

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

**Novos antígenos de *Schistosoma mansoni* para o diagnóstico sorológico da infecção
ativa e controle de cura**

por

Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho

Belo Horizonte
2016

TESE

DCS-CPqRR

G.B.F. CARVALHO 2016

GARDÊNIA BRAZ FIGUEIREDO DE CARVALHO

Novos antígenos de *Schistosoma mansoni* para o diagnóstico sorológico da infecção ativa e controle de cura

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca

Coorientação: Dr. Jeronimo Conceição Ruiz

Belo Horizonte

2016

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

C331n 2016	<p>Carvalho, Gardênia Braz Figueiredo de.</p> <p>Novos antígenos de <i>Schistosoma mansoni</i> para o diagnóstico sorológico da infecção ativa e controle de cura / Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho. – Belo Horizonte, 2016.</p> <p>XXI, 126 f: il.: 210 x 297 mm.</p> <p>Bibliografia: 109 – 129</p> <p>Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.</p> <p>1. Esquistossomose/diagnóstico 2. <i>Schistosoma mansoni</i> /imunologia 3. Antígenos/uso terapêutico I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano (Orientação). III. Ruiz, Jeronimo Conceição (Coorientação)</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.963</p>
---------------	---

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

**Novos antígenos de *Schistosoma mansoni* para o diagnóstico sorológico da infecção ativa
e controle de cura**

por

Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Jeronimo Conceição Ruiz (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Edward José de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr Carlos Eduardo Calzavara Silva (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger (UFMG) Titular

Prof. Dr. Marcos Paulo Catanho de Souza (IOC/FIOCRUZ) Titular

Profa Dra. Vanessa Peruhype Magalhães (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 30/06/2016

*Aos meus pais, Oscar e Maria;
meu marido, Lucas e minha filha, Alice
por terem sido essenciais nesta jornada!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor da minha vida, razão da minha existência, de tudo que tenho e que sou, meu maior e melhor agradecimento! Obrigada Jesus, por sua graça e por me dá sabedoria para conquistar a realização desse grande sonho!

A Kika, minha mentora científica, muito mais que uma orientadora, uma amiga que me acolheu desde o início dessa minha caminhada. Ensinou-me, nestes seis anos de convivência, como fazer ciência com respeito, ética e amor. Muito obrigada!!

Ao Jerônimo, pela contribuição durante o desenvolvimento desse estudo.

A Dani, pela valiosíssima ajuda e suporte, assistência em todos os momentos do meu trabalho. Obrigada pela parceria!

A turma do Laboratório de Esquistossomose: Dr. Paulo, Dr. Naftale, Thaís, Flávia, Diana, Jussara, Wander, Babá, Ana Karine, Carol, Vivi, Rafa, Neusa, Vanessa, Lili, Aristeu, Fábio, Sú, Áureo e Wagner.

Aos amigos que migraram comigo para nossa nova “casa”- Grupo de Biologia e Imunologia Parasitária: Paty, Clarice, Mariana e Rafaella Donadonni. Vocês realmente são pessoas especiais que tornam meus dias muito mais agradáveis.

À minha família, meu apoio e base, que sempre andaram lado a lado comigo, sonharam os meus sonhos e lutaram para que cada um deles fosse realizado! Obrigada por compartilharem desse momento! Essa conquista é nossa!

Ao meu marido, Lucas; e minha Alice, princesa que chegou em meio ao doutorado, renovando minha vida e me ensinando a amar incondicionalmente.

Aos meus amigos, que também compartilharam comigo vários momentos da minha vida, tornando essa caminhada mais leve e prazerosa.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação do CPqRR/FIOCRUZ.

À Equipe do Núcleo de Esterilização e do Biotério, pelo apoio e pela colaboração.

Aos coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas René Rachou, que de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

A todos vocês, que fazem parte da minha história, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS À AGÊNCIA FINANCIADORA

Agradeço ao Centro de Pesquisas René Rachou pela bolsa de doutorado concedida e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro.

Colaboradores

Dra. Daniela de Melo Resende, do Centro de Pesquisas René Rachou.

Dra. Andrea Teixeira de Carvalho, do Centro de Pesquisas René Rachou.

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, do Centro de Pesquisas René Rachou.

Dra. Liliane Maria Vidal Siqueira, do Centro de Pesquisas René Rachou.

Dr. Sergio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dr. Leonardo Farias, do Instituto Butantã, São Paulo.

Dra. Débora de Oliveira Lopes, da Universidade Federal de São Joao del-Rei.

RESUMO

A esquistossomose continua sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo, e para o controle e monitoramento efetivo dessa doença é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais acurados. Utilizando ferramentas de bioinformática e o proteoma do parasito *S. mansoni*, nosso grupo selecionou *in silico*, antígenos candidatos do *S. mansoni* para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose e no controle de cura da doença pós-tratamento. A estratégia baseou-se em critérios para seleção de potenciais antígenos que levaram em consideração a predição de presença de peptídeo sinal, baixa similaridade com proteínas humanas e de camundongos, presença de epítomos lineares de células B e T preditos, localização predita favorável (secretada ou de membrana) e predição de expressão em estágios de vida do parasito presentes no hospedeiro definitivo. Estas condicionais foram aplicadas em um banco de dados relacional construído para integrar os resultados das diferentes predições. Sete proteínas foram selecionadas e diante da inviabilidade de expressar todas elas, nosso grupo identificou epítomos lineares de célula B nas proteínas selecionadas, que foram produzidos como peptídeos sintéticos e utilizados na validação da estratégia de seleção *in silico* utilizada. Esses epítomos foram identificados por predição *in silico* dos programas AAP12, BCPred12, BepiPred e predição de regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs). Adicionalmente, duas proteínas também foram expressas como proteínas recombinantes em sistema procarioto e avaliadas em ensaios de ELISA. Para os ensaios de ELISA com os peptídeos sintéticos e com as proteínas recombinantes, foram utilizados soro de camundongos infectados com *S. mansoni* e soros de indivíduos provenientes de uma área endêmica de baixa intensidade de infecção para *S. mansoni* e de doadores saudáveis não residentes em áreas endêmicas para esquistossomose. Dentre os sete peptídeos sintéticos utilizados nos ensaios de ELISA, cinco foram capazes de diferenciar indivíduos infectados de áreas endêmicas (INF), de indivíduos negativos de área endêmica (NEG) e doadores saudáveis não residentes de área endêmica (HD). Além disso, um dos peptídeos também foi capaz de diferenciar soro de indivíduos infectados de área endêmica, de soro de indivíduos infectados 30 e 180 dias após tratamento, o que poderia ser utilizado para controle de cura. O uso de soros de indivíduos que vivem em áreas endêmicas para esquistossomose demonstraram que as proteínas rSm200(1069-1520)-ELISA e a rSmVal7-ELISA foram capazes de discriminar os doadores saudáveis (HD) e

indivíduos infectados (INF) que vivem em áreas endêmicas para esquistossomose, porém não foram eficientes para o controle de cura após tratamento. Nossos resultados demonstram que a estratégia de seleção *in silico* de antígenos potenciais para o diagnóstico da esquistossomose apresentou um racional promissor e com resultados promissores.

Palavras-chaves: esquistossomose, diagnóstico, bioinformática.

ABSTRACT

Schistosomiasis remains one of the most prevalent parasitic infections in the world. In order to control and effectively monitor this disease, it is essential the availability of more accurate diagnosis methods. Taking advantage of bioinformatics tools and *S. mansoni* proteome informations, our group selected, *in silico*, candidate antigens for the immunodiagnosis of schistosomiasis based on ELISA assays. The strategy of selection was based on criteria such as: presence of signal peptide; low similarity with human and mouse proteins; the presence of predicted linear B and T cells epitopes; favorable location (secreted or membrane) and expression during different parasite life stage within the definitive host. These conditionals were applied to a relational database developed to integrate the results for all predictions performed. Seven proteins were selected, and due to unfeasibility of expressing all of them, our group identified B cell linear epitopes in the selected proteins that were produced as synthetic peptides and used to validate the *in silico* selection strategy used. These epitopes were identified using *in silico* prediction of AAP12 programs BCPred12, BepiPred and prediction of intrinsically disordered regions (IDRs). Additionally, two proteins were expressed as recombinant proteins using procaryote system and also evaluated in ELISA assays. For the ELISA assays using synthetic peptides and recombinant proteins, sera of mice infected with *S. mansoni*, sera of individuals from an endemic area of low intensity of infection for *S. mansoni* and sera of healthy donors, non-residents of endemic areas, were used. Among the seven synthetic peptides used in the ELISA assays, five were able to differentiate between infected individuals living in endemic areas (INF) and negative individuals living in endemic area (NEG) or healthy donors (HD). Furthermore, one of the peptides was also capable of distinguishing sera of infected individuals from endemic area from sera of infected individuals 30 and 180 days after treatment, which could be used to control cure after treatment. The use of the sera of individuals living in endemic area for schistosomiasis demonstrated that rSm200(1069-1520)-ELISA and rSmVal7-ELISA were able to discriminate the uninfected healthy donors (HD) and infected individuals (INF) living in endemic areas for schistosomiasis and it was not effective for the diagnosis of cure after treatment. Our results demonstrate that the *in silico* selection strategy of potential antigens to be used in the diagnosis of schistosomiasis showed a promising rational with promising results.

Key words: schistosomiasis, diagnosis, bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 2 - <i>Workflow</i> com delineamento da estratégia de seleção <i>in silico</i> de proteínas candidatas potenciais para o diagnóstico da esquistosomose mansoni	49
Figura 3 - Protocolo de experimentação de camundongos suíços para infecção, obtenção de soro, tratamento e perfusão	52
Figura 4 - Diagrama de entidades e relações	64
Figura 5 - <i>Workflow</i> com delineamento da estratégia de seleção <i>in silico</i> de proteínas candidatas potenciais para o diagnóstico da esquistosomose mansoni com número de sequências selecionadas em cada etapa	66
Figura 6 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_136560 (1564-1578) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	77
Figura 7 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_141860 (1694-1709) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	78
Figura 8 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_093840(219-233) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	79
Figura 9 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_126160(438-452) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	80
Figura 10 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_150390.1(216-230) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	81
Figura 11 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_167240(213-228) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	82
Figura 12 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_180240(495-509) em soro de indivíduos de area endêmica para esquistossomose	83
Figura 13 - Correlação entre a carga parasitária e a reatividade do soro de indivíduos com exame de fezes positivo para presença de ovos contra o peptídeo Smp_150390.1(216-230).....	84
Figura 14 - Predição de epítomos lineares de células B na sequência inteira da proteína Sm200.....	87
Figura 15 - Expressão, purificação e antigenicidade da rSm200(1069-1520) em fusão com cauda de 6 histidinas em gel de poliacrilamida e <i>Western blot</i>	88
Figura 16 - Cinética dos níveis de IgG para a rSm200(1069-1520) em soro de camundongos após infecção com <i>S. mansoni</i>	89

Figura 17 - Avaliação dos níveis de IgG em soro de camundongos para a rSm200(1069-1520).....	91
Figura 18 - Níveis de IgG para rSm200(1069–1520) frente a soro de camundongos tratados (PT)	92
Figura 19 - Níveis de IgG detectados em soro humano por ELISA-rSm200(1069-1520)	93
Figura 20 - Confirmação da expressão da proteína recombinante SmVal7 por gel de poliacrilamida 15%	95
Figura 21 - Cinética dos níveis de IgG para a rSmVal7 em soro de camundongos infectados pelo <i>S. mansoni</i>	96
Figura 22 - Níveis de IgG para rSmVal7 em soro de camundongos infectados	97
Figura 23 - Níveis de IgG para rSmVal7 em soro de moradores de área endêmica para a esquistossomose	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações da concentração dos peptídeos sintéticos e diluição dos soros de indivíduos utilizados nos ensaios de ELISA	56
Tabela 2 - Proteínas de <i>Schistosoma mansoni</i> selecionadas <i>in silico</i> segundo a estratégia delineada no <i>workflow</i>	68
Tabela 3 - Proteínas de <i>Schistosoma mansoni</i> selecionadas <i>in silico</i> segundo a estratégia delineada no <i>workflow</i>	71
Tabela 4 - Peptídeos sintetizados após a predição de epítomos lineares de células B e predição de regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs)	72
Tabela 5 - Número de vermes recuperados após perfusão dos camundongos suíços do grupo 1 (G1)	73
Tabela 6 - Resultado dos exames de fezes positivos dos indivíduos de área endêmica de baixa intensidade de infecção para <i>S. mansoni</i>	75
Tabela 7 - Comparação das técnicas de ELISA-Smp_150390.1(216-230), Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA em amostras de fezes sabidamente positivas	85
Tabela 8 - Comparação das técnicas de ELISA-rSm200(1069-1520), Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA em amostras de fezes sabidamente positivas	94
Tabela 9 - Comparação das técnicas de ELISA-rSmVal7, Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA em amostras de fezes sabidamente positivas.....	100

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC: Antígeno anódico circulante

ACC: Antígeno catódico circulante

BCIP: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BLAST: Ferramenta de busca por alinhamento básico local, do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês: *Complementary deoxyribonucleic acid*

cTP: Peptídeo de cloroplasto em trânsito, do inglês: *Chloroplast transit peptide*

DALY: *Disability-Adjusted Life Years*

dbEST: Banco de dados de etiquetas de sequência expressa, do inglês: *Database Expressed Sequence Tags*

DMSO: sulfóxido de dimetilo, do inglês: Dimethyl sulfoxide

DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês: *deoxyribonucleic acid*

DO: Densidade óptica

ELISA: Ensaio de absorção imunoenzimático, do inglês: *Enzyme linked immunosorbent assay*

EMBOSS: *European Molecular Biology Open Software Suite*

EP: Esquistossômulo pulmonar

ESTs: Etiquetas de sequência expressa, do inglês: *Expressed Sequence Tags*

ES: Esquistossômulo

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

FPLC: Cromatografia líquida rápida de proteína, do inglês: *Fast protein liquid chromatography*

GPI: Glicosilfosfatidilinositol, do inglês: *glycosylphosphatidylinositol*

HD: doadores saudáveis, do inglês: healthy donors

HLA: Antígeno leucocitário humano; do inglês: *Human leukocyte antigen*

HPJ: Hoffman, Pons e Janer

IDRs: Regiões intrinsecamente desordenadas, do inglês: *Intrinsically Disordered Regions*

IFN- γ : Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

- IPTG:** Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido, do inglês: *Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside*
- Kb:** Kilobases
- Kbp:** Quilobit por segundo
- kDa:** Kilodalton
- Knn :** K -vizinho mais próximo, do inglês: *K - nearest neighbor*
- LB:** Luria-Bertani
- LE:** Luis Evangelista
- Mb:** MegaByte
- MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade; do inglês: *Major histocompatibility complex*
- MCT:** Ministério da Ciência e Tecnologia
- mTP:** Peptídeo direcional mitocondrial; do inglês: *Mitochondrial targeting peptide*
- NBT:** Nitro tetrazólio azul, do inglês: *Nitro blue tetrazolium*
- NCBI:** Centro Nacional de Informações de Biotecnologia, do inglês: *National Center for Biotechnology Information*
- NIH:** *National Institutes of Health*
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- OPG:** Ovos por grama de fezes
- ORESTES:** Janela aberta de leitura de ESTs, do inglês: *Open Reading frames ESTs*
- OXA:** Oxaminiquina
- OV:** Ovo
- PBS:** Tampão Salina Fosfato, do Inglês: *Phosphate-buffered saline*
- PBST₂₀:** Tampão Salina Fosfato mais Tween 20, do Inglês: *Phosphate-buffered saline and Tween 20*
- PCE:** Programa de Controle de Esquistossomose
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*
- PECE:** Programa Especial de Controle da Esquistossomose
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- PZQ:** Praziquantel
- RNA:** Ácido ribonucléico, do inglês: *Ribonucleic acid*
- RNA-seq:** Sequenciamento do Ácido ribonucléico, do inglês: *Ribonucleic acid sequencing*

- ROC:** Curvas de Características de Operação do Receptor, do inglês: *Receiver Operating Characteristic*
- RT-PCR:** Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase, do inglês: *Reverse transcriptase - polymerase chain reaction*
- SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, do inglês: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- SEA:** Antígeno solúvel de ovo, do inglês: *Soluble Egg Antigen*
- SPF:** Livre de patógeno específico, do inglês, *specific pathogen free*
- SGBD:** Sistema de gerenciamento de banco de dados
- SmAE:** *Schistosoma mansoni* assembled ESTs
- SQL:** Linguagem estruturada de busca, do inglês: *Structured Query Language*
- SVM:** Máquina de vetor-suporte, do inglês: *Support vector machine*
- SWAP:** Antígeno solúvel de verme adulto, do inglês: *Soluble Worm Antigen Preparation*
- TBS:** Tampão Tris salínico, do inglês: *Tris buffered saline*.
- TBST:** Tampão Tris salínico e tween 20, do inglês: *Tris buffered saline and Tween 20*
- TDR:** Pesquisa e treinamento em doenças tropicais; do inglês: *Research and Training in Tropical Diseases*
- TF-Test®:** Teste de três fezes; do inglês: *Three Fecal Test*
- Th1:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 1, do inglês: *T helper cells type 1*
- Th2:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 2, do inglês: *T helper cells type 2*
- TIGR:** Instituto de Pesquisa Genômica; do Inglês: *Institute for Genomic Research*
- TMB:** Tetrametilbenzidina, do inglês: *Tetramethylbenzidine*
- VA:** Verme Adulto
- WGS:** Shotgun do Genoma Inteiro, do inglês: *Whole Genome Shotgun*
- WHO:** Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*
- WTSI:** *Wellcome Trust Sanger Institute*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Esquistossomose.....	22
1.2 <i>Schistosoma mansoni</i>	23
1.3 Imunopatologia da esquistossomose mansoni.....	25
1.4 Estratégias de controle da esquistossomose	27
1.5 Diagnóstico da esquistossomose	28
1.5.1 Métodos parasitológicos.....	28
1.5.2 Métodos moleculares.....	31
1.5.3 Métodos imunológicos	31
1.6 Genoma do <i>Schistosoma mansoni</i>	33
1.7 Ferramentas de Bioinformática	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Análises <i>in silico</i>	42
4.1.1 Estratégia para escolha dos programas utilizados	42
4.1.2 Banco de dados de Domínio Público	42
4.1.3 Preditores utilizados para predição de peptídeo sinal	43
4.1.4 Preditores utilizados para predição de localização celular	44
4.1.5 Preditores utilizados para predição de epítomos	45
4.1.6 BLAST - <i>Basic Local Alignment Search Tool/NCBI</i>	46
4.1.7 Estratégia de seleção de proteínas candidatas para o diagnóstico da esquistossomose	47

4.1.9 Seleção de epítomos lineares de célula B para serem sintetizados	50
4.2 Obtenção de soro de camundongos e de humanos	51
4.2.1 Obtenção de soro de camundongos suíços infectados com <i>S. mansoni</i>	51
4.2.2 Obtenção de soro de camundongos infectados com outros helmintos.....	53
4.2.3 Obtenção de soro de humanos.....	53
4.3 Considerações Éticas	55
4.4 Peptídeos sintéticos	55
4.4.1 ELISA - Peptídeos sintéticos	55
4.5 Predição de epítomos lineares de célula B para proteína recombinante Sm200(1069-1520).....	56
4.6 Obtenção das proteínas recombinantes.....	57
4.6.1 Sm200(1069-1520) recombinante.....	57
4.6.2 SmVal7 recombinante	58
4.7 <i>Western blot</i> Sm200(1069-1520)	59
4.8 ELISA-rSm200(1069-1520).....	59
4.9 ELISA-rSmVal7	60
4.10 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Análises <i>in silico</i>	63
5.1.1 Modelagem do banco de dados	63
5.1.2 Proteínas selecionadas.....	65
5.1.3 Epítomos lineares de célula B	72
5.2 Experimentos com camundongos e humanos.....	73
5.2.1 Recuperação de vermes dos camundongos suíços infectados com <i>S. mansoni</i>	73
5.2.2 Resultado dos exames de fezes dos indivíduos de área endêmica para esquistossomose mansoni.....	74
5.3 Peptídeos sintéticos	76

5.3.1 Ensaio de ELISA	76
5.4 Proteínas selecionadas e expressas	85
5.4.1 rSm200	86
5.4.2 rSmVal7	94
6 DISCUSSÃO	101
7 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS	130
ANEXO I - Artigo publicado referente ao trabalho de doutorado	130
ANEXO II - Revisão publicada dentro do assunto do trabalho de doutorado	140

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

As doenças parasitárias representam um grave problema de saúde pública em vários países do mundo, principalmente naqueles em desenvolvimento, refletindo sua situação econômica e social. Neste contexto, as esquistossomoses aparecem como uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo, abrangendo 78 países, distribuídos nos continentes americanos (sul e central), africano e asiático. Dentre essas regiões, a África é a mais afetada pela doença, compreendendo 90% de todos os casos (WHO, 2015). Dentre as doenças negligenciadas, a esquistossomose se destaca por apresentar importante grau de morbidade, afetando mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que, somente no ano de 2013, mais de 40 milhões de pessoas necessitaram de tratamento para a doença (WHO, 2015). De acordo com o indicador de DALY (Disability-Adjusted Life Years), que quantifica o número perdido em anos de vida, devido a problemas relacionados com a doença, a esquistossomose foi responsável por 3,31 milhões/DALY (Hotez et al., 2014).

Os agentes etiológicos das esquistossomoses são trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Dentre as cinco espécies que parasitam os mamíferos, três possuem maior importância médica para o homem. São elas: *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) e *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), causadores da esquistossomose mansoni, esquistossomose hematóbica e esquistossomose japônica, respectivamente. A esquistossomose mansoni é endêmica em 54 países e territórios distribuídos pela América do Sul, Caribe e África (WHO, 2002), enquanto as esquistossomoses hematóbica e japônica estão restritas ao continente africano e asiático, respectivamente.

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública. Dados da prevalência de infecção pelo *S. mansoni* provenientes do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), que foram obtidos entre 2005 e 2009 (Scholte et al., 2014), e dados preliminares do Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-helminthos realizados entre 2010 e 2012 (Katz, 2014), determinados através da técnica de Kato-Katz, com duas lâminas de uma mesma amostra, demonstram que a prevalência da esquistossomose reduziu significativamente na maioria dos Estados avaliados. No entanto, vários trabalhos demonstram que a

avaliação por Kato-Katz de duas lâminas em uma única amostra de fezes, apresenta falha de diagnóstico em áreas onde os indivíduos apresentam baixa carga parasitária (Enk et al., 2008; Siqueira et al., 2011; Grenfell et al., 2013). Sendo assim, a prevalência da doença apresenta-se subestimada.

1.2 *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* possui um ciclo biológico complexo que envolve uma fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*), e uma fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro definitivo (homem ou pequenos mamíferos).

O ciclo de vida do *S. mansoni* tem início quando ovos, eliminados junto às fezes de indivíduos infectados, entram em contato com a água. Esses ovos podem sobreviver de 2 a 5 dias em fezes de consistência sólida e 24 horas em fezes diarreicas. O contato com a água, sobre influência de temperatura e luminosidade, promove a dissolução das fezes e liberação dos ovos no meio líquido, provocando a eclosão e liberação das larvas ciliadas, denominadas miracídios. Os miracídios, livres em meio aquático, encontram o hospedeiro intermediário e iniciam a penetração nestes moluscos com o auxílio de secreções glandulares e movimentos rotatórios. Após a penetração dos miracídios, ocorre a perda do epitélio ciliar e a degeneração do terebratorium (extremidade anterior do parasito, onde se encontram as terminações das glândulas adesivas e de penetração). Em seguida, ocorre o desaparecimento da musculatura subepitelial e do sistema nervoso. A larva se torna imóvel e passa a ser chamada de esporocisto primário. Na 2ª semana após a penetração, observa-se, no interior do esporocisto primário, uma série de ramificações tubulares que preenchem todos os espaços intercelulares do tecido conjuntivo; nestas ramificações, as células germinativas estão em intensa multiplicação. A partir do 14º dia, inicia-se, então, a formação dos esporocistos secundários. Ocorre o desenvolvimento de um aglomerado de células germinativas nas paredes do esporocisto primário, a formação de vacúolos mais acentuada na parte central da larva. Os aglomerados se reorganizam e dão origem a septos, sendo cada septo considerado um esporocisto secundário. Nessa fase, as paredes apresentam uma camada cuticular e, abaixo, dupla camada muscular com fibras musculares longitudinais e transversais. Essa musculatura é fundamental para locomoção dos esporocistos. Ocorre, a partir do 18º dia, a migração transtecidual dos esporocistos, até alcançarem a glândula digestiva ou

hepatopâncreas. Esses esporocistos secundários sofrem modificações anatômicas, dando início à proliferação das células germinativas e formação das cercárias. A formação completa das cercárias, até a sua emergência, ocorre de 27 a 30 dias após a penetração dos miracídios (Pan, 1965). Essas cercárias são eliminadas pelo molusco e, ao encontrar o hospedeiro definitivo, penetram ativamente na pele ou mucosas podendo ocasionar uma dermatite alérgica no local de entrada. A fixação das cercárias na pele é auxiliada pela presença de L-arginina e pelo calor proveniente do hospedeiro (Haas et al., 1976; Haas et al., 1997), permitindo um contato prolongado entre parasita e hospedeiro, e assim, facilitando a penetração das cercárias através da pele. A partir daí, as cercárias iniciam a invasão da pele através da ação vibratória da cauda e da secreção das glândulas pré-acetabulares, as quais possuem proteases (Haas et al., 1997). Esse processo de invasão da pele pelo parasito resulta em perda da cauda e em alterações morfofisiológicas, desencadeadas pelas mudanças de temperatura e osmolaridade, transformando as cercárias em esquistossômulos (Stirewalt, 1974). Os esquistossômulos, então, já transformados, caem na corrente sanguínea e são levados até os pulmões e então, chegam até as veias do sistema porta-hepático, local em que sofrerão maturação em vermes adultos (Miller e Wilson, 1980).

Os vermes adultos se acasalam, migram contra a corrente sanguínea, até as vênulas do mesentério do intestino e as fêmeas iniciam a oviposição 30-40 dias após a infecção. Esses ovos poderão ser carreados através do fluxo sanguíneo para outros órgãos, ficando retido nestes e promovendo a formação de uma reação inflamatória granulomatosa ao redor dos mesmos. Eles também podem atravessar a mucosa do intestino caindo na luz intestinal, sendo eliminados junto às fezes, dando continuidade ao ciclo (Figura 1).

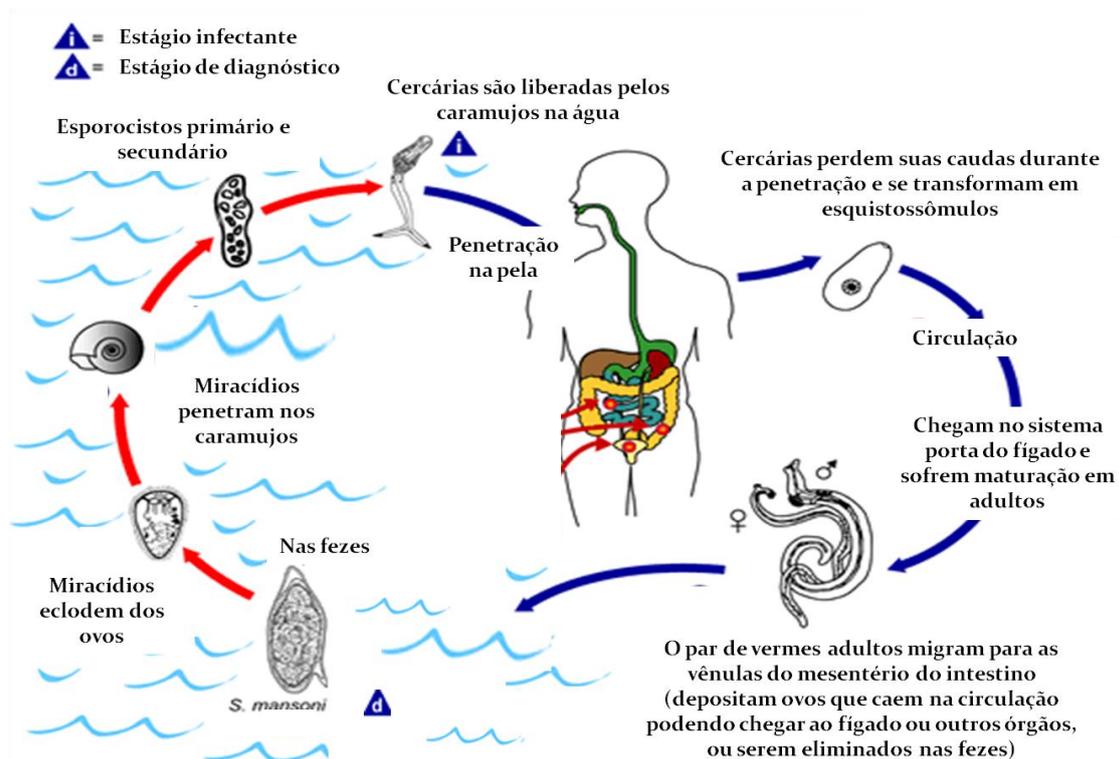


Figura 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O esquema representa o complexo ciclo de vida do *S. mansoni*, evidenciando a fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e a fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (homem). Fonte: adaptado de CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>.

1.3 Imunopatologia da esquistossomose mansoni

A infecção pelo *S. mansoni* pode induzir diferentes manifestações clínicas em seu hospedeiro definitivo. A localização do parasito, a intensidade da infecção e a resposta imune do indivíduo aos antígenos do *Schistosoma* são fatores determinantes para o curso clínico dessa parasitose (Torres, 1976; Boros, 1989). Durante a infecção pelo *S. mansoni*, os indivíduos infectados podem apresentar duas fases distintas da doença: a fase aguda e a fase crônica, que diferem entre si em relação às manifestações clínicas e imunológicas.

A fase aguda representa o estágio inicial da doença, que é determinado pela penetração das cercárias, migração de esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro definitivo, seguido pelo início da ovoposição. A resposta do sistema imune do hospedeiro definitivo contra o *S. mansoni* inicia-se assim que as cercárias

penetram através da pele e liberam diversas moléculas imunogênicas, através da secreção das glândulas acetabulares, que auxiliam neste processo de penetração e na transformação em esquistossômulos (Haas et al., 1997). Durante essa fase de invasão, a resposta imune é inicialmente inata, seguida, poucos dias depois, por uma resposta imune adaptativa tipo Th1 dominante. A partir do amadurecimento dos parasitos, por volta da sexta semana, começa a produção de ovos e a resposta imune do tipo Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6), que é característica do início da infecção, começa a declinar, enquanto a resposta do tipo Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5) aumenta (Burke, et al., 2009).

Em relação às manifestações clínicas, a esquistossomose aguda pode apresentar sinais e sintomas inespecíficos (mal-estar, febre, cefaleia, perda de peso, anorexia, artralgia, mialgia, edema, etc), respiratórios (tosse, dispneia, dor torácica e alterações das provas de função pulmonar e da radiografia do tórax), digestivos (dor abdominal, diarreia, hepatoesplenomegalia e elevação das enzimas hepáticas), neurológicos (encefalite e mielite), além de eosinofilia (Neves, Martins & Tonelli, 1966).

A presença dos ovos no organismo do hospedeiro induz a formação de uma reação inflamatória focal, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares, dispostos de forma organizada, denominada granuloma (Lenzi et al., 1998). A fase crônica da esquistossomose é caracterizada pela modulação do granuloma com a produção de IL-10 (Barsoum et al. 2013). O granuloma, ao mesmo tempo em que é danoso ao indivíduo, já que promove importante reação inflamatória, que pode causar grave fibrose hepática, também é benéfico, na medida em que “sequestra” os antígenos liberados pelos ovos, os quais apresentam efeito hepatotóxico (Hams et al., 2013).

Nesta fase, manifestações clínicas distintas podem se desenvolver, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. A forma crônica habitual ou leve é a forma em que se encontra na maioria das pessoas infectadas em áreas endêmicas, ou eventualmente fora delas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas, assintomática ou com episódios de fraqueza, fadiga, dor abdominal e diarreia (Cheever & Andrade, 1967). A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, dita *pipestem*, descrita por Symmers (1904). 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 (Andrade, 2008). Durante a fase crônica, que pode durar a vida do hospedeiro, as fêmeas 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 (Pearce e MacDonald, 2002).

1.4 Estratégias de controle da esquistossomose

Em relação ao controle da esquistossomose, as medidas adotadas baseiam-se na melhoria do saneamento básico com o suprimento de águas tratadas, combate ao molusco transmissor, educação e promoção da saúde, diagnóstico da infecção e tratamento (Rollinson et al., 2012). Com a adoção dessas medidas seria possível interromper a expansão da doença para novas áreas e reduzir a prevalência, a morbidade e a mortalidade. Porém, o precário padrão socioeconômico dos países endêmicos e a falta de interesse político dificultam o controle dessa parasitose.

Atualmente, o tratamento tem sido o método mais utilizado para controle da esquistossomose (Fenwick et al., 2003; Fenwick & Webster, 2006; Gray et al., 2010). No Brasil, quando ocorreu a implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) em 1977 até 1999, o fármaco utilizado pelo Ministério da Saúde no tratamento da esquistossomose era a oxaminiquina (OXA), administrada em dose única, e que conferia uma taxa de cura na faixa de 65% a 85%. Entretanto, devido ao seu alto custo e de algumas evidências de tolerância do *S. mansoni* ao fármaco, o praziquantel (PZQ) foi introduzido, conferindo taxa de cura entre 60 e 90%, e redução de contagem de ovos de 90 a 95% nos casos em que os indivíduos não foram curados (Fenwick et al., 2003; El-lakkany et al., 2011).

O PZQ é atualmente o medicamento recomendado pela OMS (WHO, 2013), tanto em nível populacional quanto individual, devido ao seu baixo custo, eficácia contra as formas adultas do parasito e atividade contra as cinco espécies de *Schistosoma* (Doenhoff et al., 2002). O efeito desse fármaco varia de acordo com o estágio de vida do parasito, não sendo efetivo contra as formas imaturas, o que inviabiliza o seu uso nos estágios iniciais da doença. Sendo assim, as formas não eliminadas após o tratamento, podem se desenvolver e ocasionar infecções ativas (Picca-Mattocchia et al., 2004). Com isso, programas de controle baseados apenas no tratamento em larga escala, não associados com o diagnóstico individual da população, possuem efeitos temporários, uma vez que reduzem a prevalência e a incidência de formas graves da doença, mas falham no controle da transmissão, ocasionando a manutenção da infecção e o

surgimento de novos focos (Lambertucci et al., 2000; Engels et al., 2002; Doenhoff et al., 2009; Rollinson et al., 2012).

Outro problema gerado, pelo elevado número de infecções e reinfecções em moradores de áreas endêmicas, associado à pressão seletiva exercida no parasito pelo constante tratamento da população, é o aparecimento de cepas do parasito resistente ao fármaco. Embora poucos casos de isolados de *S. mansoni* resistentes ao PZQ no campo sejam identificados, a redução da susceptibilidade ao fármaco já foi verificada em campo, em vários países da África (Fallon et al., 1995; Ismail et al., 1996; Bonesso-Sabadini & Souza-Dias, 2002; Danso-Appiah & De Vlas, 2002; Melman et al., 2009), e já foi induzida em laboratório por Fallon & Doenhoff (1994), Ismail et al. (1994) e Couto et al. (2011).

Dessa forma, um diagnóstico de alta sensibilidade para a esquistossomose torna-se um instrumento vital para se conhecer a real prevalência com a detecção de infecções ativas e para se avaliar com precisão a cura após intervenções terapêuticas. Este conhecimento se torna fundamental para o controle da transmissão da doença (Berhe et al., 2004).

1.5 Diagnóstico da esquistossomose

Os métodos diagnósticos atualmente dividem-se em dois grupos, os métodos diretos e os métodos indiretos. No primeiro, tem-se a detecção do parasito ou suas partes, como ovos, substâncias antigênicas ou fragmentos moleculares. Já no segundo, têm-se evidências indiretas da infecção pelo *S. mansoni* pela demonstração de reatividade celular a antígenos do parasito ou pela detecção de anticorpos específicos no soro do hospedeiro (Rabello, 1990). Outra divisão também permite classificar os métodos de diagnóstico como qualitativos ou quantitativos. Os métodos qualitativos detectam somente a presença do parasito, enquanto os métodos quantitativos refletem a carga parasitária e/ou a resposta imunológica de um indivíduo ou grupo populacional, o que permite estabelecer indicadores epidemiológicos para programas de controle.

1.5.1 Métodos parasitológicos

Uma variedade de técnicas parasitológicas encontram-se descritas na literatura, entretanto muitas delas já estão em desuso por não serem consideradas adequadas e

apresentarem baixa sensibilidade. A técnica de flutuação (Willis, 1921), a técnica de centrifugação em éter sulfúrico (Blagg et al., 1955) e o uso de lâminas sem qualquer padronização (Martins, 1973) são exemplos desses métodos.

Outras técnicas atualmente utilizadas são a da sedimentação espontânea (HPJ) que foi descrita por Lutz (1919) e padronizada por Hoffmann, Pons e Janer (1934), a técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972) e a técnica de centrifugação com formol acetato de etila (TF-Test®) (Gomes et al., 2004). Estas são técnicas muito utilizadas por serem simples e de fácil execução, além de apresentarem índice considerável de sensibilidade em pacientes quando a carga parasitária é alta.

A técnica de sedimentação espontânea consiste basicamente na mistura das fezes com água, sendo essa solução filtrada e mantida em repouso. Essa sedimentação é inserida entre lâmina e laminula, e observada em microscópio. É uma técnica bastante utilizada em laboratórios de análises clínicas ou inquérito coproparasitológicos, por possibilitar diagnóstico simultâneo de outras parasitoses.

A técnica de Kato-Katz consiste na demonstração microscópica de ovos nas fezes e é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (1994). Essa técnica foi modificada do seu original (Kato & Miura, 1954) por Katz et al, (1972). Eles simplificaram a realização da técnica, substituindo a pesagem das fezes com balança por um cartão com orifício central de 6 mm de diâmetro, definindo a quantidade de fezes a ser examinada ($42,7 \pm 2,0$ mg). As lâminas confeccionadas podem ser transportadas e armazenadas em temperatura ambiente por meses, sem prejuízo dos resultados. Ela é uma técnica amplamente utilizada, principalmente por seu baixo custo operacional e pela praticidade em situações de infraestrutura laboratorial precária (Rabello, 1997). Entretanto, esta técnica torna-se menos sensível em indivíduos com baixa carga parasitária, em situações de baixa prevalência e após o tratamento específico (Lin et al., 2008; Zhang et al., 2009; Ferrari et al., 2003; Enk et al., 2008). Outras limitações dessa técnica é a impossibilidade de execução em amostras diarreicas, baixa reprodutibilidade entre amostras, lâminas diferentes de um mesmo indivíduo, e entre leituras de examinadores diferentes (Kongs et al., 2001).

A técnica de TF-Test® (*Three Fecal Test*) é constituída por três amostras fecais coletadas em dias diferentes e unificadas por meio de concentração do sedimento por centrifugação rápida. Elas são duplamente filtradas, transferidas para uma solução conservadora (formalina 10%) e posteriormente analisadas por microscopia óptica.

A técnica de eclosão de miracídios (Zicker et al., 1977; Jurberg et al., 2008), gradiente salínico (Coelho et al., 2009) e helmintex® (Teixeira et al., 2007) estão em processo de validação. A técnica de eclosão de miracídios baseia-se no forte comportamento fototrópico dos miracídios. Amostras de fezes são acondicionadas em um frasco próprio e completados com água desclorada até o orifício localizado no ápice do funil. O frasco é colocado dentro de uma caixa de madeira permitindo que somente o ápice do funil fique exposto à luz. Desta forma, os miracídios são atraídos pela luz artificial, podendo então ser coletados e contados. Testes com 1,5g de fezes para determinação de sua eficiência demonstraram que a sensibilidade de um único teste é equivalente a 36 lâminas de Kato-Katz (Jurberg et al., 2008). A técnica de gradiente salínico consiste em um método de baixo custo, de fácil execução, rápido e que traz como grande vantagem a redução no número final de análises ao microscópio. O fluxo de solução salina a 3% provoca a suspensão e a retirada de sedimentos de baixa densidade da amostra fecal, que está diluída em solução salina a 0,9%. Os ovos de *S. mansoni* possuem maior densidade e permanecem na superfície de uma placa porosa, quando são analisados ao microscópio óptico. Resultados obtidos em laboratório demonstraram que a técnica de gradiente salínico apresenta maior sensibilidade do que 12 lâminas de Kato-Katz de uma única amostra fecal de 500mg (Coelho et al., 2009). A técnica de helmintex® baseia-se no isolamento de ovos de *S. mansoni* a partir de 30g de fezes que são processadas e concentradas. Essas fezes são expostas a um campo magnético onde há a interação dos ovos com microesferas paramagnéticas. Apesar da sensibilidade, sua limitação está no número de lâminas a serem analisadas, tornando o processo demorado e inviável para aplicação na rotina clínica (Teixeira et al., 2007).

