

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

**AVALIAÇÃO DA IMUNOPROTEÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS PELO  
TEGUMENTO DE ESQUISTOSSÔMULO DO *Schistosoma mansoni***

por

**Tatiane Teixeira de Melo**

Belo Horizonte  
Fevereiro/ 2010

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

**AVALIAÇÃO DA IMUNOPROTEÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS PELO  
TEGUMENTO DE ESQUISTOSSÔMULO DO *Schistosoma mansoni***

por

**Tatiane Teixeira de Melo**

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

Orientação: Dra. Cristina Toscano  
Fonseca

Co-orientação: Dr. Paulo Marcos Zech  
Coelho

Belo Horizonte  
Fevereiro/ 2010

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

M528a Melo, Tatiane Teixeira.  
2010

Avaliação da imunoproteção induzida em camundongos pelo tegumento de esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* / Tatiane Teixeira de Melo. – Belo Horizonte, 2010.

xvi, 104 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 102-120

Dissertação (Mestrado) – Dissertação 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 mansoni/imunologia 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Vacinas/imunologia I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano (Orientação) III. Coelho, Paulo Marcos Zech (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

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

**AVALIAÇÃO DA IMUNOPROTEÇÃO INDUZIDA EM CAMUNDONGOS PELO  
TEGUMENTO DE ESQUISTOSSÔMULO DO *Schistosoma mansoni***

por

**Tatiane Teixeira de Melo**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristina Toscano Fonseca (Presidente)

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Suplente: Dra. Lucila Grossi Gonçalves Pacífico

Dissertação defendida e aprovada em: 24/02/2010

**Sou o resultado das minhas escolhas...  
O produto da combinação entre o que  
quero ser, o que posso ser e o que sou!  
Sonhos me acompanham pelo caminho.  
O mais importante? O primeiro passo...  
(Cristiana Vieira)**

**Dedico este trabalho aos meus queridos pais que não mediram esforços para ampliar meus conhecimentos.**

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por me fazer trilhar um caminho muito feliz. Tenho a certeza de que estou fazendo as escolhas certas.

Agradeço de todo coração, a minha querida orientadora KIKA, um exemplo de pessoa e pesquisadora. Minha amiga de bancada, conversas, preocupações e brincadeiras. Nunca vou esquecer tudo que você faz por mim. OBRIGADA!

Ao Dr. Paulo, um excelente pesquisador, com um conhecimento admirável. Obrigada por me acolher no laboratório.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, a eles devo tudo que conquistei até hoje.

Às minhas amigas do LESQ: Rafa, Clarice, Flávia, Lili, Carol, Su, Neusa, Gardênia, Ana Karine, Eliz, Lud, Andrea, Ju, Vandinha, D. Vera, Vanessa e Lucila. E aos meus amigos do LESQ: Áureo, Naftale, Juliano, Watson e Babá. Muito obrigada pelos ótimos momentos de convivência!

Ao Dr. Sérgio Costa por abrir as portas do laboratório de Imunologia e Bioquímica quando precisei. À fernandinha e a Júlia pelas ajudas preciosas.

Ao Dr. Marcelo Caliarri pela ajuda na análise dos granulomas e pela boa vontade em disponibilizar o laboratório de patologia.

Aos funcionários do René Rachou que, de alguma forma, contribuíram para realização do meu trabalho. À biblioteca do CPqRR pelo acesso gratuito à informação técnico-científica e pela infra estrutura desse centro de pesquisa.

À minha irmã ju, por sempre estar ao meu lado me apoiando em tudo. Obrigada!!! E a todos os meus familiares.

Agradeço também ao meu querido David, pela enorme paciência, companheirismo, por me apoiar nas decisões e por torcer por mim. Muito Obrigada!!

## **AGRADECIMENTO ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Agradeço ao apoio financeiro concedido pelas Instituições financiadoras: FIOCRUZ, FAPEMIG e CNPq.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 A Esquistossomose.....	19
1.2 Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	20
1.3 Estratégias de controle da Esquistossomose.....	23
1.4 Imunobiologia da Esquistossomose.....	25
1.5 Patologia da Esquistossomose.....	27
1.6 Tegumento do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	31
1.7 Vacinas para Esquistossomose.....	33
1.8 Antígenos vacinais.....	36
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>45</b>
4.1 Obtenção de antígeno.....	45
4.2 Protocolo de imunização.....	45
4.3 Dosagem de anticorpos.....	46
4.4 Exame parasitológicos.....	47
4.4.1 HPJ(Hoffman, Pons e Janner).....	47
4.4.2 Eclosão de miracídios.....	47
4.5 Recuperação de vermes adultos.....	48

---

<b>4.6 Contagem do número de ovos do intestino e fígado.....</b>	<b>48</b>
<b>4.7 Área e número de granulomas hepáticos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.8 Avaliação da imunidade induzida pelo antígeno através da análise de citocinas e marcação intracelular.....</b>	<b>49</b>
<b>4.9 Marcação do tegumento de vermes adultos.....</b>	<b>50</b>
<b>4.10 Cultura de vermes adultos e marcação de ovos.....</b>	<b>51</b>
<b>4.11 Análises estatísticas.....</b>	<b>51</b>
<b>5 ARTIGO.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Comprovante de submissão do artigo.....</b>	<b>53</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>100</b>
<b>7.1 Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....</b>	<b>100</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

---

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1: Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 2: Esquema do sistema porta-hepático-mesentérico mostrando os principais pontos de encontro dos ovos do <i>S. mansoni</i>.</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 3: Representação do tegumento do <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 4: Protocolo de imunização.....</b>	<b>46</b>

---

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

**µg:** Micrograma

**µL:** Microlitro

**ADCC:** Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloreto de cálcio

**CDC:** Centro de Controle de Doenças (do inglês: Centers for Disease Control)

**CD40:** co-estimulador, ligante de Cd154, expresso em linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais.

**CD86:** co-estimulador, ligante de CD28 e CTLA-4, expresso em monócitos, células B ativadas e células dendríticas

**CFA:** Adjuvante Completo de Freund (do inglês: Complete Freund Adjuvant)

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico (do inglês: Deoxyribonucleic acid)

**ELAC:** Sais de Earl's Plus hidrolisado de lactoalbumina (do inglês: Earl's salts plus lactoalbumin hydrolysate)

**ELISA:** Ensaio de absorção imunoenzimático (do inglês: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

**GST:** Glutathione S-transferase

**HE:** Hematoxilina- Eosina

**HPJ:** Hoffman - Pons e Janer

**IFA:** Adjuvante Incompleto de Freund (do inglês: Incomplet Freund Adjuvant)

**IFN-γ:** Interferon gama

**Ig:** Imunoglobulina

**IL:** Interleucina

**KOH:** Hidróxido de Potássio

**PBMC:** Células Mononucleares do sangue Periférico (do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cell)

**PBS:** Tampão de Fosfato Salina (do inglês: Phosphate-buffered saline)

**PBST<sub>20</sub>:** Tampão de Fosfato Salina e Twee 20 (do inglês: Phosphate-buffered saline e Tween 20)

**RNA:** Ácido ribonucleico (do inglês: Ribonucleic acid)

**Rpm:** Rotação por minuto

**RPMI:** Meio de cultura RPMI (do inglês: Roosevelt Park Memorial Institute)

**SDS-PAGE:** Eletroforese do gel de poliacrilamida do sulfato dodecil de sódio (do inglês: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

**SGTP4:** Proteína transportadora de Glicose 4 (do inglês: Glucose Transport Protein 4)

**SEA:** Extrato solúvel do ovo do *S. mansoni* (do inglês: soluble egg antigen)

**SFB:** Soro fetal bovino

**Smtcg:** Tegumento do esquistossômulo

**SWAP:** Extrato solúvel de antígenos do verme adulto do schistosoma mansoni (do inglês: Soluble adult worm antigens)

**TBST:** Tampão Tris salinico e tween 20 (do inglês: Tris buffered saline and Tween 20)

**TGF- $\beta$ :** Fator de crescimento tumoral (do inglês: Transforming growth factor- $\beta$ )

**Th1:** Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês: T helper cells type 1)

**Th2:** Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês: T helper cells type 2)

**TMB:** Tetrametilbenzidina (do ingles: Tetramethylbenzidine)

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (do inglês: Tumor necrosis factor  $\alpha$ )

**TSP:** Tetraspanina

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**WHO:** Organização Mundial da Saúde (do inglês: World Health Organization)

---

## RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), atualmente 200 milhões de pessoas estão infectadas por espécies do gênero *Schistosoma* em 76 países do mundo causando 250.000 mortes por ano. No Brasil, o *Schistosoma mansoni* é o responsável pela infecção de aproximadamente 5.48% da população. Uma vacina como uma medida profilática, administrada sozinha ou em combinação com drogas anti-helmínticas, seria importante para o controle da esquistossomose. Um antígeno potencial para compor uma vacina anti-esquistossomótica é o tegumento de esquistossômulo do *S. mansoni*. O tegumento representa a interface parasito-hospedeiro e o esquistossômulo é o primeiro estágio a entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro, e o mais susceptível. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tegumento de esquistossômulo do *S. mansoni* é capaz de ativar células dendríticas levando a um aumento na expressão de CD40 e CD86 e na produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ . O presente trabalho avaliou a imunoproteção induzida em camundongos pelo tegumento de esquistossômulos do *S. mansoni*. Foram vacinados dez camundongos no grupo experimental e 10 camundongos no grupo controle. De 15 em 15 dias, o sangue desses animais foi retirado para avaliar, por ELISA, a produção de anticorpos específicos. Trinta dias após a terceira dose os camundongos foram infectados com 100 cercárias do *S. mansoni* e 50 dias após a infecção desafio, os animais foram perfundidos para avaliar o nível de proteção induzida pela imunização. Dois dias antes da perfusão realizou-se o exame de fezes utilizando-se duas metodologias: HPJ e Ecloração de Miracídios. O intestino e fígado dos camundongos imunizados foram retirados após a perfusão, pesados e digeridos com KOH 10% e o número de ovos presentes nestes órgãos foi determinado por microscopia óptica. Para avaliar a interferência da vacinação na patologia da esquistossomose, foram realizadas análises do número de granulomas/mm<sup>2</sup> e das áreas dos granulomas exsudativo-produtivo hepáticos. E para observar a morfologia e o comportamento dos casais de vermes bem como a viabilidade dos ovos foi realizado um estudo *in vitro*, no qual, casais de vermes foram corados com a sonda Hoechst 33258 ou colocados em cultura por sete dias para observação da oviposição. Para observar o perfil de resposta imune induzido pelas imunizações, camundongos imunizados foram eutanasiados e o baço foi retirado para cultura de esplenócitos, foram dosadas as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 no sobrenadante de cultura e intracitoplasmáticas por marcação de CD4+ e CD8+. A imunização com

Smteg resultou na produção de níveis significativos de IgG, IgG1 e IgG2c específicos a partir da segunda dose da vacina. Os níveis destes anticorpos se mantiveram elevados até 50 dias após a infecção desafio. No grupo de camundongos imunizados com Smteg observou-se uma redução de 43% a 48% no número de vermes adultos; 64% no número de ovos/grama de fígado e intestino, 59% a 60% (HPJ); 72%- 73% (eclosão de miracídio) no número de ovos/grama de fezes e de 41% no número de granuloma no fígado e intestino em relação ao grupo inoculado com PBS +CFA/IFA. Não foi observado nenhum efeito da imunização com Smteg sobre a fecundidade da fêmea do *S. mansoni*, nem sobre a área do granuloma hepático. Em um experimento, *ex vivo*, os vermes provenientes de camundongos vacinados com Smteg + CFA/IFA apresentaram danos no tegumento, além de uma interferência na oviposição com baixo número de ovos, os mesmos mortos ou inviáveis. Os camundongos imunizados com Smteg produziram níveis significativos de INF- $\gamma$  e IL-10 em relação aos camundongos inoculados com PBS, demonstrando que a imunização induz um perfil de resposta predominantemente Th1. Esses resultados indicam que o tegumento do esquistossômulo do *S. mansoni* é um forte candidato vacinal.

---

**ABSTRACT**

According to the World Health Organization (WHO), currently 200 million people are infected by *Schistosoma* species in 76 countries worldwide, causing 250.000 deaths per year. In Brazil, 5,48% of the population are infected by *Schistosoma mansoni*. The vaccination as a prophylactic measure, administered alone or with anti-helminthic drugs in association, would be important for the control schistosomiasis. A potential antigen to compose a vaccine is the *S. mansoni* schistosomula tegument. The tegument represent the parasite-host interface and schistosomula is the first stage to be come in contact with the host immune system and the most susceptible life stage. Recently, our group demonstrated that the schistosomula tegument of *S. mansoni* is able to activate dendritic cells leading to an increase in expression of CD40 and CD86 molecules on DC surface and production of IL-12 and TNF- $\alpha$ . The present work evaluated the immunoprotection induced by *Schistosoma mansoni* schistosomules tegument immunization in mice. Ten mice of the experimental group were vaccinated, as well as 10 mice of the control group. During the entire immunization protocol with a 15-days interval, blood samples of these animals was collected in order to evaluate the production of specific antibodies by ELISA. Thirty days after the third dose, mice were infected with 100 *S. mansoni* cercariae, and 50 days after challenge infection the animals were perfused for accessment of the level of protection by immunization. Two days before perfusion, a stool examination was carried out using two methodologies: HPJ and Miracidia Eclosion. The intestine and liver of the immunized mice were collected after perfusion, weighed and digested with 10% KOH, and the number of eggs present in these organs was determined under optical microscopy. In order to determine the interference of vaccination in the schistosomiasis pathology, analyses of the number of granuloma/mm<sup>2</sup> and of the areas of hepatic exsudative-productive granuloma were performed. To access the morphology and the behavior of the worm pairs, as well as eggs viability, an *in vitro* study was carried out. In this study, the worm pairs were stained with Hoechst 33258 probe, or cultured for 7 days to observe oviposition. To analyse the profile of immune response induced by Smteg, immunized mice were euthanized and the spleen removed for culture of splenocytes. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-4 production were measured in the culture supernatant and intracytoplasmic by cytokine staining in CD4+ and CD8+ cells. Immunization with Smteg elicited significant production of specific IgG, IgG1 and IgG2c since the second dose of the

vaccine. Significantly levels of specific antibodies were detected in Smtteg immunization group until to 50 days after challenge infection. In the group of mice immunized with Smtteg, a reduction of 43% a 48% in the number of adult; 64% in the number of eggs/g in the liver and intestine; 59%- 60% (HPJ); 72%-73% (Eclosion of Miracidia) in the number of eggs/miracidia of feces, and 64% in the number of granuloma in the liver was observed compared to control groups. We did not observe any effect of Smtteg immunization fecundity female or on the area of the hepatic granuloma. In an *ex vivo* analyse, the worms obtained from mice immunization with Smtteg + CFA /IFA presented tegumental damages, and an empaiared oviposition with low numbers of eggs dead or non viables. Mice immunized with Smtteg produced significant IFN-g and IL-10 levels compared to mice inoculated with PBS, demonstrating that immunization induces a predominantly Th1 profile of immune responses. These results indicated *S. mansoni* schistosomula tegument as a potential candidate to be used in a future vaccine formulation.

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença crônica, endêmica em mais de 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (1), causada por parasitos digenea, de várias espécies do gênero *Schistosoma*. Acredita-se que 200 milhões de pessoas estejam infectadas por espécies do gênero *Schistosoma* (2) e outras 779 milhões estejam sob o risco de infecção por uma das cinco espécies que afetam o homem em todo o mundo: *Schistosoma japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. mansoni* (3,4). Estima-se que cerca de 250 mil pessoas morrem anualmente em consequência da infecção por esse parasito (5).

A espécie *S. mansoni* ocorre na África, América Latina e Antilhas. A infecção causada por essa espécie é denominada esquistossomose mansoni ou intestinal, pela localização dos parasitos nas vênulas da parede do intestino, sigmóide e reto, com sintomas predominantemente intestinais. Nos casos mais graves, há envolvimento hepatoesplênico e hipertensão no sistema porta (6,7).

O Brasil é um dos países endêmicos para a esquistossomose mansoni, onde esta atinge mais de 8 milhões de pessoas (8) com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco da infecção. As áreas endêmicas para a esquistossomose no Brasil estão distribuídas em dezenove estados, estando aquelas de maior prevalência da doença distribuídas desde o estado do Maranhão até Minas Gerais com certa penetração no Espírito Santo. Há ainda focos isolados nos estados do Piauí, Pará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Tocantins (9).

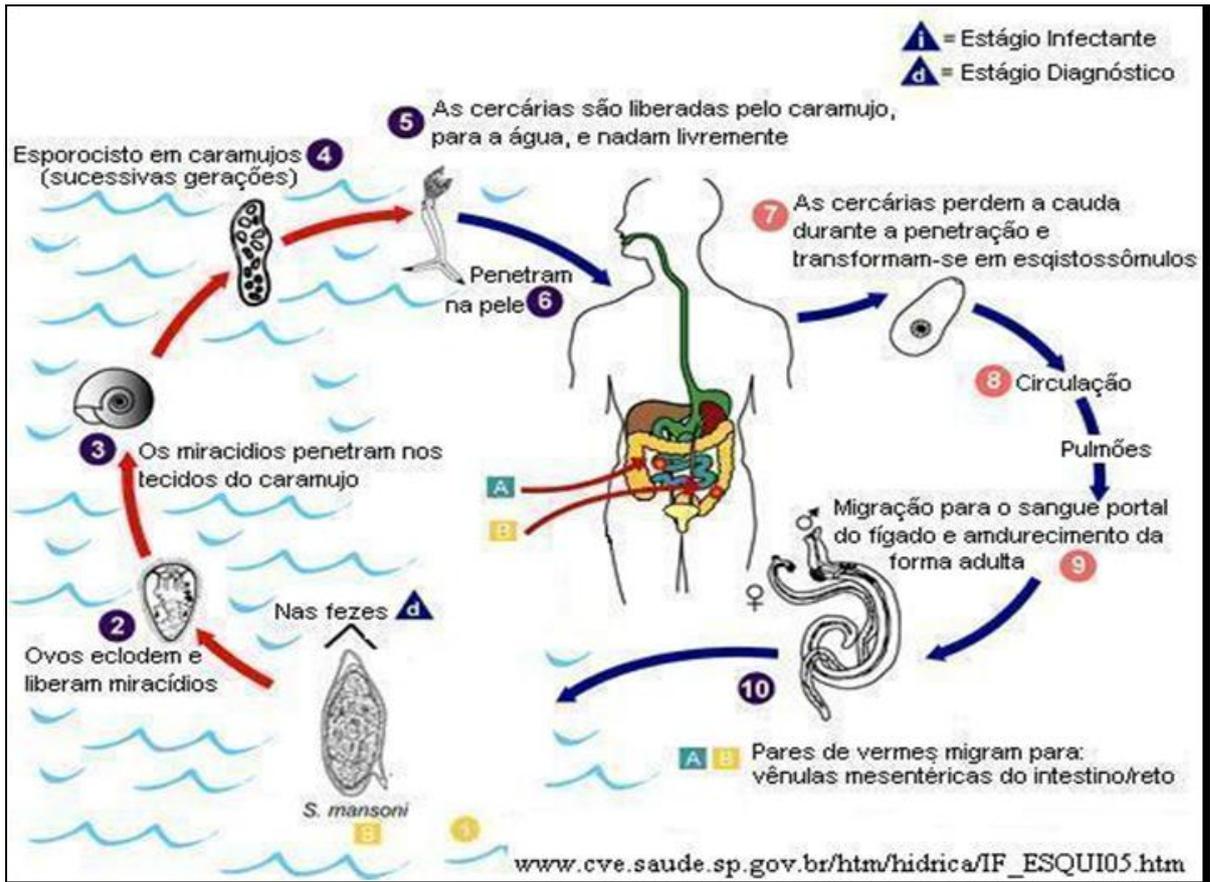
A manutenção e/ou propagação dessa doença em determinada região depende de inúmeros fatores como: a existência de clima apropriado, condições socioeconômicas precárias, existência de indivíduos infectados eliminando ovos, existência de hospedeiros intermediários e do contato de pessoas susceptíveis com águas naturais contendo cercárias (10).

