UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

MILENA SOBRAL ESPÍNDOLA

Avaliação de estratégias de vacinação “prime-boost” na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* empregando vacinas de DNA

RIBEIRÃO PRETO

2011

MILENA SOBRAL ESPÍNDOLA

Avaliação de estratégias de vacinação “prime-boost” na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* empregando vacinas de DNA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli

RIBEIRÃO PRETO

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo da publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Espíndola, Milena Sobral

Avaliação de estratégias de vacinação “prime-boost” na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* empregando vacinas de DNA. Ribeirão Preto, 2011.

Número de paginas p.106 : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1.*Schistosoma mansoni*. 2. Vacinas de DNA. 3. DNA-Sm14. 4.DNA-Hsp65. 5.”Prime-boost”.

ESPÍNDOLA, M. S. **Avaliação de estratégias de vacinação “prime-boost” na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* empregando vacinas de DNA.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*“Do futuro és a crença, a esperança,
Desse povo que ativo descansa
Como o atleta depois de lutar...
No passado o teu nome era um mito,
Era o sol a brilhar no infinito
Era a glória na terra a brilhar!”*

(Trecho do Hino de Pernambuco)

Dedicatória

À minha Mãe, Maria Inês Sobral Espíndola, pois o esforço e dedicação dela me fizeram acreditar que eu poderia ir sempre além.

Aos meus irmãos Pedro Augusto e Marília Sobral, e a toda minha família Sobral, por seguir à risca a definição de uma verdadeira família unida e feliz, independente da distância!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, paz e serenidade nos momentos necessários.

À minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, por ter acreditado em mim, me acolhido e por ter contribuído imensamente com meu aprendizado e crescimento pessoal e profissional durante esses dois anos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz, por ter sido a pessoa que esteve sempre ao meu lado durante a realização do projeto e mesmo fora dele. Por todos os ensinamentos, paciência e atenção nos momentos de dúvida.

À minha mãe, e meus irmãos por serem meus alicerces e a principal razão de eu ter chegado até aqui. Por estarem sempre próximos mesmo distantes. Por serem lindos por dentro e por fora.

A toda minha família Sobral, minha avó, minhas madrinhas, meus tios, tias e primos. Primeiramente pela união e amor que existe nessa família, que tanto me orgulha. Pela preocupação de todos, e principalmente pela incrível contribuição que cada um deles deu durante meus momentos mais difíceis.

Ao prof. Dr. Célio Lopes Silva e todos os membros do seu laboratório, pela colaboração e disponibilização do laboratório para a preparação das vacinas. Em especial à Ana Paula Masson, por toda atenção e amizade.

Ao prof. Dr. Sérgio de Oliveira, por nos ceder o DNA-Sm14 e a proteína recombinante.

À prof. Dra. Simone Gusmão, à técnica Elaine Floriano e à Cristiane Tefé, pela disponibilidade e ajuda nas histopatologias.

À Fabiana da Citometria e aos funcionários do Biotério, pelo auxílio prestado.

Aos queridos amigos do LIIP, Patrícia, Cláudia, Elyara, Priscila, Adriana, Karina, Ana, Gisele, Denise, Guilherme, Bruno, Daiane, Alyne e ao Carlos por toda a amizade, compartilhamento de ótimos momentos juntos e toda a ajuda nos meus experimentos gigantescos, que sem a mãozinha de vocês seria impossível de acontecer!

Aos meus amigos da Pós-Graduação e de Ribeirão, Everton, Cássia, Mariana, Thaís, Maria Cláudia, Aline, Rafael, Joni, Tiago, Beakman, Panda, Neto, Luiza, Juliana e todos os que estiveram junto dividindo ótimos momentos, entre disciplinas, churrascos, feijoadas e reuniões.

Às queridas amigas que moram comigo, Fabiana e Danúbia por fazerem da nossa casa um local ótimo de se viver. Pelos momentos divididos, pelas experiências culinárias de fim-de-semana e por toda a amizade!

Aos meus amigos da Turma do B, Lara, Luciana, Rafael, Mateus, Rodrigo, Virgínia, Salomão, Helder, Ricardo, Tiago, Joyce, amigos de infância, que mesmo depois de tanto tempo são um lindo exemplo de amizade, independente de hora ou local.

Aos meus queridos amigos de Recife, Flavinha, Suilane, Wyron, Zé Missa, Nathália e Fábio por toda a alegria que há quando nos revemos. E em especial, aos lindos Diogo, Dáfila e Monique que provaram que não há fronteiras quando existe uma grande amizade, que estiveram comigo dia após dia, que me ajudaram, aconselharam e dividiram todos meus melhores momentos aqui, vocês foram e continuam sendo essenciais.

A todos que fazem parte do programa de Imunologia Básica e Aplicada, pela formação diferencial.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela estrutura. E à FAPESP, CNPq e FAEPA pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Esquistossomose mansonii.....	19
1.2 Resposta imunológica contra <i>S. mansonii</i>	21
1.3 Vacinas contra Esquistossomose	23
1.4 Vacinas de DNA	24
1.5 Sm14: da descoberta à utilização como vacina de DNA	26
1.6 Utilização do DNA-Hsp65 como agente imunoestimulante	27
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais.....	33
3.2 Obtenção de cercárias e infecção.....	33
3.3 Construção das vacinas	33
Vacina DNA-Hsp65	33
Vacina DNA-Sm14	34
Avaliação da integridade dos plasmídeos.....	35
3.4 Imunização	36
3.5 Avaliação da imunogenicidade das vacinas	37
Preparo do Antígeno Sm14.....	37
Ensaio de detecção de anticorpos específicos anti-Sm14	37
Quantificação das citocinas.....	38
Proliferação celular.....	39
3.6 Avaliação da resposta imune na fase pulmonar	39
Contagem total e diferencial das células do lavado bronco-alveolar (LBA) e do sangue.....	39
Análise histopatológica do pulmão.....	40
3.7 Avaliação do efeito protetor após infecção, induzido pelo emprego das estratégias “prime-boost”	40
Avaliação da carga parasitária: Recuperação de vermes adultos	40
Viabilidade dos ovos pelo método de Oograma	41
3.8 Análise da geração de células de memória por Citometria de Fluxo	41
3.9 Análise estatística	42
3.10 Resumo do delineamento experimental utilizando os protocolos:.....	42
- “Prime-Boost” Heterólogo	42
- “Prime-Boost” Homólogo.....	43

4. RESULTADOS	44
4.1 Parte I – Avaliação da estratégia “prime-boost” heterólogo	45
4.1.1 PERFIL IMUNOGÊNICO DAS VACINAS	45
Produção de anticorpos específicos anti-Sm14	45
Produção de citocinas após imunização	49
4.1.2 PERFIL DE RESPOSTA IMUNE PULMONAR NOS ANIMAIS VACINADOS E INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i>	51
Células recuperadas do espaço bronco-alveolar	51
Concentração de citocinas nos pulmões	53
Análise histopatológica dos pulmões	55
4.1.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA VACINAÇÃO APÓS INFECÇÃO	57
Avaliação da carga parasitária	57
Efeito da vacinação na viabilidade dos ovos	59
Influência da vacinação no número de eosinófilos	61
4.2 Parte II – Avaliação da estratégia “prime-boost” homólogo	63
4.2.1 PERFIL IMUNOGÊNICO DA VACINAÇÃO	63
Produção de anticorpos específicos anti-Sm14	63
Proliferação de células T específicas	67
4.2.2 PERFIL DE RESPOSTA IMUNE PULMONAR NOS ANIMAIS VACINADOS E INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i>	69
Células recuperadas do espaço bronco-alveolar	69
Concentração de citocinas nos pulmões	71
Análise histopatológica dos pulmões	74
4.2.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA VACINAÇÃO APÓS INFECÇÃO	76
Avaliação da carga parasitária	76
Efeito da vacinação na viabilidade dos ovos	78
Influência da vacinação no número de eosinófilos	80
4.2.4 ANÁLISE DA GERAÇÃO DE CÉLULAS DE MEMÓRIA NO BAÇO DOS ANIMAIS VACINADOS E INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i>	82
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	20
Figura 2. Protocolo de vacinação “prime-boost” heterólogo.. ..	42
Figura 3. Protocolo de vacinação “prime-boost” homólogo.....	43
Figura 4. Títulos de anticorpos anti-Sm14 de camundongos não imunizados, ou imunizados com DNA-Hsp65, DNA-Sm14 ou ambas utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo.	47
Figura 5. Concentração de citocinas em cultura de células de baço de animais imunizados com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” heterólogo após reestímulo com rSm14.. ..	50
Figura 6. Número de leucócitos no lavado bronco-alveolar de camundongos imunizados ou não com DNA-Hsp65, DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados ou não com <i>S. mansoni</i>	52
Figura 7. Concentração de citocinas nos pulmões de animais imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados ou não com <i>S. mansoni</i>	54
Figura 8. Análise histológica do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não pela estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados ou não com <i>S. mansoni</i>	56
Figura 9. Número de vermes adultos recuperados em animais vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados com <i>S. mansoni</i>	58
Figura 10. Estádio de desenvolvimento dos ovos de <i>S. mansoni</i> na mucosa intestinal de camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados com <i>S. mansoni</i>	60
Figura 11. Número absoluto e relativo de eosinófilos, 48 dias após infecção, no lavado bronco-alveolar de camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou com DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, seguindo a estratégia “prime-boost” heterólogo e posteriormente infectados ou não com <i>S. mansoni</i> . A) Número absoluto no LBA; B) Número relativo de eosinófilos no LBA.. ..	62
Figura 12. Títulos de anticorpos anti-Sm14 após imunização ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou ambas as vacinas utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo. A) IgG1 anti-Sm14; B) IgG2a anti-Sm14.. ..	65
Figura 13. Proliferação de células T do baço de animais imunizados com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, utilizando estratégia “prime-boost” homólogo, em resposta ao reestímulo <i>in vitro</i> com a proteína rSm14 ou Con A.....	68
Figura 14. Número de leucócitos no lavado bronco-alveolar de camundongos imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com <i>S. mansoni</i>	70

