonii</i>	71
5.5	Expressão transiente da fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansonii</i> em células HEK 293T	74
5.6	Avaliação da imunidade protetora induzida por <i>SmPGM</i> na forma de vacina de DNA	77
5.6.1	Recuperação de vermes adultos de <i>Schistosoma mansonii</i>	77
5.6.2	Contagem do número de ovos de <i>Schistosoma mansonii</i> retidos no fígado e intestino de camundongos imunizados e desafiados	78
5.6.3	Avaliação da fecundidade de fêmeas de vermes adultos de <i>Schistosoma mansonii</i> após imunização	79
5.6.4	Contagem do número de ovos de <i>Schistosoma mansonii</i> liberados nas fezes de camundongos imunizados e desafiados.....	80
5.6.5	Análise dos níveis de IgG total em camundongos imunizados com <i>SmPGM</i> na forma de vacina de DNA	81
5.6.6	Análise da ativação celular	82

5.6.7	Análise de células T de memória central, memória efetora e célula efetora	83
5.6.8	Análise do perfil de células produtoras de citocinas induzido pela imunização de camundongos com <i>SmPGM</i> na forma de vacina de DNA.....	84
5.6.9	Análise do perfil de citocinas presente no sobrenadante das células produtoras induzido pela imunização de camundongos com <i>SmPGM</i> na forma de vacina de DNA.	87
5.6.10	Área e número de granulomas presentes no fígado de camundongos imunizados com <i>SmPGM</i> na forma de vacina de DNA e desafiados	92
5.7	Avaliação da imunidade protetora induzida por peptídeos sintéticos de SmPGM....	94
5.7.1	Recuperação de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	94
5.7.2	Verificação dos estádios de desenvolvimento dos ovos presentes no intestino de camundongos imunizados com peptídeos sintéticos de SmPGM e desafiados.....	94
5.7.3	Análise dos níveis de IgG total após imunização de camundongos com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242	95
5.8	Comparação do perfil de proteínas de <i>Schistosoma mansoni</i> imunorreativas ao pool de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica.....	96
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES.....	111
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 2: 2D-PAGE de extrato proteico total e de tegumento de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> e respectivos 2D-WB utilizando soro INF, NE e NI.	39
Figura 3: Identificação de SmPGM de <i>Schistosoma mansoni</i> por espectrometria de massas..	40
Figura 4: Esquema da via glicolítica ou glicólise.....	41
Figura 5: Mapa do vetor pcDNA 3.1/V5-His A, B e C.....	48
Figura 6: Mapa da placa do experimento de transfecção em células HEK293T.....	51
Figura 7: Protocolo de imunização com vacina de DNA.	53
Figura 8: Protocolo de imunização com peptídeos sintéticos de SmPGM.....	58
Figura 9: Nível de expressão do transcrito de <i>SmPGM</i>	63
Figura 10: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de SmPGM de <i>Schistosoma mansoni</i>	64
Figura 11: Domínios proteicos da SmPGM.	65
Figura 12: Predição da estrutura secundária de SmPGM de <i>Schistosoma mansoni</i>	68
Figura 13: Análise da similaridade de sequência de aminoácidos da fosfoglicerato mutase de <i>Schistosoma mansoni</i> e humana.	70
Figura 14: Estrutura terciária da SmPGM de <i>Schistosoma mansoni</i>	71
Figura 15: Amplificação da região codificadora do gene <i>SmPGM</i> de <i>Schistosoma mansoni</i> ..	72
Figura 16: Produtos de digestão por enzimas de restrição do DNA plasmidiano de clones contendo a região codificadora de <i>SmPGM</i> inserida no plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B.	73
Figura 17: Representação do sequenciamento parcial dos clones recombinantes de pcDNA 3.1/V5-His B contendo a sequência codificadora de <i>SmPGM</i> sem o códon de parada de tradução.	74
Figura 18: Análise da transfecção de células HEK 293T com o plasmídeo pcDNA 3-RFP por microscopia de fluorescência.	75
Figura 19: Eletroforese unidimensional de extrato proteico total de células HEK 293T transfectadas.	76
Figura 20: <i>Western blotting</i> do extrato de células HEK 293T transfectadas utilizando anticorpo anti-6xHis.	77

Figura 21: Número de ovos retidos no fígado de camundongos imunizados com pcDNA- <i>SmPGM</i> e desafiados com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	79
Figura 22: Número de ovos retidos no intestino de camundongos imunizados com pcDNA- <i>SmPGM</i> e desafiados com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	79
Figura 23: Fecundidade das fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> após imunização com o plasmídeo pcDNA- <i>SmPGM</i>	80
Figura 24: Número de ovos liberados nas fezes de camundongos imunizados com pcDNA- <i>SmPGM</i> e desafiados com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	81
Figura 25: Perfil de produção de IgG total contra peptídeos da <i>SmPGM</i> após imunização com o gene <i>SmPGM</i>	82
Figura 26: Percentual de células T ativadas em camundongos imunizados com o gene <i>SmPGM</i>	83
Figura 27: Análise da porcentagem de células CD4+ e CD8+ de memória central, memória efetora e célula efetora.....	84
Figura 28: Perfil de células produtoras de IFN- γ	85
Figura 29: Perfil de células produtoras de IL-4.....	86
Figura 30: Perfil de células produtoras de IL-10.....	87
Figura 31: Níveis de IFN- γ no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i>	88
Figura 32: Níveis de TNF- α no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i>	89
Figura 33: Níveis de IL-2 no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i>	90
Figura 34: Níveis de IL-4 no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i>	91
Figura 35: Níveis de IL-5 no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i>	92
Figura 36: Área de granulomas presentes no fígado de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i> e desafiados.	93
Figura 37: Número de granulomas presentes no fígado de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA- <i>SmPGM</i> e desafiados.....	93
Figura 38: Perfil de produção de IgG total anti-peptídeos de <i>SmPGM</i> induzido por imunização com peptídeos sintéticos.	96

Figura 39: Perfil eletroforético bidimensional de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	97
Figura 40: <i>Western blotting</i> bidimensional de proteínas insolúveis de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> utilizando anticorpo anti-Sm29.	98
Figura 41: <i>Western blotting</i> bidimensional de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Candidatos à vacina selecionados pela OMS, 1998	33
Tabela 2: Predição de epitopos de células B da proteína SmPGM de <i>Schistosoma mansoni</i> ..	66
Tabela 3: Predição de epitopos para MHC II da proteína SmPGM de <i>Schistosoma mansoni</i> .	66
Tabela 4: Número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com pcDNA- <i>SmPGM</i> e desafiados com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	78
Tabela 5: Número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com peptídeos sintéticos de SmPGM e desafiados com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> .	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- µg – Micrograma
µL – Microlitro
µM – Micromolar
2-DE – Eletroforese bidimensional
2D-WB – *Western-blotting* bidimensional
ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AIDS – Síndrome da deficiência imunológica adquirida
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCs - Células apresentadoras de antígenos
AW-TEG - Extrato proteico de tegumento de verme adulto de *S. mansoni*
AW-TOT - Extrato proteico total de verme adulto de *S. mansoni*
BCG – Bacilo de Calmette e Guérin
BLAST - *Basic local alignment search tool*
BSA – Albumina bovina
CaCl₂– Cloreto de cálcio
CAPES - Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
cDNA - DNA complementar
CFA - Adjuvante completo de *Freund*
CHAPS - 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amónio]-propano-sulfonato
CMV – Citomegalovírus
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂ - Dióxido de carbono
Con-a – Concanavalina A
CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou
DEPC – Diethylpyrocarbonate
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DNase - Desoxirribonuclease
dNTP - Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DTT – Dithiothitol
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra- acético
ELISA - Ensaio de absorção imunoenzimático
FAPEMG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FOW – Forward (senso)
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
g – Força centrífuga
GPI – glicosilfosfatidilinositol
GST - Glutathione S-transferase
HE - Hematoxilina-eosina
HIS - Histidina
HPJ - Hoffman - Pons e Janer
HRP - *Horseradish peroxidase*
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IEF - Focalização isoeletrica
IFA - Adjuvante incompleto de *Freund*
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
INF - Indivíduos infectados de área endêmica para esquistossomose
IFN- γ – Interferon gama
Ipec - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
IPG – Gradiente de pH imobilizado
IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb - Kilobase, 10^3 bases
kDa – Kilodalton
KO - camundongos nocauteados
KOH: Hidróxido de Potássio
LB - Meio Luria Bertani
LE - Cepa de *S. mansoni* Luiz Evangelista
M – Molar
Maldi-ToF-ToF - *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*
Mb – Megabase
MFI - Intensidade média de fluorescência
MgCl₂ . Cloreto de magnésio
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
mL – Mililitro
mM – Milimolar
mRNA – RNA mensageiro

MS – Espectrometria de massas
MS/MS - Espectro de massas de fragmentação dos peptídeos
NaCl – Cloreto de sódio
NAGE - Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica
NCBI - *National Center of Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
NE - Indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose
ng - Nanogramas
NI - Indivíduos não infectados de área não endêmica para esquistossomose
nM – Nanomolar
NO – Óxido nítrico
°C - Grau centígrado
OD- Densidade óptica
oligo-d(T) – Oligonucleotídeo de deoxitimina
OMS – Organização Mundial de Saúde
pb – Pares de bases
PBS – Tampão de fosfato falina
PBST₂₀ – Tampão e Fosfato Saline e Tween 20
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH – Potencial de hidrogênio
PSI - *The Protein Model Portal*
PVDF - Polifluoruro de vinilideno
PZQ – Praziquantel
q.s.p - Quantidade suficiente para
r.p.m - Rotação por minuto
RA – Cercária atenuada por radiação gama ou Radiação gama
REV – Reverse (anti-senso)
RFP - Proteína vermelha fluorescente
RNA - Ácido ribonucleico
RNase – Ribonuclease
RPMI - Meio de cultura RPMI
rSm200 - Proteína recombinante Sm200 de *S. mansoni*
RT-PCR - PCR de um Produto de transcrição reversa
SDS - Sulfato dodecil sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SEA- Extrato solúvel do ovo do *S. mansoni*
seg – Segundos;
SFB - Soro fetal bovino
SmPGM - Fosfoglicerato mutase de *S. mansoni*
Smteg - Tegumento do esquistossômulo
SMYB1 - *Y-box-binding protein*
TA - Temperatura ambiente
TBE – Tampão Tris-borato EDTA, pH 8,0
TBS: Tampão tris salinico
TBST: Tampão tris salinico e tween 20
TEMED - N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina
Th1 - Células T auxiliares do tipo 1
Th2 - Células T auxiliares do tipo 2
TMB - Tetramethylbenzidine
TNF – Fator de necrose tumoral
Tris – Trishidroximetilaminometano
TSP - Tetraspanina
U – Unidade
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
V – Volt
WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Apesar das tentativas de controle e introdução do tratamento com praziquantel, a doença persiste. Desse modo, o desenvolvimento de uma vacina poderá contribuir para o controle da doença. Dentre outras evidências, o alto nível de proteção alcançado pela vacinação com cercárias irradiadas em camundongos e a presença de indivíduos naturalmente resistentes à infecção por *Schistosoma mansoni* em áreas endêmicas sugerem a existência de mecanismos que induzem proteção contra esquistossomose. Por meio de experimentos de *Western-blotting* bidimensional utilizando soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose e extrato proteico de vermes adultos, selecionamos a proteína fosfoglicerato mutase de *S. mansoni* (SmPGM) para ser testada em ensaios de imunização em camundongos, uma vez que *spots* correspondentes a esta proteína foram reconhecidos pelo soro de indivíduos naturalmente resistentes à infecção e também porque análises *in silico* do seu potencial antigênico indicaram que SmPGM é uma das proteínas de *S. mansoni* que mais possuem peptídeos antigênicos. A região codificadora do gene foi inserida em vetor de expressão em células de mamíferos e após certificar a expressão da proteína por *Western-blotting* usando anticorpo anti-His (C-term) e extrato proteico de células HEK 293T transfectadas, outra construção de DNA similar, que não expressa a proteína em fusão com 6xHis, foi usada nos ensaios de imunização gênica em camundongos. Entretanto, não houve redução no número de vermes adultos recuperados de camundongos vacinados e desafiados, bem como no número de ovos liberados nas fezes e retidos no fígado e intestino. Além disso, não houve alteração na ovoposição das fêmeas, nem no número e tamanho dos granulomas. A imunização gênica não foi capaz de induzir resposta humoral, resposta imune celular e produção de citocinas. Sendo assim, foram realizados experimentos de imunização de camundongos com dois peptídeos sintéticos de SmPGM, que também não resultou em proteção pelos parâmetros analisados. Este projeto também teve como objetivo identificar proteínas de membrana, principalmente do tegumento do parasito. Para isso, um extrato proteico de vermes adultos de *S. mansoni* enriquecido com proteínas de membrana foi obtido e também utilizado em experimentos de *Western-blotting* bidimensional. Foram detectados *spots* proteicos que reagiram diferencialmente aos *pools* de soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose. Entretanto, todos os *spots* imunorreativos foram submetidos à identificação por espectrometria de massas.

ABSTRACT

The schistosomiasis is a parasitic disease caused by parasites of genus *Schistosoma*. Even with the attempts to control the disease and the introduction of the treatment with the praziquantel drug, the disease persists. Thereby, the development of one long lasting protection, based in vaccine therapy, would be a great benefit for the disease control. Among others evidences, the high protection level achieved by vaccination with irradiated cercarie in mice and the presence of naturally resistant individuals to infection by *S. mansoni* in endemic areas suggest the existence of mechanisms that induce protection against schistosomiasis. By the two-dimensional Western-blotting experiments using *pool* of serum of individuals from schistosomiasis endemic area and adult worm protein extract, we selected the protein *S. mansoni* phosphoglycerate mutase (SmPGM) to be tested in immunization assays in mice, since your corresponding spots were recognize by the *pool* of serum of naturally resistant individuals to infection and also because *in silico* analysis of its antigenic potential indicated that SmPGM is one of the *S. mansoni* proteins that have more antigenic peptides. The codion region of the corresponding gene was inserted into a plasmid vector for gene expression in mammalian cells and after ensuring the protein expression by *Western blotting* using anti-His (C-term) antibody and protein extract of transfected HEK 293T cells, another similar DNA construction, without the 6xHis-tag, was used to DNA immunization assays in mice. However, there was no reduction in the number of adult worms recovered from vaccinated and challenged mice, as well as in the number of eggs released in feces and retained in the liver and intestine. Furthermore, there was neither change in the female oviposition, nor in the number and area of the granulomas. The DNA immunization was not able to induce humoral, cellular immune response and cytokine production. Thus, in mice immunizations were also performed with two SmPGM synthetic peptides. This immunization protocol also resulted in lack of protective immunity against *S. mansoni* infection according to the analyzed parameters. This project also aimed to identify membrane proteins, mainly of the *S. mansoni* parasite tegument. For this, a protein extract of *S. mansoni* adult worms enriched with membrane proteins was obtained and also used in two-dimensional *Western-blotting* experiments. Protein spots that reacted differentially to the serum pools of individuals from endemic area for schistosomiasis were detected. However, all immunoreactive spots were subjected to mass spectrometry identification.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

1.1.1 Aspectos gerais

A esquistossomose é uma doença parasitária que tem como agentes causadores parasitos pertencentes ao filo Platelmino, classe Trematoda, ordem Digenea, subordem Strigeidida, superfamília Schistosomatoidea, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. *Schistosoma* é um metazoário acelomado, de simetria bilateral e dimorfismo sexual durante a fase adulta (Rollinson & Simpson, 1987).

As três espécies mais importantes para a saúde humana são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (Rollinson & Simpson, 1987). Especificamente a infecção causada pelo *S. mansoni* é denominada de esquistossomose mansônica ou intestinal, pela localização dos parasitos nas vênulas da parede do intestino grosso, sigmóide e reto, com sintomas predominantemente intestinais. Nos casos mais graves, há envolvimento hepatoesplênico e hipertensão no sistema porta (Andrade, 2009, Gryseels *et al.*, 2006).

A esquistossomose é considerada a segunda doença parasitária mais relevante em saúde pública no mundo, superada apenas pela malária. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*), a doença é endêmica em 78 países onde aproximadamente 237 milhões de pessoas requerem tratamento, sendo mais de 100 milhões crianças em idade escolar (WHO, 2013). Por ano, 41000 pessoas morrem da doença. Estima-se que cerca de 700 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas para esquistossomose em condições de pobreza e de más condições de saneamento básico, estando assim sob o risco de contraírem a doença (WHO, 2012).

A esquistossomose tem uma prevalência heterogênea quanto ao clima, vegetação e topografia, e está associada à presença do hospedeiro intermediário e alguns fatores de risco relacionados ao uso da água (Guimarães *et al.*, 2006). Na América do Sul, o Brasil é o país com maior prevalência de esquistossomose, onde a sua transmissão ocorre em uma vasta área territorial, principalmente na região norte de Minas Gerais e nos estados do Nordeste, sendo a espécie causadora o parasito *S. mansoni* (WHO, 2013).

1.1.2 Ciclo de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* envolve duas gerações (figura 1): a primeira no hospedeiro definitivo vertebrado, onde ocorre maturação dos vermes e reprodução sexuada. A segunda no hospedeiro intermediário invertebrado, onde ocorre a reprodução assexuada. Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são os caramujos do gênero *Biomphalaria* (Davis, 1985).

Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto no hospedeiro intermediário, que as libera de forma intermitente na água. Quando encontram um hospedeiro definitivo apropriado, as cercárias liberam as secreções da glândula acetabular facilitando a sua penetração pela epiderme e iniciando o processo de transformação em esquistossômulos (Stirewalt *et al.*, 1983; Wilson & Coulson, 2009). Através da circulação, os esquistossômulos chegam aos pulmões em 2 a 7 dias (Wilson & Coulson, 1986) e, em seguida, são enviados pela circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento (Miller & Wilson, 1980; Rollinson & Simpson, 1987). Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontram-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas pélvicas (Bloch, 1980; Rollinson & Simpson, 1987). O casal está em constante associação, encontrando-se a fêmea no canal ginecóforo do macho. A fêmea depende do contato com o macho para completar a sua maturação (LoVerde & Chen, 1991). A produção de ovos começa 30 a 40 dias após a infecção e os mesmos são eliminados para o ambiente através das fezes de indivíduos infectados (Rollinson & Simpson, 1987). Muitos dos ovos não ultrapassam a parede intestinal e são levados a órgãos e tecidos do hospedeiro pela corrente sanguínea. A presença destes ovos nos tecidos leva a formação do granuloma, que é resultante da resposta do sistema imune do hospedeiro. Esta resposta de hipersensibilidade destrói o ovo, mas também causa danos ao tecido, sendo responsável pelas manifestações clínicas da esquistossomose crônica. Os ovos eliminados pelo hospedeiro através das fezes eclodirão se encontrarem condições adequadas como: água limpa com temperatura morna, baixa hipotonicidade e iluminação adequada, e irão liberar os miracídios (Rollinson & Simpson, 1987). Uma vez que o ovo é rompido, o miracídio emerge e começa a nadar ativamente. O encontro com o hospedeiro intermediário deve ocorrer em um período de 24 horas. Por volta do oitavo dia após a penetração do miracídio, este apresenta-se como um tubo enovelado, imóvel, repleto de células germinativas em multiplicação, se transformando em esporocisto. Por volta da segunda semana o esporocisto rompe-se para liberar esporocistos

filhos, em número de 20 a 40. Os esporocistos secundários apresentam células germinativas em constante multiplicação. Pouco a pouco, aglomerados celulares vão se diferenciando para formar cercárias. Os esporocistos podem formar várias gerações de cercárias. A transformação dos esporocistos em cercárias ocorre apenas quando atingem sua localização permanente, nas glândulas digestivas do caramujo. As cercárias deixam o hospedeiro caindo em água limpa, fechando o ciclo de vida do parasito (Rollinson & Simpson, 1987).

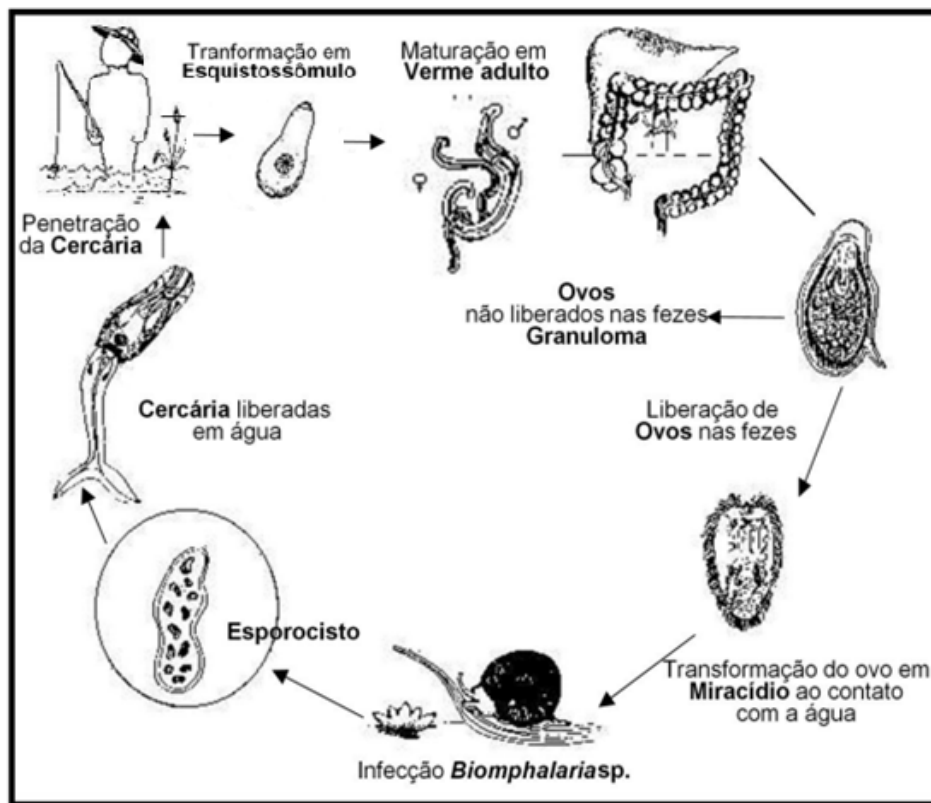


Figura 1: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.

As cercárias, ao saírem do caramujo, nadam em busca de um hospedeiro definitivo, penetram pela sua pele e perdem a cauda, iniciando-se o processo de transformação em esquistossômulos. Os esquistossômulos migram através da pele até as veias e, através da circulação, chegam aos pulmões. Em seguida, são enviados pela circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro. Quando alcançam o sistema porta intra-hepático completam seu desenvolvimento e se acasalam. Vermes adultos de *S. mansoni* residem mais frequentemente nas veias mesentéricas superiores que drenam o intestino grosso. As fêmeas depositam seus ovos nas pequenas vênulas dos sistemas porta e perivesical, de onde são ativamente movidos para o lúmen do intestino sendo eliminados com as fezes. Os ovos que não são eliminados nas fezes são levados pela corrente sanguínea principalmente para o fígado, dando origem aos granulomas. Já os que são liberados nas fezes, ao caírem em água fresca, eclodem e liberam os miracídeos que nadam e penetram no hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos e a produção e liberação de cercárias.

Fonte: Adaptada de <http://www.cdfound.to.it/HTML/sch1.htm>

1.1.3 Patologia da esquistossomose mansônica

A doença é dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por sintomas como a dermatite cercariana, que pode se manifestar como uma urticária local minutos após a infecção pelas cercárias, e a Síndrome de Katayama, que possui como sintomas febre, dor de cabeça e tosse (Burke *et al.*, 2009, Gryseels *et al.*, 2006). A fase crônica está associada ao aprisionamento dos ovos nos tecidos do hospedeiro e à formação do granuloma. Tem seu quadro clínico dividido nas formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, que podem estar associadas à fibrose severa com surgimento de sintomas graves como a hipertensão-portal e esplenomegalia (Andrade, 2004). A hipertensão portal, que aparece nos casos mais avançados, é uma forte complicação da esquistossomose mansônica (Gryseels *et al.*, 2006) e ocorre por um bloqueio do sistema porta-hepático causado pelos granulomas hepáticos. Nos casos mais graves, também ocorre uma dilatação anormal do fígado e do baço que é chamada de hepatoesplenomegalia. Esta, por sua vez, irá gerar um acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e ascite, além do desenvolvimento de varizes esofágicas que podem causar hemorragias, se forem rompidas. Esses quadros mais graves da doença, se não forem tratados, podem levar à morte do indivíduo (Boros, 1989; Capron *et al.*, 2005).

Porém, grande parte das pessoas com a doença não experimentam estas formas graves, e sim lesões mais brandas como alterações de crescimento, anemia, dor abdominal, intolerância a exercícios, baixo desempenho escolar e reduzida capacidade de trabalhar (King *et al.*, 2006). Os sintomas clínicos da esquistossomose são atribuídos à fibrose associada à resposta inflamatória dos granulomas induzidos pelos ovos do schistosoma (Wilson *et al.*, 2007).

1.1.4 Controle e tratamento da esquistossomose

O controle da doença é realizado através da intervenção no meio ambiente pelo controle dos caramujos com moluscidas, saneamento básico, abastecimento da população com água tratada e do tratamento das pessoas infectadas com praziquantel (PZQ). As tentativas de eliminação da doença apenas com o uso da droga são ineficientes, por isso é necessário adotar tais medidas em relação ao meio ambiente (Gryseels 2012). Segundo Gryseels (2012) é necessário realizar o tratamento das crianças em idade escolar, uma vez que elas são o grupo de maior risco e são de fácil acesso nas escolas.

A droga praziquantel fez da quimioterapia uma tentativa de controle da doença, porém seu uso não previne a reinfecção (Carabin *et al.*, 2000). Segundo Gryseels (2012), o principal objetivo do uso da droga é controlar e prevenir a morbidade da doença. Como as taxas de reinfecção continuam altas nas áreas endêmicas conhecidas e, além disso, surgem novos casos de transmissão, o sucesso da estratégia baseada apenas na quimioterapia torna-se limitado (Katz, 1998).

A eficácia do PZQ está relacionada ao tempo de infecção e ao sexo dos vermes. Estudos indicaram uma relativa ineficiência do PZQ contra infecções recentes (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003, Pica-Mattoccia & Cioli, 2004). O PZQ é menos eficiente contra os parasitos que estão em desenvolvimento e sua eficácia em nível subcurativo pode estar relacionada com a resposta imune do hospedeiro (Wilson & Coulson, 2006). Além disso, vermes fêmeas provenientes de infecção unissexual são menos sensíveis ao tratamento com PZQ do que vermes machos (Pica-Mattoccia & Cioli, 2004).

O tratamento com PZQ tem um papel importante na redução da prevalência e na intensidade da infecção. Entretanto, seu uso por mais de três décadas pode ser a causa do surgimento de parasitos resistentes a esta droga. Inclusive já foram descritos na África isolados de campo de *S. mansoni* menos susceptíveis ao PZQ (Wang *et al.*, 2012). Desse modo, é de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose para o controle efetivo e duradouro da transmissão, uma vez que a imunização resultará em uma proteção em longo prazo, enquanto que o tratamento com a droga resulta em uma redução em curto prazo da carga parasitária (Bergquist, 2002).

1.1.5 Resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni*

A transmissão da esquistossomose e a infecção do hospedeiro humano são influenciadas por fatores ambientais como a distribuição da água, presença do hospedeiro intermediário e por fatores do hospedeiro humano como idade, sexo, contato com a água, genética, resposta imunológica e fisiológica (Pereira *et al.*, 2010). Por outro lado, o hospedeiro humano desenvolve mecanismos de aquisição de imunidade em resposta à infecção crônica ou a repetidos tratamentos com PZQ. A melhor evidência para aquisição de imunidade contra a infecção pelo *Schistosoma* é originada dos estudos de população de área endêmica, onde ocorre uma diminuição nos níveis de infecção com o aumento da idade (Bethony *et al.*, 2010). Além disso, existem alguns estudos de resistência induzida após tratamento que relatam, por exemplo, a influência de IgE na resistência após quimioterapia tanto para *S. haematobium* quanto para *S. mansoni* (Correa-Oliveira *et al.*, 2000). O alto nível

de IgE em indivíduos adultos que vivem em área endêmica está provavelmente associado a contínuas exposições aos antígenos do parasito, levando a uma resistência a re-infecção em indivíduos de maior idade (Pereira *et al.*, 2010). Indivíduos resistentes à re-infecção têm uma maior resposta celular linfoproliferativa para antígenos de verme adulto e esquistossômulo (de Jesus *et al.*, 1993).

Além da resistência induzida, seja ela natural ou por quimioterapia, há algumas décadas Corrêa-Oliveira e colaboradores (1989) descreveram um grupo de indivíduos naturalmente resistentes à infecção, chamados posteriormente de “normais endêmicos” (NE). Estes indivíduos apresentam uma forte resposta contra antígenos do parasito, particularmente aos antígenos de ovo (SEA), e ausência de infecção, como determinada pela ausência de ovos do parasito nas fezes, apesar da constante exposição à transmissão pelo *S. mansoni*. A resposta imune desenvolvida por estes indivíduos é vigorosa, mas difere da desenvolvida contra um extrato bruto de antígenos do parasito pelos indivíduos cronicamente infectados (Bethony *et al.*, 2010). Além disso, estes indivíduos também não possuem uma história prévia de uso de drogas contra esquistossomose (Correa-Oliveira *et al.*, 2000).

Os mecanismos imunológicos desenvolvidos em indivíduos com resistência natural ou induzida que previnem o estabelecimento da infecção devem constituir a base para o entendimento e desenvolvimento de uma vacina bem sucedida contra a esquistossomose humana.

1.1.6 Imunobiologia da esquistossomose

Durante as etapas do ciclo evolutivo do *S. mansoni* nos diferentes tecidos, o parasito passa por significativas alterações morfológicas e bioquímicas que servem como “escape” contra o sistema imunológico do hospedeiro. Cada etapa desse processo promove a ativação de diferentes e complexos mecanismos imunológicos (Souza *et al.*, 2011).

No curso da infecção, a resposta imune passa por três fases. A primeira fase ocorre decorridas três a cinco semanas da infecção e é caracterizada pela exposição aos esquistossômulos que estão em constante migração pelos tecidos. A resposta imunológica predominante nesta fase é a do tipo Th1. A segunda fase ocorre após cinco ou seis semanas de infecção, quando as formas imaturas do parasito se desenvolvem em formas maduras que copulam e produzem ovos e, com isso, a resposta imunológica predominante passa a ser a do tipo Th2, induzida principalmente por antígenos do ovo de *S. mansoni*. A terceira fase acontece entre a 16^o e 17^o semanas após a infecção. Neste momento é observado um aumento significativo na produção de IL-10, a qual é responsável pela modulação da produção e das

funções efectoras dos mediadores pró-inflamatórios (Pearce & MacDonald, 2002; Araújo *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Montenegro *et al.*, 1999; Cheever *et al.*, 2001). Este aumento na produção de IL-10 é importante, uma vez que a ausência da modulação mantém os níveis de mediadores inflamatórios altos, o que pode provocar o desenvolvimento das formas graves da esquistossomose, com fibrose hepática e hipertensão portal, podendo levar a morte do hospedeiro (Hoffmann *et al.*, 1999; Rutzky *et al.*, 2001). A fibrose e alguns sintomas da patologia são mediados principalmente por citocinas do tipo Th2 (Cheever *et al.*, 1994; Remain *et al.*, 2006). Uma forte atividade antifibrótica está sendo relacionada com a presença de IFN- γ (Mukai *et al.*, 2006, Pearce & MacDonald, 2002; Wilson *et al.*, 2007). No entanto, outros estudos comprovam que níveis excessivos de IFN- γ podem causar graves consequências patológicas para o hospedeiro, como a hepatoesplenomegalia (Hoffmann *et al.*, 1999). Esta citocina parece estar envolvida na síntese de colágeno, uma vez que seu baixo nível em pacientes com a forma mais severa da doença explica o aumento da cicatriz tecidual e da fibrose (Caldas *et al.*, 2008). Níveis elevados de IFN- γ estão presentes no grupo de indivíduos normais endêmicos, e em pacientes tratados com PZQ os níveis de IFN- γ voltam a se normalizar após a cura (Bahia-Oliveira *et al.*, 2002). Deste modo, o grupo de Correa-Oliveira (1989) acredita que o IFN- γ contribui para a imunidade protetora. Caldas e colaboradores (2008) encontraram uma relação entre a intensidade da infecção e a produção das citocinas IL-10 e IFN- γ . De acordo com estes autores, em área endêmica, na qual a intensidade da infecção está relacionada com a morbidade, o aumento de IL-10 e a diminuição de IFN- γ podem ser fatores importantes para o processo de fibrose. Na forma severa da doença, a deficiência de IL-10 pode ser relacionada com a patogênese da esquistossomose (Caldas *et al.*, 2008).

Na fase aguda da doença são detectados níveis consideráveis de TNF- α no plasma e a presença de células mononucleares do sangue periférico que produzem grande quantidade de TNF- α , IL-1 e IL-16. A maioria das pessoas que se infectam com schistossomas desenvolve resposta Th2. Uma resposta Th2 prolongada contribui para o desenvolvimento de fibrose hepática e morbidade crônica. A interleucina IL-13 é a principal citocina Th2 responsável por promover a fibrinogênese e a formação do granuloma. No entanto, os mediadores como IFN- γ , IL-12, TNF- α e NO, os quais estão associados com resposta Th1, previnem o desenvolvimento de resposta Th2 e de fibrose mediada por IL-13 (Pearce & MacDonald, 2002). De acordo com Wilson e colaboradores (2007) o IFN- γ parece contribuir para a formação do granuloma e os pacientes que apresentam fibrose severa possuem elevadas taxas de TNF- α , IL-5, IL-10 e IL-13. Enquanto que os pacientes com pouca fibrose apresentam alto

nível de IFN- γ . Estes dados confirmam que citocinas produzidas por células Th2, como a IL-13, são responsáveis pela maior parte da imunopatologia e fibrose durante a infecção.

O *S. mansoni* utiliza as biomoléculas do hospedeiro para completar o ciclo e para desenvolver uma infecção crônica (Pearce & MacDonald, 2002). De acordo com Amiri e colaboradores (1992), o parasito utiliza TNF- α produzido pelo hospedeiro como sinal estimulatório para a produção de ovos. Além disso, a participação de IL-7 está relacionada com o crescimento e fecundidade do verme (Wolowczuk *et al.*, 1989). Os fatores de crescimento epitelial humano estimulam a expressão do fator de crescimento epitelial no parasito, desenvolvendo-o em tamanho (Vicogne *et al.*, 2004). No entanto, em hospedeiros imunodeprimidos o desenvolvimento de *S. mansoni* é retardado. Isto ocorre, possivelmente, pelo fato do parasito aguardar por melhores condições de sobrevivência do hospedeiro para, então, finalizar o processo de crescimento, pareamento, fecundidade e transmissão (Davies *et al.*, 2001).

A severidade da esquistossomose não está somente relacionada com a carga parasitária. A mesma parece estar vinculada às consequências imunológicas da ausência de citocinas da resposta Th2, uma vez que é extremamente importante a produção de citocinas de resposta Th2 para prevenir e amortecer a produção de mediadores inflamatórios. A IL-10, por exemplo, tem a função de modular a resposta pró-inflamatória e sua ausência pode resultar no aumento da severidade da doença. É importante ter uma resposta Th1/Th2 balanceada durante a infecção e a IL-10 tem o importante papel regulatório de prevenir o desenvolvimento de patologias mediadas pelo excesso de resposta Th1 e Th2 (Pearce & MacDonald, 2002). Por exemplo, um alto nível de IL-12, produzida por células Th1, inibe a mudança de Th1 para Th2. Além disso, manter balanceadas as respostas Th1 e Th2 é crucial para formação do granuloma sem patologia excessiva (Wilson *et al.*, 2007).

O aumento de resposta Th2 e a liberação de IL-4 e IL-5 após o tratamento com PZQ está correlacionada com a resistência dos pacientes à reinfeção. O sistema imunológico humano frequentemente é ineficaz contra os helmintos por dois motivos principais. Primeiro porque não é capaz de resolver a infecção crônica e segundo pelo fato da memória imunológica falhar na proteção contra a reinfeção, mesmo após a cura da doença com o uso da droga. (McSorley & Maizels, 2012).

1.1.7 Vacinas

A vacinação tornou-se a medida mais eficiente e menos dispendiosa para evitar, e até mesmo erradicar, uma doença infecciosa (Andre, 2003). Existem três gerações de vacinas. As

vacinas de primeira geração são produzidas a partir de microorganismos vivos e atenuados, como a BCG, ou mortos inativados, como a vacina contra *Bordetella pertussis*. Porém a eficácia e a segurança destas vacinas são muito questionadas. As vacinas de segunda geração são as de subunidades, constituídas de antígenos purificados ou recombinantes. E as de terceira geração são as vacinas de DNA, nas quais os genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos potencialmente imunogênicos são carregados por DNA plasmidiano e são inoculados nesta forma. As vacinas de segunda e terceira gerações são vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes (Mir, 2004). Comparando a vacina de DNA com as vacinas clássicas, a vacina de DNA possui diversas vantagens, como: baixo custo de produção em larga escala (Whalen, 1996; Robinson, 1997) e ausência da necessidade de refrigeração, o que facilita sua distribuição em locais de difícil acesso (Waine & McManus, 1995). As vacinas atenuadas e de DNA induzem tanto a produção de anticorpos quanto a ativação de resposta imune celular, seja por linfócitos T auxiliares (CD4+) ou por linfócitos T citotóxicos (CD8+) (Van Tienhoven *et al.*, 2001; Nagata *et al.*, 2004).

As vacinas de DNA são formadas, principalmente, por vetores plasmidiano que codificam antígenos vacinais. Estes vetores possuem um gene de resistência ao antibiótico controlado por um promotor procarioto e uma origem procariótica de replicação, permitindo a seleção e a replicação dos plasmídeos em bactérias transformadas, respectivamente (Ingolotti *et al.*, 2010). Segundo Germany e colaboradores (2003), os plasmídeos que possuem um promotor forte e que induzem a expressão de proteínas em altos níveis em células eucarióticas, induzem uma melhor resposta imune.