É possível ainda realizar análises por biópsia retal para visualização de ovos no tecido, no entanto, esta é uma técnica bastante invasiva e pouco utilizada na prática clínica, a não ser em alguns casos onde a patologia atingiu pontos críticos para a saúde do paciente (Ferrari et al., 2003).

A avaliação da prevalência por meio de técnicas parasitológicas tem sido ainda hoje um dilema encontrado no diagnóstico da esquistossomose, pois pode-se ter uma ideia falsa da real prevalência da doença, principalmente em áreas com indivíduos que apresentam baixa intensidade de infecção, o que impacta diretamente no controle da parasitose (De Vlas et al., 1992; Enk et al., 2008). Por esse motivo, a associação de técnicas moleculares e imunológicas vem se mostrando sensível e promissora na identificação do parasito em amostras com resultados negativos.

1.5.2 Métodos moleculares

A PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase) é um método molecular que permite a amplificação de sequências de DNA ou RNA da amostra, copiando-as em larga escala de maneira bastante específica. Algumas técnicas de PCR foram descritas como ferramentas para diagnóstico da esquistossomose mansoni, sendo primeiramente descrita para detecção de DNA do parasito em amostras de fezes humanas (Pontes et al., 2002). Esta metodologia também foi avaliada em áreas endêmicas, sendo capaz de detectar fentogramas de DNA de *S. mansoni* (Pontes et al., 2003).

Outra abordagem da PCR convencional, denominada de PCR-ELISA, está em fase de validação para o diagnóstico da esquistossomose, utilizando fezes humanas. Essa técnica consiste em um processo alternativo de visualização do produto amplificado, permitindo uma análise semi-quantitativa. Um método imunológico é associado para quantificar o produto de PCR após a ligação do DNA marcado com biotina. Apesar do custo relativamente alto, tem apresentado bons resultados preliminares, principalmente levando em consideração a quantidade de amostras que podem ser analisadas simultaneamente (Gomes et al., 2010).

Os métodos moleculares de diagnóstico para detecção de DNA do parasito nas fezes pode apresentar alta especificidade e sensibilidade, porém possuem alto custo e alta complexidade quanto ao manuseio de equipamentos (Obeng et al., 2008; Kjetland et al., 2009), sendo de difícil implementação em áreas endêmicas.

1.5.3 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos são ferramentas importantes para se avaliar indivíduos infectados em inquéritos epidemiológicos, embora forneça apenas evidências indiretas da presença do parasito (Chieffi & Kanamura, 1978). Uma vez que métodos parasitológicos de fezes apresentam baixa sensibilidade para diagnóstico de indivíduos que possuem infecção de baixa intensidade, os métodos imunológicos têm se mostrado, neste contexto, úteis para serem usados em estudos populacionais. Os testes sorológicos são metodologias utilizadas para o diagnóstico da esquistossomose, como a reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay). A imunofluorescência é uma técnica que permite visualizar a

reatividade de anticorpos presentes no soro dos indivíduos em substratos fixados em lâminas utilizando corantes fluorescentes, entretanto, a necessidade do microscópio de fluorescência limita a utilização da técnica em áreas endêmicas com pouca estrutura (Deelder et al., 1989; Schlsio et al., 1989). O ensaio de ELISA pode ser utilizado tanto para detecção de antígenos do parasito quanto para detecção de anticorpos específicos no soro dos indivíduos. O imunodiagnóstico da esquistossomose por detecção de antígenos circulantes específicos baseia-se na presença de antígenos do parasito na circulação sanguínea humana (De Jonge et al., 1991). As abordagens para a detecção de antígenos circulantes geralmente envolvem captura do antígeno por anticorpos monoclonais. Dois dos antígenos circulantes mais comumente utilizados são as glicoproteínas AAC (Antígeno Anódico Circulante) e ACC (Antígeno Catódico Circulante), derivadas do epitélio do tubo digestivo dos parasitos (Deelder et al., 1980), e sendo a presença destes antígenos indicativa de infecção ativa. A desvantagem da detecção de antígenos circulantes se deve ao fato de ser baixa a sensibilidade desse tipo de ensaio nos casos em que a prevalência e intensidade de infecção são baixas, podendo até mesmo ser inferior aos testes parasitológicos (De Jonge et al., 1991), além de apresentarem alto custo e dependência da produção de anticorpos monoclonais (Rabello, 1997).

Outra abordagem que está sendo utilizada para o diagnóstico da esquistossomose é o teste imunocromatográfico - POC-CCA® (urine-based point-of-care) para detecção do antígeno catódico circulante em amostras de urina (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul). Esse teste tem se mostrado promissor para ser utilizado em estudos epidemiológicos, em laboratórios e campo, apresentando melhor sensibilidade que a técnica de Kato-Katz (Colley et al., 2013; Lamberton et al, 2014; Adriko et al, 2014; Greter et al, 2015) Entretanto, mais estudos de campo, especialmente em áreas de baixa endemicidade, são necessários (Lodh et al, 2013; Legesse and Erko, 2008).

Apesar de ambos os tipos de detecções serem considerados promissores, a detecção de anticorpos tem apresentado baixa especificidade, além de não diagnosticarem a cura após tratamento (Bdul-Fattah et al., 2000; Derouin et al., 1980; da Silva et al., 1998). Uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento de testes sorológicos é a escolha dos antígenos apropriados. Existem diversos fatores que influenciam a escolha de um antígeno para ser utilizado no diagnóstico como: produtividade e facilidade de obtenção, elevada estabilidade em condições simples de estocagem, antigenicidade, especificidade e compatibilidade com técnicas sorológicas

baratas e simples. Os antígenos podem ser obtidos de diversos estágios evolutivos do parasito. Os mais utilizados são os extratos brutos, preparados mediante ruptura de vermes, cercárias ou ovos. O antígeno solúvel de vermes adultos (SWAP) é a fonte mais fácil e abundante de material antigênico (Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004). Antígenos de cercárias são menos empregados devido à sua baixa sensibilidade e especificidade (Lunde & Ottensen, 1980). O homogeneizado de ovos, conhecido como SEA, contém grande número de frações antigênicas, apesar de somente uma minoria desses constituintes ser liberada por ovos viáveis, como demonstrado por Ashton e colaboradores (2001). Sendo assim, os extratos brutos apresentam a grande vantagem de serem facilmente preparados, entretanto a utilização de preparações purificadas é uma possibilidade cada vez mais considerada. A ocorrência de reações cruzadas, principalmente observadas com o uso de antígenos brutos que contêm frações antigênicas compartilhadas com diversos parasitos, também é um dos grandes problemas do uso destes antígenos (Mott & Dixon, 1982; Correa-Oliveira et al., 1988; Montenegro, 1992; Ishida et al. 2003; Luo et al. 2009).

O uso de proteínas recombinantes como antígenos para o imunodiagnóstico da esquistossomose tem aumentado cada vez mais. A expressão de proteínas do ovo de *Schistosoma japonicum* denominadas de SjE16, SjPPlase e SjRobl, em sistema eucarioto, foram avaliadas em ensaios de ELISA e mostraram-se promissoras para o diagnóstico de esquistossomose aguda, com sensibilidade de 40%, 80% e 70% respectivamente (Chen et al., 2013). Outra proteína recombinante, SjSP-13, de *Schistosoma japonicum*, foi expressa em sistema procarioto e utilizada em ensaios de ELISA frente a soro de indivíduos positivos de área endêmica e apresentou 90,4% de sensibilidade e 98,9% de especificidade (Xu et al., 2014).

O desenvolvimento da biologia molecular somado à disponibilidade de genomas dos parasitos pode proporcionar a busca por antígenos potencialmente imunogênicos e específicos do *S. mansoni* que possam ser utilizados, como antígenos recombinantes ou na forma de peptídeos sintéticos, em testes sorológicos para diagnóstico da esquistossomose mansoni.

1.6 Genoma do *Schistosoma mansoni*

Atualmente uma das abordagens mais promissoras para a identificação de novos alvos de vacinas, farmacos e antígenos para diagnóstico, assim como para a

compreensão da resistência a drogas, diversidade antigênica, infectibilidade e patologia, consiste em compreender e decifrar as informações nos genomas dos parasitos (TDR/WHO, 2005).

O *S. mansoni* é um parasito diploide, com sete pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais, sendo as fêmeas heterogaméticas (ZW) e os machos homogaméticos (ZZ). Ele se encontra entre os primeiros animais que desenvolveram dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heterogaméticos (Verjovski-Almeida et al., 2003).

O estudo do transcriptoma de *S. mansoni* foi uma iniciativa brasileira, financiada por agências locais que teve início em 1992 por meio de um projeto colaborativo entre instituições brasileiras, financiado por agências nacionais (Franco et al., 2000). A partir de 1994, a Organização Mundial da Saúde iniciou o financiamento da Rede Genoma de *Schistosoma* para a descoberta de novos genes com o objetivo final de identificar novos alvos para o desenvolvimento de fármacos, vacinas e diagnóstico. Durante esse período a comunidade científica mundial produziu aproximadamente 16.000 ESTs (marcador de sequência expressa – Expressed Sequence Tag). Mais tarde, outros dois grandes projetos brasileiros de sequenciamento do transcriptoma do *S. mansoni* foram realizados (Oliveira et al., 2001). O primeiro projeto foi financiado pela FAPESP/MCT/CNPq e utilizou uma biblioteca de verme adulto e minibibliotecas de ORESTES (janela de leitura aberta - Open Reading frames ESTs) de seis estágios do ciclo de vida do parasito (Verjovski-Almeida et al., 2003). O projeto gerou 124.681 ORESTES e ESTs úteis de *S. mansoni* que foram agrupadas resultando em 30.988 SmAE (*Schistosoma mansoni* assembled ESTs) correspondendo a aproximadamente 92% do transcriptoma. Dentre as SmAEs anotadas, 23% encontraram relação com outras sequência de *S. mansoni* já depositadas, tendo 2% delas identidade com genes conhecidos e 21% com ESTs depositadas no dbEST. Os outros 73% não encontraram relação com sequência de *S. mansoni*, sendo descritas como novos genes relatados de *S. mansoni*. A comparação das ESTs de *S. mansoni* com sequência dos bancos de dados permitiu identificar um grande número de genes de interesse (Verjovski-Almeida et al., 2003). O segundo projeto, financiado pela FAPEMIG/MCT/CNPq, consistiu de uma rede genômica formada por instituições do Estado de Minas Gerais que caracterizou o transcriptoma de diferentes estágios de desenvolvimento do parasito, a partir da geração de aproximadamente 42.500 ESTs convencionais (Oliveira et al., 2007).

A iniciativa internacional para o sequenciamento do genoma completo do organismo foi conduzida pelo *The Institute for Genomic Research* – TIGR em associação com o *Welcome Trust Sanger Institute* – WTSI, por meio de financiamento do *National Institute of Health* – NIH e da *Welcome Trust*, respectivamente (LoVerde et al., 2004). As últimas versões do sequenciamento genômico e todas as análises efetuadas estão disponíveis nos bancos de dados *on line* GeneDB produzido pelo WTSI, e no SchistoDB, banco de dados genômicos desenvolvido para incorporar todos os dados disponíveis sobre o *S. mansoni*.

A sequência do genoma nuclear de *S. mansoni* foi obtida por meio da metodologia WGS (*Whole Genome Shotgun*). Essa técnica consiste na quebra de DNA genômico em pequenos fragmentos para sequenciamento, e a posterior organização da sequência desses fragmentos, para recompor a sequência original. Esse processo foi realizado *in silico* e os fragmentos foram agrupados em 5.745 *scaffolds* com tamanho superior a 2kb, totalizando 363mbp. Além disso, foram identificados 11.812 genes que codificam 13.162 transcritos. Apesar de 45% do genoma ser composto de elementos repetitivos, 50% das bases estão presentes em contigs de tamanho maior que 16,3kbp e em *scaffolds* maiores que 824,5kbp (Berriman et al., 2009).

Em 2012, uma nova versão do genoma de *S. mansoni* foi disponibilizada e todos os dados foram melhorados devido ao uso do dado de mapeamento genético e de tecnologia de sequenciamento em massa, além do transcriptoma (RNA-seq) de diferentes fases do parasito e disponibilização dos dados genômicos do *S. japonicum* e do *S. haematobium* (Protasio et al., 2012). Essa nova metodologia ajudou na melhor identificação de regiões transcricionalmente ativas e definiu com mais precisão a coordenada dos exons de cada gene. Além disso, a natureza quantitativa do RNA-seq permitiu identificar genes diferencialmente expressos de uma forma mais sensível e precisa do que os outros métodos anteriormente empregados (Marioni et al., 2008; Shendure, 2008). Na primeira versão do genoma, pela técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), foi possível localizar, aproximadamente, 43% dos fragmentos montados em um dos sete cromossomos autossômicos ou no cromossomo sexual de *S. mansoni* (Berriman et al., 2009). Na nova versão já foi possível mapear 81% das sequências em seus cromossomos, sendo o cromossomo um o maior deles. Além disso, o número de *scaffolds* foi reduzido para 885 e o número de genes preditos passou de 11.807 para 10.852. Dos genes excluídos, 65% haviam sido anotados como proteínas hipotéticas (Protasio et al., 2012).

1.7 Ferramentas de Bioinformática

A Bioinformática é um campo da ciência que está em crescimento e envolve o uso de técnicas de matemática aplicada, criação e aperfeiçoamento de algoritmos, técnicas computacionais, estatísticas e teoria da computação para solucionar problemas relacionados ao gerenciamento e análise de dados biológicos (Baldi and Brunak, 2001; Baxevanis and Ouellette, 2005; Lesk, 2002).

Com o auxílio de programas computacionais é possível realizar predições relevantes a partir de sequências depositadas em bancos de dados, elucidando detalhes acerca das características, estrutura, e função dos genes e proteínas. Nesse contexto, existem inúmeras ferramentas de bioinformática capazes de fazer a predição de características em sequências lineares de proteínas que são importantes para reduzir o tempo de pesquisa e custos através do desenvolvimento de predições para auxiliar e melhorar abordagens experimentais em pesquisas biológicas.

Diante do exposto e das limitações em relação ao diagnóstico da esquistossomose mansoni, torna-se favorável a utilização de ferramentas de bioinformática para selecionar alvos para serem utilizados no diagnóstico dessa doença. As condições para que uma proteína seja considerada um bom antígeno, tanto para o desenvolvimento de vacinas quanto para serem utilizadas no diagnóstico, baseiam-se em características que irão facilitar o seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro. Frente a essas condições, torna-se importante que essas proteínas possuam peptídeo sinal, baixa similaridade com proteínas humanas, epítomos lineares de célula B e T e localização celular favorável.

Os peptídeos sinais são sequências de 15 a 60 resíduos de aminoácidos, geralmente localizados na porção N-terminal das proteínas. Muitas das proteínas sintetizadas nos compartimentos celulares não desempenham seus papéis biológicos necessariamente nos locais onde são geradas, necessitando ser exportadas para a região específica onde exercerão suas funções. A sequência do peptídeo sinal tem por função marcar as proteínas que serão exportadas para determinados locais, como, por exemplo, o ambiente extracelular. Essas proteínas são reconhecidas por meio do peptídeo sinal, o qual, após a exportação, podem ser removidos da proteína por meio da ação de proteases ou manter-se como parte integrante da mesma (Clark, 2005; Alberts et al., 2008). Alguns preditores como SignalP 4.0 e Sigcleave são capazes de

computacionalmente fazer a predição da presença ou não de peptídeo sinal em uma sequência de proteína.

Outro critério importante para selecionar proteínas candidatas para serem utilizadas no diagnóstico da esquistossomose é o percentual de semelhança entre as proteínas avaliadas, proteínas humanas e proteínas de camundongos, uma vez que, se a porcentagem de similaridade for alta, as proteínas selecionadas podem apresentar baixa antigenicidade (Abbas et al., 1997).

Epítomos são unidades essenciais mínimas de informação derivados de proteínas do próprio organismo ou não, e que estimulam respostas imunológicas celulares (célula T) e/ou humorais (célula B). A identificação e caracterização de epítomos de células B desempenham um papel importante na concepção de vacina, de testes de imunodiagnóstico, e na produção de anticorpos, uma vez que epítomos de células B são os sítios que são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, podendo potencializar uma resposta imune (Larsen et al., 2006). Portanto, ferramentas computacionais para prever epítomos lineares de célula B em sequências de proteínas são fundamentais, embora a estratégia mais promissora fosse realizar a predição de epítomos conformacionais, sendo necessária, para isso, a estrutura tridimensional da proteína. A predição de epítomos lineares de células T é importante, uma vez que para produção de anticorpos específicos contra a proteína é necessária a participação de células T que precisam ser ativadas pela ligação de seus receptores ao complexo principal de histocompatibilidade, formando o complexo MHC-peptídeo, e de moléculas coestimulatórias. No homem, esses genes são chamados de *Human Leukocyte Antigen*, ou genes HLA, e em camundongos, eles são designados como genes H-2 (Janeway et al., 2002).

A localização de uma proteína também é um fator fundamental para que ela seja reconhecida pelo sistema imunológico. Proteínas restritas ao compartimento citosólico não são bons alvos imunológicos, enquanto as proteínas associadas à superfície ou proteínas secretadas são mais acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro podendo levar à produção de anticorpos específicos.

Além das ferramentas clássicas de bioinformática, outra abordagem promissora para identificar proteínas antigênicas é a busca de epítomos lineares de células B associadas com regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs, do inglês, *Intrinsically Disordered Regions*). Proteínas que possuem regiões intrinsecamente desordenadas representam uma classe de proteínas com ausência de estrutura parcial ou total em seu

estado nativo. Devido à sua adaptabilidade intrínseca, tais proteínas podem estar envolvidas em muitos processos biológicos importantes incluindo o escape do sistema imune e o processo de interação parasito-hospedeiro (Wright e Dyson, 1999; Dyson e Wright, 2005; Feng et al., 2006). Em um estudo utilizando epítomos lineares de células B altamente antigênicos, provenientes de um antígeno de membrana de *Plasmodium vivax*, promissor para vacinas contra malária, Bueno e colaboradores (2011) concluíram que a presença de regiões intrinsecamente desordenadas em epítomos lineares de células B, tornam esses epítomos mais propensos a serem os mais antigênicos e imunogênicos dentro da proteína.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose continua sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo com mais de 240 milhões de pessoas infectadas em 78 países. Para o controle e monitoramento efetivo dessa doença é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais sensíveis (Savioli et al., 1997; WHO, 2014). Um diagnóstico eficaz, com ampla aplicação na detecção de casos em áreas de alta e baixa prevalência e controle de cura após intervenções terapêuticas, desempenha um papel fundamental para avaliar o sucesso das estratégias de controle de transmissão da doença (Berhe et al., 2004; Weerakoon et al, 2015). Os métodos parasitólogos ainda são os mais utilizados em programas de controle de esquistossomose em todo o mundo, principalmente em pacientes de área endêmica e para avaliação de cura pós-tratamento, sendo a técnica de Kato-Katz a mais utilizada por ser rápida e de baixo custo (Katz et al., 1972; WHO 1993). Entretanto, a redução da carga parasitária de indivíduos tratados indicam a necessidade de adaptação do número de lâminas examinadas, além da associação de técnicas moleculares e imunológicas que vêm mostrando-se sensíveis e promissoras na identificação do parasito em amostras com resultado coproscópico negativo (Enk et al., 2008; Gonçalves et al., 2006, Noya et al., 2007). Existe uma ampla variedade de testes imunológicos, sendo o ensaio de ELISA, o de escolha para o diagnóstico em massa por apresentar baixo custo, reprodutibilidade e facilidade de execução (Oliveira et al., 2003). Uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento do teste de ELISA é a escolha de antígenos apropriados. Para transpor essas limitações, faz-se necessário o uso de um antígeno que não apresente reação cruzada com outros parasitos e cuja reatividade frente a soro de indivíduos infectados e tratados caia progressivamente após o tratamento.

No Brasil, estudos indicam que a prevalência da esquistossomose está sendo subestimada devido à dificuldade de se diagnosticar indivíduos com baixa carga parasitária, principalmente em áreas de baixa endemicidade, através dos métodos utilizados atualmente (Enk et al., 2008; Gargioni et al., 2008; Cavalcanti et al., 2013). Esse fato se deve principalmente ao tratamento, que pode levar a redução da carga parasitária dos indivíduos infectados, dificultando sua identificação pelos métodos diagnósticos disponíveis. Sendo assim, torna-se necessária uma investigação mais minuciosa para verificar se a redução na prevalência da esquistossomose em áreas

endêmicas representa realmente redução no número de indivíduos infectados ou se simplesmente reflete diminuição na carga parasitária dos indivíduos tratados.

Nesse contexto, as limitações das estratégias utilizadas no controle da esquistossomose evidenciam a necessidade do desenvolvimento de um diagnóstico mais sensível que seja capaz de discriminar indivíduos infectados e não infectados de áreas de baixa prevalência e de monitorar a cura após tratamento da doença. Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido a partir da necessidade de um antígeno para o diagnóstico da esquistossomose que possua alta especificidade e sensibilidade, e que seja capaz de diferenciar indivíduos curados após tratamento quimioterápico. Frente aos avanços na área de bioinformática e à disponibilidade do genoma do *S. mansoni* (Berriman et al., 2009), propusemos selecionar novos antígenos do *S. mansoni* para serem testados e utilizados no diagnóstico da esquistossomose e de cura da doença pós-tratamento, por análises *in silico*. Alguns dos antígenos selecionados foram avaliados em ensaios imunológicos a fim de se identificar bons candidatos para o imunodiagnóstico da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar e avaliar antígenos do *S. mansoni* para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose e no controle de cura da doença pós-tratamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Desenvolver um *workflow* utilizando ferramentas de bioinformática de código livre instaladas nos servidores locais e dados extraídos do banco de dados SchistoDB para selecionar antígenos para diagnóstico da esquistossomose e controle de cura pós-tratamento.
- 2 - Integrar as análises *in silico* em um banco de dados relacional para possibilitar a extração da informação biológica relevante.
- 3 - Selecionar epítomos lineares de células B, das proteínas selecionadas, para serem sintetizados como peptídeos e avaliados em ensaios de ELISA para validar a estratégia de seleção desses antígenos.
- 4 - Expressar em sistema procarioto e purificar algumas proteínas recombinantes, selecionadas pelas análises *in silico*, como candidatas para diagnóstico da esquistossomose e de controle de cura pós-tratamento.
- 5 - Avaliar a reatividade do soro de camundongos e indivíduos infectados, infectados e tratados e não infectados frente aos antígenos selecionados.
- 6 - Avaliar a existência de reconhecimento cruzado dos antígenos selecionados por soro de camundongos e indivíduos infectados com outros helmintos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico*

4.1.1 Estratégia para escolha dos programas utilizados

Para realização deste trabalho, foram utilizadas ferramentas de bioinformática para analisar e gerenciar dados do proteoma do parasito. A predição computacional foi realizada utilizando banco de dados e diversos algoritmos disponíveis de código livre que foram instalados localmente.

A escolha dos programas utilizados, para predição das proteínas, baseou-se primeiramente na disponibilidade para serem instalados e executados em um servidor local do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), o que permitiu analisar um número muito maior de sequências e de forma automatizada. O segundo critério abordou as características necessárias para que uma proteína possa ser considerada uma potencial candidata para o diagnóstico da esquistossomose. Os três proteomas e os programas utilizados foram: *S. mansoni*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, Sigclaeve, TargetP 1.1, SignalP 4.0, BLAST-*Basic Local Alignment Search Tool*/NCBI, BepiPred 1.0, BCPREDS: B-cell epitope prediction, TMHMM v. 2.0, SherLoc2 - *Predicting Protein Subcellular Localization* e NetMHCII 2.2. Após as predições, os resultados das análises foram armazenados no banco de dados MySQL e gerenciados de forma a responder aos questionamentos determinados.

4.1.2 Banco de dados de Domínio Público

4.1.2.1 SchistoDB 2.0

O banco de dados genômico para o parasita *S. mansoni* - SchistoDB (www.schistodb.net) foi acessado em 02 de abril de 2012, de onde foi obtido o proteoma predito do parasito. Foram obtidas 13.273 sequências, em formato embl e adicionalmente foram obtidas as sequências correspondentes a cada fase de vida do parasito, que também estavam disponíveis nesse banco de dados.

As informações foram armazenadas em formato fasta em um servidor local para realização das predições computacionais.

4.1.2.2 Proteoma predito de *H. sapiens* e *M. musculus*

Adicionalmente foram obtidos do banco de dados do NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>) em 12 de junho de 2012 e instalados no servidor local os proteomas de *H. sapiens* e *M. musculus*, com 32.799 e 28.871 sequências de proteínas, respectivamente.

4.1.3 Preditores utilizados para predição de peptídeo sinal

4.1.3.1 SignalP 4.0

O preditor foi obtido e instalado no servidor em 15 de fevereiro de 2013. O programa SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) permite obter a predição de peptídeos sinais e a localização do sítio de clivagem em sequências de aminoácidos de diferentes micro-organismos: Gram positivos procariotos, Gram-negativos procariotos e eucariotos. As predições são feitas através da combinação de redes neurais artificiais e de modelos ocultos de Markov (Petersen et al., 2004). Foram determinados o formato de saída dos resultados das análises das sequências em apenas uma linha (*short*), método padrão (*best*) onde o preditor decide quais redes neurais darão o melhor resultado, o tipo de organismo no qual o algoritmo do preditor foi treinado, sendo este o eucarioto (-euk) e o ponto de corte padrão de 0,45.

4.1.3.2 Sigcleave

O preditor foi obtido e instalado no servidor local em 17 de abril de 2012. O Sigcleave (<http://emboss.sourceforge.net/apps/release/6.0/emboss/apps/Sigcleave.html>) realiza a predição de sítios de clivagem entre a sequência de peptídeo sinal e a proteína madura que vai ser exportada utilizando o método de von Heijne (1986), que baseia-se no tratamento de posicionamento -1 e -3 de matrizes que são levemente alteradas. O preditor analisa uma ou mais sequências de proteínas e estabelece um relatório EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) padrão com a posição, comprimento e pontuação de cada sequência de peptídeo sinal predita. Para execução do preditor foram mantidos os parâmetros padrões do programa com ponto de corte de 3,5.

4.1.3.3 TargetP 1.1

O TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) foi obtido e instalado no servidor em 16 de abril de 2012. Esse preditor realiza a predição de localização subcelular de proteínas eucariotas, baseando-se na identificação de sequência N-terminal: peptídeo de cloroplasto em trânsito (cTP), peptídeo direcional mitocondrial (mTP) e peptídeo sinal de vias secretórias. O programa utiliza os preditores ChloroP, para predição de sítio de clivagem em cloroplasto e SignalP para sítio de clivagem em proteínas secretadas (Emanuelsson et al., 2000). Foram estabelecidos os parâmetros que determinaram que as sequências inseridas não fossem de plantas e incluiu-se também a predição do sítio de clivagem.

4.1.4 Preditores utilizados para predição de localização celular

4.1.4.1 TMHMM 2.0

Acessado em 17 de abril de 2012, o TMHMM v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) realiza predição de hélices transmembrana de proteínas e discrimina proteínas solúveis de proteínas de membrana. A localização e a orientação de hélices alfa que atravessam a membrana são baseadas em um modelo oculto de Markov (Krogh et al., 2001; Sonnhammer et al., 1998). Para execução do preditor foi utilizado o parâmetro “*short*” para saída dos resultados.

4.1.4.2 SherLoc2 - *Predicting Protein Subcellular Localization*

O programa SherLoc2 (*Applied Bioinformatics Group*) (<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/>) foi obtido e instalado no servidor local em 17 de maio de 2012. O preditor é um dos algoritmos disponíveis para fazer a predição de localização subcelular de proteínas, baseando-se na predição de quatro diferentes sequências classificadoras (peptídeos alvo N-terminal, sinais internos de âncora, composição global de aminoácidos e classificação de sequências-motivo) e de um classificador baseado em texto (Shatkay et al., 2007). Quatro desses classificadores (peptídeos alvo N-terminal, sinais internos de âncora, composição global de aminoácidos e classificação texto) utilizam o classificador de parâmetros SVM (*support*

vector machine) para realizarem suas análises. O SVM é um conceito em estatística e ciência da computação para um conjunto de métodos de aprendizagem que analisam dados e reconhecem padrões usando análises de classificação e regressão (Vapnik, 1998). A classificação de sequências-motivo utiliza uma busca por motivos que produz um vetor de características binárias indicando a presença ou não de 43 sequências-motivo na sequência de consulta. Os dados das quatro sequências classificadoras e da sequência baseada em texto são integrados e analisados por SVM e resultam em uma melhor predição de localização subcelular da proteína. O parâmetro selecionado para predição das sequências foi determinado de acordo com o organismo, sendo o de “animal” o escolhido.

4.1.5 Preditores utilizados para predição de epítomos

4.1.5.1 BepiPred 1.0

O BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) foi obtido e instalado no servidor local em 02 de abril de 2012. O programa realiza a predição localizando epítomos lineares de célula B utilizando uma combinação do modelo oculto de Markov e o método de escala de propensão onde são atribuídos valores para cada aminoácido de acordo com características pré-definidas (Larsen et al., 2006). Para cada sequência de entrada é gerada uma predição com um score e anotação para cada resíduo. Um resíduo anotado com um "E" é predito como sendo parte de um epítomo linear de células B (score acima do ponto de corte), e um resíduo anotado com um "." representa um resíduo predito por não ser parte de um epítomo (score abaixo do ponto de corte). A relação entre a sensibilidade e a especificidade é baseada em um cálculo de referência que contém cerca de 85 epítomos de células B. O ponto de corte utilizado para predição de epítomos lineares de célula B das sequências de proteínas foi de 0,6 com tamanho de epítomo igual a no mínimo 12 mer.

4.1.5.2 BCPREDS: *B-cell epitope prediction server*

O BCPREDS (ailab.cs.iastate.edu/bcpreds) foi instalado localmente e executado em uma interface Java em 10 de abril de 2012. O preditor permite ao usuário escolher o método para predizer epítomos lineares de célula B: BCPred e AAP12 onde o

comprimento dos epítomos preditos pode variar de 12 a 22 ou FBCpred onde o tamanho do epítomo predito pode ser inserido pelo usuário. Os métodos utilizam o classificador de parâmetros SVM (*support vector machine*) sendo que o método AAP (*Amino acid pair*) difere-se do BCPred por usar uma escala de antigenicidade com epítomos lineares de célula B em pares obtidos por decomposição contínua associada ao parâmetro SVM (Chen et al., 2007). Para realizar a predição, foram utilizados os métodos BCPred12 e AAP12 onde foi utilizado o parâmetro de tamanho de epítomo igual a 12 mer para ambos com ponto de corte de 0,75.

4.1.5.3 NetMHCII 2.2

O NetMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) foi executado em 11 de abril de 2012. O programa realiza a predição da ligação de peptídeos de células T com MHC de classe II para os genes HLA-DR e MHC de classe II de camundongos, utilizando redes neurais artificiais. As predições podem ser obtidas para 14 alelos do gene HLA-DR (DRB1_0101, DRB1_0301, DRB1_0401, DRB1_0404, DRB1_0405, DRB1_0701, DRB1_0802, DRB1_0901, DRB1_1101, DRB1_1302, DRB1_1501, DRB3_0101, DRB4_0101 e DRB5_0101), e também três alelos de classe II de camundongos do gene H-2 IA (H2-IAb, H2-IAd e H2-IAs) (Nielsen Morten and Ole Lund, 2009). Foram utilizados os parâmetros padrões do preditor e todos os alelos de humanos e de camundongos foram analisados com tamanho de epítomo igual a 15 mer.

4.1.6 BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool/NCBI*

A ferramenta utilizada para comparar a similaridade das proteínas do parasito *S. mansoni* com as proteínas de humanos e camundongos foi o programa de busca por similaridade de sequências denominado BLAST (*Basic Local Alingment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O BLAST é uma marca registrada da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América e é um algoritmo otimizado para fazer alinhamentos locais entre sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, procurando o maior grau de identidade ou similaridade respectivamente, entre a sequência em estudo e sequências depositadas em um determinado banco de dados (AltschuP et al., 1990). Os resultados dos alinhamentos gerados pelo BLAST são avaliados por dois valores de resposta: o “*Escore*” e o “*E-value*” (valor esperado). O

“*Score*” é um número constituído pela soma dos pesos atribuídos ao pareamento entre aminoácidos idênticos (maior peso), similares (peso intermediário) e diferentes (peso negativo). Logo, quanto maior o “*Score*”, maior a similaridade entre as sequências. Na versão atualizada do BLAST ainda considera-se na contabilização do “*Score*” a presença de “*gaps*”, que são espaços introduzidos no alinhamento para compensar inserções e deleções de uma sequência relativa a outra. O “*E-value*” é um valor calculado a partir do “*Score*”, que fornece a noção de qual é a chance de se encontrar um “*Score*” maior ou igual ao do alinhamento considerado dentro do banco de dados pesquisado ao acaso. Desta forma pode-se verificar que quanto maior o “*Score*” menor o “*E-value*”.

O programa utilizado foi BLASTP (comparação entre sequências de proteínas), com valor de corte de *E-value* de 10^{-6} .

4.1.7 Estratégia de seleção de proteínas candidatas para o diagnóstico da esquistossomose

A estratégia utilizada por nosso grupo está desenhada na próxima figura (Figura 2). Primeiramente foram selecionadas as proteínas que possuíam peptídeo sinal utilizando três preditores: Sigcleave ou TargetP ou SignalP. As proteínas resultantes da união desses três preditores foram avaliadas quanto à similaridade com proteínas humanas e de camundongos considerando o score mais alto do resultado. As proteínas que possuíam mais de 60% de similaridade foram excluídas. Após a realização dessas duas análises (peptídeo sinal e análise de similaridade), os resultados foram avaliados quanto à predição de presença de epítopo linear de célula B utilizando três preditores: BepiPred, BCPred12 e AAP12, onde foram considerados epítopos aqueles que apresentaram scores maiores que um. As proteínas que possuíam epítopos B lineares preditos comuns a esses três preditores foram selecionadas. Posteriormente, frente aos resultados dessas três análises (peptídeo sinal, análise de similaridade e epítopo linear de célula B), foram selecionadas apenas proteínas comuns que foram preditas com localização favorável (domínio transmembrana, extracelular e secretada) utilizando dois preditores: TMHMM e Sherloc2. Com os resultados desse conjunto de análises (presença de peptídeo sinal, baixa similaridade com proteínas humanas e de camundongos, presença de epítopos lineares de célula B e localização favorável) foram selecionadas as proteínas que possuíam epítopos de célula T preditos para ligarem em

17, 16, 15, 14 ou 13 alelos de MHC classe II utilizando o preditor NetMHCII. Os estágios de vida do parasito presentes no hospedeiro definitivo foram definidos de acordo com o objetivo da escolha da proteína. Primeiramente foram selecionadas proteínas comuns aos estágios de esquistossomulo (ES), esquistossomulo pulmonar (EP), verme adulto (VA) e ovo (OV). Outra análise foi realizada selecionando apenas proteínas presentes nos três estágios: esquistossomulo (ES), esquistossomulo pulmonar (EP) e verme adulto (VA) para selecionar proteínas para serem utilizadas no controle de cura da doença após tratamento quimioterápico, uma vez que após o tratamento, o parasito é eliminado e o ovo persiste por um tempo maior, o que poderia estimular resposta imunológica.

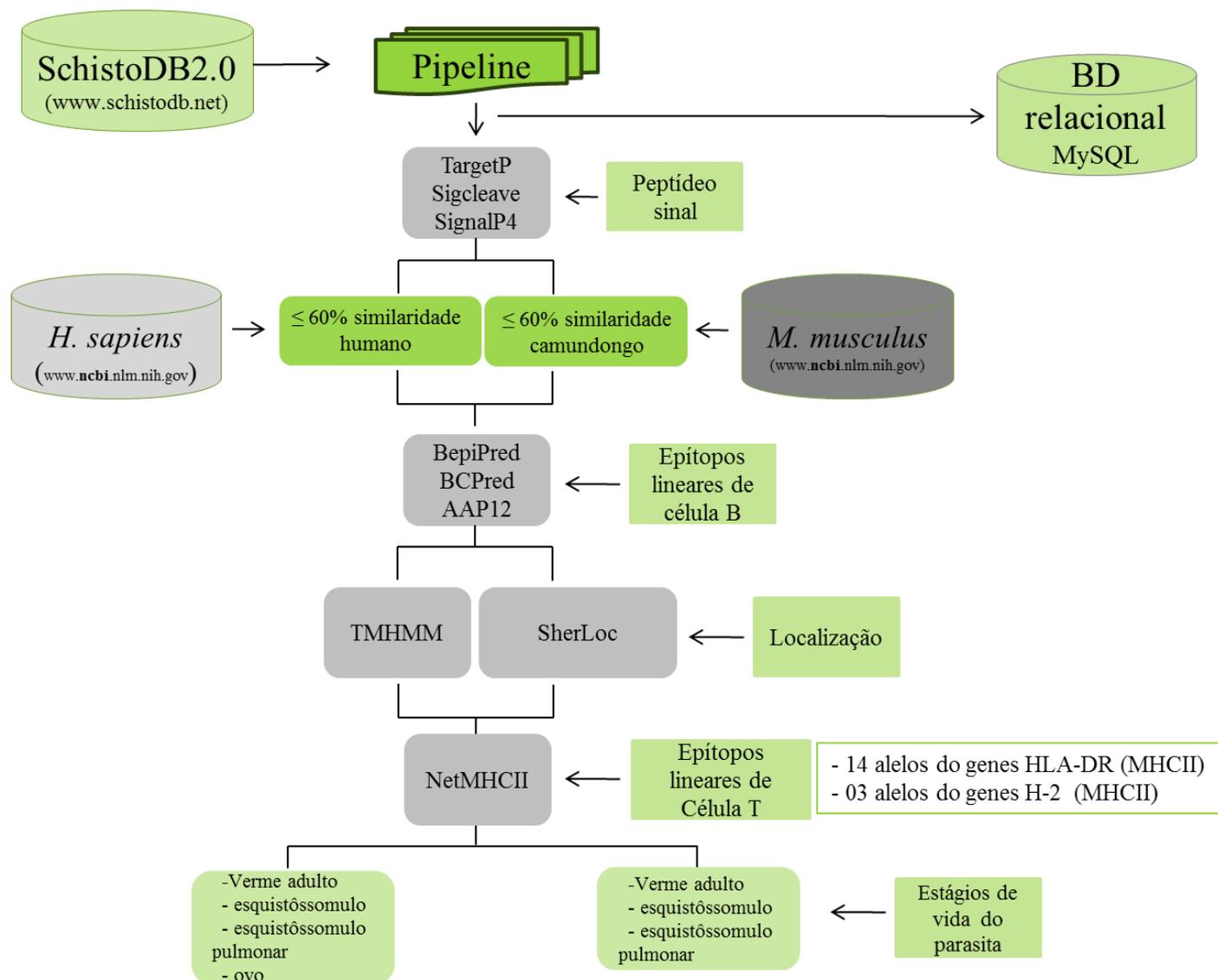


Figura 2 - Workflow com delineamento da estratégia de seleção *in silico* de proteínas candidatas potenciais para o diagnóstico da esquistosomose mansoni

4.1.8 Integração dos resultados obtidos através de banco de dados relacional

O MySQL, que é um sistema de gerenciamento de banco de dados (SGBD), que utiliza a linguagem SQL (*Structured Query Language*) e como *front-end* o MySQL *Workbench* (*software*) foi utilizado em nosso estudo. Com essa ferramenta foi possível

coletar, processar, organizar e armazenar todos os dados, facilitando acessos diferenciados dependendo da estratégia utilizada. O banco de dados foi construído e modelado de forma a possibilitar as buscas específicas necessárias para extração da informação biológica de interesse.

4.1.9 Seleção de epítomos lineares de célula B para serem sintetizados

Devido à quantidade de proteínas selecionadas e diante da inviabilidade de expressar todas elas, nosso grupo selecionou epítomos lineares de célula B das proteínas selecionadas, segundo o estágio de vida do parasito no hospedeiro definitivo (ES, EP, VA, OV) ou (ES, EP, VA) e com predição de se ligarem a um maior número de alelos, para serem sintetizados e validar a estratégia de seleção *in silico* utilizada.