Figura 15. Concentração de IFN- γ no lavado bronco-alveolar de animais imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com <i>S. mansoni</i>	72
Figura 16. Concentração de citocinas nos pulmões de animais imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” homólogo e infectados ou não com <i>S. mansoni</i>	73
Figura 17. Análise histológica do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não pela estratégia “prime-boost” homólogo e infectados ou não com <i>S. mansoni</i>	75
Figura 18. Número de vermes recuperados em animais vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com <i>S. mansoni</i>	77
Figura 19. Estádio de desenvolvimento dos ovos de <i>S. mansoni</i> presentes na mucosa intestinal de camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com <i>S. mansoni</i>	79
Figura 20. Número absoluto e relativo de eosinófilos em camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou através do protocolo “prime-boost” homólogo e infectados ou não com <i>S. mansoni</i> , 48 dias após infecção, presentes no lavado bronco-alveolar e sangue periférico.	81
Figura 21. Número de linfócitos T de memória (CD44 ^{hi} CD62L ^{low}) CD4+ e CD8+ presentes no baço de camundongos vacinados e posteriormente infectados.	84
Figura 22. Relação de células de memória pelo número total de linfócitos, 15 ou 48 dias após infecção de animais imunizados ou não com DNA-Hsp65, DNA-Sm14 ou ambas em protocolo “prime-boost” homólogo.	85
Figura 23. Número de linfócitos T de memória (CD44 ^{hi} CD62L ^{low}) presentes no baço de camundongos vacinados segundo protocolo “prime-boost” homólogo, 15, 48 e 105 dias após infecção.	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas recombinantes ou plasmídeos de DNA correlacionados com resistência em estudos humanos e/ou eficácia em modelos animais	24
Tabela 2. Disposição dos grupos utilizando protocolo “prime-boost” heterólogo.	36
Tabela 3. Disposição dos grupos utilizando protocolo “prime-boost” homólogo.....	37
Tabela 4. Razão IgG1/IgG2a anti-Sm14 nos diferentes dias após imunização com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65.....	48
Tabela 5. Carga parasitária após infecção por <i>S. mansoni</i> em animais vacinados com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 utilizando protocolo “prime-boost” heterólogo.	58
Tabela 6. Razão IgG1/IgG2a anti-Sm14 nos diferentes dias após imunização com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65	66
Tabela 7. Proteção induzida pela vacinação com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando protocolo “prime-boost” homólogo após infecção por <i>S. mansoni</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – *Antigen-presenting Cell*
APC - *Allophycocyanin*
CD – *Cluster Differentiation*
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
HE – coloração hematoxilina-eosina
HLA - *human leukocyte antigen*
Hsp65 – *65 kilodalton heat shock proteins*
IFN- γ – Interferon γ
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
LBA - lavado bronco-alveolar
LPS - lipopolissacarídeo
MHC – *Major histocompatibility complex*
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PE - *Phycoerythrin*
PerCP – *Peridinin Chlorophyll Protein*
Th – Linfócitos T *helper*
TNF - *Tumor necrosis factor*

ESPÍNDOLA, M. S. **Avaliação de estratégias de vacinação “prime-boost” na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* empregando vacinas de DNA.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

A esquistossomose é uma das mais relevantes doenças induzidas por helmintos, acometendo cerca de 207 milhões de pessoas em todo o mundo. O Praziquantel e o Oxamniquine são os fármacos empregados no tratamento, mas além de não impedirem re-infecções, não atuam nos estágios imaturos do verme. Portanto, o desenvolvimento de uma estratégia de vacinação eficaz representa um componente essencial para o controle e erradicação desta doença. Neste sentido, tivemos como objetivo estudar a resposta imunológica induzida pela imunização com a vacina DNA-Sm14 em associação com a DNA-Hsp65 utilizando protocolos de imunização “prime-boost”, sendo eles heterólogo ou homólogo. A utilização das vacinas em “prime-boost” heterólogo não alterou a produção de IgG2a, mas diminuiu a produção de IFN- γ e IL-10 dos animais quando comparados aos que receberam apenas DNA-Sm14. Após infecção, a estratégia “prime-boost” heterólogo não foi eficaz em reduzir a carga parasitária dos animais, enquanto a vacinação com DNA-Sm14 reduziu parcialmente o número de vermes. Na vacinação “prime-boost” homóloga utilizando as duas vacinas, observamos que a modificação da estratégia também não alterou a produção de IgG2a, mas reduziu a produção de IFN- γ pelas células recuperadas do espaço bronco-alveolar, quando comparada com os animais que receberam DNA-Sm14. Após infecção, a imunização com DNA-Sm14/DNA-Hsp65 não alterou a carga parasitária dos animais, mas sistemicamente reduziu o número de eosinófilos. Quando avaliado o perfil de células de memória dos animais vacinados, verificamos aumento do número de células T CD8+ e menor número de células T CD4+ no baço dos animais imunizados com as duas vacinas simultaneamente. Em suma, a utilização das vacinas DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 nas estratégias “prime-boost” heterólogo ou homólogo não foi capaz de gerar proteção contra infecção experimental por *S. mansoni*, e sugerimos que em parte, a diminuição de IFN- γ , IL-10, aumento da razão IgG1/IgG2a e a estimulação de células T CD8+ ao invés de CD4+, podem ter contribuído para baixa eficácia dos protocolos vacinais testados.

Palavras chave: Vacinas de DNA; *Schistosoma mansoni*; DNA-Sm14; DNA-Hsp65

ABSTRACT

ESPÍNDOLA, M. S. **Evaluation of prime-boost vaccination strategies against *Schistosoma mansoni* experimental infection applying DNA vaccines.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

Schistosomiasis is one of the most important diseases due to helminthes, affecting approximately 207 million people worldwide. The treatment is based on Praziquantel and Oxamniquine drugs, however these drugs do not avoid reinfections and are inefficient against worm immature stages. Therefore, the development of an efficient vaccination strategy is an essential component in the control of this disease. The aim of this work was to study the immune response induced by immunization with DNA-Sm14 vaccine in combination with DNA-Hsp65 using prime-boost protocols, which were heterologous or homologous. The heterologous prime-boost vaccination did not modify IgG2a production, but decreased IFN- γ and IL-10 production compared to animals that received only DNA-Sm14. After infection, this prime-boost strategy was not effective in reducing the worm burden of animals, while vaccination with DNA-Sm14 induced partial reduction. Using both vaccines in the homologous prime-boost model, we found that the modification of the strategy did not alter IgG2a production, although reduced IFN- γ production by cells recovered from the broncho-alveolar space compared to DNA-Sm14 immunized mice. After infection, immunization with DNA-Sm14/DNA-Hsp65 didn't modify the animals parasitic burden, however systemically, reduced eosinophils number. When the profile of memory cells in vaccinated animals was evaluated, we verified increased numbers of CD8+ T cells and lower numbers of CD4+ T cells in the spleen of animals immunized with both vaccines simultaneously. In conclusion, the vaccines DNA-Sm14 and DNA-Hsp65 in both strategies, prime-boost heterologous or homologous, were not able to generate protection against experimental infection with *S. mansoni*, and we propose that, partly, the decrease of IFN- γ , IL-10 levels, increase of IgG1/IgG2a ratio and the stimulation of CD8+ T cells rather than CD4+, may have contributed to the low efficacy of the vaccination protocols tested.

Keywords: DNA vaccines; *Schistosoma mansoni*; DNA-Sm14; DNA-Hsp65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose mansoni

O aumento na capacidade de previsão dos avanços tecnológicos são comuns aos estudos prospectivos, os quais permitem buscar por ferramentas e incorporá-las conforme a necessidade encontrada. Atualmente, este tipo de estudo visa aproximar abordagens exclusivamente tecnológicas com situações de aplicação da inovação. As pesquisas de inovação buscam o aperfeiçoamento de estratégias de desenvolvimento, como vacinas, fármacos e insumos terapêuticos, os quais visam à melhoria da quantidade e qualidade de vida das pessoas. Nesse contexto, é conveniente lembrar que as verminoses são doenças geralmente negligenciadas pelas pesquisas farmacêuticas. Tal situação deve-se ao fato dessas patologias atingirem principalmente países em desenvolvimento e não gerarem grandes lucros financeiros. Por isso faz-se necessário buscar ferramentas de inovação, como o desenvolvimento de vacinas que evitem ou solucionem doenças que historicamente acometem a população mais carente.

A esquistossomose é uma endemia parasitária causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, entre eles *Schistosoma mansoni*, responsável pela parasitose no Brasil. É uma das mais relevantes doenças parasitárias presente em países em desenvolvimento, configurando-se como um grave problema de saúde pública, diretamente relacionada com condições de pobreza e desvantagens sociais (BARBOSA et al., 2001; WHO, 2006). Ocorre em 74 países (WHO, 2004), nos quais se estima que 207 milhões de pessoas estejam acometidas e 779 milhões de pessoas vivam em áreas de risco (STEINMANN et al., 2006). No Brasil, existem aproximadamente cinco a seis milhões de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, distribuídas em 19 estados e Distrito Federal (KATZ e PEIXOTO, 2000; REY, 2001), sendo o estado de Minas Gerais e os estados da região Nordeste os que detêm os maiores índices de prevalência (AMARAL et al., 2006). O *Schistosoma mansoni* apresenta um complexo ciclo biológico representado pela notável interação adaptativa entre o parasito, hospedeiros e o ambiente natural. O ciclo evolutivo do *S. mansoni* é heteroxênico, e inicia-se através do contato de um indivíduo com água contaminada contendo a forma infectante, a cercária, liberada pelo caramujo do gênero *Biomphalaria*. Após a penetração ativa na pele do hospedeiro, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Estes atingem a corrente

sangüínea ou vasos linfáticos do hospedeiro e chegam ao pulmão, fígado e veias portais, onde permanecem até atingirem a maturidade sexual (EL RIDI et al., 2004). Ao alcançarem a vida adulta, os vermes acasalam no sistema porta-hepático. O casal em cópula migra para as vênulas do plexo hemorroidário superior e para as ramificações das veias mesentéricas inferiores, onde ocorre a oviposição. As fêmeas põem um ovo por vez, embora o total diário possa chegar a 300 ovos. A maioria desses ovos atravessa a mucosa intestinal e são eliminados nas fezes. Os ovos que não conseguem chegar à luz intestinal têm os miracídios mortos e podem ficar presos na mucosa intestinal, ou serem arrastados para o fígado (NEVES, 2000; BARBOSA et al., 2001).

Figura 1. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*
(REDE GENOMA DE MINAS GERAIS, 2011)

Os ovos presentes nas fezes e em contato com a água, na presença de luz intensa, oxigenação adequada e temperatura em torno de 28°C, eclodem liberando o miracídio. Os miracídios liberados nadam ativamente durante algumas horas, até penetrarem nos tecidos das espécies susceptíveis de *Biomphalaria*, transformando-

se em esporocisto primário, que por poliembrionia gera esporocistos secundários, originando numerosas cercárias por reprodução assexuada. Um único miracídio pode dar origem a mais de 100.000 cercárias, que são posteriormente liberadas na água, reiniciando o ciclo (BARBOSA et al., 2001).

Programas de controle da incidência da esquistossomose têm como principal ferramenta a quimioterapia para o sucesso na redução do impacto geral da doença em áreas endêmicas (BERGQUIST e COLLEY, 1998). Atualmente, dois quimioterápicos têm sido empregados no Brasil, o Praziquantel e o Oxamniquine como drogas de primeira e segunda escolha, respectivamente. Entretanto, a existência de poucas opções terapêuticas é um fato alarmante, pois a elevação do número de casos de resistência ao Praziquantel vem se tornando uma realidade clínica e experimental, além de não impedir re-infecções e não atuar sobre estágios imaturos do verme (CIOLI, 2000).