Para o controle da esquistossomose, é de extrema importância o conhecimento da biologia do verme e dos fatores ligados aos hospedeiros intermediários e definitivos (11).

## 1.2 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* envolve duas gerações: a primeira no hospedeiro vertebrado em que ocorre a reprodução sexuada e maturação; e a segunda no hospedeiro intermediário invertebrado em que somente ocorre a reprodução assexuada. O hospedeiro intermediário para o *S. mansoni* é o caramujo do gênero *Biomphalaria* (12). Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto durante a reprodução assexuada no hospedeiro intermediário, que as liberam de forma intermitente nas horas mais claras do dia, já que a liberação das cercárias é induzida pela luz e temperaturas mais altas. Na água, as cercárias possuem geotropismo negativo, fototropismo positivo e tendem a acumular-se sob a superfície líquida (13). Quando a cercária encontra o hospedeiro definitivo, penetra pela sua pele ou mucosa liberando a cauda. A capacidade invasora das larvas depende de um esforço mecânico e da ação química exercida pela secreção das glândulas cefálicas de penetração. A ação mecânica ocorre por auxílio de uma ventosa oral. A ação química ocorre por proteases, do tipo collagenase e elastase, ou por enzimas que são ativas contra as glicoproteínas da pele. Após penetrar, a cercária passa por mudanças na conformação da membrana que se torna pentalamina e no metabolismo que se torna, principalmente, anaeróbico (13,14). Inicia-se o processo de transformação em esquistossômulos (15,16). Após permanecer na pele por tempo variável, de minutos a 72 horas, os esquistossômulos iniciam a migração através do corpo do seu hospedeiro, caso não sejam destruídos pelos mecanismos de defesa. Os esquistossômulos utilizam as secreções líticas das glândulas cefálicas posteriores para penetrar nos vasos cutâneos. Através da circulação, eles chegam direto ao coração e aos pulmões em 4 dias, tornando-se mais longos e delgados, o que facilita a sua migração através da rede vascular-pulmonar (17). Do pulmão, os esquistossômulos voltam ao coração e são enviados através da circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento (13,17). 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. As localizações habituais são as vênulas da parede do reto, sigmóide e intestino grosso (13,18). O casal está em constante associação, encontrando-se a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho. A

maior parte da energia das fêmeas é gasta na produção de ovos. Cerca de 300 a 400 ovos de *S. mansoni* são liberados por fêmea em camundongos infectados a cada dia, sendo que este número aumenta em primatas (19-21). A produção de ovos começa 30 a 40 dias após a infecção. Os ovos são eliminados para o ambiente através das fezes dos indivíduos infectados (21). 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 resulta na formação de granulomas, proveniente da resposta do sistema imune do hospedeiro. Esta resposta de hipersensibilidade retém antígenos citotóxicos, mas também causa danos ao tecido, sendo responsável pela manifestação clínica da esquistossomose crônica. O órgão mais atingido é o fígado, sendo o baço também um órgão bastante acometido (11). No momento da ovoposição, o desenvolvimento embrionário é ainda incompleto, requerendo mais seis ou sete dias para completar-se. Os miracídios morrem caso a expulsão não se complete dentro de três a quatro semanas após a oviposição. Os ovos eliminados pelo hospedeiro através das fezes eclodirão se encontrarem condições adequadas como: água natural com temperatura morna, baixa hipotonicidade e iluminação adequada, liberando assim o miracídio de dentro da casca do ovo (19). Uma vez que o ovo é rompido em água natural, o miracídio emerge e começa a nadar ativamente. O miracídio possui geotropismo negativo e fototropismo positivo, que o auxilia na localização do hospedeiro intermediário, além de ser atraído por substâncias químicas eliminadas pelo caramujo. O encontro deve ocorrer em um período de 8 horas. O miracídio penetra no hospedeiro intermediário específico por movimentos rotatórios e ação lítica. Após a penetração, o miracídio perde seu revestimento epitelial e seus órgãos de penetração, atrofiando sua musculatura (13). Por volta do oitavo dia, o miracídio apresenta-se como um tubo enovelado, imóvel, repleto de células germinativas em multiplicação, se transformando em esporocisto. O esporocisto primário apresenta grandes células germinativas isoladas ou agrupadas. Por volta da segunda semana de existência, as células germinativas rompem-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. A cercária deixa o hospedeiro caindo em água fresca, completando o ciclo do parasito (13) (Fig. 1).



**FIGURA 1- Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.** As cercárias ao saírem do caramujo nadam em busca de um hospedeiro definitivo, penetram por sua pele perdendo a cauda e iniciando-se o processo de transformação em esquistossômulos. Os esquistossômulos migram através da pele até o sistema porta-hepático, onde completam o desenvolvimento. Vermes adultos do *S. mansoni* residem mais freqüentemente nas veias mesentéricas superiores do intestino grosso. As fêmeas depositam seus ovos nas pequenas vênulas do sistema porta e perivesical, de onde são ativamente movidos para órgãos ou o lúmen do intestino sendo eliminados com as fezes. Em água fresca os ovos eclodem e liberam os miracídeos que nadam e penetram no hospedeiro intermediário, a *Biomphalaria*. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos, produção e liberação de cercárias.

### 1.3 Estratégias de controle da Esquistossomose

A esquistossomose é, fundamentalmente, uma doença resultante da ausência ou precariedade do saneamento básico. As ações de saneamento ambiental são reconhecidas como as de maior eficácia para as modificações de caráter permanente das condições de transmissão da esquistossomose e incluem: coleta e tratamento de dejetos, abastecimento de água potável, instalações hidráulicas e sanitárias, aterros para eliminação de coleções hídricas que sejam criadouros de moluscos, drenagens, limpeza e retificação de margens de córregos e canais, etc. (22). Segundo Coura & Amaral em 2004 (9) o controle da doença no Brasil é dificultado por algumas razões: disseminação dos hospedeiros intermediários, altos custos para a implementação de condições sanitárias ideais e de suprimento de água tratada e dificuldades para proteção individual. Assim, verifica-se a continuidade de um intenso contato com águas contaminadas, propiciando a reinfeção.

Atualmente o controle da doença vem sendo realizado principalmente através de processos químicos e/ou biológicos de eliminação do hospedeiro intermediário e do tratamento de indivíduos infectados. Apesar de haver drogas efetivas contra o parasito, como o praziquantel e a oxaminiquina, o grande número de infecções em moradores de áreas endêmicas associado à pressão seletiva exercida no parasito pelo constante tratamento da população podem resultar no aparecimento de cepas resistentes às drogas disponíveis (23). A existência de cepas do *Schistosoma* resistentes ao praziquantel pode ser considerada potencialmente um problema para o controle dessa doença, uma vez que, de acordo com El-Ansary *et al.* em 2006 (24), a ênfase nos métodos de controle da esquistossomose tem sido atribuída somente ao uso da quimioterapia. Várias medidas têm sido sugeridas para se tentar reduzir o impacto das resistências às drogas esquistossomicidas: (1) saneamento básico; (2) educação sanitária para evitar a reinfeção após o tratamento; (3) aumento da vigilância pelos órgãos oficiais de saúde pública para monitorar o aparecimento de resistência; (4) desenvolvimento de técnicas simples e factíveis para detecção de cepas resistentes no campo; (5) desenvolvimento de novas drogas esquistossomicidas; (6) associação de drogas (25). Entretanto, ainda é bastante difícil o sucesso das mesmas, uma vez que essas medidas, na sua totalidade não são aplicadas, algumas por necessitar de maiores conhecimentos sobre seu emprego.

A resistência a esquistossomicidas foi relatada primeiramente com o hycanthone e a oxaminiquina no Brasil em 1873(26,27). Estudos posteriores no Kenya, em função das altas doses de oxaminiquina requeridas, demonstraram a resistência de vermes após sucessivos tratamentos quimioterápicos em 1987(28). O primeiro relato de produção de resistência ao praziquantel em condições de laboratório foi realizado por Fallon e Doenhoff em 1994 (23). A partir desse estudo, diversos trabalhos já demonstraram a existência de cepas de *S. mansoni* resistentes ou tolerantes ao praziquantel, tanto no campo como em laboratório (29-33).

Outro fato a ser considerado é o de que a porcentagem de cura dos pacientes tratados com essa droga é de aproximadamente 80% quando realizado o exame de fezes e 29% quando avaliado por biopsia retal (34), além de haver efeitos colaterais, tais como dores abdominais, diarreia, náusea, vômito, tonturas, dentre outros (35-37). Por isso, há um aumento na quantidade de estudos que visam desenvolver estratégias alternativas de controle baseadas não só no tratamento, como também utilização de vacinas anti-esquistossomóticas.

## 1.4 Imunobiologia da Esquistossomose

O parasito *S. mansoni* tem um ciclo de vida complexo, em que sua sensibilidade a fatores do ambiente estimula mudanças fisiológicas, morfológicas e bioquímicas. A capacidade de infectar ativamente ambos os hospedeiros, assim como a migração pelos sistemas dos hospedeiros demonstram uma sofisticada coordenação dos seus sistemas fisiológicos em diferentes fases de desenvolvimento em resposta ao meio em que se encontram (38). O crescimento e desenvolvimento dos vermes adultos do *Schistosoma* requerem uma comunicação permanente do parasito com o ambiente em que se encontram, com o hospedeiro definitivo, e também entre macho e fêmea (38).

No curso da infecção, a resposta imune progride por pelo menos três fases. Nas primeiras 3 a 5 semanas, quando o hospedeiro é exposto aos parasitos imaturos em migração (esquistossômulos), a resposta é predominantemente Th1. A partir do amadurecimento dos parasitos, por volta da sexta semana, começa a produção de ovos e a resposta altera-se de Th1 para Th2. Essa resposta é induzida, primariamente pelos antígenos dos ovos. Durante a fase crônica, a resposta Th2 é modulada (39). A ausência dessa modulação mantém altos os níveis de mediadores inflamatórios, o que pode ocasionar o desenvolvimento da esquistossomose grave, com fibrose hepática e hipertensões podendo resultar em morte do hospedeiro (45,46). A contribuição do IFN- $\gamma$  produzido por células Th1 e IL-4, IL-5 e IL-13 produzido por células Th2 na resposta granulomatosa tem sido discutida sendo que a fibrose, e a maior parte da patologia, é principalmente mediada por citocinas do tipo Th2 (20,47). Camundongos deficientes na sinalização de IFN- $\gamma$  apresentam redução no tamanho do granuloma e parecem transitar para fase crônica mais rapidamente. Uma forte atividade antifibrótica tem sido associada à presença de IFN- $\gamma$  (48), porém, níveis excessivos de IFN- $\gamma$  podem causar graves conseqüências patológicas para o hospedeiro, como, por exemplo, hepatoesplenomegalia (45).

A polarização da resposta imune na direção de um perfil Th1 ou Th2 é prejudicial se não letal para o hospedeiro (45,49,50). No curso normal da infecção, células TCD4<sup>+</sup> reguladoras mantêm a homeostase imunológica controlando a magnitude da resposta imune a organismos invasores (51).

Devido ao complexo ciclo de vida, o *S. mansoni* representa um desafio para o sistema imune do hospedeiro, principalmente porque o parasito apresenta diferentes estágios evolutivos e habita distintos nichos durante seu desenvolvimento no

---

hospedeiro definitivo. Um aspecto fundamental da relação parasito-hospedeiro é o desenvolvimento de eficientes mecanismos de escape pelo *S. mansoni*, que permite a este evadir-se da resposta imune e sobreviver por décadas no hospedeiro utilizando-se de suas biomoléculas para completar o ciclo, e também para desenvolver uma infecção crônica (39). Já foi visto que o parasito utiliza o TNF- $\alpha$  produzido pelo hospedeiro como sinal estimulatório para a produção de ovos (40). A utilização de IL-7 já foi demonstrada para o crescimento e fecundidade do verme (41). A presença do receptor de TGF- $\beta$  expresso na superfície do tegumento sincicial indica a utilização deste fator pelo verme (42). Fatores de crescimento epitelial humano estimulam a expressão do fator de crescimento epitelial no parasito (43). Produtos de células TCD4+ modulam o desenvolvimento do parasito (44). Em hospedeiros imunodeprimidos, o desenvolvimento do parasito é retardado. Uma possível explicação para este fenômeno é que o parasito aguarda melhores condições de sobrevivência do hospedeiro para, então, finalizar o seu processo de crescimento, pareamento, fecundidade e transmissão (44).

## 1.5 Patologia da Esquistossomose

A infecção pelo *S. mansoni* pode induzir diferentes manifestações clínicas em seu hospedeiro definitivo. A localização do parasito, intensidade do parasitismo e a resposta imune do indivíduo aos antígenos do *Schistosoma mansoni* são fatores determinantes do curso clínico dessa doença (52,53). Segundo Hiatt *et al.*, 1979 (54), cerca de três a seis semanas após a primeira exposição ao parasito, os indivíduos não residentes de área endêmica, desenvolvem a forma aguda da doença. Após esta fase, ocorre a diminuição espontânea da reação inflamatória ao redor dos ovos com redução do tamanho do granuloma e diminuição da resposta proliferativa aos antígenos do parasito, conhecida como modulação da resposta imune (55). Esta modulação é vista como início da transição para o estágio crônico da doença. Indivíduos residentes em áreas endêmicas geralmente apresentam a forma crônica da doença (55).

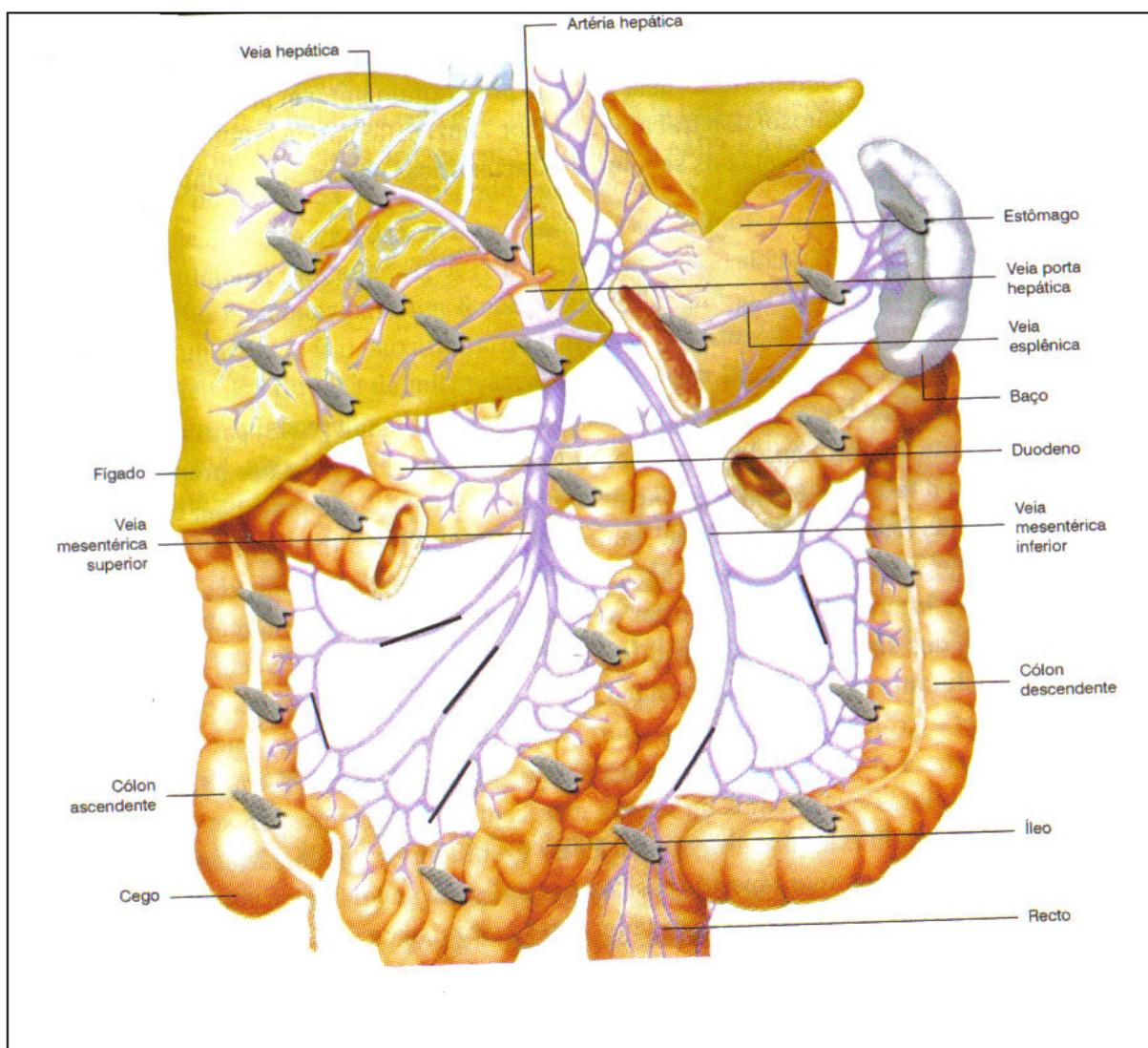
A esquistossomose aguda pode acompanhar-se de manifestações inespecíficas (mal-estar, febre, cefaléia, perda de peso, anorexia, artralgia, mialgia, edema, etc), respiratórias (tosse, dispnéia, dor torácica e alterações das provas de função pulmonar e da radiografia do tórax), digestivas (dor abdominal, diarreia, hepatoesplenomegalia e elevação das enzimas hepáticas), neurológicas (encefalite e mielite) e de pericardite, além de eosinofilia. Quanto à resposta celular na fase aguda da doença observa-se uma significativa resposta proliferativa de PBMC (células mononucleares do sangue periférico) a antígenos solúveis do ovo (SEA) e verme adulto (SWAP) (56). Indivíduos nessa fase da doença apresentam um perfil de resposta celular do tipo Th1 (57) com alta produção de IFN- $\gamma$  por PBMC em resposta a estimulação com SEA e baixos níveis de produção de IL-10 e IL-5 em resposta ao mesmo antígeno (58).

Indivíduos na fase crônica da doença podem apresentar diferentes formas clínicas da doença. A forma crônica habitual ou leve é a forma que se encontra a maioria das pessoas infectadas nas áreas endêmicas, ou eventualmente fora delas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas assintomáticas ou com queixas vagas, geralmente discretas, inespecíficas (59). Algumas manifestações intestinais podem ocorrer em uma infecção de instalação recente, mas que tendem a desaparecer, com ou sem tratamento. A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, dita *pipestem*, descrita por Symmers, 1904 (60). Esta é uma lesão representada por expansão

fibrosa sistematizada dos espaços porta, acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático, mas com preservação da arquitetura normal do parênquima (61). Este quadro pode aparecer em indivíduos sem sinais de hipertensão do sistema porta, portanto, sem esplenomegalia. Neste caso, seria uma forma hepática avançada. Em muitos outros casos, a repercussão clínica se traduz nos sinais de hipertensão porta: esplenomegalia e circulação colateral, daí a designação de forma hepatoesplênica, associada a altas cargas parasitárias e geralmente desenvolvida na infância (61).

Durante a fase crônica, que pode durar a vida do hospedeiro, os vermes continuam a produção de ovos (aproximadamente 300 ovos/dia), e os granulomas que se formam dos ovos ficam menores do que no período inicial da infecção (39). Nesta fase, os indivíduos exibem uma baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3 e alta produção de IgG4 e IgE a antígenos de esquistossômulos e de verme adulto (62). Indivíduos apresentando a forma clínica intestinal apresentam menor produção de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-10 em resposta a estimulação de PBMC com SEA e SWAP (63). O papel da IL-10 nesta fase é fundamental para ao controle da morbidade contribuindo para a sobrevivência do hospedeiro (64, 65-67). Além disso, segundo Corrêa-Oliveira *et al.* em 1998 (63) e Hoffman *et al.* em 2000 (69), o estabelecimento e a permanência da infecção pelo *S. mansoni*, não depende apenas de uma citocina, mas de um balanço fino e um equilíbrio entre as citocinas e o meio no qual se encontram. Para esses autores, um novo paradigma sobre o papel central de regulação da IL-10 na patogênese da esquistossomose foi estabelecido, onde, além dos níveis de IL-10, o desequilíbrio de qualquer tipo de perfil de resposta tipo-1 ou tipo-2 irá determinar o desenvolvimento da morbidade durante a infecção.