Esses epítomos foram selecionados baseando-se na predição *in silico* dos programas AAP12 (escore=1), BCPred12 (escore=1) e BepiPred (escore \geq 1,5), que foram descritos por Resende et al (2012) como tendo o melhor desempenho para predição de epítomos em proteínas de protozoários parasitas. Primeiramente foi realizada uma busca por epítomos lineares de células B preditos pelos três programas simultaneamente. Frente ao resultado dessa análise, caso nenhum epítomo fosse encontrado, uma segunda busca foi realizada utilizando apenas os programas AAP12 e BepiPred com os mesmos escores utilizados anteriormente. Ainda, caso nenhum epítomo fosse encontrado, os escores foram alterados para 0,9 (AAP12) e \geq 1 (BepiPred). Também foi verificado se esses epítomos lineares de célula B preditos estavam em regiões de peptídeo sinal, região transmembrana e se possuíam semelhança com proteínas de humanos. Aqueles que apresentaram uma dessas características foram eliminados da seleção.

Com os parâmetros citados acima, para cada proteína selecionada, vários epítomos lineares de células B foram encontrados. Novamente, devido à inviabilidade financeira de sintetizar todos eles, utilizamos outro parâmetro para escolher quais peptídeos seriam sintetizados. Para isso, submetemos os peptídeos à predição de regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs) e posteriormente avaliamos novamente a predição de epítomos lineares de célula B com o programa BCPred12 com um escore mínimo de 0,75; na mesma região das predições encontradas anteriormente pelos preditores AAP12 e BepiPred.

Para realização da predição de regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs), foi utilizado o *pipeline* de análise computacional desenvolvido por Ruy et al (2014). Nesse *pipeline* foram empregadas seis metodologias de predição de desordem: DisEMBL, que implementa três metodologias – Coils, Remark465 e Hot Loops, (Linding et al., 2003a), GlobPipe (Linding et al., 2003b), IUPred (Dosztányi et al., 2005) e VSL2B (Peng et al., 2006).

Para cada proteína selecionada, apenas um epítipo linear de células B foi escolhido para ser sintetizado. O peptídeo Smp_136560(1564-1578) foi sintetizado pela colaboradora Dra. Débora de Oliveira Lopes, da Universidade Federal de São João Del Rei - MG (UFSJ). Para isso, foi utilizado o sintetizador PS3TM (Protein Technologies, Inc), por meio da síntese química em fase sólida (Merrifield, R. B, 1963), utilizando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila) (Caprino e Han, 1972). Para a clivagem do peptídeo da resina e desproteção das cadeias laterais foram utilizadas duas diferentes soluções de clivagem de acordo com os aminoácidos e grupos protetores que compõem o peptídeo (Chan and White, 2000). A purificação do peptídeo foi realizada através da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo utilizado um cromatógrafo Shimadzu Prominence. Os outros seis peptídeos foram sintetizados pela empresa FastBio (<http://www.fastbio.com.br/>).

Todos os peptídeos sintetizados foram ressuspensos em DMSO (sulfato de dimetilo) na concentração de 1µg/µL, aliquotados e armazenados em freezer -70°C.

4.2 Obtenção de soro de camundongos e de humanos

Uma vez que as proteínas e os epítipos de células B foram selecionados, experimentos para obtenção de soro de camundongos e de humanos foram realizados para serem utilizados em ensaios de ELISA e *Western blot*.

4.2.1 Obtenção de soro de camundongos suíços infectados com *S. mansoni*

Camundongos suíços provenientes do biotério de produção do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) foram divididos em dois grupos (G1 e G2). O grupo 1 (G1) foi composto de 50 camundongos e o grupo 2 (G2) de 80 camundongos, devido ao maior tempo de infecção e maior probabilidade de morte dos animais. Todos os camundongos foram infectados individualmente, por via subcutânea, com

aproximadamente 25 cercárias da cepa LE. Antes da infecção, amostras de sangue de ambos os grupos foram coletadas, pelo plexo retro-orbital, para obtenção de soro negativo (NEG). No grupo 1, o sangue foi coletado nos tempos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 140 dias após infecção (INF ou *S. mansoni*). No grupo 2 o sangue foi coletado 90 e 119 dias após infecção. No dia 120 após infecção, os camundongos foram pesados e tratados com oxaminiquina (OXA) em dose única de 400mg/kg, por gavagem, sendo o peso dos animais considerado individualmente. Foi realizada coleta de sangue desses animais nos tempos 30, 60 e 90 dias após tratamento (PT), ou seja, 150, 180 e 210 dias após infecção (Figura 3). O sangue coletado foi incubado por 3 horas à temperatura ambiente e centrifugados à 20817g por 5 minutos. Os soros obtidos foram armazenados em microtubos identificados e congelados à -20°C até sua utilização. No fim do experimento, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para perfusão do sistema porta. A perfusão dos camundongos foi realizada individualmente, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Os parasitos foram coletados e contados com auxílio de lupa, discriminando-se machos e fêmeas.

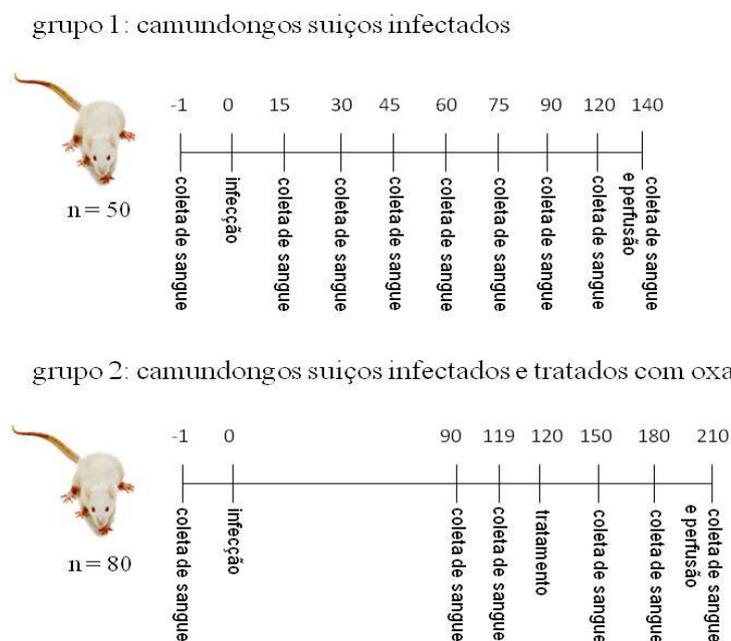


Figura 3 - Protocolo de experimentação de camundongos suíços para infecção, obtenção de soro, tratamento e perfusão

4.2.2 Obtenção de soro de camundongos infectados com outros helmintos

Adicionalmente, soro de 10 camundongos BALB/c e 8 camundongos C57BL/6, provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), infectados com outros helmintos, foram utilizados nos experimentos.

Vermes adultos dos parasitos *Ascaris suum* foram coletados de suínos abatidos em um matadouro de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil), mantidos em água e levados ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitas na Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos BALB/c foram infectados com 2500 ovos de *Ascaris suum*, embrionados por aproximadamente 100 dias em cultura de H₂SO₄ 0.2M, por via oral, com o auxílio de uma agulha de gavagem.

Já os camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 larvas L3 de *Ancylostoma ceylanicum* também por via oral com o auxílio de uma agulha de gavagem. Para manutenção da cepa de *A. ceylanicum* foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas ou machos, de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Os animais foram submetidos previamente ao tratamento oral com 4mg/kg de ivermectina (Chemitec Agro, Brasil) por sete dias consecutivos (Klement et al., 1996). Larvas de terceiro estágio (L3) de *A. ceylanicum* foram isoladas 28 dias após inóculo que foi realizado por via oral com 50 larvas. Resumidamente, após contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) pela técnica de McMaster (Gordon & Whitlock, 1939), as fezes foram misturadas em vermiculita e levadas à coprocultura. Esta foi realizada sob incubação a 26°C durante sete dias, quando então, foi realizada a técnica de Baermann Moraes modificado (Barçante et al., 2003) para recuperação das larvas infectantes.

4.2.3 Obtenção de soro de humanos

Para os ensaios de ELISA com as proteínas recombinantes foram utilizados soro de quarenta indivíduos (feminino/masculino: 18/22) provenientes de uma área endêmica de baixa intensidade de infecção para *S. mansoni* (Pedra Preta, Minas Gerais, Brasil). Para proteína recombinante Sm200(1069-1520) foram utilizados 15 soros de doadores saudáveis (HD) (feminino/masculino: 08/07) e para proteína recombinante SmVal7, 20

soros de doadores saudáveis (HD) (feminino/masculino: 09/11), ambos não residentes em áreas endêmicas para esquistossomose.

Amostras de fezes de cada indivíduo residente em área endêmica foram avaliadas por Kato-Katz e TF-Teste® para verificar o estado da infecção. Um total de 18 lâminas de 4 amostras de fezes (12 lâminas – 1ª amostra e 2 lâminas da 2ª à 4ª amostra) de cada indivíduo foram avaliadas por Kato-Katz e três amostras de 500g de fezes também foram avaliadas por TF-Teste®. Os indivíduos infectados (INF) (feminino/masculino: 10/10) apresentaram exame de fezes positivo para um dos testes realizados com carga parasitária variando de 1 a 36 OPG (ovos por grama de fezes). Indivíduos negativos de área endêmica (NEG) (feminino/masculino: 8/12) apresentaram resultados negativos em ambos os testes. Os indivíduos positivos foram tratados com uma dose oral única de praziquantel (50mg/kg para adultos) conforme recomendação do Ministério da Saúde.

Adicionalmente, para os ensaios de ELISA com os peptídeos sintéticos foram utilizados soro de cinquenta e um indivíduos de área endêmica, sendo 26 indivíduos infectados (INF) (feminino/masculino: 13/13) e 25 indivíduos negativos (NEG) (feminino/masculino: 7/18). Também foram utilizados 13 soros de doadores saudáveis (feminino/masculino: 06/07) (HD), todos com a mesma procedência citada acima.

Entretanto, em relação aos soros de indivíduos de área endêmica, utilizados para os ensaios de ELISA com os peptídeos sintéticos, as amostras de fezes correspondentes a esses soros, também foram analisadas por PCR-ELISA conforme descrito por Siqueira et al, (2015), sendo mais um critério para discriminar indivíduos infectados e não infectados. O ensaio de PCR-ELISA foi realizado com 500mg de fezes da primeira amostra e para a extração de DNA dessa amostra de fezes, utilizou-se um kit comercial QIAamp DNA Fezes Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com recomendações do fabricante e seguindo os protocolos, tal como descrito por Gomes et al. (2010).

Também foram utilizado soros de indivíduos infectados que foram tratados. Esses soros foram coletados 30 e 180 dias após tratamento (INF/DT), sendo 17 soros de indivíduos que foram coletados 30 dias após tratamento e 9 soros de indivíduos que foram coletados 180 dias após tratamento.

4.3 Considerações Éticas

Todos os procedimentos realizados com os animais experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) sob o número de licença LW-25/10 e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 45/2012).

O uso de soro de indivíduos residentes da área endêmica para esquistossomose de Pedra Preta/MG foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz (CEPSH/CPqRR 03/2008) e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (784/2008, CONEP14886). O uso de soro de doadores saudáveis foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz (CEPSH/CPqRR 03/2008: 105/2004-OF.215-TEC) e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (784/2008, CONEP14886). Antes da realização da coleta de sangue, todos os doadores foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um termo de consentimento.

4.4 Peptídeos sintéticos

4.4.1 ELISA - Peptídeos sintéticos

Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de fundo chato (maxisorp NUNC®), utilizando-se os peptídeos sintéticos frente a soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT).

Para padronização dos ensaios de ELISA com soro de indivíduos foram utilizados 1µg/mL ou 2µg/mL dos peptídeos sintéticos, diluições de *pool* de soro iniciando-se em 1:20 até 1:1280 e conjugado anti-IgG humano-HRP 1:60000.

Após a padronização, as placas foram sensibilizadas com 100µL/poço de tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6 contendo o antígeno na concentração 1 ou 2µg/mL (Tabela 1) e incubadas por aproximadamente 16 horas à 4°C. Para remover as proteínas não ligadas, as placas foram lavadas 3X com PBS 150mM contendo 0.05% de Tween 20 (PBSTween) e bloqueadas com PBS tween₂₀ + 10% de soro fetal bovino por 2 horas à 37°C. Os soros de indivíduos foram diluídos 1:40 [Smp_126160(438-452) e

Smp_180240(339-353)]; 1:80 [(Smp_136550(1564-1578) e Smp_141860(1694-1709)]; 1:160 [(Smp_093840(219-233) e Smp_167240(213-228)] e 1:320 [(Smp_150390.1(216-230)] por 2 horas à 37°C e posteriormente lavadas três vezes com PBSTween. Como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo anti-IgG de humano conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição 1:60000, por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens, a reação foi revelada por 10 minutos com 100µL tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida com 50µL de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica foi então determinada em leitor automático de ELISA (Multiskan - Thermo Scientific), utilizando-se filtro de comprimento de onda de 450nm.

Tabela 1 - Especificações da concentração dos peptídeos sintéticos e diluição dos soros de indivíduos utilizados nos ensaios de ELISA

Peptídeo sintético (posição inicial e final)	Concentração (µg/mL)	Diluição do soro de indivíduos
Smp_136560 (1564-1578)	1	1:80
Smp_141860 (1694-1709)	2	1:80
Smp_093840(219-233)	2	1:160
Smp_126160(438-452)	1	1:40
Smp_150390.1(216-230)	1	1:320
Smp_167240(213-228)	1	1:160
Smp_180240(495-509)	1	1:40

4.5 Predição de epítomos lineares de célula B para proteína recombinante Sm200(1069-1520)

A predição de epítomos lineares de célula B foi realizada utilizando toda a sequência da proteína Sm200 obtida do Gene Bank – Acesso número: gi501208. O preditor usado foi o BCPREDS: *B-cell epitope prediction Server version 1.0 on line* acessado em agosto de 2012 (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>). O tamanho para o epítomo predito utilizado foi de 22 mer e a especificidade de 75%.

4.6 Obtenção das proteínas recombinantes

4.6.1 Sm200(1069-1520) recombinante

O RNA total foi extraído de vermes adultos do *S. mansoni* e o RNA mensageiro purificado segundo manual do fabricante utilizando-se o kit Qiagen RNeasy (Qiagen). A partir do mRNA foi obtido o DNA complementar (cDNA) através de RT-PCR. De posse do cDNA foi realizado a amplificação do fragmento que codifica uma porção do gene da *Sm200* compreendida entre os nucleotídeos 3224 a 4557. Para a realização da PCR foram utilizados os seguintes iniciadores: 5'-CCGGGATCCGTTATTTACACAGAAGATTTC-3' e 5'CCCGTCTGACTGGTATGCTATCGTTAGTTG-3'. Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit de extração de gel Quiaex II (Qiagen) e clonados no vetor pGEM usando o kit pGEM-T easy (Promega). Posteriormente, a construção foi digerida utilizando as endonucleases de restrição BamHI e Sall (Biolabs) e o inserto subclonado no vetor de expressão bacteriano pET28 (Novagen) nos sítios de clonagem BamHI e Sall. As novas construções foram utilizadas para transformar *Escherichia coli* BL21(DE3) e os clones contendo inserto foram selecionados. A presença do gene e a sua correta inserção no plasmídeo foram confirmadas por sequenciamento.

Para obtenção da Sm200(1069-1520) recombinante, um litro de cultura de *Escherichia coli* contendo a construção foi mantida a 37° C até obtenção, na DO₆₀₀, de absorvância de 0,5 e 0,8. Esta cultura foi então induzida por 4 horas a 37°C com 1mM de IPTG, para expressão da proteína recombinante Sm200(1069-1520). Após este período, as células provenientes de 1 litro de cultura foram centrifugadas à 4000g e ressuspensas em 50mL de solução de lise (12,5mM Na₂HPO₄, 12,5mM de NaH₂PO₄, 0,5M NaCl, 40mM imidazol). Estas células foram lisadas por três ciclos de sonicação (pulsos de 30 segundos cada) a uma amplitude de 30% e centrifugadas novamente por 20 minutos, 4°C, à 4000g. A Sm200(1069-1520) recombinante foi recuperada como corpos de inclusão que foram ressuspensos em 50mL de tampão de lise com ureia (8M ureia). Em seguida, a purificação foi feita em coluna de níquel através de cromatógrafo FPLC (fast protein liquid chromatography) multidimensional ÄKTA Prime® (GE Healthcare), em condições desnaturantes. A renaturação foi realizada por diálise contra 10 litros de tampão PBS, utilizando membrana porosa de 3kDa (Spectrum Medical

Industries). A proteína recombinante purificada foi dosada pelo método de Bradford (1976).

4.6.2 SmVal7 recombinante

Os clones em meio STAB de bactérias BL21 DE3 transformadas com pAE-VAL7 foram cedidos pelo Dr. Leonardo Farias do Instituto Butantã – SP. Estes clones foram plaqueados em meio LB ágar com ampicilina e mantidos em estufa 37°C por 16 horas. Após o crescimento, uma das colônias foi adicionada em 10mL meio LB com ampicilina e incubado em shaker a 30°C sob agitação por 16 horas. No dia posterior, 3mL do pré-inoculo foram adicionados em 300mL de meio LB com antibiótico a 30°C, sob agitação até obtenção, na DO_{600} , de absorbância de 0,5 a 0,8. Esta cultura foi então induzida por 3 horas à 30°C com 1mM de IPTG, para expressão da proteína recombinante SmVal7. Após este período, as células provenientes de 300mL de cultura foram centrifugadas à 4000g por 25 minutos e o pellet ressuscitado em 30mL de tampão salina fosfato contendo 0,015g de lisosima. Estas células foram lisadas por congelamento (-70°C) e descongelamento (37°C) por 3x e submetidas a 3 ciclos de sonicação (pulsos de 30 segundos cada) a uma amplitude de 30%. Após a lise, foram centrifugadas novamente por 20 minutos, 4°C, à 4000g. A SmVal7 recombinante foi recuperada como corpos de inclusão que foram lavados por 2 vezes com 20mL de tampão de lise (10mM Na_2HPO_4 , 10mM NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, 10mM imidazol) acrescentado de triton (2%) e ureia (2M) e posteriormente uma vez com apenas tampão de lise, sendo centrifugados a 4000g, 20min, 4°C, após cada lavagem. Após a lavagem dos corpúsculos de inclusão, foram ressuscitadas em 20mL de tampão de lise com 6M guanidina. A rSmVal7 foi purificada por cromatografia de afinidade, em coluna de níquel (GE, Healthcare), sob condições desnaturantes, utilizando o equipamento AKTA (GE, Healthcare). Após purificação, a proteína foi dialisada contra solução de tampão PBS a 4°C, overnight, para sua renaturação. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 2% de SDS em um menor volume possível. Para a confirmação da expressão da proteína, um gel de poliacrilamida a 15% foi realizado e corado por coomassie blue.

A proteína recombinante foi dosada utilizando um biofotômetro (BioRad). Em uma cubeta adicionou-se 50µL da proteína e o equipamento foi ajustado para dosagem de proteína - 280nm. Os cálculos para determinar a dosagem foram feitos baseando-se no valor de absorbância que corresponde a 1µg/µL de proteína e o coeficiente de

extinção molar. Esses valores foram preditos pelo *ProtParam do ExpPASy - ProtParam tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>) acessado em 27 de agosto de 2013, onde foi inserida a sequência da proteína e o valor de absorvância e o coeficiente de extinção molar foram então calculados. Com esses valores, faz-se uma regra de três simples baseando-se na informação que 1µg/µL da proteína corresponde ao valor de absorvância e o coeficiente de extinção corresponde ao valor da dosagem requerida.

4.7 Western blot Sm200(1069-1520)

A proteína Sm200(1069-1520) recombinante e os padrões de peso molecular (PAGERuler prestained protein ladder - Thermo Scientific e Broad range protein marker - BioRad) foram separados em dois géis desnaturante de poliacrilamida de 10% e 12% por eletroforese (Laemmli, 1970). A partir de cada gel, as proteínas foram transferidas separadamente para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) como previamente descrito (Towbin et al., 1979). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado à 4°C por 16 horas. Uma das membranas foi incubada com anticorpo anti-his (GE) na diluição de 1:2000 por uma hora, temperatura ambiente. A outra membrana foi incubada com *pool* de soro de diferentes camundongos suíços com 15, 30, 45 e 90 dias pós-infecção, na diluição 1:20 durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a reação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBST (0.5M NaCl-0.02M Tris [pH 7.5], 0.05 % Tween 20) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:2000 (Sigma Aldrich) ou 1:4000 (Southern Biotech), ambos diluídos em TBST contendo 3% de leite em pó desnatado. Após três lavagens com TBST, as membranas foram reveladas com nitro azul tetrazólio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (BioRad).

4.8 ELISA-rSm200(1069-1520)

O ensaio de ELISA foi primeiramente padronizado utilizando 1, 3 ou 5µg/mL do antígeno recombinante Sm200(1069-1520) incubados com *pool* de soro de camundongos (suíços não infectados - NEG), infectados - *S. mansoni* ou infectados e tratados PT, soro de camundongos BALB/c infectados com *Ascaris suum* e C57BL/6 infectados com *Ancylostoma ceylanicum*) e soro de indivíduos (saudáveis não

moradores de área endêmica para esquistossomose - HD, moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos - NEG, positivos para presença de ovos - INF) em diluição seriada em PBST iniciando-se em 1:10 e terminando em 1:10240. A diluição do conjugado em PBST foi avaliada na diluição de 1:5000 e 1:10000 (anti-mouse IgG-HRP) ou 1:30000 e 1:60000 (anti-human IgG-HP).

Após padronização, o ensaio foi realizado em placas de fundo chato (maxisorp NUNC®) que foram sensibilizadas com 100uL/poço de tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6 contendo o antígeno na concentração 5µg/mL, e incubadas por aproximadamente 16 horas à 4°C. Para remover as proteínas não ligadas, as placas foram lavadas três vezes com PBS 150mM contendo 0.05% de Tween 20 (PBS Tween) e bloqueadas com PBST e 3% de leite em pó desnatado por aproximadamente 16 horas à 4°C. Os soros obtidos de animais foram diluídos 1:40 em PBST e soros de indivíduos foram diluídos 1:100 em PBST. Esses soros foram adicionados (100µL/poço) às placas e incubados por aproximadamente 16 horas à 4°C. Após a lavagem das placas (3X), foi utilizado como anticorpo secundário o anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SouthernBiotec) na diluição 1:10000 em PBST ou anticorpo anti-IgG de humano conjugado à peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição 1:60000 em PBST por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens, a reação foi revelada por 15 minutos com 100µL de substrato líquido 3, 3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB/Sigma). A reação foi interrompida com 50µL de ácido sulfúrico 4N e a densidade ótica foi então determinada em leitor automático de ELISA (BioRad), utilizando-se filtro de comprimento de onda de 450nm.

4.9 ELISA-rSmVal7

O ensaio de ELISA foi realizado em placas de fundo chato (maxisorp NUNC®), utilizando-se o antígeno recombinante SmVal7 frente a soro de camundongos suíços infectados (*S. mansoni*), não infectados (NEG) ou infectados e tratados (PT) e soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG) e positivos para presença de ovos (INF). Para padronização do ensaio de ELISA foram utilizadas concentrações variadas do antígeno, de soro e conjugado.

Para padronização dos ensaios de ELISA com soro de camundongos foram utilizados 1, 3 ou 5µg/mL da proteína recombinante, diluições de *pool* de soro

iniciando-se em 1:20 até 1:20480 e duas diluições de conjugado (1:5000 e 1:10000). As etapas de sensibilização com a proteína recombinante, bloqueio com PBS tween₂₀ + 3% de leite em pó e com soro foram deixadas por 16 horas a 4°C. O conjugado foi incubado por uma hora em temperatura ambiente.

Para padronização dos ensaios de ELISA com soro de indivíduos também foram utilizados 1, 3 ou 5 µg/mL da proteína recombinante, diluições de *pool* de soro iniciando-se em 1:20 até 1:20480 e conjugado 1:30000. As etapas de sensibilização com a proteína recombinante e bloqueio com PBS tween₂₀ + 10% de soro fetal bovino foram incubadas por 16 horas a 4°C. A etapa com *pool* de soro foi incubada por duas horas a temperatura ambiente e o conjugado por uma hora temperatura ambiente.

Após a padronização, as placas foram sensibilizadas com 100 µL/poço de tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6 contendo o antígeno na concentração 1 µg/mL (ensaio com soro de camundongos) ou 3 µg/mL (ensaio com soro de humanos), e incubadas por aproximadamente 16 horas à 4°C. Para remover as proteínas não ligadas, as placas foram lavadas 3X com PBS 150mM contendo 0.05% de Tween 20 (PBSTween) e bloqueadas conforme descrito acima por 16 horas à 4°C.

Os soros obtidos dos animais foram diluídos (1:40) em PBS Tween, adicionados (100 µL/poço) às placas e incubados por 16 horas à 4°C. Após três lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SouthernBiotec) na diluição 1:10000 e incubado por uma hora, em temperatura ambiente. Os soros de indivíduos foram diluídos (1:100) em PBS Tween adicionados (100 µL/poço) às placas e incubados por duas horas, temperatura ambiente. Como anticorpo secundário, após três lavagens, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de humano conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição 1:30000 e incubado por uma hora, em temperatura ambiente. Em ambas as placas, após novas lavagens (3X), a reação foi revelada por 10 minutos com 100 µL de TMB. A reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica foi então determinada em leitor automático de ELISA (BioRad), utilizando-se filtro de comprimento de onda de 450nm.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 4.0 (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's, quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste Mann-Whitney foi empregado quando comparadas somente duas variáveis.

O ponto de corte para discriminação entre os resultados positivos e negativos foi determinado utilizando o *Software* GraphPad Prism 4.0 (San Diego, Ca, USA) através das Curvas de Características de Operação do Receptor (Curvas ROC - *Receiver Operating Characteristic*), utilizando os valores de absorbância dos indivíduos positivos e doadores saudáveis, que permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte.

A correlação entre as absorbâncias nos ensaios de ELISA (Smp_150390.1(216-230), rSm200(1069-1520) e rSmVal7) com a carga parasitária foi analisada usando teste de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 Análises *in silico*

5.1.1 Modelagem do banco de dados

Primeiramente foram estabelecidos padrões de armazenamento utilizando chaves primárias e chaves estrangeiras para criação das tabelas. Em seguida, todas as sequências de proteínas do *S. mansoni* foram submetidas a análises dos preditores e programas estabelecidos. Uma vez que os resultados foram gerados, esses foram inseridos no banco de dados através de parseadores.

A chave primária é formada por um único campo da tabela, que correspondeu ao identificador (id) de cada proteína presente no proteoma do parasito utilizado. Esse campo não pode ter dois ou mais registros de mesmo valor e também não pode conter nenhum registro nulo. Ao criar uma chave primária, cria-se automaticamente um índice que será um referencial para todas as análises feitas no banco.

A chave estrangeira refere-se ao tipo de relacionamento entre tabelas distintas no banco de dados, ou seja, quando há relacionamento entre tabelas. Essa chave sempre aponta para a chave primária, garantindo a integridade dos dados referenciais, uma vez que apenas serão permitidos valores que estão na base de dados. Para cada preditor utilizado foi estabelecida uma tabela com chave estrangeira que está diretamente relacionada à chave primária da tabela proteoma. A representação gráfica do modelo relacional do banco de dados está representada na próxima figura (Figura 4).

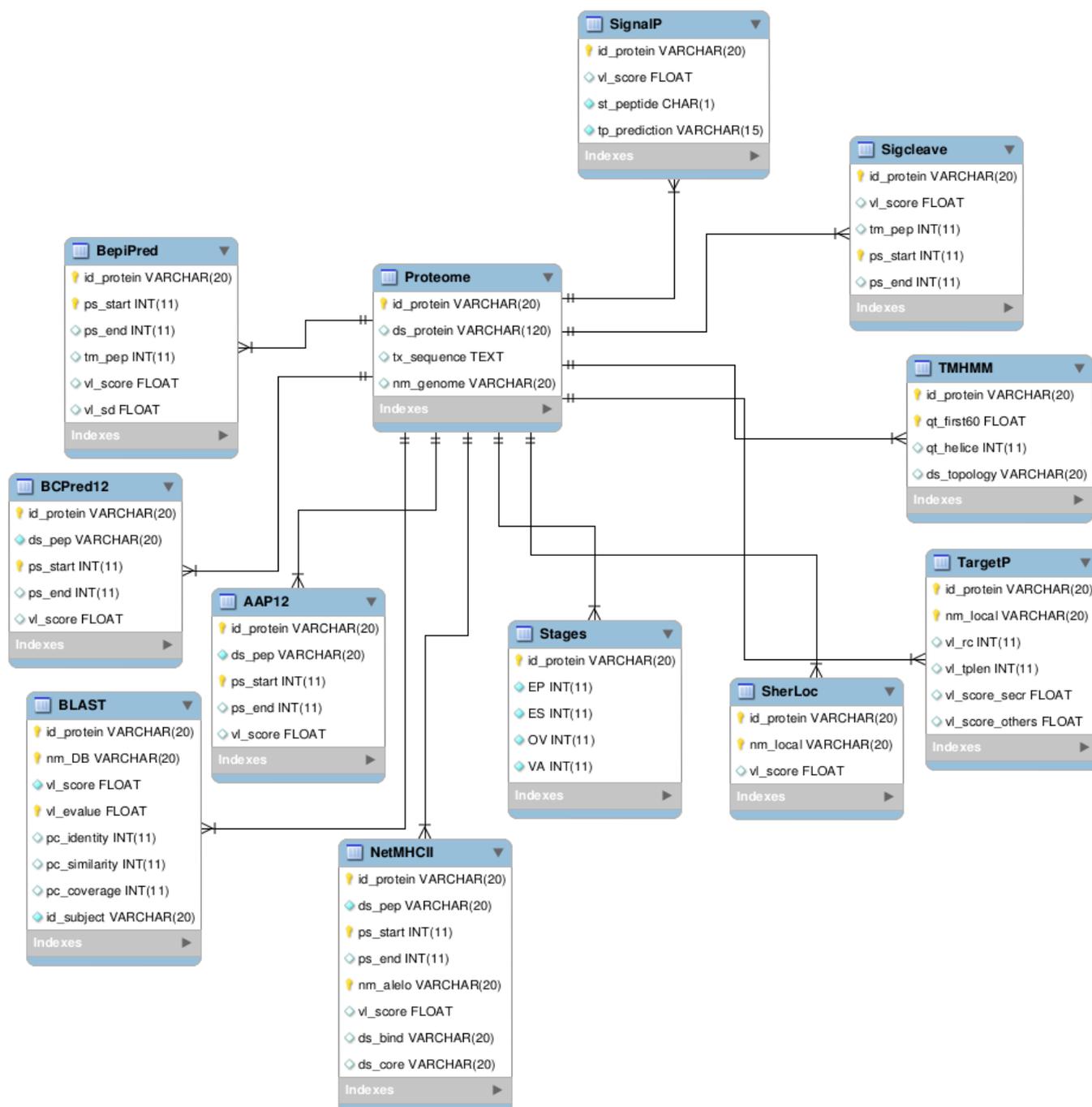


Figura 4 - Diagrama de entidades e relações

Representação gráfica do modelo do Banco de Dados relacional construído para análises das proteínas do *S. mansoni*. Cada tabela representa as análises e parâmetros de cada programa ou preditor utilizado e estão ligadas a uma tabela principal que contém o proteoma do *S. mansoni*.

5.1.2 Proteínas selecionadas

Conforme a estratégia de seleção detalhada anteriormente, foram selecionadas proteínas baseando-se nos critérios estabelecidos. A análise iniciou-se com um número de 13.273 sequências de proteínas. Com o primeiro critério, que foi a predição de peptídeo sinal presente nos resultados de qualquer um dos três preditores, para não restringir a predição inicial, 5.058 sequências foram selecionadas. Posteriormente, foi verificada a similaridade das proteínas do parasito com proteínas humanas e de camundongos, e aquelas que apresentaram menos que 60% de similaridade foram selecionadas, permanecendo então, 4391 proteínas. A predição de presença de epítomos de células B reduziu a seleção para 1.137 proteínas, uma vez que essas sequências deveriam estar presentes nos resultados dos três preditores utilizados. O mesmo critério foi utilizado para predição de localização subcelular, onde as proteínas selecionadas deveriam estar preditas com localização favorável pelos dois preditores de localização. Então, de 1.137 sequências de proteínas selecionadas anteriormente, apenas 392 foram selecionadas. A predição de epítomos de células T iniciou-se com predição para ligação a 17 alelos de MHCII, sendo três de camundongos e 14 de humanos. Com a análise inicial restringindo à predição de ligação a 17 alelos, nenhuma proteína foi encontrada. Com predição de ligação a 16 alelos de MHCII, cinco proteínas foram selecionadas; com predição de ligação a 15 alelos, 72 proteínas foram selecionadas; com 14 alelos, 186 proteínas foram selecionadas e com 13 alelos, 281 proteínas foram selecionadas. O critério seguinte foi predição de expressão no estágio de vida do parasito dentro do hospedeiro definitivo. Primeiramente foram selecionadas as sequências comuns expressas nos estágios de: esquistossômulo (ES), esquistossômulo pulmonar (EP), verme adulto (VA) e ovo (OV). Associando esse critério com as predições anteriores, não foram encontradas proteínas com predição de ligação a 17 alelos de MHC. Com 16 alelos, foram selecionadas duas proteínas; com 15 alelos, oito proteínas; com 14 alelos, 14 proteínas e com 13 alelos, 10 proteínas. O outro critério utilizado baseou-se também na expressão da proteína em diferentes estágios de vida do parasito no hospedeiro definitivo, entretanto, o estágio de ovo foi excluído, com o objetivo de selecionar proteínas que sejam potenciais para o diagnóstico de cura. Com predição de ligação a 17, 16 e 15 alelos de MHCII não foram encontradas proteínas. Com predição de ligação a 14 alelos, foram selecionadas 5 proteínas, e com 13 alelos, apenas uma proteína. Estes resultados estão representados de forma esquemática na próxima figura (Figura 5).

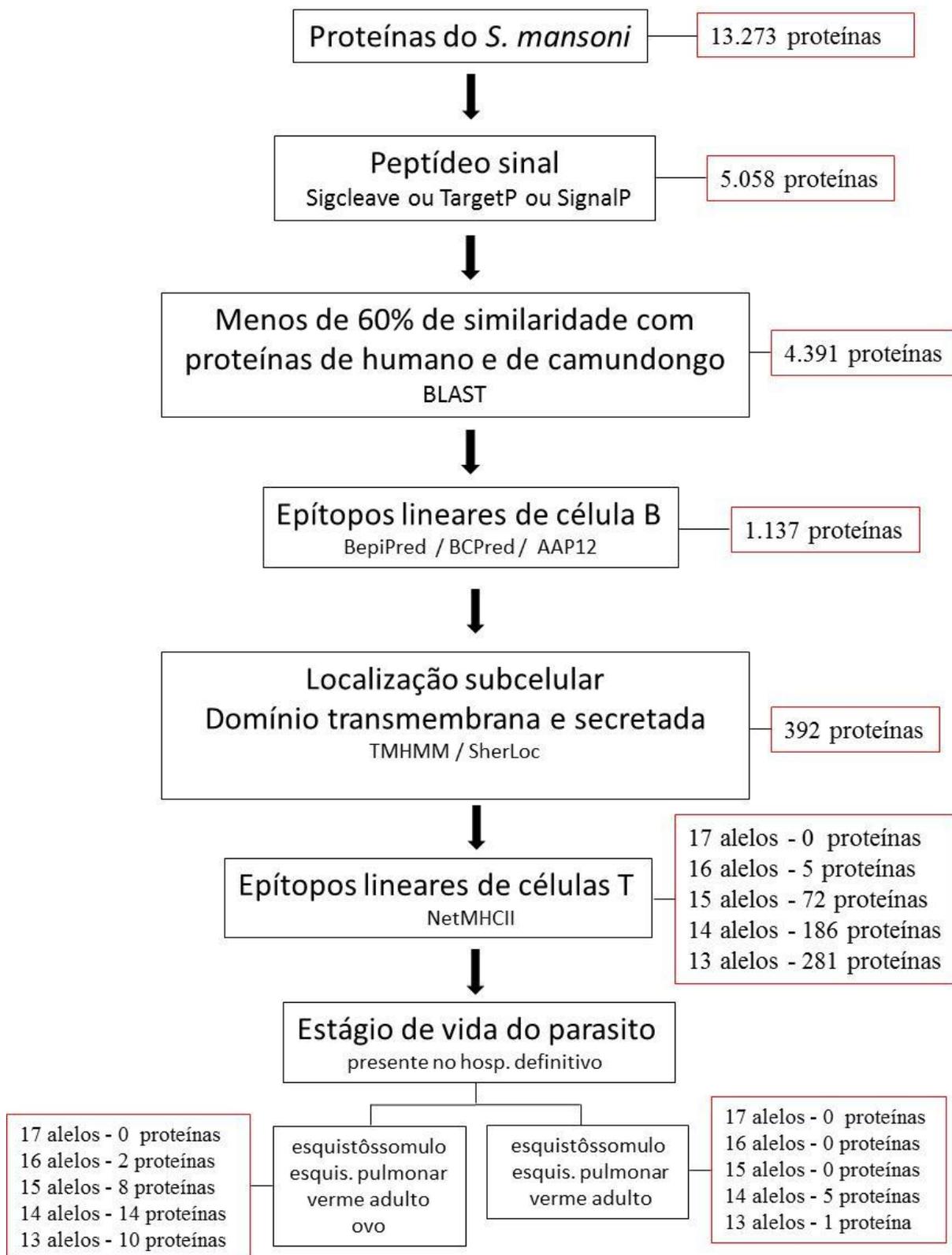


Figura 5 - Workflow com delineamento da estratégia de seleção *in silico* de proteínas candidatas potenciais para o diagnóstico da esquistosomose mansoni com número de sequências selecionadas em cada etapa

As proteínas que atenderam a todos os critérios de seleção e passaram por todas as predições estão listadas nas próximas tabelas (Tabelas 1 e 2) segundo critérios de expressão em diferentes estágios de vida do parasito no hospedeiro definitivo e predição de ligação a diferentes alelos de MHCII.