O sucesso de uma imunização com DNA depende de alguns fatores, como: a frequência e via de administração, a concentração do DNA administrada e da localização do antígeno utilizado (secretado, ligado à membrana ou citoplasmático) (Rainczuk *et al.*, 2003; Morel *et al.*, 2004; Robinson, 1997; Fyan *et al.*, 1993). Pesquisas utilizando este tipo de imunização têm sido direcionadas para doenças como a AIDS, malária e tuberculose (Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007).

Em uma inoculação intramuscular com vacina de DNA, o DNA plasmidiano é incorporado às células musculares e às células apresentadoras de antígenos (APCs). O DNA que foi endocitado pela célula, usa as vias metabólicas desta célula hospedeira para realizar os processos de transcrição do DNA inoculado e, após isso, ocorre a tradução do mRNA, que vai resultar na síntese do antígeno proteico relacionado ao agente infeccioso. Estes antígenos que foram expressos dentro da célula são processados pelas APCs e os fragmentos destes antígenos são complexados com as moléculas de MHC classe I. Após isso, os peptídeos são então apresentados na superfície celular para que ocorra o reconhecimento e ativação

específica de linfócitos T CD8 citotóxicos. Outros antígenos também produzidos pelas células musculares vão para o espaço extracelular e nele podem estimular linfócitos B a produzir antígenos específicos ou então serem endocitados para outras APCs. Estes antígenos endocitados são considerados exógenos e, por isso, são processados em compartimentos celulares diferentes daqueles quando o antígeno é originado dentro da célula. Isto é, os fragmentos destes antígenos são complexados com MHC classe II e apresentados na superfície das células apresentadoras para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4 auxiliares (Kano *et al.*, 2007).

A vacina de DNA resulta em uma imunidade em longo prazo, uma vez que há uma prolongada produção endógena do antígeno pela célula hospedeira e, também, porque estes antígenos são capazes de estimularem linfócitos de memória imunológica (Snadeep *et al.*, 1996).

1.1.8 Vacina contra esquistossomose

Existem algumas evidências que sugerem a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Tais evidências são: o alto nível de proteção obtido pela vacinação com cercárias irradiadas (Wilson & Coulson, 1999), a existência de indivíduos não infectados em áreas endêmicas (Correa-Oliveira *et al.*, 1989, Gazzinelli *et al.*, 1992), o fato de indivíduos jovens serem mais propícios à infecção do que indivíduos adultos (Wilson & Coulson, 2009) e a auto-cura relatada em macacos Rhesus (Wilson *et al.*, 2008).

A vacinação de camundongos com cercárias de *S. mansoni* atenuadas por raio X ou radiação gama (RA) foi o modelo de vacinação capaz de induzir em laboratório os níveis mais altos de proteção, variando entre 50-80% (Dean *et al.*, 1983). Apesar de não ter sido testada em humanos, em chimpanzés foi obtido 40% de proteção após 3 exposições a 27 mil cercárias RA (Eberl *et al.*, 2001). E em babuínos, obteve-se 80% de proteção com 5 exposições a 9 mil cercárias RA (Kariuki *et al.*, 2006). Na medida em que o intervalo entre a vacinação e o desafio foi aumentado, ocorreu uma diminuição no nível de proteção. Isto indica a necessidade constante de altos níveis de anticorpos protetores.

Estudos extensivos da vacina com cercária RA demonstraram que a proteção não depende apenas de um único mecanismo imunológico, mas é multifatorial. Esta envolve, simultaneamente, a indução tanto de uma resposta celular quanto humoral, estando associada ao perfil de resposta Th1 e Th2, não polarizada. Além disso, os níveis de proteção alcançados também estão associados a fatores genéticos do hospedeiro e ao protocolo de vacinação aplicado (Hoffmann *et al.*, 1999, Jankovic *et al.*, 1999, Mountford, 2005). A vacinação por

RA é mais efetiva em animais previamente infectados, sendo uma informação importante visto que a população alvo deve ser de áreas endêmicas (Mountford, 2005).

Ainda não se sabe exatamente o mecanismo que faz da vacina com cercária RA um sucesso, mas parece estar associado ao retardo na migração e desenvolvimento do esquistossômulo RA, permitindo que o sistema imune reconheça moléculas importantes do parasito para montar uma resposta imune protetora (Jones *et al.*, 2008). Apesar dos altos níveis de proteção induzidos pela vacinação com cercária RA, o uso deste modelo de vacinação não é seguro e nem ético (Kariuku *et al.*, 2006). Deste modo, a busca por alvos vacinais ainda continua. Embora vários antígenos de *S. mansoni* tenham sido testados, nenhum deles gerou uma resposta protetora esperada (DeMarco e Verjovski-Almeida, 2009).

O grande desafio para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose é a identificação de antígenos que promovam pelo menos o mesmo nível de proteção já obtido com o modelo de vacinação com cercária irradiada (Wilson & Coulson, 2009).

A maioria dos estudos e pesquisas que visam o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose se concentra em vacinas de subunidades, compostas de proteínas nativas purificadas e por antígenos recombinantes. Em meados dos anos 90, a OMS selecionou seis antígenos para serem testados em laboratórios independentes como potenciais antígenos imunoprotetores, sendo estes: IrV-5 (Soisson *et al.*, 1992), Sm97-paramiosina (Pearce *et al.*, 1988), triose fosfato isomerase (Reynolds *et al.*, 1994), Sm28-glutathione-S-transferase (Capron *et al.*, 1994), Sm14 (Capron *et al.*, 2005), Sm23-MAP-3 (Tandler *et al.*, 1996) (tabela 1). No entanto, estes antígenos só foram capazes de reduzir parcialmente a carga parasitária em camundongos após desafio, em relação ao grupo controle não imunizado. Ou seja, nenhum deles induziu o mesmo nível de proteção obtido utilizando cercária RA.

Tabela 1: Candidatos à vacina selecionados pela OMS, 1998

Antígeno	Tamanho (kDa)	Estágio em que é expressa*	Descrição	Proteção Camundongo **	Proteção Rato**	Proteção Outros**	Estado Legal	Grupo de estudo
Glutaciona-S-transferase (GST)	18	S,A,E	Enzima	30-60	40-60	40 Baboo	Patenteado	Instituto Pasteur Lille
Paramiosina (Sm97)	97	S, A	Proteína muscular	30			Público	Comel/CW RU/NIAID
Antígeno 5 da vacina irradiada (IrV-5)	62	S,A,E	Proteína muscular	50-70	95	25 Baboo	Patenteado	Johns Hopkins Scholl of Medicine
Triose fosfatase isomerase (TPI) (MAP-4)	28	S,A,E	Enzima***	30-40			Público	Harvard
Antígeno de membrana Sm23 (MAP-3)	23	S,A,E	Proteína de membrana ***	40-50			Público	JohnsHopkins /Harvard
Proteína de ligadora de ácido graxo (Sm14)	14	S,A	Proteína ligada a ácido graxo	65		90-100 coelho	Patenteado	Fiocruz

* S- esquistossômulo; A- verme adulto; E- ovo. ** Proteção em %. *** Usado peptídeo sintético nos testes de proteção.

Fonte: Adaptada de: Bergquist & Colley, 1998.

Todos estes antígenos testados, com exceção de Sm23, não possuem localização extracelular, sendo componentes do citoplasma ou do citoesqueleto. Por esta razão, os mecanismos que estes antígenos ativam o sistema imune não são reconhecidos (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009). A Sm23 é uma proteína pertencente à subfamília de proteínas tetraspaninas, que são localizadas predominantemente no tegumento externo do *S. mansoni* (Reynolds *et al.*, 1992). As proteínas desta subfamília possuem quatro domínios transmembrana expressos na superfície de células eucarióticas, incluindo células B e T (Levy *et al.*, 2005) e são promissoras como candidatas vacinais (Reynolds *et al.*, 1992). A Sm23 não confere proteção na forma de proteína recombinante quando formulada com alum, sendo mais eficiente quando administrada na forma de vacina de DNA (Da'Dara *et al.*, 2006).

A proteína Sm29, a qual está presente no tegumento de verme adulto de *S. mansoni*, foi identificada por Cardoso e colaboradores (2006). Nos experimentos realizados pelo grupo, os animais que foram imunizados com Sm29r tiveram uma redução de 31,25% na recuperação de vermes adultos em relação ao grupo controle. E, além disso, a imunização com Sm29r acrescida de CFA induziu 56,7% de proteção (Cardoso *et al.*, 2008).

A vacina composta pelo antígeno Sm14, uma proteína ligante de ácido graxo, foi construída como proteína recombinante e, também, escalonada (produção em volume industrial comprovada). Chegou-se à produção do chamado lote semente da vacina para testes clínicos, aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A Sm14 alcançou até 67,9% de proteção em camundongos. Porém, a estabilidade da proteína

recombinante foi questionada (Oliveira *et al.*, 2008). A vacina foi aprovada pela ANVISA e os testes clínicos de fase 1 foram conduzidos pela equipe do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (Ipec/Fiocruz), em voluntários humanos. Os resultados mostrados garantem que a vacina é segura para o uso em humanos e que é imunogênica, sendo capaz de induzir proteção contra a doença (Comunicação/Instituto Oswaldo Cruz). Há evidência de que células CD4+ de indivíduos não infectados que vivem em áreas endêmicas, os quais são naturalmente resistentes à esquistossomose, respondem a antígenos de *S. mansoni* como a Sm14 (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009).

A proteína Sm28 ou Glutathione S-transferase é uma enzima que possui um papel importante na detoxificação de xenobióticos e funciona como uma proteína ligadora intracelular a uma série de anti-helmínticos, protegendo o parasito do ataque das células do sistema imune do hospedeiro (Mannervik *et al.*, 1985; Brophy *et al.*, 1990). Os protocolos de imunização utilizando a Sm28 foram eficientes, reduzindo a carga parasitária, a fecundidade das fêmeas e a viabilidade dos ovos do parasito (Ballou *et al.*, 1987; Boulanger *et al.*, 1991). Em sua forma nativa, a Sm28 é capaz de induzir a redução de 70% na carga parasitária em camundongos e ratos. Especificamente em ratos, a resposta a Sm28 está associada a uma grande produção de IgG2a, capaz de induzir citotoxicidade *in vitro* mediada por eosinófilos (Ballou *et al.*, 1987). O nível de proteção de Sj28GST (Glutathione S-transferase de *S. japonicum*) variou entre diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que se obteve proteção indicada por morte de vermes de 30-65% para ovelhas, nenhuma proteção para búfalo de laboratório, 39% para búfalos de campo, 44% para bovinos. Houve também uma proteção indicada pela diminuição de ovos de 43-72% para ovelhas, 30-60% para búfalo de laboratório, 19% para búfalo de campo e 19% para bovinos (Shi *et al.*, 2001).

Os estudos de proteção realizados com helmintos demonstraram que um mesmo antígeno candidato a vacina pode ter variação nos níveis de proteção alcançados e na resposta imunológica dependendo da forma em que é desenvolvido (proteína recombinante ou DNA), do tipo de vetor utilizado, da forma de administração (intravenosa, intradérmica, *gene gun*), da presença de adjuvante/estimulante, da estratégia utilizada (dose única, *primer-boost* e diferentes intervalos entre imunização) e do hospedeiro. Sj28GST e Sm23 induziram os mesmos níveis de proteção quando utilizados como vacina recombinante (21-24%) (McManus & Loukas, 2008). A imunização com o antígeno Sm22.6 induziu proteção parcial como proteína recombinante e falhou como vacina de DNA (Pacífico *et al.*, 2006). O uso da forma recombinante de Sm28 em imunizações também resultou na redução da carga parasitária e da fecundidade da fêmea (McManus & Loukas, 2008). Uma plausível explicação para o sucesso limitado de vacina usando antígenos recombinantes é a formulação incorreta

ou inadequada para atingir o nível de proteção desejado. Isso foi demonstrado pela coadministração em camundongos da vacina com cercária irradiada com a citocina recombinante IL-12 (interleucina), a qual aumentaria a eficácia de 60 para mais de 90% de proteção. Embora a vacina com cercária irradiada possa induzir mais de 80% de proteção em roedores e primatas, nenhuma vacina recombinante ainda atingiu este nível de proteção (Wilson & Coulson, 2006).

O desenvolvimento de novas drogas e de vacinas contra a esquistossomose proporcionaria importantes alternativas para o tratamento da doença, além do uso do PZQ. O desenvolvimento de vacinas é bastante desejável, pois, como citado anteriormente, proporcionaria proteção em um longo prazo (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009).

Uma interessante abordagem para o desenvolvimento de vacinas e drogas é a seleção de proteínas de superfície, pois tais proteínas são de fácil acesso. Isso significa que as drogas não precisariam atravessar a membrana para atingir seu alvo. Além disso, existe uma maior facilidade do anticorpo se ligar a este antígeno, que está exposto. Por isso, diferentes estudos utilizando proteínas do tegumento do *S. mansoni* também foram realizados com o objetivo de descrever alvos potenciais de drogas e vacinas (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009).

Teixeira de Melo e colaboradores (2010) realizaram experimentos de imunização em camundongos com tegumento de esquistossômulos (Smteg) recém-transformados juntamente com o adjuvante *Freund*. A imunização com Smteg e adjuvante resultou em redução da carga parasitária, do número de ovos eliminados nas fezes e uma significativa redução do número de ovos retidos no fígado. Além disso, a imunização com Smteg induziu uma significativa produção de anticorpos específicos anti-Smteg, IgG1 e IgG2c e, também, produção de IFN- γ e IL-4. Os vermes adultos recuperados dos camundongos imunizados com Smteg apresentaram danos no tegumento. No entanto, Araujo e colaboradores (2012), ao avaliarem a capacidade de Smteg de induzir proteção na ausência de adjuvante, observaram que a imunização apenas com Smteg resultou em uma significativa produção de anticorpos, aumento da porcentagem de células CD4+ IFN- γ + e CD4+ IL-10+ no baço e aumento na produção de IFN- γ e IL-10, mas não foi observada redução da carga parasitária, da fecundidade da fêmea e da morbidade. A transferência passiva de soro de camundongos imunizados com Smteg para camundongos *naive* demonstrou que os anticorpos anti-Smteg estão envolvidos com a eliminação do parasito *in vivo*, uma vez que houve uma redução significativa da carga parasitária e do número de ovos presos no fígado e intestino dos camundongos desafiados que receberam o soro contendo anticorpos anti-Smteg (Teixeira de Melo *et al.*, 2014).

1.1.9 Proteoma dos Schistosomas

Os estudos pós-genômicos de *S. mansoni* avançaram não apenas com o advento de novas tecnologias em proteômica, mas também com o recente sequenciamento do genoma completo do parasito (Berriman *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Protasio *et al.*, 2012). Grande parte das proteínas de *S. mansoni* não possui similaridade detectável com potenciais homólogas nos bancos de dados existentes. Então, a partir de dados gerados pelo transcriptoma do parasito, a construção de bancos de dados de proteínas preditas a partir do seu genoma possibilitou uma melhora significativa na identificação de proteínas por espectrometria de massas (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009).

Diferentemente do genoma, que é estável e idêntico em toda célula de um organismo, o proteoma é sempre dinâmico, pois varia de acordo com os estímulos internos e externos. Ou seja, diferentes proteomas podem ser originados de um único genoma.

Atualmente, a utilização de ferramentas proteômicas é uma abordagem comum para identificação de marcadores de diagnóstico, alvos de drogas e candidatos para vacina (Seliger & Kellner, 2002). Dentre elas, a eletroforese bidimensional permite separar, identificar e quantificar as proteínas a partir de uma amostra de composição protéica. Esta técnica, associada à espectrometria de massas (MS), são ferramentas muito utilizadas para estudar a expressão de proteínas em larga escala (Haseloff *et al.*, 2003). As metodologias empregadas no estudo do proteoma do *S. mansoni* vêm sendo muito utilizadas para a identificação de proteínas deste parasito (Cheng *et al.*, 2005; Curwen *et al.*, 2004).

O proteoma de *S. mansoni* foi analisado para comparar o perfil proteico das quatro fases do ciclo de vida: cercária, esquistossômulo, verme adulto e ovo. A partir deste estudo, foi possível demonstrar que 70% das proteínas identificadas estão presentes nas 4 fases do ciclo do parasito, sugerindo assim que estas proteínas participam de vias metabólicas essenciais, como a glicólise (Curwen *et al.*, 2004; Van Hellemond *et al.*, 2007). Estes estudos comparativos podem contribuir para a identificação de funções imprescindíveis para o desenvolvimento do parasito e a presença de mecanismos adaptativos, os quais poderiam ser interrompidos para impedir o desenvolvimento da doença, sendo assim, candidatos a alvos vacinais.

Existem estudos proteômicos que têm como objetivo comparar os extratos proteicos de vermes adultos machos e fêmeas para identificar proteínas sexo-específicas em *S. japonicum*. E de acordo com este trabalho, as proteínas relacionadas com desenvolvimento, maturação sexual e sinalização de hormônios são diferencialmente expressas entre fêmeas e machos. O estudo dessas proteínas é importante para a produção de drogas e vacinas, pois

podem interferir na liberação de ovos pelas fêmeas, reduzindo assim a patologia da doença e impedir a transmissão (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009). Outros estudos proteômicos de *Schistosoma* focaram na membrana externa do tegumento dos vermes adultos, uma vez que é o local onde ocorre a interação entre o parasito e o hospedeiro (Van Hellemond *et al.*, 2007).

Extrato proteico total e de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* foram estudados pelo nosso grupo utilizando eletroforese e *western-blotting* bidimensionais (2D-WB) com soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose. Neste estudo foram utilizadas *strips* de diferentes faixas de pH e em todas se obteve uma boa separação e resolução dos *spots* proteicos. No entanto, no *western-blotting* em que *strips* de diferentes faixas de pH foram usadas, observou-se que alguns *spots* foram identificados exclusivamente em determinada faixa de pH, o que proporcionou um aumento do número total de proteínas antigênicas identificadas. Além disso, observou-se um perfil de proteínas distinto entre o experimento utilizando extrato proteico total e o que utilizou extrato do tegumento de vermes adultos. Quarenta e sete proteínas de *S. mansoni* imunorreativas ao soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose foram identificadas, dentre elas, nove proteínas foram identificadas exclusivamente no experimento em que foi utilizado soro de indivíduos infectados de área endêmica sendo, portanto, candidatas a novos antígenos para diagnóstico da esquistossomose, e somente um antígeno foi reconhecido apenas pelo soro de indivíduos não infectados de área endêmica, sendo um potencial antígeno protetor contra infecção pelo *S. mansoni* (Ludolf *et al.*, 2014).

1.1.10 Fosfoglicerato mutase

Em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo utilizando extrato proteico total ou uma preparação do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* e soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose foram identificadas 47 proteínas antigênicas. Tais proteínas foram reconhecidas pelas amostras de soro de indivíduos infectados e/ou não infectados de área endêmica para esquistossomose (Ludolf *et al.*, 2014). A partir destes experimentos, a proteína fosfoglicerato mutase (SmPGM) foi selecionada para ser avaliada como potencial antígeno imunoprotetor contra a esquistossomose.

A figura 2 mostra um experimento de eletroforese bidimensional (figura 2A) e seus respectivos 2D-WB (figura 2B), realizado por Ludolf e colaboradores (2014), onde dois *spots* proteicos (1 e 4), presentes no extrato proteico total de vermes adultos de *S. mansoni*, e outros quatro *spots* (1 a 4), presentes no extrato proteico enriquecido com proteínas do tegumento dos vermes, foram identificados por espectrometria de massas do tipo Maldi-ToF-ToF como

uma fosfoglicerato mutase de *S. mansoni* (SmPGM) . Destes, principalmente os *spots* 1 e 4 foram mais fortemente reativos ao soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE) de área endêmica para esquistossomose e fracamente reativos ao soro de indivíduos não infectados de área não endêmica (NI) (figura 2B). Utilizando o programa Mascot, os peptídeos que identificaram tais *spots* como sendo a SmPGM estão sendo mostrados na figura 3. Dentre outros fatores que serão descritos neste trabalho, esta proteína foi selecionada para ser testada como potencial antígeno vacinal contra esquistossomose por ter sido reativa ao soro de indivíduos naturalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni*, residentes em área endêmica para esquistossomose (NE).

Zhou e colaboradores (2008) identificaram a fosfoglicerato mutase de *Schistosoma japonicum*, cujo gene consiste de 753 nucleotídeos que codificam uma proteína de 250 aminoácidos, com uma massa molecular em torno de 28.26 kDa. Além disso, através da PCR em tempo real, foi demonstrado que o nível do seu mRNA é mais elevado nos esquistossômulos do que nos outros estágios de desenvolvimento do parasito.

A SmPGM é classificada no GO (*Gene Ontology*) como uma enzima que participa da via metabólica da glicólise (GO ID 0006096). A enzima fosfoglicerato mutase catalisa o passo 8 da glicólise, transferindo o grupo fosfato do terceiro para o segundo carbono na conversão do 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato (figura 4), sendo representada pelo EC 5.4.2.1: **5.** família isomerase; **5.4.** transferase intramolecular; **5.4.2.** fosfotransferase; **5.4.2.1** fosfoglicerato mutase (GeneDB).

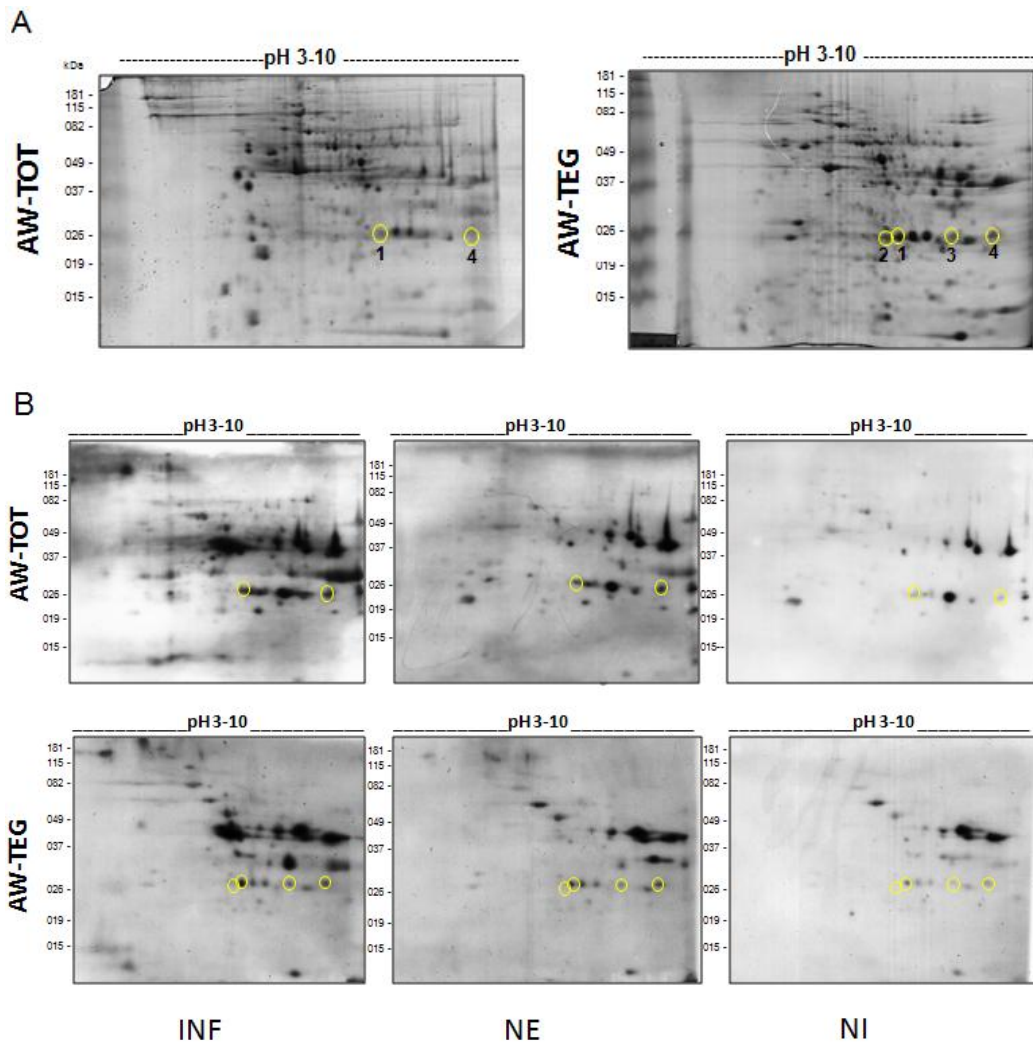


Figura 2: 2D-PAGE de extrato proteico total e de tegumento de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e respectivos 2D-WB utilizando soro INF, NE e NI.

Extrato proteico total (AW-TOT) e de tegumento (AW-TEG) de vermes adultos foram separados por 2-DE utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram coradas por Azul de Coomassie Coloidal (A) ou transferidas para membranas de PVDF (B) e incubadas separadamente com *pool* de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE) de área endêmica para a esquistossomose e não infectados de área não endêmica (NI), seguido de incubação com anti-Ig's total humana conjugada a HRP. Os círculos mostram os spots proteicos correspondentes à SmPGM. Este experimento é representativo de três réplicas.

A

Mascot Search Results

User : rosiane
 Email : rosiane@cpqrr.fiocruz.br
 Search title : Project: Andre Ferreira, Spot Set: Andre Ferreira\MileneRHV FeLudolf
 MS data file : ppw_E7_130528671006.txt
 Database : NCBIInr 20131218 (35149712 sequences; 12374887350 residues)
 Timestamp : 24 Dec 2013 at 12:41:11 GMT
 Protein hits : [gi|256088898](#) phosphoglycerate mutase [Schistosoma mansoni]
 [gi|226468204](#) phosphoglycerate mutase [Schistosoma japonicum]
 [gi|496024729](#) sulfurtransferase [Streptomyces sp. SPB74]

	NCBIInr	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	6	0	0.00 %
Peptide matches above homology or identity threshold	6	0	0.00 %

B

[gi|256088898](#) Mass: 28579 Score: 714 Matches: 7(6) Sequences: 7(6) emPAI: 1.87
 phosphoglycerate mutase [Schistosoma mansoni]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 94	1294.6147	1293.6074	1293.6387	-0.0313	0	92	4.6e-05	1		K.YALLDSSCIPR.T
<input checked="" type="checkbox"/> 105	1333.5481	1332.5408	1332.5694	-0.0286	0	92	4.8e-05	1		R.HGBSVYNEENR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 120	1435.7670	1434.7597	1434.7943	-0.0346	0	72	0.0039	1	U	R.EQVLIVAHGNSLR.A
<input checked="" type="checkbox"/> 146	1651.7732	1650.7659	1650.8253	-0.0594	0	85	0.00021	1		R.AYDIPPPPVDISDPR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 157	1734.8383	1733.8310	1733.8736	-0.0426	0	176	1.5e-13	1	U	K.HYYLADBATVAAAIAR.V
<input checked="" type="checkbox"/> 175	1807.8639	1806.8566	1806.9264	-0.0698	1	44	2.6	1		R.RAYDIPPPPVDISDPR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 187	1991.8138	1990.8065	1990.8843	-0.0778	0	154	2.7e-11	1	U	R.FCGWHDADLSGQGITEAK.Q

Figura 3: Identificação de SmPGM de *Schistosoma mansoni* por espectrometria de massas.

Os peptídeos oriundos das proteínas presentes nos spots 1 a 4 foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF-ToF e identificados utilizando o programa Mascot, o qual identificou os peptídeos como sendo da proteína fosfoglicerato mutase (A). Em B estão sendo mostrados os sete peptídeos presentes nos quatro spots, os quais identificam a SmPGM em todos estes spots.

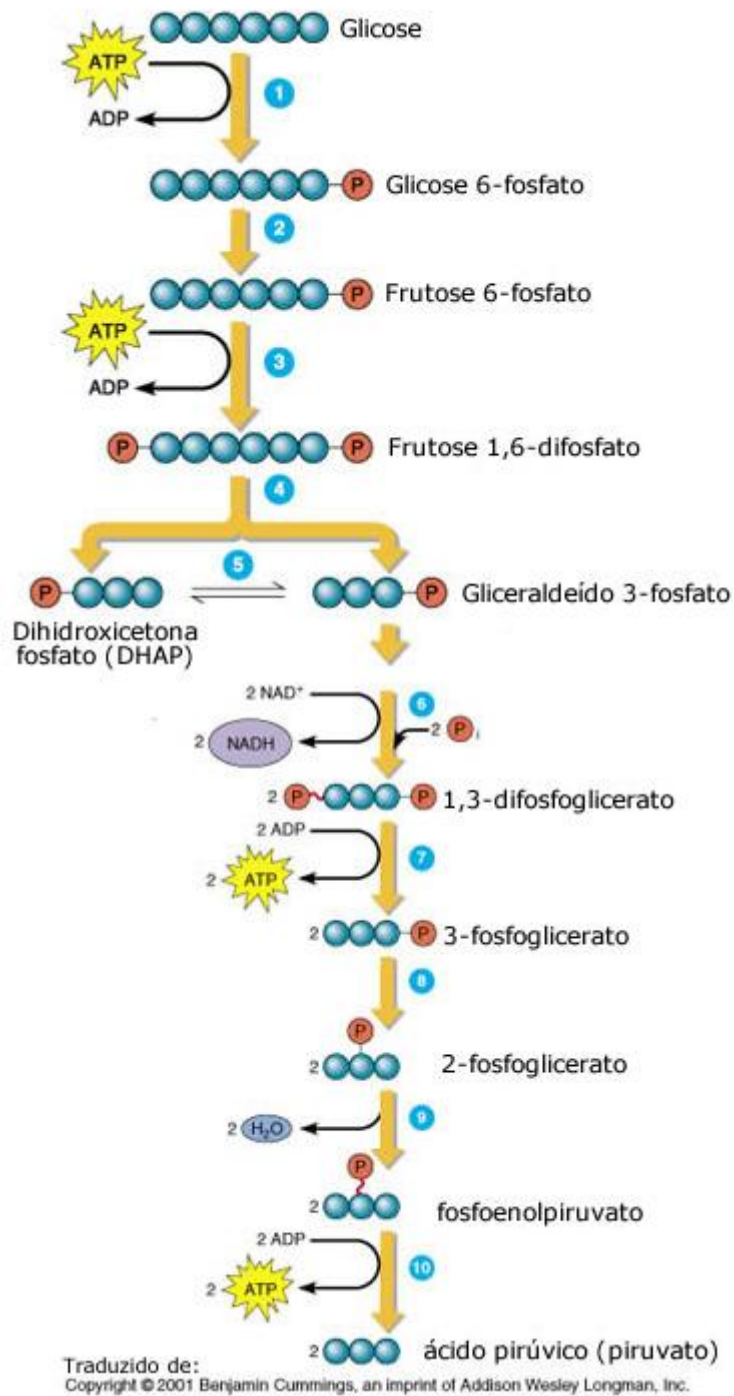


Figura 4: Esquema da via glicolítica ou glicólise.

A enzima fosfoglicerato mutase faz a conversão do 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato (etapa 8).

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo. Mesmo com as tentativas de controle da doença por mais de 100 anos e a introdução da droga praziquantel para o tratamento da esquistossomose em 1980, a doença persiste (King, 2009). O praziquantel fez da quimioterapia uma tentativa de controle da doença, porém ela não previne a reinfecção (Carabin *et al.*, 2000). Esta continua em praticamente todas as áreas endêmicas conhecidas, mesmo após o tratamento em massa. Esta alta taxa de reinfecção somada à notificação de novos casos de transmissão limita o sucesso destas estratégias baseadas apenas na quimioterapia (Katz, 1998).

Embora alguns antígenos potencialmente candidatos à vacina para a esquistossomose tenham sido sugeridos, até o momento nenhum apresentou um nível de proteção efetivo, incluindo os selecionados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O antígeno Sm14 alcançou até 67,9% de proteção em camundongos. Porém a estabilidade da proteína recombinante foi questionada (Oliveira, 2008).

Uma abordagem promissora envolve o uso das ferramentas aplicadas em estudos de proteoma, que podem agora ser exploradas na tentativa de caracterizar o proteoma completo do *S. mansoni*. Além disso, o sequenciamento do genoma de *S. mansoni* (Berriman *et al.*, 2009) e do seu transcriptoma (Protasio *et al.*, 2012) contribuíram para aumentar a possibilidade de identificar novos alvos candidatos à vacina contra esquistossomose, especialmente as proteínas secretadas ou expostas na superfície de esquistossômulos e vermes adultos (Wilson e Coulson, 2006).

A partir de experimentos de imunoproteoma realizados pelo nosso grupo (Ludolf *et al.*, 2014), a proteína fosfoglicerato mutase (SmPGM) foi selecionada para ser avaliada como potencial antígeno imunoprotetor contra a esquistossomose, uma vez que a mesma foi reconhecida também pelo soro de indivíduos não infectados de área endêmica. Esta seleção foi feita também pelo fato da proteína ainda não ter sido caracterizada em *S. mansoni*, não ter sido testada até o momento como antígeno vacinal, ser uma entre as 2,9% das proteínas preditas do genoma de *S. mansoni* que mais possuem peptídeos antigênicos para células B e, além disso, por ser uma proteína da via glicolítica, assim como outras já utilizadas como potenciais antígenos vacinais contra esquistossomose. Desse modo, nós avaliamos a capacidade da SmPGM, na forma de vacina de DNA, em induzir uma resposta imune protetora em camundongos imunizados e desafiados.

Todas as proteínas antigênicas de vermes adultos de *S. mansoni* identificadas até então pelo nosso grupo são proteínas de localização intracelular. No entanto, acreditamos que é

também interessante identificar e selecionar proteínas de membrana, principalmente do tegumento do parasito *S. mansoni*, uma vez que estas proteínas estão em contato direto com o sistema imune do hospedeiro. Para isso, no atual trabalho, obtivemos um extrato proteico de vermes adultos de *S. mansoni* enriquecido com proteínas de membranas. Este extrato proteico também foi utilizado em experimentos de eletroforese e *Western-blotting* bidimensionais com as mesmas amostras de soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose citadas por Ludolf e colaboradores (2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial imunoprotetor da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* e identificar novos alvos para teste de diagnóstico e vacina contra esquistossomose

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar análises de bioinformática das sequências nucleotídicas e de aminoácidos da enzima fosfoglicerato mutase de *S. mansoni*, bem como a sua análise funcional;
- Amplificar e inserir a região codificadora do gene da fosfoglicerato mutase de *S. mansoni* em vetor plasmidiano para expressão heteróloga da proteína em células de mamífero e avaliar a sua expressão através de ensaios de transfecção de células em cultura;
- Realizar os testes de imunização de camundongos com vacina de DNA e com peptídeos da fosfoglicerato mutase de *S. mansoni* para avaliar a sua capacidade de induzir imunidade protetora em animais desafiados;
- Avaliar o perfil de resposta imune humoral e celular induzidas pela imunização gênica;
- Obter extratos enriquecidos com proteínas de membranas celulares a partir de vermes adultos de *S. mansoni* e utilizá-los em experimentos de *Western blotting* bidimensional utilizando soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose;
- Selecionar as proteínas antigênicas reconhecidas pelas diferentes amostras de soro utilizadas e identificá-las por espectrometria de massas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico* da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni*

Para descrever as características da sequência de DNA codificadora de *SmPGM* e da sequência de aminoácidos da proteína *SmPGM* foram utilizados alguns programas de bioinformática, tais como: *ClustalW* (<http://www.clustal.org/clustal2>), o qual é utilizado para realizar o alinhamento de duas ou mais sequências de DNA ou de aminoácidos; *BepiPred* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), que é um preditor de epitopos localizados em células B utilizando uma combinação do modelo oculto de Markov e um método de escala de propensão; *Rankpep* (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>), o qual é um servidor que prevê ligantes de peptídeos para moléculas MHC I e MHC II de sequência de proteína. Neste preditor, os parâmetros padrão do programa foram utilizados. Também foram utilizados os programas: *The Protein Model Portal (PSI)* (<http://www.proteinmodelportal.org/>), o qual prevê o modelo da estrutura terciária de uma proteína através de sua sequência a partir de uma estrutura de outra proteína semelhante já cristalizada; *BLASTP* e *DELTA-BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), os quais permitem a obtenção do nível de similaridade entre sequências de proteínas. Além disso, possibilitam a identificação de domínios proteicos conservados. No *BCPreds* (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpreds/data.html>), o qual é um preditor de epitopos de células B usando propriedades físico-químicas, os parâmetros utilizados foram: comprimento do epitopo (15 e 16 aminoácidos), 75% de especificidade e usou-se o filtro de *overlap*. O programa *EMBOSS Antigenic* (<http://embooss.bioinformatics.nl/cgi-bin/embooss/antigenic>) prediz as regiões potencialmente antigênicas de uma determinada sequência de aminoácidos baseado no método de Kolaskar e Tongaonkar. O *Psipred* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) é um programa que utiliza um banco de dados que agrega vários métodos de predição com alta acurácia de estruturas secundárias de proteínas. O programa *SherLoc* (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc>) e o *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) predizem a localização celular de proteínas eucarióticas

4.2 Material biológico: camundongos e parasitos

O ciclo de vida do parasito *S. mansoni*, pertencente à cepa LE, é mantido no Laboratório de Malacologia do CPqRR-FIOCRUZ/MG onde foram obtidas as cercárias a partir de caramujos *Biomphalaria glabrata*. Estas foram utilizadas para infecção de

camundongos BALB/c, dos quais foram recuperados os vermes adultos por perfusão (Pellegrino e Siqueira, 1956), e também nos experimentos de imunização, onde foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas obtidas do Biotério de Produção do CPqRR. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ (LW-28-13).