Após o alojamento dos vermes em vasos venosos mesentéricos e início da ovoposição, parte dos ovos é eliminada pelo lúmen intestinal e parte fica retida em vários órgãos (parede intestinal, fígado, pâncreas, pulmões e outros) (Fig. 2) provocando uma reação inflamatória peculiar, chamada de reação inflamatória granulomatosa ou granuloma.



**FIGURA 2.** Esquema do sistema porta-hepático-mesentérico mostrando os principais pontos de encontro dos ovos do *S. mansoni*. Após o início da oviposição, os ovos podem ser eliminados juntamente com as fezes ou permanecerem no organismo do hospedeiro localizando-se em diferentes órgãos como fígado, intestino, pâncreas e pulmões.

O processo de formação dos granulomas hepáticos se inicia quando antígenos provenientes do envelope periovular (Von Lichtenberg's) são liberados através de microporos localizados na casca dos ovos estimulando resposta inflamatória (53). Esses antígenos são transportados para órgãos linfóides através de vasos sanguíneos e linfáticos. Nestes órgãos, os antígenos são capturados e processados por células apresentadoras de antígenos que incluem linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. Posteriormente, os antígenos são apresentados a linfócitos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade MHC de classe II (70). Esta interação leva a ativação de células T, expansão clonal, secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos adicionais. Desta resposta

participam linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, células epitelióides, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (71-73).

As células recrutadas acumulam-se em torno dos ovos dando origem ao granuloma propriamente dito, que pode apresentar um volume até 100 vezes maior do que os ovos. A destruição local dos tecidos é seguida de fibrose, um processo de cicatrização no qual os fibroblastos são conduzidos para a lesão e a conseqüente produção de colágeno resulta em cicatriz que pode ocasionar a obstrução de vasos sanguíneos ou linfáticos (71, 74-76).

Segundo Lenzi *et al.* em 1998 (78), a evolução do granuloma é dividida em estágios:

1. Estágio pré-granulomatoso:

- a) fracamente reativo;
- b) exsudativo.

2. Estágio granulomatoso:

- a) exsudativo-produtivo;
- b) produtivo ou fibrótico;
- c) involucional
  - I- com desintegração de fibras colágenas;
  - II- com camada de colágeno espessa;
  - III- com camada de colágeno fina;
  - IV- com pigmento macrofágico.

De acordo com Neves *et al.* em 2007 (79), o granuloma exsudativo é exuberante em células, predominantemente composto por eosinófilos, poucos macrófagos, linfócitos e neutrófilos e escassas células epitelioides, fibroblastos e plasmócitos. Nos granulomas exsudativo produtivos, o número de macrófagos se mantém, enquanto que eosinófilos diminuem e fibroblastos são predominantes. Nos produtivos ou fibróticos, há abundância de fibroblastos, enquanto existem poucos macrófagos e raros eosinófilos. No granuloma produtivo observa-se a formação de cicatriz. O processo de cicatrização resultante desta inflamação pode escapar do controle regulatório levando a fibrose extensa no órgão (80,81).

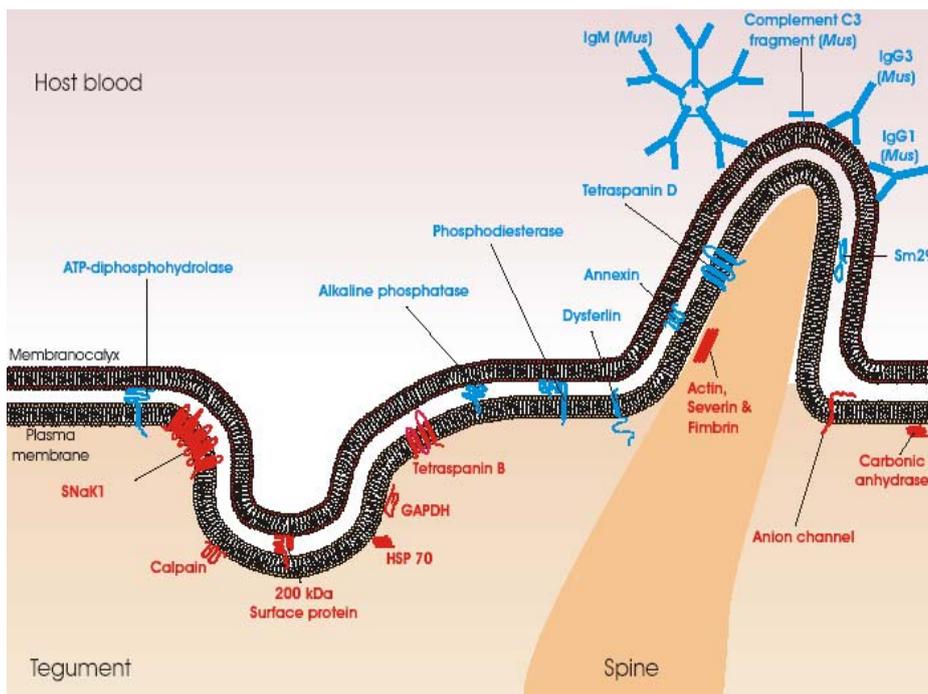
## 1.6 Tegumento do *Schistosoma mansoni*

O tegumento do *S. mansoni* difere morfológicamente e antígenicamente entre os diversos estágios de vida do parasito (Fig. 3). A cercária é toda revestida por um tegumento sincicial com uma região citoplasmática anucleada, diretamente subjacente à membrana superficial contínua, com corpos celulares situados mais profundamente no parênquima. Uma membrana plasmática trilaminada sob uma membrana basal também trilaminada formam a superfície externa do tegumento, que é coberta por numerosas fibrilas (glicocálice). O glicocálice é uma molécula complexa formada por oligossacarídeos que atuam, entre outras funções, protegendo a permeabilidade da cercária (82).

A transformação de cercárias para esquistossômulos é representada por eliminação progressiva do glicocálice, esvaziamento das glândulas secretoras e reorganização do tegumento, com acúmulo de uma proteína transportadora de glicose (SGTP4) na rede de cítons (corpos membranosos) subtegumentares (83). Uma consequência da ausência do glicocálice é o aumento da permeabilidade do esquistossômulo à água.

A partir da penetração no hospedeiro vertebrado, o tegumento se torna especializado na absorção e secreção e representa o principal sítio das ações imunológicas do hospedeiro. Os estudos ultraestruturais dos esquistossômulos recuperados 30 minutos após a passagem pela pele ou mantidos *in vitro* ainda apresentam membrana externa trilaminada, porém menos espessa, as células subtegumentares contêm pequenos corpos laminares que são transportados para o tegumento por conexões citoplasmáticas. Nos espécimes com 60 minutos, os corpos membranosos se fundem para formar grandes vacúolos com membrana externa heptalaminada. Com três horas, a maior parte da membrana externa é heptalaminada e o tegumento contém grandes vacúolos, corpos alongados e pequenos corpos membranosos. No esquistossômulo de 24 horas, a principal modificação é a formação de pregas e cavidades na superfície (84,85). A transição do esquistossômulo pulmonar para o sistema hepático envolve significativas mudanças na topografia da superfície do parasito, além de mudanças fisiológicas. Os esquistossômulos apresentam superfície estriada e pregueada, sem evidências de depressões como nas formas pulmonares. O tegumento tem uma espessura de cerca de 2  $\mu\text{m}$ , sem diferenças entre as formas com duas ou três semanas de idades (84).

O tegumento do verme adulto consiste em um sincício citoplasmático (84,86). O tegumento é ligado na sua superfície basal por uma membrana plasmática convencional invaginada e possui em sua superfície apical uma aparência heptalaminada pouco usual. Esta última estrutura foi interpretada como sendo uma membrana plasmática normal, sobreposta por uma bicamada secretada denominada membranocálice, por analogia com glicocálice das células eucariotas (87). Corpos celulares nucleados estão situados abaixo das camadas musculares, conectados ao tegumento por canais citoplasmáticos alinhados a microtúbulos. A maquinaria de síntese protéica, constituída por ribossomos, retículo endoplasmático e pelo Complexo de Golgi está situada nos corpos celulares. Duas formas de inclusões secretórias, corpos discóides e vesículas multilaminadas, são produzidos nos corpos celulares e se direcionam ao tegumento através das conexões citoplasmáticas. Espinhos, pequenas mitocôndrias e uma variedade de outras inclusões estão presentes no citoplasma do tegumento (88).



**FIGURA 3.** Representação do tegumento do *Schistosoma mansoni*.

## 1.7 Vacinas para Esquistossomose

A introdução do tratamento da doença com fármacos como o praziquantel e oxaminiquina juntamente com o desenvolvimento do conceito de controle de morbidade em vez de controle de transmissão, levou algumas pessoas a imaginarem que ferramentas alternativas para o controle de esquistossomose não eram mais necessárias. Embora usualmente, após o tratamento em massa com medicamentos, haja uma redução na prevalência e intensidade de infecção, a grande extensão de áreas endêmicas e as constantes reinfecções dos indivíduos juntamente com as condições sanitárias precárias em países tropicais como o Brasil, faz com que o tratamento com fármacos seja ineficiente para o controle da transmissão (89).

Embora seja um desafio desenvolver uma vacina contra a esquistossomose, avanços recentes na biologia molecular, especialmente na genômica tem sustentado uma nova compreensão a respeito do desenvolvimento de vacinas para esse complexo parasito (90,91). Essas informações são importantes para o entendimento da biologia do parasito e para novas drogas e alvos vacinais (92). Com os avanços das tecnologias genômicas e proteômicas, novas estratégias se tornaram disponíveis para a identificação de genes/antígenos potencialmente relevantes para a imunidade protetora contra a esquistossomose.

Como o *S. mansoni* não se multiplica dentro do hospedeiro definitivo, o desenvolvimento de uma vacina que confira proteção de pelo menos 60% seria efetivo na diminuição da morbidade e da transmissão da doença (93,94). Uma vacina antiesquistossomótica ideal, segundo Bergquist, 2005 (95) deve conter as seguintes características:

- ✓ Ser capaz de induzir altos níveis de proteção e/ou reduzir fecundidade dos vermes e patologia;
- ✓ Ser facilmente produzida em larga escala;
- ✓ Ser segura para uso em humanos;
- ✓ Ser facilmente incorporada à programas de imunização.

O desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a esquistossomose é um desafio devido à complexidade do parasito causador da doença. Das diversas

estratégias de vacinação experimental testadas, a que utiliza cercária irradiada é a que induz maiores níveis de proteção em camundongos (96).

Grande parte do conhecimento indicando que existe resistência à infecção por *S. mansoni* derivou de estudos em animais experimentais cuja resistência pode ser induzida mediante exposição à cercárias irradiadas. Neste modelo, o esquistossômulo oriundo da cercária irradiada imunizante morre em vários pontos de sua trajetória, antes que a maturidade parasitária seja atingida no sistema porta-mesentérico (94). Assim, percebe-se que este tipo de imunidade não está associado à fase adulta do parasito, nem com a patologia induzida pelo ovo, mas é induzida pelos esquistossômulos danificados pela radiação durante a sua migração e amadurecimento alterados (97).

Na exposição de camundongos à cercárias irradiadas, a resposta imunoprotetora se desenvolve rapidamente, atinge o seu máximo na quinta semana e permanece alta por longos períodos de tempo (98). A proteção conferida por este tipo de vacinação varia de 70% - 96%, tendo sido considerada um referencial para o desenvolvimento de vacinas contra a esquistossomose (94).

Diferentemente da larva normal, cuja migração ocorre rapidamente, a larva atenuada apresenta um padrão de migração truncado no hospedeiro definitivo, importante na indução da imunidade protetora contra a infecção pelo *S. mansoni* (99). A inflamação induzida na pele pela cercária irradiada persiste por, pelo menos, 14 dias (100, 101) e coincide com a sua permanência na pele (99). O foco inflamatório induzido pela larva atenuada na pele contém macrófagos e células dendríticas, capazes de capturar antígenos liberados pela larva e ativar a resposta imune adaptativa nos linfonodos drenantes (101, 102).

Em camundongos, uma exposição única utilizando cercárias irradiadas induz uma resposta dependente de células TCD4<sup>+</sup> associadas a um padrão de produção de citocinas do tipo Th1, uma vez que o uso de anticorpos monoclonais contra IFN- $\gamma$  reduz drasticamente o nível de proteção alcançada, enquanto que a neutralização de IL-4 e IL-5 não alteram a imunidade protetora (103-105). Múltiplas exposições à cercárias irradiadas causam um aumento nos níveis de proteção induzida pela imunização com uma única exposição, mas, apresentam um diferente mecanismo de imunidade protetora. Camundongos submetidos a múltiplas exposições à cercária atenuada desenvolvem uma resposta com altos títulos de anticorpos que podem transferir imunidade a um recipiente não primado (106, 107). Para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra o *S. mansoni*, nesse

modelo é necessária a indução tanto da imunidade celular quanto da imunidade humoral (108). Camundongos deficientes de células B imunizados uma vez com cercária irradiada apresentam redução no nível de proteção alcançado comparado a camundongos selvagens. O mesmo fenômeno de redução da imunidade protetora também é observada em camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  expostos a múltiplas imunizações com cercária irradiada (108).

## 1.8 Antígenos vacinais

Embora a vacina de cercária atenuada possa estimular altos níveis de proteção em animais contra a esquistossomose (109) nenhum peptídeo na forma sintética ou proteína recombinante até hoje alcançou os mesmos níveis de proteção (89,110). Análise de proteoma e transcriptoma tem demonstrado que o mais importante alvo do *S. mansoni* é o tegumento (110). Nem todas as proteínas do tegumento estão expostas ao hospedeiro. De fato somente poucas proteínas estão realmente expostas ao sistema imune do hospedeiro e estas são provavelmente proteínas de membrana que contém motivos (peptídeos sinais ou domínios transmembrana) que direcionam seu tráfego através da via secretória levando a seu alojamento na membrana plasmática do tegumento (110).

Uma subfamília de proteínas que são predominante no tegumento externo do *S. mansoni* são as tetraspaninas, que possuem quatro domínios transmembrana expressos na superfície de células eucarióticas incluindo células T e B (111) e são promissoras como candidatas a vacinas. Uma dessas tetraspaninas, a Sm23, expressa no tegumento do *S. mansoni* (112) é uma das candidatas a vacina selecionada pela WHO para compor uma vacina de subunidade contra a esquistossomose. A Sm23 é a mais eficiente quando apresentada na forma de DNA e não confere proteção na forma de proteína recombinante quando formulada com alumem (113). Mais recentemente, o rastreamento de peptídeo sinal em células de mamíferos foi usado como estratégia para a identificação de duas novas tetraspaninas de *S. mansoni*: SmTSP1 e SmTSP2 expressas no tegumento do *S. mansoni* (114). A TPS2 em particular, induz altos níveis de proteção quando usada como vacina recombinante em modelo murino, e ambas as proteínas são reconhecidas por IgG1 e IgG3 de indivíduos resistentes a infecção pelo *S. mansoni*, mas não pelo soro de indivíduos cronicamente infectados (115).

A literatura sobre as tetraspaninas de mamíferos sugere que tais proteínas têm um importante papel na formação de uma rede estrutural para manutenção da integridade da membrana do tegumento (11). O *Schistosoma* cobre a si mesmo com proteínas do hospedeiro, então, alternativamente, tetraspaninas poderiam funcionar como receptores para moléculas do hospedeiro (114). As recentes aplicações da técnica de RNA de interferência para o *Schistosoma* e observação do fenótipo subsequente está funcionando bem para a elucidação das funções das tetraspaninas no tegumento do *Schistosoma* (116).

Recentemente uma nova proteína do tegumento selecionada a partir de uma biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* foi identificada por Cardoso *et al.* em 2006 (117) e denominada Sm29. A reatividade de soros de indivíduos moradores de áreas endêmicas para a esquistossomose à Sm29 recombinante foi avaliada. Anticorpos IgG1 e IgG3 anti-Sm29r foram isotipos predominantemente identificados no soro de indivíduos naturalmente resistentes à infecção e reinfeção (117,118). Animais imunizados com Sm29r tiveram redução de 31,25% na recuperação de vermes em relação ao grupo PBS e imunização com Sm29r acrescida de CFA induziu 56,7% de proteção em relação ao grupo PBS + CFA (119).

Dentre as proteínas que estão em fase de testes clínicos encontram-se a Sm14 e Sm28/Sh28 GST. A Sm14 é uma proteína de 14 kDa do *S. mansoni* pertencente à família de proteínas ligadoras de ácido graxos que foi identificada em uma biblioteca de cDNA de verme adulto do *S. mansoni* por soro de camundongos vacinados com extrato salino de vermes adultos (SE) (120). Esta proteína está presente em todos os estágios do parasito no hospedeiro vertebrado (121). A forma recombinante desta proteína foi utilizada com sucesso em protocolos de imunização no modelo murino, sendo capaz de induzir uma redução parcial no número de vermes adultos variando de acordo com o adjuvante utilizado, porém, sem nenhum efeito sobre a área do granuloma hepático (122-124).

A Sm28 ou Glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que exerce um importante papel na detoxificação de xenobióticos e funciona como uma proteína ligadora intracelular, protegendo helmintos do ataque do hospedeiro (125,126). A Sm28 foi a princípio isolada de vermes adultos do *S. mansoni*, mas é expressa na superfície de esquistossômulo também, além de ser secretada pelo miracídio dentro do ovo (127,128). A Sm28 demonstrou ser eficiente quando utilizada em protocolos de imunização, reduzindo a carga parasitária, a fecundidade da fêmea e a viabilidade do ovo do parasito (127,129). A forma nativa da Sm28 é capaz de induzir redução de 70% na carga parasitária de camundongos e ratos, e a resposta a esta proteína em ratos está associada a uma grande produção de IgG2a capaz de induzir citotoxicidade *in vitro* mediada por eosinófilos (127). No modelo murino, a imunidade protetora induzida pela Sm28 envolve um mecanismo celular no qual a produção de citocinas como o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-6 estão envolvidas nos mecanismos citotóxicos contra o esquistossômulo (130,131). O uso da forma recombinante da Sm28 em protocolos de imunização resultou na redução da carga parasitária e da

---

fecundidade da fêmea. O efeito anti-fecundidade da Sm28 parece estar associado à indução de anticorpos capazes de inibir a atividade enzimática da proteína (132).

## **JUSTIFICATIVA**

---

## 2 JUSTIFICATIVA

Devido ao fato de não ser fácil modificar as condições sanitárias e socioeconômicas, seja por causa do alto investimento necessário inicialmente, seja pela falta de vontade ou consciência política, tradicionalmente, o controle da esquistossomose tem sido feito através do tratamento com uma única droga, o praziquantel. Este medicamento age somente nos vermes adultos, sendo pouco efetivo sobre as formas imaturas do parasito (133-134). O desenvolvimento de resistência às drogas pelos parasitos é, além disso, uma preocupação a ser considerada (135). A necessidade de tratamentos repetidos em intervalos curtos de dois a três anos, com custos operacionais importantes justifica o desenvolvimento de estratégias de controle alternativas que possam ter um efeito mais duradouro. Na última década, tem-se desenvolvido um consenso que, para atingir uma redução duradoura no espectro da doença e da transmissão da esquistossomose, uma abordagem baseada na vacinação juntamente com quimioterapia necessita ser concebida e executada (95).

A necessidade de se ter uma vacina para esquistossomose permanece bastante motivadora no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à doença (97). Recentemente, antígenos do tegumento do verme adulto do *S. mansoni*, como a Sm29 e a tetraspanina demonstraram ser capaz de induzir imunidade protetora em camundongos (114, 117, 118). O tegumento é a camada do parasito que interage com o hospedeiro e está envolvido com a nutrição, evasão e modulação da resposta imune, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais, sendo importante à perspectiva de vacinas (136,137). Além dos antígenos do tegumento de vermes adultos, o tegumento do esquistossômulo é um alvo importante, já que esse estágio é o primeiro que interage com o sistema imune ativando as células apresentadoras de antígenos e promovendo a ativação e diferenciação de linfócitos B e T.