Tabela 2 - Proteínas de *Schistosoma mansoni* selecionadas *in silico* segundo a estratégia delineada no *workflow*

Estágios - ES, EP, VA, OV	Nome sistemático	Função predita	N° aa	Aldos												N° de aldós					
				DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	H2	IAb	IAD	IAS	1501	1302	1101						
Snrp_136560	expressed protein	expressed protein	1995	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	IAD	IAS	16
Snrp_141860	heat containing protein, putative	heat containing protein, putative	4619	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	0101	0101	0101	IAb	-	IAS	16
Snrp_017730	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	1656	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_035190.2	ras GTP exchange factor, son of sevenless, putative	ras GTP exchange factor, son of sevenless, putative	1568	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_085540.6	myosin heavy chain, putative	myosin heavy chain, putative	1937	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_130040	pecanex-related protein	pecanex-related protein	2223	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_131910	surface protein, putative	surface protein, putative	1680	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_150390.2	expressed protein	expressed protein	847	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_165800	ATP-binding cassette transporter, putative	ATP-binding cassette transporter, putative	2009	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_174960	merlin/moesin/ezrin/radixin, putative	merlin/moesin/ezrin/radixin, putative	1028	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	15
Snrp_005860.3	expressed protein	expressed protein	408	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	14
Snrp_005860.4	expressed protein	expressed protein	408	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	14
Snrp_045360.3	expressed protein	expressed protein	1226	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	14
Snrp_050110	gamma-secretase subunit aph-1, putative	gamma-secretase subunit aph-1, putative	320	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAS	14

Estágios - ES, EP, VA, OV	Nome sistemático	Função predita	Alelos		Nº aa	DRBI	Alelos										Nº de alelos				
			Nº	DRBI			DRB3	DRB4	DRB5	H2	DRB3	DRB4	DRB5	H2							
	Smp_076950.2	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter) putative	696	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_097090.2	expressed protein	686	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_097090.3	expressed protein	686	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_125550	expressed protein	1412	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	-	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_137070.1	expressed protein	550	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_137070.2	expressed protein	659	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_142550	nuclear pore membrane glycoprotein gp210-related	2192	0101	0301	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_145900	adam, putative	862	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	-	14
	Smp_146590.2	expressed protein	1225	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_175360.2	cation-transporting atpase worm, putative	1509	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
	Smp_033760.1	expressed protein	570	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	IAd	-	13
	Smp_034940.1	Protein C10orf118 (CTCL tumor antigen HD-CL-01/L14-2), putative	776	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	13
	Smp_034940.2	Protein C10orf118 (CTCL tumor antigen HD-CL-01/L14-2), putative	784	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	13
	Smp_099150	expressed protein cleavage and	239	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	13
	Smp_140450.1	polyadenylation specificity factor, putative	1061	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	-	1302	1501	0101	0101	0101	IAb	-	IAs	13

Continuação

Nome sistemático	Função predita	Alelos		Alelos										Nº de alelos							
		Nº aa	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	H2	DRB3	DRB4	DRB5	H2	DRB3	DRB4		DRB5	H2					
Smp_141090.1	Protein C10orf118 (CTCL tumor antigen HD-CL-01/L14-2), putative	686	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	0101	IAb	-	IAs	13
Smp_153310.2	ledhal giant larva homologue, putative	919	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	0101	IAb	-	IAs	13
Smp_155570	hypothetical protein pak-interacting	474	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	0101	IAb	-	IAs	13
Smp_173060	exchange factor, beta-pix/cool-1, putative	749	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	0101	IAb	-	IAs	13
Smp_179370	low-density lipoprotein receptor (ldl), putative	836	0101	-	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	0101	IAb	-	IAs	13

Tabela 3 - Proteínas de *Schistosoma mansoni* selecionadas *in silico* segundo a estratégia delineada no workflow

Estágios - ES, EP, VA	Alelos																			
	Nome sistemático	Função predita	Nº aa	DRB1						DRB3	DRB4	DRB5	H2	Nº alelos						
Smp_093840	trispinning orphan receptor; TORE, putative	239	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
Smp_126160	poly(p)/ATP NAD kinase, putative	1077	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
Smp_150390.1	expressed protein	668	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
Smp_167240	expressed protein	776	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	-	14
Smp_180240	f-spondin, putative venom	941	0101	0301	0401	0404	0405	0701	-	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	IAs	14
Smp_070240	allergen-like (VAL) 7 protein	193	0101	-	0401	0404	0405	0701	0802	0901	1101	1302	1501	-	0101	0101	IAb	-	-	13

5.1.3 Epítomos lineares de célula B

Dentre as proteínas identificadas, realizamos predição de epítomos lineares de célula B naquelas proteínas que havia predição de ligação a um maior número de moléculas de MHCII (16 alelos para as proteínas expressas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito no hospedeiro definitivo e 14 alelos para as proteínas que não eram expressas no ovo).

Segundo descrito na metodologia, apenas um epítomo linear de célula B de cada proteína foi sintetizado como peptídeo sintético. Eles estão listados abaixo (Tabela 3).

Tabela 4 - Peptídeos sintetizados após a predição de epítomos lineares de células B e predição de regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs)

Nome sistemático (posição inicial e final)	Sequência	Estágio	Grau de pureza (%)	IDRs (posição inicial e final)	Preditores de IDRs
Smp_136560 (1564-1578)	ITEGNSREGNSEKV	ES, EP, VA e OV	60,1	1501-1658	REM465, GlobPipe e IUPred
Smp_141860 (1694-1709)	NHSMDKDDDDFSDIDK	ES, EP, VA e OV	95,31	1693-1793	REM465, GlobPipe, IUPred e VSL2B
Smp_093840 (219-233)	TTNKDDDTQINSAPS	ES, EP e VA	96,69	182-239	REM465, GlobPipe e IUPred
Smp_126160 (438-452)	LVTPE SKYYSSLPGN	ES, EP e VA	95,97	-	-
Smp_150390.1 (216-230)	SLPSNAHNNDNNSD	ES, EP e VA	95,55	-	-
Smp_167240 (213 -228)	QCCLDTQWNPAGTEYS	ES, EP e VA	97,74	-	-
Smp_180240 (339-353)	RDWPTTLTGAGGSTT	ES, EP e VA	97,67	-	-

5.2 Experimentos com camundongos e humanos

5.2.1 Recuperação de vermes dos camundongos suíços infectados com *S. mansoni*

Os camundongos suíços dos grupos G1 e G2, infectados com aproximadamente 25 cercárias da cepa LE, foram perfundidos individualmente segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956).

O grupo G1, composto de 50 camundongos, nos quais não receberam tratamento, foi perfundido após 140 dias de infecção para confirmar a mesma. Entretanto, apenas 33 animais permaneceram até o tempo de serem perfundidos (Tabela 4).

Tabela 5 - Número de vermes recuperados após perfusão dos camundongos suíços do grupo 1 (G1)

G1			
Camundongo	Nº de vermes fêmea	Nº de vermes macho	Nº total de vermes
1	4	6	10
2	6	6	12
3	4	4	8
4	3	3	6
5	2	2	4
6	4	7	11
7	3	5	8
8	5	6	11
9	2	5	7
10	5	4	9
11	3	5	8
12	3	4	7
13	3	6	9
14	6	5	11
15	4	4	8
16	6	5	11
17	5	4	9
18	4	5	9
19	4	4	8
20	5	6	11
21	5	4	9
22	4	5	9
23	5	5	10
24	2	6	8
25	8	4	12
26	5	3	8
27	4	5	9
28	3	7	10
29	2	8	10
30	8	4	12
31	3	9	12
32	5	4	9
33	4	2	6

Os camundongos do grupo 2 (G2) (80 animais) foram tratados 120 dias após infecção e a perfusão foi realizada 90 dias após o tratamento para confirmar se o mesmo foi eficiente. Após a perfusão dos 29 camundongos que permaneceram vivos, nenhum verme foi encontrado.

5.2.2 Resultado dos exames de fezes dos indivíduos de área endêmica para esquistossomose mansoni

Os soros utilizados nos ensaios de ELISA provenientes de uma área endêmica de baixa intensidade de infecção para *S. mansoni* (Pedra Preta, Minas Gerais, Brasil) foram coletados e discriminados entre negativos e infectados segundo os exames realizados nas fezes coletadas. Amostras de fezes de cada indivíduo foram avaliadas por Kato-Katz, TF-Teste® e posteriormente por PCR-ELISA conforme descrito na metodologia. Na tabela abaixo estão os resultados de cada teste correspondente aos soros de indivíduos positivos utilizados nos ensaios de ELISA com os peptídeos sintéticos (26 soros) e as proteínas recombinantes (20 soros) (Tabela 5). Alguns desses soros foram utilizados tanto para os ensaios de ELISA com os peptídios sintéticos (soro 10 ao 35), quanto para as proteínas recombinantes (soro 1 ao 20).

Tabela 6 - Resultado dos exames de fezes positivos dos indivíduos de área endêmica de baixa intensidade de infecção para *S. mansoni*

Soros	Kato-katz 2 lâminas	Kato-katz 18 lâminas	TF-teste®	PCR-ELISA
1	negativo	negativo	positivo	positivo
2	negativo	negativo	positivo	negativo
3	negativo	negativo	positivo	negativo
4	negativo	negativo	positivo	negativo
5	positivo	positivo	positivo	positivo
6	negativo	negativo	positivo	negativo
7	negativo	negativo	positivo	negativo
8	negativo	negativo	positivo	negativo
9	positivo	positivo	positivo	negativo
10	positivo	positivo	positivo	positivo
11	negativo	negativo	positivo	negativo
12	negativo	positivo	positivo	positivo
13	negativo	positivo	positivo	positivo
14	positivo	positivo	positivo	positivo
15	negativo	positivo	positivo	negativo
16	positivo	positivo	positivo	positivo
17	positivo	positivo	positivo	negativo
18	negativo	negativo	positivo	negativo
19	negativo	negativo	positivo	positivo
20	negativo	negativo	positivo	positivo
21	positivo	positivo	negativo	negativo
22	positivo	positivo	negativo	negativo
23	negativo	negativo	negativo	positivo
24	positivo	positivo	negativo	negativo
25	positivo	positivo	negativo	negativo
26	positivo	positivo	negativo	positivo
27	positivo	positivo	negativo	positivo
28	negativo	positivo	negativo	positivo
29	negativo	negativo	negativo	positivo
30	positivo	positivo	negativo	negativo
31	negativo	negativo	negativo	positivo
32	negativo	negativo	negativo	positivo
33	negativo	negativo	negativo	positivo
34	negativo	positivo	negativo	positivo
35	positivo	positivo	negativo	positivo

5.3 Peptídeos sintéticos

5.3.1 Ensaios de ELISA

Os peptídeos sintéticos foram utilizados em concentrações de 1 ou 2µg/mL e com varias diluições de soro de indivíduos. Para avaliar o reconhecimento dos peptídeos sintéticos Smp_136560(1564-1578), Smp_141860(1694-1709), Smp_093840(219-233), Smp_126160(438-452), Smp_150390.1(216-230), Smp_167240(213-228) e Smp_180240(495-509) por soros de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT), foram realizados ensaios de ELISA (Figura 6 a 12). Em relação à sensibilidade e especificidade dos peptídeos sintéticos, um ponto de corte foi determinado pelo teste de curva ROC utilizando doadores saudáveis como grupo de não infectado (HD) e os indivíduos infectados (INF) como grupo positivo.

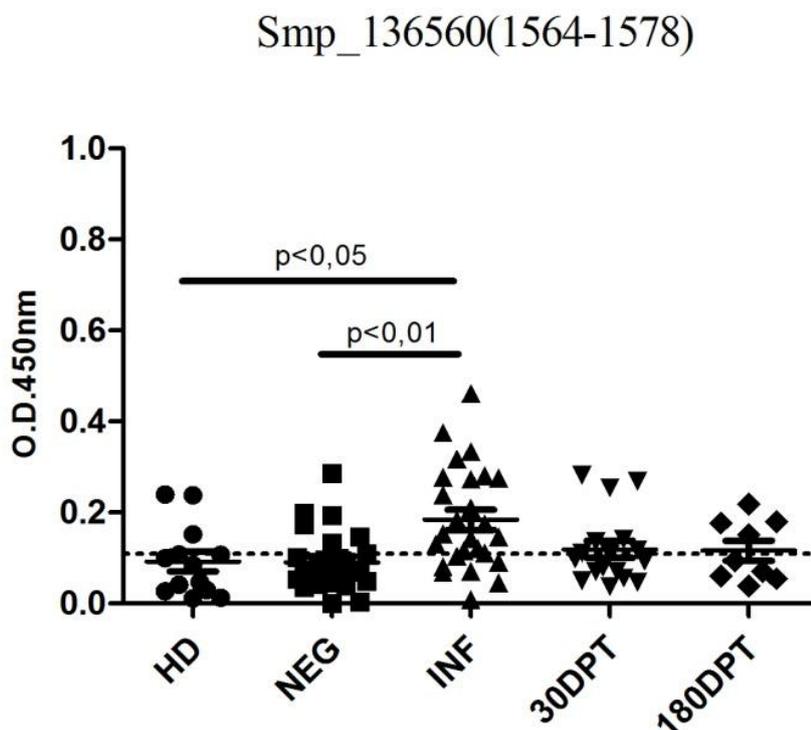


Figura 6 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_136560 (1564-1578) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_136560 (1564-1578) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 1µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB, incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:80 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorbância de 0,1098 que determina uma especificidade de 76,92% e sensibilidade de 73,08%.

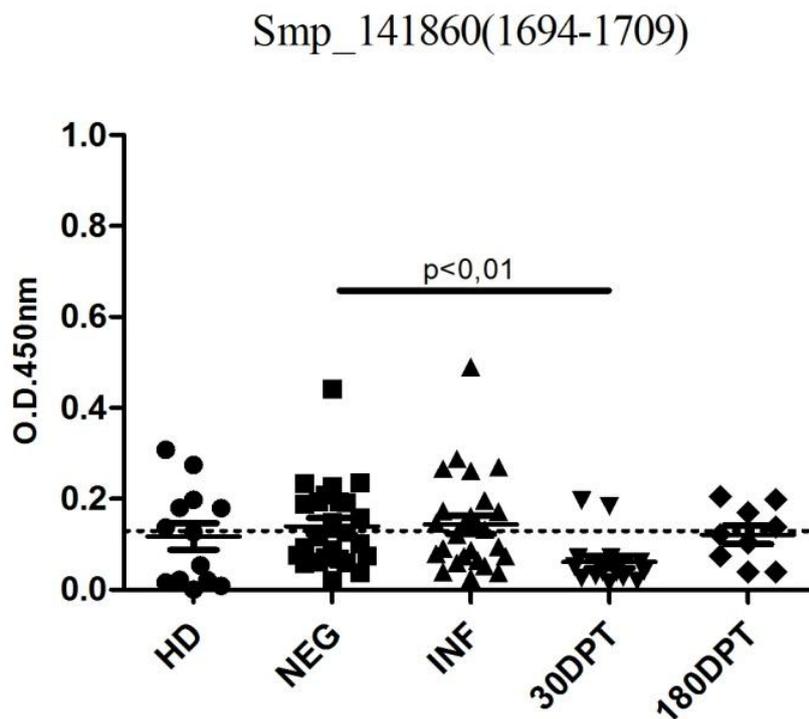


Figura 7 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_141860 (1694-1709) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_141860 (1694-1709) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 2µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB e incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:80 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorbância de 0,1295 que determina uma especificidade de 53,85% e sensibilidade de 50%.

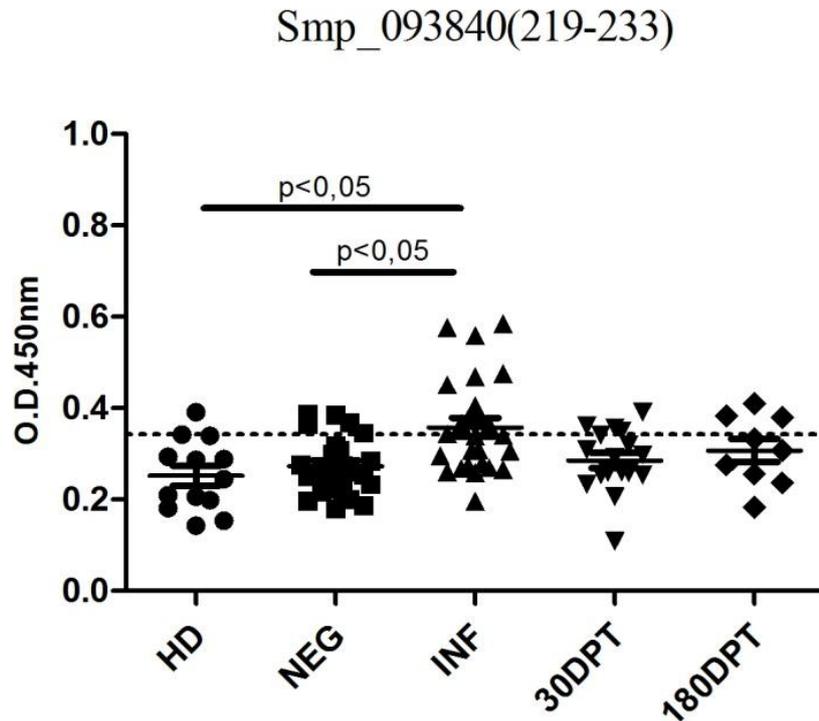


Figura 8 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_093840(219-233) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_093840(219-233) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 2µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB e incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:160 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorbância de 0,343 que determina uma especificidade de 92,31% e sensibilidade de 46,15%.

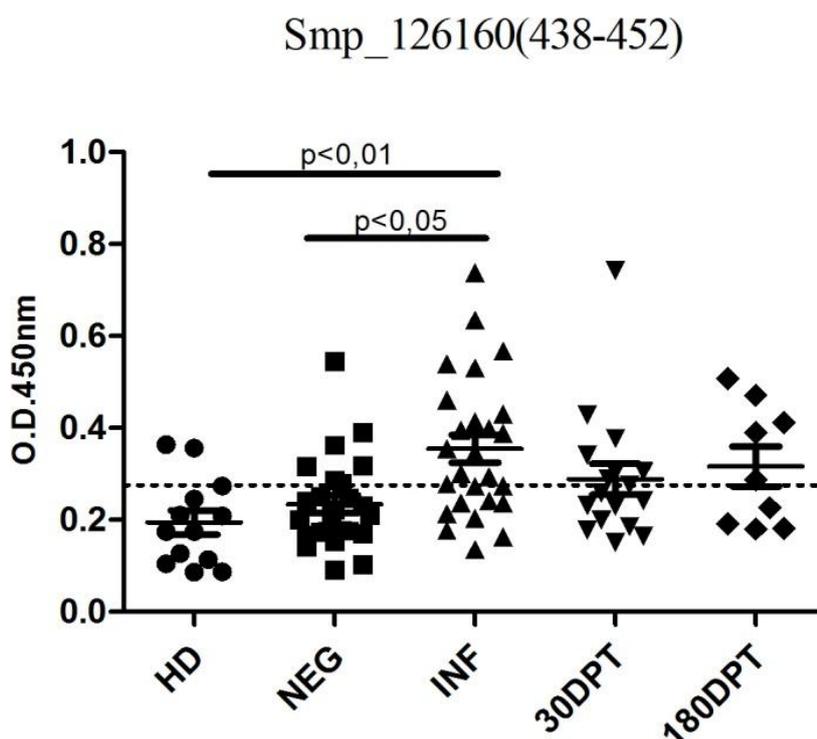


Figura 9 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_126160(438-452) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_126160(438-452) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 1µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB e incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:40 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorbância de 0,2758 que determina uma especificidade de 84,62% e sensibilidade de 61,54%.

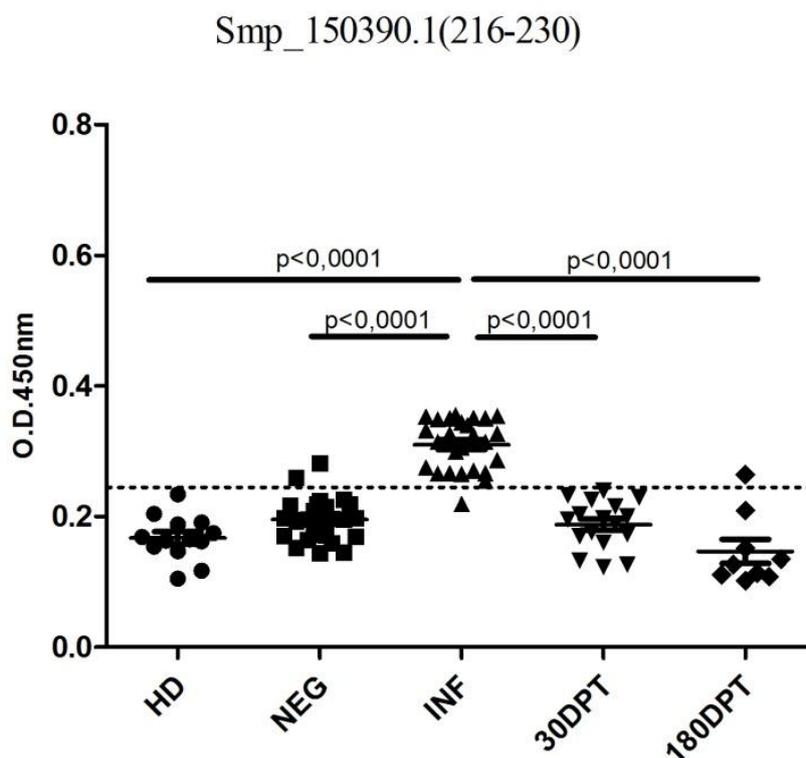


Figura 10 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_150390.1(216-230) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_150390.1(216-230) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 1µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB e incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:320 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorbância de 0,2445 que determina uma especificidade de 100% e sensibilidade de 96,15%.

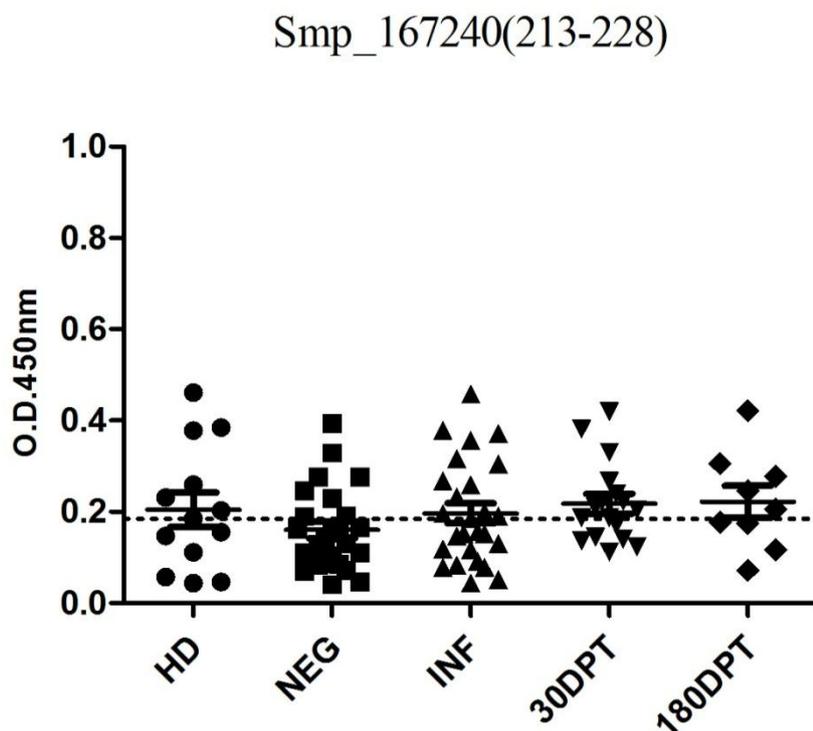


Figura 11 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_167240(213-228) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_167240(213-228) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 1µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB e incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:1600 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorbância de 0,1884 que determina uma especificidade e sensibilidade de 53,85%.

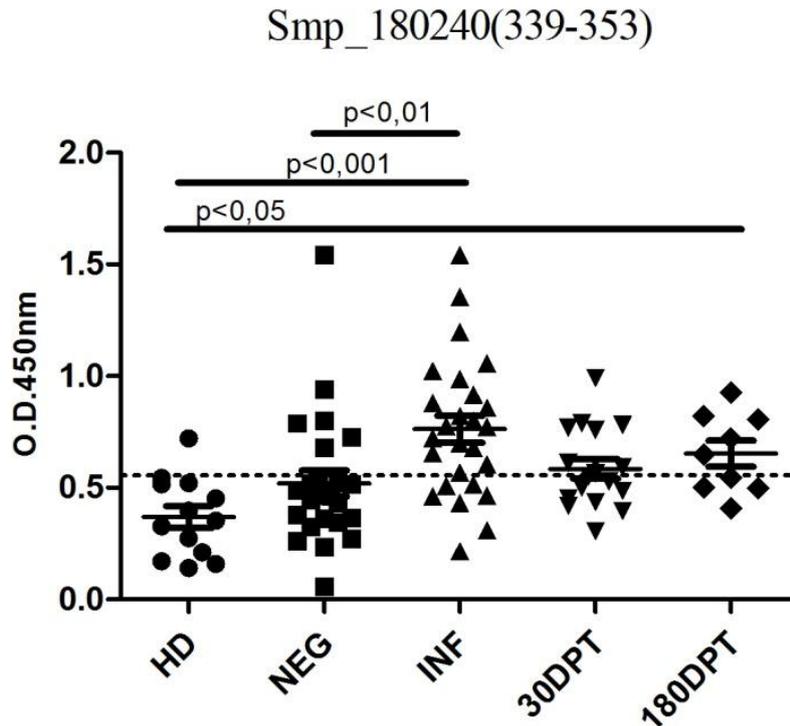


Figura 12 - Níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_180240(495-509) em soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose

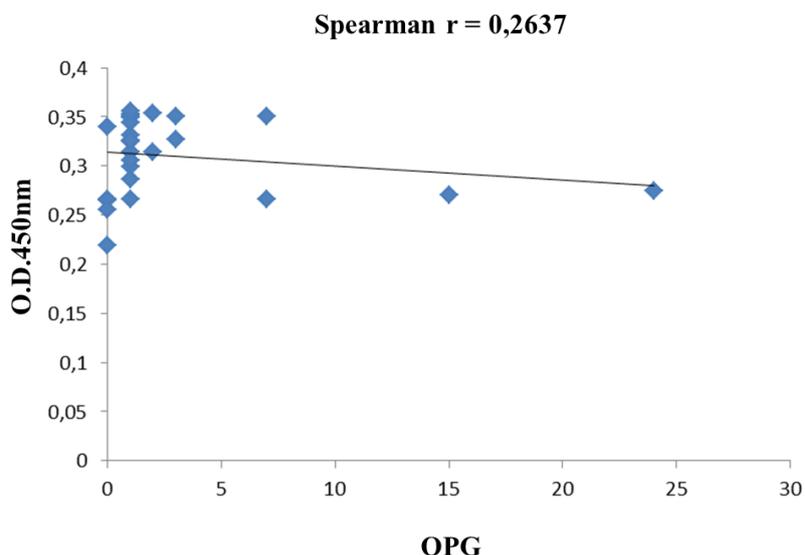
Os níveis de IgG contra o peptídeo sintético Smp_180240(495-509) em soro de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG), positivos para presença de ovos antes do tratamento (INF) e após o tratamento (DPT) foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas overnight com 1µg/mL do peptídeo, bloqueadas com PBST20 + 10% SFB e incubadas com soro de indivíduos diluídos 1:40 e anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído a 1:60000. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte na absorvância de 0,556 que determina uma especificidade de 92,31% e sensibilidade de 73,08%.

Os níveis de anticorpos contra os peptídeos sintéticos foi avaliado conforme mostrado nas figuras de 6 a 12. Um aumento significativo do reconhecimento dos peptídeos sintéticos Smp_136560 (1564-1578), Smp_093840(219-233), Smp_126160(438-452), Smp_150390.1(216-230) e Smp_180240(495-509) foi observado com soro de indivíduos infectados com *S. mansoni* moradores de área endêmica (INF) em relação aos grupos de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD) e de soro de indivíduos com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG).

Além disso, houve diferença significativa de anticorpos IgG específico para o peptídeo Smp_180240(495-509) no grupo 30 DPT em relação aos indivíduos HD, e específicos para o peptídeo Smp_141860 (1694-1709), nos indivíduos NEG em relação ao grupo 30 DPT. Também foi possível constatar queda nos níveis de anticorpos IgG específico para o peptídeo Smp_150390.1(216-230), nos indivíduos tratados, 30 e 180 DPT em relação aos indivíduos infectados. Não houve diferenças significativas no reconhecimento do peptídeo Smp_167240(213-228) entre os grupos analisados.

Em relação à sensibilidade e especificidade dos peptídeos sintéticos, os peptídeos que apresentaram melhores resultados foram o Smp_150390.1(216-230) e Smp_180240(495-509) com sensibilidade de 96,15% e 73,08% e especificidade de 100% e 92,31%, respectivamente.

Conforme mostrado na figura 10, dentre os peptídeos sintéticos utilizados nos ensaios de ELISA, o peptídeo Smp_150390.1(216-230) apresentou melhor resultado, sendo então utilizado, para avaliar a correlação entre a carga parasitária detectada pelo teste de Kato-Katz e TF Teste® e a reatividade dos soros (Figura 13). Entretanto não foi observada correlação entre as variáveis analisadas.



Nas amostras de soro dos 26 indivíduos de área endêmica utilizadas nos ensaios de ELISA com os peptídeos sintéticos, sabidamente infectados com *S. mansoni*, a técnica de Kato-Katz realizada com duas lâminas de uma amostra de fezes foi capaz de identificar 10 indivíduos positivos sendo que 16 indivíduos sabidamente infectados seriam considerados negativos (38,46% de sensibilidade). Utilizando a mesma técnica, com 18 lâminas de 4 amostras diferentes, o teste identificou 12 indivíduos positivos e 14 indivíduos falsos negativos (46,15% de sensibilidade). A técnica de TF-Test® apresentou 42,30% de sensibilidade, sendo capaz de identificar 11 indivíduos positivos e 15 falsos negativos. A PCR-ELISA apresentou 53,84% de sensibilidade, identificando 14 indivíduos positivos e 12 falsos negativos. O ensaio com Smp_150390.1(216-230)-ELISA detectou 25 pacientes positivos e apenas um falso negativo, apresentando 96,15% de sensibilidade (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação das técnicas de ELISA-Smp_150390.1(216-230), Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA em amostras de fezes sabidamente positivas

Número de amostras positivas (Kato-Katz, TF-Test® ou PCR-ELISA)	Método	Positivos	Falsos-negativos
26	Kato-Katz - 2 Lâminas	10	16
26	Kato-Katz - 18 lâminas	12	14
26	TF-Test®	11	15
26	PCR-ELISA	14	12
26	Smp_150390.1(216-230)-ELISA	25	1

5.4 Proteínas selecionadas e expressas

Adicionalmente duas proteínas com predição de epítomos de células T capaz de se ligarem a 15 e 13 alelos de MHCII foram escolhidas por nosso grupo, dentre as proteínas selecionadas por análises *in silico*, para serem expressas na forma de proteínas recombinantes. Essas proteínas foram anotadas como: Glicoproteína de superfície âncora GPI 200-kDa (Sm200) (Smp_017730) e uma proteína semelhante a alérgeno de veneno (Smp_070240) denominada de SmVal7. Essas proteínas foram selecionadas

uma vez que já estavam sendo estudadas por nossos colaboradores. A Sm200, pelo Dr. Sergio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, e a SmVal7, pelo Dr. Leonardo Farias, do Instituto Butantã, São Paulo.

5.4.1 rSm200

5.4.1.1 Predição de epítomos lineares de células B

A predição de epítomos lineares de células B é um dos critérios racionais para seleção de antígenos potenciais candidatos para serem utilizados no imunodiagnóstico da esquistossomose. A predição de epítomos lineares de células B foi realizada utilizando a sequência da proteína Sm200 inteira, onde foram preditos 38 epítomos de células B. Desses 38 epítomos preditos, 13 estão presentes na rSm200(1069-1520), parte C-terminal da proteína que foi expressa por nosso grupo, representando 34% dos epítomos preditos concentrados na rSm200(1069-1520) que corresponde a 26,86% da proteína inteira (Figura 14).

MYFLQLFLFLFTSVCNTLSDLHSNNVVDIKAHDYKLLTKILAAARQLQDLFDN
 DKNTHGLFHAELNQKVYLIVDLGGLYQVSSVEITSDEPENLKQTISIIGYGF
 KNTTSLFGSLYNCTYQQTSTLCIPACSQYDNSRTGFVGNLWSFQSDKEGW
 TRIYDLIIRGTFDENRSMKNNLDDITLFKPYADHLVPAESMESCNGLLWHL
 NDESSVTESSALAATDDRNVTIYFGKTYSVTSVHFVTSKRDDMPQEYTLHF
 GMESLTKIINLQNDCTLTASSDNDGANFKEYNCPTTDLSEYTFDYVTVNVK
 LYKLVHYGLPFHYPKIQIIPSKEDDKTIVMDKNVLQISCIQAQSCNSTSNVLL
 DVDDSYRRSRSSDKSCPMNGHIVRCEYLNLFRLSTSPNDDNNQKIQLTNQGI
 INTEFSEIMTELRIIQSNAEKLIVTMPRTHQYYSQYECSCQATDNKKSQLF
 LSTNLKPTDFDQDFIFQNTYTTIFADQTIESHVGFIELPENEHESYFKLNI
 GYSLNDVQIGVVFEVGGQAGSRTNANIEEISVQAFFGINVGSDLWSIPVYK
 YELQDVWPFSDVDDSVITVTWSPKALSATKSPSVIRDI FRALIITSSGVNTI
 RAWVWQRDShLLDIRAYHQLDENNVDSQLKILTQRSGCSPSESEDEVVASV
 QLKDGQCSTDNNDIITCTRTIHGQIIQFKLNNPSTSDVYKLYMKS
 DGVEDNV ESTSSIDLVTSGSLGETVKEDIKAGLSLTV
 EGIHHNHETQETELDVAVHIA SKVISDNIACRPT
 YLLLEFIEPNIE TLKSRVSSKQTMFRIKLP
 SNQKEINLK MQLSIGSVDP
 TQSEATTNQSI AFQNPFIPTDIK
 VDAENQLIQWFG
 LPTIFN NLLHHYETKLSGLPKACEQASEFNL
 PITQQEIDNGTIYRVNLKNI
 PDPTITK NGLAIDYNFKVTPVFKGIDGKSI
 TMTGSSDIRFSTGR
 TGQTDLKAPTSGRY
 YSLQVQVRPSQIPSC
 LNETLNTQFILRVIGEV
 DEYPDYIKQVNYVPITMKT
 TETLNDKNNHV
 KLYKIENLLPGRRYELQAEVIYTEDFRDKISEP
 VRLWIEDEV HVQTEEVFIS
 PGERVVINCTGSVGPNDTSOKSLEWKLFDGGRL
 PDGSRSLKT OEAQSGPLWYAMESLI
 FDPV NKQHGGVYACFIRPSILELMNKPTELHKV
 TVTV VSDLEVDIN
 SKIVEFGEKIIITCRTASPGOLDWMLPSGEKVE
 IMNEMKSDDD NDDQPYTIK
 DENDDVKLSIKLII PKVNLNKVGKYTCLHSP
 SNNKQTFSLKMK EVIKLVKSP
 ESSDKPGKTLILDCTANLGNLHQSVVWYKRPNSNS
 PWLEITEA IQTIEHITI
 QQKNPEDTLS SGVWLS
 ELKVKNSPGIIGEFMCTIQNIQTTMNI
 ERMETGSIMTNDNDFSKITHATIKVSLKSVL
 KILTPIKLENGQISVHCQGY
 PAHSDRLQWVYIPLNTDNKSDKVITIVHSNPK
 DEENDQESDGNTKSLDEKEI
 DEIVSLAFQLTDSIPATWPGSTGPQQLVQ
 SGLIEQEHQPKQMYTAERLSLIF
 DSKYAEKVADGILSCRYVRPKGILPMDSD
 EAAESLSKVTIPETNDDSDILE
 KSEIPMKTLLDAKQGDNDNLSILKSSLNEEP
 DEVQSDDKKNTEKKSISLL
 LYMNLMALMIIFMRN

Figura 14 - Predição de epítomos lineares de células B na sequência inteira da proteína Sm200

Os aminoácidos destacados em cinza representam os epítomos lineares de células B preditos utilizando o programa BCPREDS. Os aminoácidos que representam a proteína rSm200(1069-1520) estão sublinhados.

5.4.1.2 Gel de poliácridamida e Western blot 1D

A expressão, purificação e antigenicidade da proteína recombinante Sm200 (1069-1520) em fusão com cauda de seis histidinas foi avaliada por gel de poliácridamida e Western blot 1D. A figura 15 demonstra que a proteína com aproximadamente 66KDa, foi reconhecida pelo anticorpo anti-his (GE) (Figura 15A) e por pool de soro de camundongos infectados com *S. mansoni* (Figura 15B). O reconhecimento dessa proteína recombinante por soro de camundongos suíços

infectados (INF) demonstra que mesmo ela sendo obtida como proteína recombinante, a mesma manteve sua antigenicidade.

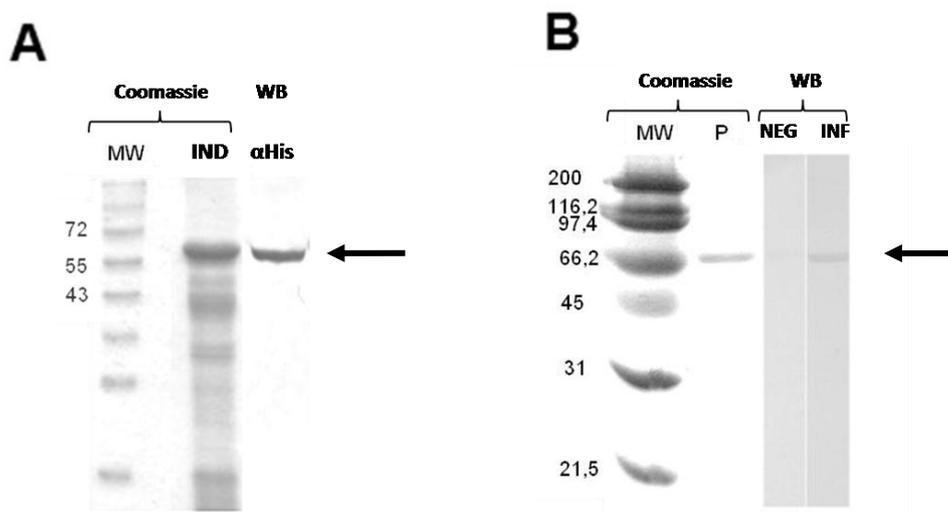


Figura 15 - Expressão, purificação e antigenicidade da rSm200(1069-1520) em fusão com cauda de 6 histidinas em gel de poliácridamida e Western blot

(A) Padrão de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (MW) e Proteína rSm200(1069-1520) não purificada (IND) em gel de poliácridamida 12% para confirmar o tamanho da proteína recombinante. A expressão foi confirmada pelo reconhecimento do anti-his (α His) por Western blot. (B) Padrão de peso molecular broad range protein marker (BioRad) (MW) e Proteína rSm200(1069-1520) purificada (P) em gel de poliácridamida 10% para avaliar o perfil molecular e o seu reconhecimento por soro de camundongos suíços infectados com *S. mansoni* (INF) e não infectados (NEG) por Western blot.

5.4.1.3 Reconhecimento da rSm200(1069-1520) por soro de camundongos suíços e indivíduos infectados com *S. mansoni*

Para avaliar o reconhecimento da rSm200 por soro de camundongos não infectados (NEG), infectados (*S. mansoni*) (15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 140 dias após infecção - dpi) e infectados tratados (PT) (30, 60 e 90 dias pós tratamento) a nível de IgG anti-rSm200(1069-1520) foram realizados ensaios de ELISA. Não houve diferenças significativas no reconhecimento da proteína por soro de camundongos infectados com 15, 30 e 45 dias em relação ao reconhecimento por soro de camundongos não infectados (Figura 16). Aumento significativo do reconhecimento da

rSm200 foi observado com soros provenientes de camundongos infectados com *S. mansoni* após 60, 90, 120 e 140 dias de infecção comparando com o soro de camundongos não infectados (Figura 16).

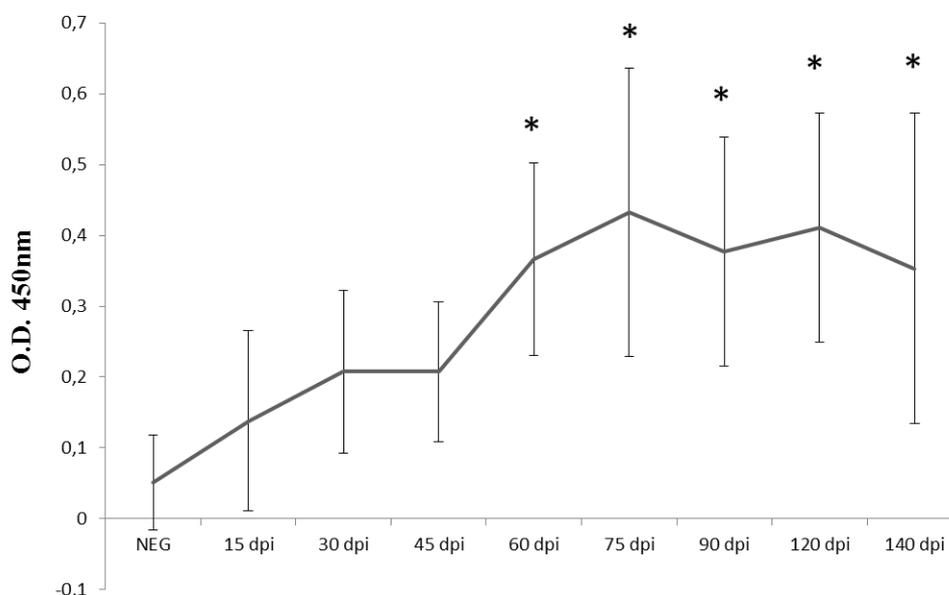


Figura 16 - Cinética dos níveis de IgG para a rSm200(1069-1520) em soro de camundongos após infecção com *S. mansoni*

O soro de camundongos suíços foi obtido um dia antes da infecção e após infecção com 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 140 dias. A linha representa as médias de absorbâncias de cada grupo. Diferenças significativas em relação ao grupo com soro negativo estão indicadas com asterisco *($p < 0,05$).