1.2 Resposta imunológica contra *S. mansoni*

A infecção pelo *S. mansoni* induz resposta imune celular e humoral durante a migração do verme pelo corpo do hospedeiro. A reação inflamatória é iniciada através da interação de produtos excretórios-secretórios de esquistossômulos com células da resposta imune inata e adaptativa, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios e radicais tóxicos que podem levar à eliminação do parasito, principalmente nos capilares sanguíneos do pulmão, o maior sítio de eliminação natural e imune de esquistossômulos (DEAN e MANGOLD, 1992; EL RIDI e TALLIMA, 2009). Nesta fase da resposta imunológica, ocorre moderada resposta Th1, de curta duração, com produção de IL-2 e IFN- γ , associada ao aumento da expressão de moléculas de adesão do endotélio, que permitem maior recrutamento de células inflamatórias para o órgão parasitado (RAMASWAMY et al., 1997). Entretanto, a proteção gerada não é completamente eficaz, visto que há um número significativo de parasitos que escapam da resposta imune ao encobrir sua superfície com moléculas do hospedeiro, como proteínas (RAMALHO-PINTO et al., 1992) e fosfolipídeos (BILLECOCQ, 1987).

Os vermes adultos e ovos, por sua vez, induzem resposta Th2 dominante, além da produção de IL-10 por células T reguladoras. As proteínas secretadas e

excretadas pelos ovos viáveis de *S. mansoni*, presentes nos tecidos, são os principais antígenos responsáveis pela amplificação de sinais durante a formação do granuloma na imunidade inata e adquirida, estimulando a liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, os quais induzem o recrutamento celular (CHIU e CHENSUE, 2002).

A formação do granuloma ao redor do ovo se desenvolve através de cinco estágios: fracamente reativo, exudativo, exudativo-produtivo, produtivo e involutivo (HSU et al., 1973; HURST et al., 2000). O início dessa formação é caracterizado por um gradual acúmulo de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, das quais em grande parte macrófagos alternativos. Com o amadurecimento do granuloma para a fase exudativa-produtiva, começam a aparecer na periferia histiócitos e células epitelióides, os quais gradualmente substituem a camada leucocitária. Posteriormente, fibrócitos e fibras colágenas começam a circundar a área lesionada e ficam mais proeminentes durante o estágio produtivo, no qual o ovo começa a se desintegrar. Além disso, linfócitos, histiócitos, plasmócitos e alguns eosinófilos formam uma zona adicional margeando a lesão. Células hepáticas estreladas, após o dano tecidual hepático, se diferenciam em células ativadas, com morfologia semelhante a fibroblastos e localizam-se na periferia dos granulomas, adjacentes às áreas fibróticas. Estas células são as principais produtoras dos componentes da matriz extracelular, os quais contribuem para o remodelamento do tecido fibrótico no processo granulomatoso (BARTLEY et al., 2006; ZOU et al., 2007; BURKE et al., 2009).

Os fatores acima citados são os principais responsáveis pelas manifestações clínicas da doença, entre elas hipertensão portal, em decorrência do processo fibrótico, da congestão e da dificuldade de perfusão, culminando em hepatoesplenomegalia, formação de circulação venosa colateral, varizes esofagianas, hemorragias digestivas e ascite. Dessa forma, estes são os principais responsáveis pela morbidade em indivíduos infectados e em muitos casos pode ser letal (PEARCE e MACDONALD, 2002).

Portanto, estratégias profiláticas que visem não apenas a eliminação dos parasitas, mas também a diminuição dos efeitos danosos da resposta imune exacerbada contra os ovos de *S. mansoni* é de extrema importância.

1.3 Vacinas contra Esquistossomose

A vacina ideal anti-esquistossoma é aquela capaz de reduzir a carga parasitária, sendo o esquistossômulo em migração o principal alvo a fim de se obter imunidade protetora (MCMANUS, 2005; WILSON e COULSON, 2006). No entanto, a busca de vacinas utilizando proteínas dos ovos como alvos pode ser considerada, já que são eles os principais responsáveis pela patologia e transmissão da doença (CAPRON et al., 2002). Além disso, a modulação do sistema imunológico, com a indução de resposta humoral e celular eficientes é essencial para proteção, pois interfere diretamente na formação da resposta efetora contra o helminto (JANKOVIC et al., 1999).

Diversas estratégias de vacinação já foram testadas em camundongos, primatas ou outros mamíferos, entre elas, a utilização de cercárias irradiadas por raios ultravioleta ou radiação γ (EBERL et al., 2001; HEWITSON et al., 2005). A resposta Th1 eficiente no início da infecção, induzida após vacinação única mostrou-se protetora. No entanto, repetidas vacinações também têm efeito protetor, porém mediado por citocinas de perfil Th2 (CAULADA-BENEDETTI et al., 1991).

A utilização da vacinologia reversa nas pesquisas com *S. mansoni*, através do sequenciamento de seu genoma (ZERLOTINI et al., 2009) e da caracterização de seu transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003), em combinação com novas tecnologias, como bioinformática, micrroarranjos e o proteoma, dão suporte à identificação de novos alvos, tanto para desenvolvimento de fármacos, quanto de vacinas moleculares. Essas últimas estão sendo extensivamente testadas, utilizando as tecnologias de DNA e proteínas recombinantes (Tabela 1).

A descoberta e fabricação de peptídeos sintéticos que contenham epítomos imunodominantes é considerada uma possível estratégia de vacinação, já que é de fácil produção e não é necessário passo de purificação, além de eliminar regiões conservadas de epítomos que poderiam induzir autoimunidade. Contudo, dificuldades em induzir resposta de células B e T, e polimorfismos nos genes de HLA em humanos são fatores limitantes para o uso dessa estratégia (OLIVEIRA et al., 2008).

Tabela 1. Proteínas recombinantes ou plasmídeos de DNA correlacionados com resistência em estudos humanos e/ou eficácia em modelos animais (MCMANUS e LOUKAS, 2008)

Antígeno	Localização em vermes adultos	Componente vacinal	Estágio alvo	Proteção conferida
SmTSP-2	Tegumento – membrana apical	Proteína recombinante	Vermes	++
			Ovos	++
SmTSP-1	Tegumento - membrana apical	Proteína recombinante	Vermes	+
			Ovos	++
Sm29	Tegumento – membrana apical	Proteína recombinante	Vermes	++
Sm23	Tegumento – membrana apical	Peptídeo multiantigênico / DNA Plasmideal	Vermes	+
Sm-p80	Associada com o tegumento – membrana interna	DNA plasmideal	Vermes	+
		DNA plasmideal + citocinas	Vermes	++
Sm14	Corpo inteiro – citosólico	Proteína recombinante	Vermes	++
Sm28-GST	Corpo inteiro	Proteína recombinante	Verme adulto	+
			Ovos	+
Sm97 - paramiosina	Tegumento do esquistossômulo e musculatura em adultos	Proteína nativa e recombinante	Vermes	+
CT-SOD	Tegumento e epitélio intestinal	DNA plasmideal	Vermes	++

+ 30-50% de redução da carga parasitária e número de ovos no fígado;

++ > 50% de redução da carga parasitária e número de ovos no fígado.

1.4 Vacinas de DNA

A utilização de DNA como vacina é uma das mais promissoras técnicas de imunização contra vários patógenos e tumores, para os quais métodos convencionais não têm sido eficientes (KANO et al., 2007). A vacina de DNA normalmente é constituída por um vetor plasmideal, derivado de bactéria, o qual

contém a sequência do gene heterólogo de interesse (DAVIS, 1997). Wolff e colaboradores (1990) demonstraram pela primeira vez que a vacinação com o plasmídeo de DNA (ou DNA nu), através de inoculação direta por via intramuscular, poderia induzir a expressão de proteínas de interesse por miócitos. As vias intradérmica e subcutânea são outras formas de administração plasmideal. O mecanismo pelo qual as vacinas de DNA produzem imunidade antígeno-específica *in vivo* baseia-se na utilização da maquinaria celular do hospedeiro, na qual haverá a entrada do plasmídeo nas células e a geração de antígenos, as proteínas recombinantes de interesse. As células transfectadas podem ser células locais, miócitos, queratinócitos, ou qualquer célula que apresente antígenos via MHC de classe I; pode ainda ocorrer o “priming” direto de células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), ou o “cross-priming”, no qual as células transfectadas com o plasmídeo podem, após produção, secretar as proteínas e estas serem endocitadas por APCs profissionais ou reconhecidas diretamente por linfócitos B. (GURUNATHAN et al., 2000; KUTZLER e WEINER, 2008).

Dentro das células, as proteínas recém-fabricadas são processadas e encaminhadas para as moléculas de MHC de classe I ou MHC de classe II. As APCs migram para os linfonodos drenantes a fim de apresentar os peptídeos antigênicos para os linfócitos T “naive”, em combinação com a sinalização de moléculas co-estimuladoras. Esta interação fornece os segundos sinais necessários para o início da resposta imune com a ativação e expansão de células T, ou ainda, com a ativação de linfócitos B e produção de anticorpos. (GURUNATHAN et al., 2000; KUTZLER e WEINER, 2008). Em resumo, a utilização de vacinas de DNA é vantajosa em relação a outros métodos, pois por si só, leva à ativação de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e linfócitos B.

A indução de imunidade protetora após imunização com DNA plasmideal já foi verificada contra vírus (DAVIS e MCCLUSKIE, 1999), bactérias (STRUGNELL et al., 1997), protozoários (KALINNA, 1997), além de câncer (LIU et al., 2004) e doenças autoimunes (RAMSHAW et al., 1997).

Na última década a utilização de vacinas de DNA contra infecção por *S. mansoni* foi descrita experimentalmente (Tabela 1), utilizando-se diversos epítomos, entre eles Sm23 (21 a 44% de proteção) (DA'DARA et al., 2001), SmCT-SOD (44 a 60% de proteção) (SHALABY et al., 2003), Sm-p80 (38 a 59% de proteção) (AHMAD

et al., 2009a; AHMAD et al., 2009b), além da utilização de vacinas multivalentes (56% de proteção) (ROMEIH et al., 2008). No Brasil, a formulação de vacina de DNA multiantigênica induziu proteção de 65% (NASCIMENTO et al., 2002), porém grande parte das pesquisas no país foca-se no antígeno de 14kDa de *S. mansoni*, o Sm14, utilizado como proteína recombinante ou plasmídeo de DNA.

1.5 Sm14: da descoberta à utilização como vacina de DNA

O programa especial para pesquisa e treinamento em Doenças Tropicais, o TDR, da Organização Mundial da Saúde patrocinou na década de 80, o desenvolvimento de vacinas para algumas doenças parasitárias, em particular a malária, leishmaniose e esquistossomose (ENGERS et al., 1996). Uma lista de moléculas foram produzidas e testadas, e dessas restaram seis moléculas mais promissoras (BERGQUIST e COLLEY, 1998), entre elas a Sm14, que mesmo após decréscimo no financiamento na década de 90, continuou sendo intensivamente estudada no Brasil com o apoio da Fundação Oswaldo Cruz, instituição diretamente ligada ao Ministério da Saúde do país.