4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

Vermes adultos da cepa LE de *S. mansoni* foram utilizados para extração de RNA total utilizando *Trizol Reagent (Invitrogen)*, conforme indicado no manual do fabricante. O RNA extraído foi utilizado para síntese de cDNA com o kit *SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen)* e Oligo dT. Resumidamente, 2µL do RNA total (3,0µg/µL) foram tratados com DNase I (2U/µL) (*Invitrogen*) em uma reação contendo 6µL da enzima, 6µL do tampão 10x e 46µL de água DEPC, para um volume final de 60µL. A reação foi mantida por 15 minutos a temperatura ambiente (TA) e, em seguida, por 10 minutos a 65°C. Foram realizadas duas reações de síntese do cDNA, uma vez que uma delas foi utilizada como controle sem a adição da transcriptase reversa. Foram utilizados em cada reação 1µL de Oligo dT (50µM), 1µL de dNTP (10mM) e 8µL do RNA previamente tratado com DNase. Esta solução foi mantida por 5 minutos a 65°C e, após esse tempo, mantida em gelo. Em seguida, 9µL do mix [RT Buffer 10x; MgCl₂ (25mM), DTT (0,1M) e RNase OUT (40U/µL)] foram adicionados em ambas as reações. Por fim, foi adicionado 1µL da enzima *SuperScript III RT* (200U/µL) em uma das reações e a outra foi adicionada água. Ambas foram mantidas a 50°C por 50 minutos e, decorrido esse tempo, por 5 minutos a 85°C. Posteriormente, foi adicionado 1µL de RNase H em cada reação e estas foram mantidas por 20 minutos a 37°C antes de serem armazenadas a -20°C.

4.4 Amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase

Os iniciadores foram desenhados de acordo com a sequência de DNA encontrada no banco de dados SchistoDB do gene selecionado, *SmPGM* (Smp_096760), e a sequência do vetor plasmidiano escolhido pcDNA 3.1 V5-His B (*Invitrogen*) (figura 5). Especificamente, para amplificar a região codificadora de SmPGM foram desenhados os seguintes iniciadores:

- SmPGM *foward* com sítio de restrição para *HindIII*:
(5' - AAAAGCTTATGGCTCCTTACAGAATTGT - 3')

- SmPGM *reverse* com sítio de restrição para *EcoRI*, mutando o códon de parada de tradução:

(5' - TTGAATTCCATTTCTTTTTTCCCTGGT - 3')

- SmPGM *reverse* com sítio de restrição para *EcoRI*, mantendo o códon de parada de tradução:

(5' - TTGAATTCTCATTTCTTTTTTCCCTGGT - 3').

Além destes iniciadores, também foram desenhados outros dois, que se anelam internamente na sequência codificadora de SmPGM, que foram utilizados para o sequenciamento de DNA dos clones obtidos. Sendo eles:

- SmPGM *foward seq*:

(5' - AAGTATAAAGAGACGCGAACAGG - 3')

- SmPGM *reverse seq*:

(5' - AAGTTCATCAAGGACAAAGTTTA - 3')

Para as reações de RT-PCR foram utilizados os cDNAs obtidos a partir de RNA total de vermes adultos, conforme descrito anteriormente, e o kit *PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen)*. Nestas reações foram utilizados 22,5µL de SuperMix; 1,0µL da reação de síntese de cDNA e 0,75µL de cada iniciador (10pMoles/µL), para um volume total de reação de 25µL. A PCR foi realizada em termociclador sendo 35 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto. Os produtos de amplificação das reações de RT-PCR foram submetidos à análise em géis de agarose 1%.

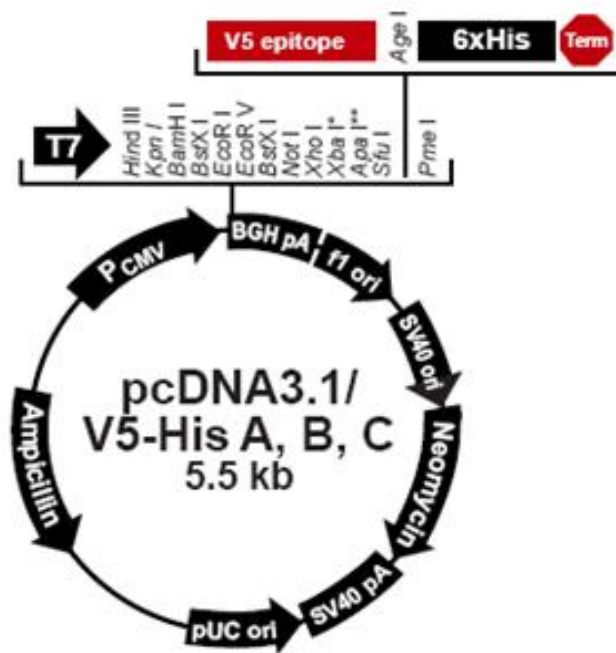


Figura 5: Mapa do vetor pcDNA 3.1/V5-His A, B e C.

Mapa do vetor utilizado pcDNA 3.1/V5-His A, B e C (*Invitrogen*). O mesmo apresenta o epitopo V5 e as 6xHis na porção C-terminal. Além de mostrar os sítios das enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*, os quais foram utilizados para o desenho dos iniciadores.

4.5 Purificação e ligação dos fragmentos de DNA ao vetor de expressão

Após a separação dos produtos de RT-PCR por eletroforese em gel de agarose, os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (*Qiagen*), que se baseia na adsorção de DNA em sílica, conforme instruções do fabricante.

Estes fragmentos, que correspondem à região codificadora de SmPGM, foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e foram novamente purificados para serem inseridos no vetor plasmidiano pcDNA 3.1/V5-His B (*Invitrogen*), previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição.

As reações de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foram realizadas com o *Quick Ligation Kit* (*New EnglandBioLabs*) utilizando 1µL de vetor, 7µL de cada inserto, 1µL da enzima *Quick T4 DNA Ligase*, 10µL do Tampão 2X e 1µL de água para um volume final de 20µL. As reações foram mantidas a 16°C por aproximadamente 16 horas.

4.6 Transformação de bactérias *Escherichia coli*

Parte das reações de ligação entre os fragmentos que contêm a região codificadora de SmPGM e o vetor pcDNA 3.1/V5-His B foi utilizada para transformação de bactérias *Escherichia coli* cepa Top 10 quimicamente competentes, por choque térmico. Após crescimento e seleção em placas contendo meio LB e ampicilina (100µg/mL), colônias de bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas em 5mL de meio LB com ampicilina (100µg/mL) em agitador orbital a 300 r.p.m, 37°C por 16 horas. As mesmas foram utilizadas para extração de DNA plasmidiano com kit *Qiaprep spin miniprep (QIAGEN)*, de acordo com as instruções do fabricante.

A identificação dos clones positivos obtidos foi realizada através de digestão do DNA plasmidiano com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e análise em gel de agarose 1%. Posteriormente, os clones positivos selecionados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA.

4.7 Sequenciamento de DNA dos clones positivos

Clones obtidos relativos a cada uma das duas construção de *SmPGM* em pcDNA 3.1/V5-His B, com e sem o códon que permitem a expressão da proteína em fusão às 6xHis C-terminais, foram submetidos ao sequenciamento de DNA utilizando o sequenciador automático MegaBace 1000 (*Amersham Biosciences*) do Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do ICB-UFMG e da Plataforma de Sequenciamento (RPT01E) do CPqRR. Para isso foram utilizados os iniciadores já descritos anteriormente, bem como os iniciadores BGH e T7, que se anelam na sequência do vetor pcDNA 3.1/V5-His B.

As quantidades de DNA utilizadas nas reações de sequenciamento foram 250ng ou 300ng. Em cada um dos 96 poços da placa de sequenciamento foram utilizados 4µL de *DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)*, 1µL de cada iniciador (10pMols/µL), o volume correspondente de DNA e água suficiente para 10µL.

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* (1994) do *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.7.1).

4.8 Expressão e análise de proteínas recombinantes em células HEK 293T

4.8.1 Transfecção transiente de células HEK 293T por lipossomos

Para verificar a expressão da proteína SmPGM em células de mamífero foi utilizada a linhagem HEK 293T, derivada de células de rim de embrião humano, previamente cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM (*GIBCO, Invitrogen*), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e com 1% antibióticos penicilina/estreptomicina, a 37°C em 5% de CO₂. A transfecção foi realizada por meio da técnica de lipofecção (transfecção por lipossomos) com o uso de *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*) e com o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His B contendo a região codificadora do gene de SmPGM de *S. mansoni* referentes aos clones positivos obtidos com ambas as construções realizadas. Foi utilizado como controle positivo da transfecção o plasmídeo pcDNA3-RFP, que contém o gene repórter codificador da *Red Fluorescent Protein* (RFP - Proteína vermelha fluorescente). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Alexandre Machado (CPqRR-Fiocruz). Esta proteína emite luz vermelha quando excitada por luz ultravioleta que pode ser observada em microscopia de fluorescência. Foi utilizado o microscópio de fluorescência AXIO – Observer.A1 (Zeiss), com câmera integrada AxioCam MRc, do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração/CPqRR.

Como controle negativo do experimento foi utilizado o plasmídeo pcDNA3.1/ V5-His B vazio, ou seja, sem inserto, assim como células não transfectadas que foram mantidas na presença e ausência de lipofectamina. Em cada poço da placa de cultura de 24 poços foram inoculadas $1,5 \times 10^5$ células em 500 µL de meio DMEM com 10% SFB e sem antibióticos. Esta placa foi incubada à 37°C e 5% de CO₂ por cerca de 24 horas, de forma que no momento da transfecção houvesse uma confluência de aproximadamente 80%.

Cada amostra de DNA e a lipofectamina foram separadamente diluídos em meio DMEM, sendo utilizado 0,8µg de DNA em 50µL de meio de cultura e 2µL de lipofectamina em 50µL de meio de cultura para cada poço. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a lipofectamina diluída foi misturada a cada uma das amostras de DNA. Esta mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, permitindo a formação dos complexos DNA-lipossomo. Decorrido esse tempo, cada mistura foi adicionada aos respectivos poços da placa de cultura (figura 6), sendo esta mantida por aproximadamente 5 horas a 37°C em 5% CO₂. As células haviam sido previamente lavadas para retirada do SFB e adição apenas de meio DMEM. Após as 5 horas de incubação, foi realizada uma nova lavagem das células, sendo adicionado meio DMEM sem antibiótico e contendo 10% SFB. A

placa foi então incubada por cerca de 48 horas a 37°C em 5% CO₂. O experimento foi realizado utilizando todas as amostras em duplicata, como é possível observar na figura 6 que mostra o mapa da placa utilizado no experimento, evidenciando os plasmídeos utilizados em cada poço.

Após 48 horas, as células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-RFP foram analisadas em microscópio de fluorescência para verificação da expressão do gene repórter (RFP). As demais culturas transfectadas foram submetidas à lise para extração de proteínas.

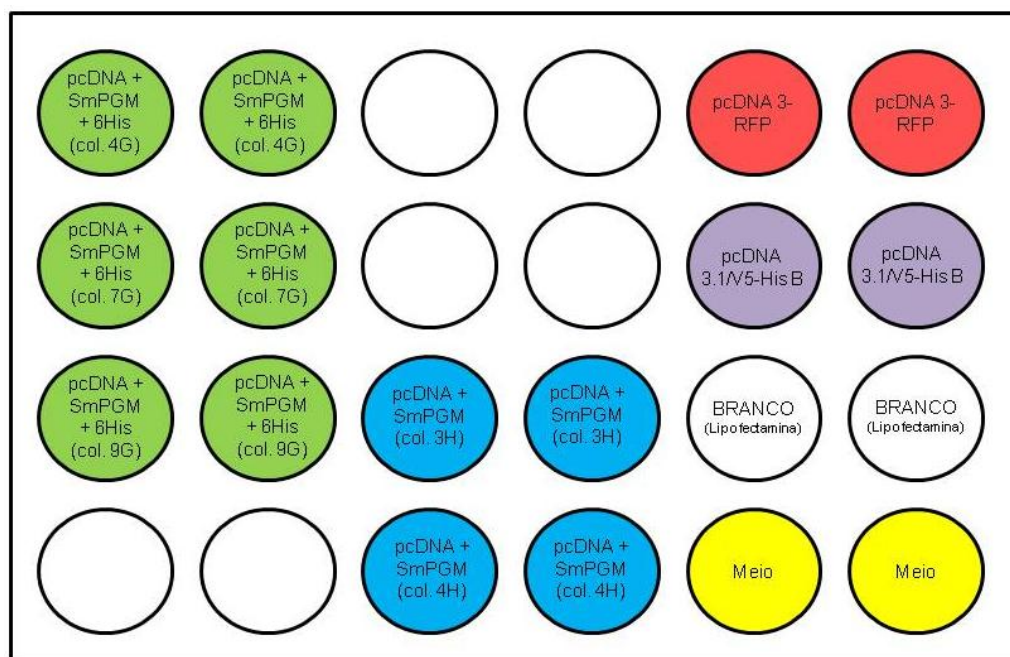


Figura 6: Mapa da placa do experimento de transfecção em células HEK293T.

Em verde, estão os três clones positivos obtidos em pcDNA3.1/V5-His B contendo a região codificadora de SmPGM com o códon de parada mutado, permitindo a expressão das 6xHis C-terminais e, em azul, os dois clones positivos obtidos em pcDNA3.1/V5-His B contendo a região codificadora de SmPGM com o códon de parada original. Em vermelho, estão os plasmídeos pcDNA3-RFP e, em roxo, apenas o pcDNA3.1/V5-His B. Também foi utilizado o controle sem DNA, das células incubadas apenas com lipofectamina (em branco) e, em amarelo, apenas as células com o meio de cultura. Todos em duplicata.

4.8.2 Extração de proteínas a partir da lise das células HEK 293T transfectadas

Dois dias (48 horas) após a transfecção, as células transfectadas foram lavadas com 1mL de PBS gelado. A placa de cultura foi visualizada em microscópio invertido trinocular (OLYMPUS - CK2, ULWCD 0.30) para certificar que as células não haviam sido removidas com a lavagem. Em seguida, estas foram lisadas em 100µL de tampão Laemmli 2X [4% SDS (p/v), 20% glicerol (v/v), 10% β-mercaptoetanol (v/v), 0,004% azul de bromofenol (p/v) e 0,125M Tris HCl, pH 6,8 - BioRad] acrescido de β-mercaptoetanol (950µL do tampão Laemmli 2X + 50µL de β-mercaptoetanol). Os extratos de células foram recolhidos em tubos

de 1,5mL e estes foram mantidos no gelo. Os poços foram lavados com 50µL adicionais do tampão Laemmli 2X e esta solução foi posteriormente adicionada aos tubos descritos anteriormente. Em seguida, as amostras foram fervidas a aproximadamente 100°C por 5 minutos para desnaturação das proteínas e inativação de proteases. Em seguida, as mesmas foram brevemente centrifugadas a 14.000 g e armazenadas a -70°C. A qualidade dos extratos proteicos obtidos foi avaliada por SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie R-250, utilizando 10µl de cada amostra.

4.9 Análise da expressão de SmPGM pelas células HEK 293T por *Western blotting*

Foram utilizados 15µL dos extratos proteicos das células transfectadas e controles, já em tampão de amostra, e 10µL da porção C-terminal da proteína recombinante Sm200 de *S. mansoni* (rSm200) compreendida entre os aminoácidos 1069-1520 em fusão com 6xHis, gentilmente cedida pela Dra. Cristina Toscano/FIOCRUZ, para eletroforese seguida de transferência de proteínas para membrana *Imuno-Blot* PVDF 0,2µm (*BioRad*), utilizando-se o sistema de transferência mini *Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (*BioRad*). Após a transferência, a membrana foi bloqueada por aproximadamente 16 horas em TBS-T/BSA 3% [TBS: 20Mm Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5; Tween-20 0,1% (v/v); BSA 3% (p/v)] sob leve agitação à temperatura ambiente. Após lavagem rápida com TBS 1X, a membrana foi incubada por 3 horas com anticorpo anti-6xHis conjugado a HRP (*Horseshoe Peroxidase*) (*Invitrogen*), diluído 1:5000 em TBS-T/BSA 1%. Em seguida, a membrana foi submetida a 2 ciclos de lavagem de 15 minutos cada com TBS-T e a um ciclo de lavagem, também de 15 minutos, com TBS 1X. A reação foi revelada utilizando *ECL Plus Western blotting Detection System* (*GE-Healthcare*) e a imagem foi capturada em *ImageQuant LAS 4000* (*GE-Healthcare*) pelo método quimioluminescente.

4.10 Imunização de camundongos com vacina de DNA

A construção do plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B que contém a região codificadora de *SmPGM* com o códon de parada de tradução (clone 3H) foi utilizada em testes de imunização através de vacinação de DNA em camundongos para avaliar o nível de proteção alcançado após o desafio. Para isso foi obtido o DNA plasmidiano referente ao clone 3H em larga escala com o Kit *EndoFree Plasmid Giga* (*QIAGEN*), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA plasmidiano foi dosado em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* e diluído para a concentração final de 1µg/µl.

Para cada ensaio de imunização com DNA, 30 camundongos C57BL/6 fêmeas foram divididos em três grupos: o grupo 1 era composto de 10 camundongos que foram imunizados com quatro doses da construção de DNA que contém a região codificadora de SmPGM com o códon de parada de tradução (pcDNA-*SmPGM*), com intervalo de 15 dias entre cada dose. O grupo 2 era composto de 10 camundongos que foram imunizados com 4 doses do plasmídeo vazio (pcDNA). O grupo 3 era composto de 10 camundongos que não foram imunizados e que serviram de controle da infecção. Cinco dias antes da primeira imunização, os camundongos receberam 100µL/animal de cardiotoxina (0,06mg/mL) no músculo da coxa para o recrutamento de células inflamatórias. Os camundongos foram inoculados, por via intramuscular, com uma solução contendo 100µg de DNA plasmidiano purificado, sendo 50µg em cada coxa. Quinze dias após a última dose, os camundongos foram infectados por exposição percutânea da pele do abdômen por 1 hora em água contendo 100 cercárias da cepa LE. Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para realização da perfusão do sistema porta hepático e contagem do número de vermes adultos recuperados. Destes camundongos também foram extraídos fígado e intestino que foram utilizados em ensaios histopatológicos e imunológicos. A cada quinze dias a partir do início das imunizações até o final do experimento, foram coletados aproximadamente 160µl de sangue do plexo retro-orbital dos camundongos de cada grupo para a obtenção do soro mantido a -20°C até ser utilizado (figura 7). Foram realizados dois experimentos independentes.

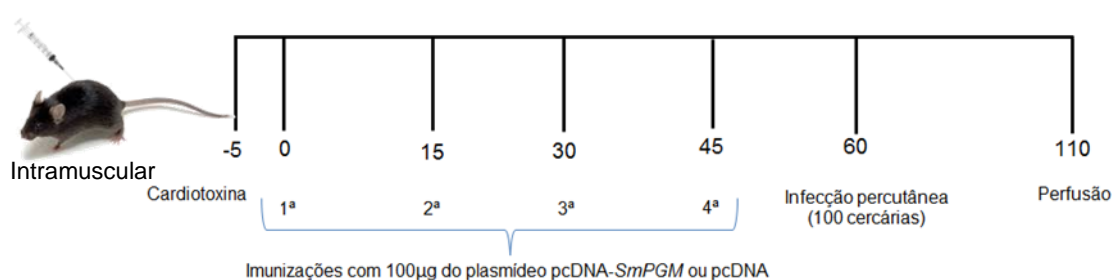


Figura 7: Protocolo de imunização com vacina de DNA.

Cinco dias antes da primeira imunização, os camundongos foram injetados com cardiotoxina. A primeira dose da imunização composta por 100µg de DNA plasmidiano foi realizada no dia 0, a segunda, a terceira e a quarta doses foram realizadas com um intervalo de quinze dias a partir da primeira dose. Quinze dias após a quarta dose, foi realizada a infecção percutânea utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo e, cinquenta dias após a infecção, foi realizada a perfusão do sistema porta hepático.

4.11 Recuperação de vermes adultos

Cinquenta dias após o desafio de camundongos imunizados e controle, vermes adultos foram recuperados do sistema porta-hepático por perfusão das veias mesentéricas (Pellegrino *et al.*, 1956). Os níveis de proteção foram calculados comparando a média do número de vermes recuperados no grupo experimental em relação ao grupo controle, diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas através do programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

4.12 Contagem do número de ovos retidos no intestino e no fígado

Durante a perfusão, o fígado e o intestino de cada camundongo foram retirados. Esses órgãos foram pesados, acondicionados em béqueres com KOH 10% onde foram mantidos por cerca de 16 horas. Em seguida a solução foi incubada à 37°C por 30 minutos em banho-maria. Os órgãos digeridos foram centrifugados por 5 minutos a 900 g e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado com salina 0,85%. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Depois da última centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de salina 0,85% e o número de ovos presentes em uma amostra de 10µL da solução foi contado em microscopia de luz. Foram realizadas três contagens para cada amostra.

4.13 Avaliação da fecundidade de fêmeas

A fecundidade das fêmeas de vermes adultos de *S. mansoni* após a imunização foi avaliada a partir do número total de ovos retidos no fígado e intestino, dividido pelo peso total de tecido e ainda pelo número total de vermes fêmeas recuperadas por camundongo.

4.14 Exame Parasitológico HPJ (Hoffman, Pons e Janner)

Três amostras de fezes frescas coletadas nos dias 48, 49 e 50 pós-infecção (0,5g de fezes por grupo) foram colocadas em um cálice contendo água desclorada e formol 10%. As fezes foram trituradas com o auxílio de um bastonete de alumínio e filtradas em uma gaze dobrada quatro vezes. A suspensão de fezes foi deixada no cálice com água desclorada e formol 10% por uma hora para sedimentação espontânea dos ovos. Após este período, o sobrenadante foi descartado e uma nova etapa de sedimentação espontânea foi realizada. Todo

o sedimento contendo os ovos foi avaliado em microscópio óptico para determinação do número de ovos por grama de fezes.

4.15 Avaliação da imunidade humoral induzida pelas formulações vacinais

A análise dos níveis de anticorpo IgG total anti-SmPGM foi realizada pelo método de ELISA. Placas de microensaio de 96 poços (*Nunc*) foram sensibilizadas com 1µg/mL dos peptídeos sintéticos SmPGM 228-242 e SmPGM 116-130, separadamente, em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 por 12 a 16 horas à 4°C. Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas com PBST₂₀ (Tampão fosfato, pH 7,2, e Tween 20 0,05%) e então bloqueadas por 2 horas a 4°C com 300µl por poço de PBST₂₀ (Tampão fosfato, pH 7,2, e Tween 20 0,05%) acrescentado de SFB 10% (soro fetal bovino). Após nova etapa de lavagem, 100µL de cada amostra de soro diluído 1:50 em PBST₂₀ foram adicionados por poço em duplicata e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. 100µL por poço de anti-IgG de camundongo (*Southern Biotech*) conjugado à peroxidase, diluído 1:10.000 em PBST₂₀, foram adicionados aos poços após as placas terem sido novamente lavadas com PBST₂₀ (Tampão fosfato, pH 7,2, e Tween 20 0,05%). A reação colorimétrica foi desenvolvida pela adição de 100µL/poço do substrato TMB (Tetramethylbenzidine) e parada com 50µL/poço de ácido sulfúrico 5%. A absorbância foi medida a 450nm em um leitor de microplacas.

4.16 Avaliação da imunidade celular induzida pelas formulações vacinais

Camundongos (cinco por grupo) foram submetidos ao protocolo de imunização com as construções pcDNA e pcDNA-*SmPGM* descrito anteriormente e uma semana após a última dose, os animais foram eutanasiados para retirada do baço. Este órgão foi macerado, as hemácias foram lisadas e os esplenócitos foram lavados com salina e ajustados para 1x10⁶ células por poço. Para a análise de produção de citocinas, os esplenócitos foram mantidos em cultura a 37°C, 5% CO₂ apenas em meio RPMI ou estimulados com os peptídeos sintéticos SmPGM 228-242 (10µg/poço), SmPGM 116-130(10µg/poço) ou com o mitógeno Concanavalina A (1µg/poço). O sobrenadante das culturas foi coletado 24 horas após a estimulação para quantificação das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-5 utilizando o kit *BD Cytometric Bead Array CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine*, conforme instruções do fabricante. A análise dos dados foi realizada utilizando o software específico *BD CBA Analysis Software*, através da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões de

citocinas do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI).

Para dosagem de citocinas intracitoplasmáticas, 5×10^5 esplenócitos foram mantidos em cultura por 18 horas a 37°C e 5% CO₂ apenas em meio RPMI ou estimulados com os peptídeos sintéticos SmPGM 228-242 (10µg/poço), SmPGM 116-130 (10µg/poço) ou com o mitógeno (Cona-1µg/poço). A secreção de citocinas foi interrompida pela adição de brefeldina A (1µg/mL) às culturas nas últimas 4 horas. Após este período as células foram centrifugadas e os receptores Fc foram bloqueados pela adição de anticorpo anti-CD16/CD32 de camundongo (*BD-bioscience*). As células foram então lavadas com PBS 0,15 M, BSA 0,5%, NaN₃ 2mM, centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos e marcadas com anticorpo anti-CD4 de camundongo conjugado a FITC ou anti-CD8 de camundongo conjugado a Percp e seus controles de isotipo por 15 minutos à 4°C. Após marcação de superfície, as células foram lavadas, fixadas com formaldeído 2% por 30 minutos à temperatura ambiente e permeabilizadas com uma solução de saponina 0,5% por 10 minutos à temperatura ambiente. Após permeabilização da membrana plasmática, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ conjugado a e-Fluor450, anti-IL10 conjugado a APC e anti-IL4 conjugado a PE e seus controles de isotipo por 30 minutos à temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, as células foram fixadas e a aquisição dos dados (30000 eventos dentro do *gate* de linfócitos) foi realizada no citômetro LSRfortessa (Becton Dickinson, San José, CA). Os dados foram analisados usando o software *FlowJo* (Tree star, Ashland).

Para o ensaio de marcação *ex vivo*, para detecção de células T ativadas e de memória, células do baço provenientes de quatro camundongos/grupo foram ajustadas para 5×10^5 células por poço. Antes da marcação, os receptores Fc gama destas células foram bloqueadas com anti-mouse CD16/CD32 mAbs (*Fc-Block*, *BD bioscience*). A superfície dessas células foi marcada com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD4 conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a Percp anti-CD25 conjugado a Biotina, anti-CD44 conjugado a Pacific Blue, anti-CD62L conjugado a Alexa-700, anti-CD127 conjugado a Pe-Cy7 e seus respectivos controles de isotipo através de incubação por 20 minutos a 4°C. Após este tempo as células foram lavadas com PBS 0,15 M, BSA 0,5%, NaN₃ 2mM e submetidas a incubação com uma solução de estreptavidina, diluída em uma solução de 50% de *wash A* (*Dulbeccos Phosphate Buffered Saline*) e 50% de *wash B* (*wash A*, azida sódica e BSA), conjugada a APC-Cy7 na diluição 1:200 a 4°C por 20 minutos. As células foram, então, lavadas e fixadas em solução de formaldeído 2%. A aquisição dos dados foi obtida utilizando LSRfortessa (Becton Dickinson, San José, CA) e os dados foram analisados usando o software *FlowJo* (Tree star, Ashland).

4.17 Área e número de granulomas hepáticos

Seções do fígado de cada camundongo dos grupos controle e experimental, coletadas 50 dias após a infecção, foram analisadas quanto ao número e tamanho dos granulomas para avaliar os efeitos da imunização na formação dos mesmos. Os fragmentos do fígado foram fixados em formol 10%. Cortes histológicos foram feitos com o auxílio de um micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Imagens dos granulomas foram capturadas através de uma câmera acoplada em um microscópio e analisadas no software KS300 do Laboratório de Patologia do ICB -UFMG. Para realizar as medidas da área dos granulomas, imagens de 100 granulomas/grupo que se encontravam no estágio exudativo-produtivo e que continham apenas um ovo com miracídio vivo foram capturadas utilizando o microscópio com objetiva de 10X através da microcâmera JVC TK-1270/RGB. Utilizando um cursor digital, a circunferência total do granuloma foi delimitada e, posteriormente, analisada no software KS300. Os resultados foram expressos em μm^2 . Para determinar o número de granulomas por área, o número total de granulomas por lâmina foi contado em microscópio com objetiva de 10X. Todas as lâminas foram escaneadas e a área de corte foi determinada utilizando o software KS300. Os resultados foram expressos em número de granulomas/ mm^2 .

4.18 Protocolo de imunização com peptídeos sintéticos da proteína SmPGM

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram divididos em grupos de 10 camundongos cada. Um grupo controle não imunizado foi utilizado para avaliar a eficiência da infecção. No outro grupo controle, os camundongos foram inoculados com salina e adjuvante. O grupo experimental consistiu de camundongos imunizados simultaneamente com 10 μg de cada peptídeo (peptídeo SmPGM 228-242: YYLADEATVAAAIAR e peptídeo SmPGM 116-130: RRAYDIPPPPVDISD) diluídos em salina na presença de adjuvante [*Freund* completo (1^a dose) ou incompleto (2^a e 3^a doses)]. A imunização foi realizada por via subcutânea, em três doses com intervalos de 15 dias entre elas. Quinze dias após a terceira dose, os camundongos foram infectados com 100 cercárias por via percutânea, como descrito anteriormente para os experimentos de vacinação com DNA. Após 50 dias, os animais foram eutanasiados e perfundidos pela veia porta (Pellegrino *et al.*, 1956). O fígado e o intestino de cada animal foram retirados para determinação do número de ovos do parasito retidos nestes órgãos. Amostras de sangue foram coletadas a cada 15 dias pelo plexo retro-orbital dos camundongos para obtenção do soro a partir de 15 dias após a primeira dose da vacina. A figura 8 ilustra o

esquema deste protocolo de imunização com peptídeos sintéticos de SmPGM. Foram realizados dois experimentos independentes.

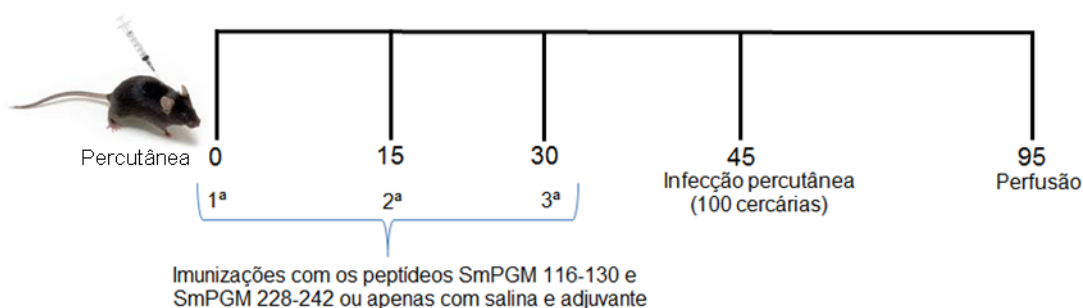


Figura 8: Protocolo de imunização com peptídeos sintéticos de SmPGM.

A primeira dose da imunização com 10µg de cada peptídeo foi realizada no dia 0, a segunda e a terceira doses foram realizadas com um intervalo de 15 dias. Quinze dias após a terceira dose, foi realizada a infecção percutânea utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo e, cinquenta dias após a infecção foi realizada a perfusão do sistema porta hepático.

4.19 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPadPrism* 3.03 (San Diego, Ca, USA). Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste *t* de student foi empregado quando comparadas somente duas variáveis.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste Mann-Whitney foi empregado quando comparadas somente duas variáveis. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$.

4.20 Extração de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea com aproximadamente 100 cercárias. A perfusão foi realizada após 45 dias da infecção, segundo Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes foram lavados três vezes em meio RPMI acrescido do coquetel de inibidores de proteases *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche). O excesso de meio de cultura foi retirado e os vermes adultos foram utilizados imediatamente ou foram

congelados rapidamente em nitrogênio líquido e, então, armazenados a -70°C até serem utilizados.

Para extração de proteínas da fração insolúvel do parasito foi utilizado o *2D Fractionation* kit (*GE Healthcare*). Os parasitos foram ressuspensos em tampão de lise do kit, contendo inibidores de protease e nucleases (RNAse e DNAse), na proporção de 100mg de vermes para 700 μL do tampão. Em seguida os mesmos foram lisados com auxílio de um pistilo e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos para ação das nucleases. Após centrifugação a 20000 g, 30 minutos a 4°C , o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi descartado. O *pellet* foi ressuspensado em metade do volume inicial de tampão de lise e sonificado uma vez a 4°C , por 30 segundos a uma frequência de 50/60 Hz. Em seguida, a solução foi novamente centrifugada a 20000 g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi também descartado. O *pellet* foi novamente ressuspensado em 0,5mL de tampão de lise e levado ao vórtex por 60 segundos. Em seguida, houve uma centrifugação a 20000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido e descartado. O *pellet* contendo as proteínas da fração de proteínas insolúveis foi ressuspensado em 0,4mL de tampão de solubilização do kit e levado ao vórtex 4 a 5 vezes por 60 segundos cada, para solubilizar as proteínas. Em seguida, foi feita a centrifugação a 20000 g, 15°C por 15 minutos e o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi recolhido. O *pellet* foi novamente ressuspensado em 0,1mL de tampão de solubilização e a centrifugação foi repetida. O sobrenadante foi coletado e reunido com o sobrenadante da última centrifugação. Desta forma foi possível obter uma fração enriquecida de proteínas de membranas celulares do verme. Após a extração, as proteínas foram dialisadas contra uma solução contendo Tris 20mM, Tiouréia 2M e Uréia 8M utilizando o sistema de Mini Dialysis Kit (*GE Healthcare*) com poro de 1kDa. Em seguida a concentração de proteínas foi dosada pelo método de Bradford e armazenadas a -70°C . A qualidade dos extratos proteicos obtidos foi avaliada por SDS-PAGE 12.5%, como descrito por Ausubel e colaboradores (1995).

4.21 Eletroforese bidimensional (2DE)

As proteínas foram separadas por 2DE de acordo com as condições determinadas por Curwen e colaboradores (2004), com algumas modificações. Na primeira dimensão, foi feita a focalização isoeétrica das proteínas diluídas em tampão IEF (8M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% azul de bromofenol, 10mg/mL DTT e anfólitos 1X). Foram utilizadas fitas de IPG (*Immobilized pH Gradient*) de 7cm com uma faixa de pH 3-10. As amostras foram aplicadas nas fitas de IPG através de rehidratação do gel. A focalização isoeétrica foi feita no

equipamento PROTEAN IEF Cell (*BioRad*) a 20°C, 50µA/fita. A rehidratação passiva foi realizada por 4 horas, seguida da rehidratação ativa a 50 V por 12 horas e focalização isoeétrica a 500V por 30 minutos, seguida de 1.000V por 30 min, 4.000V por 1 hora e 4.000V até 16,000V/h. Após o término da focalização isoeétrica, as fitas foram congeladas a -70°C, ou utilizadas imediatamente para separação das proteínas por SDS-PAGE.

Antes da separação das proteínas pela segunda dimensão, as fitas de IPG foram submetidas às etapas de equilíbrio (redução e alquilação das proteínas). As fitas foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação, em tampão de equilíbrio [6M Uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 50mM solução de Tris-HCl (pH 8,8) e 0,001% azul de bromofenol] contendo DTT 130mM, e, em seguida, por mais 15 minutos no mesmo tampão contendo iodoacetamida 13mM. A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) foi realizada utilizando o sistema *Mini-PROTEAN 3* (*BioRad*).

4.22 Western blotting bidimensional (2D-WB)

As proteínas de vermes adultos de *S. mansoni*, extraídas conforme descrito anteriormente, foram submetidas à 2DE, seguida pela transferência para membranas de PVDF. Estas membranas foram incubadas por aproximadamente 16 hs a TA, em tampão de bloqueio (TBS, BSA 5% e Tween-20 0,1%) e, em seguida, incubadas por 2 hs em TA com os seguintes soros diluídos (1:500) em TBST-BSA1%: soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica e soro de indivíduos negativos ou não infectados de área não endêmica para esquistossomose, separadamente. As amostras de soro utilizadas foram as mesmas descritas por Ludolf e colaboradores (2014), as quais foram obtidas de indivíduos moradores de Virgem das Graças (município de Ponto Volante). Este município é uma área rural de extrema pobreza, hiperendêmica para a esquistossomose, localizada no Vale Jequitinhonha, Norte do Estado de Minas Gerais. Estas amostras de soro foram coletadas pelo grupo do Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) e da Dra. Andréa Gazzinelli (UFMG). O termo de consentimento livre e informado foi assinado no momento da coleta do material (Pereira, 2006). As amostras utilizadas foram selecionadas para a realização deste trabalho obedecendo aos seguintes critérios: pertencer a indivíduos não infectados por outros helmintos (*Ascaris lumbricoides*, ancilostomídeos e *Trichuris trichiura*), de idade entre 20-50 anos, homem ou mulher não grávida. Os indivíduos nos quais foram encontrados ovos de *S. mansoni* nas fezes foram denominados infectados (INF), e aqueles nos quais não foram encontrados ovos nas fezes durante os três anos de coleta (2001, 2002 e 2006), foram denominados não infectados de área endêmica (NE).

Todas as amostras de soro utilizadas neste estudo foram coletadas em janeiro de 2001, antes do tratamento em massa com praziquantel. Um total de 13 amostras de soro INF e 9 NE foram obtidas. Soro de indivíduos não infectados de área não endêmica para a esquistossomose foi também utilizado neste estudo, sendo 7 amostras provenientes de voluntários dos Estados Unidos (NI). O atual projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ (CAAE: 1.0.245.000-08).

Após sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas por 2 hs a TA com anticorpo secundário anti-Ig total humana diluído (1:100000) em TBST-BSA1%, conjugado à peroxidase, e em seguida reveladas por quimioluminescência utilizando *ECL plus Western blotting Detection System (GE-Healthcare)*. Os *spots* de interesse foram localizados, com o auxílio do programa PDQuest (*BioRad*), e excisados de um outro gel idêntico aos que foram utilizados para transferência das proteínas, e que foi corado por Azul de Coomassie Coloidal, para que as proteínas fossem identificadas por espectrometria de massas.