Para avaliar o desempenho da rSm200(1069-1520) como antígeno em ensaios de ELISA para o diagnóstico da esquistossomose, o reconhecimento da rSm200 por soro de camundongos infectados com *S. mansoni*, em fase aguda e crônica da infecção foi avaliado. Para essa finalidade, os soros foram divididos em 4 grupos: negativo (soro de camundongos não infectados - Neg), agudo (soro de camundongos infectados obtidos com 15 a 90 dias após infecção - Agudo), crônico (soro de camundongos infectados obtidos com 120 e 140 dias após infecção - Crônico) e infectados (soro de camundongos infectados em fase aguda e crônica da infecção - *S. mansoni*). Para determinar o ponto de corte entre os grupos, o soro de 120 camundongos não infectados e 120 soros de camundongos infectados com *S. mansoni* foram analisados e a absorbância foi avaliada para determinar a especificidade e a sensibilidade utilizando o teste de curva ROC. O ponto de corte foi determinado na absorbância de 0,3228.

Comparando os valores de absorvância, diferenças significativas foram observadas entre o grupo negativo e os outros grupos (agudo, crônico e infectado) (Figura 17A). Entretanto, o ensaio ELISA-rSm200(1069-1520) apresentou 99,17% de especificidade e 50% de sensibilidade quando utilizado no diagnóstico da esquistossomose, independentemente da fase da doença. Para avaliar o reconhecimento cruzado, o ensaio de ELISA foi realizado usando rSm200(1069-1520) como antígeno e soro de camundongos infectados com *A. suum* ou *A. ceylanicum*. Não foi observado reconhecimento cruzado da proteína por esses soros (Figura 17B). Para avaliar os níveis de IgG específico para rSm200(1069–1520) frente a soro de camundongos tratados (PT) foram utilizados soros de animais infectados e tratados com 30, 60 e 90 dias após o tratamento (Figura 18). Foram observadas diferenças significativas do grupo de camundongos infectados e infectados tratados (30, 60 e 90 dias PT) em relação ao grupo negativo. Esses resultados mostram que a proteína recombinante utilizada no ensaio de ELISA não foi eficiente para monitorar cura após tratamento. Sendo que após o tratamento houve maior reconhecimento da rSm200(1069–1520) por soro de camundongos tratados (Figura 18).

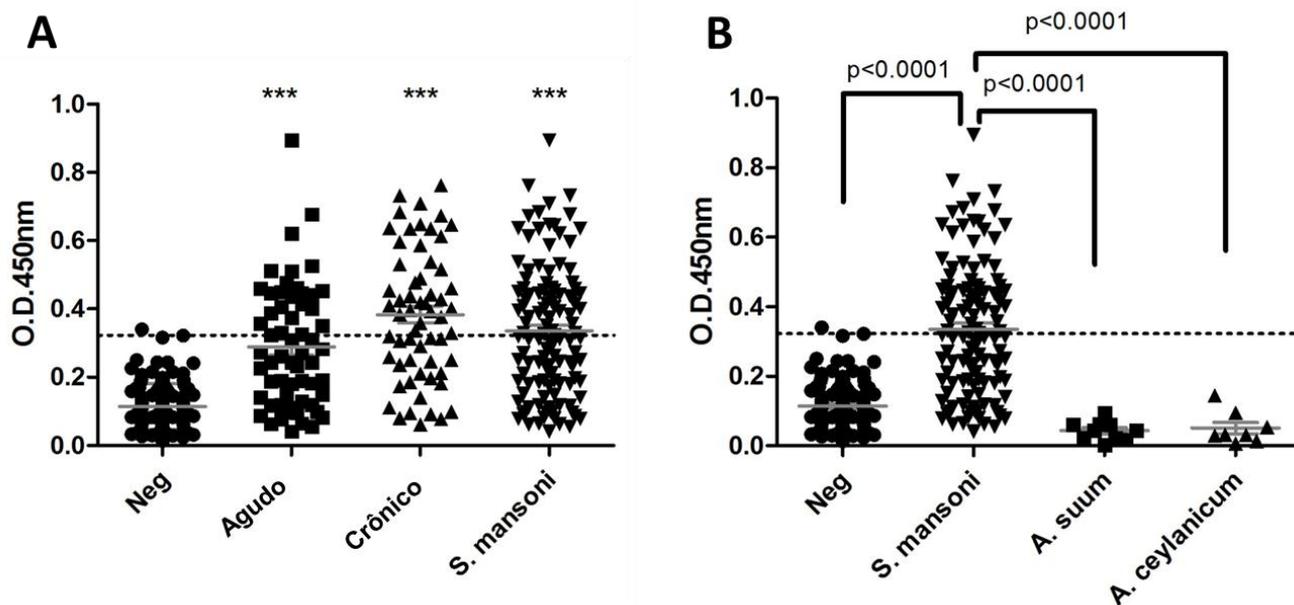


Figura 17 - Avaliação dos níveis de IgG em soro de camundongos para a rSm200(1069-1520)

(A) Níveis de IgG para rSm200(1069-1520) em soro de camundongos suíços em diferentes grupos: negativo (soro de camundongos não infectados), agudo (soro de camundongos infectados obtidos com 15 a 90 dias após infecção), crônico (soro de camundongos infectados obtidos com 120 e 140 dias após infecção) e infectados (soro de camundongos infectados em fase aguda e crônica da infecção). Diferenças significativas nos níveis de IgG comparado ao grupo negativo foram indicados com asteriscos ***($p<0,001$). (B) Níveis de IgG específicos para a rSm200(1069-1520) detectados em soro de camundongos suíços infectados com *S.mansoni*, camundongos BALB/c infectados com *Ascaris suum* ou camundongos C57BL/6 infectados com *Ancylostoma ceylanicum* para avaliar reconhecimento cruzado. A linha pontilhada representa o ponto de corte.

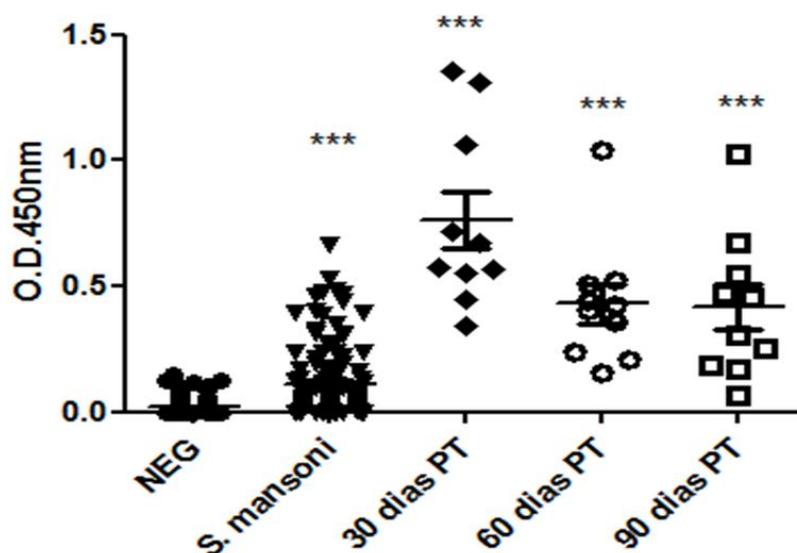


Figura 18 - Níveis de IgG para rSm200(1069–1520) frente a soro de camundongos tratados (PT)

Níveis de IgG para rSm200(1069-1520) em soro de camundongos suíços não infectados (NEG), infectados (*S. mansoni*) e infectados tratados (30, 60 e 90 dias pós tratamento – PT). Diferenças significativas nos níveis de IgG comparado ao grupo negativo foram indicados com asteriscos ***($p < 0.001$).

Soro de indivíduos com exame de fezes negativo (NEG) e soro de indivíduos com amostras de fezes positivas (INF) moradores de área de endêmica para infecção com *S. mansoni* e soro de doadores saudáveis (HD) não moradores de área endêmica para *S. mansoni* foram utilizados para avaliar eficácia do ensaio ELISA-rSm200(1069-1520) no hospedeiro natural.

Foi observado reconhecimento significativo da rSm200(1069-1520) por soros de indivíduos moradores de área endêmica para esquistossomose em comparação com o grupo de doadores saudáveis (Figura 19A). O reconhecimento da rSm200(1069-1520) por soro de indivíduos infectados correlaciona-se fortemente com a carga parasitária de ovos detectado por Kato-Katz e TF-Test® (Figura 19B), no entanto, não foram observadas diferenças significativas no reconhecimento da rSm200(1069-1520) por soros de indivíduos que moram em área endêmica com exame de fezes negativo (NEG) e exame de fezes positivo (INF) (Figura 19A). Para avaliar ELISA-rSm200(1069-1520) quanto à sensibilidade e especificidade, um ponto de corte na absorbância de 0,176 foi determinado pelo teste de curva ROC utilizando doadores saudáveis como grupo de não infectado (HD) e os indivíduos infectados (INF) como grupo positivo. Com esses parâmetros, foi observada uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 93,3%.

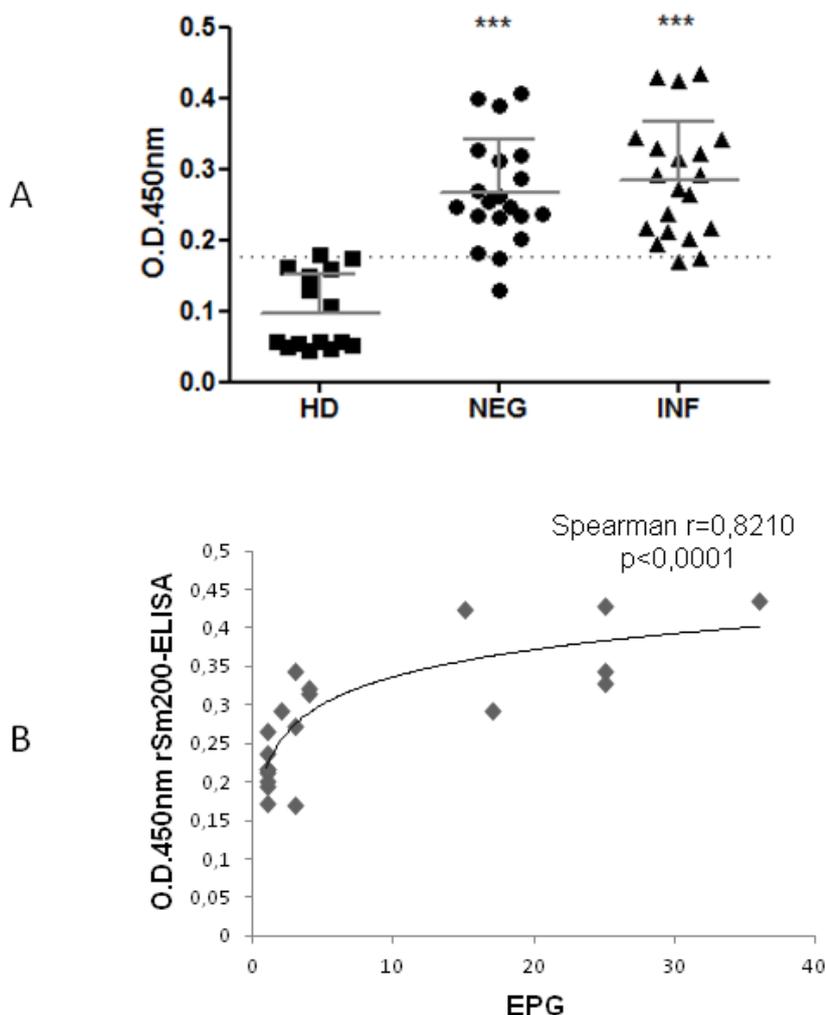


Figura 19 - Níveis de IgG detectados em soro humano por ELISA-rSm200(1069-1520)

(A) Amostras de soro foram coletadas de indivíduos moradores de área endêmica para infecção com *S. mansoni*. Foram avaliadas 20 amostras de indivíduos com exame de fezes negativo (NEG) e 20 amostras de indivíduos com amostras de fezes positivas (INF). Adicionalmente, soro de 15 doadores saudáveis (HD), não moradores de área endêmica para *S. mansoni*, também foram avaliados. Diferenças significativas nos níveis de IgG comparado com o grupo de doadores saudáveis foram indicadas com asterisco ***($p<0.001$). A linha pontilhada representa o ponto de corte. Em (B), a correlação entre a carga parasitária e a reatividade do soro para rSm200(1069-1520) foi avaliada. O número de ovos por grama de fezes foi determinado pela técnica de Kato-Katz avaliando 18 lâminas de quatro amostras de fezes e TF Teste®. A reatividade do soro para rSm200(1069-1520) foi avaliada em absorbância em ensaio de ELISA. A correlação foi determinada por teste de correlação de Spearman.

Nessas mesmas amostras de soro de 20 indivíduos de área endêmica, sabidamente infectados com *S. mansoni*, a técnica de Kato-Katz usualmente utilizada com duas lâminas de uma amostra de fezes foi capaz de identificar seis indivíduos positivos e 14

falsos negativos (30% de sensibilidade). Utilizando a mesma técnica, com 18 lâminas, o teste identificou 9 indivíduos positivos e 11 indivíduos falsos negativos (45% de sensibilidade), sendo os mesmos valores observados com a técnica de PCR-ELISA. A técnica de TF-Test® apresentou 100% de sensibilidade, sendo capaz de identificar todos os indivíduos positivo. Adicionalmente, o ensaio de ELISA-rSm200(1069-1520) detectou 18 pacientes positivos e apenas dois falsos negativos (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação das técnicas de ELISA-rSm200(1069-1520), Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA em amostras de fezes sabidamente positivas

Número de amostras positivas (Kato-Katz ou TF-Test®)	Método	Positivos	Falsos-negativos
20	Kato-Katz - 2 Lâminas	6	14
20	Kato-Katz - 18 lâminas	9	11
20	TF-Test®	20	0
20	PCR-ELISA	9	11
20	rSm200 (1069-1520)-ELISA	18	2

5.4.2 rSmVal7

5.4.2.1 Confirmação da expressão da SmVal7 recombinante

A proteína recombinante rSmVa7 foi expressa e purificada de acordo com a metodologia descrita e a confirmação da expressão foi demonstrada através da visualização, em gel de poliacrilamida 15%, da banda referente ao peso molecular da proteína recombinante (Figura 20). A presença desta banda evidencia a expressão da proteína apresentando uma massa molecular de aproximadamente 20kDa.

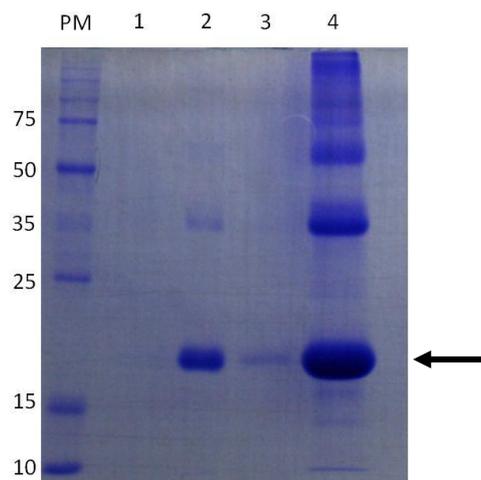


Figura 20 - Confirmação da expressão da proteína recombinante SmVal7 por gel de poli-acrilamida 15%

Após o processo de purificação, frações do purificado foram coletadas e alíquotas destas frações foram aplicadas no gel de poli-acrilamida. A seta indica a presença da proteína recombinante. PM: Padrão de Peso Molecular USB (10 kDa; 15 kDa; 25 kDa; 35 kDa; 50 kDa; 75 kDa; 100 kDa; 150 kDa; 225 kDa), 1 e 3: Sobrenadante após diálise, 2 e 4: Precipitado após diálise.

5.4.2.2 Reconhecimento da rSmVal7 por soro de camundongos suíços e indivíduos infectados com *S. mansoni*

Foram realizados ensaios de ELISA com o objetivo de avaliar o reconhecimento da rSmVal7 por soro de camundongos não infectados (NEG), infectados com *S. mansoni* (INF) (45, 60, 75, 90, 120 e 140 dias após infecção - dpi) e infectados e tratados (PT) (30, 60 e 90 dias pós tratamento).

Foram observadas diferenças significativas no reconhecimento da proteína recombinante SmVal7 por soro de camundongos infectados com 90 e 120 dias de infecção em relação ao grupo negativo. Esse reconhecimento começa a declinar à medida que a doença se cronifica, com diferença significativa com 140 dias de infecção em relação às absorvâncias com 45, 75, 90 e 120 dias após a infecção (Figura 21).

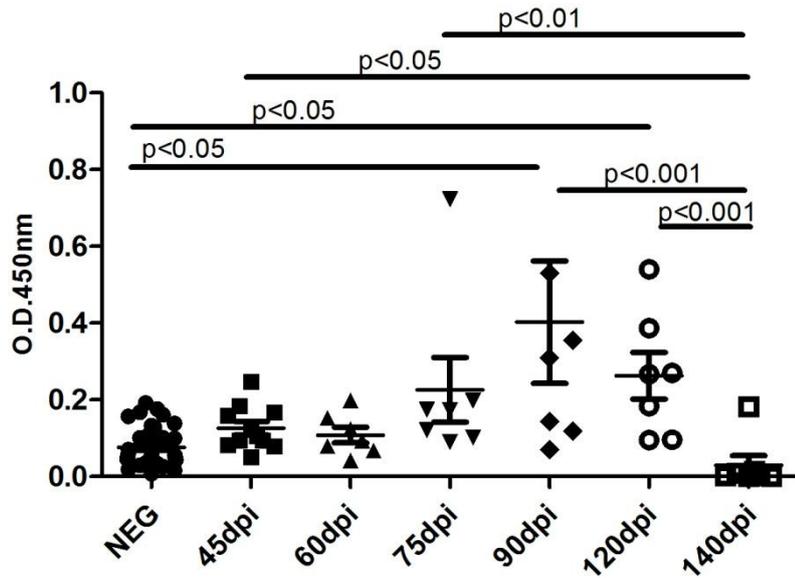


Figura 21 - Cinética dos níveis de IgG para a rSmVal7 em soro de camundongos infectados pelo *S. mansoni*

Cinética dos níveis de IgG para rSmVal7 após infecção com *S. mansoni*. O soro de camundongos suíços foi obtido um dia antes da infecção (NEG), após infecção com 45, 60, 75, 90, 120 e 140 dias após infecção (dpi). Diferenças significativas em relação aos grupos estão indicadas na figura.

Para avaliar o desempenho da rSmVal7 como antígeno em ensaios de ELISA para o diagnóstico da esquistossomose, foi avaliado o reconhecimento da rSmVal7 por soro de camundongos infectados com *S. mansoni*, em fase aguda e crônica da infecção. Os soros foram divididos em 4 grupos: negativo (soro de camundongos não infectados - NEG), agudo (soro de camundongos infectados obtidos com 45 a 90 dias após infecção), crônico (soro de camundongos infectados obtidos com 120 e 140 dias após infecção) e infectados (soro de camundongos infectados em fase aguda e crônica da infecção - *S. mansoni*).

Para determinar o ponto de corte entre os grupos, o soro de 40 camundongos não infectados e 26 soros de camundongos infectados com *S. mansoni* foram analisados e a absorbância foi avaliada para determinar o ponto de corte utilizando o teste de curva ROC. O ponto de corte foi determinado na absorbância de 0,1953. Comparando os valores de absorbância, diferenças significativas foram observadas entre o grupo negativo e os grupos agudo e infectado (*S. mansoni*) (Figura 22A). Entretanto, o ensaio rSmVal7 ELISA apresentou 97,5% de especificidade e 26% de sensibilidade quando utilizado no diagnóstico da esquistossomose, independentemente da fase da doença.

Para avaliar os níveis de IgG específico para rSmVal7 frente a soro de camundongos tratados (PT) foram utilizados soros de animais infectados e tratados com 30, 60 e 90 dias após o tratamento (Figura 22B). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo de camundongos não infectados (NEG) e infectados (*S. mansoni*). Esses resultados mostram que a proteína recombinante utilizada no ensaio de ELISA não foi eficiente para monitorar cura após tratamento, uma vez que não foram observadas diferenças entre o grupo infectado (*S. mansoni*) e infectados e tratados com 30, 60 e 90 dias (PT).

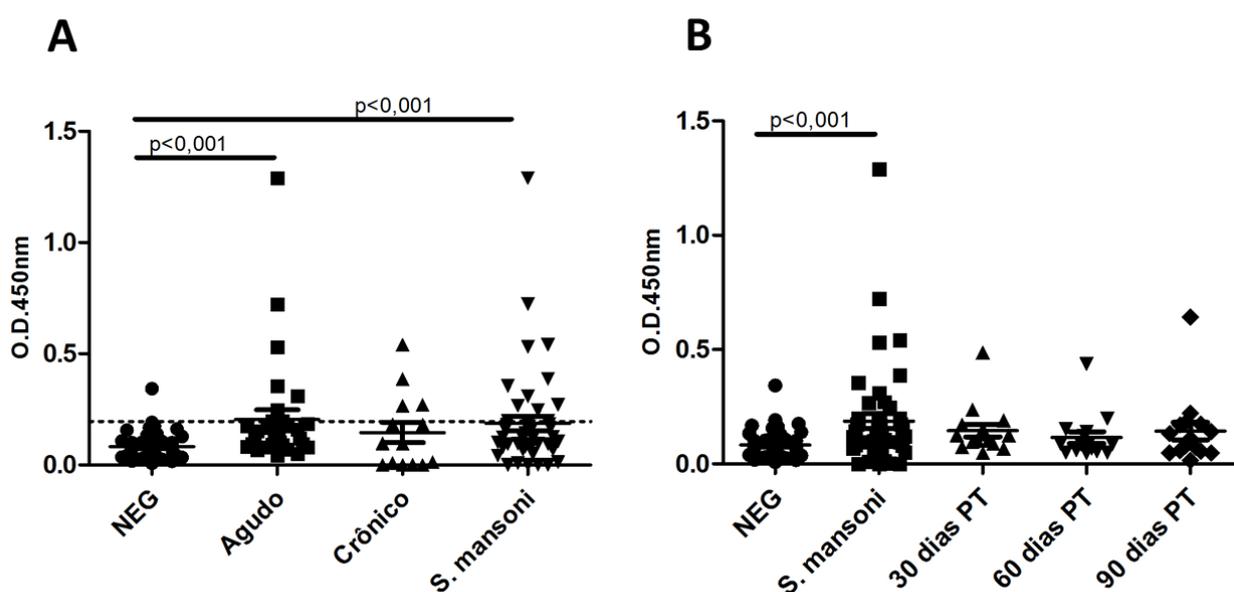


Figura 22 - Níveis de IgG para rSmVal7 em soro de camundongos infectados

(A) Níveis de IgG para rSmVal7 em soro de camundongos suíços em diferentes grupos: negativo (soro de camundongos não infectados -NEG), agudo (soro de camundongos infectados obtidos com 45 a 90 dias após infecção), crônico (soro de camundongos infectados obtidos com 120 e 140 dias após infecção) e infectados (soro de camundongos infectados em fase aguda e crônica da infecção - *S. mansoni*). Diferenças significativas nos níveis de IgG comparado ao grupo negativo estão indicadas no gráfico. (B) Níveis totais de IgG para rSmVal7 em soro de camundongos suíços não infectados (NEG), infectados (*S. mansoni*) e infectados tratados (30, 60 e 90 dias pós tratamento - PT). Diferenças significativas nos níveis de IgG comparado ao grupo negativo estão indicadas no gráfico.

Para avaliar a eficácia do ensaio de ELISA utilizando a rSmVal7 no hospedeiro humano foram utilizados soro de indivíduos não infectados saudáveis não moradores de área endêmica para *S. mansoni* (HD), moradores de área endêmica com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG) e positivos para presença de ovos (INF). Um

reconhecimento significativo da rSmVal7 por soros de indivíduos moradores de área endêmica para esquistossomose (NEG e INF) em comparação com soro de indivíduos saudáveis (HD) foi observado. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no reconhecimento da rSmVal7 por soros de indivíduos que moram em área endêmica com exame de fezes negativo (NEG) e exame de fezes positivo (INF) (Figura 23A). O reconhecimento da rSmVal7 por soro de indivíduos infectados não correlaciona-se com a carga parasitária de ovos detectado por Kato-Katz e TF-Test® (Figura 23B). Um ponto de corte na absorbância de 0,5963 (Figura 23A) foi determinado pela curva ROC utilizando doadores saudáveis como grupo de não infectado (HD) e os indivíduos infectados (INF) como grupo positivo para avaliar a sensibilidade e a especificidade da ELISA-rSmVal7. Com esse ponto de corte determinado, foi observada sensibilidade de 80% (4 falsos-negativos) e especificidade de 100%.

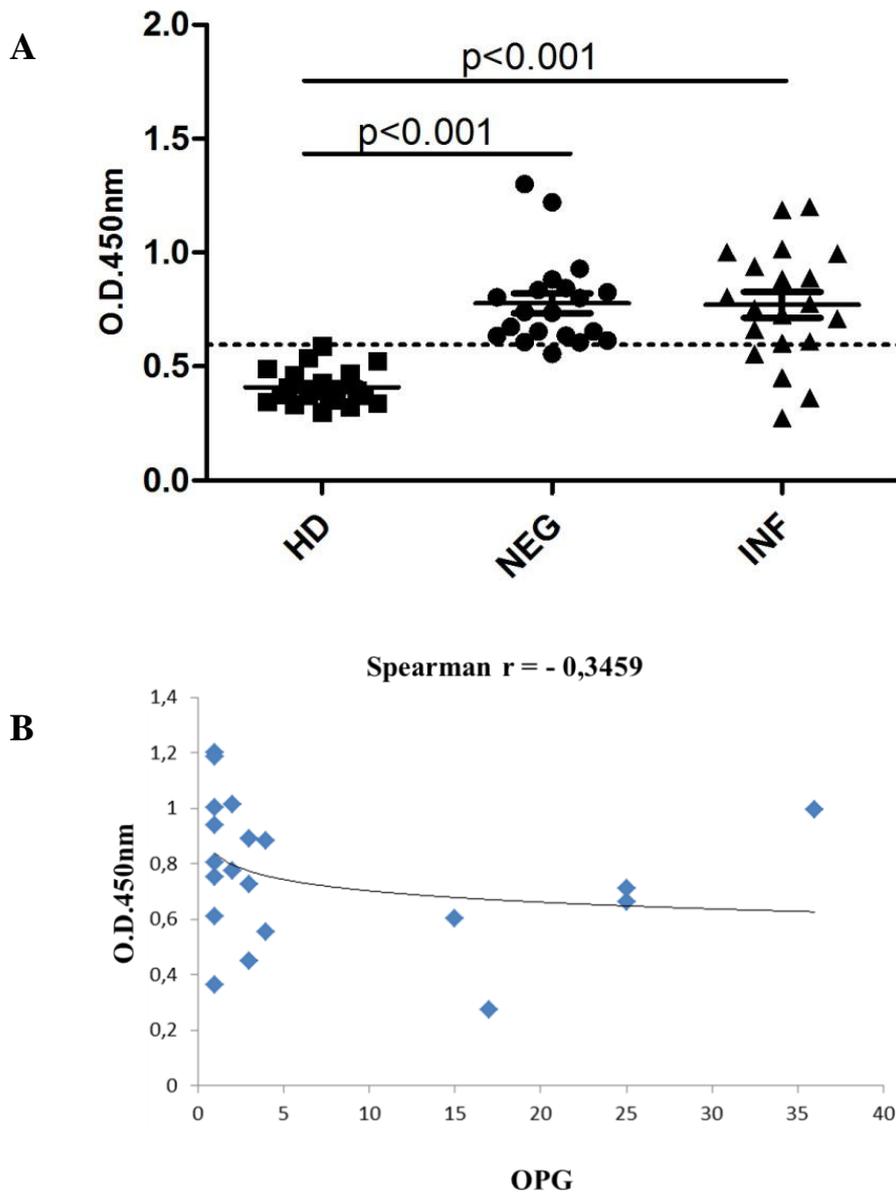


Figura 23 - Níveis de IgG para rSmVal7 em soro de moradores de área endêmica para a esquistossomose

(A) Amostras de soro foram coletadas de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica para esquistossomose (HD), moradores de área endêmica para *S. mansoni* com exame de fezes negativo para presença de ovos (NEG) e positivos para presença de ovos (INF). Diferenças significativas nos níveis de IgG, comparado com o grupo de indivíduos saudáveis (HD), estão indicadas no gráfico. A linha pontilhada representa o ponto de corte. Em (B), a correlação entre a carga parasitária e a reatividade do soro contra a rSmVal7 foi avaliada. O número de ovos por grama de fezes foi determinado pela técnica de Kato-Katz avaliando 18 lâminas de 4 amostras de fezes e TF-Teste®. A reatividade do soro para rSmVal7 foi avaliada em absorbância em ensaio de ELISA. A correlação foi determinada por teste de correlação de Spearman.

Comparando novamente as amostras de soro de 20 indivíduos de área endêmica, sabidamente infectados com *S. mansoni*, com as técnicas de Kato-Katz usualmente utilizada com duas lâminas de uma amostra de fezes, com 18 lâminas de quatro amostras de fezes, com a técnica de TF-Test® e com PCR-ELISA, o ensaio de ELISA-rSmVal7 detectou 16 pacientes positivos e 4 falsos negativos (Tabela 9), representando 80% de sensibilidade.

Tabela 9 - Comparação das técnicas de ELISA-rSmVal7, Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA em amostras de fezes sabidamente positivas

Número de amostras positivas (Kato-Katz ou TF-Test®)	Método	Positivos	Falsos-negativos
20	Kato-Katz - 2 Lâminas	6	14
20	Kato-Katz - 18 lâminas	9	11
20	TF-Test®	20	0
20	PCR-ELISA	9	11
20	rSmVal7-ELISA	16	4

6 DISCUSSÃO

Considerando a situação atual da esquistossomose, é essencial desenvolver abordagens mais eficazes para a prevenção, controle e eliminação dessa doença (Lustigman et al., 2012). Um diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade é fundamental para promover a interrupção da transmissão dessa parasitose que reflete diretamente no controle e na eliminação da mesma. Os testes de diagnóstico com baixa sensibilidade podem não detectar indivíduos infectados, que permanecem, assim, positivos, e continuam a contribuir substancialmente para a transmissão da esquistossomose.

Métodos de imunodiagnósticos com base na detecção de anticorpos têm aumentado a eficiência do diagnóstico da esquistossomose, especialmente em áreas de baixa endemicidade (de Noya et al., 1992; Kinkel et al., 2012; Smith et al., 2012; Espírito-Santo et al., 2014). Os antígenos recombinantes têm sido utilizados como alternativa aos antígenos brutos, a fim de aumentar a especificidade do teste e minimizar as reações cruzadas, além de poderem ser produzidos em larga escala (Cavalcanti et al., 2013; Gomes et al., 2014; Xu et al., 2014; Carvalho et al., 2014).

O sequenciamento completo do genoma do *S. mansoni* (Berriman et al., 2009) e os avanços na área de genômica e proteômica associadas com a disponibilidade de ferramentas de bioinformática cada vez mais sofisticadas, tem fornecido recursos potenciais para identificar numerosas moléculas de *Schistosoma*, com alvos promissores para o diagnóstico da doença (McCarthy et al., 2012; Carvalho et al., 2011; Carvalho et al., 2014; Silva-Moraes et al., 2014). Estudos utilizando estratégias de análises de bioinformática para selecionar candidatos potenciais para o diagnóstico da esquistossomose têm sido realizados. Análises *in silico* foram realizadas para procurar proteínas de repetições em cadeias no genoma de *S. mansoni*, e sete candidatos foram selecionados para serem utilizados no diagnóstico da doença. Essas proteínas foram clonadas e expressas em sistema procarioto e utilizadas em ensaios de ELISA com soro de camundongos, mostrando ser capaz de diferenciar grupos infectados de não infectados e re-infecção após tratamento com PZQ (Kalenda et al., 2015). Guo e colaboradores (2012) utilizaram análises de bioinformática para encontrar sequências retrotransposons alvo para o diagnóstico molecular de *S. japonicum*. Além disso, Zhang et al. (2007) procurou por epítomos de células B em três proteínas pré-selecionados de *S. japonicum*, a fim de criar duas proteínas quiméricas de epítomos múltiplos para serem

usadas como alvos de diagnóstico, e mostrou que estas proteínas foram capazes de reagir com soros de pacientes infectados por *S. japonicum*.

A estratégia de escolha do nosso grupo para selecionar antígenos potenciais para serem utilizados em ensaios de ELISA, para o diagnóstico da doença baseou-se em critérios racionais considerados importantes para tal, como: presença de peptídeo sinal, baixa similaridade com proteínas humanas e de camundongos, presença de epítomos lineares de células B e T preditos, localização favorável (secretada ou de membrana) e expressão em estágio de vida do parasito presentes no hospedeiro definitivo. Algumas das proteínas identificadas foram anotadas como proteínas expressas e hipotéticas, ou seja, ainda não possuem função conhecida descrita, uma vez que não foram encontradas similaridade com qualquer sequência depositada nos bancos de dados e por isso podem representar genes específicos de *S. mansoni*. Essas proteínas podem ser consideradas boas candidatas para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, uma vez que passaram por todos os critérios de seleção para serem potenciais antígenos. Outras proteínas foram anotadas como putativas e com nome sistemático que provavelmente indicam sua função por possuírem algum domínio conservado que apresentou similaridade com alguma proteína já descrita. Algumas delas, como a *trispinning orphan receptor; TORE, putative*; foi isolada e caracterizada como uma nova proteína encontrada na superfície do *S. mansoni* e *S. hematobium* e sugere-se estar associada a receptores de membrana (Inal, 1999). A *myosin heavy chain, putative*, que segundo a descrição do nome deve estar relacionada com a contração muscular, foi descrita como alvo vacinal por ter sido reconhecida em uma triagem na biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. japonicum* por soro de coelhos vacinados com esquistossômulos atenuados (Li et al., 2004). As outras proteínas, com nomes sistemáticos específicos e denominadas como putativas, não foram encontradas na literatura relacionando-se com o parasito alvo desse estudo, o *S. mansoni*. Embora a anotação das proteínas de *S. mansoni* tenha sido melhorada nos últimos tempos, quando iniciamos nossas análises, utilizamos o proteoma disponível no momento e selecionamos proteínas que devem ser analisadas e investigadas para serem utilizadas no diagnóstico sorológico da esquistossomose.

Alguns antígenos recombinantes têm sido utilizados em ensaios de ELISA para aumentar a especificidade do teste. Um deles é a proteína IPSE, uma glicoproteína expressa e secretada exclusivamente por ovos maduros de *S. mansoni*, que é idêntica à proteína alpha-1 (Schramm et al., 2006). A proteína alpha-1 foi descrita por Dunne et al

(1981) como sendo uma fração da CEF6 (*cation Exchange chromatography fraction 6*) de antígenos de ovos de *S. mansoni* solúveis em água - SmEA (*water-soluble S. mansoni egg antigens*) que é constituído de dois antígenos, alpha-1 e omega-1. O imunodiagnóstico utilizando a CEF6 como antígeno resultou na identificação de 90% de pacientes infectados com *S. mansoni* sem apresentar reconhecimento cruzado (McLaren et al., 1981). Além disso, os níveis de anticorpos contra a CEF6 caem rapidamente após o tratamento da infecção por *S. mansoni*, sendo, então um potencial antígeno para distinção entre o diagnóstico de infecção ativa e de cura após tratamento (Doenhoff et al., 2003). O uso da IPSE/Alpha-1 em ensaios de ELISA utilizando soro de camundongos infectados com *S. mansoni* mostrou que ela é o principal antígeno reconhecido precocemente durante a infecção comparando com a fração CEF6 e o antígeno solúvel SmEA (Schramm et al., 2006), sendo portanto, um potencial candidato para o imunodiagnóstico da esquistossomose mansoni. Frente a esses resultados, apesar de ser um potencial antígeno, a IPSE foi excluída da nossa estratégia de seleção, uma vez que está presente apenas no estágio de ovo.

Outro antígeno que vem sendo muito utilizado é o ACC (Antígeno Catódico Circulante). Estudos utilizando a proteína recombinante ACC em ensaios de ELISA para o imunodiagnóstico da esquistossomose mostraram que a detecção de anticorpos IgG específicos contra antígenos ACC em soro de pacientes infectados com *S. mansoni* moradores de área endêmica para esquistossomose, pode ser utilizada como ferramenta importante para identificar pacientes com baixa carga parasitária (Grenfell et al., 2013). Ao analisarmos a sequência de aminoácidos dessa proteína acessada no banco de dados genômico GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>) em abril de 2016, verificamos que o nome sistemático dessa proteína era Smp_140450, e agora passou a ser denominada de Smp_211120. Em nosso banco de dados, identificamos apenas a proteína Smp_140450.1 (1063aa) que, ao compararmos com a sequência Smp_211120 (347aa), verificamos 100% de identidade e 33% de cobertura, ou seja, a proteína Smp_211120 está inserida na proteína Smp_140450.1. Também verificamos que essa proteína Smp_140450.1 passou por todas as análises em nosso *workflow*, estando listada na tabela 1 com predição de ligação de peptídeos de células T com MHC de classe II para os genes HLA-DR em 13 alelos. Novas buscas foram feitas no atual banco de dados genômico do *S. mansoni* - SchistoDB (<http://www.schistodb.net/schisto/>), e nenhuma das duas proteínas foi encontrada. O fato dessa proteína ter passado por todas

as análises do nosso *workflow*, evidencia que nossa estratégia possui um racional promissor.

Nosso grupo de pesquisa, em 2011, utilizando o banco de dados do SchistoDB 2.0 (Zerlotini et al., 2009) e ferramentas *on line* de bioinformática, identificou seis candidatos potenciais para o diagnóstico da esquistossomose (Carvalho et al., 2011), particularmente a Sm200, que foi novamente selecionada pela estratégia desse trabalho. Utilizando nossa estratégia atual, a proteína Smp_034420.1 passou por todos os critérios, não sendo selecionada devido à quantidade de alelos, que foi de apenas 12. A proteína Smp_042910 não apresentou predição de epítomos lineares de células B utilizando o preditor BepiPred e as outras três (Smp_171300, Smp_184440, Smp_184550), apresentaram mais de 60% de similaridade com proteínas humanas. Embora na estratégia utilizada por nosso grupo em 2011, onde esse mesmo critério de similaridade com proteínas humanas foi adotado, diferenças de predições feitas *on line* e no servidor podem ocorrer. Para as predições realizadas no servidor, o proteoma humano foi obtido e instalado, podendo ser, então, uma versão diferente da utilizada na predição *on line*.

Com o objetivo de validar nossa estratégia de seleção de antígenos candidatos para o diagnóstico da esquistossomose, dentre as proteínas selecionadas, epítomos lineares de células B foram identificados nas proteínas que apresentaram predição de ligação ao maior número de moléculas de MHCII. Esses epítomos foram sintetizados como peptídeos sintéticos para serem avaliados em ensaios de ELISA. Nossos resultados mostram que dentre os sete peptídeos utilizados, cinco foram capazes de diferenciar soro de indivíduos de área endêmica infectados com *S. mansoni* de soro de indivíduos de área endêmica negativos para a presença de ovos nas fezes e de indivíduos saudáveis não moradores de área endêmica. Além disso, baseado na estratégia utilizada para selecionar antígenos não expressos no estágio de ovo do parasito e que seriam utilizados no controle de cura de indivíduos infectados e tratados, o peptídeo Smp_150390.1(216-230), foi capaz de diferenciar soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose infectados de soro de indivíduos de área endêmica infectados após 30 e 180 dias do tratamento, sugerindo o uso do mesmo para controle de cura após tratamento. Além disso, outros parâmetros podem ser trabalhados para melhorar o resultado do teste. Oliveira e colaboradores (2006) sintetizaram sete peptídeos provenientes de proteínas de *S. mansoni* e avaliaram em ensaios de ELISA para o diagnóstico da doença com *pool* de soro de indivíduos negativos e positivos para

esquistossomose com metodologias de sensibilização diferentes. A maioria deles apresentou resultados melhores quando sensibilizados por 30 minutos a 37°C antes de serem incubadas por aproximadamente 16 horas a 4°C.

Embora nossa estratégia de seleção de peptídeo tenha sido baseada em critérios racionais, como predição de epítomos lineares de células B e de regiões intrinsecamente desordenadas, outros epítomos da proteína poderiam apresentar potencial para o diagnóstico dessa parasitose. O critério de predição de regiões intrinsecamente desordenadas não abrangeu todas as proteínas, conseqüentemente, nem todos os epítomos selecionados possuíam essas regiões preditas. Embora Bueno e colaboradores (2011) tenham confirmado experimentalmente a relação de regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs) com epítomos lineares de células B altamente imunogênicos em *Plasmodium vivax* e também em outros resultados de trabalhos de colaboradores com predição de epítomos de células B associados a regiões intrinsecamente desordenadas em *Leishmania infantum* ter sido maior que ao acaso (manuscrito em preparação), mais estudos são necessários para inferir se essas regiões intrinsecamente desordenadas seriam promissoras para seleção de antígenos de *S. mansoni* ou não, uma vez que o peptídeo que obteve melhor resultado em nossos ensaios não possui predição de regiões intrinsecamente desordenadas.