A Sm14 foi descrita por Moser e colaboradores (1991), como a primeira molécula com homologia às proteínas ligadoras de ácidos graxos (FABP - *fatty acid-binding protein*) identificada em helmintos. A importância dessa classe de moléculas, como potenciais alvos, se dá devido ao fato dos helmintos do gênero *Schistosoma* não possuírem a via oxigênio-dependente necessária para a síntese de esteróis e ácidos graxos, tornando-os inteiramente dependentes do hospedeiro para o fornecimento desses lipídeos. As proteínas ligadoras de ácidos graxos estão, dessa forma, diretamente envolvidas na captura, transporte e compartimentalização de ácidos graxos derivados do hospedeiro, tornando-se vitais à sobrevivência do parasito (MOSER et al., 1991). A primeira caracterização dos efeitos protetores da Sm14 foi descrita por Tendler e colaboradores (1996), na qual a imunização com a proteína recombinante levou a 67% de proteção em camundongos. A partir de então foram realizados diversos ensaios com a finalidade de otimização da produção da rSm14 e maior estabilidade da molécula, além da produção de diferentes construções plasmídeais e diferentes vetores. Porém nesses estudos a margem de proteção oscilou entre 25% a 54,8% (RAMOS et al., 2001; FONSECA et al., 2004;

VARALDO et al., 2004). Os mecanismos envolvidos na proteção murina após imunização com rSm14 são dependentes de IFN- γ e TNF (FONSECA et al., 2004), tais citocinas são as mesmas produzidas por células T CD4⁺ de indivíduos naturalmente resistentes à esquistossomose, que vivem em áreas endêmicas, em resposta à rSm14 *in vitro* (BRITO et al., 2000). Dessa forma, a geração de uma resposta Th1 dominante demonstra ser protetora contra infecção por *S. mansoni* (OLIVEIRA et al., 2008).

Na tentativa de melhor indução da imunidade celular e humoral, Fonseca e colaboradores (2006) relataram que a utilização da vacina de DNA-Sm14 co-administrada com o plasmídeo contendo o gene da IL-12, alterou o perfil imunológico, mas falhou em aumentar a proteção conferida pelo DNA-Sm14 sozinho, que foi de 40%. O perfil imunológico gerado após imunização com DNA-Sm14 também é direcionado às células Th1, com elevada produção de IFN- γ e da citocina reguladora IL-10 por células esplênicas reestimuladas com a proteína rSm14 *in vitro*, além de elevada produção de IgG anti-Sm14. Tendo em vista o potencial imunoestimulatório e protetor da DNA-Sm14 na prevenção da esquistossomose, faz-se necessária a busca de novas estratégias, as quais tenham a capacidade de complementar e modular a resposta imune gerada pela DNA-Sm14 a fim de atingir níveis de proteção satisfatórios visando à utilização em humanos. Para isso, utilizamos a estratégia de vacinação “prime-boost” adicionando o DNA-Hsp65 ao esquema de vacinação com a DNA-Sm14.

1.6 Utilização do DNA-Hsp65 como agente imunoestimulante

No que diz respeito à Hsp65, ela pertence a uma classe de proteínas denominada proteínas de choque térmico, as quais são altamente conservadas durante a evolução, tanto em mamíferos quanto em bactérias, com alta homologia estrutural entre as diferentes espécies (GARSIA et al., 1989; JINDAL et al., 1989).

Na busca por novas estratégias vacinais contra tuberculose, o Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da FMRP – USP desenvolveu uma vacina de DNA baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65) de *Mycobacterium leprae*. Os primeiros resultados foram obtidos em 1992, quando

Silva e colaboradores (1992), realizaram a transferência adotiva de células monocíticas transfectadas com vetores retrovirais produtores da Hsp65, as quais induziam ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno específicas em camundongos não infectados (SILVA e LOWRIE, 1994; SILVA et al., 1994; SILVA et al., 1996). Ao longo dos anos, trabalhos do mesmo grupo utilizando DNA plasmideal evidenciaram a eficácia da vacina contra a tuberculose experimental (TASCON et al., 1996; LOWRIE et al., 1997). Os mecanismos envolvidos com a proteção dos animais após imunização com DNA-Hsp65 são mediados por células T antígeno-específicas, produtoras de IFN- γ e de produtos citotóxicos, mas não de IL-4, indicando a geração de uma resposta Th1 protetora, com elevada produção de IgG1 e IgG2a (BONATO et al., 1998; SILVA et al., 1999; SILVA e LOWRIE, 2000). No entanto, além da ação específica de redução da carga bacilar, a observação da preservação do órgão alvo através da diminuição da fibrose e auxílio da reestruturação do tecido pulmonar após administração do DNA-Hsp65, introduz a hipótese de que a vacina atue como imunomoduladora. Com o intuito de explorar tal propriedade, o DNA-Hsp65 foi testado em outros modelos experimentais como leishmaniose (COELHO et al., 2006), paracoccidiodomicose (RIBEIRO et al., 2009), diabetes (SANTOS JUNIOR et al., 2007), artrite (SANTOS-JUNIOR et al., 2005) e ensaios de câncer em fase I (MICHALUART et al., 2008; VICTORA et al., 2009), nos quais foram obtidos resultados positivos. Frantz e colaboradores (2011 – *in press*) verificaram em modelo de fibrose induzida por ovos de *S. mansoni*, que a administração do DNA-Hsp65 reduziu os processos fibróticos durante a formação do granuloma, através do balanço de citocinas e da diminuição da migração de miofibroblastos, com conseqüente diminuição da deposição de colágeno no sítio da injúria. Dessa forma, a ativação da resposta imune pela vacina a antígenos não relacionados sugere outros mecanismos de ação derivados das proteínas de choque térmico.

Por conseguinte, com o objetivo de atingir níveis ótimos de proteção contra infecção por *S. mansoni* e contornar as dificuldades encontradas pela vacinação com DNA-Sm14, o atual trabalho se baseia na hipótese da utilização do DNA-Sm14 juntamente com o DNA-Hsp65, em uma nova estratégia de vacinação utilizando as estratégias “prime-boost” heterólogo e homólogo. O princípio “prime-boost” se baseia em múltiplas imunizações, sejam elas homólogas, nas quais o “prime” é semelhante ao “boost”, ou heterólogas, nas quais imuniza-se com um tipo de vacina

no “prime” e posteriormente realiza-se o “boost” com uma vacinação diferente da primeira. Tal estratégia vem demonstrando resultados promissores em diversas patologias (LU, 2009). Neste sentido, em nosso trabalho vacina DNA-Sm14 foi empregada com o objetivo de indução da resposta imune específica contra *S. mansoni*, e a vacina DNA-Hsp65 com a finalidade de potencializar a ativação do sistema imunológico de forma inespecífica. Logo, na estratégia “prime-boost” heterólogo, utilizamos o DNA-Sm14 como “prime” e posteriormente, o DNA-Hsp65 como “boost”, enquanto utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo, foi realizado “prime” com a administração simultânea do DNA-Sm14 e DNA-Hsp65, e o “boost” foi semelhante ao “prime” em todos os dias de imunização.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Desenvolvimento de um protocolo de vacinação utilizando as vacinas DNA-Sm14 e DNA-Hsp65, de forma heteróloga ou homóloga, de modo a aumentar a proteção contra infecção experimental por *S. mansoni*.

Como estratégias para testar nossa hipótese de trabalho, foram avaliados (as):

- 1) A imunogenicidade do DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 pela avaliação da produção de citocinas, anticorpos anti-Sm14 e proliferação específica de linfócitos T;
- 2) A resposta imune gerada no pulmão, no início da infecção após vacinação, através da avaliação do número de células no espaço bronco-alveolar, produção de citocinas e histologia;
- 3) O efeito protetor gerado pela vacinação durante a infecção, através da quantificação da carga parasitária, viabilidade dos ovos no intestino e número de eosinófilos;
- 4) A geração de células T de memória após vacinação e infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos, pertencentes à linhagem C57BL/6, com peso entre 20 – 25 gramas, provenientes do Biotério de criação de animais livres de patógenos específicos (spf), Unidade II da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto – USP. O trabalho possui certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto – USP (Protocolo: 09.1.144.53.3).

3.2 Obtenção de cercárias e infecção

Para a infecção dos animais, contamos com a colaboração do laboratório do Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Uma linhagem LE de *S. mansoni* é rotineiramente mantida por passagem através de caramujos *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss. Caramujos *B. glabrata* infectados são induzidos a eliminar cercárias por exposição à iluminação artificial a 30°C em banho de água sem cloro por 1 hora.

Para infecção, os camundongos foram anestesiados com quetamina / xilasina (20 µL de quetamina, 10 µL de xilasina em 70 µL de PBS estéril por animal) e foram injetados 50 µL/10 g de peso corpóreo do animal. Em seguida, 30 cercárias por animal foram injetadas por via subcutânea. Nos dias da avaliação dos parâmetros imunopatológicos, os animais foram eutanasiados em câmara com excesso de CO₂.

3.3 Construção das vacinas

Vacina DNA-Hsp65

A vacina DNA-Hsp65 foi obtida em colaboração com o Dr. Célio Lopes Silva, do Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da FMRP – USP.

O DNA-Hsp65 é construído com um inserto de 3000 pares de bases, que codifica a proteína de choque térmico (hsp) de *M. leprae*, subclonado no sítio BamHI e NotI do vetor pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O plasmídeo pVAX-hsp65 foi obtido após purificação por cromatografia de troca iônica através do Endofree Plasmid Giga KitTM (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Para isso, uma colônia da bactéria *Escherichia coli* linhagem DH5αTM transformada com o plasmídeo

recombinante pVAX-hsp65 foi inoculada em 5,0 mL de meio LB (0,5% de triptona, 1% de extrato de levedura, 1% de NaCl) (GIBCO BRL, Scotland) suplementado com 50 µg/mL de kanamicina e incubada durante 8 horas a 37°C e 250 rpm (Incubator shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 500 vezes em 2,5 litros em mesmo meio de cultura e condições por 16 horas. Posteriormente o material foi centrifugado a 5500 rpm por 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspendido em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase 100 µg/mL). Em seguida foi adicionado 125 mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) e após 5 minutos adicionou-se 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5). O material foi filtrado, adicionado ao tampão ER para remoção do lipopolissacarídeo (LPS) e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado à resina da QUIAGEN™ previamente equilibrada com tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600 mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmídeo foi eluído com 100 mL de tampão QN (NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado em 70 mL de isopropanol e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 45 minutos a 4°C e o sedimento ressuspendido em 1,0 mL de água. A quantificação do plasmídeo pVAX-hsp65 foi realizada por espectrofotometria no aparelho GeneQuant II™ (Amersham-Pharmacia, BioSciences, USA), utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Vacina DNA-Sm14

A vacina de DNA-Sm14 foi obtida através da colaboração com o Dr. Sérgio Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Investigação em Imunologia – Instituto Milênio, da Universidade Federal de Minas Gerais, que gentilmente nos cedeu a linhagem de *E. coli* DH5α™ previamente transformada com o plasmídeo pCI/Sm14.