A imunidade protetora induzida por um antígeno, depende, especificamente, do tipo apropriado de resposta imune. A resposta imune adaptativa é dirigida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), especialmente células dendríticas, que se tornam ativas e maduras após encontrar o patógeno (138). Em um trabalho realizado por nosso grupo (139) o tegumento do esquistossômulo do *S. mansoni* denominado por nós de Smteg foi capaz de ativar células dendríticas induzindo um aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias tais como CD40 e CD86, bem

como aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias: IL-12p40 e TNF- $\alpha$ , as quais são importantes na eliminação do parasito (108, 140). Todo o exposto justifica a utilização do Smtg em protocolos de imunização em murinos e o estudo da imunidade protetora induzida por esse antígeno.

## **OBJETIVOS**

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial protetor do tegumento do esquistossômulo do *S. mansoni* (Smteg) em protocolo de imunização no modelo murino.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito protetor induzido pelas imunizações com Smteg através da recuperação de vermes adultos, número de ovos/miracídios nas fezes, no fígado e intestino;
- Avaliar, através da detecção de anticorpos IgG, IgG1, IgG2c específicos, o perfil de resposta imune humoral induzida pela imunização com Smteg;
- Avaliar o efeito das imunizações na patologia da doença através da medida da área dos granulomas hepáticos e contagem do número de granulomas no fígado;
- Avaliar o perfil de resposta imune celular induzido pelas imunizações com o Smteg através da dosagem de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura de esplenócitos e por marcação intracitoplasmática de linfócitos;
- Avaliar o efeito da imunização com Smteg na integridade do tegumento do parasito, na fecundidade do verme adulto e na viabilidade dos ovos por microscopia óptica e de fluorescência.

## **METODOLOGIA**

---

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção de antígeno

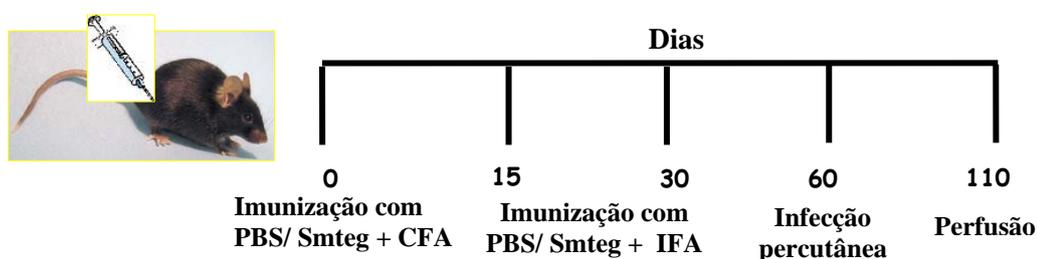
O ciclo de vida da cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) do *S. mansoni* tem sido mantido pela passagem em caramujo *Biomphalaria glabrata*, hamsters e camundongos Swiss ou Balb/c. As cercárias foram obtidas no laboratório de malacologia do Centro de Pesquisa René Rachou e transformadas, mecanicamente, através da técnica de Ramalho-Pinto e colaboradores em 1974 (141) em esquistossômulos. Resumidamente, as cercárias foram deixadas no gelo durante 30 minutos, acondicionadas em tubos cônicos, para reduzir a sua movimentação. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 200xg por 3 minutos. O “pellet” então foi ressuspenso em 1mL de Earl’s salts plus lactoalbumin hydrolysate (ELAC) gelado. As caudas foram quebradas utilizando-se o vórtex na velocidade máxima por um período de dois minutos. Posteriormente as caudas foram retiradas do meio através de repetidas lavagens restando, então, os esquistossômulos. Estes foram incubados por 90 minutos no banho-maria a 37° C.

Os esquistossômulos foram lavados com 5 mL de salina apirogênica e centrifugados a 200xg por 1 minuto. Para a remoção do tegumento dos esquistossômulos (Smteg), foram acrescentados 2mL de CaCl<sub>2</sub> 0,3M, e as larvas foram agitadas no vórtex no canal 3 por um período de 7 minutos e centrifugados a 900xg por 1 minuto por duas vezes. O sobrenadante, contendo o tegumento, foi coletado e posteriormente, centrifugado a 50000xg durante uma hora a 4°C. O pellet enriquecido com membranas foi submetido à diálise contra 6 litros de salina fisiológica 1,7% com duas trocas. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (142).

### 4.2 Protocolo de imunização

Trinta camundongos C57BL/6 fêmeas foram separados para a vacinação, sendo que os mesmos foram divididos em três grupos de 10 camundongos cada. Um grupo controle da infecção, outro inoculados com PBS e Adjuvante Completo / Incompleto de Freund (CFA ou IFA), um grupo vacinado com o Smteg e Adjuvante Completo / Incompleto de Freund (CFA ou IFA). Aplicou-se 200µL da mistura em cada camundongo, os inoculados com PBS receberam 100µL de PBS e 100µL de

CFA na primeira dose ou IFA nas doses subseqüentes cada. Camundongos vacinados com Snteg receberam 25µg de antígeno diluído em salina (100µL) e 100µL de CFA na primeira dose ou IFA nas doses subseqüentes. A vacinação foi realizada por via subcutânea, em três doses com intervalos de 15 dias entre elas. Trinta dias após a terceira dose, os camundongos foram infectados com 100 cercárias por via percutânea. Após 50 dias, os animais foram sacrificados e perfundidos pela veia porta (143). Fragmentos do fígado foram retirados para análise histopatológica, fígado e intestino foram retirados para contagem do número de ovos. Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital dos camundongos para obtenção do soro de 15 em 15 dias a partir de 15 dias após a primeira dose da vacina. A figura 4 abaixo ilustra o esquema de imunização.



**FIGURA 4: Protocolo de imunização.** A primeira dose da imunização foi realizada no dia 0, no qual camundongos foram imunizados com PBS mais Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou com Snteg mais CFA. A segunda e a terceira doses foram realizadas com um intervalo de quinze dias utilizando as mesmas formulações anteriores, entretanto, o adjuvante utilizado foi o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA). Trinta dias após a terceira dose, a infecção percutânea foi realizada utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo e, cinquenta dias após a infecção a perfusão do sistema porta hepático foi realizada.

### 4.3 Dosagens de anticorpos

Análise de anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2c foi realizada pelo método de ELISA. Placas de microensaio de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com 1 µg/mL de Snteg em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 por 12 a 16 horas à 4°C. As placas foram então bloqueadas por 20 horas à 4°C com 300µL por poço de PBST<sub>20</sub> (phosphate-buffered saline and Tween 20) acrescentado a 10% de SFB (soro fetal bovino). Cem microlitros de soros diluídos à 1:100 (IgG e IgG1) e à 1:200 (IgG2c) em PBST<sub>20</sub> (PBS com Tween-20) foram adicionados por poço em duplicata nas placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Cem microlitros por

poço de IgG (Southern Biotech) , IgG1 (Southern Biotech) e IgG2c (Southern Biotech) conjugados à peroxidase foram diluídos em PBST<sub>20</sub>, respectivamente, a 1:5000, 1:20000, 1:4000 e adicionados à placa. A reação de cor foi desenvolvida pela adição de 100µL/ poço do substrato (TMB- Tetramethylbenzidine) e parada com 50µL/ poço de 5% de ácido sulfúrico. As placas foram lidas a 450 nm em um leitor de ELISA.

#### **4.4 Exames Parasitológicos**

Dois dias antes da perfusão duas metodologias de exame de fezes, HPJ e Eclosão de miracídios, foram realizadas.

##### **4.4.1 HPJ (Hoffman, Pons e Janner)**

Fezes frescas (0,5g de fezes por grupo – controle da infecção, PBS e Smtteg) foram colhidas no dia do exame e 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 4 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 de luz para determinação do número de ovos por grama de fezes.

##### **4.4.2 Eclosão de miracídios**

Fezes frescas (0,5g de fezes por grupo – controle da infecção, PBS e Smtteg) foram colhidas no dia do exame. As fezes foram colocadas e trituradas (com o auxílio de um bastonete de alumínio) em um cálice contendo água desclorada a 28°C. Essa mistura foi então transportada para um Kitasato e o volume do mesmo foi completado com água desclorada a 28°C. Esse recipiente foi exposto à luz por quinze minutos. Após esse período, o Kitasato foi colocado em uma caixa de madeira própria e, em seguida, a mesma foi vedada a fim de evitar a entrada de luz por outro lugar que não fosse apenas o container coletor, este que acondicionou os miracídios eclodidos após uma segunda exposição à luz por mais duas horas. Os

miracídios, então, foram coletados por pipetagem, depositados em uma placa escavada (placa de Kline) e contados à lupa. Os procedimentos seguiram o método descrito por Juberg *et al.* em 2008 (144).

#### 4.5 Recuperação de vermes adultos

Camundongos C57BL/6 foram desafiados 30 dias após a terceira imunização através de exposição percutânea da pele do abdômen com 100 cercárias da cepa LE. Cinquenta dias após o desafio, vermes adultos foram recuperados do sistema porta-hepático por perfusão das veias mesentéricas (Pellegrino J, Siqueira AF 1956). Os níveis de proteção foram calculados comparando o número de vermes recuperados no grupo imunizado com o grupo controle, através da seguinte fórmula:

$$NP = \frac{CRGC - CRGE}{CRGC} \times 100$$

NP: nível de proteção

CRGC: carga recuperada do grupo controle

CRGE: carga recuperada do grupo experimental

#### 4.6 Contagem do número de ovos do intestino e fígado

Durante a perfusão, o fígado e o intestino de cada camundongo foram retirados. Esses órgãos foram pesados, acondicionados em béqueres com KOH10% e permanecidos overnight. No dia seguinte, os béqueres contendo os órgãos foram incubados à 37° por meia hora em banho-maria. Os órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 900xg 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 10 µL da solução foi observado em microscopia. Foram realizadas 3 contagens de 10 µL.

#### **4.7 Área e número de granulomas hepáticos**

Secções do fígado de cada camundongo dos grupos controle e experimental foram coletados 50 dias após a infecção para avaliar os efeitos da imunização na formação do granuloma. Esses cortes foram fixados em formol 10%. Cortes histológicos foram feitos com o auxílio de um micrótomo e corados com HE (Hematoxilina - Eosina). Imagens dos granulomas foram capturadas através de uma câmera acoplada em um microscópio e analisadas no software KS300 do laboratório de patologia da UFMG.

Para realizar as medidas da área dos granulomas, foram capturadas imagens de 10 granulomas/ lâmina que se encontravam no estágio exsudativo-produtivo e que continham apenas um ovo com miracídio vivo. Utilizando um cursor digital, o diâmetro total do granuloma foi delimitado e, posteriormente analisado no software KS300. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

Para determinar o número de granulomas por área, o número total de granulomas por lâmina foi contado em um microscópio. Todas as lâminas foram escaneadas e a área de corte foi determinada utilizando o software KS300.

#### **4.8 Avaliação da imunidade induzida pelo antígeno através da análise de citocinas e marcação intracelular**

Camundongos (5 por grupo PBS/ Smtg) foram submetidos ao protocolo de imunização descrito anteriormente e uma semana após a última dose, os camundongos foram eutanasiados para retirada do baço. Este órgão foi macerado, as hemácias foram lisadas e os esplenócitos foram lavados com salina e ajustados para  $1 \times 10^6$  células por poço. Para a análise de citocinas, os esplenócitos foram mantidos em cultura à 37°C 5% CO<sub>2</sub> em meio; na presença do mitógeno Concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou na presença de Smtg (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h para detecção de IL-4 e TNF- $\alpha$  ou 72h para detecção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no sobrenadante de cultura por ELISA sanduíche utilizando os Kits duoset (R&D system) ou Ready set GO (e-bioscience) conforme instruções do fabricante. Para dosar as citocinas intracitoplasmáticas, os esplenócitos foram mantidos em cultura a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio, na presença de mitógeno (ConA-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou antígeno (Smtg- 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 20 horas. A secreção de citocinas foi interrompida pela adição de brefeldina A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) à cultura nas 4 últimas horas de cultura. Após este período as células

foram centrifugadas e os receptores Fc $\gamma$  foram bloqueados pela adição de anticorpo anti-CD16/CD32 de camundongo (BD-bioscience). As células foram então lavadas, centrifugadas a 387x g por 7 minutos e marcadas com anticorpo anti-CD4 de camundongo (clone GK1.5, BD bioscience) ou anti-CD8 de camundongo (clone 53.6.7, e-bioscience) e seus controles de isotipo Rat IgG2b (BD bioscience) e Rat IgG2a (e-bioscience) conjugados à FITC por 15 minutos à 4°C. Após marcação de superfície, as células foram lavadas, fixadas com formaldeído a 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- $\gamma$  (clone, XMG1.2, BD bioscience), anti TNF- $\alpha$  (clone MP6-XT22, e-bioscience) , anti IL-10 (clone JES5-16E3, e-bioscience) e anti IL-4 (Clone 11B11, BD Bioscience) e seus controles de Isotipo Rat IgG1 (BD bioscience) e Rat IgG2b (e-bioscience) conjugas à PE por 30 minutos à temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, as células foram fixadas e a aquisição dos dados (30000 eventos) foi realizada no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree star, Ashland).

#### **4.9 Marcação do tegumento de vermes adultos**

Cinco camundongos C57BL/6 do grupo vacinado com Smteg CFA/IFA e do grupo inoculados com PBS CFA/IFA foram submetidos ao protocolo de vacinação exposto no item 3.2, entretanto, o método de perfusão realizado seguiu o protocolo descrito por Smithers & Terry em 1965 (145) a fim de não danificar o tegumento dos vermes adultos. O sangue presente nas placas em que se encontravam os vermes foi retirado através da utilização de pipetas de Pasteur de plástico em sucessivas lavagens utilizando meio de cultura RPMI. Posteriormente, os vermes foram colocados de forma aleatória em placas de seis poços contendo meio de cultura RPMI enriquecido com Soro Fetal Bovino. Essa placa, então, foi incubada na estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 15 minutos. Após esse tempo, 10  $\mu$ g da sonda Hoechst 33258 (Molecular Probes) foi acrescentada em cada poço sendo a placa novamente levada a incubação por 1 hora, após esse tempo, o excesso de sonda foi lavado. Uma lâmina foi preparada com os vermes e a mesma foi levada à microscopia de fluorescência para análise do dano no tegumento.

#### **4.10 Cultura de vermes adultos e marcação de ovos**

Vermes foram recuperados através da perfusão de camundongos C57BL/6 vacinados com Smtteg CFA/IFA e inoculados com PBS CFA/IFA pelo método (145). Os vermes foram lavados com meio de cultura RPMI e, em seguida, 12 casais de cada grupo foram distribuídos em uma placa de seis poços dividindo-se os mesmos em 4 casais por poço. Observação da integridade do tegumento e motilidade dos vermes, bem como número e estádios dos ovos foi realizada durante os sete dias de cultura utilizando microscópio de luz. No oitavo dia de cultura, os ovos foram corados com a 20µg da sonda Hoechst 33258 conforme descrito no item 4.10 para verificação da viabilidade dos mesmos.

#### **4.11 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 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  $p < 0,05$ .

**RESULTADO: ARTIGO**

---

## 5 RESULTADO: ARTIGO

### 5.1 Comprovante de submissão do artigo

Mensagem encaminhada: Manuscript submitted - PIM-2010-0018.msg

Manuscript submitted - PIM-2010-0018 Quarta-feira, 3 de Fevereiro de 2010 9:40

De: emmmissen@msn.com  
Para: ctoscano@cpqrr.fiocruz.br, ctoscano@icb.ufmg.br

Dear Miss Fonseca

PIM-2010-0018 Immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) elicits tegument damage, reduction on egg and parasite burden.

Thank you for submitting your paper to Parasite Immunology. We will be contacting you as soon as we are able to make our decision.

Please quote the number above in any future correspondence.

Yours sincerely

Emma Missen  
Editorial Assistant

On behalf of Professor Eleanor Riley and Professor Richard Grenois, Editors

--  
Centro de Pesquisas Rene Rachou/CPqRR - A FIOCRUZ em Minas Gerais.  
Rene Rachou Research Center/CPqRR - The Oswaldo Cruz Foundation in the State of Minas Gerais-Brazil.

---

**Immunization with newly transformed *S. mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction on egg and parasite burden.**

Tatiane Teixeira de Melo<sup>1+</sup>, Juliano Michel de Araujo<sup>1++</sup>, Fernanda do Valle Durães<sup>2+++</sup>, Marcelo Vidigal Caliarí<sup>3</sup>, Sérgio Costa Oliveira<sup>2,4</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho<sup>1</sup> and Cristina Toscano Fonseca<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais.

\* Corresponding author: Mailing Adress: Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz. Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, 30190-002, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55-31-33497828. Fax: 55-31-32953115. E-mail: [ctoscano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:ctoscano@cpqrr.fiocruz.br)

Disclosures: none

**Abstract**

The surface of the schistosomula is an important target for host immune system attack since the tegument represents the interface between host and parasite and thus is a potential candidate for development of new intervention strategies. In this study we evaluated the ability of schistosomula tegument (Smteg) to induce protection in mice. Immunization of mice with Smteg together with Freund adjuvant induced a Th1 type of immune response associated with a significant reduction in worm burden (43-48%), eggs trapped in the liver (65%), eggs eliminated in the feces (59-60%) and granuloma number (41%). Lastly, during an *in vitro* study, worms from mice immunized with Smteg showed damage in the adult worm tegument and impaired egg laying.

**Key words:** *Schistosoma mansoni*, vaccine, schistosomula tegument.

**Running title:** Smteg induces protective immunity against schistosomiasis.

## 1. Introduction

Among human parasitic diseases, schistosomiasis ranks second behind malaria in terms of socio-economic and public health importance in tropical and subtropical areas (1). Schistosomiasis causes up to 4.5 million DALY (disability adjusted life years) losses annually (2). Approximately 200 million people around the world are infected with one of the five species of schistosome which causes the disease in humans (3) and additional 779 million individuals are at risk of acquiring this infection (2).

Currently, schistosomiasis control strategy is mainly based on the treatment of infected individuals with safe and effective drugs (4). However the simplistic approach of exclusive drug treatment has been proved not to be sufficient to control the disease transmission and drug resistance by the parasite is also a concern that has to be considered (5). An effective vaccine against schistosomiasis would contribute significantly to the current control strategy, mainly because it would provide long lasting immunity against the infection. In addition, in the case of schistosomiasis, a sterilizing vaccine is not essential and partial reduction in worm burdens could considerably reduce morbidity, pathology and limit parasite transmission (6).

Whether an antigen/vaccine will be protective or not, the outcome of infection depend on the appropriate type of adaptative immune response elicited. Adaptative immune responses are driven by antigen-presenting cells (APCs), especially dendritic cells, which become activated and mature upon encounter with a variety of different pathogen-derived stimuli (7). Recently we have demonstrated that newly transformed schistosomula tegument (Smteg) is able to activate dendritic cells to up-

regulate the expression of essential co-stimulatory molecules, such as CD40 and CD86, and also to produce IL-12p40 and TNF- $\alpha$  cytokines (8).

In the murine model, protective immunity against *Schistosoma mansoni* has been described to be dependent on antibody response and to involve a cellular immune response dependent on CD4<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$  (9-12). Additionally, the use of rIL-12 as adjuvant has been proved to enhance the protective immunity induced by the antigen alone or associated with others adjuvants (13-15).

The larval schistosomula has been described to be the most susceptible parasite life stage to host immune system attack the interface of host-parasite interaction lies primarily on the parasite tegument (16-18). The tegument is a dynamic host-interactive layer involved in nutrition, immune evasion and modulation, excretion, osmoregulation, sensory reception and signal transduction (19-20). Therefore, the tegument could be considered an obvious source of parasite antigens for the development of a schistosome vaccine. Recently publications have shown that some proteins located in the tegument, such as TSP-2 (21) and Sm29 (22), are able to induce high levels of protection in the murine model. Taking all this information into account, Smteg represents an interesting antigen to be tested in immunization protocols in mice.