Uma das proteínas selecionadas e expressa por nosso grupo foi a Sm200. A forma recombinante de parte desta proteína contendo os aminoácidos de 1069-1520 foi expressa em bactéria e utilizada em ensaios de ELISA para o diagnóstico da esquistossomose. A Sm200 é uma glicoproteína, com função desconhecida, ancorada à membrana de vermes adultos do *S. mansoni* através de uma ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI). Inicialmente foi identificada no tegumento do parasito (Sauma and Strand, 1990; Sauma et al., 1991) e posteriormente chamada de 200kDa (Hall et al., 1995), Sm200 (Racoosin et al., 1999) ou ECL (Nascimento et al., 2007). A sua localização na superfície do tegumento do verme adulto de *S. mansoni* foi confirmada por uma raspagem enzimática superficial que detectou sua presença no tegumento (Castro-Borges et al., 2011).

A parte C-terminal recombinante da Sm200 avaliada neste estudo apresentou 34% dos epítomos de células B preditos na proteína inteira e manteve a sua antigenicidade, uma vez que foi reconhecida por soros de camundongos infectados com *S. mansoni*. No ensaio de ELISA, a reatividade para rSm200(1069-1520), de soros de camundongos infectados aumenta à medida que o parasito se desenvolve dentro do

hospedeiro definitivo (Fig. 16). Estas observações estão de acordo com os estudos de Norden e Strand (1985) que detectaram maiores níveis de anticorpos contra a Sm200, 140 dias após a infecção. Além disso, os níveis de expressão preditos de proteínas de tegumento de *Schistosoma* nas diferentes etapas de vida do parasito no hospedeiro definitivo indicam que a Sm200 possui baixos níveis de expressão em estágios de cercárias e esquistossômulo, níveis médios de expressão em ovos e níveis altos de expressão em vermes adultos (Fonseca et al., 2012).

O teste de diagnóstico baseado na ELISA-rSm200(1069-1520) foi capaz de detectar 60 camundongos positivos em 120 animais que foram infectados com aproximadamente 25 cercárias da cepa LE, representando uma sensibilidade de 50%. No grupo de 120 camundongos não infectados, apenas um animal foi erroneamente considerado infectado por *S. mansoni*, resultando em 99,17% de especificidade. Este resultado falso positivo não pode ser atribuído à reação cruzada com *A. suum* ou *A. ceylanicum*, uma vez que não foi observado nenhum reconhecimento cruzado utilizando soros de animais infectados com esses dois helmintos.

O diagnóstico da esquistossomose, em indivíduos com alta carga parasitária é prontamente realizado por métodos parasitológicos, como Kato-Katz. No entanto, em áreas de baixa endemicidade, onde os indivíduos infectados possuem uma carga parasitária baixa, uma lâmina de uma amostra de fezes na técnica de Kato-Katz apresenta 22,2% de sensibilidade (Siqueira et al., 2011). Aumentar o número de lâminas e amostras de fezes para 18 e 4, respectivamente, aumenta a sensibilidade da técnica de Kato-Katz para 80,6% (Siqueira et al., 2011). O uso de soros de indivíduos que vivem em área de baixa endemicidade para esquistossomose demonstraram que a rSm200 (1069-1520)-ELISA foi capaz de discriminar soro de doadores saudáveis não infectados e indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas para esquistossomose, mas não discriminou indivíduos provenientes de áreas endêmicas com exame de fezes negativo e positivo. O reconhecimento da rSm200(1069-1520) por soro de indivíduos que vivem em áreas endêmicas para esquistossomose com exame de fezes negativo poderia representar resposta de anticorpos a infecção anterior ou infecção não diagnosticada pelos exames realizados. Estes resultados demonstram que a rSm200(1069-1520) pode ser utilizada em ensaios de ELISA para excluir o diagnóstico de esquistossomose em indivíduos apresentando sintomas de doenças semelhantes, uma vez que os sintomas da infecção por esquistossomose são semelhantes aos sintomas associados com outras infecções intestinais. Também é importante ressaltar que embora apenas uma parte da

proteína tenha sido expressa, mesmo com uma porcentagem considerável de epítomos lineares de células B preditos, a expressão da proteína inteira poderia melhorar o desempenho do teste.

A outra proteína expressa, SmVal7, faz parte de uma família de genes de 28 proteínas denominadas de proteínas semelhante a alérgeno de veneno - Venom Allergen-Like proteins (SmVALs). Esta família de genes é dividida em dois grupos, sendo o grupo 1, em que a SmVal7 está inserida, constituído de proteínas que possuem peptídeo sinal e podem ser secretadas e o grupo 2, de proteínas que não possuem peptídeo sinal, podendo ter função intracelular (Chalmers et al., 2008). A SmVal7 é expressa na glândula esofágica de vermes adultos de *S. mansoni* e sua expressão é visualizada logo nos estágios iniciais de cercária e esquistossômulos de 10 dias. A expressão da SmVal7 unicamente na glândula esofágica do parasito sugere um papel relacionado ao processo de alimentação do parasito ou na proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que o tubo digestivo é o segundo sítio de maior interação entre o verme e o hospedeiro (Rofatto et al., 2012).

Embora essa proteína tenha sido selecionada para ser utilizada no controle de cura pós-tratamento, pois não possui predição para o estágio de ovo no hospedeiro definitivo, os resultados dos ensaios de ELISA utilizando essa proteína recombinante mostrou que ela não foi capaz de diferenciar soro de camundongos infectados com *S. mansoni* de soro de camundongos infectados e tratados. De acordo com esses resultados, outros ensaios devem ser realizados utilizando soro de indivíduos de área endêmica infectados e tratados, e também subclasses de anticorpos IgG para avaliar se o perfil distinto de resposta imune humoral com essa proteína recombinante também poderia discriminar indivíduos negativos, positivos e positivos tratados de área endêmica.

Fazendo uma comparação dos testes utilizados para identificar os indivíduos positivos de área endêmica, que foram Kato-Katz, TF-Test® e posteriormente PCR-ELISA, nossos antígenos Smp_150390.1(216-230), rSm200(1069-1520) e SmVal7 utilizados em ensaios de ELISA com soro desses mesmos indivíduos apresentaram sensibilidade consideravelmente maior que a técnica de Kato-Katz com 2 e 18 lâminas e PCR-ELISA. Adicionalmente, o antígeno Smp_150390.1(216-230) apresentou sensibilidade maior que a técnica de TF-Test®, demonstrando que nossa estratégia para seleção de antígenos potenciais para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose atingiu o objetivo.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a abordagem computacional utilizada para realizar predições de antígenos para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose e no diagnóstico de cura pós-tratamento apresentou um racional promissor. Nossa estratégia de seleção *in silico* apresentou antígenos que podem ser utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose com sensibilidade maior do que o método parasitológico convencionalmente utilizado que é a técnica de Kato-Katz. Além disso, o ELISA utilizando o peptídeo sintético Smp_150390.1(216-230) demonstrou que o mesmo possui potencial para ser utilizado no controle de cura após tratamento e em inquéritos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S 1997. Self-tolerance and autoimmunity. In AK Abbas, A H Lichtman, J S Pober, Cellular and molecular immunology, chapter 19, WB Saunders Company, Philadelphia, p. 406-422.

Adriko M, Standley C J, Tinkitina B, Tukahebwa E M, Fenwick A, Fleming FM, Sousa-Figueiredo J C, Stothard J R, Kabatereine N B. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. *Acta Trop.* 2014; 136:50-57.

Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari I M, Noya O. 2007. Detection of schistosomiasis cases in low transmission areas based on coprologic and serologic criteria. The Venezuelan experience. *Acta Parasitol Int.* 2015; 503-512.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland science, Taylor & Francis Group, 2008. 1268 p.

Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman D J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; (3): 403-410.

Andrade Z A. A patologia da esquistossomose humana. In: Carvalho O S, Coelho P M Z, Lenzi H. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.* Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008; p. 547.

Ashton P D, Harrop R, Shah B, Wilson RA. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology.* 2001; 122: 329-338.

Baldi P and Brunak S. *Bioinformatics: The Machine Learning Approach*, 2nd edition. MIT Press, 2001.

Barçante J M, Barçante T A, Dias S R, Vieira L Q, Lima W S, Negrão-Corrêa D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res.* 2003; 89 (2): 89-93.

Barsoum R S, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research.* 2013; 4: 433-444.

Baxevanis A D and Ouellette B F F. eds. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, third edition. Wiley, 2005.

Bdul-Fattah M M, A E el-Gindy, M H Hegab, M F el, Y A Kadry MI, el-Dessouky and F el-Gohary. Diagnosis of early pre-patent schistosomiasis by cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Egypt Soc Parasitol.* 2000; 30: 621-630.

Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, Moore R, Habte E, Redda A, Gebre-Michael T, Gundersen S G. Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 2004; 92: 205-212.

Berriman M, Haas B, Lo Verde P, Wilson A, Dillon, G, Cerqueira G. et al. The Genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature.* 2009; 460 (7253): 352-358.

Blagg W, Schoegel E L, Mansour N S, Khalat G I. A new concentration tecnic for the demonstration of protozoa and helmint eggs in faces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 4: 23-28.

Bonesso-Sabadini P I P, de Souza Dias L C. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97 (3): 381- 385.

Boros D L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2:250-269.

Bradford M M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Bueno L L, Lobo F P, Morais C G, Mourão L C, de Ávila R A, Soares I S, Fontes C J, Lacerda M V, Chavez Olórtégui C, Bartholomeu D C, Fujiwara R T, Braga E M. Identification of a highly antigenic linear Bcell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1(AMA-1). *PLoS One.* 2011; 6(6):e21289.

Burke M L, Jones M K, Gobert G N, Li Y S, Ellis M K, McManus D P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31:163-176.

Caprino L A and Han Grace Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* 1972; 37: 3404-3409.

Carvalho do Espírito-Santo MC, Pinto PL, Gargioni C, Alvarado-Mora MV, Pagliusi Castilho VL, Pinho JR, de Albuquerque Luna EJ, Borges Gryscek RC. Detection of *Schistosoma mansoni* antibodies in a low endemicity area using indirect immunofluorescence and circumoval precipitin test. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; (6):1146-1152.

Carvalho G B, Pacífico L G, Pimenta D L, Siqueira L M, Teixeira-Carvalho A, Coelho P M, Pinheiro C S, Fujiwara R T, Oliveira S C, Fonseca C T. Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. *Exp Parasitol.* 2014; 139:24-32.

Carvalho G B, Silva-Pereira R A, Pacífico L G, Fonseca C T. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. *Acta Trop.* 2014; 75-79.

Castro-Borges W, Dowle A, Curwen R S, J Thomas-Oates, and Wilson R A. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (3): e993.

Cavalcanti M G, Silva L F, Peralta R H S, Barreto M G M, Peralta J M. Schistosomiasis in áreas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends in Parasitology*. 2013; 29 (2): 75-82.

Chalmers I W, McArdle A J, Coulson R M, Wagner M A, Schmid R, Hirai H, Hoffmann K F. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics*. 2008; Feb 23; 9:89.

Chan W C and White P D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. 2000, Oxford University Press Inc.

Cheever A M, Andrade Z A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. *Trans R Soc Tro Med Hyg*. 1967; 61: 626-639.

Chen J, Liu H, Yang J, Chou K. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*. 2007; 33: 423-428.

Chen Q, Wu C Y, Feng Y, Wu J H, Yao X Y, Xu D G, Wang Z J. Eukaryotic expression of SjE16, SjPPIase and SjRobl genes from *Schistosoma japonicum* egg and evaluation of their role in immunodiagnosis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2013; 31(3):170-175.

Chieffi P P, Kanamura H. Diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 1978; 30: 77-97.

Clark, D. P. *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005.

Coelho P M Z, Jurberg A D, Oliveira A A, Katz N. Use of saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009; Vol. 104 (5): 720-723.

Colley D G, Binder S, Campbell C, King C H, Tchuem Tchuenté LA, N'Goran E K, Erko B, Karanja D M, Kabatereine N B, van Lieshout L, Rathbun S. A five-country

evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg. 2013; 88(3):426-432.

Correa-Oliveira R, Dusse L M, Viana I R, Colley D G, Santos Carvalho O, Gazzinelli G. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. Am J Trop Med Hyg. 1988; 38: 348-355.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004; 99 Suppl 1: 13-19.

Couto F F B, Coelho P M Z, Araújo N, Katz N, Kusel, J R, Janotti-Passos, L K, Mattos, A C A. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106 (2): 153-157.

da Silva R M, Kanamura H Y, Camargo E D, Chiodelli S G, Nakamura P M, Gargioni C, Velloso S A and Antunes J L. A comparative study on IgG-ELISA, IgM-IFT and Kato-Katz methods for epidemiological purposes in a low endemic area or schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998; 93 (Suppl 1): 279-282.

Danso-Appiah A, De Vlas S J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. Trends Parasitol. 2002; 18(3):125-129.

De Jonge N, Rabello A L, Krijger F W, Kremsner P G, Rocha R S, Katz N, Deelder A M. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1991; 85: 756-759.

de Noya B A, Noya O, Balzan C, Cesari I M. New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992; 227-231.

De Vlas, S J. & Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. Parasitol. Today. 1992; 8: 274-277.

Deelder A M et al. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. *Exp Parasitol*. 1980; 50: (1) 16-32.

Deelder A M, Duchenne W., Polderman, A M. Serodiagnosis of schistosoma infections. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1989; 133: 154-156.

Derouin FF, Heyer M, Lariviere and J Petithory. ELISA in schistosomiasis. Limits. Possibility of application (author's transl). *Pathol. Biol*. 1980; 28: 465-468.

Doenhoff M J, Chiodini P L & Hamilton J V. Specific and sensitive diagnosis of *Schistosoma* infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol*. 2004; 20: 35-39.

Doenhoff M J, Hagan P, Cioli D, et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology*. 2009; 136: 1825–1835.

Doenhoff M J, Kusel J R, Coles G C, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96: 465-469.

Doenhoff M J, Wheeler J G, Tricker K, et al. The detection of antibodies against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens (SEA) and CEF6 in ELISA, before and after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003; 97: 697–709.

Dosztányi Z, Csizmók V, Tompa P, Simon I. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol*. 2005; (4):827-839.

Dunne D W, Lucas S, Bickle Q, et al. Identification and partial purification of an antigen from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T cell-deprived mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1981; 75 (1): 54 - 71.

Dyson H J, Wright P E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Ver Mol Cell Biol.* 2005; (3):197-208.

El-lakkany N M, el-Din S H, Sabra A N, Hammam O A. Pharmacodynamics of mefloquine and praziquantel combination therapy in mice harbouring juvenile and adult *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; p.814-822.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 2000; Jul 21, 300 (4): 1005-1016.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.*, 2002; 82 :139-146.

Enk M J, Lima A C, Massara C L, Coelho P M, Schall V T. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 78: 140-146.

Fallon P G, Doenhoff M J. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51 (1): 83-88.

Fallon P G, Smith P, Nicholls T, Modha J, Doenhoff M J. Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. *Parasite Immunol.* 1994; Oct, 16(10): 529-535

Fallon P G, Sturrock R F, Capron A, Niang M, Doenhoff M J. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53 (1): 61-62.

Feng Z, Zhang X, Han P, Arora N, Anders R, Norton R. Abundance of intrinsically unstructured proteins in *P. falciparum* and other apicomplexan parasite proteomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; (2):256-267.

Fenwick A, Webster J P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; p.577-582.

Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd M H.. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends in Parasitology.* 2003; p.509-515.

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

Fonseca C T, Braz Figueiredo Carvalho G, Carvalho Alves C, de Melo T T. *Schistosoma* tegument proteins in vaccine and diagnosis development: an update. *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 541268.

Franco G R, Valadão A F, Azevedo V, Rabelo E M. The schistosoma gene discovery program: state of the art. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30 (4): 453-463.

Gargioni C, Silva R M, Thomé C M, Quadros C M S, Kanamura H Y. Utilização de método sorológico como ferramenta diagnóstica para implementação da vigilância e controle da esquistossomose no Município de Holambra, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2008; 24(2): 373-379.

Gomes J F, Hoshino-Shimizu S, Dias L C S, Araújo A J U S, Castilho V L P, Neves F A M A. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *J Clin Lab Anal.* 2004; 18: 132-138.

Gomes L I, Marques L H S, Enk M J, Oliveira M C, Coelho P M Z, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Shistosoma* infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4 (4): e664.

Gomes L I, Enk M J, Rabello A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2014; 47 (1) 3-11.

Gonçalves M M L, Barreto M G M, Peralta R H S, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja R P, Soares M S, Peralta J M. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Trop.* 2006; 100: 24-30.

Gordon, H M, Whitlock H V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Council of Science and Industry Research, Australia.* 1939; v.12, n.1., p. 50-52.

Gray D J, McManus D P, Li Y, Williams G M, Bergquist R, Ross A G. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. *Lancet Infect Dis.* 2010; p. 733-736.

Grenfell R, Harn D A, Tundup S, Da'dara A, Siqueira L, Coelho P M. New approaches with different types of circulating cathodic antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(2): e2054.

Greter H, Krauth S J, Ngandolo B N, Alfaroukh I O, Zinsstag J, Utzinger J. Validation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Urine Cassette Test for *Schistosoma mansoni* diagnosis in the Sahel, and potential cross-reaction in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94(2):361-364.

Guo J J, Zheng H J, Xu J, Zhu X Q, Wang S Y, Xia C M. Sensitive and specific target sequences selected from retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the diagnosis of schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(3):e1579.

Haas W, Diekhoff D, Koch K, Schmalfluss G, Loy C. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. *J Parasitol.* 1997; 83:1079-1085.

Haas, W. The attachment response of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. Influence of natural substrates and temperature. *Z Parasitenkd.* 1976; 49:63-72.

Hall T M, Joseph G T, and Strand M. *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen. *Expe. Parasitol.* 1995; 80: 242-249.

Hams E, Aviello G, Fallon P G. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol.* 2013; 4:89.

Hoffman VA, Pons JS, Janer JL. Sedimentation concentration method in the schistosomiasis mansoni. *P. R. J. Public Health Trop. Med.* 1934; 9: 283-298.

Hotez P J, Alvarado M, Basáñez M G, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, Brooker S J, Brown A S, Buckle G, Budke C M, Carabin H, Coffeng L E, Fèvre E M, Fürst T, Halasa Y A, Jasrasaria R, Johns N E, Keiser J, King C H, Lozano R, Murdoch M E, O'Hanlon S, Pion S D, Pullan RL, Ramaiah K D, Roberts T, Shepard D S, Smith J L, Stolk WA, Undurraga E A, Utzinger J, Wang M, Murray C J, Naghavi M. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 24, 8(7):e2865.

Inal J M. *Schistosoma* TOR (trispinning orphan receptor), a novel, antigenic surface receptor of the blood-dwelling, *Schistosoma* parasite. *Biochim Biophys Acta.* 1999; Jun 9, 1445(3): 2832-2898.

Ishida M M, Rubinsky-Elefant G, Ferreira A W, Hoshino-Shimizu S, Vaz A J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop.* 2003; 89: 73-84.

Ismail M M, Taha S A, Farghaly A M, el-Azomy A S. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J Egypt Soc Parasitol.* 1994; Dec, 24(3): 685-695.

Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, Bennett J L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (2): 214- 218.

Janeway, Charles A. et al. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 2002. 767 p.

Jurberg A D, Oliveira A A, Lenzi H L, Coelho P M Z. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 112-114.

Kalenda Y D, Kato K, Goto Y, Fujii Y, Hamano S. Tandem repeat recombinant proteins as potential antigens for the sero-diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Nucleic Acids Res*. 2009; 579-582.

Kato K, Miura M. Comparative examinations. *Jpn J Parasitol* 1954; 3: 35.

Katz N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-helminthos: depoimento [21 de janeiro, 2014]. Belo Horizonte. Entrevista concedida a Assessoria de Comunicação Social da Fiocruz Minas. Disponível em <http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/blog/inquerito-nacional-de-prevalencia-da-esquistossomose-e-geo-helminthos/>

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1972; 14(6): 397-400.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(3): 303-08.

Kinkel H F, Dittrich S, Bäumer B, Weitzel T. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis, *Clin. Vaccine Immunol*. 2012; 948-953.

Kjetland E F, Hove R J, Gomo E, Midzi N, Gwanzura L, Mason P, Friis H, Verweij J J, Gundersen S G, Ndhlovu P D, Mduluzi T, Van Lieshout L. Shistosomiasis PCR in vaginal lavage as an indicator of genital *Schistosoma haematobium* infection in rural Zimbabwean women. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2009; 81 (6): 1050-1055.

Klement P, Augustine J M, Delaney K H, Klement G, Weitz J I. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci*. 1996; Jun, 46 (3):286-290.

Kongs A, Marks G, Verlé P, Van der Stuyft P. Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections. *Trop Med Int Health*. 2001; 6: 163-169.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer E L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001; Jan 19, 305 (3):567-580.

Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Lamberton P H, Kabatereine N B, Oguttu D W, Fenwick A, Webster J P. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre- and post-repeated-praziquantel treatment. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(9):e3139.

Lambertucci J R, Serufo J C, Gerspacher-Lara R, Rayes A A M, Teixeira R, Nobre V, et al. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop*. 2000; p.101-109.

Larsen J E, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006; 2: 2.

Legesse M & Erko B Field-based evaluation of a reagent strip test for diagnosis of schistosomiasis mansoni by detecting circulating cathodic antigen (CCA) in urine in low endemic area in Ethiopia. *Parasite*. 2008; 15, 151-155.

Lenzi H L, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha W S, Pacheco R G, Mariano M, Lenzi J A. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93:141-151.

Lesk A M. Introduction to Bioinformatics, Oxford University Press, 2002.

Lin D D, Liu JX, Liu YM, Hu F, Zhang Y Y, Xu JM, Li JY, Ji MJ, Bergquist R, Wu GL, Wu HW. Routine Kato–Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: A case study in an endemic area of the People's Republic of China. *Parasitol Int.* 2008; 57: 281–286.

Linding R, Jensen L, Diella F, Bork P, Gibson T, Russell R. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure.* 2003; (11):1453-1459.

Linding R, Russell R, Neduva V, Gibson T. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* 2003; (13):3701-3708.

Li X H, Liu S X, Song G C, Xu Y X, Cao J P, Chen J X. Screening of cDNA library of *Schistosoma japonicum* with sera from rabbits vaccinated with ultraviolet-attenuated schistosomula. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2004; Apr 30;22(2):80-82.

Lodh N, Mwansa J C, Mutengo M M, Shiff C J. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma* [corrected] *mansoni* infection from filtered urine in Zambia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89(1):46-50.

LoVerde P T, Hirai H, Merrick J M, Lee N H and EL-sayed N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol. Int.* 2004; 53: 183–192.

Lunde M N, Ottensen E A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis. *The A J Trop Med & Hyg.* 1980; 29: 82-85.

Luo Q L, Qiao Z P, Zhou Y D, Li X Y, Zhong Z R, Yu Y J, Zhang S H, Liu M, Zheng M J, Bian M H, Shen J L. Application of signaling protein 14-3-3 and 26 kDa glutathione-S-transferase to serological diagnosis of schistosomiasis japonica. *Acta Trop.* 2009; 112: 91-96.

Lustigman S, Prichard R K, Gazzinelli A, Grant W N, Boatin B A, McCarthy J S, Basáñez M G. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiases. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(4):e1582.

Lutz A. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. Mem.Inst. Oswaldo Cruz. 1919; 11: 121-155.

Marioni J C, Mason C E, Mane S M, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res. 2008; Sep,18(9):1509-1517.

Martins A V. Sobre a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método de sedimentação-concentração. Brazil-médico. 1937; 5: 319-321.

McCarthy J S, Lustigman S, Yang G J, Barakat R M, García H H, Sripa B, Willingham A L, Prichard R K, Basáñez MG. A research agenda for helminth diseases of humans: diagnostics for control and elimination programmes. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(4):e1601.

McLaren M L, Lillywhite J E, Dunne D W, Doenhoff M J. Serodiagnosis of human *Schistosoma mansoni* infections: enhanced sensitivity and specificity in ELISA using a fraction containing *S. mansoni* egg antigens omega 1 and alpha 1. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1981; 75(1): 72-79.

Melman S D, Steinauer M L, Cunningham C, Kubatko L S, Mwangi I N, Wynn N B, Mutuku M W, Karanja D M, Colley D G, Black C L, Secor W E, Mkoji G M, Loker E S. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 2009; Aug 18, 3 (8): e504.

Merrifield R B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 1963; 85: 2149-2153.

Miller P, Wilson R A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. Parasitology. 1980; 80:267-288.

Montenegro S M L. Immunodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992; 87: 333-335.

Mott DE & Dixon H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of Shistosomiasis. Bull. World Health Organ. 1982; 60: 729-753.

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

Neves J, Martins N R, Tonelli E. Forma toxêmica da esquistossomose mansoni. Considerações diagnósticas em torno de 50 casos identificados em Belo Horizonte. O Hospital. 1966; 70: 1583-1603.

Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. BMC Bioinformatics. 2009; Sep 18, 10: 296.

Norden A P and Strand M. Identification of antigenic *Schistosoma mansoni* glycoproteins during the course of infection in mice and humans. Am. J. Trop. Med. 1985; 34(3): 495-507.

Obeng B B, Aryeetey Y A, de Dood C J, Amoah A S, Larbi A I, Deelder A M, Yazdanbakhsh M, Hartgers F C, Boakye D A, Verweij JJ, van Dam G J, van Lieshout L. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine sample from Ghana. Ann Trop Med parasitol. 2008; 102 (7): 625-633.

de Oliveira E J, Kanamura H Y, Takei K, Hirata R D, Valli L C, Nguyen N Y, de Carvalho Rodrigues I, de Jesus A R, Hirata M H. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102: 360-366.

Oliveira E J, Kanamura H Y, Dias L C S, Soares L C B, Lima D M C, Ciaravolho R M C. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade. Cad Saúde Pública. 2003; 19: 255-261.

Oliveira G, Johnston D A. Mining the schistosome DNA sequence database. Trends Parasitol. 2001; 17: 501-503.

Oliveira G. The *Schistosoma mansoni* transcriptase: an update. Exp. Parasitol. 2007; 117 (3): 229-239.

Pan C T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am J Trop Med Hyg. 1965; 14(6): 931-76.

Pearce E J, Macdonald A S. The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol. 2002; p.499-511.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1956; 8: 589-597.

Peng K, Radivojac P, Vucetic S, Dunker A, Obradovic Z. Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder. BMC Bioinformatics. 2006; 7:208.

Petersen T N, Brunak S, v Heijne G and Nielsen H. SignalP 4.0 - Discrimination between Signal Peptides and Transmembrane Regions. Nature Methods. 2011; 8:785-786.

Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. Int J Parasitol. 2004; Mar 29, 34 (4):527-533.

Pontes L A, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and faeces. Am J Trop Med Hyg 2002; 66: 157-162.

Pontes L A, Oliveira M C, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68: 652-656.

Protasio A V, Tsai I J, Babbage A, Nichol S, Hunt M, Aslett M A, De Silva N, Velarde G S, Anderson T J, Clark R C, Davidson C, Dillon G P, Holroyd N E, LoVerde PT, Lloyd C, McQuillan J, Oliveira G, Otto T D, Parker-Manuel S J, Quail M A, Wilson R A, Zerlotini A, Dunne D W, Berriman M. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 2012; Jan;6 (1): e1455.

Rabello A L T. O exame parasitológico de fezes, a biópsia retal e o teste imunoenzimático no diagnóstico da esquistossomose mansoni humana. Thesis, Faculdade de Medicina, 1990. UFMG, 155 pp.

Rabello A. diagnosing schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92 (5): 669-676.
Racoosin E L, Davies S J, Pearce E J. Caveolae-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol., 1999; 104: 285–297.

Resende D M, Rezende A M, Oliveira N J, Batista I C, Corrêa-Oliveira R, Reis A B, Ruiz J C. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes. BMC Bioinformatics. 2012;13:309.

Rofatto H K, Parker-Manuel S J, Barbosa T C, Tararam C A, Alan Wilson R, Leite L C, Farias LP. Tissue expression patterns of *Schistosoma mansoni* Venom Allergen-Like proteins 6 and 7. Int J Parasitol. 2012; 613-620.

Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard J R, Tchuem Tchuenté L A, Garba A, Mohammed K A, Schur N, Person B, Colley D G, Utzinger J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. Acta Trop. 2012; p. 423-440.

Sauma S Y and Strand M. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. Mol. Biochem. Parasitol. 1990; 38: 199–210.

Sauma S Y, Tanaka T M and Strand M. Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 1991; 46: 73-80.

Savioli L, Renganathan E, Montresor A, Davis A, Behbehani K. Control of schistosomiasis - a global picture. Parasitol. 1997; Today 13, 444-448.

Schlsio W, Moller F W, Ziegler K. Immunofluorescence serologic findings in schistosomiasis. Methodologic aspects. Z. Gesamte Inn. Med. 1989; 44: 149-152.

Scholte R G, Gosoni L, Malone J B, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P.. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. Acta Trop. 2014; 132: 57-63.

Schramm G, Gronow A, Knobloch J, Wippersteg V, Grevelding C G, Galle J, Fuller H, Stanley R G, Chiodini P L, Haas H, Doenhoff M J. IPSE/alpha-1: a major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. Mol Biochem Parasitol. 2006; 9-19.

Shatkay H, Höglund A, Brady S, Blum T, Dönnies P, Kohlbacher O. SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data. Bioinformatics. 2007; 23: 1410-1417.

Shendure J. The beginning of the end for microarrays? Nat Methods. 2008; 585-587.

Silva-Moraes V, Ferreira J M, Coelho P M, Grenfell R F. Biomarkers for schistosomiasis: towards an integrative view of the search for an effective diagnosis. Acta Trop. 2014; 132:75-79.

Siqueira L M, Coelho P M, Oliveira Á A, Massara C L, Carneiro N F, Lima A C, Enk M J. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 844-850.

Siqueira L M, Gomes L I, Oliveira E, Oliveira E R, Oliveira Á A, Enk M J, Carneiro N F, Rabello A, Coelho P M. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; (2):209-214.

Smith H, Doenhoff M, Aitken C, Bailey W, Ji M, Dawson E, Gilis H, Spence G, Alexander C, van Gool T. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble antigens and soluble egg antigens for sero diagnosing schistosome infections. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(9):e1815

Sonnhammer E L, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. 1998; 6: 175-182.

Stirewalt M A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. Adv Parasitol. 1974; 12:115-182.

Symmers W S T C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. J Pathol Bact. 1904; 9: 237-239.

Teixeira C F, Neuhauss E, Bem R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. Plos Negl Trop Dis. 2007; Vol 1 (2): e73.

Torres V. M. Dermatologic manifestations of schistosomiasis mansoni. Arch. Dermatol. 1976; 112: 1539-1542.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 4350-4354.

Vapnik V. Statistical Learning Theory. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1998.

Verjosvski- Almeida S, DeMarco R, Martins E A, Guimarães P E, Ojopi E P, Paquola A C, Piazza J P, Nishiyama M Y, Kitajima J P, Adamson R E, Ashton P D, Bonaldo M F, Coulson P S, Dillon G P, Farias L P, Gregório S P, Ho P L, Leite R A, Malaquias L C, Marques R C, Miyasato P A, Nascimento L A, Ohlweiler F P, Reis E M, Ribeiro M A, Sá R G, Stukart G C, Soares M B, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira A M, Wilson R A, Menk CF, Setubal J C, Leite L C, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nat. Genet. 2003; 35 (2):148-157.

von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Res. 1986; 4683-4690.

Weerakoon K G, Gobert G N, Cai P, McManus D P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. Clin Microbiol Rev. 2015; (4):939-67.

WHO - World Health Organization. Schistosomiasis: fact sheet n° 115. Março, 2013a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>>. Acesso em Set. 2013.

WHO - World Health Organization. Schistosomiasis: fact sheet n° 115. Maio, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>>. Acesso em janeiro 2016.

WHO. 2014. Schistosomiasis fact sheet 115. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.

Willis H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. Med. J. Aust. 1921; 29: 375-376.

Woolley D W, Merrifield R B. Anomalies of the structural specificity of peptides. Ann N Y Acad Sci. 1963; 104:161-171.

World Health Organization – WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. World Health Organ Tech Rep Ser 2002; 912 (i-vi): 1-57.

World Health Organization (WHO). O controle da esquistossomose. (Relatório Técnico, 830). Genebra: OMS 1994.

World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. Geneva, 14-16, 2005.

World Health Organization. The control of schistosomiasis. Geneva, p.1-85. Technical Report Series, n° 830, 1993.

Wright P E, Dyson H J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.* 1999; (2):321-331.

Xu X, Zhang Y, Lin D, Zhang J, Xu J, Liu YM, Hu F, Qing X, Xia C, Pan W. Serodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: genome-wide identification of a protein marker, and assessment of its diagnostic validity in a field study in China. *Lancet Infect Dis.* 2014; 489-497.

Zerlotini A, Heiges M, Wang H, Moraes R L, Dominitini A J, Ruiz J C, Kissinger J C, Oliveira G. SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 837-843.

Zhang H, Zhu Y C, Si J, Zhao S, Wang X T, Yin X R, Cao L M, Cao G Q, Hua W Q, Xu M, Liang Y S. Development and identification of the multiple B cell epitope antigens of *Schistosoma japonicum*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2007; Aug;25(4):285-289.

Zhang Y Y, Luo J P, Liu Y M, Wang Q Z, Chen J H, Xu M X, Xu J M, Wu J, Tu X M, Wu GL, Zhang ZS, Wu H W. Evaluation of Kato–Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: A Bayesian modeling approach. *Acta Trop.* 2009; 112: 16-22.

Zicker F, Katz N, Wolf J. Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 1997; 19: 202-207.

ANEXOS**ANEXO I - Artigo publicado referente ao trabalho de doutorado**

- Artigo: Carvalho GB, Pacífico LG, Pimenta DL, Siqueira LM, Teixeira-Carvalho A, Coelho PM, Pinheiro Cda S, Fujiwara RT, Oliveira SC, Fonseca CT. Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. Exp Parasitol. 2014 Apr; 139:24-32.

O artigo científico apresentado a seguir corresponde aos objetivos 2, 3 e 4 referente a proteína rSm200(1069-1520).

Título: Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation.

Autores: Carvalho G B, Pacífico LG, Pimenta DL, Siqueira LM, Teixeira-Carvalho A, Coelho PM, Pinheiro C da S, Fujiwara RT, Oliveira SC, Fonseca CT.

Revista: Experimental Parasitology. 2014 Apr;139:24-32.

Na busca por candidatos para diagnóstico no genoma do parasito *S. mansoni*, nosso grupo identificou a Sm200, uma proteína de 200kDa do *S. masoni* como alvo. A forma recombinante desta proteína contendo os aminoácidos de 1069-1520 foi expressa em bactéria e utilizada em ensaios de ELISA para o diagnóstico da esquistossomose. Nossos resultados demonstram que este ensaio foi capaz de discriminar indivíduos não infectados (doadores saudáveis) de indivíduos infectados, havendo correlação positiva entre a absorbância detectada no teste e a carga parasitária do indivíduo infectado.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200 kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation



Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho^a, Lucila Gonçalves Grossi Pacifico^a, Deborah Laranjeira Ferreira Pimenta^a, Liliâne Maria Vidal Siqueira^a, Andréa Teixeira-Carvalho^a, Paulo Marcos Zech Coelho^a, Carina da Silva Pinheiro^b, Ricardo Toshio Fujiwara^c, Sergio Costa Oliveira^d, Cristina Toscano Fonseca^{a,e,*}

^a Centro de Pesquisas René Rachou, Píscuz-MG, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Bahia, Salvador, BA, Brazil

^c Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Biologia e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Laboratório de Imunologia e Genética de Parasitos, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

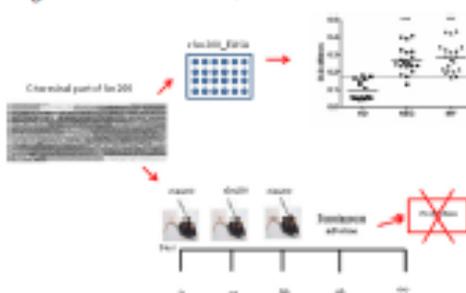
^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais-INCT-DT, Brazil

HIGHLIGHTS

- rSm200 (1069–1520) fail to induce protection in immunized mice.
- rSm200 (1069–1520) immunization increased IL-10 production by spleen cells.
- rSm200-ELISA test presented a sensitivity of 90% and a specificity of 93.3% in schistosomiasis diagnosis.

GRAPHICAL ABSTRACT

The C-terminal part of the 200 kDa *Schistosoma mansoni* tegumental protein, Sm200, fails to induce a protective immune response in mice, but rSm200 (1069–1520)-ELISA represents a tool to be used in the diagnosis of schistosomiasis.



ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2013

Received in revised form 31 January 2014

Accepted 9 February 2014

Available online 18 February 2014

Keywords:

Schistosoma mansoni

Tegument

Sm200

Diagnosis

Vaccine

ABSTRACT

Schistosoma mansoni tegument is involved in essential functions for parasite survival and represents a target for screening candidates for vaccine and diagnosis. Our group using reverse vaccinology selected six candidates, previously demonstrated by proteomics studies to be expressed in the parasite tegument, among them was Sm200. In this work we have cloned and expressed a recombinant form of Sm200 C-terminal (1069–1520) region. The efficacy of rSm200 (1069–1520) in the diagnosis of schistosomiasis and in the formulation of a vaccine against *S. mansoni* was assessed respectively in an ELISA based diagnostic assay and immunization protocols in mice. Significant differences between non-infected and acutely infected or chronically infected animals were observed and no cross-recognition was observed with sera from *Ascaris suum* or *Ancylostoma ceylanicum* infected mice. rSm200-ELISA test could also discriminate infected individuals from healthy donors not living in endemic area for schistosomiasis but failed to discriminate between individuals from a low endemic area for schistosomiasis known to have

* Corresponding author at: Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, CEP: 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: ctoscano@cpqr.fiocruz.br (C.T. Fonseca).

positive or negative stools after examination. Recombinant Sm200 also failed to induce protection against schistosomiasis, demonstrating that the C-terminal part of Sm200 is unable to induce protective immune response in mice. Therefore, rSm200 (1069–1520)-ELISA represents an important tool to be used in the diagnosis of schistosomiasis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis remains a serious public health problem in 76 countries and territories of the world with more than 200 million individuals infected and causing annual losses of 10.4 million in DALYs (Briegleb et al., 2002; PAH/WHO, 2007). Although effective drugs against schistosomiasis are used in disease control programs, the prevalence of the disease remains unaltered and new disease foci and acute outbreaks are observed worldwide (Van der Weef et al., 2003; Coum and Amaral, 2004). Also, drug resistance by the parasites must be considered (Doenhoff et al., 2002; Fenwick and Webster, 2006) and an effective vaccine against schistosomiasis is desirable. Additionally, due to changes in the epidemiological profile of the disease with an increased number of individuals with low intensity of infection, associated with the low sensitivity of Kato-Katz method in low endemic areas, a more sensitive diagnosis test is needed to contribute to the control of disease, especially disease transmission (Feldmeier and Poggensee, 1993; Kongs et al., 2001).

New strategies for developing an effective vaccine formulation and more sensitive diagnosis method for schistosomiasis are being proposed by several research groups. Recently, our group proposed a screening strategy, based on rational criteria, to select through *in silico* analysis of the *Schistosoma mansoni* genome, candidates to be used in an ELISA-based diagnosis method (Carvalho et al., 2011). Sm200, a glycoprotein with unknown function, linked to *S. mansoni* adult worm membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor was one of the antigens selected as a potential candidate to compose an ELISA diagnostic test for schistosomiasis (Sauma and Strand, 1990; Carvalho et al., 2011). This protein was initially identified in the tegument of the parasite (Sauma and Strand, 1990; Sauma et al., 1991) and later termed 200 kDa (Hall et al., 1995), Sm200 (Racoonin et al., 1999) or ECL (Nascimento et al., 2007). Its location on the tegument surface from *S. mansoni* adult worms was recently confirmed by a proteomic analysis of the surface proteins obtained by an enzymatic shaving technique (Castro-Borges et al., 2011a). Sm200 has also been associated with praziquantel efficacy, since antibodies against this protein can restore drug efficacy in B cell depleted mice (Brindley et al., 1989).