O gene expressando Sm14 isolado do plasmídeo pMAL-c2/Sm14 foi construído pela digestão com as enzimas XbaI e Sall e subclonado no vetor de expressão pCI (Promega Corp., Madison, WI). O plasmídeo pCI/Sm14 foi utilizado na transformação bacteriana e os clones contendo o inserto foram selecionados pela adição de ampicilina ao cultivo. A presença do inserto Sm14 no plasmídeo pCI/Sm14

foi confirmada pela digestão do mesmo com as enzimas XbaI e SalI seguida pela eletroforese e análise da sequência de DNA (FONSECA et al., 2006). A purificação do plasmídeo foi realizada utilizando com o Endofree Plasmid Giga KitTM (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) seguindo instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria através do GeneQuant IITM (Amersham-Pharmacia, BioSciences, USA). A presença de LPS na vacina foi avaliada através do kit QCL 1000 Limulus amoebocyte lysate analysis (Bio Whittaker, Walkersville, MD). Paralelamente, foi realizada a transformação com o plasmídeo pCI/Sm14 em *E. coli* Top10.

Avaliação da integridade dos plasmídeos

Como o plasmídeo pVAX e o inserto Hsp65 têm tamanhos semelhantes, de aproximadamente 3000 pares de base, foi utilizada a enzima de restrição BamHI (Invitrogen) para diferenciação do plasmídeo clonado ou vazio, visto que esta enzima apresenta um único sítio de restrição para o plasmídeo. Desta forma, a confirmação do inserto Hsp65 presente no pVAX foi feita a partir da visualização da construção com aproximadamente 6000 pares de base após corrida eletroforética.

A construção pCI/Sm14 contém 4408 pares de base, sendo que o plasmídeo vazio contém 4006 pares de base e o inserto do gene que codifica a Sm14, 402 pares de base. Para a linearização do plasmídeo foi utilizada a enzima XbaI e para a liberação do inserto, foram utilizadas as duas enzimas de restrição XbaI e SalI.

Para isso, foram utilizadas 5U de cada enzima de restrição para 1µg de cada plasmídeo à 37°C por 3 horas. Em seguida, os produtos da digestão de cada amostra, e também os plasmídeos não digeridos, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (GIBCO BRL) a 1%. No preparo deste gel, as amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25 % azul de bromofenol; 40 % de sucrose em água) e o material foi submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,3) onde o padrão de 1Kb Plus DNA Ladder (GIBCO BRL, Scotland) foi utilizado como marcador de peso molecular. A corrida foi realizada a 76 V por 1 hora utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). O gel foi corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Gibco BRL) e a visualização das bandas feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.4 Imunização

Nos experimentos em que avaliamos o efeito da imunização com o “prime-boost” heterólogo, o “prime” foi realizado com DNA-Sm14 e o “boost” constituiu-se da imunização com DNA-Hsp65 (Grupo 4). O DNA-Sm14 foi administrado por via intramuscular no músculo quadríceps, na dose de 100 µg/dia e concentração de 1µg/µL (50µL em cada perna), nos dias 01, 07, 14 e 21. O DNA-Hsp65 foi administrado nos dias 28, 35 e 42, na mesma dose e concentração do DNA-Sm14. Como controle, camundongos foram imunizados com apenas uma das formulações (Grupo 2 e 3), e as doses foram administradas nos dias especificados na Tabela 2. A infecção por *S. mansoni* ocorreu no 60º dia do experimento.

Tabela 2. Disposição dos grupos utilizando protocolo “prime-boost” heterólogo.

	Imunizações		Infecção
Dia	01 / 07 / 14 / 21	28 / 35 / 42	60
Grupo 1	-	-	+
Grupo 2	-	DNA-Hsp65	+
Grupo 3	DNA-Sm14	-	+
Grupo 4 (“Prime-Boost” HETERÓLOGO)	DNA-Sm14	DNA-Hsp65	+

Para utilização do protocolo “prime-boost” homólogo, o DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 foram administrados simultaneamente (Grupo 4). O DNA-Sm14 (100 µg) e o DNA-Hsp65 (100 µg) foram utilizados na concentração de 2µg/µL cada um, e foram administrados 50µL de cada vacina em pernas diferentes nos dias 01, 07, 14 e 21. Como controle, camundongos foram imunizados com apenas uma das formulações (Grupo 2 e 3), e as doses foram administradas nos dias especificados na Tabela 3. A infecção por *S. mansoni* ocorreu no 36º dia do experimento.

Tabela 3. Disposição dos grupos utilizando protocolo “prime-boost” homólogo.

Dia	Imunizações				Infecção
	01	07	14	21	
Grupo 1	-	-	-	-	+
Grupo 2	DNA-Hp65	DNA-Hp65	DNA-Hp65	DNA-Hp65	+
Grupo 3	DNA-Sm14	DNA-Sm14	DNA-Sm14	DNA-Sm14	+
Grupo 4 (“Prime-Boost” HOMÓLOGO)	DNA-Sm14 / DNA-Hsp65	DNA-Sm14 / DNA-Hsp65	DNA-Sm14 / DNA-Hsp65	DNA-Sm14 / DNA-Hsp65	+

3.5 Avaliação da imunogenicidade das vacinas

Preparo do Antígeno Sm14

A proteína recombinante rSm14 foi cedida pelo Prof. Dr. Sérgio de Oliveira, da UFMG, sendo obtida utilizando-se o vetor de expressão pMAL-c2 *Escherichia coli* (DH5α) (New England Biolabs, Beverly, MA) de acordo com Fonseca e colaboradores (FONSECA et al., 2006). A proteína recombinante rSm14 foi avaliada quanto a presença de LPS através do kit QCL 1000 Limulus amoebocyte lysate analysis (Bio Whittaker, Walkersville, MD).

Ensaio de detecção de anticorpos específicos anti-Sm14

O sangue dos animais vacinados foi coletado pelo plexo orbital, e centrifugado para a separação do soro. A avaliação da presença de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Sm14 após a vacinação foi realizada nos dias 60, 66 e 108 após início da imunização pelo protocolo “prime-boost” heterólogo e nos dias 20, 60 e 84 utilizando protocolo “prime-boost” homólogo.

Para a detecção dos anticorpos pela técnica de ELISA, as placas de cultura de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg/mL de antígeno Sm14 em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 overnight e bloqueadas por 2 horas com 200 µL/poço de PBS/Tween 0,05% com 10% de soro bovino fetal, pH=7,2. As amostras foram então diluídas em 1:200 para IgG1 e 1:20 IgG2a e aplicadas na placa, onde permaneceram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada com PBS/Tween e a presença de anticorpos detectada pela adição de IgG conjugada à peroxidase. A reação colorimétrica foi desenvolvida pela adição de TMB

“reagent set” e o desenvolvimento da reação interrompido com ácido sulfúrico 1M para aquisição da densidade óptica no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro de placas.

Quantificação das citocinas

Duas semanas após a última imunização, para detecção de citocinas do padrão Th1, Th2 e reguladoras no sobrenadante de culturas, 1×10^7 /mL células do baço de camundongos imunizados foram cultivadas *in vitro* com a proteína recombinante rSm14 (20µg/mL) ou com Concanavalina A (Con A, a 10µg/mL) por 48h.

A detecção de citocinas também foi feita no sobrenadante do homogenato do pulmão esquerdo e no sobrenadante do lavado bronco-alveolar.

Para o ensaio de ELISA para detecção das citocinas IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-5 e TNF-α, as placas de 96 poços foram recobertas com a solução contendo o anticorpo de captura, diluído 1:1000 em tampão carbonato, e incubadas durante a noite, a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com PBS contendo 5% de soro bovino fetal, incubando-se por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas como descrito acima. As amostras e o padrão, utilizado na construção da curva, foram diluídos em tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20. Após a adição das amostras e do padrão, as placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. A detecção de citocinas foi realizada utilizando-se anticorpo de detecção anti-citocinas biotinilado (PharMingen) diluído 1:1000 em tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20. As placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagens, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos com StreptAB kitTM (Dako). Após a lavagem das placas, 100 µL do substrato foi adicionado (TMB reagent set) em cada poço em ambiente escuro. A reação foi finalizada pela adição de 50 µL de uma solução de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placas a 490 nm.

Proliferação celular

A proliferação celular foi medida através da incorporação de [^3H]-Timidina. Os baços foram macerados e as suspensões celulares lavadas e ressuspensas em RPMI-1640 (Sigma) completo (suplementado com 5% de soro bovino fetal, 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 20 mM Hepes). Nestes ensaios, foram utilizadas preparações de células totais. Para avaliar a atividade proliferativa dos esplenócitos dos diferentes grupos experimentais, suspensões celulares contendo 5×10^5 células em 200 μl em meio RPMI-C foram incubadas na presença ou ausência de rSm14 (25 $\mu\text{g/mL}$) ou ConA (25 $\mu\text{g/mL}$), em placas de 96 poços de fundo chato (Costar 3595, Corning, NY, USA). As células foram cultivadas por 96 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO_2 , sendo que 18 horas antes do término da cultura, as células foram incubadas com [^3H]-timidina na concentração de 0,25 $\mu\text{Ci/poço}$. As células foram coletadas em coletor de células (Inotech Cell Harvester, USA). A leitura foi realizada no contador de cintilação β (Beckman, Brea, CA, USA), o qual expressa a proliferação através da cpm (contagem por minuto) de radiação β .

3.6 Avaliação da resposta imune na fase pulmonar

Contagem total e diferencial das células do lavado bronco-alveolar (LBA) e do sangue

O LBA dos animais imunizados pela estratégia “prime-boost” heteróloga foi obtido 06 dias após infecção, enquanto utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo, o LBA foi obtido 15 dias após infecção. As células foram obtidas do LBA através de um catéter acoplado a uma seringa contendo 1 mL de solução de PBS estéril, sendo este procedimento realizado três vezes no caso do protocolo “prime-boost” heterólogo e apenas uma vez no caso do protocolo “prime-boost” homólogo. O exsudato total foi adicionado em tubo plástico de 15 mL e a contagem do número total de células presentes nos lavados foi feita empregando solução de TURK e câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada em esfregaços preparados em citocentrífuga e corados utilizando os corantes Panótico Rápido (LB). Outra parte do LBA foi utilizada para a dosagem de citocinas.

O sangue dos animais imunizados pela estratégia “prime-boost” homólogo foi coletado pela veia do plexo orbital. Para a contagem do número de células totais, foi

utilizada solução TURK e câmera de Neubauer, enquanto a contagem diferencial das células foi feita após realização de esfregaço sanguíneo e coloração utilizando os corantes Panótico Rápido (LB).

Análise histopatológica do pulmão

Os fragmentos dos tecidos, removidos por ocasião da morte dos animais, foram fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 24 horas, e em seguida foram submetidos ao processo de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol. Os tecidos foram inclusos em blocos de parafina e em seguida foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 58-60° C para fixação. Em seguida, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto aos 80%). Os cortes reidratados foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de infiltrado inflamatório do tecido. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (80% ao absoluto), lavados com xilol e cobertos com lamínulas para análise dos componentes celulares presentes.