In this study, we have evaluated the ability of Smteg to induce immune protection in mice. Herein, we showed that immunization of mice with Smteg was able to induce partial reduction on worm burden, on eggs trapped on liver and gut, and also eggs eliminated in the feces.

---

## 2 Materials and methods

### 2.1. Mice and parasites

Female C57BL/6 mice aged 6-8 weeks were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)- Fiocruz. All procedures involving animals were approved by the local Ethics Commission on Animal Use (CEUA) from Fiocruz (n° L-005/08). Cercariae of *S. mansoni* (LE strain) were maintained routinely in *Biomphalaria glabrata* snails at CPqRR and obtained by exposing infected snails to light for 1h to 2h to induce cercariae shedding. The number of cercariae and their viability were determined using a light microscope.

### 2.2. Antibodies

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: anti-mouse CD4-FITC (clone YTS 191.1, Cerdalane), anti-mouse CD8-FITC (clone 53-6-7, e-bioscience), anti-mouse IL-10-PE (clone JESS-16E3, e-bioscience), anti-mouse IFN- $\gamma$ -PE (clone XMG1.2, e-bioscience), anti-mouse TNF- $\alpha$ -PE (clone MPGXT22, ebioscience) and anti-mouse IL-4-PE (clone 11B11, BDbioscience). The following isotype controls were used: Rat IgG2a-FITC, Rat IgG2b-FITC, Rat IgG1-PE, Rat IgG2a-PE, Anti-mouse CD16/CD32, Fc Block (BD Bioscience) was also used for flow cytometry assays.

### 2.3. Tegument purification (Smteg)

Cercariae from *S. mansoni* were mechanically transformed into skin-stage schistosomula according to Ramalho-Pinto et al. (23). Briefly, cercariae were incubated on ice for 30 min. and then centrifuged at 1800xg for 3 min. at 4°C. The cercariae were resuspended in cold ELAC (Earle's salts plus lactalbumin

hydrolysate) containing 0.5% lactoalbumin, 1% penicillin/streptomycin and 0.17% glucose. The tails were broken by vortexing in high speed for 2 minutes. After this, the tails were removed through several wash steps with ELAC. The schistosomula were cultured for 90 min at 37°C in ELAC. The tegument was removed with CaCl<sub>2</sub> 0.3M by vortex agitation, according to Caldas et al. (24). The tegument was separated from denuded bodies by centrifugation at 900xg for 1 min. The supernatants were pooled and centrifuged at 50000xg for 1h at 4°C. The pellet was dialyzed against physiological saline 1.7%. This preparation was termed Smtteg. A Western blot was performed using Smtteg and sera from mice immunized with rSm29, a tegument protein previously characterized by Cardoso et al. 2006 (25) to confirm that Smtteg preparation contains tegument proteins.

#### **2.4 Immunization of mice**

Female C57BL/6 mice (10 mice per group) were immunized subcutaneously in the nape of the neck with 25µg Smtteg on days 0, 15 and 30. The antigen was formulated with Freund's adjuvant (complete Freund's adjuvant/CFA for the first immunization and incomplete Freund's adjuvant/IFA for the boosters). In the control group, saline with Freund's adjuvant was administered using the same immunization protocol. Blood samples were collected from retro orbital sinus of each mice with an interval of fifteen days beginning 15 days after the first immunization. Serum samples were collected and stored at -20°C until use. Two independent experiments were performed to confirm the results observed.

#### **2.5 Challenge infection and worm burden recovery**

Thirty days after the last boost, mice were challenge through percutaneous exposure of abdominal skin for 1h in water containing 100 cercariae (LE strain) as

described Smithers and Terry (26). Fifty days after challenge, adult worms were perfused from the portal system and mesenteric veins according to Pellegrino and Siqueira (27). The protection level was calculated comparing the number of worm recovered from the immunization group with the control group.

## **2.6 Measurement of specific antibodies**

The measurement of specific anti- Smtcg IgG, IgG1 and IgG2c antibodies was performed by ELISA. Maxsorp 96-wells microtiter plates (Nunc) were coated with 1µg/mL of the Smtcg in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, for 16h at 4°C. The plates were then blocked for 16h at 4°C with 300µL/well of PBST (phosphate-buffered saline, pH 7.2 with 0.05% Tween-20) plus 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO, USA). One hundred microliters of each serum diluted 1:100 (IgG and IgG1) and 1:200 (IgG2c) in PBST was added per well and incubated for 1h at room temperature. Plate-bound antibody was detected by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotech, USA), IgG1 (Southern Biotech, USA) and IgG2c (Southern Biotech, USA) diluted in PBST 1:5000, 1:20000 and 1:4000, respectively. Color reaction was developed by addition of 100µL per well of TMB (Microwell Peroxidase Substrate System) and stopped with 50µL of 5% sulfuric acid per well. Absorbance was measured at 450nm in ELISA reader.

## **2.7 Number of eggs in gut, liver and feces**

At days 49 and 50 after challenge infection, 0.5g of fecal material from each mouse group were analyzed for egg burden determination. Two different methods were performed: HPJ (28) and miracidia hatching (29). In HPJ, whole sediment was evaluated to determine epg. Gut and liver from each mouse from both control (saline) and Smtcg immunized groups were collected 50 days post-infection. These organs

were weighed and digested with 10% KOH overnight at 4°C and for 2 hours at 37°C. The eggs were obtained by centrifugation at 900xg for 10 min and resuspended in 1mL of saline. Egg number was counted using a light microscope.

## **2.8 Measurement of hepatic granuloma area and numbers**

Liver sections from control mice (saline plus Freund's adjuvant) and Smtg plus Freund's adjuvant immunized mice were collected 50 days post-infection to evaluate the effect of immunization on granuloma formation. The liver sections removed from the central part of the left lateral lobe were fixed in 10% buffered formaldehyde in PBS. Histological sections were performed using microtome and the slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). To perform area measurements, 100 granulomas from each group with a single well-defined egg and at exsudative-productive stage were randomly obtained at 10x objective lens through a JVC TK-1270/RGB microcamera. Using a digital pad, the total area of granulomas was measured and the results were expressed in square micrometers ( $\mu\text{m}^2$ ). To determine the number of granulomas, all section from the same slides mentioned above were counted using a microscope with 10x objective lens and the total area of the cut was calculated using the same software. The results were expressed as the number of granuloma per area of liver ( $\text{mm}^2$ ).

## **2.9 Culture of adult worms and labelling of adult worm tegument and *S. mansoni* eggs**

The perfusion for the recovery of adult worms was performed according to Smithers and Terry (25) using RPMI-1640 plus heparin as the perfusing fluid. Worms were washed in RPMI-1640 and 5% fetal bovine serum (FCS). For tegument labeling, the worms were divided into six-well plates (4 pairs of worms per well) with

2mL of RPMI and labeled with 10µg of Hoechst 33258 (Sigma). A hydrophilic probe, which ability to cross the membrane is increased in the presence of damages in the membrane that allow the probe to bind the DNA of the cell. When eggs of *S. mansoni* are not viable, the probe cross pores present in eggs and bind the DNA of embryonic cells and vitelline cells (30, 31).

The worms were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 30 minutes, then gently washed five times with 2mL RPMI-1640 and placed on a microscope slide. Analysis of fluorescence was performed using a Zeiss fluorescence microscope (K- Zees) with a DAPI filter and documented with a Nikon 4.0 megapixel camera. Using the ImageJ, the area of damage in adult worm tegument was determined. For the *in vitro* culture, the worms from control and Smtg immunized mice were divided into six-well plates (4 pairs of worms per well) and cultured in RPMI-1640 supplemented with 5% fetal bovine serum, 100µg/mL of antibiotics penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 7 days. On the eighth day of worm culture, *S. mansoni* eggs were removed along with the culture medium, stained with 20µg of the probe Hoechst 33258, centrifuged and washed five times to check viability. Analysis of fluorescence was performed under Zeiss fluorescence microscope (K-Zees), filter DAPI and documented in a 4.D megapixel Nikon.

### **2.10 Cytokine analysis**

Experiments were performed using splenocyte culture supernatants from five individual mice per group immunized with Smtg/CFA/IFA or saline/CFA/IFA one week after the last immunization. The cells obtained from mice spleen were washed twice in sterile saline and then adjusted to 1 X 10<sup>6</sup> cells/well. Splenocytes were maintained in culture at 37° C in 5% of CO<sub>2</sub> in medium alone or stimulated with Smtg (25 µg/mL) or concanavalin A (Con A) (5 µg/mL). Culture supernatants were

collected after 24 h stimulation to measure IL-4 and TNF- $\alpha$  or 72 h stimulation to measure IFN- $\gamma$  and IL-10. Cytokine assay for measurement of IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 was performed using the Douset Elisa kit (R&D system, Minneapolis, MN) or Ready set GO (e-bioscience, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions.

### **2.11 Intracytoplasmatic cytokine staining**

For intracytoplasmatic cytokine staining, splenocytes from 5 mice/group were adjusted to  $5 \times 10^5$  cells per well. Splenocytes were maintained in culture at 37°C in 5% of CO<sub>2</sub> in medium alone or stimulated with Smtg (25  $\mu$ g/mL) or Con A (5  $\mu$ g/mL). After 16 h of culture, 1  $\mu$ g/well of brefeldin A (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was added to impair cytokine secretion. After 4 h of incubation, these cells were stained for surface markers and intracellular cytokines. Before staining the cells were generally blocked with anti-mouse CD16/CD32 mAbs (Fc-Block), after that cells were stained for surface markers using FITC-labeled anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibodies and their respective isotype controls by incubation for 20 min with antibody solution (PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM NaN<sub>3</sub>), followed by washes and fixation using 2% formaldehyde solution. These cells were permeabilized and further stained with PE-labeled anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-10 and anti-IL-4 monoclonal antibodies in PBS with 0.5% saponin. After 15 min, cells were washed with permeabilization solution, resuspended in PBS and read using FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data analysis was performed using a FlowJO interface (Tree Star, Ashland, OR).

**2.12. Statistical analysis**

Statistical analysis were performed with Student's t-test using the software package GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego California USA).

### **3 Results**

#### **3.1 Smtteg immunization elicits partial protection to challenge infection and reduction in egg number.**

Once Western blot analysis confirmed that Smtteg of *S. mansoni* schistosomula tegument contain at least one tegument from protein (data not shown), protective immunity induced by Smtteg vaccination was evaluated 50 days after challenge infection. Mice vaccinated with Smtteg had significantly lower worm burdens and egg or miracidia per gram of feces than mice from the control group (Table 1). Immunization with Smtteg induced 43-48% reduction in worm burden, 59-60% reduction in the number of eggs eliminated in the feces and 72-73% reduction on miracidia/gram of feces compared to control group (Table 1). In order to investigate the effect of Smtteg immunization on the number of *S. mansoni* eggs trapped in the liver and in the intestinal wall of immunized mice, the number of eggs per gram of liver or gut was determined. Mice immunized with Smtteg presented a significant reduction (65%) in egg counts in the liver compared to control mice (Fig. 1).

#### **3.2 Liver pathology**

The effect of Smtteg immunization on liver pathology was also evaluated. In parallel with the results of egg burden in the liver, histological analysis by digital morphometry of H&E sections obtained from mice immunized with Smtteg showed a significant reduction in the number of liver granuloma compared to saline inoculated mice (Fig. 2A). However Smtteg immunization failed to induce granuloma modulation, since no significant difference in granuloma area was observed between Smtteg immunized mice and control group (Fig. 2B).

### **3.3 Antibody responses to Smtteg immunization.**

In order to evaluate the production of antibodies specific to Smtteg in immunized mice, the level of anti-Smtteg IgG in sera of immunized mice was determined by ELISA. Significant levels of anti-Smtteg IgG antibodies were detected in the sera of Smtteg immunized mice compared to control group at all time points analyzed (Fig. 3). Enhanced production of anti-Smtteg antibodies was also observed in Smtteg immunized group after the second immunization (Fig. 3). To evaluate the type of immune response elicited by Smtteg immunization, the levels of IgG1 and IgG2c antibodies to Smtteg were also determined by ELISA. Smtteg immunization induced a significant production of specific anti-Smtteg IgG1 and IgG2c compared to control animals thirty days after the first immunization which were maintained until the end of the immunization protocol (Table 2). Furthermore, the IgG1/IgG2c ratio observed demonstrates that initially there was an IgG1 predominance in the sera of Smtteg immunized mice however, as IgG2c levels increased with subsequent immunization, the ratio between IgG1 and IgG2c production tended towards a balance.

### **3.4 Smtteg immunization induces a Type 1 immune response in mice.**

Since Smtteg immunized animals demonstrated high protection level, we decided to evaluate the cytokine profile produced by splenocytes from mice immunized with Smtteg or saline plus Freund's adjuvant, after the third immunization dose. Significant IFN- $\gamma$  production was detected in the supernatant of splenocytes from the Smtteg immunized group compared to the control group following Smtteg *in vitro* stimulation (Fig. 4). Although the levels of IL-4 produced by the splenocyte from Smtteg immunized mice was significantly higher compared to control group, IL-4 levels was 33 fold lower than IFN- $\gamma$  levels in Smtteg immunized mice , indicating a

predominance of a Th1 response. Both saline and Smteg immunized groups produced TNF- $\alpha$  in response to *in vitro* Smteg stimulation but no statistically significant difference in TNF- $\alpha$  production was observed between both groups (Fig. 4). To determine if the source of cytokines produced were T lymphocytes, we performed intracellular cytokine staining in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells from Smteg immunized and control mice. After Smteg *in vitro* stimulation, significant percentage of CD4+IFN- $\gamma$ + cells and CD4+IL-10+ cells was detected in mice immunized with Smteg in comparison to saline immunized mice (Table 3). In control group, no difference in the percentage of double positive cells were observed between unstimulated or Smteg-stimulated cells for IFN- $\gamma$ , IL-10 or IL-4 staining, however significant increase in percentage of CD4+TNF- $\alpha$ + cells were observed in Smteg stimulated cells (data not shown). In Smteg immunized mice, *in vitro* Smteg stimulation induced a significant increase in the percentage of CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+TNF $\alpha$ + and CD4+IL-10+ compared to unstimulated cells (data not shown).

### **3.5 Smteg immunization induces damage to adult worm tegument.**

To determine the effect of Smteg immunization on the parasite, the integrity of the tegument of adult worms recovered from the portal system and mesenteric veins of immunized animals were evaluated. The tegument of the adult worms recovered from mice immunized with Smteg plus Freund's adjuvant showed stronger labeling with the fluorescent probe Hoechst 33258 compared to the tegument of adult worms recovered from mice inoculated with saline (Fig. 5A-D and supplementary data Fig1 and Fig2). Worms obtained from mice immunized with Smteg showed a significant increase in the area of tegument damage compared to saline inoculated mice (Fig5E). In order to access the viability of these adult worms, pairs of worms from both immunized group were cultured *in vitro* for 7 days. Mice inoculated with saline

presented normal movements and morphology, laying eggs during the seven days of culture with the presence of newly hatched miracidia, when examined seven days after the beginning of the experiment. In contrast, the worms from Smtteg immunized group remained with normal movements, but some blisters appeared in the tegument up to the 7<sup>th</sup> day of observation. Moreover, no miracidia were observed to hatch and all eggs appeared to be dead (data not shown).

#### 4. Discussion

Schistosomiasis is one of the most important neglected tropical diseases whose effective control is unlikely to occur in the absence of improved sanitation and a vaccine. The schistosomes tegument, a unique outer syncytial surface, represents an obvious target for the development of new control strategies (21). In this context, recently our group demonstrated that newly transformed schistosomula tegument (Smteg) is recognized by DC and induces the up regulation of CD40 and CD86 expression and the production of IL-12 and TNF- $\alpha$  *in vitro* (8), hallmarks of a Th1 response. Co-stimulatory molecules such as CD40 and CD86 along with proinflammatory cytokines such as IL-12 and TNF- $\alpha$  play an important role in the immune response triggered by antigens of *S. mansoni*. This is confirmed by the work of Hewitson et al (2007) (32), which demonstrate that CD40/CD154 signaling has an essential role in the development of protective immune response against schistosomes. Additionally, some surface-exposed tegument proteins are able to induce high levels of protection in mice (21,22), suggesting that the schistosomula tegument would be able to induce protective immunity.

Previous studies have demonstrated the ability of antigens obtained from different life stage of the parasite to induce protective immune response in mice, the soluble lung stage antigens were able to reduce significantly the worm burden recovered from immunized mice when the vaccine formulation included IL-12 as adjuvant (33). The presence of protective antigens in soluble and particulate fraction of newly transformed schistosomula had been demonstrated by James et al., 1985 (34). Also the protective capacity of *S. mansoni* adult worm tegument administered with BCG was previously assessed by Smithers et al. (35), where vaccination of mice with adult worm tegument resulted in a 20% reduction in worm burden. Herein, we immunized mice with schistosomula tegument (Smteg) and we observed a reduction

of 43% to 48% on parasite burden, with no differences in the percentage of reduction between male and female worms (Table 1). The reduction in worm burden in the Smtteg immunized group resulted also in a reduction on the number of eggs eliminated in the feces (59 to 60%) or miracidia hatchin from eggs (72 to 73%) (Table 1). This result demonstrates that Smtteg immunization not only reduced worm burden in the host, but also reduced the number of eggs eliminated in the environment, thereby reducing transmission.

Although we still need to elucidate in which parasite stage the effector mechanism is operating there are some evidences that suggest that skin and lung schistosomula should be the target for effector immune response. In vitro, humans IgG1, IgG3 and IgE are able to mediate newly transformed schistosomula killing in the presence of eosinophils, macrophages and platelets by ADCC and complement fixation (36-38). However in the attenuated cercariae vaccine model, the lung of mice is the major site for protective immune response that seems to involve both NO production by macrophages and the formation of an inflammatory focus around schistosomula which block it migration to portal system (39,40,41,42,43,44).

The granulomatous reactions around parasite eggs represent the major pathology associated with schistosomiasis, the intensity of these reactions correlates with host morbidity (29). A decrease in the number of eggs trapped on the liver and gut of mice immunized with Smtteg was also observed, although statistically differences were only observed in the liver of immunized mice (Fig. 1). In agreement with these results we have also observed a reduction in the number of granuloma per liver area (Fig. 2A). Nevertheless the immune response elicited by immunization did not alter the area of liver granuloma (Fig. 2B). The reduction of the number of eggs trapped in the liver reflects the reduction of the worm burden and is not related to an anti-fecundity effect of Smtteg immunization, since no significant difference was

observed between groups when the number of eggs per gram of liver was divided by the number of adult worm pairs recovered (data not shown). Granuloma modulation has been associated with IL-10 production by host cells (45-46). Our results demonstrated that significant percentage of CD4<sup>+</sup> T cells from mice immunized with Smtteg produce IL-10 in response to *in vitro* Smtteg stimulation compared to CD4<sup>+</sup> T cells from mice inoculated with saline/adjuvant (Table 3). However significant IL-10 production was not detected in the supernatant of splenocytes culture from mice immunized with Smtteg (data not shown). The low levels of IL-10 may be associated with the lack of Smtteg ability to reduce granuloma size in immunized mice.

The protective immunity against schistosomiasis involves both humoral and cellular immune responses (12). In this study, significant levels of anti-Smtteg IgG antibodies were detected fifteen days after the first immunization with Smtteg and as expected, an immunization boost increased significantly the levels of specific anti-Smtteg IgG (Fig.3). Regarding isotype profiles, Smtteg immunization induced significant production of both IgG1 and IgG2c specific antibodies, after the second dose of the vaccine, and the IgG1/IgG2c ratio demonstrated a balance between these two IgG isotypes (Table 2). Although these results suggest a mixed Th1/Th2 type of immune response, the sustained levels of specific IgG1 observed in Smtteg group could have been influenced by IL-2 production as previously demonstrated (47). Significant levels of IFN- $\gamma$  were detected in splenocyte culture supernatants from Smtteg immunized mice compared to control group (Fig. 4). Although significant levels of IL-4 were detected in Smtteg group compared to saline group, flow cytometry analysis demonstrated that the source of IL-4 does not seem to be T cells, since no significant percentage of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> IL-4 producing cells were detected in Smtteg immunized group compared to control group (Table 3). These data suggest that Smtteg immunization elicits a Type1 profile of immune response which agrees

with the choice of Freund's adjuvant that is associated a Th1 profile. However the role of IFN- $\gamma$  on parasite elimination induced by Smtteg immunization remains to be evaluated.