Parasite tegument proteins represent interesting target to be used in vaccine formulation, since the tegument is a dynamic host interactive surface involved in essential functions like nutrition, sensory reception, immune evasion and modulation (Jones et al., 2004; Van Hellemond et al., 2006). Indeed many tegument antigens and even the tegument itself have been proved to induce protective immune response in mice (Siddiqui et al., 2003; Tran et al., 2006; Cardoso et al., 2008; Teixeira de Melo et al., 2010). Furthermore, DNA immunization with Sm200 induces 38% protection in mice and an increased production of IgG1 and IgG2a (Nascimento et al., 2007).

Besides its involvement in praziquantel efficacy and its ability to induce protective immunity in a DNA immunization protocol, Sm200 protein has never been tested as antigen in serological diagnosis assays nor has its recombinant form been tested in a vaccine formulation. In the present study, the recombinant form of Sm200 containing the amino acids from 1069 to 1520 corresponding to the C-terminal part of the protein was obtained and used in immunological assays to evaluate its immunogenicity, efficacy in disease diagnosis and ability to induce protection in mice. The C-terminal part of Sm200 induced significant specific production of IFN- γ ,

IL-10 IgG and IgG1 antibodies but failed to induce a protective response in immunized mice. rSm200 (1069–1520)-ELISA could discriminate between healthy donors not living in endemic area for schistosomiasis and infected individuals from a low endemic area for schistosomiasis but could not discriminate individuals from an endemic area for schistosomiasis known to have negative or positive stools after examination. Therefore, rSm200 (1069–1520)-ELISA together with epidemiological data, represents an important tool to be used in the diagnosis of schistosomiasis.

2. Materials and methods

2.1. B cell epitopes prediction

The B cell epitope prediction was performed using the whole sequence of Sm200 obtained from (Gene Bank – Access Number: gi|501208|) in the program BCPREDS: B-cell epitope prediction server version 1.0 on line accessed on August 2012 (<http://ai.lab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>). Amino acid sequences of 22 mer presenting 75% of specificity were considered B cell epitopes.

2.2. Sera samples

2.2.1. Mice sera

One hundred and twenty Swiss female mice were obtained from Rene Rachou Research Center (Flocruz) facility and they were used to obtain sera samples. Cercariae of *S. mansoni* (LE strain) were maintained routinely on *Biomphalaria glabrata* snails at CPqRR and were obtained by exposing infected snails to light for 1–2 h to induce shedding. Cercarial numbers and viability were determined using a light microscope prior to infection. Swiss mice were infected individually by subcutaneous route with approximately 25 cercariae of *S. mansoni* (LE strain). The blood samples were collected by retro-orbital plexus from all mice before the infection (day 0) and after infection at days 15, 30, 45, 60, 75, 90 (acute phase of disease), 120, 140 (chronic phase of disease) post-infection. At the end of the experiment mice were sacrificed by cervical fracture and perfusion was performed in order to verify parasite burden.

Additionally, C57BL/6 and BALB/c mice were obtained from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) facility, infected with *Ancylostoma ceylanicum* and *Ascaris suum* respectively by gavage with 50 infective larva to obtain serum samples. In order to maintain the strain of *A. ceylanicum*, the eggs of faeces from hamster is processed by Baermann Moraes modified technique (Barçante et al., 2003) for recovery of the infective larvae. A suum adult worms were harvested from pigs at a Brazilian slaughterhouse (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil).

2.2.2. Human sera

Sera from forty individuals (female/male: 18/22) from a low-endemic area for *S. mansoni* infection (Pedra Preta, Minas Gerais, Brazil) and 15 sera from healthy donors (HD) (female/male: 06/09) not living in endemic area for schistosomiasis were used in this study. Fecal samples from all individuals living in endemic area for schistosomiasis were evaluated for the presence of *S. mansoni* eggs by the Kato-Katz (Katz et al., 1972) and TF-Test[®] in order to determine the infection status. A total of eighteen slides from four fecal

samples for each participant were examined by Kato-Katz. Three fecal samples of 500 mg for each participant were examined by TF-Test[®]. Infected individuals (INF) (female/male:1/0/10) presented positive fecal examination results in both Kato-Katz and TF-Test[®] with intensity of infection ranging from 1 to 25 EPG (eggs per gram of feces). Negative individuals (NEG) (female/male:08/12) presented negative fecal examination results in both tests. Infected individuals were treated with a single oral dose of praziquantel (50 mg/kg for adults), according to the recommendation of the Brazilian Ministry of Health.

2.3. Cloning, expression and purification of recombinant Sm200 (1069–1520)

Total RNA from *S. mansoni* adult worms was extracted and the messenger RNA (mRNA) was purified using RNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer. The complementary DNA (cDNA) was obtained from mRNA through RT-PCR amplification using specific primers designed for the Sm200 fragment of 3207–4560 pb, (sense 5' CCGGGATCCGGTATTACACAGAAAGATTTC 3' and antisense 5' CCCGTCGACTGGTATGCTATCAGTATGTTG 3'). The amplified product was purified, digested with BamHI and SalI and linked to the bacterial expression vector pET28a (Novagen) digested with the same enzymes. The presence and correct orientation of the Sm200 gene were confirmed using the "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" kit and the MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Biosciences). rSm200 (1069–1520) was expressed in *Escherichia coli* with an in-frame six-histidine C-terminal tag using the pET28a expression vector. For protein expression, transformed BL21(DE3) cells were grown in 1 L LB medium plus ampicillin (1 mg/ml) until achieving absorbance of 0.6 in 600 nm. One millimolar of isopropylthio- β -galactoside (IPTG, Invitrogen) was added to the culture and cells were incubated for 4 h at 37 °C. Cells were then harvested by centrifugation and resuspended in 50 ml of 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl and 10 mM imidazole. Subsequently, the cells were submitted to three 30 s-cycles of sonication and centrifuged at 5400g for 20 min. The rSm200 was recovered as inclusion bodies and solubilized in 50 ml of 8 M urea, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, and 10 mM imidazole. The protein was purified by affinity chromatography on a Ni-Sepharose column (HiTrap chelating 5 ml) under denaturing conditions using an AKTA explorer chromatograph (GE Healthcare), according to the manufacturer's protocol. Fractions containing rSm200 were dialyzed against PBS pH 7.0. The dialysis was carried out at AKTA explorer using a Hi-Trap Desalting column (GE Healthcare). The recombinant proteins were quantified according to Bradford (1976) and used as antigen in vaccine formulations and in immunological assays.

2.4. SDS-PAGE and Western blot ID

Recombinant Sm200 (1069–1520) and the molecular weight (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) were loaded on two different 10% or 12% denaturing polyacrylamide gels and separated by electrophoresis (Laemmli, 1970). The proteins from each gel were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) as previously described (Towbin et al., 1979) and the membranes were blocked with 5% powdered milk at 4 °C overnight. One membrane was incubated in a 1:2000 dilution of anti-6xHIS antibodies (GE) in TBST for 1 h at room temperature. The other was incubated with a pool of serum from *S. mansoni* infected mice (1:20) for 1 h at room temperature. After three washes with TBST (0.5 M NaCl–0.02 M Tris [pH 7.5], 0.05% Tween 20), the membranes were incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate 1:2000 (Sigma Aldrich) or 1:4000 (Southern Biotech) in TBST plus

3% powdered milk. Finally each membrane was washed three times with TBST and treated with Alkaline Phosphatase reaction developing buffer containing nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate (BCIP). After the reaction was developed, the membrane was washed using distilled water and dried in filter paper.

2.5. rSm200 (1069–1520)-ELISA

The rSm200 (1069–1520)-ELISA were first standardized using 1 and 5 μ g/ml of the recombinant protein with incubations of pool of sera from non infected and infected animals or individuals in serial dilution in PBST beginning in 1:10 and ending in 1:10,240, conjugate dilution in PBST of 1:5000 and 1:10,000 (anti-mouse IgG-HRP) or 1:30,000 and 1:60,000 (anti-human IgG-HRP) were also assayed. The ELISA assay was performed in flat-bottom plate (Maxisorp) using the Sm200 (1069–1520) recombinant antigen. The plate was coated with 100 μ l/well of 0.05 M bicarbonate carbonate buffer, pH 9.6 containing 5 μ g/ml of the rSm200 (1069–1520) (5 μ g/ml) and incubated for approximately 16 h at 4 °C. In order to remove the unbound proteins, the plates were washed three times with 300 μ l PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) and blocked with PBST and 3% powdered milk and incubated for approximately 16 h at 4 °C. The sera obtained from animals infected with *S. mansoni* or *A. suum* or *A. coylicum* were diluted 1:40 in PBST, sera from patients were diluted 1:100 in PBST. A 100 μ l per well of diluted sera were added to the plates and incubated for 16 h at 4 °C. Plates were then washed and incubated for 1 h with 100 μ l of anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Southern Biotech) diluted 1:10,000 in PBST or anti-human-IgG conjugated to peroxidase (Sigma Aldrich) diluted 1:60,000 in PBST. After further washes, the reaction was developed for 15 min with 100 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate and the reaction was stopped with 50 μ l of 5% sulfuric acid. The optical density was measured with automated ELISA reader (Biorad), using a filter of 450 nm.

2.6. Immunization protocol

C57BL/6 female, 6–8 weeks old, were obtained from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) animal facility and used in the immunization protocols. The mice were divided into two groups of ten mice each and they received subcutaneously (s.c.) in the nape of the neck, an injection, of rSm200 (25 μ g/animal) or PBS as a control on days 0, 15 and 30. The recombinant protein or the PBS was formulated together with Freund's adjuvant (CFA-complete Freund's adjuvant on first immunization and IFA-incomplete Freund's adjuvant on the boosters). Fifteen days after the last boost, mice were challenged through percutaneous exposure of the abdominal skin for 1 h in water containing 100 cercariae (LE strain). Forty-five days after challenge, mice were sacrificed by cervical fracture and perfusion was performed for collecting worms in the mesentery and liver as described by Pellegrino and Siqueira (1956). After the perfusion, the liver of the animals were removed, weighed and digested with 10% KOH. The eggs were obtained by centrifugation at 900g for 10 min and were resuspended in 1 ml of saline. The number of eggs present in this organ was determined using a light microscope. Two independent experiments were performed to determine protection levels.

The protection was calculated by comparing the number of worms recovered from the vaccinated group with its respective control group, using the formula:

$$PL = (WRCC - WREG) / WRCC \times 100\%$$

where PL = protection level, WRCC = worms recovered from control group, and WREG = worms recovered from experimental group.

2.7. Antibody response analysis

Following immunization, sera of ten mice from each vaccinated or control group were collected at a two-week interval. Measurements of specific antibodies were performed using indirect ELISA. Maxisorp 96-well microtiter plates (Nunc, Denmark) were coated with 5 µg/ml of rSm200 in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 for 16 h at 4 °C, then blocked for 2 h at room temperature with 200 µl/well PBST (phosphate buffer saline, pH 7.2 with 0.05% Tween-20) plus 10% FBS (fetal bovine sera). One hundred microliters of each serum diluted 1:100 in PBST were added per well and incubated for 1 h at room temperature. Plate-bound antibody was detected by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, IgG1 and IgG2a (Sigma Aldrich) diluted in PBST 1:10,000, 1:5000 and 1:2000, respectively. Color reaction was developed by the addition of 100 µl per well of 200 pmol OPD (o-phenylenediamine, Sigma Aldrich) in citrate buffer, pH 5.0 plus 0.04% H₂O₂ for 10 min and stopped with 50 µl of 5% sulfuric acid per well. The plates were read at 495 nm in an ELISA plate reader (BioRad, Hercules, CA).

2.8. Cytokine analysis

To evaluate cytokine profile induced by immunization, mice were immunized with three doses of 25 µg of rSm200 (1069–1520) or PBS as a control group plus CFA/IFA (n = 4 for each group). Ten days after the last immunization dose, spleen cells were isolated from macerated spleen of individual mice and washed twice with sterile PBS. After washing the cells were adjusted to 1 × 10⁶ cells per well for IL-4, IL-10, IFN-γ and TNF-α assays in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml of penicillin G sodium, 100 µg/ml of streptomycin sulfate, 250 ng/ml of amphotericin B. Splenocytes were maintained in culture with medium alone or stimulated with rSm200 (25 µg/ml), with concanavalin A (ConA) (5 µg/ml) or LPS (1 µg/ml) as previously described (Fonseca et al., 2004; Martins et al., 2012). The 96-well plates (Nunc) were maintained in an incubator at 37 °C with 5% CO₂. Culture supernatants were collected after 24, 48 and 72 h. The assays for measurement of IL-10, IFN-γ and TNF-α were performed using the DuoSet ELISA kit (R&D Diagnostic, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's directions.

2.9. Statistical analysis

The software package GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used in statistical analysis. Student's *t*-test or ANOVA test followed by Dunnett post-test statistical analysis were performed in samples with a normal distribution. Mann-Whitney test or Kruskal–Wallis test followed by Dunn post-test statistical analyses were performed in samples without a normal distribution. The cutoff points between infected and non-infected groups' results were determined using the curves of the Receiver Operating Characteristics (ROC curves – Receiver Operating Characteristic). The correlation between absorbance detected in rSm200 (1069–1520)-ELISA Test and egg burden determined by Kato-Katz methods were analyzed using Spearman test.

2.10. Ethics

All procedures involving animals were approved by the local Ethics Commission on Animal Use (CEUA) from Fiocruz (1W25-10) and Ethics Committee on Animal Use CETEA from UFMG (protocol 179/2010). The use of sera from individuals living in Pedra Preta endemic area for schistosomiasis was approved by the Ethical Research Committee of the René Rachou Research Institute – Fiocruz (CEPSH/CPqRR 03/2008) and the National Ethical Board (784/2008, CONEP14886). The use of sera from Healthy Donor

was approved by the Ethical Research Committee of the René Rachou Research Institute – Fiocruz (CEPSH/CPqRR 03/2008: 105/2004-OF.215-TEC) and the National Ethical Board (784/2008, CONEP14886). The objectives of the study were presented and explained to all participants and written consent was obtained through signing a form before admission to the study.

3. Results

3.1. B cell epitopes prediction

Predicting epitopes in antigen sequence is one rational criteria for screening candidate antigens to be used in immunodiagnosis. Using the whole Sm200 amino acid sequence we performed B cell epitope prediction of linear B cells epitopes. Our results demonstrated that among the 38 B cells epitopes predicted by BCPred in the sequence Sm200, the rSm200 (1069–1520) C-terminal part present 13 epitopes corresponding to 34% of total B cells epitopes predicted for whole protein (Fig. 1).

3.2. SDS-PAGE and Western blot 1D

The expression, purity and immunogenicity of rSm200 (1069–1520) 6×His-tag fusion protein were assessed by SDS-PAGE and Western blotting analysis. Fig. 2 demonstrates a protein with approximately 66 kDa, which is recognized by an anti-his antibody (Fig. 2A) and by pool of sera from mice infected with *S. mansoni* (Fig. 2B). Any non-specific recognition of the rSm200 (1069–1520) was observed using sera from non-infected mice (Fig. 2B).

3.3. Recognition of the rSm200 (1069–1520) by sera from mice and individuals infected with *S. mansoni*

In order to evaluate sera reactivity to rSm200 (1069–1520) we measured specific anti-rSm200 (1069–1520) IgG in sera from non-infected and infected mice (15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 and 140 days post-infection). No significant difference in the reactivity to rSm200 (1069–1520) was observed between sera from non-infected mice and sera from mice at days 15, 30, and 45 post-infection (Fig. 3A). Significant increased rSm200 recognition was observed in sera from *S. mansoni* infected mice 60, 90, 120 and 140 days post infection compared to sera from non-infected mice (Fig. 3A). To evaluate the performance of rSm200 (1069–1520) as antigen in ELISA tests for the diagnosis of schistosomiasis, rSm200 recognition by sera from *S. mansoni* infected mice (in acute and chronic phase of the disease) was assessed. For this purpose we divided sera in four groups: negative (non infected mice), acute (sera from infected mice collected between 15 and 90 days after infection), chronic (sera from infected mice collected between 120 and 140 days post-infection) and infected (sera from *S. mansoni* infected mice from both acute and chronic phases). In order to determine rSm200 (1069–1520)-ELISA cut-off 120 sera from non-infected mice and 120 sera from infected mice were evaluated and the absorbances observed were analyzed in the ROC curve test. A cut-off of 0.3228 abs was determined and used to evaluate rSm200 (1069–1520)-ELISA sensitivity and specificity. Comparing the absorbances values, significant differences between the negative group and the other groups (acute, chronic and infected) were observed (Fig. 3B). However, rSm200 (1069–1520)-ELISA test presented 99.17% of specificity and 50% of sensitivity when used in the diagnosis of schistosomiasis regardless of disease phase. In order to assess cross recognition, ELISA test was performed using rSm200 (1069–1520) as antigen against sera from mice infected with *A. suum* or *A. coylei* and no cross-recognition was observed

MYFLQLFLFLFTSVCNTLSDLHSNNVVDIKAHDYKLLTKILAAROLQDLFDN
 DKNTHTGLFHAELNQVYLIIVDLGGLYQVSSVEITSDEPENLKQTIISIGYGF
 KNTTSLFGSLYNCTYQQTSTLCIPACSQYDNSRTGFVGNSELLWSFQSDKEGW
 TRIYDLIIRGTFDENRSMKNNLDDITLFPKYADHLVPAESMESCNGLLWHL
 NDESSVTESSALAAATDDRNVTIYFGKTYSVTSVHFVTSKRDDMPQEYTLHFN
 GMESLTKIINLQNDCTLTASSDNDGANFKEYNCPTTDLESYTFDYVTVNVKG
 LYKLHVYGLPFHYPKIQIIPSKEDDKTIMVDKNVLQISCIAQSCNSTSNVLL
 DVDDSYRRSRSSDKSCPMNGHIVRCEYLNLFRLSTSPNDDNNQIKQLTNQGI
 INTFSEIMTELRIIQSNAEKLIVTMRTHQYYSQYECSCQATDNKKSQLF
 LSTNLKPTDFDQDFIQFTNYTTIFADQTIESHVGFIELPENEHESYFKLNI
 GYSLNDVQIGVVFVEGGQAGSRTNANIEEISVQAFFGINVGSDLWSIPVYK
 YELQDVWPDSVDDSVITVTSMPKALSATKSPSVIRDIRALIIITSSGVNTI
 RAWVWRDSHLLDIRAYHQLDENNVDSQLKILTQRSGCSPSESEDEVVASV
 QLKDGQCSTDNNDIITCTRTHGQIIQFKLNNPSTSDVYKLYMKSDGVEDNV
 ESTSSIDLVTSGSLGETVKEDIKAGLSLTVEGIHNNHETQETELDVAVHIA
 SKVISDNIACRPTYLLLEFIEPNIETLKSRSVSSKQTMFRIKLPNSQKEINLK
 MQLSIGSVDPQTQSEATTNQSIAFQNPFIPTDIKVDENQLIQWFLPTIFN
 NLLHHYETKLSGLPKACEQASEFNLPITQQEIDNGTIYRVNLKNIPDPTITK
 NGLAIDYNFKVTPVFKGIDGKSITMGTSSEDIRFSTGRGTQDLKAPTSGRY
 SLQVQVRPSQIPSCNLETLNTQFILRVIGEVDEYPDYIKQVNYVPIIMKTT
 ETLNDKNNHVKLYKIENLLPGRRYELQAEVIYTEDFRDKISEPVRLWIEDEV
HVQTEEVFISPGERVVINCTGSGVGNPNTSOKSLEWKLEFDGGRLPDGSRSLKT
QEAQSGPLWYAMESLIFDPVNKQGGVYACFIRPSILELMNKPTLHKVTVT
VSDLEVDINSKIVEFGEKIIITCRTASPGQLDWMLPSGEKVEIMNEMKSDDD
NDDQPYTIKDENDDVKLSIKLIIIPKVNLNKVGKYTCLHSPSNNKQTFSLKMK
EVIKLVKSPSSDKPGKTLILDCTANLGNLHQSVVWYKRPNSNSPWLEITEA
IQTIEHITIQQKNPEDTLSGGVWLSLELKVKNSPGIIGEFMCTIQNIQTMMNI
ERMETGSIIMTNDNDFSKI THATIKVSLKSVLKILTPIKLENGQISVHCQGYF
AHSDRLQWVYIPLNTDNKSDKVIITVHSNPKDEENDQESDGNTKSLDEKEI
DEIVSLAFQLTDSIPATWPGSTGPQQLVQSGLIEQEHQPKQMYTAERLSLIF
 DSKYAEKVADGILSCRYVRPKGILPMDSDAAESLSKVTIPETNDDSDLEILE
 KSEIEMKTLDDAKQGGDDNDNLSILKSSLNEEPDEVQSDDKNNTEKKSISLL
 LYMNLMALMIIFMRN

Fig. 1. B cell epitope predicted in Sm200 protein. The highlighted amino acids within the whole Sm200 protein sequence represents B cell epitopes predicted using BCPred software. Amino acid position in the rSm200 (1069–1520) recombinant protein sequence was boldfaced and underlined.

(Fig. 3C). Sera from individuals with negative stools after examination, from low intensity infected individuals from an endemic area for schistosomiasis and sera from healthy donors not living in endemic area for schistosomiasis were used to evaluate efficacy of rSm200 (1069–1520)-ELISA test in the natural host. Significant recognition of rSm200 (1069–1520) by sera from individuals living in endemic area for schistosomiasis was observed in comparison to healthy donor group (Fig. 4A). rSm200 (1069–1520) recognition by infected individuals strongly correlates with egg burden detected by Kato-Katz (Fig. 4B), nevertheless no significant differences were observed in rSm200 (1069–1520) recognition by sera from individuals living in a schistosomiasis endemic area with negative (NEG) and positive stools after examination (Fig. 4). To evaluate rSm200 (1069–1520)-ELISA sensitivity and

specificity, a cut-off of 0.176 abs was determined by ROC curve test using healthy donors as the non-infected group and infected individuals as the positive group. A sensitivity of 90% and a specificity of 93.3% was observed.

3.4. Parasitological evaluation of immunized mice

Protective immunity induced by vaccination with rSm200 (1069–1520) was evaluated 45 days after challenge with 100 *S. mansoni* cercariae. Mice vaccinated with rSm200 elicited no statistically significant reduction in worm burden compared to control mice. Additionally, no reduction in number of eggs per gram of liver was observed in rSm200 (1069–1520) immunized mice in comparison to control group (Table 1).

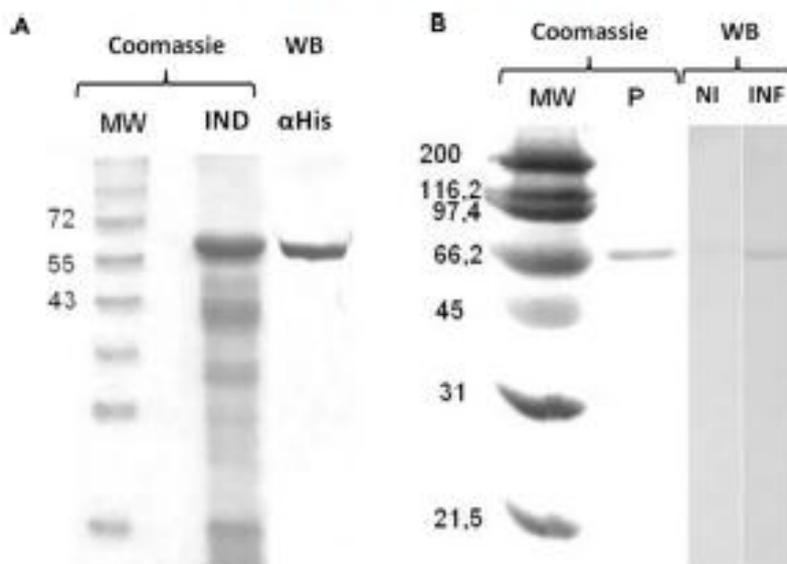


Fig. 2. Expression and purification of rSm200 (1069–1520) 6 × His fusion proteins. (A) Not purified rSm200 (1069–1520) sample (IND) and PageBlue Protein Ladder (Thermo Scientific) (MW) was loaded into a 12% SDS-PAGE to evaluate rSm200 molecular weight. rSm200 expression was confirmed by anti-His recognition by Western blot analysis. (B) rSm200 purified protein (P) and broad range protein marker (BioLad) (MW) were loaded in a 10% SDS-PAGE to evaluate rSm200 molecular profile and its recognition by sera from *S. mansoni* infected (INF) and Non-infected (NI) Swiss mice by Western blot.

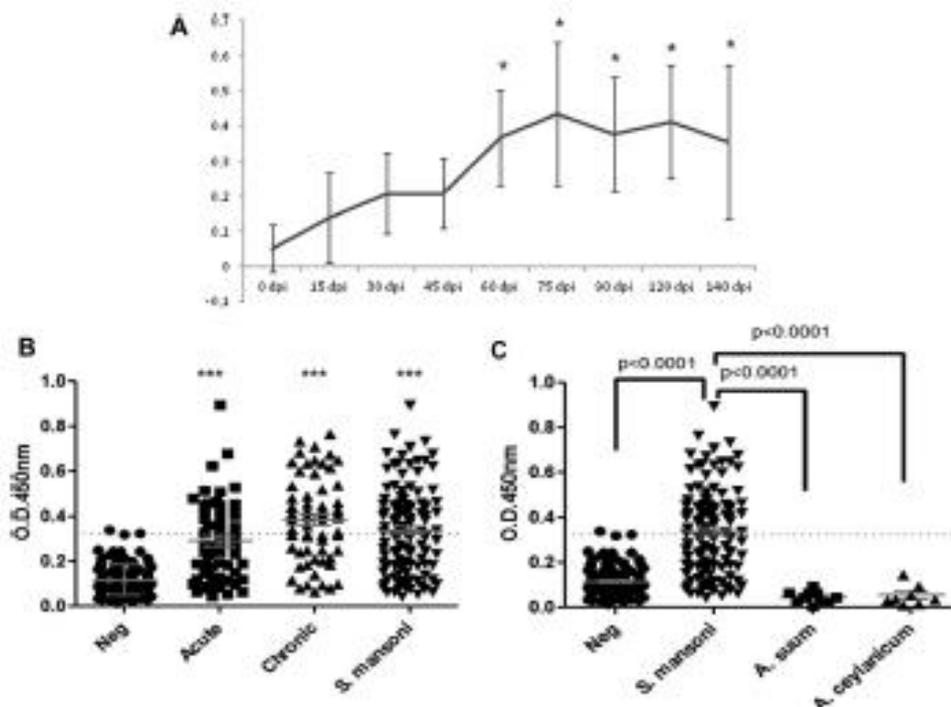


Fig. 3. IgG measurement in mice sera against rSm200 (1069–1520). (A) Kinetics of specific IgG production after *S. mansoni* infection. Swiss mice were bled 1 day before infection (–1, negative control sera) and 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 140 days post-infection as shown in graphic. The line represents mean absorbance in each time point. Significant differences in relation to negative sera are denoted by an asterisk (*) $P < 0.05$. (B) Levels of total IgG against rSm200 (1069–1520) in sera from Swiss mice of different groups: negative (sera from non-infected mice), acute (sera from infected mice collected 15–90 days post-infection), chronic (sera from infected mice collected 120–140 post-infection) and infected (sera from infected mice in both acute and chronic phase of disease). Statistically significant differences in IgG levels compared to negative group are denoted by asterisk *** ($P < 0.001$). (C) Levels of total IgG against rSm200 (1069–1520) detected in sera from Swiss mice infected with *S. mansoni*, Balb-c mice infected with *Acetivus baumannii* or CS 70L-6 mice infected with *Anoplolepis ceylanicum* to evaluated cross-recognition. Dashed lines represents the test cut-off.

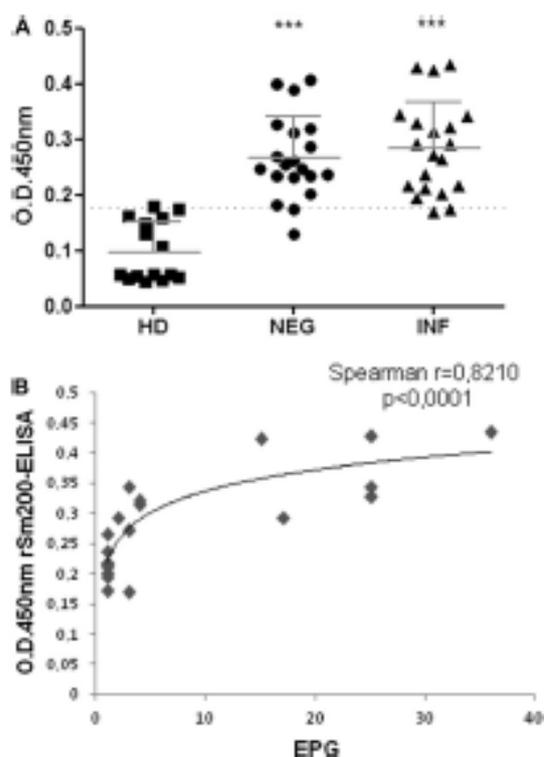


Fig. 4. IgG levels detected in human sera by rSm200 (1069–1520) Indirect Enzyme Immunosorbent Assay. (A) Sera samples were collected from 40 individuals living in a low endemic area for *S. mansoni* infection. Samples from 20 individuals with negative stool examination (NEG) and from 20 individuals with positive stool examination were evaluated (INF). Additionally, sera from 15 health donors (HD) not living in endemic area for schistosomiasis were evaluated. Statistically significant differences in IgG levels compared to health donors are denoted by asterisks *** ($P < 0.001$). Dashed lines represent the test cut-off. In (B) the correlation between parasite burden and sera reactivity to rSm200 (1069–1520) was assessed. The number of eggs per gram of feces were determined by Kato-Katz test evaluating 18 slides from 4 stool samples. The reactivity from sera to the rSm200 was assessed in absorbance in a rSm200 (1069–1520)-ELISA. The correlation was determined by Spearman correlation test. Spearman r and P value are pointed in the graphic.

Table 1
Parasitological evaluation in mice immunized with rSm200 (1069–1520).

Groups	Worm burden (Mean \pm S.D.)	Protection	Eggs per gram of liver (Mean \pm S.D.)
Trial 1			
Control (PBS+CFA/IFA)	50.1 \pm 10.7	–	2464.2 \pm 1511
rSm200 (rSm200 (1069–1520)+CFA/IFA)	50.1 \pm 8.8	0%	2678.8 \pm 4463
Trial 2			
Control (PBS+CFA/IFA)	30.5 \pm 7.5	–	nd
rSm200 (rSm200 (1069–1520)+CFA/IFA)	34.7 \pm 7.4	0%	nd

nd, not determined.

3.5. Immune response induced by immunization with rSm200 (1069–1520)

In order to evaluate the immune response induced by immunization of mice with rSm200 (1069–1520), assays for specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies and cytokine measurement were

performed. Sera of ten immunized animals from each group were tested by ELISA. All rSm200-immunized mice developed significant levels of specific IgG and IgG1 antibodies after the first immunization dose compared to control group (Fig. 5A and B). However specific IgG2a production was not observed (data not shown). Also significant amounts of IFN- γ , and IL-10 in response to rSm200 (1069–1520) stimulation were detected in spleen cell culture supernatants from immunized mice in comparison to control group (Fig. 5C). No significant differences in TNF- α production was observed between groups (Fig. 5C) and IL-4 production was not detected (data not shown).

4. Discussion

Schistosomiasis control requires new tools such as a more sensitive immunodiagnosis test and an efficient vaccine in order to transpose the existing limitations of the current chemotherapy-based control strategy. The first step in developing these tools is the choice of an antigen able to increase the sensitivity of the diagnosis test without the undesirable cross-reactions and to induce a protective immune response in immunized mice. Sm200, a glycoprotein present in the tegument of *S. mansoni* adult worms, is a candidate to be used in ELISA-based diagnosis tests and in vaccine formulations against schistosomiasis due to its *in silico* predicted immunogenicity (Carvalho et al., 2011).

In order to be a good candidate for vaccine and diagnosis, an antigen may present B cell epitopes recognized by sera from infected individuals and also may be able to induce a protective immune response in immunized individuals. Antibodies have been described to be involved in parasite elimination or in the anti-fecundity effect induced in the parasite by immunization in many vaccine formulations against schistosomiasis (Boulanger et al., 1991; Jankovic et al., 1999; Capron et al., 1992; Torben et al., 2012). The C-terminal recombinant part of Sm200 evaluated in this study present 34% of the B cell epitopes predicted in the whole protein and retained its antigenicity, since sera from infected mice recognized the recombinant Sm200.

In ELISA assay, the reactivity of sera from infected mice to rSm200 (1069–1520) increased as the parasite developed inside the definitive host (Fig. 3A). These observations are in agreement with Norden and Strand (1985) study that detected the highest titers of antibodies against Sm200 140 days post infection. Furthermore, the predicted expression levels from schistosome tegument proteins in the different parasite life stages to the definitive host indicates that Sm200 has low expression levels in cercariae and schistosomula stage, medium expression levels in eggs and is highly expressed in adult worms (Fonseca et al., 2012). The rSm200 (1069–1520)-ELISA based diagnosis test was able to detect 60 infected mice in 120 animals that had been infected with approximately 25 cercariae from the LE strain, leading to a sensitivity of 50%. In the group of 120 non-infected mice, only one animal was wrongly considered to be infected by *S. mansoni*, resulting in 99.17% of specificity. This false positive report cannot be attributed to cross reaction due to *A. saim* or *A. ceylanicum* infection, since no cross recognition was observed using sera from animals infected with these two helminthes.

The diagnosis of schistosomiasis in individuals with high parasite burden is readily performed by stool examination tests as the Kato-Katz method. However in low endemic areas where individuals are infected with a low parasite burden Kato-Katz analysis of one slide from one stool sample presents 22.2% sensitivity (Siqueira et al., 2011). Increasing the number of slides and stool sample to 18 and 4 respectively increases the sensitivity of Kato-Katz method to 80.6% and the number of stool positive individuals increases if both Kato-Katz (18 slides/4 stool samples) and TF-Test[®] are used

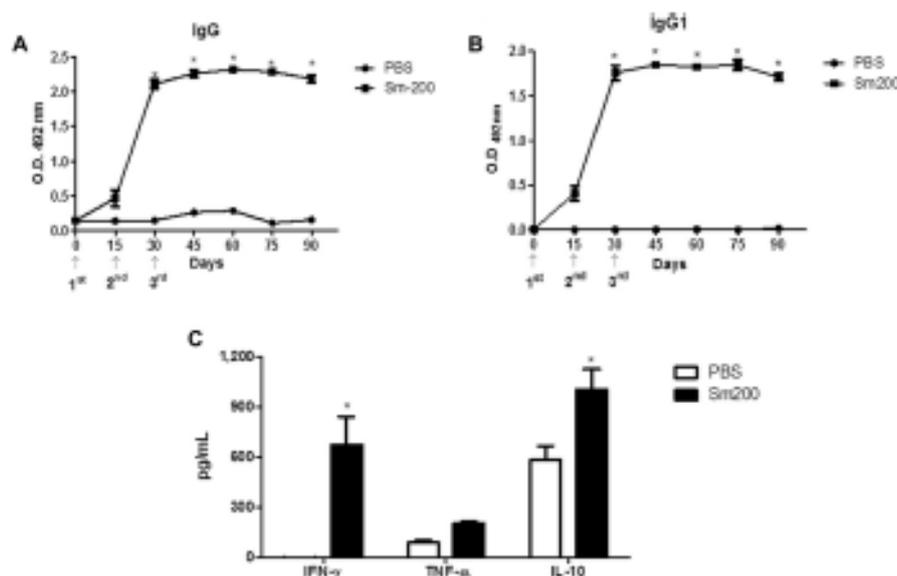


Fig. 5. Immune response induced by rSm200 (1069–1520) in C57 BL/6 immunized mice. Kinetics of specific IgG (A) and IgG1 (B) antibodies against rSm200 (1069–1520) was evaluated by ELISA using individual sera from ten animals per group, collected at days 15, 30, 45, 60, 75 and 90 after the first immunization. Results are presented as the mean absorbance measured at 492 nm \pm S.D. from two independent experiments. Statistically significant differences is denoted by an asterisk (* $P < 0.05$). The cytokine profile induced by immunization (C) was evaluated 1 week after the last immunization in spleen cells isolated from rSm200 (1069–1520) immunized mice and control group (PBS). IL-10, IFN- γ and TNF- α production in response to rSm200 (1069–1520) stimulation (2.5 mg/ml) are presented as mean \pm S.D. for each group. A statistically significant difference between immunized and control group is denoted by an asterisk* ($P < 0.05$).

in the diagnosis of the disease (Siqueira et al., 2011). The use of sera from individuals living in low endemic area for schistosomiasis demonstrated that rSm200 (1069–1520)-ELISA discriminates between non-infected healthy donors and infected individuals living in endemic areas for schistosomiasis, but does not discriminate those individuals from endemic areas known to have negative or positive stools examination. The high recognition of rSm200 (1069–1520) by sera from individuals living in endemic areas for schistosomiasis with stool negative exams could represent antibody responses to a previous infection or an undetected infection status even after our parasitological examination strategy. These results demonstrate that rSm200 (1069–1520)-ELISA can be used to exclude the diagnosis of schistosomiasis in individuals presenting similar disease symptoms. Once the symptoms of schistosome infection are similar to the symptoms associated with other intestinal infections, rSm200 (1069–1520)-ELISA represents an important tool to help physicians to make a correct diagnosis.

Furthermore, the use of rSm200 (1069–1520) as an antigen in the immunization of mice failed to induce a protective immune response (Table 1). The ability of Sm200 to induce protection in mice had been demonstrated by Nascimento and co-workers in 2007 in a gene vaccination strategy that elicited high levels of IgG, IgG1 and low levels of IgG2a conferring 33–44% of protection (Nascimento et al., 2007). More recently, a preparation containing the GPI-anchored proteins of the *S. mansoni* tegument surface in which Sm200 corresponds to 87% of the total amount of protein (Castro-Borges et al., 2011b), also induced partial protection in mice (Martins et al., 2012). The protection induced by immunization against schistosomiasis has been described to be associated with a Th1 type of immune response (Sher et al., 1990; Smythies et al., 1992; Wilson et al., 1996; Street et al., 1999; Fonseca et al., 2004; Teixeira de Melo et al., 2010). The absence of protection observed in our immunization protocol can be attributed to a high production of IL-10 that is an immunomodulatory cytokine. High

production of IL-10 has also been described by our group to be associated with an impaired immune response induced by immunization with schistosome tegument (Smteg) that abrogated the protection observed in a Smteg plus Freund's adjuvant (Araujo et al., 2012). Another difference between our formulation and other formulations using Sm200 lies in the absence of the N-terminal part of the protein in our recombinant Sm200. This might lead to a loss of important epitopes from the protein involved in protective immunity. Indeed the prediction of T cell epitope, using the software NetMHCII 2.2 Server – prediction results (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) demonstrated that only one region between the 586 and 603 amino acid in N-terminal part of the protein strongly binds to IAB alleles from MHCII (data not shown). Since rSm200 was expressed as a recombinant protein containing the C-terminal part of the native protein, some conformational B cells epitopes might have been lost and this could also have had an impact in the antigen capacity to induce protective immune response.

In conclusion, our study demonstrates that rSm200 (1069–1520) is not a good candidate to be in a vaccine formulation and suggest that the N-terminal part of the protein is involved in its ability to induce protection in mice. However rSm200 (1069–1520)-ELISA, together with epidemiological data, represents an important tool to be used in the diagnosis of schistosomiasis.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/HOCRUZ for use of its facilities and Dr. John Kussel for English revision of this manuscript. Sponsorships: CPqRR-FIOCRUZ, CNPq, FAPEMIG, RIPAq/FIOCRUZ. Fellowships: CPqRR/Hocruz (GBFC); PV/CNPq (LGCP); Capes (IMVS); PQ/CNPq (SCO); PQ/CNPq (PMZC); PQ/CNPq (RTF); PQ/CNPq (CTF).