3.7 Avaliação do efeito protetor após infecção, induzido pelo emprego das estratégias “prime-boost”

Avaliação da carga parasitária: Recuperação de vermes adultos

Para avaliar a eficácia da estratégia vacinal proposta, os vermes adultos foram recuperados dos camundongos 48 dias após a infecção através da perfusão do sistema porta. O grau de proteção foi medido pela comparação entre o número de vermes recuperados em cada grupo experimental e seu respectivo controle, de acordo com a fórmula:

$$GP = \frac{RGC - RGE}{RGC} \times 100$$

Onde GP é grau de proteção, RCG é recuperação no grupo controle e RGE, recuperação no grupo experimental (FONSECA et al., 2004).

Viabilidade dos ovos pelo método de Oograma

Os fragmentos intestinais retirados para a análise do Oograma foram lavados em solução salina e ligeiramente secados em papel absorvente. Posteriormente, os mesmos foram comprimidos entre lâmina e lamínula para realização da leitura (PELLEGRINO e FARIA, 1965). Os fragmentos foram microscopicamente analisados, contando-se 200 ovos/camundongo, os quais foram classificados de acordo com os seus estádios de desenvolvimento. Os ovos foram classificados em: (i) ovos imaturos viáveis (de 1º a 4º estágio); (ii) ovos maduros viáveis; e (iii) ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes) (PELLEGRINO e KATZ, 1969).

3.8 Análise da geração de células de memória por Citometria de Fluxo

O baço dos camundongos imunizados e infectados (15, 48 ou 105 dias após infecção) foi macerado e as hemáceas foram lisadas com Tampão de Lise (0,85% de NH_4Cl). 1×10^6 leucócitos foram então coletados em tubos específicos para citometria, centrifugados a 400g por 10 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com 1 mL de sobrenadante de cultura contendo o anticorpo Fc Block, a 4°C por 30 minutos. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 400g por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μL de Tampão Facs (PBS 1x, 2% de SBF e 1g/litro de NaH_3) e incubadas com os anticorpos monoclonais de interesse durante 30 minutos, no escuro à 4°C. Passado o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com Tampão Facs (2mL/tubo) e centrifugadas a 400g, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” ressuspensos em 300 μL de PBS contendo 1% de formaldeído para posterior leitura em Citômetro de Fluxo (*FACSCanto*TM – BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) , onde foram adquiridos 30000 eventos por tubo. Todos os anticorpos utilizados foram da BD Bioscience (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). As células foram marcadas quanto à presença de CD4, CD8, CD44 e CD62L, nos quais cada anticorpo estava ligado ao respectivo composto fluorescente na seguinte forma: CD4-PE (clone GK1.5) , CD8-PerCP (clone 53-6.7), CD44-APC (clone A95-1) e CD62L-FITC (clone MEL-14).

3.9 Análise estatística

Para comparação das médias obtidas entre os diversos grupos nos experimentos, foi utilizado o teste ANOVA, utilizando Newman-Keuls post test com significância estabelecida de $*p < 0,05$.

3.10 Resumo do delineamento experimental utilizando os protocolos:

- “Prime-Boost” Heterólogo

A

B

Figura 2. Protocolo de vacinação “prime-boost” heterólogo. A) Avaliação da imunogenicidade da vacinação; B) Avaliação dos efeitos profiláticos da vacinação.

- “Prime-Boost” Homólogo

A **B**

Figura 3. Protocolo de vacinação “prime-boost” homólogo. A) Avaliação da imunogenicidade da vacinação; B) Avaliação dos efeitos profiláticos da vacinação.

4. RESULTADOS

A seguir, os resultados referentes à análise dos protocolos vacinais utilizando as estratégias “prime-boost” homólogo e heterólogo estão apresentados em duas partes distintas.

4.1 Parte I – Avaliação da estratégia “prime-boost” heterólogo

4.1.1 PERFIL IMUNOGÊNICO DAS VACINAS

Após determinar as estratégias de vacinação, o primeiro parâmetro a ser analisado é a sua capacidade de estimular as células do sistema imunológico e proteger contra o patógeno em questão. Estudos anteriores mostraram que para obtenção de resposta imune protetora contra *S. mansoni* é necessária a indução da resposta imune humoral e celular específicas (JANKOVIC et al., 1999).

A avaliação da estratégia “prime-boost” heterólogo foi realizada utilizando o DNA-Sm14 como “prime” e o DNA-Hsp65 como “boost”.

Produção de anticorpos específicos anti-Sm14

Trabalhos anteriores mostraram que a vacinação com DNA-Sm14 ou com DNA-Hsp65 induzem ativação de linfócitos B e a geração de anticorpos IgG específicos para cada proteína (FONSECA et al., 2006; SOUZA et al., 2008). Com o objetivo de verificarmos se a adição da vacina DNA-Hsp65 modifica o perfil de produção de anticorpos anti-Sm14 obtido pela imunização com DNA-Sm14, avaliamos a produção de IgG1 e IgG2a em camundongos C57BL/6, vacinados e posteriormente infectados, seguindo o protocolo “prime-boost” heterólogo.

Animais não imunizados e não infectados tiveram valores basais similares de IgG1 nos dias 0 e 60, o mesmo fenômeno foi visto para IgG2a nesses dias. Aos 06 dias após infecção dos animais não imunes (dia 66), não observamos mudança significativa na produção de ambos os isotipos de anticorpos. No entanto, 48 dias após infecção, a produção de anticorpos IgG1 estava 6 vezes aumentada nesses animais (Figura 4^a), enquanto a produção de IgG2a não foi alterada (Figura 4B). A

produção de IgG1 e IgG2a por animais vacinados apenas com DNA-Hsp65 antes e após infecção foi semelhante ao grupo não vacinado (Figura 4).

Os animais vacinados com DNA-Sm14 tiveram aumento semelhante na produção de IgG1 e IgG2a no dia 60 após imunização. Porém, 06 dias após infecção, os títulos de IgG1 não foram modificados, enquanto IgG2a aumentou 50% em relação ao dia 60. Aos 48 dias de infecção, os títulos de IgG2a continuaram a aumentar (37%), enquanto a produção de IgG1 foi reduzida pela metade em relação ao dia 66. Interessantemente, a imunização utilizando as duas vacinas em “prime-boost” heterólogo, aumentou a quantidade de IgG2a de forma semelhante à vacinação com DNA-Sm14 nos dias 60 e 108, porém a produção de IgG1 aumentou 4 vezes 6 dias após infecção e permaneceu elevada no dia 108, ao contrário do que ocorreu nos animais vacinados somente com DNA-Sm14 (Figura 4).

A análise da razão IgG1/IgG2a é uma forma de demonstrar como as vacinações interferem no perfil de células T gerado. Quanto menor a razão IgG1/IgG2a, mais o perfil imune é direcionado à resposta Th1, por outro lado, quanto maior a razão, a resposta é mais direcionada ao perfil Th2. Desse modo, observamos que nos dias 66 e 108 após vacinação, os animais vacinados com DNA-Sm14 possuem menor razão IgG1/IgG2a em relação aos animais vacinados pela estratégia “prime-boost” heterólogo nos respectivos dias (Tabela 4), mostrando que após infecção, o DNA-Sm14 induz elevada resposta Th1 e que a adição do DNA-Hsp65 à vacinação reduz este perfil de resposta.

Figura 4. Títulos de anticorpos anti-Sm14 de camundongos não imunizados, ou imunizados com DNA-Hsp65, DNA-Sm14 ou ambas utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo. A) IgG1 anti-Sm14; B) IgG2a anti-Sm14. A dosagem de anticorpos específicos presentes no soro de camundongos C57BL/6 sem imunização, imunizados com DNA-Hsp65, DNA-Sm14, ou ambas, foi realizada duas semanas após última imunização, seis dias após infecção e 48 dias após infecção. A infecção (↓) com 30 cercárias foi realizada no dia 60 após início das imunizações. O soro dos animais foi submetido a diluições de 1:200 para IgG1 e 1:20 para IgG2a. A dosagem foi realizada pelo método de ELISA, sendo avaliada a Densidade Óptica (D.O.) das amostras em 490nm. Resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-7 animais por grupo, sendo os valores de cada ponto relacionados à média de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs Sem imunização; # $p < 0,05$ vs DNA-Sm14. (↑) indica os dias das vacinações, na qual DNA-Sm14 foi administrada nos dias 1, 7, 14 e 21, enquanto DNA-Hsp65 nos dias 28, 35 e 42.

Tabela 4. Razão IgG1/IgG2a anti-Sm14 nos diferentes dias após imunização com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65

Dias ¹	Grupos	
	DNA-Sm14	DNA-Sm14 + DNA-Hsp65
60	1,10	0,35
66	0,75	1,87
108	0,27	0,86

¹: dias após início da imunização

Produção de citocinas após imunização

Com a proposta de avaliar o padrão de resposta de células T específicas para o epítipo Sm14 de *S. mansoni*, as células do baço dos camundongos foram estimuladas em cultura e a produção de citocinas avaliada. A Con A foi utilizada como estímulo policlonal às células T (controle positivo), e a proteína rSm14 como estímulo específico.

Neste sentido, a vacinação com DNA-Sm14 levou à elevada produção de IFN- γ e IL-10, após reestímulo com a rSm14, enquanto os animais vacinados com DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 produziram quantidades significativamente menores das duas citocinas (Figura 5 A e B). Não houve produção de IL-5 por nenhum dos grupos (Figura 5C) e a produção de TNF- α foi semelhante entre os animais vacinados com DNA-Sm14 e DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 (Figura 5D). Quando estimuladas com Con A, as células de ambos os grupos estavam igualmente responsivas ao estímulo policlonal, com exceção da produção de IFN- γ pelos animais vacinados com DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, que foi menor quando comparada aos vacinados apenas com DNA-Sm14 (Figura 5A).

Figura 5. Concentração de citocinas em cultura de células de baço de animais imunizados com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” heterólogo após reestímulo com rSm14. A) IFN-γ; B) IL-10; C) IL-5; D) TNF. Aos 60 dias após início da imunização, 1×10^7 /mL células do baço de camundongos C57BL/6 vacinados e não infectados foram cultivadas duas semanas após a última imunização, e foram reestimuladas *in vitro* com a proteína rSm14 (20µg/mL) ou ConA (10µg/mL) por 48 horas. A quantificação foi realizada pelo método de ELISA e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs não estimulado; # $p < 0,05$ vs DNA-Sm14; & $p < 0,05$ vs estimulação com rSm14. ND – não detectado no sobrenadante.

4.1.2 PERFIL DE RESPOSTA IMUNE PULMONAR NOS ANIMAIS VACINADOS E INFECTADOS COM *S. mansoni*

Duas semanas após a última imunização, utilizando o protocolo “prime-boost” heterólogo, os camundongos vacinados foram infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* e avaliados quanto à resposta pulmonar ao esquistossômulo, seis dias após infecção. Os parâmetros utilizados foram: contagem de células recuperadas do lavado bronco-alveolar (LBA), quantificação de citocinas no homogenato de pulmão e histologia do parênquima pulmonar.