The involvement of IFN- $\gamma$  in protective immunity to schistosomiasis is well established in the murine model (48). In the irradiated cercariae vaccination model, treatment with monoclonal anti-IFN- $\gamma$  antibody totally abrogated the protective immunity achieved (10). Also, a Th1 profile with high production of IFN- $\gamma$  has been associated with protective immunity in many studies using recombinant proteins, gene immunization or peptide vaccination (13,22,49,50).

Most of these immune evasion strategies developed by Schistosomes to survive in the host reside on parasite tegument (51,52). The protective immunity induced by Smtteg immunization may rely on the recognition of tegument proteins by specific antibodies combined to the activation of both complement and ADCC. In fact, tegument damage was observed in adult worms recovered from Smtteg immunized mice but not from saline immunized mice (Fig. 5) even when worm recover was performed 3 months after challenge infection (data not shown). In *in vitro* adult worm culture, worms from Smtteg immunized mice presented some blisters in the tegument (data not shown), during the seven days of culture, and an impaired egg laying with the majority of eggs not viable.

In conclusion, our study demonstrated that Smtteg immunization induces a Th1 type of immune response, able to damage adult worm tegument, reduce egg number, worm burden and the number of liver granuloma in mice, reducing the pathology associated with schistosomiasis. The tegument proteins involved on this protective immunity remains to be identified.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by CNPq, INCT de Doenças Tropicais/CNPq, RIPAq/CPqRR-Fiocruz. Fellowships <sup>†</sup>Fapemig; <sup>††</sup>PIBIC/CNPq; <sup>†††</sup> Capes, The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS FIOCRUZ for use of its facilities.

---

**REFERENCES**

- (1) El Ridi R, Tallima H. *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. *Vaccine* 2009; 27 (5): 666-73.
- (2) Steinmann P, Keiser J, Bos J, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 2006; 6 (7): 411-25.
- (3) Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet* 2006; 368 (9541): 1106-18.
- (4) Harder A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes current knowledge and outlook. *Parasitol Res* 2002; 88 (6): 395-97.
- (5) Fenwick A, Webster JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19 (6): 577-82.
- (6) Bergquist NR. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90 (2): 221-27.
- (7) Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'Dara AA, Piskorska D, McGuire E, et al. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 171 (11): 5837-5841.
- (8) Durães FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC, Fonseca CT. IL-12 and TNF- $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunol Lett* 2009; 125(1): 72-77.
- (9) Vignali DA, Crocker P, Bickle QD, Cobbold S, Waldmann H, Taylor MG. A role for CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. *Immunology* 1989; 67 (4): 466-72.

- (10) Smythies LE, Coulson PS, Wilson RA. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol* 1992; 149 (11): 3654-58.
- (11) Wilson RA, Coulson PS, Betis C, Dowking MA, Smythies LE. Impaired immunity and altered pulmonary response in mice with a disrupted interferon- $\gamma$  receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 1996; 87 (2): 275-82.
- (12) Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Caspar R, James S, Cheever AW, et al.. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- $\gamma$  dependent effector mechanisms. *J Immunol* 1999; 162 (1): 345-51.
- (13) 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-  $\gamma$  and TNF-  $\alpha$  dependent pathway. *Vaccine* 2004; 22 (3-4): 503-10.
- (14) Wynn TA, Cheever AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol* 1995; 7 (4): 505-511.
- (15) Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, Poindexter RW, Caspar P, Lewis FA, et al. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 1995; 376 (6541): 594-96.
- (16) Foley M, Kussel JR, Garland PB. Changes in the organization of the surface membrane upon transformation of cercariae to schistosomula of helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1988; 96 (pt1): 85-97.
- (17) James SL. *In vitro* proliferative response to living schistosomula by T lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1981; 83 (pt1): 147-162.

- (18) Simpson AJ, James SL, Sher A. Identification of surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni* recognized by antibodies from mice immunized by chronic infection and by exposure to highly irradiated cercariae. *Infect Immun* 1983; 41(2): 591-97.
- (19) Jones MK, Gobert GN, Zhang L, Sunderland P, McManus DP. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Bioessays* 2004; 26 (7): 752-65.
- (20) Van Hellemond JJ, Retra K, Brouwers JF, Van Balkom BW, Yazdanbakhsh M, Shoemaker CB, et al. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *Int J Parasitol* 2006; 36 (6): 691-99.
- (21) Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, et al. Tetraspanin on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med* 2006; 12 (7): 835-840.
- (22) Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, Melo AL, et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *Plos Negl Trop Dis* 2008; 2 (10) e308.
- (23) Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota- Santos TA, Figueiredo EA, Pelegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol* 1974; 36 (3): 360-372.
- (24) Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massafara CL, Colley DG, et al. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62 (1): 57-64.

- (25) Cardoso FC, Pacífico RN, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic áreas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol* 2006; 144 (3): 382-91.
- (26) Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. *Parasitology* 1965; 55 (4): 695-700.
- (27) Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1956; 8 (4): 589-597.
- (28) Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Publ Hlth* 1934; 9: 281-298.
- (29) Jurberg AD, Oliveira AA, Lenzi HA, Coelho PMZ. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103 (1): 112-14.
- (30) Sarvel AK, Kusel JR, Araújo N, Coelho PMZ, Katz N. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (suppl. 1) : 289-92.
- (31) Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, Mattos ACA, Pascarelli BM, Manso PPA et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol* 2009; 219 (5): 219-234.
- (32) Hewitson JP, Hamblin PA, Mountford AP. In the absence of CD154, administration of interleukin-12 restores Th1 responses but not protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Inf and Immunity* 2007; 75 (7): 3539-47.
- (33) Mountford AP, Anderson S, Wilson RA. Induction of Th1 cell-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni* by co- administration of larval antigens and IL-12 as an adjuvant. *J Immunol* 1996; 156 (12): 4739-45.

- (34) James SL, Pearce EJ, Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. I. Partial characterization of antigens recognized by antibodies from mice immunized with soluble schistosome extracts. J Immunol 1985; 134(5) :3432-38.
- (35) Smithers SR, Hackett, F, Omer Ali P, Simpson AJG. Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm membranes. Parasite Immunol. 1989; 11(4): 301-318.
- (36) Khalife J, Capron M, Grzych JM, Butterworth AE, Dunne DW, Ouma JH. Immunity in human schistosomiasis mansoni: regulation of protective immune mechanism by IgM blocking antibodies. J Exp Med. 1986; 164 (5): 1626-40.
- (37) Capron A, Dessaint JP, Capron M, Bazin H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma. mansoni* schistosomules. Nature 1975; 253(5491): 474-5.
- (38) Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P. A new function for platelets: IgE dependent killing of schistosomules. Nature 1983; 303 (5920): 810-812.
- (39) Von Lichtenberg, F., Correa-Oliveira, R. and Sher, A. The fate of challenge schistosomula in the murine anti-schistosome vaccine model. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1985; 34: 96–106.
- (40) Wilson RA, Coulson PS, Dixon B. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae and normal mice: an attempt to identify the timing and site of parasite death. Parasitology 1986; 92 (1): 101-16.
- (41) James SL, Cheever AW, Caspar P, Wynn TA. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice develop enhanced Th1 cytokine-associated cellular and humoral immune responses after vaccination with attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae but display partially reduced resistance. Inf and Immunity 1998; 66(8):3510-18.

- (42) Crabtree JE, Wilson RA. The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 1986; 8 (3): 265-85.
- (43) Coulson PS, Wilson RA. Examination of mechanisms of pulmonary phase resistance to *Schistosoma mansoni* in vaccinated mice. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38 (3): 529-39.
- (44) Kassim OO, Dean DA, Mangold BL, Von Lichtenberg F. Combined microautoradiographic and histopathologic analysis of the fate of challenge *Schistosoma mansoni* schistosomula in mice immunized with irradiated cercariae. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47 (2):231-7.
- (45) Allam G. Vasoactive intestinal peptide inhibits liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni and modulates IL-10, IL-12 and TNF-alpha production. *Immunobiology* 2007; 212 (8): 603-12.
- (46) Sadler CH, Rutitzky LI, Miguel JS, Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* 2003; 33 (4): 880-88.
- (47) DeKruyff RH, Mosmann RR, Umetsu DT. Induction of antibody synthesis by CD4+ T cells:IL-5 is essential for induction of antigen specific antibody response by Th2 but not Th1 clones. *Eur J Immunol*. (1990); 20 (10):2219-27.
- (48) Hewitson JP, Hamblin PA, Mountford AP. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol* 2005; 27 (7-8): 271-280.
- (49) Fonseca CT, Pacífico LG, Barsante MM, Rassi T, Cassali GD, Oliveira SC. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. *Microbes infect* 2006; 8(9-10): 2509-16.

- 
- (50) Garcia TC, Fonseca CT, Pacifico LG, Durães FV, Marinho FA, Penido ML, et al. 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* 2008; 106 (3): 162-67.
- (51) McLaren DJ, Cleeg JA, Smithers SR. Acquisition of host antigens by young *Schistosoma mansoni* in mice: correlation with failure to bind antibody *in vitro*. *Parasitology* 1975; 70 (1): 67-75.
- (52) Simpson AJ, Singer D, McCutchan TF, Sacks DL, Sher A. Evidence that schistosome MHC antigens are not synthesized by the parasite but are acquired from the host as intact glycoproteins. *J Immunol* 1983; 131 (2): 962-65.

---

## Legend

Figure 1: Egg burden in the liver and gut of immunized mice. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smteg (25 $\mu$ g/mice) or saline in association with Freund adjuvant, 30 days after the last immunization mice were challenge with 100 cercariae of *S. mansoni*, fifty days after challenge infection mice were sacrificed and the liver and gut were obtained, weighted and digested in KOH10%. The number of eggs was determined by optical microscopy. Bars represent the mean number of eggs/gram of organ  $\pm$  SD for mice immunized with Smteg or saline. The percentage reduction on egg count is given relative to saline immunized group. Statistically significant differences between Smteg and saline immunized group are pointed in the graphic. Results represent data obtained from two independent experiments.

Figure 2: Hepatic granuloma number and area measured in Smteg and saline immunized mice. (A) Number of granulomas measured on slide of liver histological sections. (B) Granuloma area measured on 100 granulomas from each group with a single well-defined egg, using a digital pad. The total diameter of granulomas was measured and the results were expressed as mean square micrometers ( $\mu\text{m}^2$ ). Statistically significant difference compared to saline group is denoted in the graphic. Results represent data obtained from two independent experiments.

Figure 3: Kinetics of specific anti-Smteg IgG production in immunized mice. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smteg (25 $\mu$ g/mice) or saline in association with Freund adjuvant. Sera samples were obtained from 10 individual mice from each group on days 15, 30, 45, 60, 75, 90 and

105 after the first immunization dose and assay by ELISA. Arrows indicate the timing of each immunization dose and challenge infection. Results are presented as mean absorbance measured at 450nm. Statistically significant differences between Smteg and saline immunized group are denoted by three asterisks ( $p < 0.001$ ). # Represents statistically significant difference in IgG anti-Smteg levels between days 15 and 30 after the first immunization ( $p < 0.05$ ). Results represent data obtained from two independent experiments.

Figure 4: Type of immune response elicited by Smteg immunization. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smteg ( $25\mu\text{g}/\text{mice}$ ) or saline in association with Freund adjuvant. Ten days after the last immunization dose, mice were sacrificed and splenocytes were obtained from each individual mouse. IL-4, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production in response to Smteg ( $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in vitro stimulation were measured in the supernatant of splenocytes culture by sandwich ELISA. Bars represent the mean  $\pm$  SD of the difference on cytokine production in response to Smteg stimulation and the basal cytokine production observed in non stimulated splenocytes. Statistically significant difference between saline and Smteg immunized group are denoted by an asterisk ( $p < 0.05$ ) or three asterisks ( $p < 0.001$ ). Results represent data obtained from two independent experiments.

Figure 5: Evaluation of the damage induced on adult worm tegument by the immune response elicited by Smteg immunization. Fifty days after challenge infection, mice were perfused and the worms recovered from Saline (A and B) or Smteg (C and D) immunized mice were stained with the probe Hoechst 33258. The tegument damage was observed in a fluorescence microscope. The arrows indicate the tegument damage. The area of damage in the tegument of 26 adult worms from each group

---

was analyzed in ImageJ software (E). The total diameter of tegument damage area was measured and the results were expressed as mean square micrometers ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  SD. Statistically significant difference compared to saline group is denoted in the graphic. Results represent data obtained from two independent experiments.

Table 1: Protection level induced in C57BL/6 mice by immunization with the tegument of schistosomula from *S. mansoni*.

Groups	Worm burden recover (mean $\pm$ SD)			Protection level (%)	Eggs/gram of feces (Mean $\pm$ SD)	Reductions (%)	Miracidia/gram of feces (Mean $\pm$ SD)	Reductions (%)
	Male	Female	Total					
1 <sup>st</sup> experiment								
Saline + CFA/IFA	25 $\pm$ 4	26 $\pm$ 6	50 $\pm$ 9		117 <sup>b</sup>		338 <sup>b</sup>	
Smtg + CFA/IFA	13 $\pm$ 4 <sup>***</sup>	14 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	26 $\pm$ 6 <sup>***</sup>	48% <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>	59% <sup>a</sup>	94 <sup>b</sup>	72% <sup>a</sup>
2 <sup>nd</sup> experiment								
Saline + CFA/IFA	19 $\pm$ 6	15 $\pm$ 8	30 $\pm$ 14		432 $\pm$ 130 <sup>c</sup>		966 $\pm$ 148 <sup>c</sup>	
Smtg + CFA/IFA	9 $\pm$ 5 <sup>*</sup>	10 $\pm$ 8 <sup>**</sup>	19 $\pm$ 14 <sup>**</sup>	43% <sup>a</sup>	171 $\pm$ 28 <sup>c***</sup>	60% <sup>a</sup>	263 $\pm$ 12 <sup>c***</sup>	73% <sup>a</sup>

CFA – Complete Freund's Adjuvant

IFA – Incomplete Freund's Adjuvant

\* p&lt;0.05

\*\* p&lt; 0.005

\*\*\* p&lt;0.0005

<sup>a</sup> in comparison to saline +CFA/IFA group<sup>b</sup> one day sample of pool of feces/group analyzed<sup>c</sup> two consecutive days samples of pool of feces;/group analyzed

Figure 1

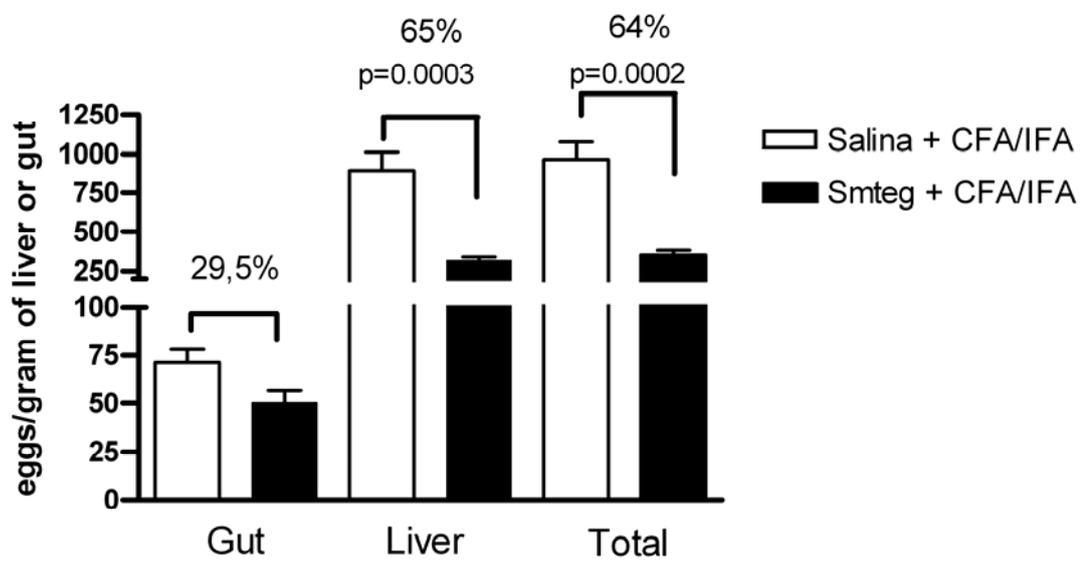


Figure 2

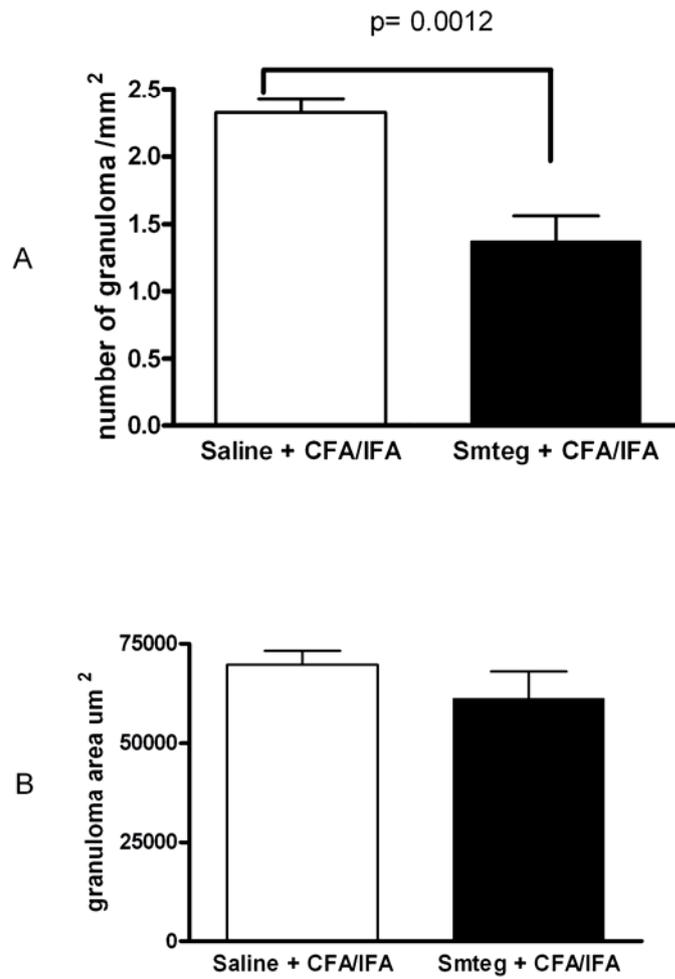


Figure 3

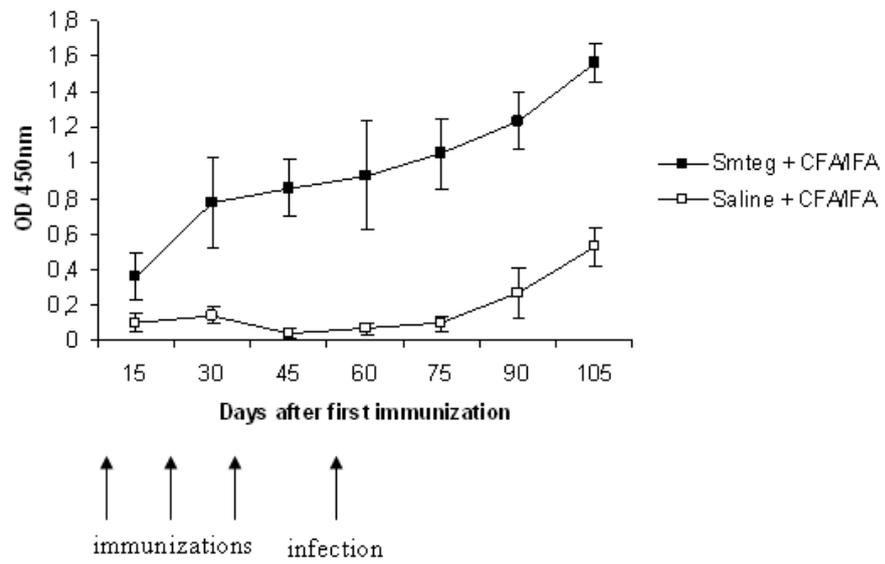


Table 2: IgG1 and IgG2c production induced by Smtteg or saline immunization

Days <sup>a</sup>	IgG1		IgG2c		IgG1/IgG2 ratio
	Saline <sup>b</sup>	Smtteg <sup>b</sup>	Saline <sup>b</sup>	Smtteg <sup>b</sup>	
15	0.022 ± 0.010	0.050 ± 0.044	0.019 ± 0.018	0.036 ± 0.050	1.38
30	0.023 ± 0.008	0.250 ± 0.115***	0.023 ± 0.018	0.090 ± 0.050**	2.78
45	0.017 ± 0.013	0.453 ± 0.206***	0.020 ± 0.021	0.409 ± 0.376*	1.10
60	0.061 ± 0.032	0.580 ± 0.227***	0.037 ± 0.011	0.509 ± 0.299***	1.14
75	0.030 ± 0.024	0.605 ± 0.241***	0.064 ± 0.032	0.505 ± 0.222***	1.19
90	0.064 ± 0.057	0.469 ± 0.120***	0.015 ± 0.046	0.395 ± 0.129*	1.18
105	0.088 ± 0.068	0.604 ± 0.242***	0.119 ± 0.068	0.556 ± 0.174**	1.08