References

- Aratijo, J.M., Melo, T.T., Sena, I.C., Alves, C.C., Aratijo, N., Dardes, F.D., Oliveira, S.C., Fonseca, C.T., 2012. *Schistosoma mansoni* schistosoma tegument (Smtg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection. *Acta Trop.* 124, 140–146.
- Berçante, J.M., Berçante, T.A., Dias, S.R., Viçosa, L.Q., Lima, W.S., Negredo-Costa, D., 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol. Res.* 89, 89–91.
- Boulanger, D., Reid, G.D., Stumock, R.E., Wolowczak, I., Ballou, J.M., Gezal, D., et al., 1991. Immunization of mice and humans with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13, 473–480.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brindley, P.J., Strand, M., Norden, A.P., Sher, A., 1989. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 99–108.
- Capron, A., Desaint, J.P., Capron, M., Pierce, R.J., 1982. Vaccine strategies against schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87, 19–27.
- Cardozo, F.C., Macedo, G.C., Gava, E., Kitten, G.T., Matt, V.L., Melo, A.L., Caliani, M.V., Almeida, G.T., Venancio, T.M., Viejovski-Almeida, S., Oliveira, S.C., 2008. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protect mice against parasite infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (10), e308.
- Carvalho, G.B.F., Silva-Pereira, R.A., Pacifico, L.G.G., Fonseca, C.T., 2011. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 837–843.
- Castro-Borges, W., Dowling, A., Curwen, R.S., Thomas-Gates, J., Wilson, R.A., 2011a. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (3), e983.
- Castro-Borges, W., Simpson, D.M., Dowling, A., Curwen, R.S., Thomas-Gates, J., Beynon, R.J., Wilson, R.A., 2011b. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QchipCAT proteomics. *J. Proteomics* 24, 1519–1533.
- Coats, J.R., Aranzáiz, S., 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 13–19.
- Dorenhoff, M.J., Rawil, J.R., Coles, G.C., Ciolek, D., 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 465–469.
- Engels, D., Chikulo, L., Montresor, A., Savioli, L., 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.* 82, 139–146.
- Feldman, H., Poggendorf, G., 1983. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. *Acta Trop.* 52, 205–220.
- Finwick, A., Webster, J.P., 2006. Schistosomiasis – challenge for control, treatment and drug resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 577–582.
- Fonseca, C.T., Brito, C.F., Alves, J.B., Oliveira, S.C., 2004. E-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- γ and TNF- α dependent pathway. *Vaccine* 2, 503–510.
- Fonseca, C.T., Carvalho, G.B.F., Alves, C.C., Teixeira de Melo, T., 2012. *Schistosoma* tegument proteins in vaccine and diagnosis development: an update. *J. Parasitol. Res.* 2012, 541268.
- Hall, T.M., Joseph, G.T., Strand, M., 1985. *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen. *Exp. Parasitol.* 60, 242–249.
- Jankovic, D., Wynn, T.A., Kullberg, M.C., Capor, R., James, S., Cheever, A.W., Sher, A., 1999. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- γ dependent effector mechanisms. *J. Immunol.* 162, 345–351.
- Jonas, M.K., Gobet, G.N., Zhang, L., Sandeford, P., McManus, D.P., 2004. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *BioEssays* 26, 752–765.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative thin-layer technique in *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 14, 397–400.
- Kopp, A., Mark, G., Verbe, P., Van der Stuyft, P., 2001. The unreliability of the Katz-Katz technique limits its usefulness in reevaluation of *S. mansoni* infections. *Trop. Med. Int. Health* 6, 163–169.
- Martins, V.P., Pinheiro, C.S., Figueiredo, B.C.P., Assis, N.R.G., Moisés, S.B., Caliani, M.V., Azevedo, V., Castro-Borges, W., Wilson, R.A., Oliveira, S.C., 2012. Vaccination with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 962538.
- Nascimento, E.J., Amorim, R.V., Cavalcanti, A., Alves, V.E., Nakazawa, M., Pereira, V.B., Lucena-Silva, N., 2007. Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegument antigen complexed to protamin sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102, 21–27.
- Norden, A.P., Strand, M., 1985. Identification of antigenic *Schistosoma mansoni* glycoproteins during the course of infection in mice and humans. *Am. J. Trop. Med.* 34, 495–507.
- Pan American Health Organization/World Health Organization, 2007. Preparatory Meeting on Epidemiological Data Needed to Plan Elimination of Schistosomiasis in the Caribbean. PAHO/WHO, St. George (December 13–14).
- Pellegrino, J., Siqueira, A.F., 1955. Técnica de perfusão para cultura de *Schistosoma mansoni* em cobaias experim. em laboratório. *Rev. Bras. Malariol Doenças Trop.* 8, 589–597.
- Racovich, E.L., Davies, S.J., Pearce, E.J., 1999. Groves-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104, 285–297.
- Sauna, S.Y., Strand, M., 1990. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38, 199–210.
- Sauna, S.Y., Tanaka, T.M., Strand, M., 1991. Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 73–80.
- Sher, A., Goffman, R.L., Hwang, S., Cheever, A.W., 1990. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-I-E or anti-I-L4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.* 145, 3911–3916.
- Siddiqui, A.A., Phillips, T., Chame, H., Podesta, R.B., Quintán, M.L., Pinheiro, J.R., Lloyd, J.D., Paz, M., Villalobos, R.M., Pompa, J., 2003. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* via DNA priming and boosting with the large subunit of calpain (Sm-p80) adjuvant elicits of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4. *Infect. Immun.* 71, 3844–3851.
- Siqueira, L.M., Coelho, P.M., Oliveira, J.A., Moreira, C.L., Cordeiro, N.F., Lima, A.C., Elk, M.J., 2011. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 844–850.
- Smythies, L.E., Coulson, P.S., Wilson, R.A., 1992. Monoclonal antibody to IFN- γ modulates pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.* 149, 3654–3658.
- Stout, M., Coulson, P.S., Sedler, C., Wamock, L.J., McLaughlin, D., Bashirwan, H., Wilson, R.A., 1999. TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *J. Immunol.* 163, 4489–4494.
- Teixeira de Melo, T., Michel de Aratijo, J., Da Valle Dames, F., Caliani, M.V., Oliveira, S.C., Coelho, P.M., Fonseca, C.T., 2010. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosoma tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. *Parasite Immunol.* 32, 749–759.
- Torben, W., Ahmed, G., Zhang, W., Nash, S., Le, L., Kermark, S., Siddiqui, A.A., 2012. Role of antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni*. *Vaccine* 30, 6753–6758.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- Tran, M.H., Pearson, M.S., Bethony, J.M., Smyth, D.J., Jones, M.K., Duke, M., Don, T.A., McManus, D.P., Correa-Oliveira, R., Loukas, A., 2006. Tegumentin on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat. Med.* 12, 835–840.
- Van der Werf, M.J., de Vlas, S.J., Brooker, S., Looman, C.W., Nagelkerke, N.J., Habberna, J.D., Engels, D., 2003. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* 86, 125–139.
- Van Hellemond, J.J., Brito, K., Branswen, J.E., et al., 2005. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *Int. J. Parasitol.* 35, 691–699.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Brito, C., Dowling, M.A., Smythies, L.E., 1996. Impaired immunity and altered pulmonary response in mice with a disrupted interleukin-1 receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 87, 275–282.

ANEXO II - Revisão publicada dentro do assunto do trabalho de doutorado

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Parasitology Research
Volume 2012, Article ID 541268, 8 pages
doi:10.1155/2012/541268

Review Article

Schistosoma Tegument Proteins in Vaccine and Diagnosis Development: An Update

Cristina Toscano Fonseca,^{1,2} Gardênia Braz Figueiredo Carvalho,¹
Clarice Carvalho Alves,¹ and Tatiane Teixeira de Melo¹

¹Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil

²Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil

Correspondence should be addressed to Cristina Toscano Fonseca, ctoscano@cpqrr.fiocruz.br

Received 27 July 2012; Accepted 24 September 2012

Academic Editor: Andrea Teixeira-Carvalho

Copyright © 2012 Cristina Toscano Fonseca et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The development of a vaccine against schistosomes and also the availability of a more sensitive diagnosis test are important tools to help chemotherapy in controlling disease transmission. Bioinformatics tools, together with the access to parasite genome, published recently, should help generate new knowledge on parasite biology and search for new vaccines or therapeutic targets and antigens to be used in the disease diagnosis. Parasite surface proteins, especially those expressed in schistosome tegument, represent interesting targets to be used in vaccine formulations and in the diagnosis of early infections, since the tegument represents the interface between host and parasite and its molecules are responsible for essential functions to parasite survival. In this paper we will present the advances in the development of vaccines and diagnosis tests achieved with the use of the information from schistosome genome focused on parasite tegument as a source for antigens.

1. Introduction

Schistosomiasis is still a significant public health problem in tropical countries despite the existence of effective drugs against the parasite [1]. Chemotherapy as a strategy for disease control has proved ineffective in controlling transmission [1] therefore, the development of a vaccine against the disease and also a more sensitive diagnosis test is necessary to assist chemotherapy in control programs [1, 2].

In this context, the recent availability of schistosome genomes information represents an important tool to be used in the discovery of new targets for vaccine and diagnosis. *Schistosoma mansoni* genome, published in 2009 [3] described 11,809 genes while *Schistosoma japonicum* genome [4] has been described to be composed of 13,469 genes. Their assemblies were generated by conventional capillary sequencing resulting in 19,022 scaffolds (*S. mansoni*) and 25,048 scaffolds (*S. japonicum*). More recently an improved version of the *S. mansoni* genome was published [5], utilizing

a combination of traditional Sanger capillary sequencing and deep-coverage Illumina sequencing that refined gene prediction resulting in a reduction in the number of predicted genes from 11,809 to 10,852. Illumina-based technology was also used in *Schistosoma haematobium* genome sequencing, which described 13,073 genes [6].

Simultaneously to genome publication, an important tool to access and analyze parasite genome has been developed, the SchistoDB (<http://www.schistodb.net/>) database [7]. The SchistoDB enables access to information on the parasite genome even to those researchers not specialized in computer language. The current 3.0 database version provides access to the latest draft of *S. mansoni* genome sequence and annotation and also to *S. japonicum* and *S. haematobium* genome annotation.

The bioinformatics tools, together with the availability to access parasite genome, should have helped the knowledge of parasite biology and the search for new vaccines, therapeutic targets, and antigens to be used in the disease diagnosis. In

this paper we will present the advances in the development of vaccines and diagnostics tests achieved with the use of the information from schistosome genome, focus will be given to the parasite tegument as a source for antigens.

2. Host-Parasite Relationship: Role for the Parasite Tegument

Highly adapted to parasitic life, schistosomes can live for years or decades even in a hostile environment as the circulatory system from vertebrate host where the parasite has an intimate contact with circulating elements of the immune system [8].

In this successful host-parasite relationship, the host immune system plays an important role in both parasite development and elimination. CD4+ cells, hormones, and cytokines as TNF- α , TGF- β , and IL-7 produced by the host, seem to assist the parasite development [9–15]. While CD4+ cells, B cells, IFN- γ , and TNF- α has been described to be involved in parasite elimination in the irradiated cercariae vaccine model [16–18].

Moreover, the highly adapted relationship between schistosomes and the mammalian definitive host also involves the effective mechanisms for evading the immune response that they provoke. In this context, the parasite tegument plays an important role [19, 20]. After penetration, the parasite surface undergoes a profound change that allows parasite adaptation into the host internal microenvironment where the parasite switches from its immune-sensitive to an immune-refractory state [21]. In cercariae, the surface is characterized by a single bilayer membrane covered by a dense glycocalyx. During penetration, the glycocalyx is lost and the membrane transforms into a double bilayer membrane [22]. Evading mechanisms as antigenic mimicry, membrane turnover, production of immunomodulatory molecules and modulation of surface antigens expression also takes place in the parasite surface and contributes to schistosome survival [23, 24].

Trying to eliminate the parasite, host immune system targets the antigens in parasite surface. Studies in mice have shown that the developmental stage most susceptible to the host immune system attack is the schistosomula stage. Very early after infection, schistosomula are susceptible to cellular and humoral immunity, however, in the course of parasite development the susceptibility is rapidly lost [25, 26]. The resistance to host immune response acquired by parasites can be in part explained by surface changes independently of host antigens adsorption [27–29]. In addition, El Ridi and colleagues [30], demonstrated that lung-stage schistosomulum protect themselves from the host immune system by confining antigenic molecules in lipid-rich sites of surface membrane. In contrast, McLaren, in 1989 [31], demonstrated that both skin and lung schistosomula phases are targets of the immune system in the radiation-attenuated vaccine model which trigger an inflammatory reaction around the larvae inhibiting their migration.

Since schistosomula is the major target of the host immune system attack and its tegument represents the interface between parasite and host, also performing vital

functions that ensure parasite survival [32], the study of its structure and how it interacts with the host immune system can provide important information about disease control, especially to those related to the search for new drugs and vaccine development. We have recently demonstrated that the schistosomula tegument from *S. mansoni* (Smteg) is recognized by TLR4 in dendritic cells (DC) leading to DC activation and production of proinflammatory cytokines as IL-12 and TNF- α [33]. In contrast to this inflammatory profile, Smteg also induce IL-10 production by DC in a TLR (Toll like receptors) 2, 3, 4, and 9 independent manner (unpublished data) once again demonstrating that schistosomula tegument can both activate or modulate host immune system.

3. The Tegument as Antigen Source for Vaccine Development

Most of the studies that aimed to identify membrane proteins in parasite tegument were performed in adult worms [34–36]. Although schistosomula is the major target for host immunity, its tegument proteins have still not been characterized, mainly due to the difficulty in obtaining sufficient quantities of material for such protein studies [37]. Indeed protective antigens are found in *S. mansoni* schistosomula tegument (Smteg) since mice immunization with Smteg formulated with Freund's adjuvant [38] or Alum + CPG-ODN (unpublished data) is able to reduce significantly worm burden and egg elimination with the feces. The characterization of these protective antigens is being performed using immune-proteomics analysis and genome databases to identify candidates to be used in a vaccine formulation against schistosomiasis. Other "omics" technologies are also being used to identify schistosoma proteins, mainly those expressed in schistosomula. In this context, two studies, using cDNA microarrays technologies assessed the most relevant transcriptional changes in the schistosomula development phase. These studies demonstrated that tetraspanin, Sm22.6, Sm29, Sm200 and phosphodiesterase are membrane proteins are highly expressed during schistosomula phase [39, 40]. Furthermore, the studies that used gene silencing through RNAi technique could clarify the importance of some proteins, such as cathepsins [41, 42] and tetraspanins [43] for parasite development and survival. The same membrane protein was identified in adult worm tegument preparations using Mass spectrometry (MS)-based proteomics [33, 34] together with genome, transcriptome and genetic maps information [3, 44–46]. Recently a proteomic analysis demonstrated that Sm29 and Sm200 are linked to parasite surface membrane through a GPI-anchor [47] while the most abundant protein in adult worm tegument, among the investigated molecules, are aquaporin, dysferlin, TSP-2, and ATP diphosphohydrolase [48]. Among this expressive catalogue of protein expressed in the schistosome tegument, some of them have been evaluated as vaccine antigen in immunization protocols in mice. The Table 1 summarizes the results observed in these preclinical trials using tegument proteins.

Sm29 was identified by Cardoso and coworkers using *in silico* analysis to identify in *S. mansoni* transcriptome putative expressed proteins localized in the parasite tegument [49].

TABLE 1: Schistosome tegument protein evaluated as vaccine candidates in preclinical studies.

Protein	Vaccine type	Protection level	Egg reduction	Bioinformatic tool used in antigen selection	References
Sm 21.7	Recombinant protein	41%–70%	ND	ND	[63]
Sm 21.7	DNA vaccine	41.5%	62% (liver) 67% (intestine)	ND	[64]
Cu/Zn superoxide dismutase	DNA vaccine	44%–60%	ND	ND	[65]
Sm TSP2	Recombinant protein	57%	64% (liver) 65% (feces)	BLAST	[57, 83]
Sm29	Recombinant protein	51%	60% (intestine)	InterProScan, SignalP 3.0, Signal IP Neural, NetNGlyc 1.0, BLAST, WolfpsORT, SCSUI, Compute pI/Mw tool,	[49, 50]
ECL (200 kDa protein)	DNA vaccine	38.1%	ND	ND	[61]
Sm 22.6	Recombinant protein	34.5%	ND	BLAST	[53]
Sm TSP 1	Recombinant protein	34%	52% (liver) 69% (intestine)	BLAST	[57, 83]

ND: not determined.

Sm29 recombinant form induces a Th1 profile in mice associated with a reduction of 51% in worm burden when used in vaccine formulation [50]. The tegumental protein, Sm22.6 and its homologue in *S. japonicum* (Sj22.6), are involved in resistance to reinfection in endemic areas [51, 52]. Immunization of mice with recombinant 22.6 formulated with Freund adjuvant resulted in 34.5% reduction on worm burden [53] while Sm22.6 formulated with alum failed to induce protection against schistosomiasis but induced a regulatory response able to modulate allergic asthma in mice [54, 55].

Tetraspanins (TSP) 1 and 2 were identified in a cDNA library from *S. mansoni* based on their membrane-targeting signal [56]. Immunization of mice with TSP1 recombinant protein resulted in a reduction of 57% in worm burden and reduction in the number of eggs in liver (64%) and intestine (65%), TSP2 recombinant protein was less effective in reducing worm burden (34%) but had similar effects in reducing the number of eggs trapped in the liver (52%) and intestine (69%) [57]. The TSP-2 homologues in *S. japonicum* has also been evaluated in murine immunization however no protection was observed [58].

ECL or Sm200 is a GPI-anchored protein in the *S. mansoni* tegument that has also been associated with praziquantel efficacy, since antibodies against this protein can restore drug efficacy in B cells depleted mice [59, 60]. Murine DNA vaccination with the gene encoding Sm200 elicited 38.1% protection while immunization of mice with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from the *S. mansoni* tegument, in which Sm200 represent the most abundant protein result in 43% reduction in adult worm burden [61, 62]. Sm21.7 was tested as antigen in a recombinant vaccine [63] and DNA vaccine [64]. Immunization of mice with recombinant Sm21.7 resulted in a decrease of 41%–70% in worm burden while DNA vaccination resulted in of 41.5% worm burden reduction [63, 64].

The schistosome antioxidant enzymes (Cu/Zn superoxide dismutase-SOD, glutathione-S-peroxidase-GPX) are

developmentally regulated. The lowest level of gene expression and enzyme-specific activity was found in the larval stages while the highest level of gene expression was observed in adult worms [65–68]. This suggests that antioxidant enzymes are important in immune evasion by adult schistosome parasites [67]. Also RNAi assays demonstrated that knocking down the antioxidants enzymes GPX and GST result in dramatic decreases in sporocysts survival indicating that these enzymes are capable of enhancing parasite survival in an oxidative environment [69]. Mice immunized with the antioxidant enzyme Cu-Zn superoxide dismutase in a DNA vaccine strategy resulted in 44–60% reduction in worm burden [65].

4. Antigens to Be Used in Schistosomiasis Diagnostic Test

Currently, all available techniques for the diagnosis of schistosomiasis are characterized by having some limitations, especially when it becomes necessary to detect infection in a large number of patients with low parasite load [70]. One of the initial difficulties in the development of a test for the diagnosis of schistosomiasis is the choice of an appropriate antigen. There are several factors that influence this choice: easily of production, high stability in sample storage, immunogenicity, specificity, and ability to be incorporated to low costs test platforms [71].

In this context, the availability of the complete genome sequences in combination with other technologies such as bioinformatics and proteomics, provides important tools to seek for an ideal candidate to compose an efficient immunodiagnostic test. With this in mind, our group have recently designed an *in silico* strategy based in the principles of reverse vaccinology, and using a rational criteria to mine candidates in parasite genome to be used in the immunodiagnosis of schistosomiasis [72]. Six antigens were selected based on the evidence of gene expression at different phases of the parasite

TABLE 2: *Schistosoma mansoni* protein selected by genome mining to be used in serological diagnosis for schistosomiasis.

Protein	SchistoDB number	Annotation	Number of amino acid	Base pairs	Predicted molecular weight	Predicted isoelectric point	Predicted location
Sm200	Smp_017730	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	1656	4971	186,5 kDa	4.97	Tegument surface membranes
Sm12.8	Smp_034420.1	Expressed protein	117	354	12,8 kDa	6.88	Extracellular
Sm43.5	Smp_042910	Expressed protein	382	1149	43,5 kDa	8.43	Extracellular
Sm127.9	Smp_171300	Hypothetical protein	1143	3432	127,9 kDa	6.63	Extracellular
Sm18.9	Smp_184440	Cytochrome oxidase subunit, putative	171	516	18,9 kDa	9.30	Extracellular
Sm16.5	Smp_184550	Cytochrome oxidase subunit, putative	146	441	16,5 kDa	9.14	Extracellular

Adapted of Carvalho et al., 2011 [72].

life cycle in the definitive host, accessibility to host immune system (exposed proteins), low similarity with human and other helminthic proteins, and presence of predicted B cells epitopes (Table 2) [72]. Although our *in silico* analysis led to identification of six candidates, this strategy has not been yet experimentally validated.

Other groups have also used bioinformatics analysis to select target sequence from *S. japonicum* genome to be used for the detection of parasite DNA in blood samples. A 230-bp sequence from the highly repetitive retrotransposon SjR2 was identified and it was demonstrated that PCR test to detect SjR2 is highly sensitive and specific for detection *S. japonicum* infection in the sera of infected rabbits and patients [73]. More recently the same group performed a comparative study to determine the best target to be used in a molecular diagnosis test for schistosomiasis *japonicum* in 29 retrotransposons identified by bioinformatics analysis. A 303-bp sequence had the highest sensitivity and specificity for the detection of *S. japonicum* DNA in serum samples [74].

Proteomics analysis has also been used in the identification of candidates to the immunodiagnosis of schistosomiasis. Western Blot with sera from *S. japonicum* infected rabbit in a two-dimensional gel loaded with adult worm preparation identified 10 spots that were demonstrated by LC/MS-MS to correspond to four different proteins: SjLAP (Leucine aminopeptidases), SjFBPA (fructose-1,6-bisphosphate aldolase), SjGST (Glutathione-S-transferase) and SjZ2.6 [75]. Recombinant SjLAP and SjFBPA were tested in ELISA assay and presented high efficacy for the diagnosis of *S. japonicum* infection, with 96.7% specificity for both proteins and 98.1% or 87.8% sensitivity to detect acute and chronically infected individuals, respectively, when SjLAP was used as antigen or a sensitivity of 100% (acute) and 84.7% (chronic infection) when SjFBPA was used as antigen [75].

5. Other Membrane Proteins Candidates to Be Used in Vaccine Formulation and Diagnosis Tests

Aquaporins are small integral membrane proteins involved in the selective transportation of water and other solutes through plasma membranes of mammals, plants and lower

organisms [76]. This protein was described to be abundant in schistosome tegument and due to its physiological function and abundance represent an interesting target to vaccines and diagnosis tests [48]. Characterization of the *S. japonicum* aquaporin-3 using bioinformatics tools demonstrated that this 32.9 kDa transmembrane protein has predicted B cells epitopes with the most likely epitopes present in the N-terminal portion of the protein, located outside the membrane [77]. Other abundant protein in schistosome tegument is dysferlin, based on analogy with homologues from other organisms, this protein seems to be involved in membrane repair and/or vesicle fusion in tegument surface [34].

ATP-diphosphohydrolases are enzymes involved in ADP and ATP hydrolysis that has been related to host immune system evasion, since this enzyme could hydrolyze the ATP produced in response to parasite induced stress in the endothelium thus modulating the DAMP (danger associated molecular pattern)-mediated inflammatory signaling [78, 79]. In schistosomes two different proteins have been described SmATPDase 1 and SmATPDase2 with approximately 63 and 55 kDa [80, 81]. SmATPDase 1 is located in the border of the tegument while SmATPDase2 is located in internal structure of the tegument syncytium and can be secreted [81]. The immunogenicity of the synthetic peptide (r175-190) from SmATPDase2 has been demonstrated in Balb-c mice, however the protection induced by this epitope has not been evaluated [82].

Although most tegument protein listed in this paper has been identified in adult worm tegument, an *in silico* analysis performed in SchistoDB (<http://www.schistodb.net/>) demonstrates that some of them are also expressed in the schistosomula stage as demonstrated in Figure 1 reinforcing their potential to be used in a vaccine formulation or in the early diagnosis of schistosome infection.

6. Conclusion

So far the genome, transcriptome, and proteome information provided many targets to be tested in schistosomiasis vaccine and diagnosis and also new knowledge about schistosome biology. However approximately 40% of the schistosome genome is composed of hypothetical proteins with unknown function that represents interesting targets to be

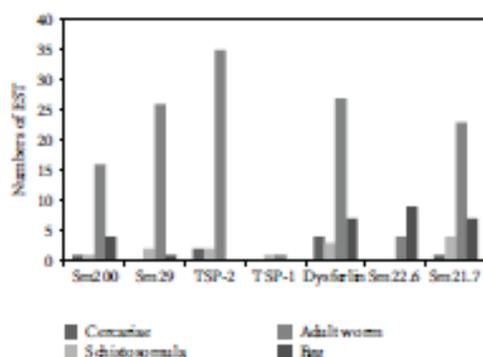


FIGURE 1: Predicted expression of schistosome tegument proteins in the different parasite life stage in the definitive host. schistosome tegument protein identified by proteomics analysis of the adult worm tegument was analyzed in SchistoDB database (<http://www.schistodb.net/>). Bars represent the numbers of EST in each parasite life stage whose annotation correspond to Sm200, Sm29, TSP-2, TSP-1, Dysferlin, Sm22.6, or Sm21.7.

tested and characterized. An increase in the knowledge about parasite biology, pathogenesis, and host-parasite relationship can be expected for the next years.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, INCT-DT/CNPq, Ripaq/CPqRR-Fiocruz, and Papes/Fiocruz. G. B. F. Carvalho and C. C. Alves both received fellowship from Fapemig. C. T. Fonseca received a fellowship from PQ/CNPq.

References

- [1] N. R. Bergquist, L. R. Leonardo, and G. F. Mitchell, "Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach?" *Trends in Parasitology*, vol. 21, no. 3, pp. 112–117, 2005.
- [2] N. Berhe, G. Medhin, B. Erko et al., "Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*," *Acta Tropica*, vol. 92, no. 3, pp. 205–212, 2004.
- [3] M. Berriman, B. J. Haas, P. T. Loverde et al., "The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*," *Nature*, vol. 460, no. 7253, pp. 352–358, 2009.
- [4] Y. Zhou, H. Zheng, Y. Chen et al., "The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay," *Nature*, vol. 460, no. 7253, pp. 345–351, 2009.
- [5] A. V. Protasio, I. J. Tsai, A. Babbage et al., "A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 1, Article ID e1455, 2012.
- [6] N. D. Young, A. R. Jex, B. Li et al., "Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*," *Nature Genetics*, vol. 44, no. 2, pp. 221–225, 2012.
- [7] A. Zerlotini, M. Heiges, H. Wang et al., "SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 1, pp. D579–D582, 2009.

- [8] A. R. C. Harris, R. J. Russell, and A. D. Charters, "A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 78, no. 3, pp. 385–388, 1984.
- [9] S. J. Davies, J. L. Grogan, R. B. Blank, K. C. Lim, R. M. Locksley, and J. H. McKerrow, "Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4⁺ lymphocytes," *Science*, vol. 294, no. 5545, pp. 1358–1361, 2001.
- [10] R. L. De Mendonça, H. Escrivá, D. Bouton, V. Laudet, and R. J. Pierce, "Hormones and nuclear receptors in schistosome development," *Parasitology Today*, vol. 16, no. 6, pp. 233–240, 2000.
- [11] P. Saulé, E. Adriaenssens, M. Delacré et al., "Early variations of host thyroxine and interleukin-7 favor *Schistosoma mansoni* development," *Journal of Parasitology*, vol. 88, no. 5, pp. 849–855, 2002.
- [12] P. Amiri, R. M. Locksley, T. G. Parslow et al., "Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice," *Nature*, vol. 356, no. 6370, pp. 604–607, 1992.
- [13] P. T. Loverde, A. Osman, and A. Hinc, "Schistosoma mansoni: TGF- β signaling pathways," *Experimental Parasitology*, vol. 117, no. 3, pp. 304–317, 2007.
- [14] I. Wolowczuk, S. Nutten, O. Roye et al., "Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*," *Infection and Immunity*, vol. 67, no. 8, pp. 4183–4190, 1999.
- [15] R. B. Blank, E. W. Lamb, A. S. Tocheva et al., "The common γ chain cytokines interleukin (IL)-2 and IL-7 indirectly modulate blood fluke development via effects on CD4⁺ T cells," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 11, pp. 1609–1616, 2006.
- [16] D. A. A. Vignali, P. Crocker, Q. D. Bickle, S. Cobbold, H. Waldmann, and M. G. Taylor, "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*, vol. 67, no. 4, pp. 466–472, 1989.
- [17] D. Jankovic, T. A. Wynn, M. C. Kullberg et al., "Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN- γ -dependent effector mechanisms," *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 1, pp. 345–351, 1999.
- [18] M. Street, P. S. Coulson, C. Sadler et al., "TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine," *Journal of Immunology*, vol. 163, no. 8, pp. 4489–4494, 1999.
- [19] F. G. C. Abath and R. C. Werkhauser, "The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features," *Parasite Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 15–20, 1996.
- [20] Z. G. Han, P. J. Brindley, S. Y. Wang, and C. Zhu, "Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction," *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol. 10, pp. 211–240, 2009.
- [21] M. K. Jones, G. N. Gobert, L. Zhang, P. Sunderland, and D. P. McManus, "The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions," *BioEssays*, vol. 26, no. 7, pp. 752–765, 2004.
- [22] D. J. Hockley and D. J. McLaren, "Schistosoma mansoni: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm," *International Journal for Parasitology*, vol. 3, no. 1, pp. 13–20, 1973.
- [23] M. Salzet, A. Capron, and G. B. Stefano, "Molecular crosstalk in host-parasite relationships: Schistosome- and leech-host

- Interactions," *Parasitology Today*, vol. 16, no. 12, pp. 536–540, 2000.
- [24] R. T. Daman, "Molecular mimicry revisited," *Parasitology Today*, vol. 3, no. 9, pp. 263–266, 1987.
- [25] S. R. Smithers, D. J. McLaren, and F. J. Rahalho-Pinto, "Immunity to schistosomes: the target," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 26, no. 6, pp. 11–19, 1977.
- [26] F. Santoro, P. J. Lachmann, A. Capron, and M. Capron, "Activation of complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula: killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation," *Journal of Immunology*, vol. 123, no. 4, pp. 1551–1557, 1979.
- [27] D. A. Dean, "Decreased binding of cytotoxic antibody by developing *Schistosoma mansoni*. Evidence for a surface change independent of host antigen adsorption and membrane turnover," *Journal of Parasitology*, vol. 63, no. 3, pp. 418–426, 1977.
- [28] A. Desselin, J. C. Samuelson, and A. E. Butterworth, "Immune evasion by *Schistosoma mansoni*: loss of susceptibility to antibody or complement-dependent eosinophil attack by schistosomula cultured in medium free of macromolecules," *Parasitology*, vol. 82, no. 3, pp. 357–374, 1981.
- [29] E. L. Racoosin, S. J. Davies, and E. J. Pearce, "Caveolae-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 104, no. 2, pp. 285–297, 1999.
- [30] R. El Ridi, S. H. Mohamed, and H. Tallima, "Incubation of *Schistosoma mansoni* lung-stage schistosomula in corn oil exposes their surface membrane antigenic specificities," *Journal of Parasitology*, vol. 89, no. 5, pp. 1064–1067, 2003.
- [31] D. J. McLaren, "Will the real target of immunity to schistosomiasis please stand up," *Parasitology Today*, vol. 5, no. 9, pp. 279–282, 1989.
- [32] G. N. Gobert, M. Chat, and D. P. McManus, "Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum," *Parasitology*, vol. 134, no. 4, pp. 453–460, 2007.
- [33] F. V. Durães, N. B. Carvalho, T. T. Melo, S. C. Oliveira, and C. T. Fonseca, "IL-12 and TNF- α production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent," *Immunology Letters*, vol. 125, no. 1, pp. 72–77, 2009.
- [34] B. W. M. Van Balkom, R. A. Van Gestel, J. F. H. M. Brouwers et al., "Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome," *Journal of Proteome Research*, vol. 4, no. 3, pp. 958–966, 2005.
- [35] S. Braschi, W. C. Borges, and R. A. Wilson, "Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, supplement 1, pp. 205–212, 2006.
- [36] S. Braschi and R. A. Wilson, "Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 5, no. 2, pp. 347–356, 2006.
- [37] A. Loukas, S. Gaze, J. P. Mulvanna et al., "Vaccinomics for the major blood feeding helminths of humans," *OMICS A Journal of Integrative Biology*, vol. 15, no. 9, pp. 567–577, 2011.
- [38] T. Tetsuya De Melo, J. Michel De Araujo, F. Do Valle Durães et al., "Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden," *Parasite Immunology*, vol. 32, no. 11–12, pp. 749–759, 2010.
- [39] G. P. Dillon, T. Feltwell, J. P. Skelton et al., "Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*," *International Journal for Parasitology*, vol. 36, no. 1, pp. 1–8, 2006.
- [40] G. N. Gobert, M. H. Tran, L. Moertel et al., "Transcriptional changes in *Schistosoma mansoni* during early schistosomula development and in the presence of erythrocytes," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 2, article e600, 2010.
- [41] J. M. Correnti, P. J. Brindley, and E. J. Pearce, "Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 143, no. 2, pp. 209–215, 2005.
- [42] M. E. Morales, G. Rinaldi, G. N. Gobert, K. J. Kines, J. E. Tort, and P. J. Brindley, "RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 157, no. 2, pp. 160–168, 2008.
- [43] M. H. Tran, T. C. Freitas, L. Cooper et al., "Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover," *PLoS pathogens*, vol. 6, no. 4, Article ID e1000840, 2010.
- [44] F. Liu, S. J. Cai, W. Hu, Z. Feng, Z. Q. Wang, and Z. G. Han, "Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 8, no. 6, pp. 1236–1251, 2009.
- [45] S. Verjovski-Almeida, R. DeMarco, E. A. L. Martins et al., "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*," *Nature Genetics*, vol. 35, no. 2, pp. 148–157, 2003.
- [46] C. D. Cristone, C. L. L. Valentim, H. Hirai, P. T. LoVerde, and T. J. C. Anderson, "Genomic linkage map of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*," *Genome Biology*, vol. 10, no. 6, article R71, 2009.
- [47] W. Castro-Borges, A. Dowle, R. S. Curwen, J. Thomas-Oates, and R. A. Wilson, "Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 3, article e993, 2011.
- [48] W. Castro-Borges, D. M. Simpson, A. Dowle et al., "Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics," *Journal of Proteomics*, vol. 74, pp. 1519–1533, 2011.
- [49] F. C. Cardoso, J. M. R. Pinho, V. Azevedo, and S. C. Oliveira, "Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis," *Genetics and Molecular Research*, vol. 5, no. 4, pp. 609–618, 2006.
- [50] F. C. Cardoso, G. C. Macedo, E. Gava et al., "*Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 2, no. 10, article e308, 2008.
- [51] D. W. Dunne, M. Webster, F. Smith et al., "The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate the IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to reinfection," *Parasite Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 79–89, 1997.
- [52] M. L. Santiago, J. C. R. Hafalla, J. D. Kurtis et al., "Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 117, no. 2, pp. 94–104, 1998.
- [53] L. G. G. Pacifico, C. T. Fonseca, L. Chitari, and S. C. Oliveira, "Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine," *Immunobiology*, vol. 211, no. 1–2, pp. 97–104, 2006.

- [54] L. G. G. Pacifico, C. T. Fonseca, M. M. Barsante, L. S. Cardoso, M. I. Aratijo, and S. C. Oliveira, "Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter interleukin-10 production," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, supplement 1, pp. 365–368, 2006.
- [55] L. S. Cardoso, S. C. Oliveira, A. M. Góes et al., "*Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 160, no. 2, pp. 266–274, 2010.
- [56] D. Smyth, D. P. McManus, M. J. Smout, T. Laha, W. Zhang, and A. Loukas, "Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 5, pp. 2548–2554, 2003.
- [57] M. H. Tran, M. S. Pearson, J. M. Bethony et al., "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 7, pp. 835–840, 2006.
- [58] W. Zhang, J. Li, M. Duke et al., "Inconsistent protective efficacy and marked polymorphism limits the value of *Schistosoma japonicum* tetraspanin-2 as a vaccine target," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 5, Article ID e1166, 2011.
- [59] S. Y. Sauma and M. Strand, "Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 38, no. 2, pp. 199–210, 1990.
- [60] P. J. Brindley, M. Strand, A. P. Norden, and A. Sher, "Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: Identification of target antigens," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 34, no. 2, pp. 99–108, 1989.
- [61] E. J. M. Nascimento, R. V. Amorim, A. Cavalcanti et al., "Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, no. 1, pp. 21–27, 2007.
- [62] V. P. Martins, C. S. Pinheiro, B. C. P. Figueiredo et al., "Vaccination with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 962538, 11 pages, 2012.
- [63] H. M. Ahmed and M. H. Rometh, "Protection against *Schistosoma mansoni* infection with recombinant schistosomula 21.7 kDa protein," *Arab Journal of Biotechnology*, vol. 24, pp. 229–249, 2001.
- [64] H. M. Ahmed, M. H. Rometh, and T. S. Abou-Shousha, "DNA immunization with the gene encoding Sm21.7 protects mice against *S. mansoni* infections," *American Journal of Science*, vol. 2, pp. 59–69, 2006.
- [65] K. A. Shalaby, L. Yin, A. Thakur, L. Christen, E. G. Niles, and P. T. LoVerde, "Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Ca/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes," *Vaccine*, vol. 22, no. 1, pp. 130–136, 2003.
- [66] Z. Hong, D. J. Kosman, A. Thakur, D. Rekosch, and P. T. LoVerde, "Identification and purification of a second form of Ca/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*," *Infection and Immunity*, vol. 60, no. 9, pp. 3641–3651, 1992.
- [67] H. Mei and P. T. LoVerde, "*Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes," *Experimental Parasitology*, vol. 86, no. 1, pp. 69–78, 1997.
- [68] H. Mei, A. Thakur, J. Schwartz, and P. T. LoVerde, "Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 10, pp. 4299–4306, 1996.
- [69] M. D. M. Mourão, N. Dingulrard, G. R. Franco, and T. P. Yoshino, "Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 11, article e550, 2009.
- [70] J. V. Hamilton, M. Klinkert, and M. J. Doenhoff, "Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods," *Parasitology*, vol. 117, pp. 541–557, 1998.
- [71] M. J. Doenhoff, P. L. Chiodini, and J. V. Hamilton, "Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?" *Trends in Parasitology*, vol. 20, no. 1, pp. 35–39, 2004.
- [72] G. B. F. Carvalho, R. A. da Silva-Pereira, L. G. G. Pacifico, and C. T. Fonseca, "Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 7, pp. 837–843, 2011.
- [73] C. M. Xia, R. Bong, Z. X. Lu et al., "*Schistosoma japonicum*: a PCR assay for the early detection and evaluation of treatment in a rabbit model," *Experimental Parasitology*, vol. 121, no. 2, pp. 175–179, 2009.
- [74] J.-J. Guo, H.-J. Zheng, J. Xu, X.-Q. Zhu, S.-Y. Wang, and C.-M. Xia, "Sensitive and specific target sequences selected from retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the diagnosis of schistosomiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 3, Article ID e1579, 2012.
- [75] Z. R. Zhong, H. B. Zhou, X. Y. Li et al., "Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of *Schistosoma japonicum*," *Acta Tropica*, vol. 116, no. 1, pp. 1–8, 2010.
- [76] A. S. Verkman, "Physiological importance of aquaporin water channels," *Annals of Medicine*, vol. 34, no. 3, pp. 192–200, 2002.
- [77] J. Song and Q.-E. He, "Bioinformatics analysis of the structure and linear B-cell epitopes of aquaporin-3 from *Schistosoma japonicum*," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 107–109, 2012.
- [78] E. G. Vasconcelos, P. S. Nascimento, M. N. L. Metrelles, S. Verjovski-Almeida, and S. T. Ferreira, "Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 58, no. 2, pp. 205–214, 1993.
- [79] R. Bhardwaj and P. J. Skelly, "Parinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?" *Trends in Parasitology*, vol. 25, no. 6, pp. 256–260, 2009.
- [80] R. DeMarco, A. T. Kowaltowski, R. A. Mortara, and S. Verjovski-Almeida, "Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 307, no. 4, pp. 831–838, 2003.
- [81] J. Levano-García, R. A. Mortara, S. Verjovski-Almeida, and R. DeMarco, "Characterization of *Schistosoma mansoni* ATP-Dase2 gene, a novel apyrase family member," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 352, no. 2, pp. 384–389, 2007.
- [82] R. G. P. R. Mendes, M. A. N. Gusmão, A. C. R. G. Maia et al., "Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform

(SmATPDase 2) and immunolocalisation of this protein in the schistosoma mansoni egg," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 7, pp. 808–813, 2011.

- [83] M. E. Hemler, "Specific tetraspanin functions," *Journal of Cell Biology*, vol. 155, no. 7, pp. 1103–1107, 2001.