Células recuperadas do espaço bronco-alveolar

A infecção por *S. mansoni* aumentou o número de células no espaço bronco-alveolar em aproximadamente 3,5 vezes. Após imunização, nenhuma das vacinas modificou esse perfil. Animais sem infecção apresentaram somente células mononucleares no lavado bronco-alveolar, enquanto após 6 dias de infecção, houve discreta presença de neutrófilos, ausência de eosinófilos e 99% das células eram mononucleares nos animais não imunizados. Nenhuma das vacinas sozinhas ou em conjunto modificaram a presença de neutrófilos e mononucleares quando comparadas aos animais sem imunização, enquanto os eosinófilos foram observados apenas nos grupos em que havia a presença da DNA-Sm14 sozinha ou em “prime-boost” com a DNA-Hsp65 (Figura 6).

Figura 6. Número de leucócitos no lavado bronco-alveolar de camundongos imunizados ou não com DNA-Hsp65, DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados ou não com *S. mansoni*. O lavado bronco-alveolar foi obtido 6 dias após infecção de camundongos imunizados. As células totais foram contadas em solução de Turk e as subpopulações de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foram diferenciadas após coloração com Panótico Rápido. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do número de células de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo sem infecção; ND – não detectado no lavado bronco-alveolar.

Concentração de citocinas nos pulmões

As citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram quantificadas a partir do homogenato de pulmão dos animais imunizados seguindo protocolo “prime-boost” heterólogo e posteriormente infectados.

Aos 6 dias após infecção, os animais não imunizados tiveram discreto aumento na produção de IFN- γ , enquanto houve aumento significativo da produção de IL-4 e IL-10 no pulmão desses animais quando comparados aos animais não infectados. A vacinação com DNA-Hsp65 não modificou a produção de IFN- γ em relação aos animais sem imunização, contudo houve discreta redução de IL-4 e significativa redução de IL-10. Os animais que receberam DNA-Sm14 foram os únicos que tiveram produção de IFN- γ significativamente elevada em relação aos outros animais infectados, a redução de IL-4 foi modesta e a produção de IL-10 estava similarmente elevada quando comparada aos animais somente infectados. A utilização do protocolo “prime-boost” heterólogo não induziu o mesmo aumento de IFN- γ visto nos animais imunizados apenas com DNA-Sm14, neste grupo houve redução significativa de IL-4 e IL-10 em relação aos animais não imunizados (Figura 7). Esses dados corroboram com os obtidos em cultura de células de baço (Figura 5).

Figura 7. Concentração de citocinas nos pulmões de animais imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados ou não com *S. mansoni*. Os camundongos foram infectados duas semanas após a última dose e 6 dias após infecção o lobo esquerdo do pulmão foi retirado e homogeneizado para quantificação das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem infecção; # $p < 0,05$ vs Sem Imunização + Infecção.

Análise histopatológica dos pulmões

Além da migração de células para o espaço bronco-alveolar, os pulmões dos animais vacinados e infectados foram avaliados quanto à preservação do parênquima. Seis dias após infecção por *S. mansoni*, o parênquima pulmonar dos animais infectados apresentava-se preservado (Figura 8B), semelhante aos animais não infectados. A vacinação com DNA-Hsp65 não modificou esse perfil (Figura 8C). Contudo, animais imunizados com DNA-Sm14 (Figura 8D) apresentavam discreta modificação tecidual quando comparados aos animais sem imunização (Figura 8B), e nesse caso, a vacinação “prime-boost” heterólogo (Figura 8E) não modificou o efeito da DNA-Sm14 sozinha. No entanto, essa modificação não influenciou no arranjo do parênquima, nem na migração de células inflamatórias para o órgão.

Figura 8. Análise histológica do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não pela estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados ou não com *S. mansoni*. A) Controle não infectado; B) Sem imunização + infecção; C) DNA-Hsp65 + infecção; D) DNA-Sm14 + infecção; E) DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 + infecção. Duas semanas após imunização com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou ambas, os animais foram infectados e 06 dias pós-infecção foi realizada a análise histológica de fragmentos do pulmão, na qual foi utilizada a coloração de Hematoxilina-eosina (Aumento 200X).

4.1.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA VACINAÇÃO APÓS INFECÇÃO

O principal parâmetro a ser analisado quando se avalia a eficácia de uma vacina contra determinada infecção é seu efeito protetor, diretamente relacionado com a redução do número de microrganismos no hospedeiro. No caso da esquistossomose, a redução da carga parasitária, do dano tecidual e da viabilidade dos ovos.

Avaliação da carga parasitária

A avaliação da eficácia as vacinas foi realizada 48 dias após infecção com 30 cercárias de *S. mansoni* através da perfusão do sistema porta-hepático para recuperação dos helmintos.

Observamos que os animais infectados e não vacinados apresentavam em média 22 vermes por animal. A vacinação com DNA-Hsp65 não reduziu a carga parasitária quando comparada aos animais sem imunização. No entanto, a administração de DNA-Sm14 reduziu o número de vermes em 33,9%, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, ao analisar o efeito do “prime-boost” heterólogo, o DNA-Hsp65 anulou o efeito protetor da DNA-Sm14, uma vez que a recuperação dos vermes nesses animais foi semelhante ao grupo sem imunização (Tabela 5; Figura 9).

Tabela 5. Carga parasitária após infecção por *S. mansoni* em animais vacinados com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65 utilizando protocolo “prime-boost” heterólogo.

Grupo	Média	$\pm$ S.E.	n	Eficácia
Sem imunização	22,40	4,479	5	-
DNA-Hsp65	22,83	2,344	6	-
DNA-Sm14	14,80	2,417	5	33,9%
DNA-Sm14 + DNA-Hsp65	22,83	3,978	6	-

Figura 9. Número de vermes adultos recuperados em animais vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados com *S. mansoni*. Duas semanas após a última dose da imunização, os camundongos foram infectados com 30 cercárias (s.c) e a avaliação da proteção foi realizada através da recuperação dos vermes adultos por perfusão do sistema porta-hepático 48 dias após infecção. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo.

Efeito da vacinação na viabilidade dos ovos

No 48º dia após infecção, aproximadamente 70% dos ovos presos na mucosa intestinal dos animais infectados e sem imunização eram de estágio de desenvolvimento imaturo (1º a 4º estágio), seguido da presença de 20% de ovos maduros e aproximadamente 10% de ovos inviáveis. A imunização com DNA-Hsp65 não modificou a maturação dos ovos em nenhum estágio. No entanto, após vacinação com DNA-Sm14, houve aumento discreto, porém significativo, da presença de ovos inviáveis. Na utilização do protocolo “prime-boost” heterólogo, também foi verificado aumento de ovos inviáveis, porém, dessa vez, sem significância estatística, mostrando que o DNA-Hsp65 não modulou o efeito na inviabilidade dos ovos visto pelo DNA-Sm14 sozinho (Figura 10). No entanto, a observação de todos os estágios de desenvolvimento dos ovos indica que a vacinação não causa interferência na oviposição pelas fêmeas, mas de certa forma, modifica o amadurecimento dos ovos.

Figura 10. Estádio de desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* na mucosa intestinal de camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” heterólogo e infectados com *S. mansoni*. Fragmentos do intestino foram coletados 48 dias após infecção, e submetidos à técnica de Oograma. Os ovos visualizados ao microscópio óptico foram classificados em imaturos, maduros e inviáveis. Os resultados foram expressos como média da porcentagem $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem imunização + Infecção.

Influência da vacinação no número de eosinófilos

A infecção por *S. mansoni*, como esperado, induziu aumento de eosinófilos no lavado bronco-alveolar de animais não imunizados, no 48º dia após infecção. Observou-se que a vacinação com DNA-Hsp65 reduziu de forma significativa o número relativo de eosinófilos, enquanto a vacinação com DNA-Sm14 induziu o recrutamento de eosinófilos de maneira semelhante aos animais não imunizados. Na utilização da estratégia “prime-boost” heterólogo, o DNA-Hsp65 foi capaz de reduzir o número dessas células, mesmo na presença do DNA-Sm14 (Figura 11B). O número absoluto de eosinófilos teve perfil semelhante ao número relativo, no entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 11A).

Figura 11. Número absoluto e relativo de eosinófilos, 48 dias após infecção, no lavado bronco-alveolar de camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou com DNA-Sm14 + DNA-Hsp65, seguindo a estratégia “prime-boost” heterólogo e posteriormente infectados ou não com *S. mansoni*. A) Número absoluto no LBA; B) Número relativo de eosinófilos no LBA. O LBA foi coletado 48 dias após infecção dos animais vacinados e foi realizada a contagem de células totais pela coloração de Turk e as subpopulações de células foram diferenciadas após coloração com Panótico Rápido. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem infecção; # $p < 0,05$ vs Sem imunização + Infecção.

4.2 Parte II – Avaliação da estratégia “prime-boost” homólogo

Com o objetivo de otimizar e diminuir o período de imunizações, que no protocolo “prime-boost” heterólogo era de 7 semanas, decidimos realizar o protocolo “prime-boost” homólogo, no qual o DNA-Sm14 e o DNA-Hsp65 foram administrados de forma simultânea como “prime”, e posteriormente por 3 semanas consecutivas foram realizados os “boosts” semelhantes ao “prime” (Tabela 3). A hipótese era que a administração simultânea induziria expressão de ambas as proteínas de interesse de forma concomitante, aumentando as chances da Hsp65 atuar como imunoestimulante, simultaneamente aos efeitos específicos da Sm14.

Após a análise dos resultados obtidos pela estratégia de vacinação “prime-boost” heterólogo, realizamos modificações em alguns experimentos e adicionamos a análise de outros aspectos que julgamos ser importantes no entendimento da ação das vacinas na infecção por *S. mansoni*.

4.2.1 PERFIL IMUNOGÊNICO DA VACINAÇÃO

Produção de anticorpos específicos anti-Sm14

Vinte dias após o início das imunizações, nenhuma das vacinações modificou a produção de IgG1 quando comparadas aos animais sem imunização. Aos 24 dias após infecção (Dia 60) não houve modificação da produção de IgG1 nos animais não imunizados, ou imunizados com qualquer esquema de vacinação. No entanto, 84 dias após o início das imunizações, que corresponde a 48 dias de infecção, houve aumento da produção de IgG1 anti-Sm14 tanto nos animais não imunizados, quanto nos animais vacinados com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou ambas, do mesmo modo que o observado no protocolo “prime-boost” heterólogo, sendo seu título significativamente maior nos animais que receberam DNA-Sm14/DNA-Hsp65, quando comparado aos animais sem imunização (Figura 12A).

No que diz respeito à produção de IgG2a (Figura 12B), não foi detectada a produção desse isotipo nos animais não imunizados, e o mesmo foi observado para os animais vacinados com DNA-Hsp65. Os animais vacinados com DNA-Sm14

produziram uma quantidade significativamente maior de IgG2a em relação aos animais sem imunização nos dias 20, 60 e 84. No entanto, a produção desse isotipo durante a vacinação simultânea com DNA-Sm14/DNA-Hsp65 foi significativamente menor em relação à imunização com DNA-Sm14 no dia 20, e foi semelhante no dia 60 e 84.