4.23 Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Os *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massas foram previamente descorados e submetidos à digestão proteica com tripsina (Ludolf *et al.*, 2014). Os peptídeos obtidos foram extraídos do gel em solução contendo 5% ácido fórmico e 50% acetonitrila, purificados em Zip-Tips C18 e submetidos à análise por espectrometria de massas do tipo MALDI ToF-ToF utilizando um espectrômetro de massas modelo AB Sciex TOF/TOF 5800 System. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, em colaboração com o Dr. André Teixeira e Dr. Jonas Perales, os quais são responsáveis pela Plataforma de Espectrometria de Massas - RJ, PDTIS-FIOCRUZ. Um volume de 0,3µL da amostra de peptídeos purificados foi misturado com 0,3µL de matriz ácido alpha-cyano-4-hydroxycinnamic (20mL/mL na mesma solução). A amostra em matrix foi aplicada à placa de MALDI para a ionização, separação e fragmentação dos peptídeos.

O espectro de massas dos peptídeos gerados pela digestão com tripsina (*mass fingerprinting*) e os dados de fragmentação dos peptídeos foram analisados utilizando o programa MASCOT e o banco de dados do NCBI que contém sequências de proteínas de *Schistosoma* ou um banco de dados particular contendo as proteínas preditas do genoma do *S. mansoni* obtidas do SchistoDB (www.schistodb.net) (Zerlotini *et al.*, 2009).

Os parâmetros utilizados foram: tolerância de peptídeos de ± 50 ppm, tolerância de fragmento de massa MS/MS de $+ 0,4$ Da, carga de peptídeo $+1$ e modificações variáveis em cisteína (carbamidometilação) e em metionina (oxidação). A fim de evitar identificações aleatórias, apenas íons com valor de *score* individual acima do indicado pelo MASCOT para identidade e homologia extensiva foram aceitos ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análises de sequência e análise funcional da proteína fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* por bioinformática

A proteína de *S. mansoni* codificada pelo gene identificado por Smp_096760, a qual foi selecionada nos ensaios de *Western blotting* bidimensional para ser testada como possível alvo vacinal, foi identificada como uma fosfoglicerato mutase devido a sua extensiva homologia com uma proteína ortóloga descrita em *S. japonicum* (ID: CAX76329.1) com a qual possui 94% de identidade (BLASTP), segundo o *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>). Em *S. japonicum*, a presença da proteína fosfoglicerato mutase foi inferida pela detecção do transcrito correspondente (*UniProt*). Smp_096760 possui genes ortólogos em diferentes espécies, inclusive em outros schistosomas, como mencionado acima para *S. japonicum*; em protozoários, como *Plasmodium* e *Toxoplasma*; em bactérias, e até mesmo no homem, mas não foi identificado nenhum parálogo no genoma do *S. mansoni TDR Target* ([www.http://tdrtargets.org/](http://tdrtargets.org/)).

De acordo com os dados disponíveis no banco de dados *GeneDB* (www.genedb.org), o gene correspondente a Smp_096760 possui 14762pb e está localizado no cromossomo 4, na posição 18.655.437 – 18.670.199 do *contig* Smp_scaff000596, sendo constituído por 5 éxons e 4 íntrons. Como inferido pelo número de sequências EST's detectadas, seu transcrito é mais expresso em vermes adultos e cercárias e menos expresso em esquistossômulos (figura 9).

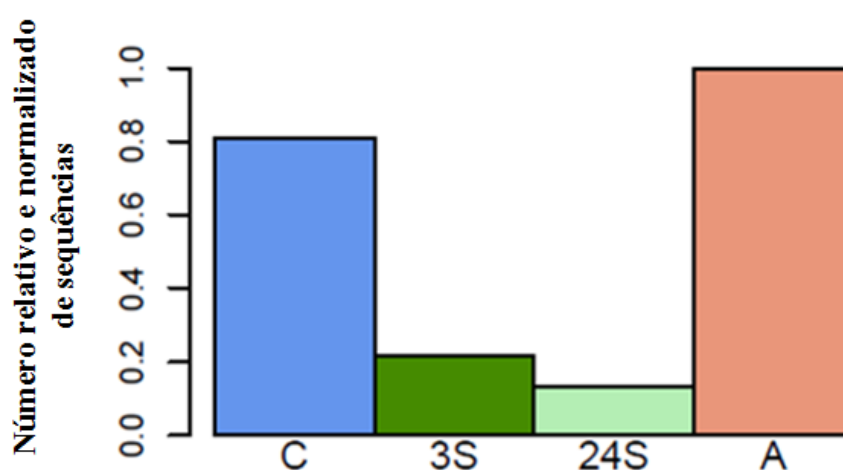


Figura 9: Nível de expressão do transcrito de *SmPGM*.

Nível de expressão do transcrito da *SmPGM* nas diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni* de acordo com o número de EST's detectadas. C: cercárias, 3S: esquistossômulos de 3 horas, 24S: esquistossômulos de 24 horas, A: vermes adultos.

Fonte: GeneDB.

A região codificadora de SmPGM possui 753pb (figura 10A) e codifica uma proteína composta por 250 aminoácidos (figura 10B). A proteína SmPGM apresenta uma massa molecular teórica de 28,4 kDa e ponto isoelétrico teórico 8,3 (GeneDB). Estes valores são próximos aos encontrados experimentalmente no 2D-PAGE para alguns dos *spots* identificados como fosfoglicerato mutase, principalmente os *spots* 3 e 4 mostrados na figura 2.

Ao realizar a busca por domínios proteicos presentes na sequência da proteína codificada pelo gene Smp_096760 usando a base de dados do *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), foi identificado um domínio proteico que caracteriza significativamente proteínas da superfamília Histidina Fosfatase (ramo 1) (His_Phos_1) PF00300, que se localiza entre os aminoácidos 5 e 191. As proteínas desta superfamília possuem um resíduo de histidina no seu centro catalítico, o qual torna-se transitoriamente fosforilado durante a reação que estas enzimas catalisam. Também foi utilizado o programa *Delta-blast*, ferramenta disponível no NCBI para busca de domínios proteicos conservados, que identificou dois domínios específicos de HP_PGM que corresponde ao *Histidina Phosphatase Domain* (His_Phos_1) (figura 11).

A - Fosfoglicerato mutase Smp_096760 (753pb)

ATG GCT CCT TAC AGA ATT GTG TTT ATT CGC CAT GGAG AGAG TGT TTA CAAT GAAG AAA ATCG ATTT
TGT GGT TGG CAT GAT GCAG ATCT TT CAG GACA AGGT ATCA CTG AGG CTA AAC AAG CTGG CCA ACTT
CTAC GCC AAA ATCA CTTC ACCT TTG ATATT GCCT ATACA AGCG TTCT AAAA AGAG CCATCA AGACT
TTAA ACT TTG TCCT TGAT GAAC TTG ATCT TAA CTGG ATAC CTGTG AC AAAA CATGG CGTCT AAAT
GAA GAA TGTAC GGTG CTCT CAAG GTCT GAATA AGTCTG AAAC TGCTGCC AAAC ATGGAG AGGAA
CAAG TTA AAA ATATGG AGAC GTGCTT ATGAT ATACCT CCCC CTCTG TTGAC ATTT CAGAT CCTCGC
TTCC CGG TAATGA ACCAA AGTATGC CTTACTTG ACTCTT CCTGC ATACCAG TACTG AGTGT TTA
AAGG AACTG TTCAAC GTG TACTGCC ATTTTGG TTTG ATACTATTTCTG CAAGTATAAAG ACACGC
GAAC AGG TTCTG ATTGT CGCC CATG GAAAC AGTTTAA GAGCG CTTATCA AGTACTTGG ATAATACA
TCTG ATT CAG ATATTGTG GAACTCA ATATAC CCACTGG TATTCC ACTAGTCTATG AACTGG ATGCG
AACTTGA AGCCA ACCAA CACTATTATCTTG CCGATGA AGCGACAG TAGCAGCAGCA ATAGCACGT
GTGG CGAAC CAGG GAAAAAAG AAA TGA

B - Fosfoglicerato mutase Smp_096760 (250 aminoácidos)

M A P Y R I V F I R H G E S V Y N E E N R F C G W H D A D L S G Q G I T E A K Q A G Q L L R Q N H F T F D I A Y T S V L K R A I K T
L N F V L D E L D L N W I P V T K T W R L N E R M Y G A L Q G L N K S E T A A K H G E E Q V K I W R R A Y D I P P P P V D I S D P R
F P G N E P K Y A L L D S S C I P R T E C L K D T V Q R V L P F W F D T I S A S I K R R E V L I V A H G N S L R A L I K Y L D N T S
D S D I V E L N I P T G I P L V Y E L D A N L K P T K H Y L A D E A T V A A A I A R V A N Q G K K K

Figura 10: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de SmPGM de *Schistosoma mansoni*.

A: Sequência nucleotídica da região codificadora de fosfoglicerato mutase identificada como Smp_096760 no banco de dados Schisto DB, possuindo 753pb. Em vermelho está destacado o códon de início de tradução (ATG) e em verde o códon de parada de tradução (TGA). B: Sequência da proteína fosfoglicerato mutase, contendo 250 aminoácidos. Em vermelho está destacada a região correspondente ao domínio proteico His_Phos_1 (PF00300) de SmPGM, que inicia no aminoácido 5 e termina no aminoácido 191.

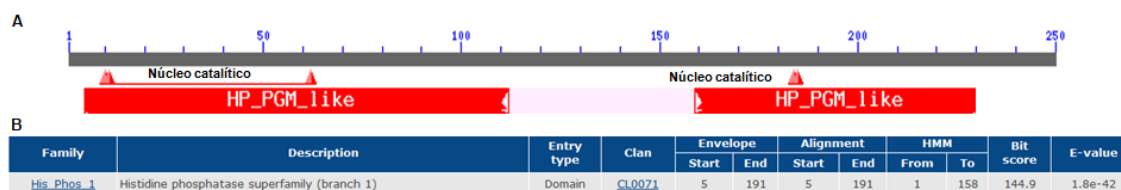


Figura 11: Domínios proteicos da SmPGM.

A: Dois domínios proteicos HP_PGM, os quais correspondem ao domínio His_Phos_1, foram encontrados na sequência de SmPGM de acordo com o Delta Blast. B: Informações sobre a localização e nível de significância do domínio proteico His_Phos_1 encontrado na sequência de SmPGM utilizando o banco de dados Pfam.

Quanto à localização celular de SmPGM, segundo o programa *TargetP 1.1 Server* que prediz a localização celular de proteínas eucarióticas, esta proteína não é encontrada na mitocôndria e também não possui peptídeo sinal. Outro programa, o *SherLoc 2*, que desempenha a mesma função, indicou que a SmPGM é uma proteína de localização citoplasmática com *score* 0,99, condizendo com a função desempenhada por esta proteína. Além disso, de acordo com informações fornecidas pelo banco de dados *TDR Targets (v5)*, a SmPGM de *S. mansoni* não possui sinal de adição de âncora de GPI ou domínios transmembrana, o que fornece mais evidências sobre a sua localização citoplasmática.

5.2 Análise *in silico* do potencial antigênico da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni*

De acordo com o programa *EMBOSS Antigenic*, que prediz as regiões potencialmente antigênicas de uma determinada sequência de aminoácidos baseado no método de Kolaskar e Tongaonkar, a SmPGM de *S. mansoni* possui 14 possíveis epítopos antigênicos para células B, com no mínimo 6 aminoácidos, e um percentil de 97,1%. Isto significa que a SmPGM está entre as 2,9% das proteínas preditas do genoma de *S. mansoni* que mais possuem peptídeos antigênicos para células B.

Ainda com relação à análise da antigenicidade da SmPGM de *S. mansoni*, foi utilizado o programa de predição de epítopos de células B denominado *BCPred*, que se baseia no uso exclusivo do modelo *Support Vector Machine (SVM)* diretamente aplicado à sequência proteica para predizer epítopos lineares de células B. Foram testados epítopos de 15 e 16 aminoácidos, com uma especificidade de 75%, que é o parâmetro padrão do programa. A predição realizada para epítopos de 16 aminoácidos resultou em quatro epítopos, todos com *scores* significativos acima de 0,9 (tabela 2). E a predição para epítopos de 15 aminoácidos resultou em três epítopos com *scores* acima de 0,9, sendo o epítopo de maior *score* coincidente com o epítopo de maior *score* com 16 aminoácidos, além de outros dois epítopos com *scores* abaixo de 0,9 (tabela 2). Este epítopo de maior *score* também foi predito

utilizando o preditor *BepiPred*, que também realiza a predição de epitopos lineares de células B (resultado não mostrado).

Tabela 2: Predição de epitopos de células B da proteína SmPGM de *Schistosoma mansoni*

Peptídeo Predito ^a	Posição Inicial	Posição Final	Número de aminoácidos ^b	Score
RRAYDIPPPVDISDP	116	131	16	1
RAYDIPPPVDISDP	117	131	15	1
VFIRHGESVYNEENR	7	21	15	0,998
KYLDNTSDSDIVELN	193	207	15	0,998
WFDTISASIKRREQVL	165	180	16	0,982
DSSCIPRTECLKDTVQ	144	159	16	0,972
RHGESVYNEENRFCGW	10	25	16	0,947
DSSCIPRTECLKDTV	144	158	15	0,842
CGWHADADLSGQGITE	23	37	15	0,714

^a Foi utilizado o preditor *BCPred* com valor de 75% de especificidade como padrão do programa.

^b Predição realizada para epitopos de 15 e 16 aminoácidos.

Para a predição de epitopos ligantes de MHC classe II para o haplótipo I-Ab de camundongos C57BL/6 foi utilizada a ferramenta *Rankpep*. Os peptídeos preditos possuem 9 aminoácidos, como parâmetro padrão do programa, e na tabela 3 estão sendo mostrados os 7 que apresentaram melhores *scores*. Os peptídeos SmPGM 116-124 e SmPGM 119-127 fazem parte do peptídeo predito para células B que apresentou melhor *score*, seja com 15 ou 16 aminoácidos.

Tabela 3: Predição de epitopos para MHC II da proteína SmPGM de *Schistosoma mansoni*

Peptídeo Predito ^a	Posição Inicial	Posição Final	Score
YYLADEATV	228	236	14,453
RRAYDIPPP	116	124	14,376
EATVAAAIA	233	241	14,218
YDIPPPVVD	119	127	13,386
VAAAIARVA	236	244	12,805
YALLDSSCI	140	148	12,124
YLADEATVA	229	237	11,103

^a Foi utilizado o haplótipo I-Ab de MHC II de camundongos C57BL/6 e os parâmetros padrões determinados pelo preditor *Rankpep*.

Baseando-se nestes resultados, foram sintetizados os peptídeos SmPGM 116-130 (RRAYDIPPPPVDISD) e SmPGM 228-242 (YYLADEATVAAAIAR) para serem utilizados em experimentos de imunização de camundongos e nos ensaios imunológicos que serão descritos mais adiante.

Através do programa *Psipred* (*Protein Structure Prediction Server*), que utiliza um banco de dados que agrega vários métodos de predição com alta acurácia de estruturas secundárias de proteínas, foi obtida a predição da estrutura secundária da SmPGM de *S. mansoni* utilizando a configuração padrão do programa (figura 12). Deste modo, foram preditas 12 regiões formadas por alças ou *loops*, 4 por folhas- β e 9 por α -hélices na sua estrutura. Os quatro epitopos de células B compostos por 16 aminoácidos e os 3 de maior *score* compostos por 15 aminoácidos preditos pelo programa *BCPred* foram marcados no modelo gráfico da estrutura secundária da SmPGM. Através desta representação é possível perceber que quatro destes peptídeos estão situados principalmente em regiões formadas por alças (SmPGM 7-21, SmPGM 10-25, SmPGM 116-131, SmPGM 117-131) e que os peptídeos SmPGM 144-159, SmPGM 165-180 e SmPGM 193-207 estão situados em regiões formadas também por α -hélices e/ou folhas- β , mas também se localizam em regiões de alças. O peptídeo de maior *score*, predito tanto para a análise com 15 aminoácidos quanto com 16, é formado em sua maior parte por alças. Os peptídeos escolhidos pelo nosso grupo para serem utilizados nas imunizações com peptídeos sintéticos e nos ensaios imunológicos estão marcados de vermelho na figura 12.

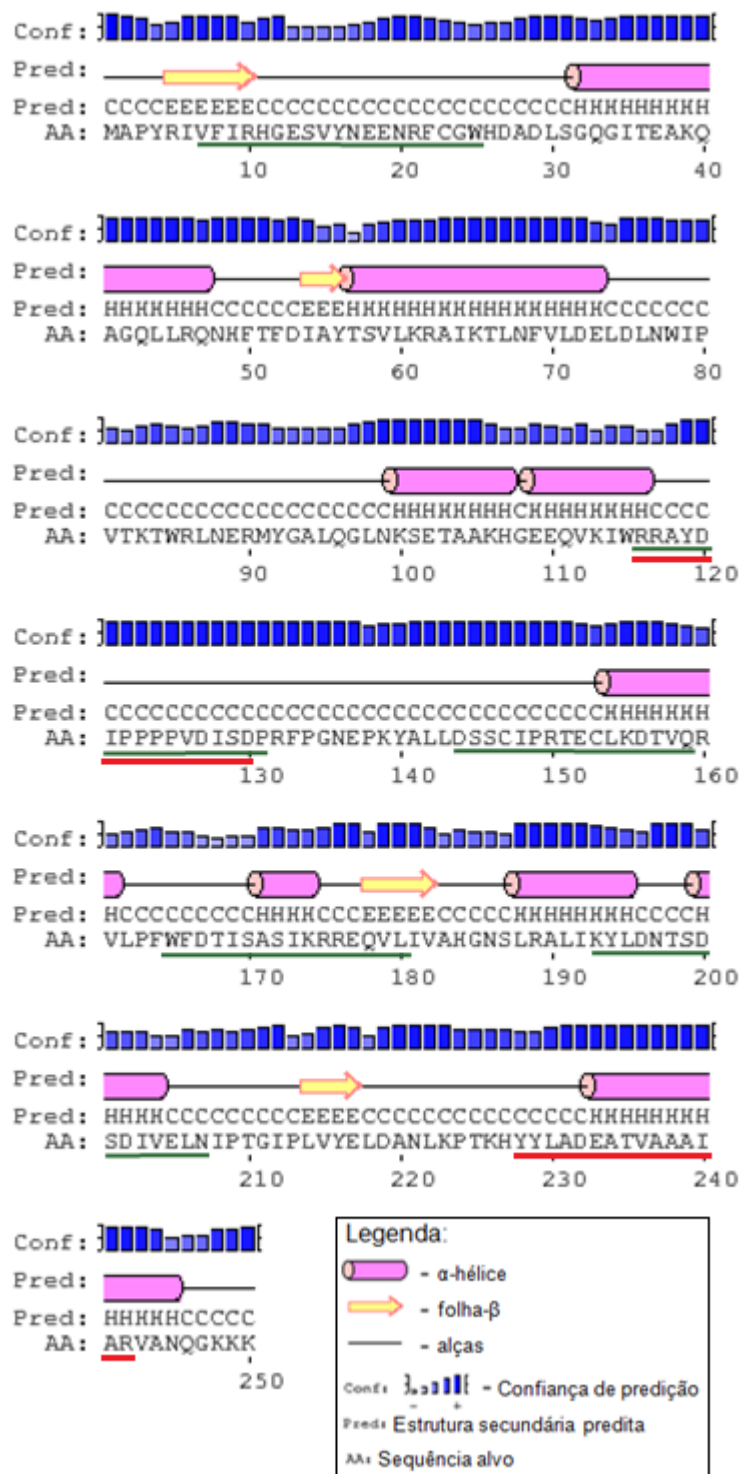


Figura 12: Predição da estrutura secundária de SmPGM de *Schistosoma mansoni*

Representação gráfica da estrutura secundária predita da proteína SmPGM de *S. mansoni* utilizando o programa Psipred que considera os níveis de confiança de predição (Conf). Os epitopos de células B preditos pelo programa BCPred estão sublinhados de verde e os peptídeos utilizados nas imunizações e nos ensaios imunológicos estão sublinhados de vermelho.

Foi realizada uma busca por proteínas ortólogas à SmPGM de *S. mansoni* através do BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*) utilizando o banco de dados de proteínas restrito a *Homo Sapiens*. As análises mostraram que entre a fosfoglicerato mutase de *S.*

mansoni e a fosfoglicerato mutase humana que apresentou maior similaridade à fosfoglicerato mutase do parasito (NP_000281.2), e que possui 253 aminoácidos, existe 57% de identidade e 71% de positividade (figura 13). Verificamos se as regiões de similaridade entre estas proteínas correspondem às regiões onde estão localizados os epitopos preditos tanto para células B quanto para MHC II da SmPGM de *S. mansoni*. De acordo com a figura 13, é possível observar que dos 9 peptídeos preditos para células B, 3 (SmPGM 7-21; SmPGM 10-25; SmPGM 116-131) se encontram em uma região de alta similaridade entre a sequência da fosfoglicerato mutase humana e de *S. mansoni*. O peptídeo SmPGM 10-25 apresentou alto grau de similaridade com a sequência da fosfoglicerato mutase humana, sendo 13 aminoácidos idênticos, dentre os 16 aminoácidos que os compõem. Por outro lado, outros peptídeos como SmPGM 144-159, SmPGM 144-158, SmPGM 165-180 e SmPGM 193-207 se localizam em regiões de baixa similaridade entre as sequências analisadas. Estes apresentaram 6 ou 8 aminoácidos idênticos à sequência da fosfoglicerato mutase humana, dentre os 15 ou 16 aminoácidos que os constituem.

Foi realizada uma junção dos peptídeos preditos para células T, uma vez que eles sobrepõem uns com outros. Tais peptídeos estão marcados de azul na figura 13. Destes peptídeos, apenas um, SmPGM 116-127, se encontra em uma região de alta similaridade, isto é, 9 dos 12 aminoácidos que o compõe são idênticos à sequência da fosfoglicerato mutase humana. No entanto, os peptídeos SmPGM 140-148 e SmPGM 228-244 se localizam em regiões de baixa similaridade com a sequência humana, apresentando 3 ou 8 aminoácidos idênticos à sequência humana, dos 9 ou 17 que os compõem, respectivamente.

phosphoglycerate mutase 2 [Homo sapiens]

Sequence ID: [ref|NP_000281.2|](#) Length: 253 Number of Matches: 1

▶ See 5 more title(s)

Range 1: 1 to 253		GenPept	Graphics			Next Match	Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
298 bits(764)		2e-100 Compositional matrix adjust.		145/253(57%)	181/253(71%)	3/253(1%)	
Query 1	M	A	P	Y	R	V	F
Sbjct 1	M	A	T	H	R	L	V
Query 61	K	R	A	I	K	T	L
Sbjct 61	K	R	A	I	R	L	W
Query 121	I	P	P	P	V	D	I
Sbjct 121	I	P	P	P	M	D	E
Query 179	V	L	I	V	A	H	G
Sbjct 181	V	L	I	A	A	H	G
Query 238	A	A	T	A	R	V	N
Sbjct 241	K	A	M	E	A	V	A

Figura 13: Análise da similaridade de sequência de aminoácidos da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* e humana.

Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da SmPGM de *S. mansoni* e da fosfoglicerato mutase humana que apresentou maior nível de similaridade à fosfoglicerato mutase do parasito (NP_000281.2) obtido pelo programa BLASTP. As regiões quadriculadas de vermelho correspondem aos peptídeos preditos de células B compostos de 16 aminoácidos e as sublinhadas de verde aos de 15 aminoácidos. Em azul, estão destacados os peptídeos de células T formados pela junção dos peptídeos preditos para SmPGM. Em roxo, estão sublinhados os peptídeos utilizados nas imunizações dos camundongos e ensaios imunológicos.

5.3 Predição da estrutura terciária da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni*

Utilizando a interface *The Protein Model Portal (PSI)* (Konstantin *et al.*, 2009), que utiliza modelos de estruturas de proteínas de diferentes repositórios como *Swiss-Model* e *ModBase* (modbase.compbio.ucsf.edu), dentre outros, foi possível obter um modelo da estrutura terciária da proteína SmPGM de *S. mansoni* a partir da estrutura já cristalizada da fosfoglicerato mutase da bactéria *Burkholderia pseudomallei* fornecida pelo provedor *ModBase* (figura 14). A identidade entre a sequência de aminoácidos destas duas proteínas é de 62%, sendo que a estrutura da SmPGM foi predita entre os aminoácidos 2 ao aminoácido 246. Esta ferramenta também identificou o domínio proteico conservado da sequência His_Phos_1.

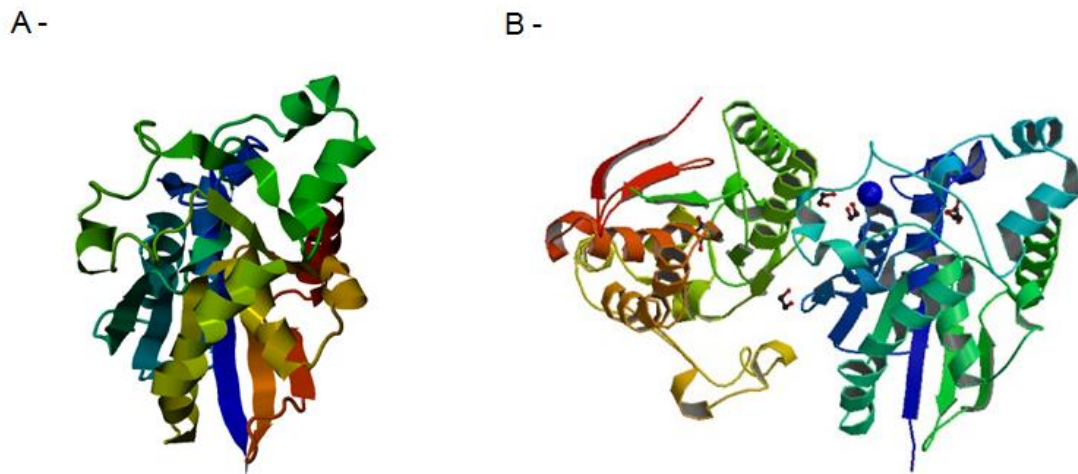


Figura 14: Estrutura terciária da SmPGM de *Schistosoma mansoni*

Modelo da estrutura terciária da SmPGM de *S. mansoni* (A) obtido através do *The Protein Model Portal* (PSI) a partir de um modelo da estrutura da fosfoglicerato mutase já cristalizada de *Burkholderia pseudomallei* (B) utilizando o banco de dados de estruturas de proteínas ModBase.

5.4 Amplificação da região codificadora da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni*

Para inserção no plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B, foram amplificados dois fragmentos de DNA correspondentes à região codificadora de SmPGM: um contendo o códon de parada de tradução original da proteína e outro no qual o códon de parada de tradução foi mutado, permitindo a expressão de SmPGM em fusão com 6xHis na porção C-terminal, de modo que esta pudesse ser detectada por *Western blotting* com anticorpo anti-6xHis. A primeira construção foi utilizada nos ensaios de imunização de camundongos para avaliar o potencial imunoprotetor desta proteína na forma de vacina de DNA e a segunda, para confirmar a expressão da proteína pelo plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B em células de mamífero em cultura.

Estes fragmentos foram amplificados por RT-PCR utilizando como molde cDNAs sintetizados com oligo dT a partir de RNA total extraído de vermes adultos de *S. mansoni* e os iniciadores específicos que amplificam um fragmento de 768 pb, para a construção sem o códon de parada de tradução, e um fragmento de 769 pb, para a construção que mantém o códon de parada de tradução da *SmPGM*.

A figura 15 mostra os produtos amplificados correspondentes à região codificadora de SmPGM, onde em (A) foram aplicados os produtos da reação de PCR utilizando o iniciador reverso que amplifica a sequência sem o códon de parada e em (B), os produtos da reação de PCR utilizando o iniciador reverso que amplifica a sequência desejada com o códon de parada de tradução de *SmPGM*. As canaletas 1A e 1B mostram o produto da amplificação correspondente à região codificadora de SmPGM. Como observado na figura 15, os produtos

amplificados apresentam o tamanho esperado de aproximadamente 750 pares de bases, como indicados pela seta vermelha. Foram realizados dois tipos de reações utilizadas como controles negativos da PCR: utilizando como molde parte da reação de transcrição reversa realizada na ausência da enzima transcriptase reversa (canaletas 2A e 2B) e na ausência de cDNA (canaletas 3A e 3B).

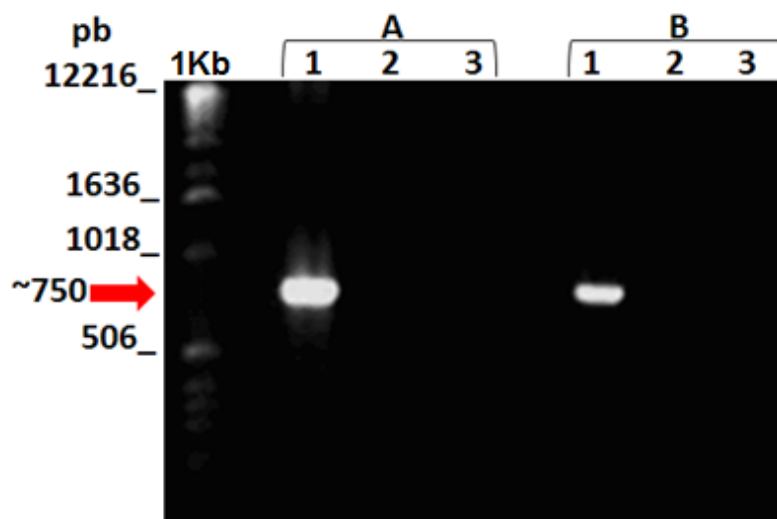


Figura 15: Amplificação da região codificadora do gene *SmPGM* de *Schistosoma mansoni*.

Produtos de PCR utilizando como molde cDNA de vermes adultos provenientes de RT-PCR com oligo-dT foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado por brometo de etídio. As amplificações foram realizadas utilizando o iniciador reverso sem o códon de parada (A) ou o iniciador reverso com o códon de parada de tradução de *SmPGM* (B). Amplificação da região codificadora do gene de *SmPGM* (1A e 1B). Controles negativos da PCR utilizando como molde parte da reação de transcrição reversa realizada na ausência da enzima transcriptase reversa (2A e 2B). Controle negativo da PCR sem cDNA (3A e 3B). A seta vermelha indica a massa molecular esperada para os fragmentos amplificados de aproximadamente 750 pb. Foi utilizado o padrão de massa molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen).

Estes fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose, digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* e, então, ligados ao vetor pcDNA 3.1/V5-His B previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. Dentre os clones selecionados, dois deles (3H e 4H) contêm a região codificadora de *SmPGM* com o códon de parada e três clones (4G, 7G e 9G) contêm a região codificadora de *SmPGM* sem o códon de parada de tradução da proteína. Como observado na figura 16, os produtos de digestão do DNA plasmidiano destes clones com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* apresentam os tamanhos esperados de aproximadamente 750 pb, correspondente a região codificadora de *SmPGM*, e 5,5 Kb, correspondente ao vetor pcDNA 3.1/V5-His B.

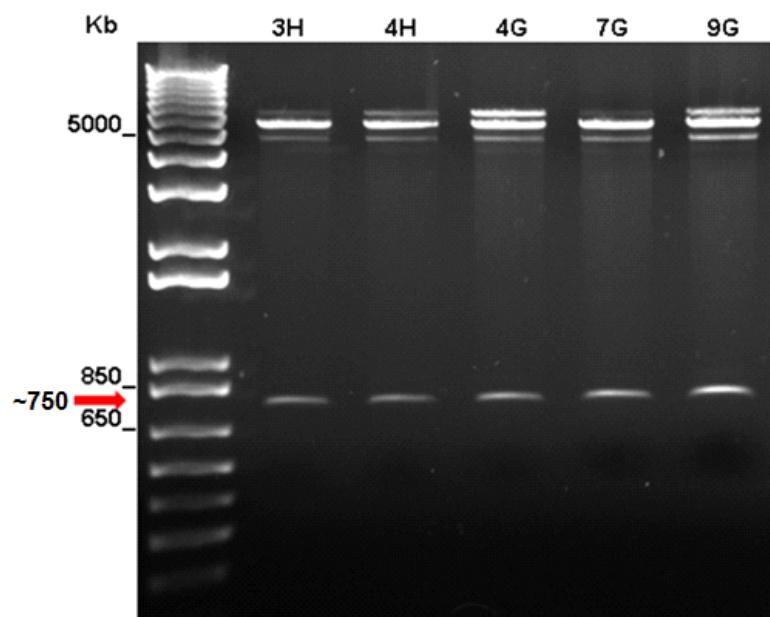


Figura 16: Produtos de digestão por enzimas de restrição do DNA plasmidiano de clones contendo a região codificadora de *SmPGM* inserida no plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B.

Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos produtos de digestão pelas enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* de DNA plasmidiano de 2 clones de pcDNA 3.1/V5-His B contendo a região codificadora de *SmPGM* com o códon de parada (3H e 4H) e de 3 clones contendo a região codificadora de *SmPGM* sem o códon de parada de tradução (4G, 7G e 9G). A seta vermelha indica a massa molecular aproximada dos fragmentos correspondentes à região codificadora de *SmPGM*. Foi utilizado o padrão de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Foi também realizado o sequenciamento parcial de DNA destes clones a fim de confirmar a correta inserção das sequências correspondentes a região codificadora da *SmPGM* no plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B. As análises obtidas do sequenciamento de DNA mostraram que as sequências correspondentes a *SmPGM* foram corretamente inseridas no vetor em ambas as construções, com e sem o códon de parada de tradução, não apresentando mutações, e que a região codificadora da *SmPGM* foi mantida na mesma janela aberta de leitura dos epitopos V5 e 6xHis, presentes no vetor, nos clones 4G, 7G e 9G (figura 17).

```

ggt aag ctt ATG GCT CCT TAC AGA ATT GTG TTT ATT CGC CAT GGA
GAG AGT GTT TAC AAT GAA GAA AAT CGA TTT TGT GGT TGG CAT GAT
GCA GAT CTT TCA GGA CAA GGT ATC ACT GAG GCT AAA CAA GCT GGC
CAA CTT CTA CGC CAA AAT CAC TTC ACC TTT GAT ATT GCC TAT ACA
AGC GTT CTA AAA AGA GCC ATC AAG ACT TTA AAC TTT GTC CTT GAT
GAA CTT GAT CTT AAC TGG ATA CCT GTG ACA AAA ACA TGG CGT CTA
AAT GAA AGA ATG TAC GGT GCT CTT CAA GGT CTG AAT AAG TCT GAA
ACT GCT GCC AAA CAT GGA GAG GAA CAA GTT AAA ATA TGG AGA CGT
GCT TAT GAT ATA CCT CCC CCT CCT GTT GAC ATT TCA GAT CCT CGC
TTC CCC GGT AAT GAA CCA AAG TAT GCC TTA CTT GAC TCT TCC TGC
ATA CCA CGT ACT GAG TGT TTA AAG GAC ACT GTT CAA CGT GTA CTG
CCA TTT TGG TTT GAT ACT ATT TCT GCA AGT ATA AAG AGA CGC GAA
CAG GTT CTG ATT GTC GCC CAT GGA AAC AGT TTA AGA GCG CTT ATC
AAG TAC TTG GAT AAT ACA TCT GAT TCA GAT ATT GTG GAA CTC AAT
ATA CCC ACT GGT ATT CCA CTA GTC TAT GAA CTG GAT GCG AAC TTG
AAG CCA ACC AAA CAC TAT TAT CTT GCC GAT GAA GCG ACA GTA GCA
GCA GCA ATA GCA CGT GTG GCG AAC CAG GGA AAA AAG AAA TGG aat
tct gca gat atc cag cac agt ggc ggc cgc tcg agt cta gag ggc
ccg cgg ttc gaa ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc
gat tct acg cgt acc ggt cat cat cac cat cac cat tga

```

Figura 17: Representação do sequenciamento parcial dos clones recombinantes de pcDNA 3.1/V5-His B contendo a sequência codificadora de *SmPGM* sem o códon de parada de tradução. Parte da sequência do vetor pcDNA 3.1/V5-His B (letras minúsculas), a sequência da região codificadora do gene *SmPGM* sem o códon de parada de tradução (sequência sublinhada), códons do epítipo V5 (retângulo em vermelho) e das 6 histidinas (retângulo azul escuro). O ATG (negrito azul) corresponde a metionina inicial de *SmPGM* e o códon TGG (negrito rosa) corresponde ao último códon da sequência codificadora de *SmPGM*, o qual substituí o códon de parada de tradução da proteína. O TGA (negrito vermelho) corresponde ao códon de parada de tradução do vetor.

5.5 Expressão transiente da fosfoglicerato mutase de *Schistosoma mansoni* em células HEK 293T

Com o objetivo de verificar a expressão da SmPGM em cultura de células de mamífero pelo plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B, foi realizada a transfecção de células HEK 293T, em cultura, utilizando todos os clones obtidos, ou seja, os que contêm a sequência codificadora de SmPGM em fusão ou não com os códons de 6xHis na porção C-terminal da proteína. Como controle positivo da transfecção foi utilizado o plasmídeo pcDNA 3-RFP, gentilmente cedido pelo Dr. Alexandre Machado (CPqRR-Fiocruz), no qual foi inserida a sequência de DNA que codifica a proteína RFP (Proteína Fluorescente Vermelha). Através do protocolo de transfecção utilizando lipofectamina, após 48 horas foi possível obter cerca de 60% de células transfectadas (figura 18).