Statistically significant difference compared to Saline inoculated group is denoted by \* p<0.05, \*\* p<0.01 or \*\*\* p<0.001

Figure 4

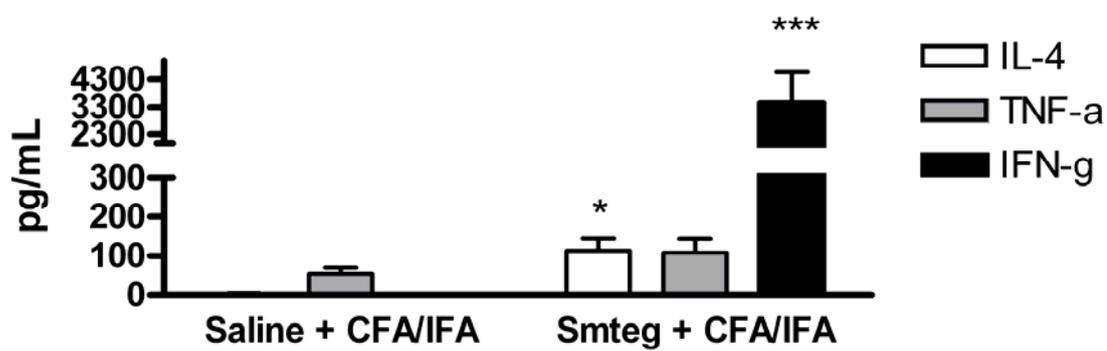
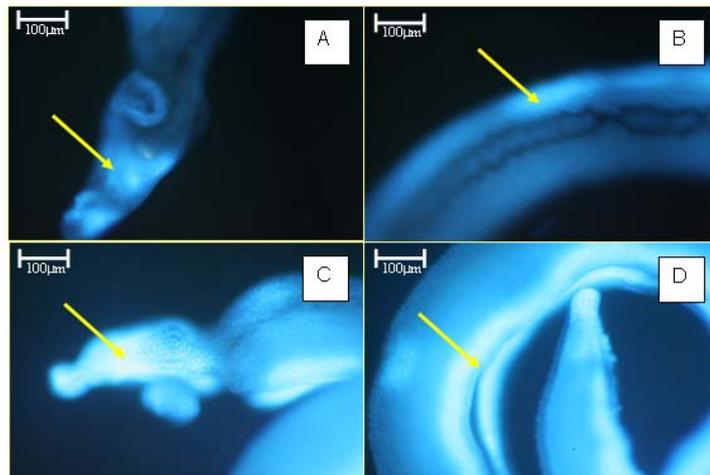


Table 3: Cytokine production by lymphocyte subpopulation in response to Smtteg in vitro stimulation.

	IFN- $\gamma$		IL-4		TNF- $\alpha$		IL-10	
	Saline <sup>a</sup>	Smtteg <sup>a</sup>						
CD4+	$0.38 \pm 0.06$	$1.05 \pm 0.14^*$	$0.47 \pm 0.14$	$0.66 \pm 0.09$	$0.67 \pm 0.08$	$0.67 \pm 0.07$	$0.25 \pm 0.04$	$0.57 \pm 0.11^*$
CD8+	$0.16 \pm 0.12$	$0.21 \pm 0.02$	$0.17 \pm 0.04$	$0.14 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.10$	$0.20 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.02$	$0.07 \pm 0.01$

<sup>a</sup> Saline and Smtteg associated with complete and incomplete Freund adjuvant

Figure 5



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vacinas estão entre as estratégias menos dispendiosas e mais poderosas para a prevenção de doenças e óbitos decorrentes das mesmas. Isto é particularmente importante porque as doenças infecciosas e parasitárias permanecem como importantes causas de óbitos no mundo (4). As mais bem sucedidas vacinas desenvolvidas e licenciadas até hoje são as que agem contra infecções agudas bacterianas e viróticas. Para algumas doenças infecciosas, vacinas bastante eficazes foram desenvolvidas de maneira empírica e com base em um conhecimento mínimo dos mecanismos imunológicos envolvidos (146). Entretanto, no caso das doenças causadas por patógenos que exibem variação antigênica extensa ou causam infecções crônicas e persistentes, como é o caso das doenças parasitárias, as dificuldades e fracassos sugerem que um entendimento muito claro da biologia dos organismos envolvidos e da natureza da resposta imune estimulada seja necessário antes que se consiga uma vacina protetora. O sucesso no desenvolvimento de vacinas está no conhecimento dos mecanismos efetores e protetores e no uso de antígenos e estratégias capazes de desencadear resposta protetora. No caso do *S. mansoni* a dificuldade em se desenvolver uma vacina efetiva contra este parasito esbarra na complexidade do mesmo, que apresenta diferentes estágios evolutivos e uma série de mecanismos de escape contra a imunidade do hospedeiro.

Recentemente, bastante atenção tem sido dada ao tegumento do parasito para identificação de antígenos vacinais, já que este representa a interface entre hospedeiro-parasito (114) estando envolvido com a nutrição, evasão e modulação da resposta imune, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais (136;137). Em um trabalho realizado por nosso grupo estudando a ativação de células dendríticas pelo tegumento do esquistossômulo (Smteg), foram observados um aumento na expressão de CD40 e CD86 e uma elevada produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  pelas células dendríticas estimuladas (139). A IL-12 é uma importante citocina envolvida na diferenciação da resposta adaptativa para um perfil Th1 (147) que tem sido descrito como o perfil protetor no caso de infecção parasitária no modelo murino (124). Já o TNF- $\alpha$  tem sido descrito como uma importante citocina envolvida na eliminação do parasito (124).

O objetivo central dessa dissertação foi avaliar o potencial protetor do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* associado ao adjuvante de

Freund em um protocolo de imunização em modelo murino. Em dois experimentos realizados, o nosso antígeno foi capaz de reduzir de 43% a 48% a carga parasitária induzindo, assim, uma proteção parcial. Esses resultados corroboram com o trabalho de Tran et al, 2006 que, utilizou proteínas presentes no tegumento do *Schistosoma mansoni*, as quais foram denominadas de tetraspaninas e que induziram uma proteção parcial de 57% (TSP 2) e de 34% (TSP 1) e está de acordo com Cardoso et al. 2008 o qual utilizou outra proteína do tegumento (Sm29) obtendo uma redução de 56,7% do número de vermes adultos presentes no sistema porta hepático de camundongos. Os níveis de proteção encontrados em ambas as proteínas foram maiores do que o nível de proteção da nossa formulação, entretanto este fato pode ser explicado uma vez que o Smteg é um composto contendo várias proteínas além da Sm29 e TSPs, sendo que algumas ainda não foram identificadas e que podem ou não serem imunogênicas, sendo ainda capazes de modular a resposta imune interferindo no poder de proteção das proteínas, como, por exemplo, a TSP e Sm29. Um exemplo claro da interferência de epitopos não imunogênicos foi observado por Garcia et al. (2008) (148) no estudo que demonstrou que, quando camundongos eram imunizados com epitopos imunodominantes da Sm14 observava-se uma redução na patologia da doença que não era observada quando utilizava-se a proteína recombinante em protocolo de imunização. Outra explicação para o percentual menor de redução do número de vermes em nossos experimentos comparados aos estudos com a TSP e a Sm29 é a concentração do antígeno vacinal. Nós vacinamos com a mesma concentração vacinal da Sm29 purificada, ou seja, nosso antígeno tinha uma concentração de Sm29 muito menor, o que justifica também uma menor redução.

Observamos em nosso trabalho uma redução do número de ovos presos no intestino e fígado, bem como uma redução no número de ovos eliminados nas fezes. Esse resultado é de grande relevância, uma vez que, em uma população endêmica diminuiria a transmissão e morbidade da doença, respectivamente. É importante salientar que dentre os métodos utilizados para contagem dos ovos nas fezes HPJ e Eclosão de Miracidio, o último nos permite uma precisão maior dos resultados principalmente porque, além de ser um método de diagnóstico rápido e de fácil execução, possibilita uma eclosão em praticamente 100 % dos ovos (144). Em contrapartida, no exame HPJ pode-se perder ovos na etapa de filtração dos sedimentos na gaze.

Outra consideração importante é que, nosso trabalho analisou especificamente um estágio do granuloma: exsudativo-produtivo. Experimento anteriormente realizado por nosso grupo (dados não mostrados), ao analisar a patologia não levando em consideração o estágio dos granulomas teve como resultado uma diminuição estatisticamente significativa. Segundo Lenzi et al. (2008) (78) é de fundamental importância em estudos histopatológicos utilizar granulomas centrados por ovos viáveis e de mesma fase evolutiva, para tal sugere-se que sejam analisados granulomas exsudativo-produtivo. Infelizmente, a maioria dos trabalhos sobre modulação dos granulomas não discrimina esses aspectos topográficos e os dados são heterogêneos, variáveis e até contraditórios de modelo para modelo que dificultam uma análise integral (78). A regulação do granuloma parece seguir mecanismos diferentes conforme a fase de infecção. Além disso, a regulação negativa do tamanho dos granulomas em infecções agudas (oito semanas) difere da regulação da fase crônica (149). Assim, para uma melhor compreensão da patogênese da doença é importante sempre levar em consideração os mecanismos imunes envolvidos.

Em relação à esquistossomose, ainda não estão bem estabelecidos os mediadores imunológicos da patogênese da forma aguda, nem a que antígenos essa resposta está dirigida. Como os sintomas, muitas vezes, ocorrem antes do amadurecimento do verme adulto e oviposição, acredita-se que os antígenos de esquistossômulos sejam importantes mediadores da resposta imune (54, 150, 93). Tem-se descrito na literatura alguns tipos de linfócitos com perfis de respostas distintos. Entre eles, há aqueles que possuem um perfil Th1, produtores de citocinas INF- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ . Há o tipo Th2 que são produtores das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (146). Um modelo de resistência bastante estudado na esquistossomose é o que utiliza cercária irradiada em imunizações. Uma única exposição à cercária atenuada é capaz de induzir altos níveis de proteção em camundongos desafiados com a cercária não atenuada, e essa imunoproteção está relacionada à produção de INF- $\gamma$  e à imunidade mediada por células (103; 140). Esses autores sugerem que a proteção nesse modelo está relacionada a um perfil de resposta imune do tipo Th1. Em humanos, a resposta do tipo Th1 também tem sido associada à resistência contra infecção pelo *S. mansoni*, já que PBMC de indivíduos naturalmente resistentes à infecção por este parasito produzem altos níveis de INF- $\gamma$  in vitro quando estimulados com antígenos das diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni* (151). A resposta imune humoral também está relacionada à proteção na

esquistossomose experimental e humana. O papel dos anticorpos na resposta imune contra o *S. mansoni* pode ser regulatório ou efetor dependendo do isotipo de anticorpo produzido. Tem sido sugerido que os mecanismos efetores de eliminação do parasito em uma infecção pelo *S. mansoni* ou no caso da imunidade protetora induzida por vacinação tem como principal alvo os esquistossômulos. Em humanos, IgG1, IgG3 e IgE são anticorpos capazes de mediar a destruição de esquistossômulos *in vitro* na presença de eosinófilos, macrófagos e plaquetas por um mecanismo de citotoxicidade mediada por anticorpo – ADCC e fixação de complemento (152, 93, 153). Para ativar esses mecanismos efetores é importante a ativação de células CD4+ secretando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  além de induzir a produção de anticorpos capazes de ativar o complemento e de promover a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Dessa forma, a imunidade protetora contra a infecção pelo *S. mansoni* em camundongos está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta celular e humoral, sendo a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  importantes para a eliminação do parasito (108; 140).

Neste trabalho nós observamos níveis estatisticamente significativos das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 presentes no sobrenadante da cultura de esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com Smteg comparado ao grupo controle. Entretanto, análises de citometria de fluxo não apresentaram níveis estatisticamente significativos de IL-4 demonstrando que a produção desta citocina não derivou de linfócitos TCD4+ e TCD8+. Esses dados sugerem que a imunização com o Smteg elicita um perfil de resposta imune celular Th1. Apesar de uma porcentagem significativa de TCD4+ produzir altos níveis de IL-10, não foi observado nenhum nível estatisticamente significativo de IL-10 no sobrenadante de esplenócitos. Fato este que pode estar relacionado a ausência de modulação do granuloma.

Para escapar da resposta imune do hospedeiro, os vermes adultos do *S. mansoni* rapidamente adquirem antígenos do próprio hospedeiro, o que pode mascarar os antígenos do parasito correlacionando com a resistência imune dos vermes (145). Muitos desses antígenos podem ser adquiridos pela fusão do tegumento do verme com células imunes do hospedeiro (154). A interação entre moléculas do hospedeiro e o *S. mansoni* foi considerada como a característica chave para a sobrevivência desse parasito (155). Nossos resultados de cultura de vermes *ex-vivo* mostraram que os vermes vacinados com Smteg apresentavam descolamento do tegumento e durante os sete dias de cultura o número de ovos

produzidos por eles era de 20 ovos/dia. Esse resultado se repetiu quando esses experimentos foram realizados 3 meses após a infecção dos camundongos. Além disso, os ovos produzidos por esses vermes eram inviáveis não passando do primeiro estágio. Isso pode estar relacionado à dependência dos vermes ao hospedeiro. Sugere-se que os danos no tegumento interfiram na fecundidade da fêmea, já que na cultura dos vermes provenientes de camundongos inoculados com PBS, os vermes quase não possuíam danos no tegumento e, conseqüentemente, a oviposição se manteve normal. Os ovos são os elementos do *S. mansoni* responsáveis pela maior parte da patologia em hospedeiros vertebrados. O ovo libera uma grande variedade de imunógenos que medeiam respostas imunológicas envolvidas com a migração tecidual, agregação plaquetária, adesão ao endotélio vascular, passagem para luz intestinal, formação de granulomas e processos relacionados à angiogênese (78).

Segundo Van Hellemon et al. (2006) (137) aparentemente, o ambiente do hospedeiro tem uma significativa influência no tegumento do *S. mansoni*, não apenas contribuindo com os antígenos que o verme assimila, mas também influenciando na sua taxa de renovação. Por exemplo, o parasito adquire, do hospedeiro os lipídios de sua membrana mediados por um mecanismo de captura específico envolvendo transporte de moléculas como o LDL (154). Segundo Okumura-Noji et al. (2001) (156) em um estudo com *S. japonicum* a taxa de maturação dos ovos dos vermes foi significativamente baixa quando o meio de cultura contendo os ovos era composto por soro deficiente de proteína que transfere ester do colesterol. Sugere-se então, que o descolamento do tegumento interfira na homeostase de algumas proteínas importantes na captação de lipídios para o tegumento como, por exemplo, as anexinas que são da família das proteínas ligantes de lípidos, usualmente presentes na superfície citoplasmática e algumas vezes secretada (157). Portanto, como os vermes não se encontram dentro do hospedeiro para se reconstituir, sugere-se uma provável interferência na ovoposição.

Em relação à resposta imune humoral, os resultados deste trabalho mostraram que a imunização com o tegumento do Smteg induziu níveis estatisticamente significativos de IgG, IgG1e IgG2c em soros de camundongos vacinados com Smteg + CFA/IFA em relação aos inoculados com PBS + CFA/IFA. No modelo de vacinação com cercária irradiada, múltiplas vacinações influem em um aumento nos níveis de proteção (158, 107) e envolve um mecanismo de resistência

dependente de anticorpos, uma vez que a transferência passiva de anticorpos IgG de camundongos vacinados conferem resistência a um recipiente não primado.

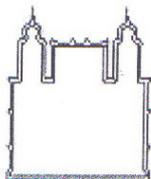
Em camundongos, experimentos têm demonstrado que células do tipo Th1 estimuladas são capazes de induzir produção de IgG2a (159), sendo que o IFN- $\gamma$  é a citocina capaz de induzir a troca da cadeia pesada no linfócito B para produzir esta subclasse de imunoglobulina (160), já células do tipo Th2 induzem a produção de IgG1 (159), sendo que a mudança da cadeia pesada para a produção dessa subclasse parece ser induzida por IL-4 (161).

A análise da razão IgG1 e IgG2c sugere que, inicialmente, houve um predomínio dos níveis de IgG1, provavelmente devido a um aumento da IL-2, citocina envolvida na proliferação dos linfócitos T após a estimulação por antígenos e diretamente relacionada ao aumento dos níveis de IgG1 (162). Após esse período, o nível de IgG1 diminuiu e concomitantemente houve um aumento do nível de IgG2c indicativo de uma resposta Th1. Posteriormente, observou-se o equilíbrio entre esses dois isotipos de anticorpos.

Após todas essas análises, pode-se concluir que o tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* é capaz de induzir um perfil de resposta imune Th1 que, segundo a literatura, relaciona-se a uma imunidade protetora em camundongos. Análises proteômicas futuras rastrearão os possíveis componentes do tegumento do esquistossômulo responsáveis pela ativação do sistema imune, o que torna possível a identificação de futuros candidatos vacinais.

**ANEXO**

---

**7 ANEXO****7.1 Aceite da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA- FIOCRUZ)**

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

**CERTIFICADO**

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

*" Avaliação da Imunoproteção induzida em camundongos pelo tegumento de esquistossômulos de Schistosoma mansoni. "*

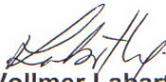
número P-418/07, proposto por Cristina Toscano Fonseca, foi licenciado pelo N° L-005/08.

Sua licença de N° L-005/08 autoriza o uso anual de :

- 110 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ( COBEA ) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ( CEUA - FIOCRUZ ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 19 de fevereiro de 2012 .

Rio de Janeiro, 24/09/2008

  
Dra. Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ

## **REFERÊNCIAS**

---

---

## 8 REFERÊNCIAS

1. Engels D, Chitsulo L, Montresos A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta trop.* 2002; 139-146.
2. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006; 368: 1106-18.
3. Chitsulo L, Engels D, Monstrear A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta trop.* 2000; 77: 41-51.
4. World Health Organization. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Geneve: WHO, 2003.
5. Van der Werf M J, de Vilas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosoma infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* 2003; 86: 125-39.
6. Andrade ZA. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 5 (suppl 1): 51-7.
7. Rey L. Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731p.il. Inclui índice. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.br/ph182/index.html>
8. Katz N, Peixoto S. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33: 303-8.
9. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic áreas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99 (suppl.1):13-19.