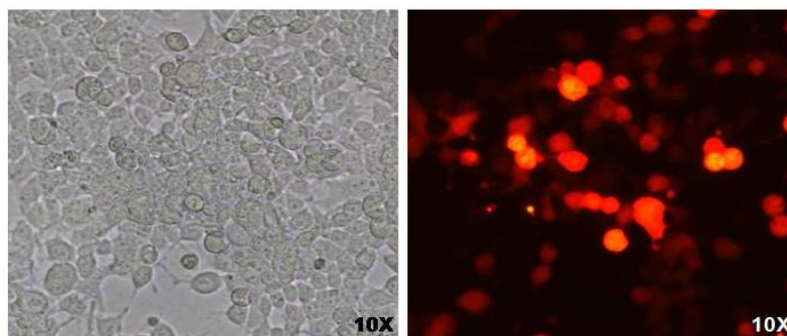


Figura 18: Análise da transfecção de células HEK 293T com o plasmídeo pcDNA 3-RFP por microscopia de fluorescência.

À esquerda: imagem de células HEK 293T transfectadas sob luz branca. À direita: imagem da mesma área da placa evidenciando a expressão de RFP em células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-RFP, as quais emitem fluorescência vermelha quando expostas a luz ultra violeta. Imagens obtidas em aumento de 10X no microscópio AXIO – *ObserverA1* (Zeiss).

O extrato proteico total das células HEK 293T transfectadas com os plasmídeos contendo a sequência codificadora de SmPGM, em fusão (canaletas 1, 2 e 3) ou não com 6xHis (canaletas 4 e 5), e com o plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B vazio (canaleta 6) foi analisado em gel de poliacrilamida unidimensional corado por Azul de Coomassie (figura 19). Podem ser visualizadas bandas bem definidas de alta e baixa massa molecular, com ausência de arraste, indicando um efetivo processo de extração de proteínas e ausência de degradação.

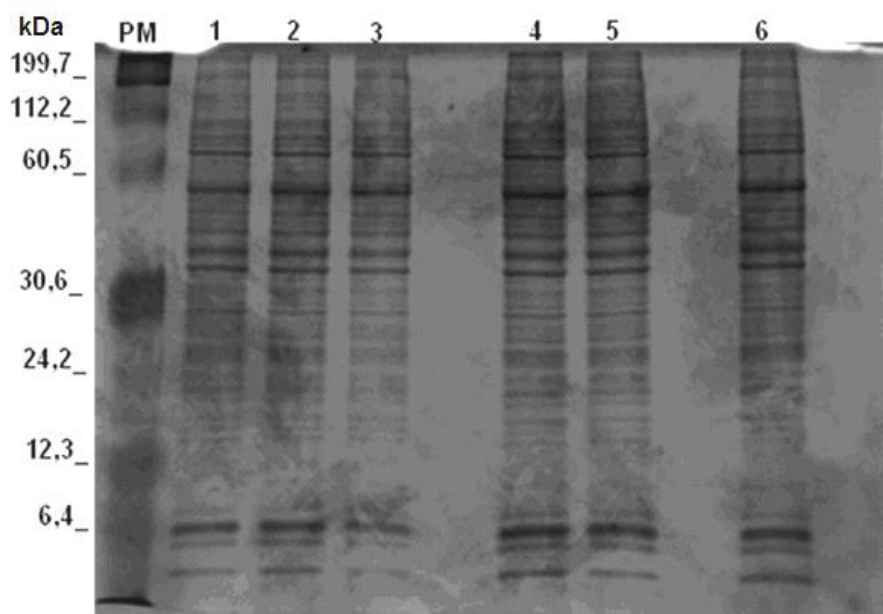


Figura 19: Eletroforese unidimensional de extrato proteico total de células HEK 293T transfetadas.

Gel de poliacrilamida corado pelo Azul de Coomassie contendo extrato proteico total de células HEK 293T transfetadas com os plasmídeos pcDNA 3.1/V5-His B contendo o gene de interesse em fusão (canaletas 1, 2 e 3) ou não (canaletas 4 e 5) com 6xHis. A canaleta 6 corresponde ao extrato proteico de células HEK 293T transfetadas com o plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B vazio. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad).

Estes mesmos extratos proteicos foram separados em gel de poliacrilamida e transferidos para uma membrana de PVDF, a qual foi incubada com anticorpo anti-6xHis (C-terminal) conjugado a peroxidase (HRP) (figura 20). Desta maneira, foi possível afirmar que a proteína SmPGM foi expressa nas células que foram transfetadas com os plasmídeos pcDNA 3.1/V5-His B que continham a sequência codificadora de SmPGM em fusão com as 6xHis, uma vez que somente nas canaletas 1, 2 e 3 foi observada uma banda de aproximadamente 29kDa que corresponde a massa molecular esperada para SmPGM acrescida da massa do epítipo V5 e das 6xHis. Nas canaletas 4 e 5 esta mesma banda não foi observada, uma vez que os extratos proteicos aplicados nestas canaletas foram obtidos de células transfetadas com os plasmídeos pcDNA 3.1/V5-His B que continham a sequência codificadora de SmPGM sem a fusão com 6xHis. A canaleta 6 corresponde ao extrato proteico total de células HEK 293T transfetadas com plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B vazio. Nesta canaleta, bem como nas demais, observa-se uma reatividade inespecífica de algumas bandas ao anticorpo anti-6xHis. Neste experimento, parte da proteína Sm29 de *S. mansoni* recombinante purificada (rSm29) foi utilizada como controle positivo do *Western blotting*, uma vez que a mesma também foi expressa em fusão com uma cauda de 6xHis (canaleta 7). A banda correspondente a rSm29 apresenta a massa molecular observada de 16,7 kDa (Cardoso *et al.*, 2006).

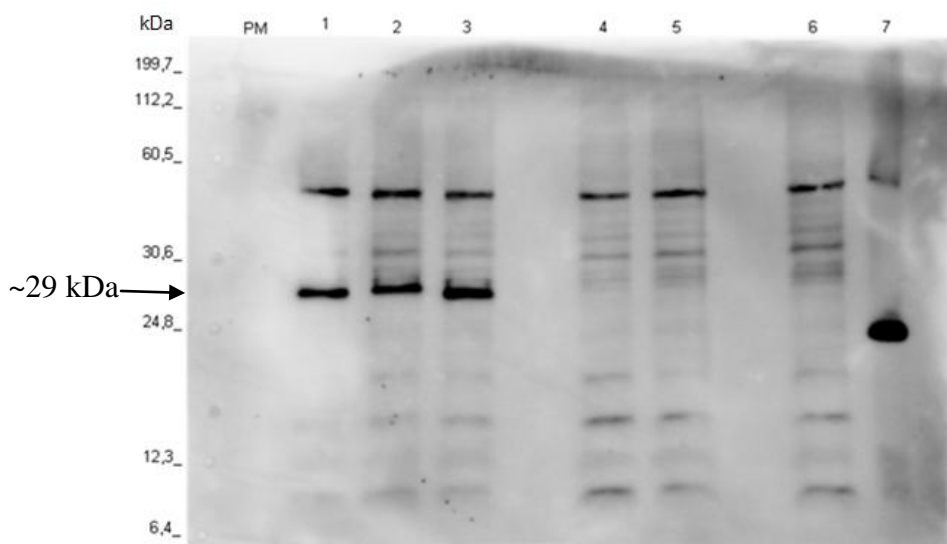


Figura 20: Western blotting do extrato de células HEK 293T transfectadas utilizando anticorpo anti-6xHis.

Membrana de PVDF contendo extrato proteico total de células HEK 293T transfectadas com os plasmídeos pcDNA 3.1/V5-His B contendo o gene de interesse em fusão (canaletas 1, 2 e 3) ou não (canaletas 4 e 5) com 6xHis. A canaleta 6 corresponde ao extrato proteico total de células transfectadas com plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B vazio e a canaleta 7 corresponde a rSm29 em fusão com 6xHis purificada. A membrana de PVDF foi incubada com anticorpo anti-6xHis (C-term) conjugado a peroxidase (*Invitrogen*) na diluição de 1:5000. A revelação foi realizada utilizando o *Kit ECL Plus (GE Healthcare)*. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad)*.

5.6 Avaliação da imunidade protetora induzida por *SmPGM* na forma de vacina de DNA

5.6.1 Recuperação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Para avaliar a capacidade de indução de imunidade protetora conferida por *SmPGM* na forma de vacina de DNA foram realizados dois ensaios independentes de imunização com DNA plasmidiano obtido do clone 3H, no qual a região codificadora de *SmPGM* foi inserida no plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B sem a fusão com 6xHis (pcDNA-*SmPGM*), seguida pelo desafio de camundongos com cercárias de *S. mansoni*. O nível de proteção foi avaliado comparando o número de vermes adultos recuperados do grupo de camundongos imunizados e do grupo controle, após 50 dias da infecção desafio. Como pode ser observado na tabela 4, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com o plasmídeo recombinante pcDNA-*SmPGM* e desafiados quando comparado com o número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com o mesmo plasmídeo pcDNA vazio e também desafiados, nos dois experimentos realizados.

Tabela 4: Número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

Experimento 1						
	Fêmeas		Machos		Total	
	pcDNA	pcDNA- <i>SmPGM</i>	pcDNA	pcDNA- <i>SmPGM</i>	pcDNA	pcDNA- <i>SmPGM</i>
Número de vermes adultos (média ± D.P.)	18,40±4,159	14,50±5,563	17,80±2,950	17,60±6,867	36,20±5,404	32,10±9,837
Experimento 2						
Número de vermes adultos (média ± D.P.)	21,83±5,269	22,40±5,320	24,83±4,215	26,80±3,271	46,67±7,891	49,20±8,167

5.6.2 Contagem do número de ovos de *Schistosoma mansoni* retidos no fígado e intestino de camundongos imunizados e desafiados

O número de ovos do parasito retidos no fígado e intestino de camundongos imunizados e desafiados também foi avaliado. Como observado nas figuras 21 e 22, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o número de ovos de *S. mansoni* recuperados do fígado e do intestino, respectivamente, de camundongos imunizados com o plasmídeo pcDNA-*SmPGM* e desafiados quando comparado com o grupo controle de camundongos imunizados com o plasmídeo pcDNA vazio e também desafiados. Além disso, através da análise morfológica por microscopia de luz dos ovos retidos no intestino dos camundongos imunizados e do grupo controle, foi observada a presença de ovos em todos os estádios evolutivos em ambos os grupos.

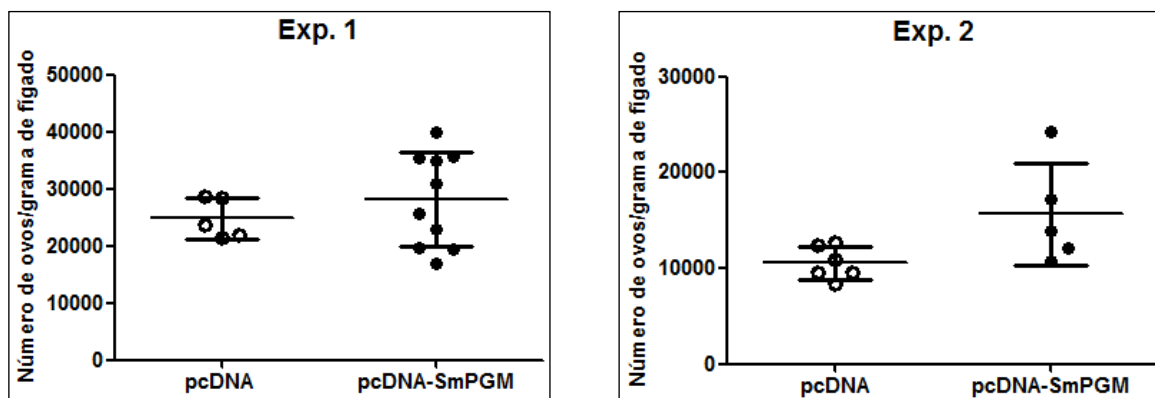


Figura 21: Número de ovos retidos no fígado de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

Camundongos foram imunizados com 4 doses de 100µg de DNA plasmidiano (pcDNA-*SmPGM* ou pcDNA) e 15 dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por infecção percutânea utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo. Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados para obtenção do fígado. Foi feita a pesagem do órgão, a digestão com KOH e o número de ovos determinado pela contagem em microscopia de luz. As análises estatísticas foram realizadas com Teste t (*Student's t test*) utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*). Foram realizados dois experimentos independentes.

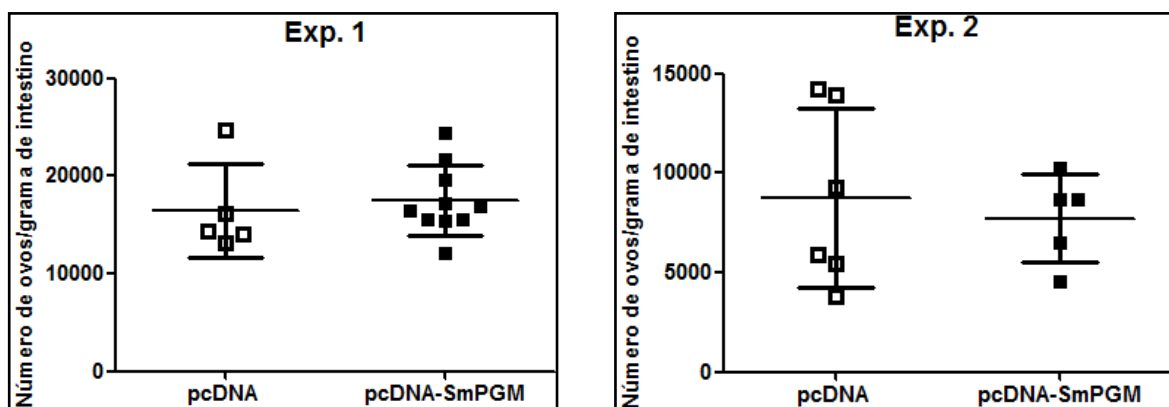


Figura 22: Número de ovos retidos no intestino de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

Camundongos foram imunizados com 4 doses de 100µg de DNA plasmidiano (pcDNA-*SmPGM* ou pcDNA) e 15 dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por infecção percutânea utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo. Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados para obtenção do intestino. Foi feita a pesagem do órgão, a digestão com KOH e o número de ovos determinado pela contagem em microscopia de luz. As análises estatísticas foram realizadas com Teste t (*Student's t test*) utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*). Foram realizados dois experimentos independentes.

5.6.3 Avaliação da fecundidade de fêmeas de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após imunização

Também foi verificada a fecundidade das fêmeas de *S. mansoni* após a imunização com o plasmídeo pcDNA-*SmPGM* determinada pelo número de ovos recuperados por grama de tecido (fígado e intestino) dividido pelo número de fêmeas de vermes adultos recuperadas de camundongos imunizados e desafiados. Como observado na figura 23, não houve diferença

estatisticamente significativa entre os grupos controle pcDNA e o imunizado com pcDNA-*SmPGM*. Portanto, a imunização com pcDNA-*SmPGM* não alterou significativamente a fecundidade das fêmeas.

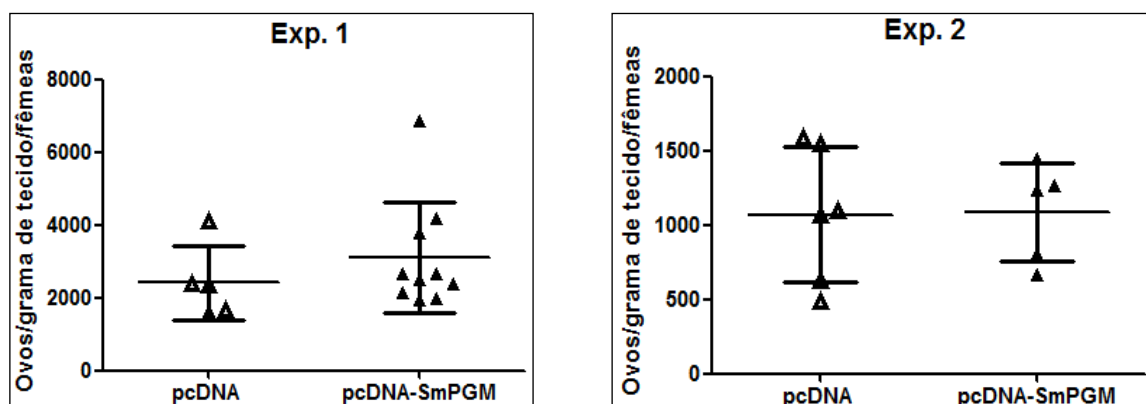


Figura 23: Fecundidade das fêmeas de *Schistosoma mansoni* após imunização com o plasmídeo pcDNA-*SmPGM*.

Camundongos foram imunizados com 4 doses de 100 μ g de DNA plasmidiano (pcDNA-*SmPGM* ou pcDNA) e 15 dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por infecção percutânea utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo. Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados para obtenção do fígado e do intestino. Foi feita a pesagem dos órgãos, a digestão com KOH e o número de ovos determinado pela contagem em microscopia de luz. As análises estatísticas foram realizadas com Teste t (*Student's t test*) utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*). Foram realizados dois experimentos independentes.

5.6.4 Contagem do número de ovos de *Schistosoma mansoni* liberados nas fezes de camundongos imunizados e desafiados

O efeito protetor induzido pela imunização com o plasmídeo pcDNA-*SmPGM* também foi avaliado pela contagem do número de ovos liberados nas fezes de camundongos imunizados e desafiados. Também não houve uma diferença estatisticamente significativa neste parâmetro avaliado entre animais dos grupos controle e imunizado com pcDNA-*SmPGM*, em nenhum dos dois ensaios realizados (Figura 24).

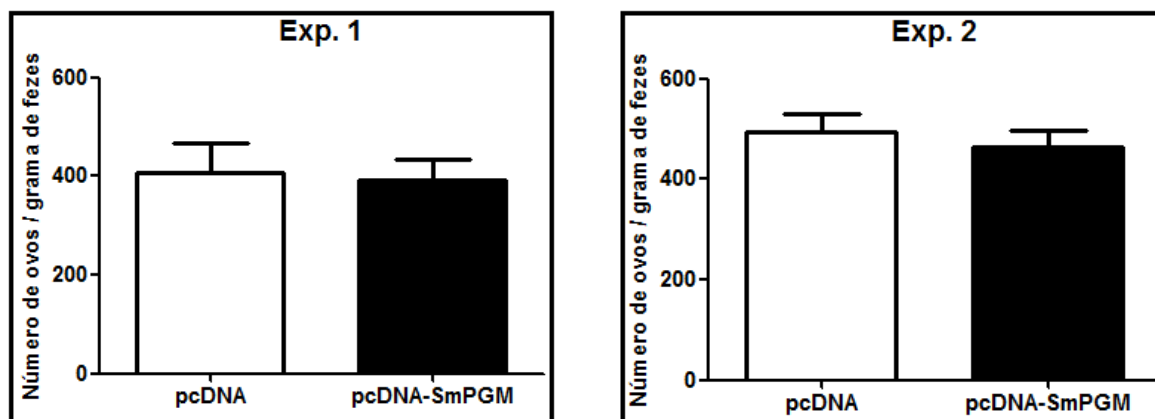


Figura 24: Número de ovos liberados nas fezes de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

Camundongos foram imunizados com 4 doses de 100µg de DNA plasmidiano (pcDNA-*SmPGM* ou pcDNA) e 15 dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por infecção percutânea utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo. Três amostras de fezes frescas (0,5g de fezes/grupo) foram coletadas nos dias 48, 49 e 50 pós-infecção. O número de ovos foi determinado pela contagem em microscopia de luz. As análises estatísticas foram realizadas com Teste t (*Student's t test*) utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*). Foram realizados dois experimentos independentes.

5.6.5 Análise dos níveis de IgG total em camundongos imunizados com *SmPGM* na forma de vacina de DNA

Para investigar a presença de anticorpos específicos anti-*SmPGM*, as amostras de soro de camundongos coletadas a cada 15 dias após a primeira dose de imunização foram testadas em ensaios de ELISA. Para isso, os peptídeos sintéticos *SmPGM* 116-130 e *SmPGM* 228-242, que contêm epítopos preditos de *SmPGM* para células B e T, foram utilizados separadamente. Na figura 25 é possível observar que não houve produção de IgG total anti-*SmPGM*, tanto no grupo de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* quanto no grupo controle, ao longo de todo o experimento.

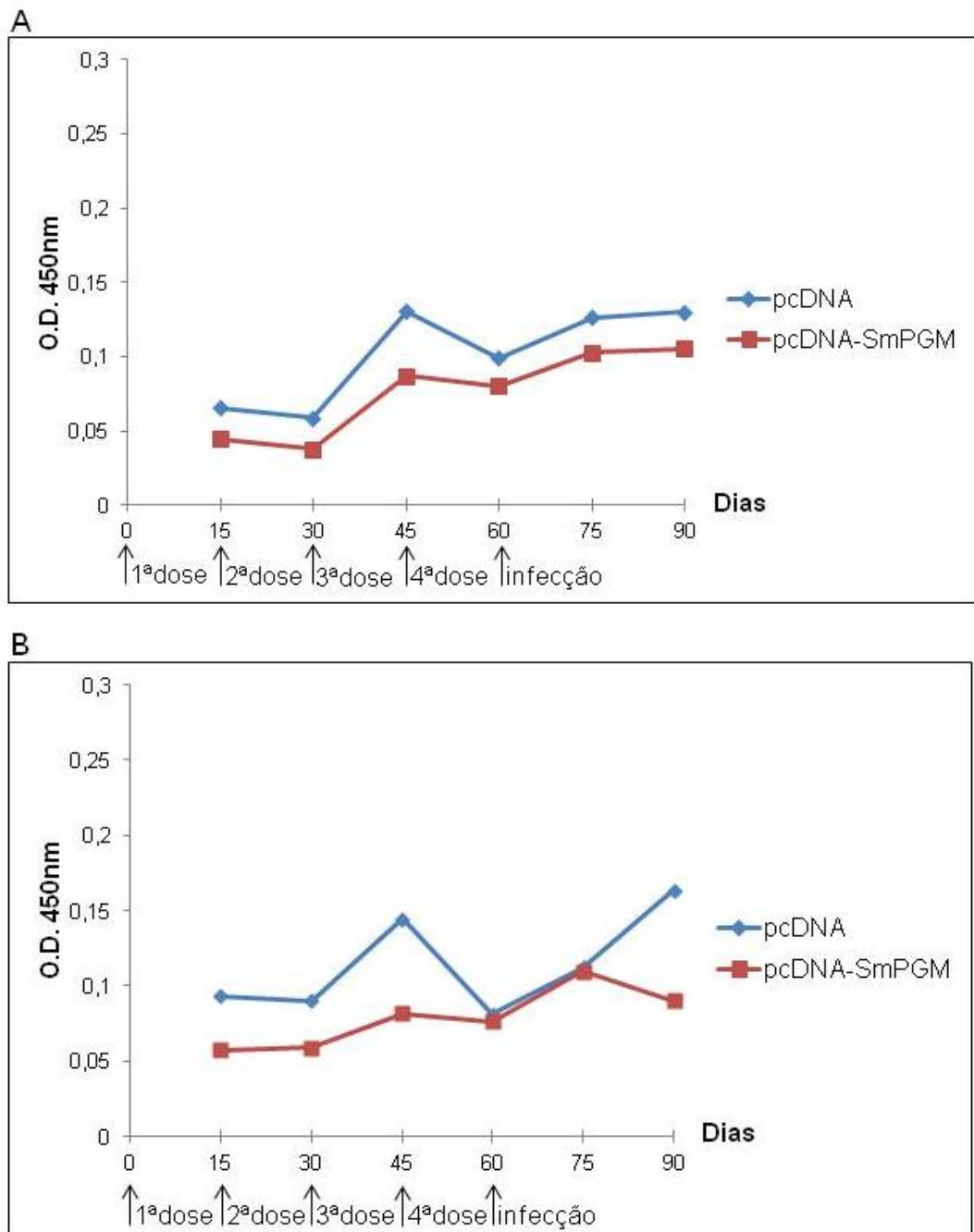


Figura 25: Perfil de produção de IgG total contra peptídeos da SmPGM após imunização com o gene *SmPGM*.

Camundongos foram imunizados com o plasmídeo pcDNA vazio ou com o pcDNA-*SmPGM* nos dias 0, 15, 30 e 45 e desafiados com 100 cercárias da cepa LE por camundongo no dia 60. A cada 15 dias após a primeira dose de imunização foram coletadas amostras de soro dos camundongos. Estas amostras de soro foram utilizadas em ensaios de ELISA para detectar a produção de IgG total contra os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 (A) e SmPGM 228-242 (B). Os resultados estão representados como a média da absorbância a 450nm de cada grupo. Estes gráficos são representativos dos dois experimentos.

5.6.6 Análise da ativação celular

Para verificar a ativação das células T dos camundongos imunizados foi realizado um ensaio de marcação *ex vivo*. Na figura 26A é possível observar uma diferença estatisticamente

significativa ($p < 0.05$) no percentual de células CD4⁺ ativadas (CD4⁺CD25⁺) em camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* em comparação ao grupo imunizado com apenas com pcDNA. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa no percentual de células CD8⁺ ativadas (CD8⁺CD25⁺) entre os grupos (figura 26B).

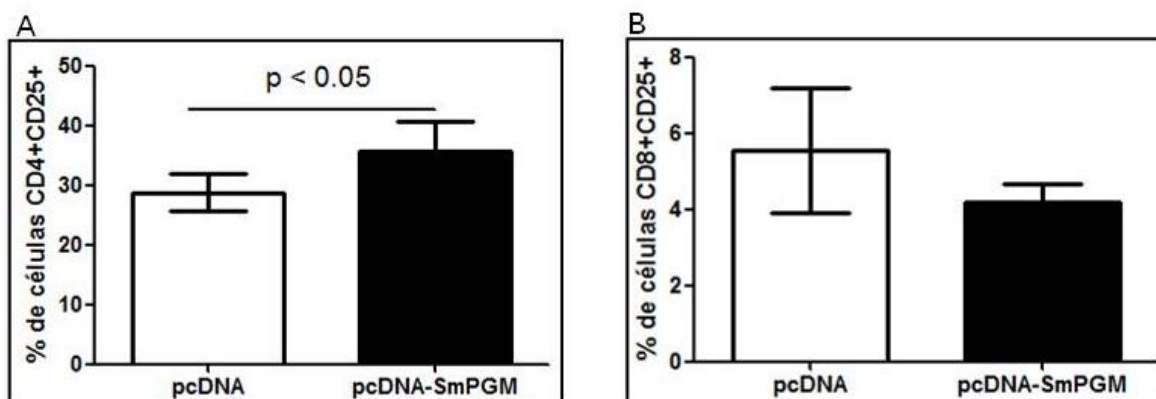


Figura 26: Percentual de células T ativadas em camundongos imunizados com o gene *SmPGM*. Células do baço de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* e pcDNA vazio foram obtidas para análise da ativação de células CD4 (A) e CD8 (B). As análises estatísticas foram realizadas com teste *t* não pareado utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

5.6.7 Análise de células T de memória central, memória efetora e célula efetora

Foi realizado um experimento com o intuito de verificar se a imunização com pcDNA-*SmPGM* induziria uma alteração na porcentagem de células T de memória. Na figura 27, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ de memória central, memória efetora ou células efetoras do grupo imunizado com pcDNA-*SmPGM* e do grupo controle.

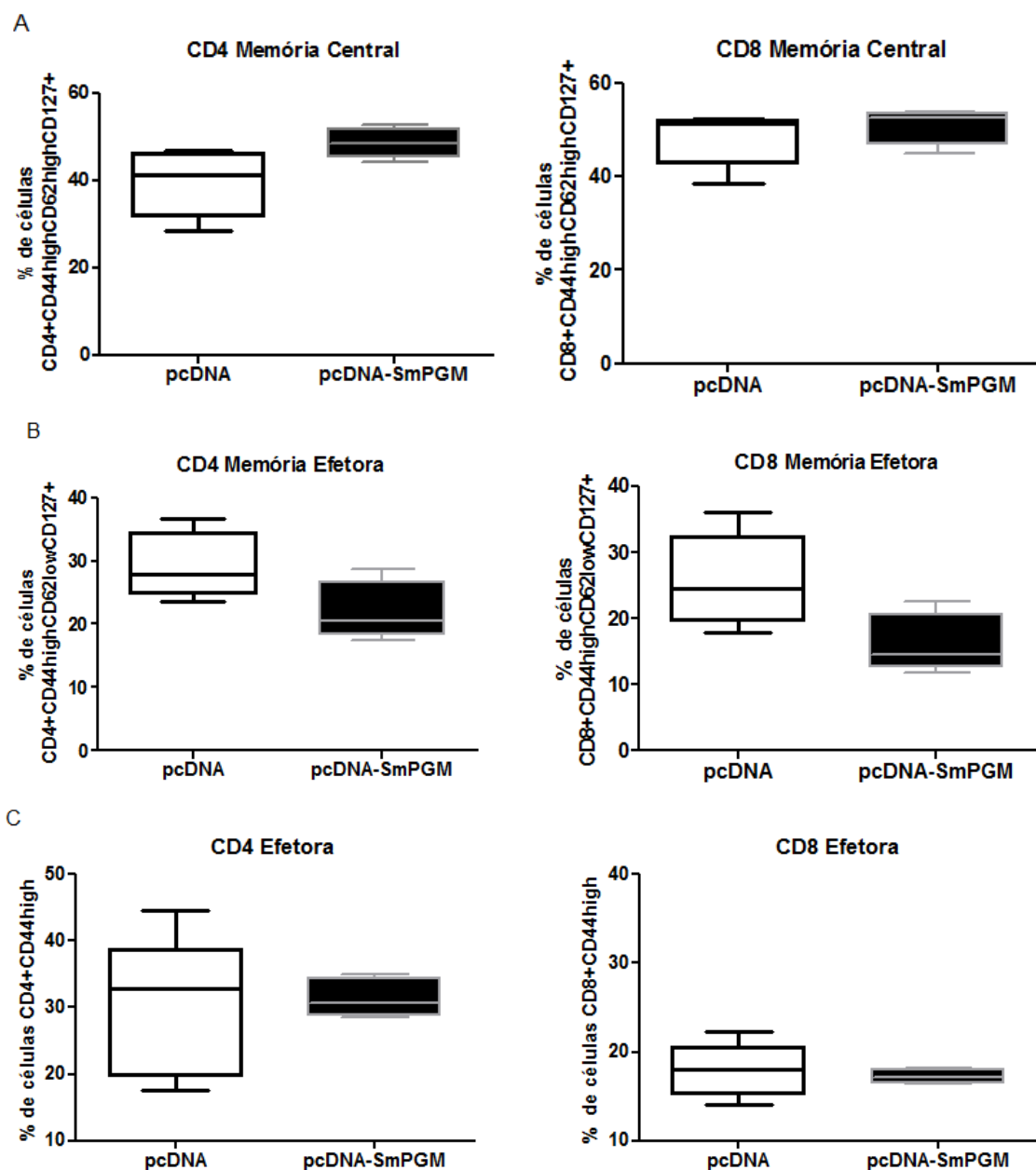


Figura 27: Análise da porcentagem de células CD4+ e CD8+ de memória central, memória efetora e célula efetora.

Células do baço de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* (barras pretas) e pcDNA vazio (barras brancas) foram obtidas para análise de células de memória. As análises estatísticas foram realizadas com teste não paramétrico utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

5.6.8 Análise do perfil de células produtoras de citocinas induzido pela imunização de camundongos com *SmPGM* na forma de vacina de DNA

Para investigar o perfil de citocinas induzido pelo protocolo de imunização com pcDNA-*SmPGM*, bem como a fonte de células produtoras destas citocinas, foi realizada a marcação intracelular das citocinas IFN- γ , IL-4+ e IL-10+ em células CD4⁺ e CD8⁺ provenientes do baço de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM* (barras pretas) e do grupo controle, imunizados com pcDNA vazio (barras brancas). As figuras 28, 29 e 30

mostram a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , IL-4⁺ e IL-10⁺, respectivamente, quando estimuladas *in vitro* com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242, separadamente, ou com Concanavalina A (Con-a).

É possível observar nestas figuras que a estimulação com os peptídeos derivados de SmPGM não foi capaz de induzir uma alteração estatisticamente significativa na porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, sejam estas células provenientes de camundongos do grupo controle, ou seja, imunizados somente com o plasmídeo pcDNA vazio, ou imunizados com pcDNA-SmPGM (figuras 28, 29 e 30).

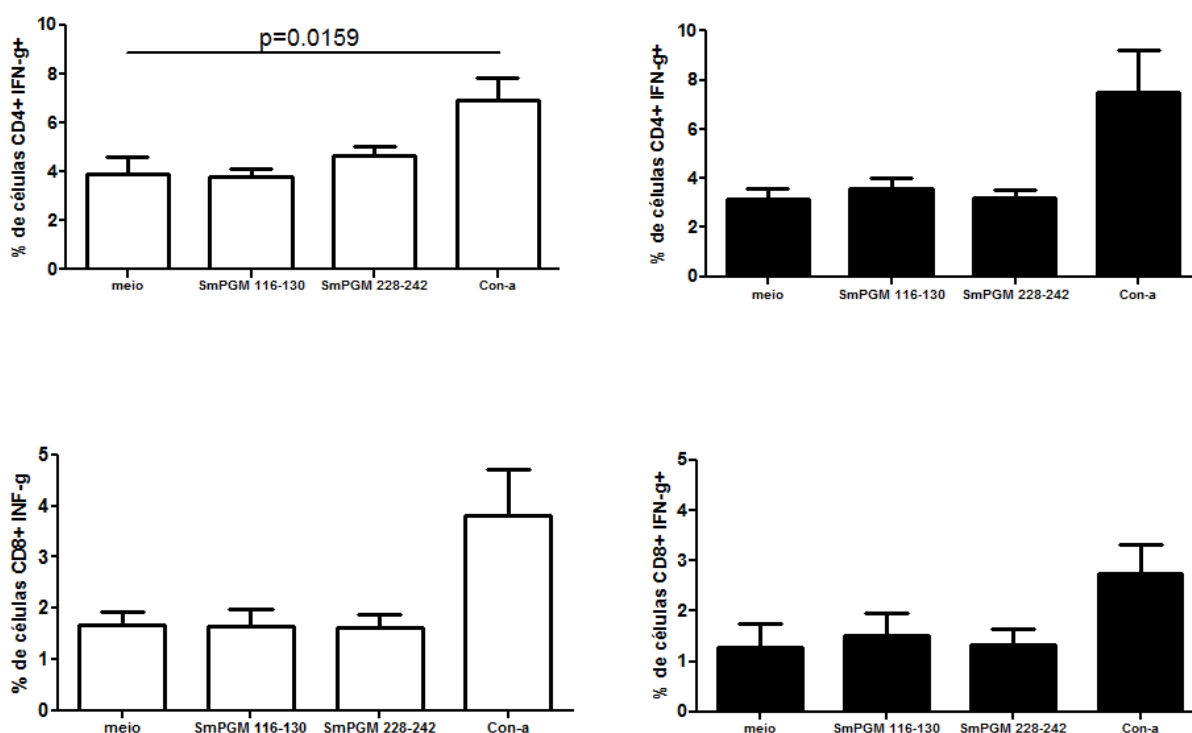


Figura 28: Perfil de células produtoras de IFN- γ .

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (barras brancas) e pcDNA-SmPGM (barras pretas) foram isoladas. Foi determinada a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ estimuladas *in vitro* com SmPGM 116-130, SmPGM 228-242 ou Con-a. As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p. As análises estatísticas foram realizadas com teste *Mann Whitney* utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

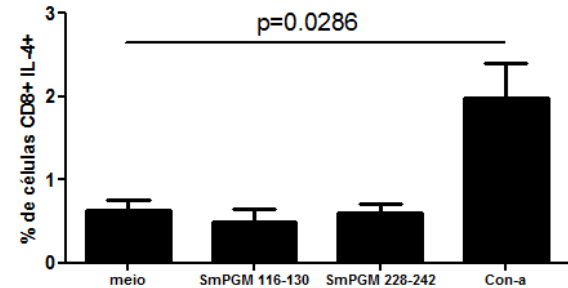
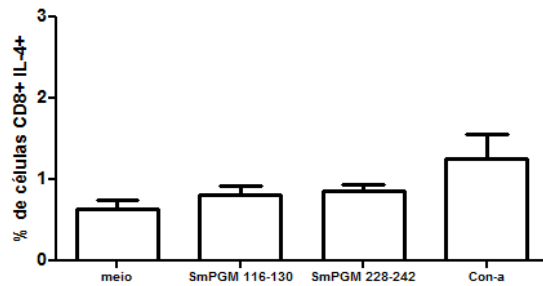
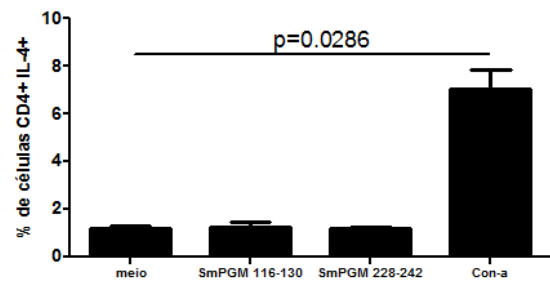
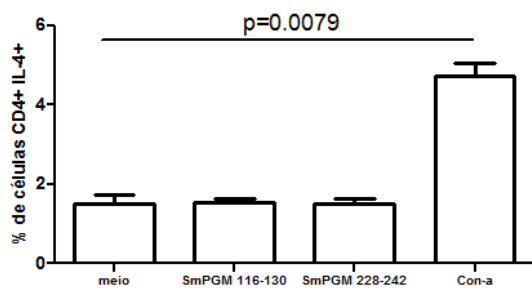


Figura 29: Perfil de células produtoras de IL-4.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (barras brancas) e pcDNA-*SmPGM* (barras pretas) foram isoladas. Foi determinada a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-4 estimuladas *in vitro* com SmPGM 116-130, SmPGM 228-242 ou Con-a. As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p. As análises estatísticas foram realizadas com teste *Mann Whitney* utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

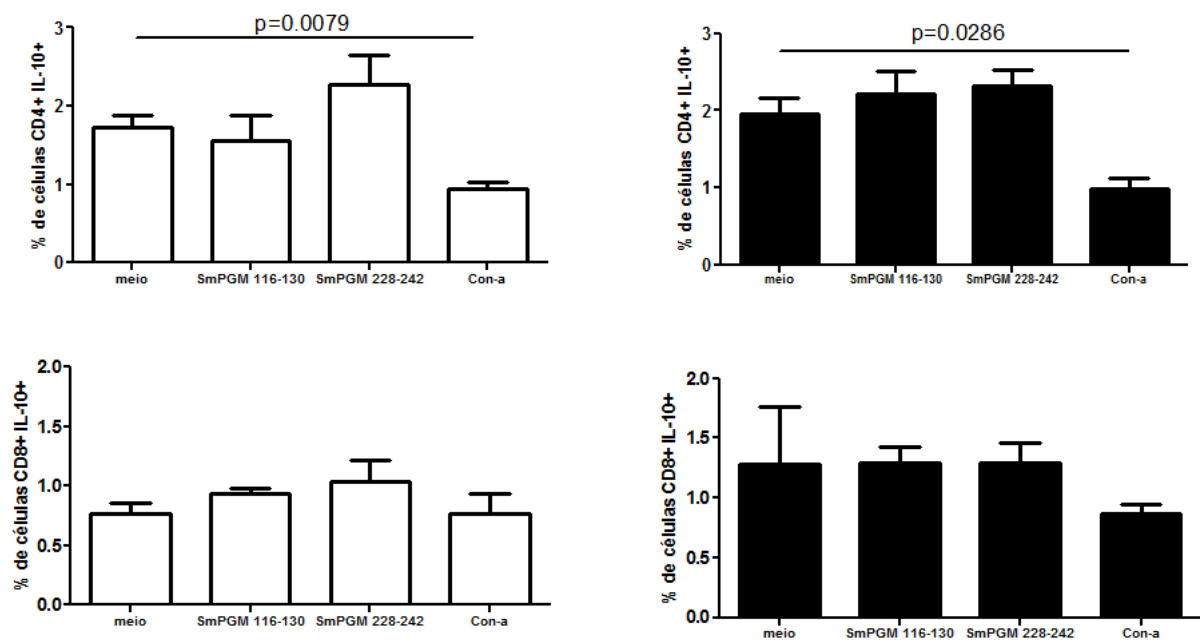


Figura 30: Perfil de células produtoras de IL-10.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (barras brancas) e pcDNA-*SmPGM* (barras pretas) foram isoladas. Foi determinada a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-10 estimuladas *in vitro* com SmPGM 116-130, SmPGM 228-242 ou Con-a. As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p. As análises estatísticas foram realizadas com teste *Mann Whitney* utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

5.6.9 Análise do perfil de citocinas presente no sobrenadante das células produtoras induzido pela imunização de camundongos com *SmPGM* na forma de vacina de DNA

Foi investigado o perfil de citocinas induzido pelo protocolo de imunização com pcDNA-*SmPGM* presente no sobrenadante de cultura de esplenócitos provenientes de camundongos imunizados somente com o plasmídeo pcDNA vazio ou imunizados com pcDNA-*SmPGM*. As figuras 31, 32, 33, 34 e 35 mostram o perfil das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-5 presente no sobrenadante da cultura de células produtoras destas mesmas citocinas quando estimuladas com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242, separadamente, ou com Concanavalina A (Con-a). Na figura 31 é possível observar que houve um aumento significativo na produção de IFN- γ nos dois grupos, imunizados com pcDNA vazio e com pcDNA-*SmPGM*, apenas quando os esplenócitos foram estimulados com Con-a. O mesmo se observa para as citocinas IL-4 e IL-5 (figuras 34 e 35, respectivamente). Já em relação a TNF- α , não houve diferença significativa na produção desta citocina com nenhum dos estímulos utilizados nos dois grupos quando comparada à cultura não estimulada (figura 32). A figura 33 mostra que nos dois grupos, imunizados com pcDNA vazio e com pcDNA-*SmPGM*, houve diferença significativa na produção de IL-2 sob

estímulo de Con-A em relação à cultura não estimulada. Além disso, no grupo imunizado com pcDNA-*SmPGM* também houve um aumento significativo nos níveis de IL-2 produzida por esplenócitos, quando estes foram estimulados com o peptídeo sintético SmPGM 116-130 ($p=0,047$).

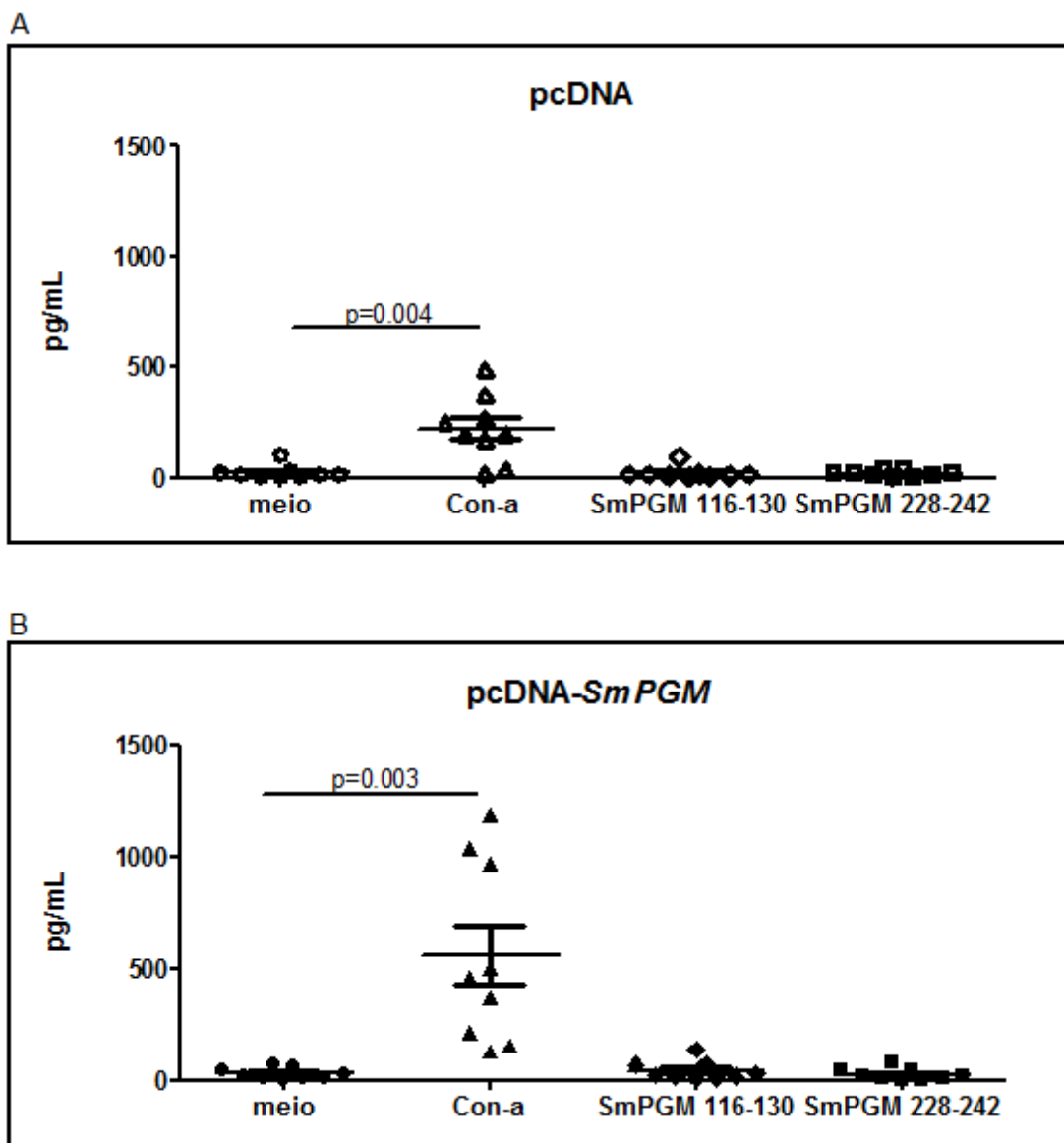


Figura 31: Níveis de IFN- γ no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-*SmPGM*.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (A) e pcDNA-*SmPGM* (B) foram isoladas. Foi determinada a concentração de IFN- γ presente no sobrenadante da cultura de células quando estimuladas com os peptídeos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 ou com Con-a por 24hs. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p .

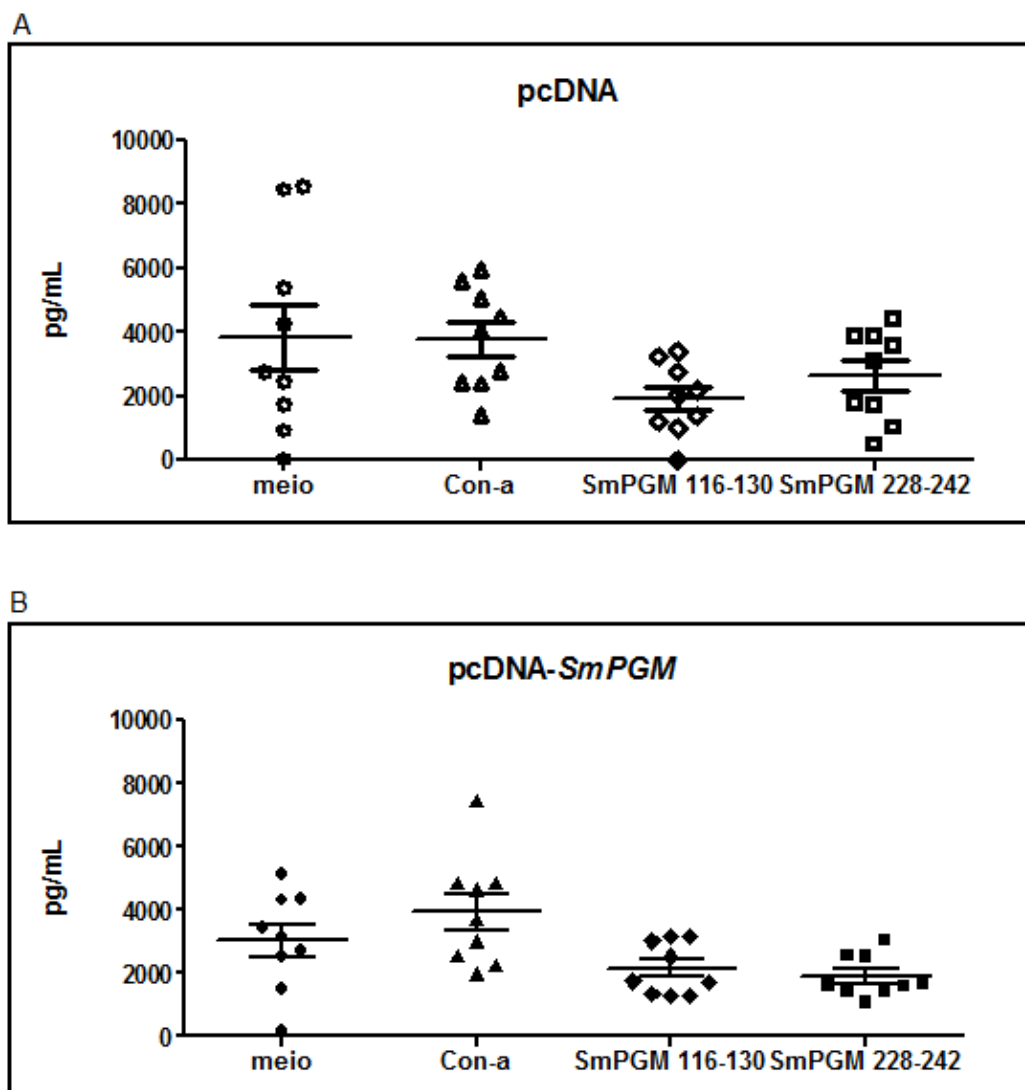


Figura 32: Níveis de TNF- α no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-SmPGM.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (A) e pcDNA-SmPGM (B) foram isoladas. Foi determinada a concentração de TNF- α presente no sobrenadante da cultura de células quando estimuladas com os peptídeos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 ou com Con-a por 24hs.

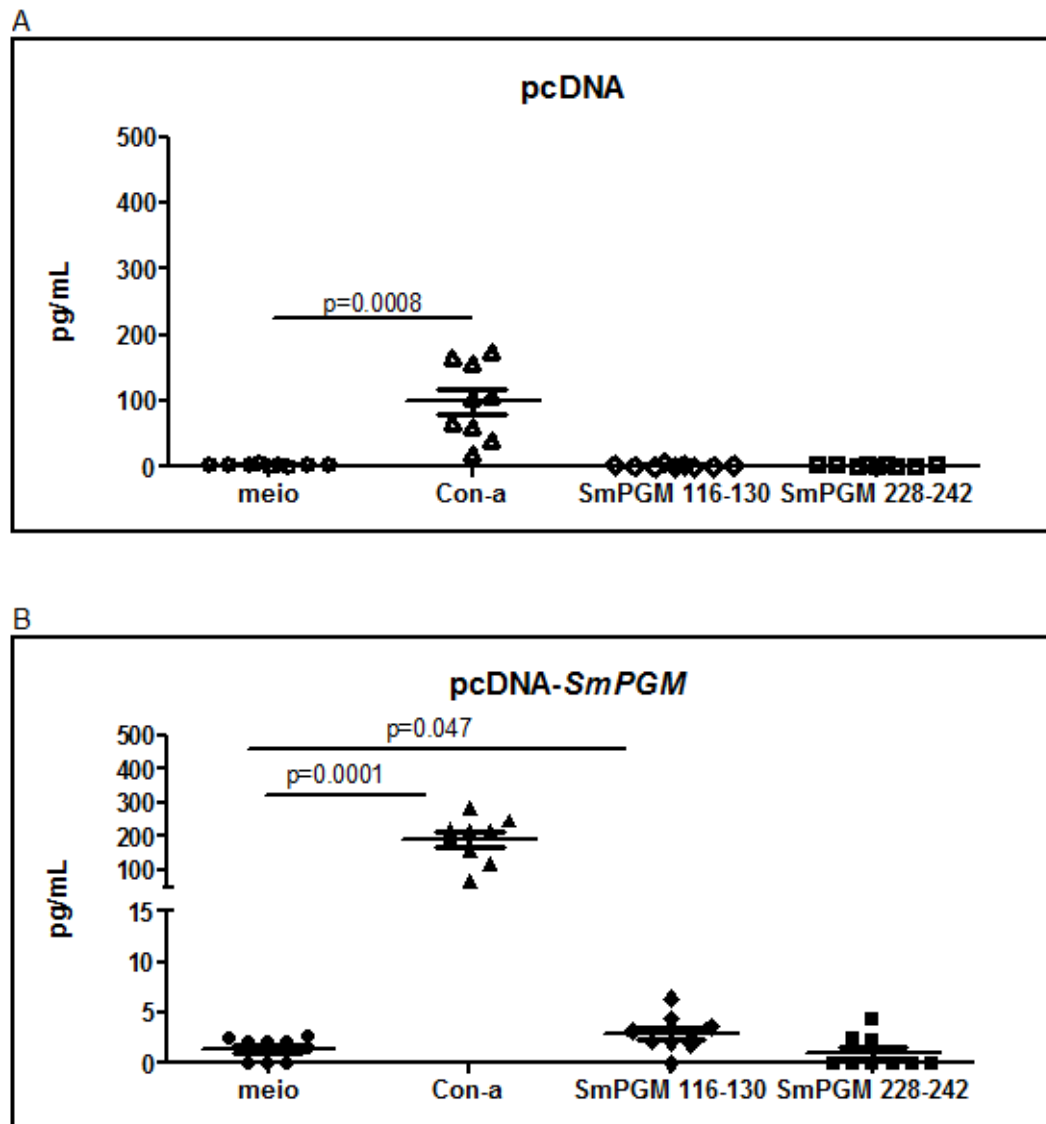


Figura 33: Níveis de IL-2 no sobrenadante da cultura de splenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-SmPGM.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (A) e pcDNA-SmPGM (B) foram isoladas. Foi determinada a concentração de IL-2 presente no sobrenadante da cultura de células quando estimuladas com os peptídeos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 ou com Con-a por 24hs. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p.

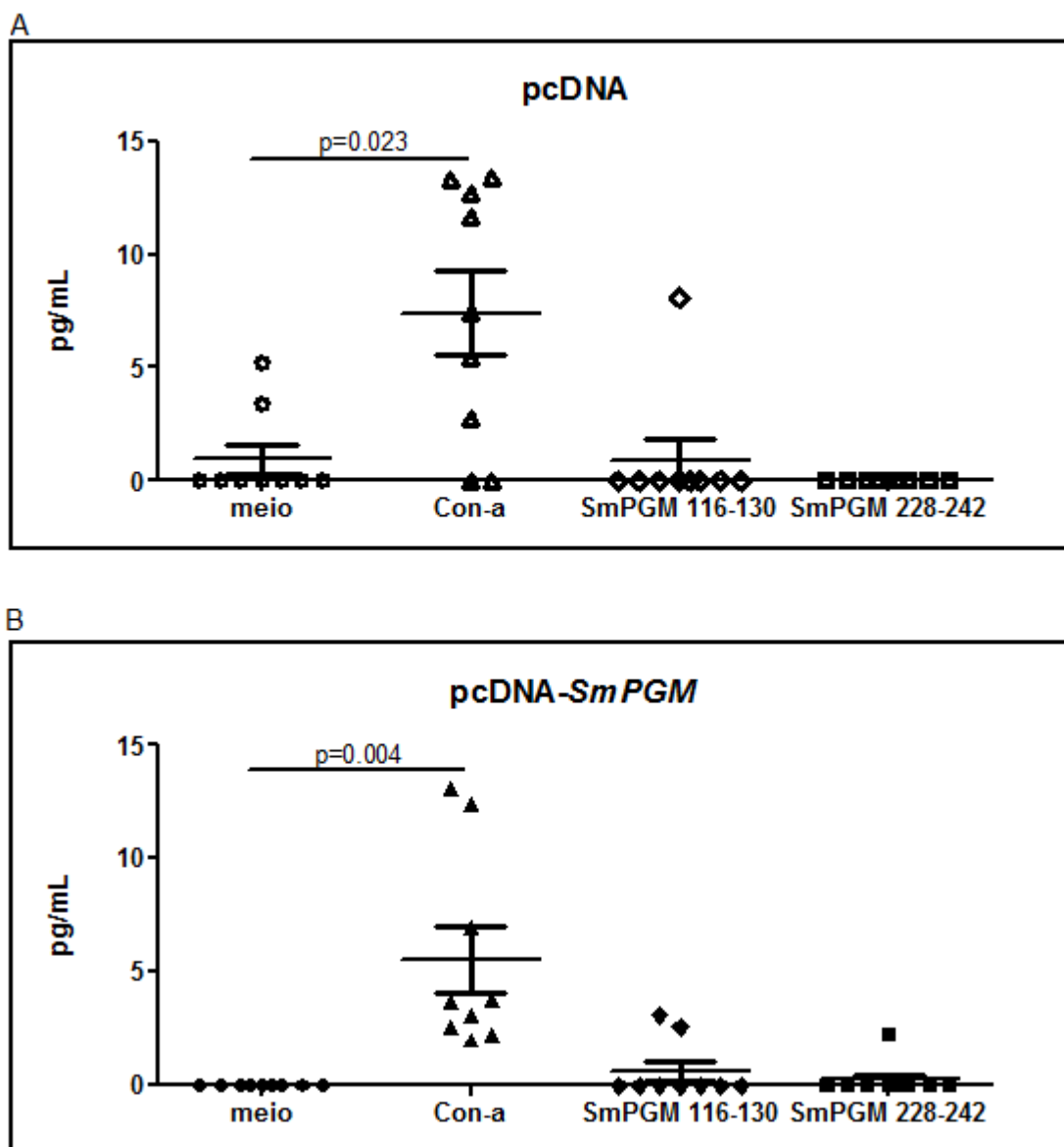


Figura 34: Níveis de IL-4 no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-SmPGM.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (A) e pcDNA-SmPGM (B) foram isoladas. Foi determinada a concentração de IL-4 presente no sobrenadante da cultura de células quando estimuladas com os peptídeos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 ou com Con-a por 24hs. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p.

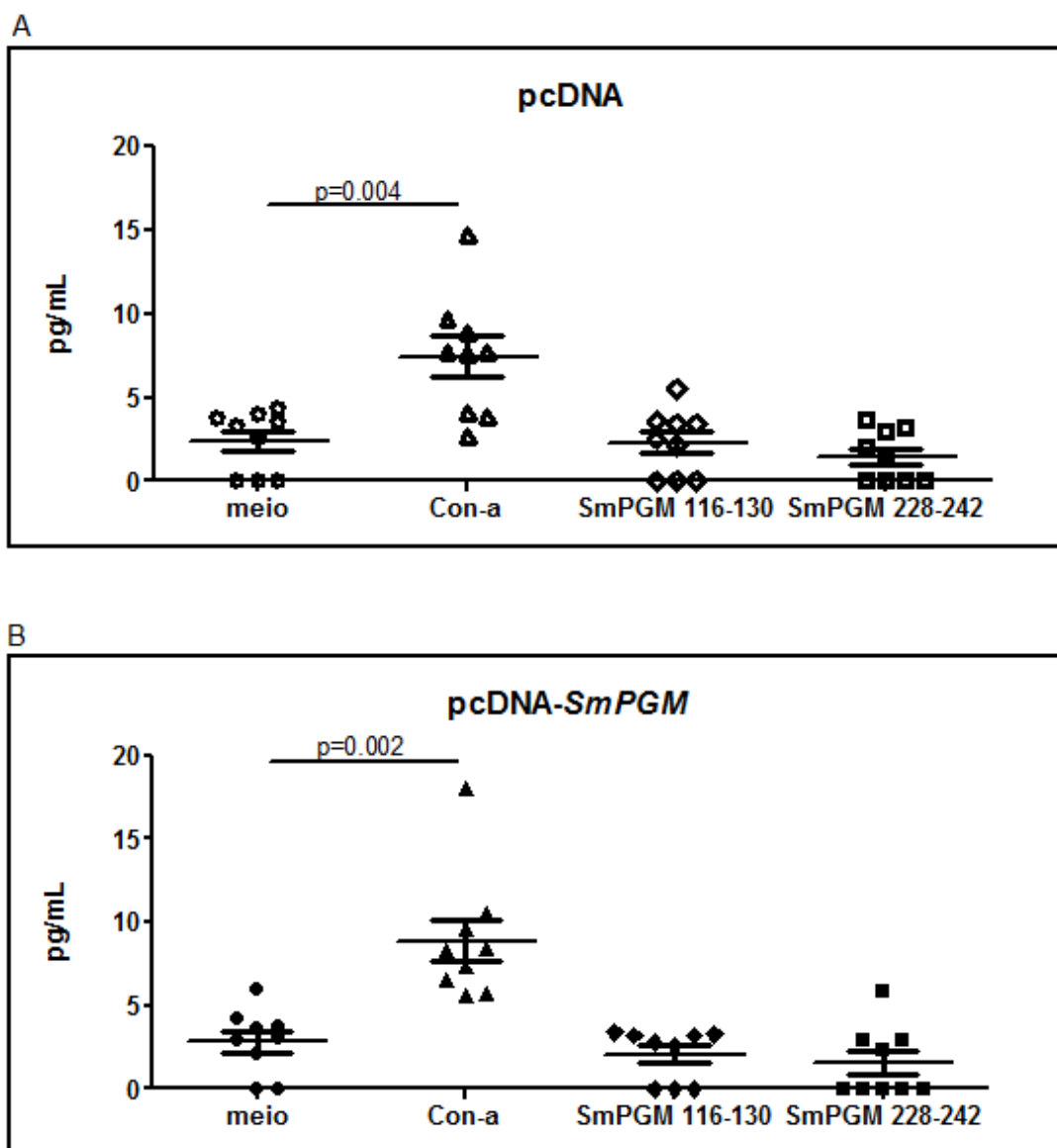


Figura 35: Níveis de IL-5 no sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-SmPGM.

Sete dias após a última dose de imunização, células do baço de camundongos imunizados com pcDNA vazio (A) e pcDNA-SmPGM (B) foram isoladas. Foi determinada a concentração de IL-5 presente no sobrenadante da cultura de células quando estimuladas com os peptídeos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 ou com Con-a por 24hs. Diferenças significativas estão indicadas com uma linha e seu respectivo valor de p.

5.6.10 Área e número de granulomas presentes no fígado de camundongos imunizados com SmPGM na forma de vacina de DNA e desafiados

Seções do fígado de cada camundongo dos grupos controle e experimental, imunizados com pcDNA vazio e com pcDNA-SmPGM, respectivamente, foram coletadas 50 dias após a infecção para avaliar os efeitos da imunização na formação do granuloma. A figura 36 mostra que não há diferença significativa entre a área dos granulomas presentes no fígado de camundongos do grupo controle e imunizado com pcDNA-SmPGM. Além disso,

também não houve diferença significativa entre o número de granulomas presentes nas seções do fígado de camundongos do grupo controle e imunizados (figura 37).

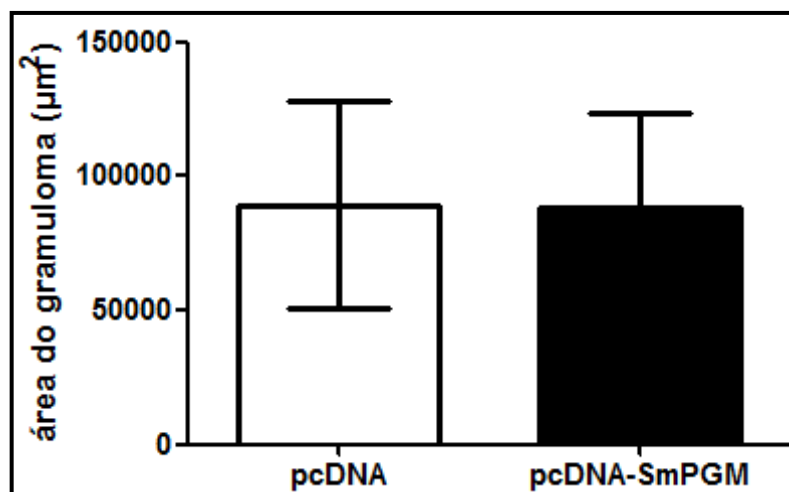


Figura 36: Área de granulomas presentes no fígado de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-SmPGM e desafiados.

As medidas da área dos granulomas (μm^2) foram realizadas a partir de imagens de 100 granulomas/grupo que se encontravam no estágio exudativo-productivo e que continham apenas um ovo com miracídio vivo. As análises estatísticas foram realizadas com Teste t (*Student's t test*) utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

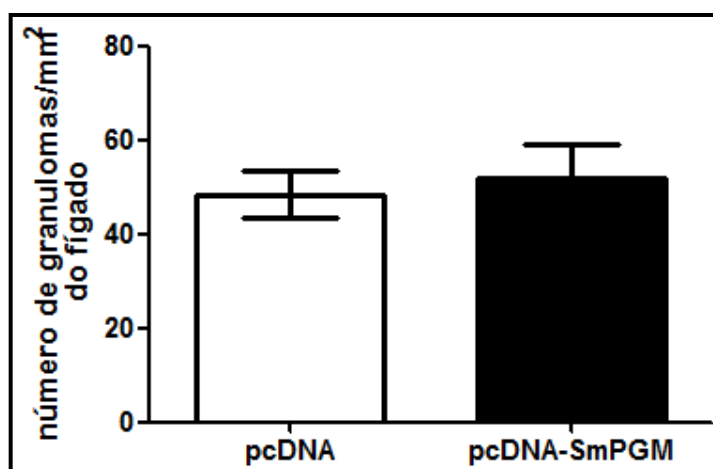


Figura 37: Número de granulomas presentes no fígado de camundongos imunizados com pcDNA ou pcDNA-SmPGM e desafiados.

O número de granulomas por mm^2 foi determinado a partir do número total de granulomas por lâmina de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas com Teste t (*Student's t test*) utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, San Diego California USA*).

5.7 Avaliação da imunidade protetora induzida por peptídeos sintéticos de SmPGM

5.7.1 Recuperação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Uma vez que na forma de vacina de DNA com o gene *SmPGM* não foi observada proteção contra a infecção pelo *S. mansoni*, foram realizados ensaios de imunização utilizando os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242. Estes peptídeos possuem os epitopos preditos de SmPGM para ligação em moléculas de MHC classe II, sendo que o peptídeo SmPGM 228-242 também foi predito como epitopo para linfócitos B, como mostrado nas tabelas 2 e 3. Cada camundongo recebeu três doses contendo 10µg de cada peptídeo associado ao adjuvante completo e incompleto de *Freund*. Após as três imunizações, os camundongos foram desafiados com 100 cercárias e, passados 50 dias da infecção, foram eutanasiados. Na tabela 5 é possível observar que não houve diferença significativa entre o número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com os dois peptídeos sintéticos e desafiados quando comparado com o número de vermes adultos recuperados de camundongos do grupo controle, inoculados somente com PBS e também desafiados, nos dois experimentos realizados.

Tabela 5: Número de vermes adultos recuperados de camundongos imunizados com peptídeos sintéticos de SmPGM e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

Experimento 1						
	Fêmeas		Machos		Total	
	PBS	SmPGM-116-130/ SmPGM-228-242	PBS	SmPGM-116-130/ SmPGM-228-242	PBS	SmPGM-116-130/ SmPGM-228-242
Número de vermes adultos (média ± D.P.)	19,50±7,232	17,50±6,655	23,83±8,565	18,13±8,659	43,33±14,94	35,63±15,03

Experimento 2						
Número de vermes adultos (média ± D.P.)	8,500±5,707	7,000±4,320	9,375±5,236	9,286±5,648	17,88±10,78	16,29±9,214

5.7.2 Verificação dos estádios de desenvolvimento dos ovos presentes no intestino de camundongos imunizados com peptídeos sintéticos de SmPGM e desafiados

Por meio de análise morfológica por microscopia de luz do intestino dos camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos e do grupo controle, foi observada a presença de ovos em todos os estádios evolutivos nos dois grupos avaliados (dados não mostrados).

5.7.3 Análise dos níveis de IgG total após imunização de camundongos com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242

Amostras de soro dos camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 e do grupo controle foram coletadas até 15 dias após a terceira dose de imunização e utilizadas em um ensaio de ELISA contra os próprios peptídeos sintéticos, separadamente. A figura 38 demonstra que não houve produção de IgG total anti-peptídeos de SmPGM, tanto no grupo de camundongos imunizados quanto no grupo controle, ao longo de todo o experimento.

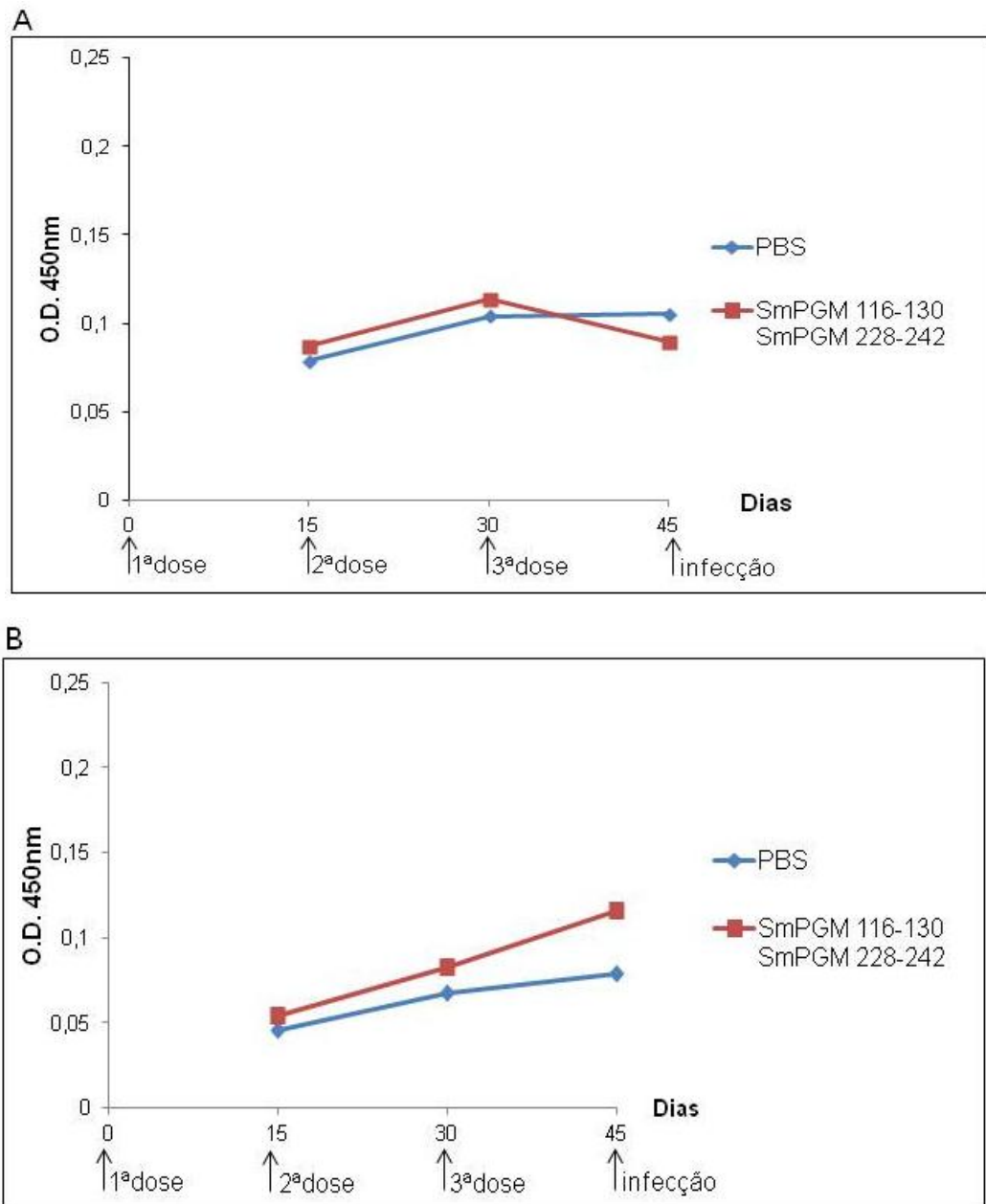


Figura 38: Perfil de produção de IgG total anti-peptídeos de SmPGM induzido por imunização com peptídeos sintéticos.

Camundongos foram imunizados com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242, simultaneamente, ou inoculados com PBS, nos dias 0, 15 e 30. A cada 15 dias após a primeira dose de imunização foram coletadas amostras de soro dos camundongos até o dia 45. Estas amostras de soro foram utilizadas em ensaios de ELISA para detectar a produção de IgG total contra os próprios peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 (A) e SmPGM 228-242 (B). Os resultados estão representados como a média da absorbância a 450nm de cada grupo.

5.8 Comparação do perfil de proteínas de *Schistosoma mansoni* imunorreativas ao pool de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica

Na tentativa de selecionar outros antígenos candidatos à vacina contra esquistossomose foi realizada a extração de proteínas dos parasitos utilizando um protocolo que permite a recuperação de uma fração enriquecida de proteínas de

membranas celulares do verme. Este novo protocolo foi utilizado, uma vez que nos trabalhos anteriores do nosso grupo, dos quais a proteína SmPGM foi selecionada, foram identificadas apenas proteínas antigênicas expressas por vermes adultos de *S. mansoni* de localização citoplasmática ou intracelular (Ludolf *et al.*, 2014). Sendo assim, foi utilizado um protocolo de extração de proteínas através do *2D Fractionation kit* (GE Healthcare) que permite a extração e a solubilização de proteínas presentes nas frações solúvel e insolúvel.

Foi realizado um primeiro experimento de extração e separação por eletroforese bidimensional de proteínas presentes na fração de proteínas insolúveis recuperadas de vermes adultos de *S. mansoni*. Foi obtido um perfil satisfatório de separação de proteínas, podendo ser observado um grande número de *spots* proteicos bem definidos (figura 39).

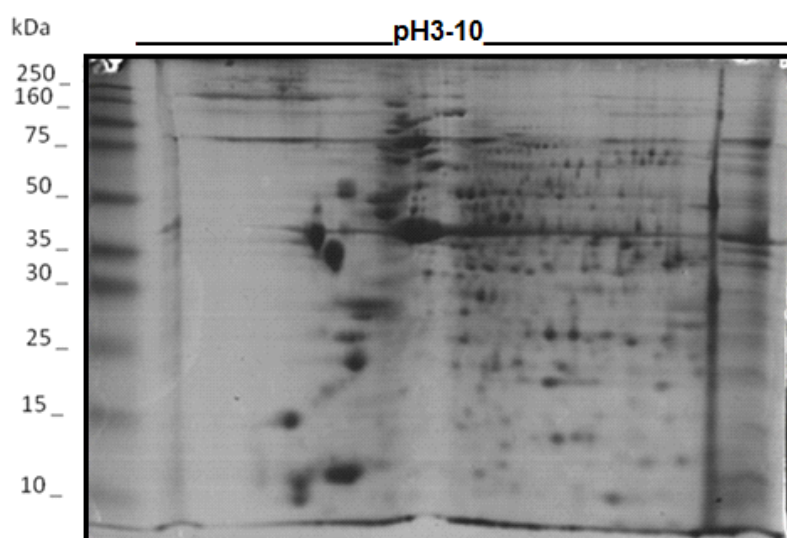


Figura 39: Perfil eletroforético bidimensional de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

100µg de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos foram separadas por eletroforese bidimensional utilizando fitas de IPG de 7cm, pH 3-10 seguido por SDS-PAGE 12,5% corado por azul de coomassie coloidal. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Broad Range* (BioRad).

A presença de proteínas de membrana do tegumento do parasito neste extrato proteico foi demonstrada pela utilização de um anticorpo anti-Sm29 recombinante, gentilmente cedido pelo Dr. Sérgio Costa Oliveira (UFMG), em um ensaio de *Western blotting* bidimensional. Um conjunto de *spots* presentes na porção do gel onde estão focalizadas proteínas ácidas foi fortemente reconhecido pelo anticorpo anti-Sm29, como mostrado na figura 40 (destacado por um círculo).