10. Valadares TE *et al.* *Schistosoma mansoni*: aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. Rev Inst Med Trop. de São Paulo. 1981; 23: 6-11.
11. Katz N, schussler P, Kunz W, Grevelding CG. Identification, isolation and characterization of a Fyn-like tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni*. Parasitology. 1986; 122: 317-27.
12. Davis AH. Schistosomiasis. In: Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. Epidemiology and Community Control of disease in Warm Climate countries. Churchill Livingstone, London; 1985. p. 389-412.
13. Rollinson D, Simpsom AJ. The biology of Schistosomes- from genes to latrines, Harcourt Brace Jovanovich, London 1987.
14. Gordon RM, Griffiths RB. Observations of means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological exchanges in the newly penetrate larvae. Ann Trop Med Parasitol. 1951; 45: 4577-85.
15. Silva JR, Neves RH, Gomes DC. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases do desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: Carvalho, OS (Org.); Coelho, PMZ (Org.); Lenzi, HL (Org.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. P. 43-84. Capa dura, 26 cm. ISBN 978-857541-150-6.
16. Stirewalt MA, Cousin CE, Dorsey CH. *Schistosoma mansoni* stimulus and transformation of cercariae into schistossomules. Exp. Parasitol. 1983; 56: 358-68.
17. Miller P, Wilson RA. Migration of the schistossomula of *Schistosoma mansoni* from skin the lungs. Parasitology. 1980; 77:281-302.
18. Bloch EH. In vivo microscopy of schistosomiasis, II-migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver and intestine. Am J Trop Med Hyg. 1980; 29:62-70.

19. Juberg AD, Gonçalves T, Costa TA, de Mattos AC, Pascarelli BM, de Manso PP, Ribeiro-Alves M, Pelajo-Machado M, Peralta JM, Coelho PM, Lenzi HL. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol.* 2009;219(5):219-34
20. 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.* 1994; 50:281-295.
21. Valadares E, Coelho PMZ, Pelegrino J, Sampaio IBM. *Schistosoma mansoni*: comparação da oviposição entre as cepas LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) e ST (Libéria) em camundongos. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1981; 23: 1-5.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília:MS/SVS, 2005. 816 p. Tab. ISBN 85-334-1047-6. Disponível em: < [http://www.prosaude.org/publicacoes/guia/Guia\\_Vig\\_Epid\\_novo2.pdf](http://www.prosaude.org/publicacoes/guia/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf) >. Acesso em: 15 dez. 2009.
23. Fallon PG, Denhoff MJ. Drug- resistance schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxaminiquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51: 83-88.
24. El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. *Med Sci Monit.* 2006; 12(12): 282-92.
25. Bennett JL, Day T, Feng-Tao L, Ismail M, Farghaly A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp Parasitol.* 1997; 87: 260-7.
26. Katz N, Dias EP, Araújo N, Souza CP. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1973; 7 (6): 381 – 7.

27. Campos R, Moreira AAB, Sette Jr H, Chamone DAF, da Silva LC. Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976; 70: 261-2.
28. Coles GC, Bruce JI. In vitro selection of drug resistant *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 1987; 17(3): 767-71.
29. Fallon PG, Sturrock RF, Capron A, Niang M, Doenhoff MJ. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53 (1): 61 – 2.
30. Stelma FF, Talla A, Sow S, Kongs A, Nang M, Polman K, Delder AM, Gryseels B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53 (2): 167-70.
31. Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, Bennett JL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (2): 214 – 8.
32. 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.* 1996; 29: 467 – 76.
33. Bonesso-Sabadini PIP, Dias LCS. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (3): 381 – 5.
34. Ferrari MLA, Coelho PM, Antunes CM, Tavares CA, da Cunha AS. Efficacy of oxaminiquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bull World Health Organ.* 2003; 81:190-196.
35. Katz N, Rocha RS, Chaves A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ.* 1979; 57:781-785.

36. Davis A, Wegner DH. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. *Bull World Health Organ.* 1979; 57:767-771.
37. Ishizaki T, Kamo E, Boehme K. Double-blind studies on tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. *Bull World Health Organ.* 1979; 57:787-791.
38. Loverde PT, Hirai H, Merrich JM, Lee NH, El Sayed N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Int.* 2004; 53:183-192.
39. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 499-511.
40. 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.* 1992; 356:604-7.
41. 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.* 1989; 67:4183-4190.
42. Davies SJ, Shoemaker CB, Pearce EJ. A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J Biol Chem.* 1998; 273:11234-40.
43. Vicogne J, Cailliau K, Evans RJ. Molecular properties of ATP-gated P2x receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25:487-93.
44. 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.* 2001; 294:1358-61.
45. Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of

lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol.* 2000;164 (12): 6406-16.

46. Rutzky LI, Hernandez 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* 2001; 98: 13243-13248.

47. Remain RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW *et al.* Interleukin 5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect.Immun.* 2006; 74 (3):1471-9.

48. Mukai T, Nagaki M, Imose M, Kimura K, Satake S, Takai S *et al.* Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon-gamma. *Liver Int.* 2006; 26(8):1006-14.

49. Stadecker MJ, asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev.* 2004; 201: 168-79.

50. Wilson RA, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(2):148-54.

51. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005; 6(4):353-60.

52. Torres VM. Dermatologic manifestations of schistosomiasis mansoni. *Arch Dermatol.* 1976; 112: 1539-42.

53. Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2:250-69.

54. Hiatt RA, Sotomayor ZR, Sanches G, Zambrana M, Knight WB. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis.* 1979; 139:659-666.

55. Andrade ZA, Warren KS. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; 58:53-57.
56. Gazzinelli G, Montesano MA, Correa-Oliveira R, Lima MS, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987; 4:95-100.
57. Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM *et al.* 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.* 1999; 179(6):1502-14.
58. Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, de Almeida RP *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis.* 2002; 185(1): 98-105.
59. Cheever AM., Andrade ZA. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. *Trans R Soc Tro Med Hyg.* 1967; 61: 626-639.
60. Symmers W. Note a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia hematobia*. *J Pathol.* 1904; 9: 237-239.
61. Andrade ZA. A patologia da esquistossomose humana. In: Carvalho, OS (Org.); Coelho, PMZ (Org.); Lenzi, HL (Org.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.* Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. P. 547-568. Capa dura, 26 cm. ISBN 978-857541-150-6.
62. Jassim A, Hassan K, Catty D. Antibody isotype in human schistosomiasis mansoni. *Parasite immunol.* 1987; 9(6):627-50.
63. Correa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcão PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM *et al.* Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(1):171-7.

64. Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. Eur J Immunol. 2003; 15 (4): 880-8.
65. Teixeira- Carvalho A, Martins Filho OA, Peruhype-Magalhães V, Silveira-Lemos D, Malaquias LCC, Alves Oliveira LF, Silveira MAS *et al.* Cytokine, chemokine receptors CD4+CD25<sup>HIGH+</sup> T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. Acta Trop. 2008; 108:139-149.
66. Malaquias LCC, Falcão PL, Silveira AMS, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL *et al.* 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. 1997; 121:41-50.
67. Falcão PL, Malaquias LCC, Martins-Filho OA, Silveira AMS, Passos M, Prata A, *et al.* Human schistosomiasis mansoni:IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. Parasite Immunol. 1998; 20:447-454.
68. Corrêa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcão PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, *et al.* Cytokines is a determinant of the susceptible and resistance in human Schistosomiasis mansoni. Braz Med Biol Res. 1998; 31: 127-131.
69. Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive Type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. J immunol. 2000; 164: 6406-6416.
70. Phillips SM, Lammie PJ. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. Parasitol Today. 1986; 2(11):296-302.
71. Von Lichtenberg F. Studies on granuloma formation. III. Antigen sequestration and destruction in the schistosome pseudotubercle. Am J Pathol. 1964; 45: 75-93.

72. Moore DL, Grove DI, Warren KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J Pathol.* 1977; 121(1): 41-50.
73. Silva-Teixeira DN, Doughty BL, Goes AM. Human schistosomiasis: modulation of in vitro granulomatous hypersensitivity and lymphocyte proliferative response by macrophages undergoing differentiation. *Scand J immunol.* 1996; 44:522-9.
74. Domingo EO, Warren KS. Pathology and pathophysiology of the small intestine in murine schistosomiasis mansoni, including a review of the literature. *Gastroenterology.* 1969; 56(2): 231-40.
75. Cheever AW. Pipe-stem fibrosis of the liver. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972; 66(6): 947-8.
76. Warren KS. Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology? *J Infec Dis.* 1973; 127(5):595-609.
77. Colley DG, Savage AM, Lewis FA. Host response induced and elicited by cercariae, schistosomula, and cercarial antigenic preparations. *Am J Trop Med Hyg.* 1977; 26(6): 88-95.
78. Lenzi LH, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, Mariano M, Lenzi JA. Histoarchitecture of Schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biochanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1998; 1:141-151.
79. Neves RH, Alencar AC, Silva MC, Águila MB, Lacerda CA, Silva JR, *et al.* Long-term feeding, a high-fat diet cause histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. *Exp Parasitol.* 2007; 115:324-332.
80. Cheever AW, Yap GS. Immunologic basis of disease regulation in schistosomiasis. *Chem Immunol.* 1997; 66:159-176.
81. Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol.* 1998; 29:836-847.

82. Dorsey CH. Ultraestrutura of the *Schistosoma mansoni* cercária. *Micron*. 2002; 33:279323.
83. Skelly PJ, Shoemaker CB. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercária. *Int J Parasitol*. 2000; 30: 625-631.
84. McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: the parasite surface in relation to host immunity. Letchworth: Research Studies Press. 1980.
85. Hockley DJ. Ultraestrutura of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Adv Parasitol*. 1973; 11: 233-305.
86. McLaren DJ, Hockley DJ. Blood flukes have a double outer membrane. *Nature*. 1977; 269:147-149.
87. Braschi S, Borges WC, Wilson RA. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Sep;101 Suppl 1:205-12.
88. Wilson RA, Barnes PE. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. *Parasitology*. 1974; 68(2): 239-258.
89. Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitol Today*. 1998; 14:99-104.
90. Verjovski-Almeida S, Leite LC, Dias-Neto E, Menck CF, Wilson RA. Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. *Trends Parasitol*. 2004; 20 (07): 3004-8.
91. Hu W, Brindley PJ, McManus DP, Feng Z, Han ZG. *Schistosoma* transcriptomes: new insights into the parasite and schistosomiasis. *Trends Mol Med*. 2004; 10:217-225.

92. Oliveira SC, Fonseca CT, Cardoso FC, Farias LP, Leite LC. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop.* 2008; 108(2-3):256-62.
93. Capron M, Capron A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science.* 1994; 264 (5167): 1876-7.
94. Coulson PS. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Adv Parasitol.* 1997; 39: 271-336.
95. Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchel GF. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol.* 2005; 21:112-117.
96. Wynn TA, Reynolds S, James S, Cheever AW, Caspar P, Hieny S, *et al.* IL-12 enhances vaccine induced immunity to *Schistosoma mansoni* by augmenting both humoral and cell mediated immune response against the parasite. *J Immunol.* 1996; 157: 4068-78.
97. Abath FGC, Katz N. Desenvolvimento de vacinas para esquistossomose mansoni: estado atual e perspectivas. In: Carvalho, OS (Org.); Coelho, PMZ (Org.); Lenzi, HL (Org.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro:Ed. Fiocruz, 2008. P. 1009-1028. Capa dura, 26 cm. ISBN 978-857541-150-6.
98. Dean DA. *Schistosoma* and related genera: acquired resistance in mice. *Exp Parasitol.* 1983; 55: 1-104.
99. Mountford AP, Coulson PS, Wilson RA. Antigen localization and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 1988; 97 (pt 1): 11-25.
100. Hogg KG, Kumkate S, Anderson S, Mountford AP. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11+ and F4/80 cells is a major features of the innate response in mice that develop Th1- mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 2003 a; 71 (6): 3563-71.

101. Hogg KG, Kumkate S, Mountford AP. IL-10 regulates early IL-12 mediated immune response induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Int Immunol.* 2003b; 15(12): 1451-9.
102. Riengrojpitak S, Anderson S, Wilson RA. Induction of immunity to *Schistosoma mansoni*: interaction of schistosomula with accessory leucocytes in murine skin and draining lymph nodes. *Parasitology.* 1998; 117 (pt 4): 301-9.
103. Vignali DA, Cracker P, Bickle QD, Cobbould S, Waldmann H, Taylor MG. A role for CD4+ but not CD8+ t cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 Krad irradiated and Ro 11-3128 terminated infections. *Immunology.* 1989; 67:466-72.
104. Smythies LE, Coulson PS, Wilson RA. A monoclonal antibody to IFN-g modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol.* 1992; 149: 3654-3658.
105. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Cheever AW. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol.* 1990 Dec 1;145(11):3911-6. PubMed PMID: 2123226.
106. Minard P, dean DA, Jacobson RH, Vannier WE, Murrel KD. Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27 (pt 1): 76-86.
107. Caulada-Benedetti Z, Al-Zamel F, Sher A, James S. comparison of Th1 and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J Immunol.* 1991; 146 (5): 1655-60.
108. Jankovic, D, Wynn TA, Kullberg MC, Caspar R, James S, Cheever AW *et al.* Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- $\gamma$  dependent effector mechanisms. *J Immunol.* 1999; 162:345-351.

109. Minard P, Dean DA, Jacobson RH, Vannier WE, Murrell KD. Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27 (1Pt 1): 77-86.
110. Loukas A, Tran M, Pearson MS. Schistosome membrane proteins as vaccine. *Int J Parasitol.* 2007; 37 (3-4) 252-63.
111. Levy S, Shohan T. Protein-protein interaction in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 218-24.
112. Reynolds SR, Shoemaker CB, Harn DA. T and B cell epitope mapping of Sm23 an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1992; 149 (12): 3995-4001.
113. 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.* 2003; 25 (8-9): 429-37.
114. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, *et al.* Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med.* 2006; 12 (7): 835-40.
115. McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21 (1): 225-42.
116. Correnti, JM, Brindley, PJ, Pearce, EJ. Long- term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosoma growth. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005; 143: 209-215.
117. Cardoso FC, Pacifico RN, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol.* 2006<sup>a</sup>; 144: 382-391.
118. Cardoso FC, Oliveira SC. Caracterização molecular e imunológica da proteína da membrana Sm29 do *Schistosoma mansoni*. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Número de chamada: T2764 577.1 C268c; 2006b.

119. Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, Melo AL, *et al.* *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *Plos Negl Trop dis* 2008; 2(10): e308.
120. Moser D, Tendler M, Griffiths G, Klinkert MQ. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *Bio Chem.* 1991; 266 (13): 8454.
121. Brito CF, Oliveira SC, Street M, Riengrojpitak S, Wilson RA, Simpson A J, *et al.* Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35 (3): 377-81.
122. Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra- Freire N, Diogo CM, Almeida MS, *et al.* *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93 (1): 269-73.
123. Ribeiro F, Vieira CS, Fernandes A, Araujo N, Katz N. The effects of immunization with recombinant Sm14 (rSm14) in reducing worm burden and mortality of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(1):11-7.
124. 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 a IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  dependent pathway. *Vaccine.* 2004; 22:503-510.
125. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1985; 57:357-417.
126. Brophy PM, Barrett J. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology.* 1991;100 Pt 2:345-9.

127. Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, Capron M, Grzych JM, Pierce RJ, *et al.* Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*. 1987; 326(6109):149-53
128. Porchet E, McNair A, Caron A, Kusnierz JP, Zemzoumi K, Capron A. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology*. 1994; 109 ( Pt 5):565-72.
129. 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*. 1991;13(5):473-90.
130. Damonville M, Wietzerbin J, Pancre V, Joseph M, Delanoye A, Capron A, *et al.* Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J Immunol*.1988; 140(11):3962-5.
131. Pancre V, Monte D, Delanoye A, Capron A, Auriault C. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur Cytokine Netw*.1990; 1(1):15-9.
132. Xu CB, Verwaerde C, Grzych JM, Fontaine J, Capron A. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur J Immunol*. 1991; 21(8):1801-7
133. Utzinger J, Keiser J, shuhua X, Tanner M, Singer BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob. Agents.Chemother*. 2003; 47:1487-1495.
134. Wilson RA, Langermans JA, Van Dam GJ, Vervenne RA, Hall SL, Borges WC, *et al.* Elimination of *Schistosoma mansoni* adult worms by rhesus macaques: basis for therapeutic vaccine? *Plos Megl Trop Dis*. 2008 2:e290.

135. Coles GC, Bruce JL, Kinoti GK, Mutahi WT, Dias EP, Katz N. Drug resistance in schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80:347-351.
136. Jones MK, Gobert GN, Zhang L, Suderland P, McManus DP. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Biossays.* 2004; 26: 752-765.
137. Van Hellemond JJ, Van Balkon BW, Tielens AG. Schistosome biology and proteomics: progress and challenges. *Exp Parasitol.* 2007; 117 (3):267-74.
138. Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'Dara AA, Piskorska D, McGuire E, *et al.* Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 171 (11): 5837-5841.
139. Durães FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC, Fonseca CT. IL-12 and TNF-  $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunol Lett* 2009; 125(1): 72-77.
140. Wilson RA, Coulson PS, Betis C, Dowking MA, Smythies LE. Impaired immunity and altered pulmonary response in mice with a disrupted interferon- $\gamma$  receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 1996; 87 (2): 275-282.
141. Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pelegrino. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule *in vitro*. *Exp Parasitol.* 1974; 36 (3):360-72.
142. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
143. Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 1956; 8:589-597.

144. Juberg AD, Oliveira AA, Lenzi HA, Coelho PMZ. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(1): 112-114.
145. Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercária of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. Parasitology. 1965; 55:695-700.
146. Hilleman M. R. Six decades of vaccine development- a personal history. Nature Medicine 1998; 4:507-514.
147. Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996;383.
148. Garcia TC, Fonseca CT, Pacífico LG, Durães FV, Marinho FA, Penido ML, et al. 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 2008; 106 (3): 162-67.
149. Flores-Villanueva P. O. et al. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment dowregulate egg antigen-especific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. J Immunol. 1996; 156:3315-3320.
150. Butherworth A. E. Immunity and morbidity in human schistosomiasis. Trop Geog Med. 1994; 46:197-208.

- 
151. Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos, Massara CL, Colosimo E, Colley DG et al. Comparison of antibody isotype response to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in a endemic área. *Parasite Immunol* 1995; 17 (6):297-304.
152. Khalife J, Capron M, Grzych JM, Butterworth AE, Dunne DW, Ouma JH. Immunity in human schistosomiasis mansoni: regulation of protective immune mechanism by IgM blocking antibodies. *J Exp Med.* 1986; 142(12):4422-7.
153. Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P. A new function for platelets: IgE dependent killing of schistosomules. *Nature* 1983; 303: 810-812.
154. Caufield JP, Korman G, Butherworth AE, Hogan M, David JR. The adherence of human neutrophils to schistossomula: evidence for membrane fusion between cells and parasites. *J. Cell Biol* 1980; 101:158-166.
155. Tempone AJ, Biacone ML, Rumjanek FD. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Mol cell Biochem* 1997; 177:139-144.
156. Okomura K, Sasai K, Kawaguchi H, Maruyama H, Tada T, Takahashi H et al. Ester transfer protein deficiency causes slow egg embryonation of *Schistosoma japonicum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286: 305-310.
157. Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Alan W. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistoma mansoni* : A proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics* 2006; 6: 1471-1482.

158. Delgado VS, McLaren DJ. Evidence the ratio-sensitive cells are central to skin-phase protective immunity in CBA/Ca mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* as well as in naive mice protected with vaccine serum. *Parasitology* 1990; 100 (1):45-56.
159. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988; 334 (6179): 255-8, 1988.
160. Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987; 139 (1): 10-7.
161. Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, Krammer PH. T cell-derived B cell differentiation factors. Effect on the isotype switc of murine B cells. *J Exp Med* 1982; 155 (3):734-48.
162. DeKruyff RH, Mosmann RR, Umetsu DT. Induction of antibody synthesis by CD4+ T cells:IL-5 is essential for induction of antigen specific antibody response by Th2 but not Th1 clones. *Eur J Immunol* 1990; 51 (6): 595-601.