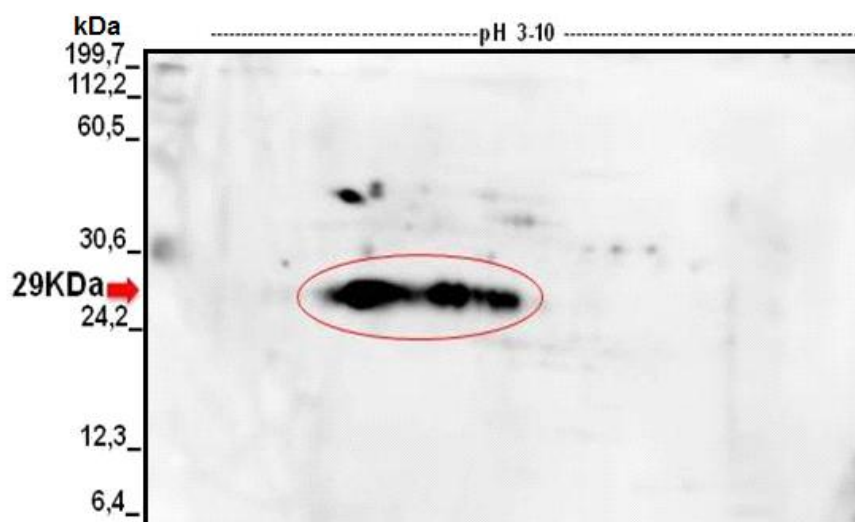


Figura 40: Western blotting bidimensional de proteínas insolúveis de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* utilizando anticorpo anti-Sm29.

100µg de proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional utilizando fitas de IPG de 7 cm, pH 3-10 e SDS-PAGE 12,5%. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-Sm29 (1:500) e com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado à peroxidase (1:50.000). Para revelação foi utilizado o kit *ECL Plus Western blotting Detection* (GE Healthcare). O padrão de massa molecular utilizado foi o *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad).

Foram realizadas outras três extrações de proteínas utilizando este mesmo protocolo e estes extratos foram utilizados em experimentos de *Western blotting* bidimensionais com soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica e, também, com soro de indivíduos não infectados de área não endêmica para esquistossomose. Os experimentos de *Western blotting* bidimensionais com os diferentes soros foram realizados simultaneamente para que fosse possível compará-los e, assim, identificar antígenos reconhecidos pelos anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados e/ou não infectados de área endêmica. Foi possível localizar a maioria das proteínas imunorreativas no 2D-PAGE correspondente corado por Coomassie Coloidal. No entanto, foi observado que existem proteínas pouco expressas pelos vermes adultos de *S. mansoni* e com forte imunorreatividade ao soro, como por exemplo, os *spots* circulados de azul na figura 41, e proteínas visivelmente coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal e com fraca imunorreatividade, como os *spots* circulados de vermelho. Isso demonstra que não existe uma correlação direta entre a quantidade de proteína expressa pelo parasito e o seu grau de antigenicidade. Também foi possível observar que existe um maior número de proteínas imunorreativas com pI acima de 7 e massa molecular entre 19-80 kDa (figura 41).

Nestes experimentos foram detectados *spots* proteicos que reagiram diferencialmente frente aos *pools* de soro utilizados (figura 41), principalmente *spots* que reagiram exclusivamente ao *pool* de soro de indivíduos infectados de área endêmica, sendo bons candidatos ao uso como antígenos para diagnóstico de esquistossomose. Foi possível detectar

spots proteicos que reagiram fortemente ao *pool* de soro de indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose. Foram detectados também *spots* proteicos que reagiram ao *pool* de soro de indivíduos não infectados de área não endêmica para esquistossomose. Entretanto, a maioria apresentou uma menor intensidade de reação quando comparados aos outros *pools* de soro utilizados.

Todos os *spots* imunogênicos aos *pools* de soro utilizados foram localizados e excisados do 2D-PAGE correspondente corado por Azul de Coomassie Coloidal. Os mesmos foram descorados, digeridos com tripsina e dessalinizados para serem identificados por espectrometria de massas.

Foi realizada a identificação dos *spots* proteicos de um dos experimentos de 2D-WB. Entretanto, a lista das proteínas identificadas não será apresentada por recomendação do Núcleo de Inovação Tecnológica do CPqRR (NIT-CPqRR) com vistas a um possível depósito de patentes.

A SmPGM é uma das proteínas antigênicas que foi identificada nestes novos experimentos de 2D-WB, cujo *spot* proteico foi reconhecido por anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica para esquistossomose.

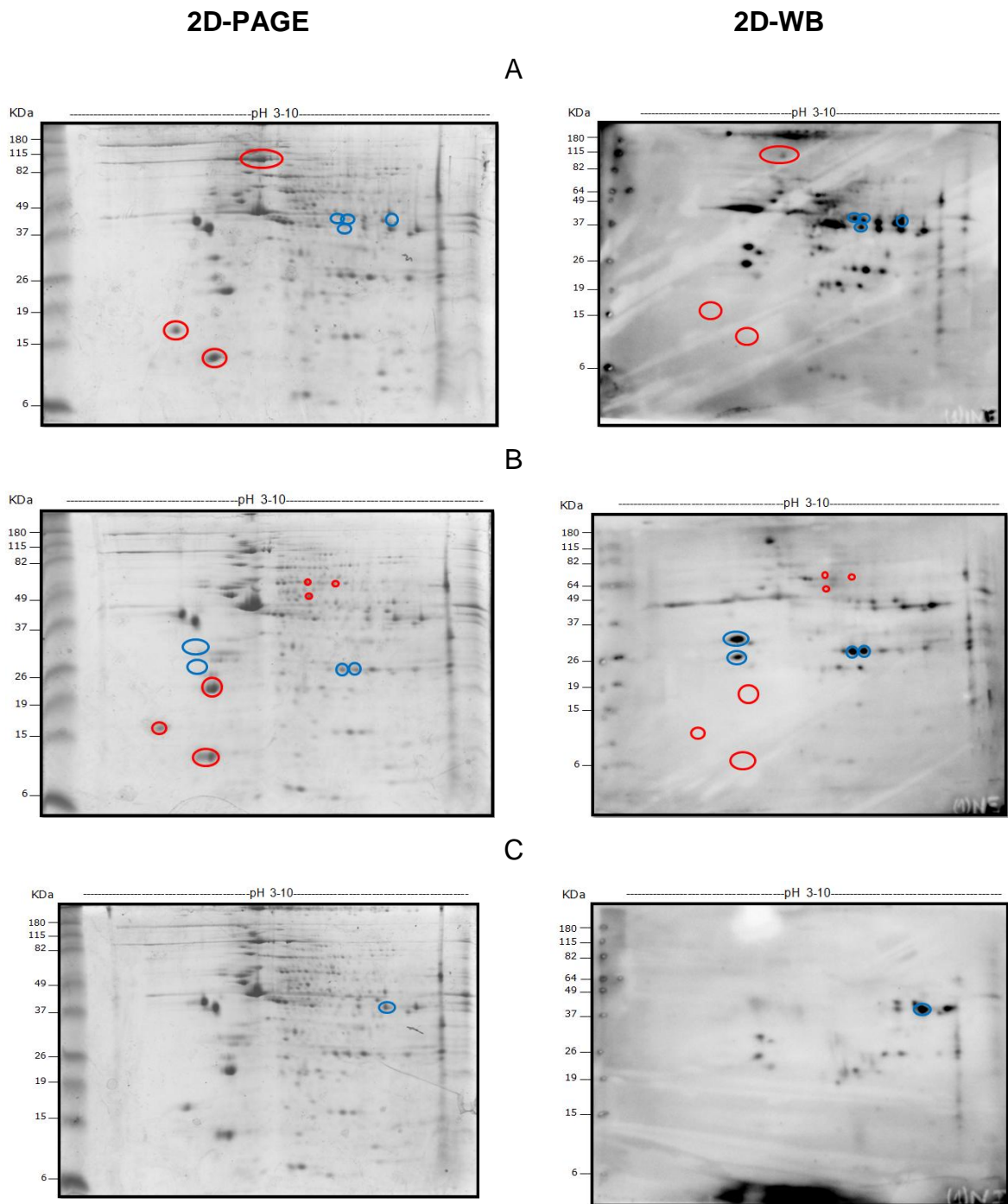


Figura 41: Western blotting bidimensional de proteínas da fração insolúvel de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

100µg de proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional utilizando fitas de IPG de 7 cm, pH 3-10 e SDS-PAGE 12,5% e, em seguida, os géis foram corados por Azul de Coomassie Coloidal (2D-PAGE) ou as proteínas de um outro gel idêntico foram transferidas para membranas de PVDF (2D-WB). As membranas foram incubadas separadamente com os respectivos *pools* de soro diluídos 1:500: A- *pool* de soro de indivíduos infectados; B- *pool* de soro de indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose e C- *pool* de soro de indivíduos não infectados de área não endêmica. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-Ig total humana, conjugado à peroxidase (1:100000). Para revelação foi utilizado o kit *ECL Plus Western blotting Detection (GE Healthcare)*. *Spots* proteicos fracamente corados pelo Azul de Coomassie Coloidal e com forte imunoreatividade ao soro estão circulos de azul e *spots* proteicos visivelmente corados pelo Azul de Coomassie Coloidal e com fraca imunoreatividade estão circulos de vermelho. Esta figura é representativa de três experimentos. O padrão de massa molecular utilizado foi o *BenchMark Pre-Satined Protein Ladder (Invitrogen)*.

6 DISCUSSÃO

A proteína fosfoglicerato mutase de *S. mansoni* (SmPGM) foi selecionada para ser testada como candidata a antígeno vacinal contra esquistossomose a partir dos experimentos de imunoproteoma realizados anteriormente pelo nosso grupo. Na figura 2 foi mostrado que 4 spots proteicos correspondem a SmPGM, diferindo estes apenas em relação ao valor do pI. A diferença observada nos valores de ponto isoelétrico nos géis bidimensionais pode ser explicada pelas possíveis modificações pós-traducionais que esta proteína deve sofrer no parasito (Tese doutorado Fernanda Ludolf: Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* através de análises do proteoma sorológico/maio de 2012).

A proteína SmPGM possui algumas características que nos levaram a selecioná-la para ser testada em protocolos de vacinação em camundongos. Como por exemplo, ser reconhecida por anticorpos presentes no pool de soro de indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose (NE), ou seja, indivíduos que são naturalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni*, uma vez que mesmo em contato com a água contaminada, não apresentam ovos do parasito nas fezes. Além disso, as análises *in silico* sobre o potencial antigênico da SmPGM mostraram que esta proteína está entre as 2,9% das proteínas preditas do genoma de *S. mansoni* que mais possuem peptídeos antigênicos para células B, e que, apesar da sua similaridade com a fosfoglicerato mutase humana, alguns epitopos preditos se localizam em regiões de menor similaridade entre estas proteínas e em regiões possivelmente mais expostas da proteína preditas como sendo regiões formadas por alças. As análises de bioinformática (*SherLoc 2* e *TDR Targets*) indicaram que a SmPGM apresenta localização citoplasmática. No entanto, existem trabalhos, como o do Dias e colaboradores (2014) que avaliaram o potencial da proteína SMYB1 (*Y-box-binding protein*) como alvo vacinal, mesmo esta proteína sendo de localização citoplasmática. Esta proteína participa da regulação da expressão de genes e de diversos processos celulares, como: regulação da transcrição e tradução, proliferação celular, reparo do DNA, resistência à droga e resposta ao estresse. Eles demonstraram que SMYB1 recombinante (rSMYB1) estimula a produção de alto nível de anticorpo específico IgG1 em ensaios de imunização em camundongos. Os camundongos que foram imunizados com rSMYB1 tiveram redução de 26% na carga parasitária e de 28% no número de ovos retidos no fígado. Segundo Dias e colaboradores, embora proteínas do tegumento de vermes adultos sejam consideradas ótimos alvos para o desenvolvimento de uma vacina, seus estudos demonstraram que proteínas citoplasmáticas são capazes de reduzir a carga parasitária de vermes e o número de ovos retidos no intestino e fígado.

A SmPGM é uma enzima que cataliza a conversão do 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato na via glicolítica. Segundo Kelly e Kavanagh (2010), enzimas da via glicolítica como a própria fosfoglicerato mutase e a aldolase são altamente imunogênicas *in natura*.

A enolase, por exemplo, é uma proteína da via glicolítica que já foi utilizada em testes de imunização. A enolase é expressa na superfície de vários parasitos onde age como proteína ligadora de plasminogênio. A enolase de *Schistosoma japonicum* é expressa tanto na superfície quanto nos tecidos internos dos vermes e também apresenta altos níveis de expressão em esquistossômulos. A enolase recombinante de *S. japonicum* funciona como um receptor que é capaz de se ligar ao plasminogênio humano. Em experimentos de imunização de camundongos BALB/c com a enolase recombinante houve uma redução de 24,28% no número de ovos retidos no fígado e redução de 21,45% no número de ovos encontrados nas fezes quando comparados com o grupo controle. Ensaio de ELISA demonstrou que alto nível de anticorpo específico IgG pode ser induzido pela vacinação com enolase recombinante de *S. japonicum* em camundongos (Yang *et al.*, 2010). Também em outros parasitos como as leishmanias, enzimas da via glicolítica têm sido apontadas como bons candidatos vacinais. As proteínas enolase e aldolase de *Leishmania* foram testadas em ensaios de imunização em ramisters que posteriormente foram desafiados. Neste estudo, a imunização com a proteína enolase recombinante resultou em 90% na redução da carga parasitária e aumento de expressão de mRNA de iNOS, IFN- γ , TNF- α e IL-12. O mesmo ensaio foi realizado com a aldolase recombinante, no entanto, esta apresentou menor eficácia profilática. Em seus estudos, estas proteínas foram capazes de mostrar forte capacidade de induzir proliferação de linfócitos e produção significativa de óxido nítrico, além de induzir a produção de citocinas características da resposta Th1: IFN- γ e IL-12. Com estes experimentos, foi demonstrado que as enzimas da via glicolítica enolase e aldolase de *Leishmania* são proteínas capazes de estimular resposta do tipo Th1 (Gupta *et al.*, 2014).

O transcrito de SmPGM foi detectado nas principais formas do parasito que entram em contato com o sistema imunológico do hospedeiro humano, como verme adulto, cercária e esquistossômulo (Figura 9) e, através de análises do proteoma de vermes adultos do *S. mansoni*, foi também demonstrado que a SmPGM está presente no tegumento do parasito (Ludolf *et al.*, 2014; Van Balkom *et al.*, 2005). Ludolf e colaboradores (2014) identificaram a SmPGM na preparação de proteínas do tegumento, assim como também a identificamos no nosso extrato enriquecido com proteínas do tegumento de vermes adultos.

Foram realizadas duas construções com o plasmídeo escolhido: em uma delas, a região codificadora de SmPGM teve seu último nucleotídeo deletado, conseqüentemente o códon de parada foi mutado para que a sequência da região codificadora de SmPGM ficasse em fusão

com as 6xHis do plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B (Figura 17). Esta construção foi realizada com o objetivo de verificar a expressão proteica em cultura de células de mamíferos, uma vez que este vetor possui um forte promotor (CMV) para garantir altos níveis de expressão proteica nestas células. Na outra construção, a região codificadora manteve-se com o códon de parada, então, não estava em fusão com as histidinas do plasmídeo. Esta construção foi realizada para ser utilizada nos ensaios de imunização gênica. As duas construções foram transfectadas em células HEK 293T através de lipossomos para detectar a expressão da proteína SmPGM. A construção pcDNA 3-RFP, que codifica a proteína vermelha fluorescente (RFP), foi utilizada como controle positivo da transfecção, uma vez que sob excitação com luz ultravioleta esta proteína emite luz vermelha (figura 18). Foi obtida uma eficiência satisfatória de transfecção, chegando a 65%. Sendo assim, o extrato proteico das células transfectadas foi obtido e utilizado no ensaio de *Western-blotting* com anticorpo anti-histidina. Uma vez que foram detectados altos níveis de expressão da SmPGM com a construção que possui a fusão com as 6xHis, inferimos que também houve expressão de SmPGM quando foi utilizada a construção na qual a sequência não está em fusão com 6xHis, uma vez que a sequência da região codificadora nestas construções se diferem em apenas um nucleotídeo do códon de parada de tradução. Portanto, a construção na qual foi mantido o códon de parada de tradução da SmPGM foi utilizada no protocolo de vacinação gênica, evitando assim qualquer influência do epitopo formado pelas histidinas e também do epitopo V5, ambos presentes no vetor de expressão, sobre os resultados obtidos nos ensaios de imunização.

Foram realizados dois ensaios independentes de imunização e desafio de camundongos na forma de vacina de DNA. No entanto, por nenhum dos parâmetros analisados foi observada a aquisição de imunidade protetora contra a infecção pelo *S. mansoni* induzida por SmPGM utilizando o protocolo de vacinação gênica. Isto é, o número de vermes adultos recuperados de camundongos do grupo imunizado e controle não foi diferente, assim como não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de ovos retidos no fígado e intestino entre os grupos, o parâmetro fecundidade da fêmea adulta não foi diferente entre os grupos, o número de ovos presente nas fezes também não foi estatisticamente diferente entre os grupos analisados, bem como o número e a área de granulomas não foram estatisticamente diferentes no grupo imunizado em relação ao grupo controle. A ausência de proteção contra infecção pelo *S. mansoni* observada nos experimentos de imunização com pcDNA-SmPGM pode ter ocorrido por algumas razões, dentre elas: a proteína pode realmente não ter sido capaz de induzir proteção, a estratégia vacinal utilizada não foi a ideal ou que houve uma baixa expressão da proteína. Segundo Levy e colaboradores

(1996), na imunização gênica via intramuscular, uma desvantagem é que o DNA plasmidiano é liberado no meio extracelular, exatamente no local onde a maioria do DNA é rapidamente degradado pelas nucleases, deste modo, já há uma perda inicial do DNA. Somente uma parte do DNA plasmidiano injetado é internalizado pelas células e que impacta no sucesso na transfecção (Ulmer, 2006). É possível aumentar os níveis de proteção associando um adjuvante na formulação vacinal ou realizando um reforço da vacinação (*primer boost*). Além disso, também é possível realizar ensaio de imunização utilizando a própria SmPGM como proteína recombinante, que será realizada futuramente pelo nosso grupo.

Outros trabalhos também utilizaram a estratégia de imunização com vacina de DNA para testar sua eficácia na infecção contra *S. mansoni*. Por exemplo, Saber e colaboradores (2013) avaliaram a eficácia da vacina de DNA, na qual o gene que codifica a frutose-1,6-bisfosfato aldolase (SMALDO) está inserido no vetor pcDNA 3.1/V5-His TOPO-TA, e inocularam em camundongos por via intramuscular (IM), sub-cutânea (SC) e intraperitonal (IP). Realizaram 4 doses de imunização (50 µg/dose/camundongo) e 2 semanas após a última dose, os camundongos foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*. Em suas análises, foram detectados títulos mais altos de anticorpos IgG no soro de todos os grupos vacinados quando comparados com o grupo controle. A via de administração IP e SC resultaram em uma significativa redução da carga parasitária. Na via IP houve também redução no número de ovos retidos no fígado e intestino, além de ser a via que apresentou maior redução no número e diâmetro dos granulomas e significativo aumento de miracídios mortos. O número de ovos mortos aumentou nas vias IP e IM. Enfim, foi concluído que via de administração da vacina de DNA influencia a eficácia da vacinação.

Romeih e colaboradores (2008) também utilizaram a estratégia de vacina de DNA para testar a eficácia da imunização contra a infecção pelo *S. mansoni* egípcio. Neste estudo eles desenvolveram uma vacina de DNA multivalente, a *Sm21.7-SmFim/pBudCE4.1* e avaliaram sua eficácia imune. Esta vacina multivalente foi inoculada em camundongos que posteriormente foram infectados com *S. mansoni* e detectou-se que houve um nível de proteção de 56% em relação à diminuição na carga parasitária e de 41,53% e 55,63% de redução do número de ovos no fígado e intestino, respectivamente. Além disso, também houve diminuição do número e tamanho dos granulomas. Os ensaios também indicaram que os camundongos imunizados apresentaram IgGs específicas contra *Sm21.7-SmFim/pBudCE4.1*.

Chlichlia e colaboradores (2002) também realizaram imunização no pavilhão auricular dos camundongos utilizando vacina de DNA com uma construção na qual havia o gene que codifica a asparaginil endopeptidase (Sm32) inserido no vetor de expressão

pCDNA3.1/V5/His-TOPO. A vacina de DNA afetou a fecundidade das fêmeas (redução de 37%) e induziu uma resposta de anticorpos específicos, mas não alterou a carga parasitária. Também foi detectado um aumento de peso dos camundongos imunizados quando comparados com o grupo controle.

Apesar de existirem trabalhos nos quais o protocolo de imunização com vacina de DNA resultou em proteção contra a infecção por *S. mansoni*, alguns estudos mostram que tal estratégia não foi a ideal. Esta pode ter sido uma das causas da ausência de proteção observada no nosso trabalho. Isto ocorreu nos estudos de Pacífico e colaboradores (2006) onde a proteína Sm22,6 foi utilizada como vacina de DNA e também foi produzida na sua forma recombinante (rSm22,6) para ser testada em camundongos contra a infecção por *S. mansoni*. Somente a vacinação com rSm22,6 resultou em níveis previstos de proteção contra a infecção de 34,5% na redução da carga parasitária. Além disso, o nível de produção de IgG1 e IgG2a foi maior do que o induzido pela vacina de DNA. A produção de IFN- γ e IL-4 em cultura de esplenócitos e um maior nível de IgG1 confirmaram a indução de uma resposta imune mista após a imunização com rSm22,6. Neste trabalho, a vacina de DNA foi ineficaz e talvez isso possa ser explicado pelo fato dos títulos de anticorpos produzidos serem insuficientes para induzir proteção contra *S. mansoni* (Pacífico e colaboradores 2006).

Moelling (1998) acredita que a vacinação com DNA é provavelmente mais simples e mais barata do que as preparações de proteínas convencionais e isso aumenta a esperança em seu uso contra as doenças infecciosas em países em desenvolvimento. Além disso, o estudo em imunização gênica é muito interessante para ser testada contra parasitos infecciosos, principalmente porque é capaz de induzir resposta imune celular e humoral (Kofta, 2001).

Utilizando peptídeos sintéticos de SmPGM em ensaios de ELISA foi observado que mesmo no grupo de camundongos imunizados com pCDNA-SmPGM não houve produção de anticorpos IgG total anti-SmPGM. Em ratos, IgG2a contra o parasito schistosoma é relatado como anticorpo letal (Horta *et al.*, 1987). Utilizando camundongos *knockout* de células B (KO) Jankovic e colaboradores (1999) demonstraram que uma vacinação efetiva contra schistosomas depende da indução simultânea de imunidade celular e humoral. Isso foi concluído uma vez que após uma única dose de vacinação em camundongos KO, a proteção contra *S. mansoni* foi reduzida, embora a produção da citocina IFN- γ estivesse normal. Além disso, a segunda e terceira doses aumentaram significativamente o nível de proteção em camundongos selvagens e já em camundongos nocauteados (KO) os níveis de proteção permaneceram inalterados. Outro trabalho que também mostra a importância dos anticorpos na imunidade induzida por vacina é o do Le e colaboradores (2014). Neste trabalho, foi realizada uma imunização utilizando simultaneamente a proteína recombinante Sm-p80 (rSm-

p80) e vacina de DNA Sm-p80-VR1020. Neste ensaio em apenas 4 semanas foi possível observar títulos de anticorpos IgG e seus subtipos. Títulos de IgG2a (subtipo típico de resposta Th1) e de IgG2b (subtipo típico de resposta Th2) permaneceram altos, indicando a coexistência de respostas Th1 e Th2, as quais podem ter sido induzidas pela imunização com vacina de DNA e de proteína recombinante, respectivamente.

Nos estudos de Torben e colaboradores (2012), o papel da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) foi decifrada pela proteção desenvolvida por Sm-p80 especialmente na eliminação de esquistossômulos de fase pulmonar. Neste trabalho foi detectada perda da motilidade e morte dos esquistossômulos, relacionada diretamente com a produção de NO. Os estudos com a vacinação com Sm-p80 mostraram que os animais imunizados apresentaram produção predominante de IL-12 e IFN- γ . Estes são ativadores de macrófagos e células endoteliais, as quais estão envolvidas na morte de esquistossômulos de fase pulmonar através da produção de óxido nítrico (Ahmed *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). As células T apresentam um papel importante na estimulação de secreção de citocinas. Célula Th1, por exemplo, produz IFN- γ que é a principal citocina ativadora de macrófagos. Enfim, a produção de NO e ADCC por células aderentes é um importante fator na proteção mediada por Sm-p80 (Torben *et al.*, 2012). Outros estudos sugerem o papel dos macrófagos e eosinófilos em ADCC na morte de esquistossômulos em camundongos, ratos e humanos. Eles mostraram ser capazes de danificar o esquistossômulo *in vitro* (Nutten *et al.*, 1999; Keating *et al.*, 2006). Teixeira de Melo e colaboradores (2014) também investigaram o papel dos anticorpos produzidos após a imunização com Smtg na morte dos parasitos *in vitro* e *in vivo* e demonstraram que estes anticorpos são capazes de reconhecer e se ligar na superfície dos esquistossômulos recentemente transformados e transferir proteção para um camundongo *naive*. Isto demonstra que as proteínas da superfície dos esquistossômulos são constituintes da preparação de Smtg e sugere que estes anticorpos podem estar envolvidos na eliminação do parasito por ativação do complemento ou por ADCC.

O protocolo de vacinação com pcDNA-SmPGM foi capaz de induzir ativação de células CD4⁺ CD25⁺, indicando que a proteína foi expressa nas células dos camundongos imunizados. Porém, a síntese de SmPGM pelas células transfectadas deve ter sido baixa, uma vez que não foi capaz de induzir uma alteração no perfil de células CD4⁺ e CD8⁺ de memória central, memória efetora ou células efetoras. O CD25 é um marcador de ativação celular que é receptor da IL-2, a qual induz a proliferação celular. A partir desta proliferação, a célula é capaz de produzir citocinas (Létourneau *et al.*, 2009). Uma vacina de DNA apresenta um DNA plasmidiano que contém o gene de interesse que codificará o antígeno, o qual entrará em contato com o sistema imune do organismo. Este primeiro contato irá desencadear uma

resposta imune primária contra esse antígeno o que, conseqüentemente, levará à produção de células de memória. Estas células de memória são essenciais para que se o organismo entrar em contato com esse antígeno novamente, será induzida uma resposta imune secundária rápida e específica contra esse antígeno antes mesmo que apareçam os sintomas (Kaech *et al.*, 2002). Desse modo, a vacina é capaz de gerar uma memória imunológica, o que possibilita uma proteção de longa duração. Uma outra possível explicação para a vacinação com pcDNA-*SmPGM* não ter induzido proteção contra *S. mansoni* pode ter sido a ausência de células de memória.

Muitos trabalhos em esquistossomose utilizando imunização gênica, vacinação com peptídeos ou proteínas recombinantes tiveram um perfil de resposta Th1 predominante com alta produção de IFN- γ associado com imunidade protetora (Fonseca *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2004). Com relação à produção de citocinas, houve um aumento significativo apenas no nível de IL-2 no sobrenadante da cultura produzida por esplenócitos de camundongos imunizados com pcDNA-*SmPGM*, quando estes foram estimulados com o peptídeo sintético SmPGM 116-130. A estimulação com os peptídeos derivados da proteína SmPGM não foi capaz de induzir produção significativa de citocinas por células T CD4+ e CD8+. E isto também contribuiu para que não fosse observada nenhum tipo de proteção induzida pela SmPGM, uma vez que a produção de citocinas é fundamental em uma resposta imune inflamatória contra o *Schistosoma*. As células T CD4+ são fundamentais, pois ativam e contribuem com os macrófagos para a destruição dos microorganismos a partir das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α , além de ativarem outras células como linfócitos B. (Elliott *et al.*, 2003; Kalinkovich *et al.*, 1998; Sher *et al.*, 1991).

Embora a imunização gênica com pcDNA-*SmPGM* não tenha sido capaz de induzir proteção contra *S. mansoni* em nossos ensaios, Wilson e Coulson (2009), assim como outros pesquisadores, acreditam que uma única “proteína mágica” não deve ser um alvo suficientemente eficaz para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Isto é, acredita-se que o ideal seja um conjunto de antígenos para induzir proteção.

Diante dos resultados obtidos com a vacinação gênica, optamos por selecionar dois peptídeos sintéticos imunogênicos da sequência da SmPGM para serem utilizados em outros dois ensaios de imunização. Esta seleção foi feita a partir do programa *BCPred*, o qual prediz epitopos de células B lineares. Foram preditos 5 epitopos de 15 aminoácidos e 4 epitopos de 16 aminoácidos, todos com *score* próximos de 1, conforme já foi mostrado na tabela 2. Os primeiros epitopos preditos de *score* 1 de 15 e 16 aminoácidos são iguais, diferindo apenas em um aminoácido (RRAYDIPPPPVDISD). Desta maneira, ele foi um dos escolhidos para ser usado nas imunizações. De acordo com Wang e colaboradores (2011), *scores* positivos são

indicativos de bons epitopos. O epitopo que se inicia na posição 10 apresenta alto grau de similaridade com a sequência de SmPGM humana, sendo 13 aminoácidos idênticos, dentre os 16 aminoácidos analisados. Por isso, este epitopo não seria um bom alvo candidato à vacina contra esquistossomose humana, no caso de uma formulação constituída de peptídeos sintéticos, sendo os epitopos que se iniciam nas posições 144 e 165, os melhores candidatos para tal finalidade. Para a predição de epitopos ligantes de MHC classe II para o haplótipo I-Ab de camundongos C57BL/6 utilizou-se a ferramenta *Rankepep* e foram utilizados 4 epitopos para montagem de um peptídeo predito de 15 aminoácidos (YYLADEATVAAAIAR), o qual foi o segundo peptídeo a ser utilizado nas imunizações. De maneira interessante, o *Rankepep* fez a predição de 2 epitopos que também fazem parte do peptídeo predito para células B. É interessante trabalhar com os epitopos que estão presentes nas alças da estrutura da proteína, pois elas são estruturas que geralmente estão mais externamente localizadas na proteína (Farinha-Arcieri, 2008; Vieira; Chies 2008). Tais epitopos podem ser importantes para o reconhecimento por anticorpos, sendo essenciais para desencadear uma resposta imunológica humoral (Yuan *et al.*, 2009; Mesquita-Junior *et al.*, 2010). Dos epitopos que foram utilizados nas imunizações deste trabalho, somente o SmPGM 116-130 está localizado totalmente em alças da proteína. Já o SmPGM 228-242 está localizado quase que totalmente em α -hélices.

Nos ensaios de imunização utilizando dois peptídeos sintéticos, não houve indução de proteção, como observado para os parâmetros analisados: carga parasitária e produção de IgG total. A análise morfológica por microscopia de luz dos ovos retidos no intestino dos camundongos imunizados (imunização gênica ou de peptídeos) e do grupo controle foi observada e detectou-se a presença de ovos em todos os estádios evolutivos, indicando que nenhum dos dois protocolos de imunização induziu alteração na cinética de ovoposição das fêmeas de vermes adultos.

Uma vacina ideal para a esquistossomose deveria também atuar afetando a fecundidade da fêmea, conseqüentemente, reduzindo o número de ovos eliminados nas fezes para que a transmissão da doença reduzisse. Também seria benéfico se a vacinação interferisse na reação granulomatosa, uma vez que o granuloma está relacionado com a intensidade da morbidade da doença (Jurberg *et al.*, 2008). Araújo e colaboradores (2012) acreditam que o sucesso de uma formulação vacinal depende do uso de antígenos imunogênicos junto com um adjuvante capaz de induzir uma resposta inflamatória que irá polarizar a resposta para um perfil desejável. O adjuvante, além de induzir resposta imune, também aumenta a meia-vida do antígeno, o que melhora a captação pelas células fagocíticas, pois libera os antígenos lentamente (Amy *et al.*, 2010; Mosca *et al.*, 2008).

Além de testar o potencial imunogênico de SmPGM, neste trabalho associamos a eletroforese e *Western-blotting* bidimensionais para identificarmos antígenos de *S. mansoni* que são reconhecidos pelos anticorpos presentes no soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose. Os antígenos que são reconhecidos somente pelo soro de indivíduos infectados de área endêmica (INF) podem ser candidatos para o diagnóstico da doença e os antígenos reconhecidos somente pelo soro de indivíduos não infectados de área endêmica (NE) podem ser candidatos a novos alvos vacinais para a esquistossomose. Algumas proteínas antigênicas já foram identificadas pelo nosso grupo, mais especificamente, 9 proteínas imunorreativas somente ao soro INF e uma proteína reconhecida apenas pelo soro NE. Neste trabalho realizado pelo nosso grupo foram identificadas proteínas antigênicas capazes de distinguir indivíduos infectados de não infectados de área endêmica (Ludolf *et al.*, 2014). No entanto, uma vez que neste trabalho todas as proteínas identificadas são de localização citoplasmática, adotamos uma nova abordagem que consiste na utilização de extrato proteico enriquecido com proteínas de membrana de vermes adultos de *S. mansoni*, uma vez que acreditamos que estas proteínas sejam fortes candidatas vacinais, pois quando localizadas na membrana externa do tegumento do parasito estão em contato direto com o sistema imune do hospedeiro. Estas proteínas foram separadas por 2-DE, obtendo-se um perfil satisfatório de separação de *spots* proteicos. Inclusive, após a eletroforese bidimensional foi realizada a transferência dos *spots* para uma membrana de PDVF e quando a membrana foi incubada com anticorpo anti-Sm29, houve o reconhecimento da proteína Sm29 no peso molecular esperado de 29kDa. Portanto, este resultado mostrou que utilizando este protocolo de extração de proteínas foi possível obter uma fração enriquecida de proteínas localizadas na membrana do tegumento do parasito, uma vez que a Sm29 está presente no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* (Cardoso *et al.*, 2008). Alguns trabalhos, como do Castro-Borges e colaboradores (2011) também objetivaram a identificação de tais proteínas para selecioná-las como candidatas vacinais. Já foram selecionadas proteínas de membrana como Sm200, Sm25 e três anexinas (CD44, fatores do complemento C3 e C4). A proteína Sm29 também foi usada em testes vacinais, estando localizada na superfície de esquistossômulos de fase pulmonar e de vermes adultos (Cardoso *et al.*, 2008) e também sendo identificada na fração de proteínas de membrana em uma análise do proteoma do tegumento de *S. mansoni* (Braschi *et al.*, 2006; Castro-Borges *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008). Animais imunizados com rSm29 tiveram redução de 31,25% na recuperação de vermes adultos quando comparado com o grupo controle (Cardoso *et al.*, 2008).

Em humanos, a resistência à re-infecção está associada com os anticorpos contra os antígenos da superfície do parasita (Dunne *et al.*, 1992). Segundo Teixeira de Melo (2014),

anticorpos estão envolvidos na eliminação do schistosoma. Em seu trabalho foi realizada a transferência passiva de anticorpos produzidos por camundongos imunizados com Smteg para camundongos. Assim foi demonstrado que os anticorpos foram capazes de se ligar na superfície de esquistossômulos. Tais anticorpos aumentaram a porcentagem de esquistossômulos mortos *in vitro* por ativação do complemento. A transferência passiva de soro diminuiu significativamente a carga parasitária e o número de ovos retidos nos órgãos dos camundongos que receberam o anticorpo anti-Smteg, indicando que os anticorpos tem um papel importante na eliminação do parasito nos camundongos imunizados com Smteg.

Outros géis bidimensionais utilizando o extrato proteico enriquecido com proteínas de membrana de vermes adultos de *S. mansoni* foram confeccionados e os *spots* proteicos foram transferidos para uma membrana de PVDF e incubados com soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose. Os *spots* reconhecidos pelas diferentes amostras de soro foram identificados por espectrometria de massas e a proteína SmPGM foi uma das proteínas imunorreativas ao soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica para esquistossomose. Ambos os *spots* se localizavam na mesma posição nos dois géis, dos quais foram retirados. Estes *spots* referentes à SmPGM correspondem ao *spot* 1 da figura 2, o que concorda com os resultados de Ludolf (2014) e mostra que a composição do novo extrato proteico obtido é diferente do que foi utilizado por estes autores, uma vez que no presente trabalho apenas um *spot* foi identificado como sendo a proteína SmPGM.

O soro de indivíduos não infectados de área não endêmica (NI) para esquistossomose reagiu com alguns antígenos de extrato proteico de vermes adultos de *S. mansoni*. Existem relatos na literatura sobre a reação cruzada entre *S. mansoni* e outras espécies de schistossomas e outros trematódeos (Higon *et al.*, 2011; Boukli *et al.*, 2011 e Zhong *et al.*, 2010). Um exemplo desta reação é que antígenos da *Fasciola hepática* reagiram com o soro de pacientes infectados por esquistossomose crônica (Boukli *et al.*, 2011).

Pretendemos prosseguir com este trabalho identificando os *spots* antigênicos que foram extraídos dos outros experimentos de *Western blotting* bidimensionais que compõem a triplicata experimental. E, a partir destes experimentos, abriremos novas perspectivas ao selecionar proteínas para serem testadas como antígenos para diagnóstico e/ou como alvo vacinal contra esquistossomose.

7 CONCLUSÕES

- A região codificadora de SmPGM foi inserida corretamente no vetor de expressão de proteínas em células de mamíferos, pcDNA 3.1/V5-His B, como comprovado pela detecção da proteína em fusão com 6x-His (C-term) no extrato de células de cultura transfectadas com este mesmo plasmídeo;
- O antígeno SmPGM e/ou a estratégia de vacinação gênica não induziu proteção contra a infecção por *Schistosoma mansoni*, apesar da proteína ter sido expressa nos camundongos imunizados, uma vez que houve ativação de células CD4+CD25+;
- A imunização com os peptídeos sintéticos SmPGM 116-130 e SmPGM 228-242 de SmPGM também não foi capaz de induzir proteção contra infecção por *Schistosoma mansoni* de acordo com os parâmetros já analisados;
- O protocolo utilizado para extração de proteínas insolúveis de vermes adultos de *S. mansoni* mostrou ser eficiente para a obtenção do extrato proteico enriquecido com proteínas de membrana do parasito, uma vez que foi detectada neste extrato a presença da proteína Sm29;
- Proteínas desta nova preparação de extrato proteico de vermes adultos de *S. mansoni* reagiram diferentemente aos *pools* de soro de indivíduos infectados e não infectados de área endêmica para esquistossomose;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED SF1, OSWALD IP, CASPAR P, HIENY S, KEEFER L, SHER A, JAMES SL. **Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*.** Infect Immun.; v. 65(1) : p. 219–26; Jan 1997.
- AMIRI P, LOCKSLEY RM, PARSLOW TG, SADICK M, RECTOR E, RITTER D, MCKERROW JH. **Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome infected SCID mice.** Nature, 356:604-7; 1992.
- AMY, S.M., MEGAN, K.L.M., JOHN, W.K., PHILIPA, M. **Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge?** BMC Biology 8, 37; 2010.
- ANDRADE, Z. A. **Schistosomal hepatopathy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 51-57, Ago 2004.
- ANDRADE, Z. A. **Schistosomiasis and liver fibrosis.** Parasite Immunology, v. 31, p. 656-663, Nov 2009.
- ANDRE, F. E. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises.** Vaccine, v. 21, p. 593-595, Jan 2003.
- ARAÚJO JM, DE MELO TT, DE SENA IC, ALVES CC, ARAÚJO N, DURÃES FDO V, OLIVEIRA SC, FONSECA CT. ***Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection.** Acta Trop.,v. 124(2): p.140-6, Nov 2012.
- ARAÚJO NP, SOUZA SP, PASSOS LKJ, SIMPSON AJG, DIAS NETO E, PEREIRA TR, CERUTTI JRC, ALENCAR FEC, DIETZE R, KATZ N. **Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados.** Rev Soc Bras Med Trop; v. 29 p. 467 – 76; 1996.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., & KINGSTON, R. E. **Current Protocols in Molecular Biology.** New York Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1995.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., GAZZINELLI, G., ELOI-SANTOS, S. M., CUNHA-MELO, J. R., ALVES-OLIVEIRA, L. F., SILVEIRA, A. M. S., VIANA, I. R. C., CARMO, J., SOUZA, A., CORREA-OLIVEIRA, R. **Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg v. 86, p57-61, 1992
- BALLOUL JM, SONDERMEYER P, DREYER D, CAPRON M, GRZYCH JM, PIERCE RJ, CARVALLO D, LECOCQ JP, CAPRON A. **Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes.** Nature; v. 326(6109): p. 149-53; 1987.
- BERGQUIST, N. R. & COLLEY, D. G. **Schistosomiasis vaccine:research to development.** Parasitology Today, v. 14, p. 99-104, Mar 1998.
- BERGQUIST, R., AL-SHERBINY, M., BARAKAT, R., & OLDS, R. **Blueprint for schistosomiasis vaccine development.** Acta Tropica, v. 82, p. 183-192, Mai 2002.

BERRIMAN, M., HAAS, B. J., LOVERDE, P. T., WILSON, R. A., DILLON, G. P., CERQUEIRA, G. C., MASHIYAMA, S. T., AL-LAZIKANI, B., ANDRADE, L. F., ASHTON, P. D., ASLETT, M. A., BARTHOLOMEU, D. C., BLANDIN, G., CAFFREY, C. R., COGHLAN, A., COULSON, R., DAY, T. A., DELCHER, A., DEMARCO, R., DJIKENG, A., EYRE, T., GAMBLE, J. A., GHEDIN, E., GU, Y., HERTZ-FOWLER, C., HIRAI, H., HIRAI, Y., HOUSTON, R., IVENS, A., JOHNSTON, D. A., LACERDA, D., MACEDO, C. D., MCVEIGH, P., NING, Z., OLIVEIRA, G., OVERINGTON, J. P., PARKHILL, J., PERTEA, M., PIERCE, R. J., PROTASIO, A. V., QUAIL, M. A., RAJANDREAM, M. A., ROGERS, J., SAJID, M., SALZBERG, S. L., STANKE, M., TIVEY, A. R., WHITE, O., WILLIAMS, D. L., WORTMAN, J., WU, W., ZAMANIAN, M., ZERLOTINI, A., FRASER-LIGGETT, C. M., BARRELL, B. G., & EL-SAYED, N. M. **The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni***. *Nature*, v. 460, p. 352-358, Jul 2009.

BETHONY M. J., COLE N. R., GUO X., KAMHAWI S., LIGHTOWLERS M. W., LOUKAS A., PETRI W., REED S., VALENZUELA J. G., HOTEZ P. J. **Vaccines to combat the neglected tropical diseases**. *Immunological Review*, v. 239: p. 237–270; 2011.

BLOCH, E. H. **In vivo microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine**. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 29, p. 62-70, Jan 1980.

BOROS, D. L. **Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection**. *Clinical Microbiology Reviews* 2, p. 250-69. 1989.

BOUKLI NM, DELGADO B, RICAURTE M, ESPINO AM. **Fasciola hepatica and *Schistosoma mansoni*: Identification of common proteins by comparative proteomic analysis**. *J of Parasitol* v. 97: p. 852–861, 2011.

BOULANGER D, REID GD, STURROCK RF, WOLOWCZUK I, BALLOUL JM, GREZEL D, *et al*. **Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni***. *Parasite Immunol.*; v.13(5): p. 473-90; 1991.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, Mai 1976.

BRASCHI S, BORGES WC, WILSON RA. **Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101 Suppl 1: p. 205-12; Set 2006.

BROPHY PM, BARRETT J. **Glutathione transferase in helminths**. *Parasitology.*; v. 100 (2) : p. 345-9; 1990.

BURKE, M. L., JONES, M. K., GOBERT, G. N., LI, Y. S., ELLIS, M. K., & MCMANUS, D. P. **Immunopathogenesis of human schistosomiasis**. *Parasite Immunology*, v. 31, p. 163–176, Abr 2009.

CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LF, SILVEIRA AM, OLIVEIRA RC, GAZZINELLI G. **Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection**. *Acta Trop.*; v. 108(2-3): p. 109-17, Nov-Dez 2008.

CAPRON, A., RIVEAU, G., CAPRON, M., & TROTTEIN, F. **Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials.** Trends in Parasitology, v. 21, p. 143-149, Mar 2005.

CAPRON, A., RIVEAU, G., GRZYCH, J. M., BOULANGER, D., CAPRON, M., & PIERCE, R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update.** Tropical and Geographical Medicine, v. 46, p. 242-246, 1994.

CARABIN H, GUYATT H, ENGELS D. **A comparative analysis of the cost-effectiveness of treatment based on parasitological and symptomatic screening for *Schistosoma mansoni* in Burundi.** Tropical Medicine & International Health, v. 5, p. 192-202, Mar 2000.

CARDOSO FC, MACEDO GC, GAVA E, KITTEN GT, MATI VL, DE MELO AL, CALIARI MV, ALMEIDA GT, VENANCIO TM, VERJOVSKI-ALMEIDA S, OLIVEIRA SC. ***Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection.** PLoS Negl Trop Dis., v. 2(10): p. e308; Out 2008.

CARDOSO FC, PINHO JM, AZEVEDO V, OLIVEIRA SC. **Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis.** Genet Mol Res. v. 5(4): p. 609-18, Out 2006.

CASTRO-BORGES W, DOWLE A, CURWEN RS, THOMAS-OATES J, WILSON RA. **Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates.** PLoS Negl Trop Dis.; v. 5(3): p. e993. doi: 10.1371/journal.pntd.0000993. Mar 2011.

CHEEVER AW, HOFFMAN KF, WYNN TA. **Immunopathology of schistosomiasis in mice and men.** Immunol Today; p. 465-6, 2001.

CHEEVER AW, MACEDONIA JG, MOSIMANN JE, CHEEVER EA. **Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair worms.** Am J Trop Med Hyg; v. 50: p. 281-295, 1994.

CHENG GF, LIN JJ, FENG XG, GU ZQ, JIN YM, YUAN CX, ZHOU YC, CAI YM. **Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing.** Proteomics.; v. 5: p. 511-21; 2005.

CHLICHLIA K1, BAHGAT M, RUPPEL A, SCHIRRMACHER V. **DNA vaccination with asparaginyl endopeptidase (Sm32) from the parasite *Schistosoma mansoni*: anti-fecundity effect induced in mice.** Vaccine. v. 20(3-4): p. 439-47, Nov 2001.

CIOLI, D. & PICA-MATTOCCIA, L. **Praziquantel.** Parasitology Research, v. 90, p. S3-S9, 2003.

Comunicação/Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em:

http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1492&query=simple&search_by_authname=all&search_by_field=tax&search_by_keywords=any&search_by_priority=all&search_by_section=all&search_by_state=all&search_text_options=all&sid=32&site=fio&xt=Sm14. Acesso em: 25 fev 2014.

CORREA-OLIVEIRA, R., CALDAS, I. R., & GAZZINELLI, G. **Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection.** Parasitology Today, v. 16, p. 397-399, Set 2000.

CORREA-OLIVEIRA, R., PEARCE, E. J., OLIVEIRA, G. C., GOLGHER, D. B., KATZ, N., BAHIA, L. G., CARVALHO, O. S., GAZZINELLI, G., & SHER, A. **The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene, v. 83, p. 798-804, Nov-Dez 1989.

CURWEN RS, ASHTON PD, JOHNSTON DA, WILSON RA. **The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages.** Mol Biochem Parasitol; v. 138: p. 57-6; 2004.

DA'DARA AA, SKELLY PJ, WALKER CM, HARN DA. **A DNA prime/ protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection.** Parasite Immunol; v. 25 (8-9): p. 429-37; 2003.

DAVIES SJ, GROGAN JL, BLANK RB, LIM KC, LOCKSLEY RM, MCKERROW JH. **Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes.** Science; v. 294: p. 1358-61; 2001.

DAVIS, A. H. **Epidemiology and Community Control of Disease in Warm Climate Countries.** London: Churchill Livingstone, p. 389-412, 1985.

DEAN, D. A., MURRELL, K. D., XU, S. T., & MANGOLD, B. L. **Immunization of mice with ultraviolet-irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae: a re-evaluation.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 32, p. 790-793, Jul 1983.

DE JESUS, A. M., ALMEIDA, R. P., BACELLAR, O., ARAUJO, M. I., DEMEURE, C., BINA, J. C., DESSEIN, A. J., & CARVALHO, E. M. **Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis.** European journal of immunology, v. 23, p. 152-158, Jan 1993.

DEMARCO, R. & VERJOVSKI-ALMEIDA, S. **Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets.** Drug Discovery Today, v. 14, p. 472-478, Mai 2009.

DIAS SR1, BORONI M1, ROCHA EA1, DIAS TL1, DE LAET SOUZA D1, OLIVEIRA FM2, BITAR M1, MACEDO AM1, MACHADO CR1, CALIARI MV2, FRANCO GR1. **Evaluation of the *Schistosoma mansoni* Y-box-binding protein (SMYB1) potential as a vaccine candidate against schistosomiasis.** Front Genet.; v. 5: p. 174. doi: 10.3389/fgene.2014.00174. eCollection Jun 2014.

DUNNE DW, BUTTERWORTH AE, FULFORD AJ, KARIUKI HC, LANGLEY JG, OUMA JH, CAPRON A, PIERCE RJ, STURROCK RF. **Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection.** Eur J Immunol, v.22: p. 1483-1494; 1992.

EBERL, M., LANGERMANS, J. A., FROST, P. A., VERVENNE, R. A., VAN DAM, G. J., DEELDER, A. M., THOMAS, A. W., COULSON, P. S., & WILSON, R. A. **Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees.** *Infection and Immunity*, v. 69, p. 5352-5362, Set 2001.

ELLIOTT AM, MAWA PA, JOSEPH S, NAMUJU PB, KIZZA M, NAKIYINGI JS, WATERA C, DUNNE DW, WHITWORTH JA. **Associations between helminth infection and CD4+ T cell count, viral load and cytokine responses in HIV-1-infected Ugandan adults.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 97(1): p. 103-8; Jan-Fev 2003.

FARINHA-ARCIERI, L. E. **Desenvolvimento e avaliação de ferramentas de imunização baseadas na região globular da fibra adenoviral modificada com o domínio C4 da glicoproteína gp120 do HIV.** Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

FONSECA CT, BRITO CF, ALVES JB, OLIVEIRA SC. **IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- γ and TNF- α dependent pathway.**; v. 22 (3-4): p. 503-10 ; *Vaccine* 2004.

FONSECA CT, PACÍFICO LG, BARSANTE MM, RASSI T, CASSALI GD, OLIVEIRA SC. **Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fattyacid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone.** *Microbes infect*; v. 8(9-10): p. 2509-16, 2006.

FYAN, F. F.; WEBSTER, R. G.; FULLER, D. H.; HAYNES, J. R.; SANTORO, J. C.; ROBINSON, H. L. **DNA vaccines:protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.90, n.42, p.11478-11482, 1993.

GARCIA TC, FONSECA CT, PACIFICO LG, DURÃES FDO V, MARINHO FA, PENIDO ML, CALIARI MV, DE MELO AL, PINTO HA, BARSANTE MM, CUNHA-NETO E, OLIVEIRA SC. **Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice.** *Acta Trop*; v. 106 (3): p. 162-67, 2008.

GARMONI, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R.W. **DNA vaccines: improving expression of antigens.** *Genetic Vaccines and Therapy*, Flórida, v.1, n.2, p.2-5, 2003

GAZZINELLI, G., VIANA, I. R., BAHIA-OLIVEIRA, L. M., SILVEIRA, A. M., QUEIROZ, C. C., CARVALHO, O. S., MASSARA, C. L., FRAGA, L. A., COLLEY, D. G., & CORREA-OLIVEIRA, R. **Immunological profiles of patients from endemic areas infected with *Schistosoma mansoni*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87, p. 139-142, 1992.

GAZZINELLI, A., BETHONY, J., FRAGA, L. A., LOVERDE, P. T., CORREA-OLIVEIRA, R., & KLOOS, H. **Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil. I: water contact.** *Trop. Med. Int. Health* v. 6, p. 126-135, 2001.

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., & KESTENS, L. **Human schistosomiasis.** Lancet, v. 368, p. 1106-1118, Set 2006.

GRYSEELS, B. **Schistosomiasis.** Infect Dis Clin North Am. v. 26(2): p. 383-97. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.004; Jun 2012.

GUIMARÃES, R. J., FREITAS, C. C., DWARKI, V. J., DRUMMOND, S. C., AMARAL, R. S., MULLER, E. C., GUERRA, M., SCHOLTE, R. G. C., FREITAS, R. C., & CARVALHO, O. S. **Analysis and estimative of schistosomiasis prevalence for the state of Minas Gerias, Brazil, using multiples regression with social and enviromental spatial data.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, p. 91-96, 2006.

GUPTA R1, KUMAR V2, KUSHAWAHA PK1, TRIPATHI CP1, JOSHI S1, SAHASRABUDDHE AA2, MITRA K3, SUNDAR S4, SIDDIQI MI2, DUBE A1. **Characterization of glycolytic enzymes--rAldolase and rEnolase of Leishmania donovani, identified as Th1 stimulatory proteins, for their immunogenicity and immunoprophylactic efficacies against experimental visceral leishmaniasis.** PLoS One. 24;9(1): p. e86073. doi: 10.1371/journal.pone.0086073. eCollection; Jan 2014.

HASELOFF, R. F., KRAUSE, E., BLASIG, I. E. **Proteomic of brain endothelium – Separation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis and identification by mass spectrometry.** Methods Mol. Med. v. 89, p. 465-477, 2003.

HIGÓN M, COWAN G, NAUSCH N, CAVANAGH D, OLEAGA A, TOLEDO R, STOTHARD JR, ANTÚNEZ O, MARCILLA A, BURCHMORE R, MUTAPI F. **Screening trematodes for novel intervention targets: a proteomic and immunological comparison of Schistosoma haematobium, Schistosoma bovis and Echinostoma caproni.** Parasitology v. 138: p. 1607–1619; 2011.

HOFFMANN, K. F., JAMES, S. L., CHEEVER, A. W., & WYNN, T. A. **Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to Schistosoma mansoni.** Journal of Immunology, v. 163, p. 927-938, Jul 1999.

HORTA MF, RAMALHO-PINTO FJ. **Levels of lethal antibody during the course of infection with Schistosoma mansoni in rats and mice.** Mem Inst Oswaldo Cruz;82 Suppl v. 4: p. 283-4; 1987.

INGOLOTTI, M.; KAWALEKAR, O.; SHEDLOCK, D.J.; MUTHUMANI, K.; WEINER, D.B. **DNA vaccines for targeting bacterial infections.** Expert Rev Vaccines, v. 9(7): p. 747-63, 2010.

JANKOVIC, D., WYNN, T. A., KULLBERG, M. C., HIENY, S., CASPAR, P., JAMES, S., CHEEVER, A. W., & SHER, A. **Optimal vaccination against Schistosoma mansoni requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms.** Journal of Immunology, v. 162, p. 345-351, Jan 1999.

JONES, M. K., LUSTIGMAN, S., & LOUKAS, A. **Tracking the odysseys of juvenile schistosomes to understand host interactions.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 2, p. 257, Jul 2008.

JURBERG, A.D., OLIVEIRA A.A., LENZI, H. A. & COELHO P. M. Z. **A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, p.112-114, 2008.

KAECH SM1, WHERRY EJ, AHMED R. **Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development.** Nat Rev Immunol.; v. 2(4): p. 251-62; Abr 2002.

KALINKOVICH A1, WEISMAN Z, GREENBERG Z, NAHMIAS J, EITAN S, STEIN M, BENTWICH Z. **Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection.** Clin Exp Immunol. v. 114(3): p. 414-21. Dez 1998.

KANO, S. F., VIDOTTO O., VIDOTTO C. M. **Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.28, n.4, p. 709-726, Out/Dez 2007.

KARIUKI TM1, VAN DAM GJ, DEELDER AM, FARAH IO, YOLE DS, WILSON RA, COULSON PS. **Previous or ongoing schistosome infections do not compromise the efficacy of the attenuated cercaria vaccine.** Infection and Immunity, v. 74, p. 3979-3986, Jul 2006.

KATZ N. **Schistosomiasis control in Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 93, p. 33-35, 1998.

KEATING JH, WILSON RA, SKELLY PJ. **No overt cellular inflammation around intravascular schistosomes in vivo.** J Parasitol. v. 92(6): p. 1365-9; Dez 2006.

KELLY J. & KAVANAGH K. **Proteomic analysis of proteins released from growth-arrested Candida albicans following exposure to caspofungin.** Medical Mycology, v. 48, p. 598-605, Jun 2010.

KING, C. H., STURROCK, R. F., KARIUKI, H. C., & HAMBURGER, J. **Transmission control for schistosomiasis - why it matters now.** Trends in Parasitology , v. 22, p. 575-582, Dez 2006.

KING, C. H. **Toward the elimination of schistosomiasis.** The new england. journal of medicine, v. 360, p. 106-109,Jan 2009.

KOFTA W, WEDRYCHOWICZ H. **c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages.** Vet Parasitol; v. 100(1-2): p. 3-12; 2001.

KOLASKAR AS & TONGAONKAR PC. **A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens** FEBS Lett.; v. 276(1-2): p. 172-4, Dez 1990.

KONSTANTIN ARNOLD, FLORIAN KIEFER, JÜRGEN KOPP, JAMES N. D. BATTEY, MICHAEL PODVINEC, JOHN D. WESTBROOK, HELEN M. BERMAN, LORENZA BORDOLI, AND TORSTEN SCHWEDE. **The Protein Model Portal.** J Struct Funct Genomics; v. 10(1): p. 1-8; Mar 2009.

LE L, ZHANG W, KARMAKAR S, AHMAD G, TORBEN W, SIDDIQUI AA. **Simultaneous priming with DNA encoding Sm-p80 and boosting with Sm-p80 protein**

confers protection against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mice.

Parasitol Res.; v. 113(3): p. 1195-200, Mar 2014.

LÉTOURNEAU S, KRIEG C, PANTALEO G, BOYMAN O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets.

J Allergy Clin Immunol.; v. 123(4): p. 758-62. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011, Abr 2009.

LEVY, M.Y., BARRON, L. G., MEYER, K. B., SZOKA, F. C. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into the blood. Gene Therapy, Pittsburg, v.3, p.201-211, 1996.

LEVY S, SHOHAN T. Protein-protein interaction in the tetraspanin web. Physiology (Bethesda); v. 20: p. 218-24; 2005.

LIU, F., CUI, S. J., HU, W., FENG, Z., WANG, Z. Q., & HAN, Z. G. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. Molecular & cellular proteomics, v. 8, p. 1236-1251, Jun 2009.

LOVERDE, P. T. & CHEN, L. Schistosome female reproductive development.

Parasitology Today, v. 7, p. 303-308, Nov 1991.

LUDOLF, F. Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* através de análises do proteoma sorológico. Tese doutorado – Centro de Pesquisa René Rachou, Programa de pós graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte. Mai 2012.

LUDOLF, F., PATROCÍNIO, R. P., CORRÊA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, A., FALCONE, H. F., TEIXEIRA-FERREIRA, A., PERALES, J., OLIVEIRA, C. G., SILVA-PEREIRA, A. R. Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome. Plos Neglected Tropical Diseases, Mar 2014.

MALAQUIAS LC, FALCÃO PL, SILVEIRA AM, GAZZINELLI G, PRATA A, COFFMAN RL, PIZZIOLO V, SOUZA CP, COLLEY DG, CORREA-OLIVEIRA R. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. Scand J Immunol.; v. 121: p. 41-50; 1997.

MANNERVIK B. The isoenzymes of glutathione transferase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, v. 57: p. 357-417; 1985.

MCMANUS, D. P. & LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. Clinical microbiology reviews, v. 21, p. 225-242, Jan 2008.

MCSORLEY HJ & MAIZELS RM. Helminth infections and host immune regulation. Clin Microbiol Rev.; v. 25(4): p. 585-608. doi: 10.1128/CMR.05040-11; Out 2012 .

MESQUITA-JUNIOR, D. et al. Sistema imunitário – Parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Revista Brasileira de Reumatologia. v. 50(5): p. 552-80, 2010.

MILLER, P. & WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. Parasitology, v. 77: p. 281-302; 1980.

MILLER, P. & WILSON, R. A. **Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system.** Parasitology, v. 80, p. 267-288, abril 1980.

MIR, L. **Genômica: do DNA à Transgênese.** 1ª ed. Rio de Janeiro, 2004.

MOELLING K. **Naked DNA — the poor man's gene therapy?** Gene Therapy; v. 5: p. 573–4; 1998.

MONTENEGRO SM, MIRANDA P, MAHANTY S, ABATH FG, TEIXEIRA KM, COUTINHO EM, BRINKMAN J, GONÇALVES I, DOMINGUES LA, DOMINGUES AL, SHER A, WYNN TA. **Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens.** J Infect Dis.; v. 179(6): p. 1502-14; 1999.

MOREL, P. A., FALKNER, D., PLOWERY, J., LARREGINA, A. T., FALO JR. L. D. **DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response.** Vaccine, Kidlington, v. 22, p.447-456, 2004.

MOSCA, F., TRITTO, E., MUZZI, A., MONACI, E., BAGNOLLI, F., LAVARORE, C., O'HAGAN, D., RAPPUOLI, A., DE GREGORIO, E. **Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants.** Proceedings of the National Academy of Sciences v. 105, p.10501-10506; 2008.

MOUNTFORD, A. P. **Immunological aspects of schistosomiasis.** Parasite Immunology, v. 27, p. 243-246, Jul 2005.

MUKAI T, NAGAKI M, IMOSE M, KIMURA K, SATAKE S, TAKAI S, MORIWAKI H. **Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon-gamma.** Liver Int.; v. 26(8): p. 1006-14; 2006.

NAGATA, T., AOSHI, T., UCHUIMA, M., SUKUKI, M., KOIDE, Y. **Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T-lymphocyte oriented DNA vaccination.** DNA and Cell Biology, Philadelphia, v.23, n.2, p. 93-106, 2004.

NEGRÃO-CORRÊA D1, FITTIPALDI JF1, LAMBERTUCCI JR2, TEIXEIRA MM3, ANTUNES CM4, CARNEIRO M5. **Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil.** PLoS One 9(2):e88042. doi: 10.1371/journal.pone.0088042. eCollection; Fev 2014.

NUTTEN S, PAPIN JP, WOERLY G, DUNNE DW, MACGREGOR J, TROTTEIN F, CAPRON M. **Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula.** Eur J Immunol.; v. 29(3): p. 799–808; Mar 1999.

OLIVEIRA, S. C., FONSECA, C. T., CARDOSO, F. C., FARIAS, L. P., & LEITE, L. C. **Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil.** Acta Tropica, v. 108, p. 256-262., Nov/Dez 2008.

PACÍFICO LG, FONSECA CT, CHIARI L, OLIVEIRA SC. **Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine.** Immunobiology; v. 211 (1-2): p. 97-104; 2006.

PEARCE, E. J., JAMES, S. L., HIENY, S., LANAR, D. E., & SHER, A. **Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 85, p. 5678-5682, Ago 1988.

PEARCE E. J & MACDONALD AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol.; v. 2(7): p. 499-511, Jul 2002.

PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A. F. **A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs.** Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais, v. 8, p. 589-597, Out 1956.

PEREIRA, W. R., KLOOS, H., CRAWFORD, S. B., VELASQUEZ-MELENDEZ, J. G., MATOSO, L. F., FUJIWARA, R. T., CANCADO, G. G., LOVERDE, P. T., CORREA-OLIVEIRA, R., & GAZZINELLI, A. ***Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk.** Acta Tropica, v. 113, p. 34-41, Jan 2010.

PEREIRA, W. R. **Fatores de risco associados à infecção pelo *Schistosoma mansoni*.** Dissertação. 2006.

PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D. **Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment.** International journal for parasitology, v. 34, p. 527-533, Mar 2004.

PROTASIO AV1, TSAI IJ, BABBAGE A, NICHOL S, HUNT M, ASLETT MA, DE SILVA N, VELARDE GS, ANDERSON TJ, CLARK RC, DAVIDSON C, DILLON GP, HOLROYD NE, LOVERDE PT, LLOYD C, MCQUILLAN J, OLIVEIRA G, OTTO TD, PARKER-MANUEL SJ, QUAIL MA, WILSON RA, ZERLOTINI A, DUNNE DW, BERRIMAN M. **A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*.** PLoS neglected tropical diseases, v. 6, n. 1, p. e1455, Jan 2012.

RAINCZUK, A.; SMOOKER, P. M.; KEDZIERSKI, L.; BLACK, C. G.; COPPEL, R. L.; SPITHILL, T. W. **The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi adami* challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol.** Vaccine, Kidlington, v. 21, p. 3030-3042, 2003.

REIMAN RM1, THOMPSON RW, FENG CG, HARI D, KNIGHT R, CHEEVER AW, ROSENBERG HF, WYNN TA. **Interleukin 5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity.** Infect. Immun; v. 74 (3): p. 1471-9, 2006.

REYNOLDS, S. R., DAHL, C. E., & HARN, D. A. **T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase.** Journal of Immunology, v. 152, p. 193-200, Jan 1994.

- REYNOLDS SR, SHOEMAKER CB, HARN DA. **T and B cell epitope mapping of Sm23 an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni***. J Immunol.; v. 149 (12): p. 3995-4001; 1992.
- ROBINSON, H. L. **Nucleic acid vaccines: an overview**. Vaccine, Kidlington, v. 15, n. 8, p. 785-787, 1997.
- ROLLINSON, D. & SIMPSON, A. **The Biology of Schistosomes - From genes to Latrines** **Harcourt Brace Jovanovich**. 1987.
- ROMEIH MH, HASSAN HM, SHOUSHA TS, SABER MA. **Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* infection by multivalent DNA vaccine**. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai); v. 40(4): p. 327-38, Abr 2008.
- RUTZKY LI, HERNADEZ HJ, STADECKER MJ. **Th1- polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in Schistosome infection**. Proc Nat Acad Sci USA; v. 98: p. 13243-13248, 2001.
- SABER M1, DIAB T, HAMMAM O, KARIM A, MEDHAT A, KHELA M, EL-DABAA E. **Protective and anti-pathology effects of Sm fructose-1,6-bisphosphate aldolase-based DNA vaccine against *Schistosoma mansoni* by changing route of injection**. Korean J Parasitol.; v. 51(2): p. 155-63, Abr 2013.
- SELIGER, B. & KELLNER, R. **Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets**. Proteomics. 2, p. 1641-1651, doi:10.1002/1615-9861(200212)2:12<1641::AID-PROT1641>3.0.CO;2-B [doi] ; 2002.
- SHER A, FIORENTINO D, CASPAR P, PEARCE E, MOSMANN T. **Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection**. J Immunol.; v. 15; p. 147(8):2713-6. Out 1991.
- SHI, F., ZHANG, Y., YE, P., LIN, J., CAI, Y., SHEN, W., BICKLE, Q. D., & TAYLOR, M. G. **Laboratory and field evaluation of *Schistosoma japonicum* DNA vaccines in sheep and water buffalo in China**. Vaccine, v. 20, p. 462-467, Nov 2001.
- SNADEEP, K.; TRIPATHY, S. K.; SVENSSON, E. C.; BLACK, H. B.; GOLDWASSER, E.; MARGALITH, M.; HOBART, P. M.; LEIDEN, J. M. **Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector**. Genetics, Pittsburgh, v.93, p.10876-10880, 1996.
- SOISSON, L. M., MASTERSON, C. P., TOM, T. D., MCNALLY, M. T., LOWELL, G. H., & STRAND, M. **Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen**. Journal of Immunology, v. 149, p. 3612-362, Dez 1992.
- SOUZA, F. P. C. DE; VITORINO, R. R.; COSTA, A. DE P. *et al.* **Esquistossomose mansônica : aspectos gerais , imunologia , patogênese e história natural**. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, v. 9, n. 4, p. 300 - 307, 2011.
- STIREWALT, M. A., COUSIN, C. E., & DORSEY, C. H. ***Schistosoma mansoni*: stimulus and transformation of cercariae into schistosomules**. Experimental Parasitology, v. 56, p. 358-368, Dez 1983.

TEIXEIRA DE MELO T, ARAUJO JM, DO VALLE DURÃES F, CALIARI MV, OLIVEIRA SC, COELHO PM, FONSECA CT. **Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden.** Parasite Immunol, v. 32 (11-12): p. 749-59; 2010.

TEIXEIRA DE MELO T, SENA IC, ARAUJO N, FONSECA CT **Antibodies are involved in the protective immunity induced in mice by *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Snteg) immunization.** Parasite Immunol.; v. 36(2): p. 107-11, Fev 2014.

TENDLER, M., BRITO, C. A., VILAR, M. M., SERRA-FREIRE, N., DIOGO, C. M., ALMEIDA, M. S., DELBEM, A. C., DA SILVA, J. F., SAVINO, W., GARRATT, R. C., KATZ, N., & SIMPSON, A. S. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, p. 269-273, Jan 1996.

TORBEN W1, AHMAD G, ZHANG W, NASH S, LE L, KARMAKAR S, SIDDIQUI AA. **Role of antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni*.** Vaccine; v. 30(48): p. 6753-8, Nov 2012.

ULMER, J. B., WAHREN, B., LIU, M. A. **Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances.** TRENDS in Molecular Medicine, London, v.12, n.5, p.216-222, 2006.

VAN BALKOM BW1, VAN GESTEL RA, BROUWERS JF, KRIJGSVELD J, TIELENS AG, HECK AJ, VAN HELLEMOND JJ. **Mass Spectrometric Analysis of the *Schistosoma mansoni* Tegumental Sub-proteoma.** Journal of Proteome Research. v.4, p. 958-966. Fev/Mai 2005.

VAN HELLEMOND JJ, VAN BALKON BW, TIELENS AG. **Schistosome biology and proteomics: progress and challenges.** Exp Parasitol.; v. 117 (3): p. 267-74; 2007.

VAN TIENHOVEN, E. A. E., TEN BRINK, C. T. B., VAN BERGEN, J., KONING, F., VAN EDEN, W., BROEREN, C. P. M. **Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines.** Vaccine, Kidlington, v.19, p. 1515-1519, 2001.

VICOONE J, CAILLIAU K, EVANS RJ. **Molecular properties of ATP-gated P2x receptor ion channels.** Trends Pharmacol Sci.; v. 25: p. 487-93; 2004.

VIEIRA, G. F.; CHIES, J. A. B. **Peptídeos virais imunogênicos como determinantes de reatividade cruzada no sistema imune.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre. 2008.

WAINE, G. J. & MCMANUS D. P. **Nucleic acids: Vaccine of the future.** Parasitology Today, California, v.11, n. 3, p. 113-116, 1995.

WANG, R.; DOOLAN, D. L.; LE, T. P.; HEDSTROM, R. C.; COONAN, K. M.; CHAROENVIT, Y. **Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine.** Science, New York, v.282, p.476-480, 1998.

WANG, S.; FARFAN-ARRIBAS, D. J.; SHEN, S.; CHOU, T.H.W.; HIRSCH, A.; HE, F.; LU, S. **Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence**

the antigen expression and immunogenicity of HIV-1Env DNA vaccine. Vaccine, Kidlington, v.24, n.21, p.4531-4540, 2005.

WANG W, WANG L, LIANG YS. **Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review.** Parasitol Res, v. 111: p. 1871–1877, 2012.

WANG Y, WU W, NEGRE NN, WHITE KP, LI C, SHAH PK. **Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences.** BioMed Central Bioinformatics. v. 12: p. 251. 2011.

WHALEN, R. G. **DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if?** Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v.2, n.3, p.168-175, 1996.

WHO. **Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010.** The Weekly Epidemiological Record, v. 87, n. 4, p. 37–44, 2012.

WHO. **Schistosomiasis: number of people treated in 2011.** Weekly Epidemiological Record. Switzerland: [s.n.], p. 81-88, 2013.

WILSON MS, MENTINK-KANE MM, PESCE JT, RAMALINGAM TR, THOMPSON R, WYNN TA. **Immunopathology of schistosomiasis.** Immunol Cell Biol.2007 Feb-Mar; v. 85(2): p. 148-54. Epub Dez 2006.

WILSON MS, MARGARET M MENTINK-KANE, JOHN T PESCE, THIRUMALAI R RAMALINGAM, ROBERT THOMPSON, AND THOMAS A WYNN. **Immunopathology of schistosomiasis.** Immunol Cell Biol.; 85(2): 148–154; Feb-Mar 2007.

WILSON, R. A. & COULSON, P. S. **Schistosoma mansoni: dynamics of migration through the vascular system of the mouse.** Parasitology, v. 92, p. 83-100, Feb 1986.

WILSON, R. A. & COULSON, P. S. **Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively?** Microbes and Infection, v. 1, p. 535-543, Jun 1999.

WILSON, R. A. & COULSON, P. S. **Schistosome vaccines: a critical appraisal.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, p. 13-20, Set 2006.

WILSON, R. A., LANGERMANS, J. A., VAN DAM, G. J., VERVENNE, R. A., HALL, S. L., BORGES, W. C., DILLON, G. P., THOMAS, A. W., & COULSON, P. S. **Elimination of Schistosoma mansoni Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for a Therapeutic Vaccine?** PLoS neglected tropical diseases, v. 2, p. e290, Set 2008.

WILSON, R. A. & COULSON, P. S. **Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour.** Trends in Parasitology, v. 25, p. 423-431, Set 2009.

WOLOWCZUK I, NUTTEN S, ROYE O, DELACRE M, CAPRON M, MURRAY RM, TROTTEIN F, AURIAULT C. **Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite Schistosoma mansoni.** Infect Immun.; v. 67: p. 4183-4190; 1989.

YANG J1, QIU C, XIA Y, YAO L, FU Z, YUAN C, FENG X, LIN J. **Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage.** Parasitol Res.; v. 107(3): p. 667-77, 2010 Aug.

YUAN X1, QU Z, WU X, WANG Y, LIU L, WEI F, GAO H, SHANG L, ZHANG H, CUI H, ZHAO Y, WU N, TANG Y, QIN L. **Molecular modeling and epitopes mapping of human adenovirus type 3.** Vaccine. v. 27, p. 5103-5110. 2009.

ZERLOTINI, A., HEIGES, M., WANG, H., MORAES, R. L., DOMINITINI, A. J., RUIZ, J. C., KISSINGER, J. C., & OLIVEIRA, G. **SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource.** Nucleic Acids Research, v. 37, p. D579-D582, Jan 2009.

ZHANG R, YOSHIDA A, KUMAGAI T, KAWAGUCHI H, MARUYAMA H, SUZUKI T, ITOH M, EL-MALKY M, OHTA N. **Vaccination with calpain induces a Th1-biased protective immune response against *Schistosoma japonicum*.** Infect Immun.; v. 69(1): p. 386-91; Jan 2001.

ZHANG, X.; DIVANGAHI, M.; NGAI, P.; SANTOSUOSSO, M.; MILLAR, J.; ZGANIAZ, A.; WANG, J.; BRAMSON, J.; XING, Z. **Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene.** Vaccine, Kidlington, v.25, n.7, p.1342-1352, 2007.

ZHONG ZR, ZHOU HB, LI XY, LUO QL, SONG XR, WANG W, WEN HQ, YU L, WEI W, SHEN JL. **Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of *Schistosomiasis japonica*.** Acta Trop v. 116: p. 1-8, 2010.

ZHOU Y, LIN J, YAO L, WANG X, SHI Y, LU K, LIU J, FU Z, TAO L. **Cloning, expressing and characterizing of a phosphoglycerate mutase gene of *Schistosoma japonicum*.** Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, v. 24(9):1550-5, Set 2008.