Assim como observado no protocolo “prime-boost” heterólogo, a razão IgG1/IgG2a foi menor nos animais vacinados com DNA-Sm14 quando comparados aos imunizados com ambas as vacinas (Tabela 6)

Tais dados demonstram que a adição da DNA-Hsp65, em ambos os protocolos utilizados não foi capaz de aumentar a produção de IgG2a anti-Sm14 (Figura 12B), que possui perfil protetor durante imunização e infecção. Além disso, o DNA-Sm14 induziu maior perfil de resposta Th1 em comparação aos animais que receberam as duas vacinas.

Figura 12. Títulos de anticorpos anti-Sm14 após imunização ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou ambas as vacinas utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo. A) IgG1 anti-Sm14; B) IgG2a anti-Sm14. A dosagem de anticorpos específicos de camundongos C57BL/6 sem imunização, imunizados com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, foi realizada 20, 60 e 84 dias após a primeira imunização. A infecção (↓) com 30 cercárias foi realizada no dia 36 após início das imunizações. O soro dos animais foi submetido a diluições de 1:200 para IgG1 e 1:20 para IgG2a. A dosagem foi realizada pelo método de ELISA, sendo avaliada a Densidade Óptica (D.O.) das amostras em 490nm. Resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-7 animais por grupo, relativo a um experimento. * $p < 0,05$ em relação aos animais sem imunização; # $p < 0,05$ em relação aos animais vacinados com DNA-Sm14/DNA-Hsp65. (↑) indica os dias das vacinações, na qual DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou ambas foram administradas nos dias 1, 7, 14 e 21.

Tabela 6. Razão IgG1/IgG2a anti-Sm14 nos diferentes dias após imunização com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65

Dias ¹	Grupos	
	DNA-Sm14	DNA-Sm14/DNA-Hsp65
20	0,11	0,17
60	0,06	0,14
84	0,47	0,61

¹: dias após início da imunização

Proliferação de células T específicas

A fim de verificarmos se a vacinação “prime-boost” homóloga altera a proliferação de células T específicas na presença da proteína Sm14 após imunização, foi realizado o ensaio de proliferação das células do baço, através da incorporação de [³H]-Timidina.

Células do baço de animais vacinados com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14 / DNA-Hsp65 que não sofreram reestímulo *in vitro*, apresentaram proliferação basal, sem diferença entre os dois esquemas de vacinação. Após reestímulo com a proteína rSm14, houve aumento na proliferação de células T específicas dos camundongos vacinados com DNA-Sm14, e este aumento não foi modificado pela vacinação simultânea com DNA-Hsp65, quando utilizado o protocolo “prime-boost” homólogo. Sob reestímulo policlonal, utilizando Con A, o mesmo fenômeno foi observado, no entanto, houve maior proliferação celular quando comparada às células reestimuladas com rSm14 (Figura 13). Este fato demonstra que a adição da DNA-Hsp65 à vacinação com DNA-Sm14 não influenciou na expansão clonal de células T específicas para Sm14, nem na expansão policlonal dos linfócitos T.

Figura 13. Proliferação de células T do baço de animais imunizados com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, utilizando estratégia “prime-boost” homólogo, em resposta ao reestímulo *in vitro* com a proteína rSm14 ou Con A. Partindo de baços de camundongos imunizados e não infectados, 5×10^5 células foram coletadas e cultivadas duas semanas após a última dose das vacinas e foram reestimuladas *in vitro* com a proteína rSm14 (25µg/mL) ou Con A (25µg/mL) por 96 horas. A timidina foi incorporada às células do baço 18 horas antes do término da cultura e a radiação β emitida pelas células marcadas que proliferaram foi detectada em β -cintilador. Os resultados indicam a média $\pm$ erro padrão da cintilação por minuto emitida pelas células de 2-5 poços sob cada estímulo. * $p < 0,05$ vs células não reestimuladas *in vitro*.

4.2.2 PERFIL DE RESPOSTA IMUNE PULMONAR NOS ANIMAIS VACINADOS E INFECTADOS COM *S. mansoni*

Duas semanas após a última imunização, utilizando o protocolo “prime-boost” homólogo, avaliamos os parâmetros pulmonares através do recrutamento de células para o espaço bronco-alveolar, pela da contagem de células recuperadas no lavado bronco-alveolar (LBA), produção de citocinas no LBA, produção de citocinas e leucotrienos no homogenato de pulmão e histologia do parênquima pulmonar.

Células recuperadas do espaço bronco-alveolar

Ao desenvolvermos o protocolo “prime-boost” homólogo, realizamos uma modificação no dia de avaliação da resposta imune pulmonar, que no protocolo “prime-boost” heterólogo era aos 06 dias. Neste novo protocolo de vacinação homóloga avaliamos o infiltrado celular aos 15 dias de infecção, com a hipótese de que nesse período pudéssemos observar uma resposta imune pulmonar mais robusta, visto que o esquistossômulo passa pelo pulmão entre os dias 6 e 10.

Aos 15 dias de infecção, o número de células totais no espaço bronco-alveolar estava aumentado nos animais não imunizados quando comparado aos animais não infectados, e enquanto os animais não infectados apresentaram somente células mononucleares, a infecção induziu o recrutamento de um pequeno número de neutrófilos e eosinófilos. A vacinação com DNA-Hsp65, DNA-Sm14, ou ambas em protocolo “prime-boost” homólogo não modificou o perfil de células no espaço bronco-alveolar quando comparado aos animais infectados e não imunizados (Figura 14).

Figura 14. Número de leucócitos no lavado bronco-alveolar de camundongos imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com *S. mansoni*. O lavado bronco-alveolar foi obtido de camundongos 15 dias após infecção de camundongos imunizados na estratégia “prime-boost” homólogo. As células totais foram contadas em solução de Turk e as subpopulações de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foram diferenciadas após coloração com Panótico Rápido. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do número de células de 5-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem infecção. ND: Não detectado.

Concentração de citocinas nos pulmões

A produção de IFN- γ foi avaliada no lavado bronco-alveolar 15 dias após infecção dos animais imunizados a fim de verificar como a vacinação influenciou na ativação das células presentes no espaço bronco-alveolar.

Apesar de não ter sido observada diferença no recrutamento de células aos 15 dias de infecção (Figura 14), a produção de IFN- γ foi diferente entre os grupos vacinados. Os animais vacinados com DNA-Hsp65 não apresentaram aumento da citocina quando comparados aos animais não imunizados. Em contrapartida, a imunização com DNA-Sm14 sozinho levou a aumento significativo de IFN- γ , o que não foi visto na estratégia “prime-boost” homólogo, no qual a administração simultânea de DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 levou à redução da produção de IFN- γ pelas células presentes no espaço bronco-alveolar (Figura 15).

No que diz respeito à concentração de citocinas no homogenato de pulmão, observamos elevada concentração de IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos animais infectados e sem imunização. Neste ponto da infecção, independente do esquema de vacinação, a imunização não modificou a produção de citocinas nos pulmões dos animais infectados. Observamos ainda que todas as citocinas estavam em maiores quantidades no protocolo atual (Figura 16) em relação ao protocolo de “prime-boost” heterólogo (Figura 7), este fato pode estar diretamente relacionado ao tempo de infecção observado, que sofre influência da resposta imune direcionada contra o patógeno, independente da vacinação.

Figura 15. Concentração de IFN- γ no lavado bronco-alveolar de animais imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com *S. mansoni*. Os camundongos foram infectados duas semanas após a última dose conforme protocolo “prime-boost” homólogo e 15 dias após infecção, o lavado bronco-alveolar foi retirado, centrifugado e quantificado IFN- γ no sobrenadante pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-7 animais por grupo. # $p < 0,05$ vs DNA-Sm14 + Infecção.

Figura 16. Concentração de citocinas nos pulmões de animais imunizados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando estratégia “prime-boost” homólogo e infectados ou não com *S. mansoni*. Os camundongos foram infectados duas semanas após a última dose, conforme protocolo “prime-boost” homólogo, e 15 dias após infecção, o lobo esquerdo do pulmão foi retirado e homogeneizado para quantificação das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 5-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem infecção.

Análise histopatológica dos pulmões

Os pulmões dos animais vacinados e infectados foram avaliados quanto à preservação tecidual. Aos 15 dias após infecção por *S. mansoni*, o parênquima pulmonar dos animais infectados e não imunizados (Figura 17B) possuíam maior aspecto inflamatório em relação aos animais não infectados (Figura 17A). A vacinação com DNA-Hsp65 não modificou o aspecto inflamatório da infecção (Figura 17C). Os animais imunizados com DNA-Sm14 apresentavam discreta modificação tecidual quando comparados aos animais infectados e não imunizados (Figura 17D), e este perfil não foi alterado no esquema “prime-boost” homólogo de vacinação (Figura 17E)

Figura 17. Análise histológica do parênquima pulmonar de animais vacinados ou não pela estratégia “prime-boost” homólogo e infectados ou não com *S. mansoni*. A) Controle não infectado; B) Sem imunização + infecção ; C) DNA-Hsp65 + infecção; D) DNA-Sm14 + infecção; E) DNA-Sm14/DNA-Hsp65 + infecção. Duas semanas após imunização com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou ambas, os animais foram infectados e 15 dias pós-infecção foi realizada a análise histológica de fragmentos do pulmão, na qual foi utilizada a coloração de Hematoxilina-eosina (Aumento 200X).

4.2.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA VACINAÇÃO APÓS INFECÇÃO

Avaliação da carga parasitária

Ao modificar o protocolo para a estratégia de “prime-boost” homólogo, verificamos que da mesma forma que ocorreu no protocolo heterólogo de vacinação, a imunização com DNA-Hsp65 não induziu proteção nos animais infectados, enquanto o DNA-Sm14 foi eficaz em reduzir a carga parasitária em 34,5%, desta vez com significância estatística. Ao utilizar as duas vacinas simultaneamente, verificamos uma redução de 15,25% no número de vermes recuperados (Tabela 7; Figura 18). Tais resultados mostram que as propriedades de imunomodulação e de chaperona da DNA-Hsp65 não mantiveram ou melhoraram a ação da DNA-Sm14 na proteção contra infecção por *S. mansoni*.

Tabela 7. Proteção induzida pela vacinação com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 utilizando protocolo “prime-boost” homólogo após infecção por *S. mansoni*

Grupo	Média	$\pm$ S.E.	n	Eficácia
Sem imunização	19,86	1,405	7	-
DNA-Hsp65	20,17	0,9804	6	-
DNA-Sm14	13	1,024	7	34,5% ($p < 0,05$)
DNA-Sm14/DNA-Hsp65	16,83	0,7491	6	15,25%

Figura 18. Número de vermes recuperados em animais vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com *S. mansoni*. Duas semanas após a última dose da imunização, os camundongos foram infectados com 30 cercárias e a avaliação da proteção foi realizada através da recuperação dos vermes adultos por perfusão do sistema porta-hepático 48 dias após infecção. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 6-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem imunização + Infecção.

Efeito da vacinação na viabilidade dos ovos

A Figura 19 mostra que após 48 dias de infecção, o desenvolvimento dos ovos no intestino dos animais imunizados com DNA-Hsp65 foi semelhante ao dos animais não imunizados, nos quais houve entre 40-50% de ovos imaturos, 40-50% de ovos maduros e 7-8% de ovos inviáveis. Nos animais vacinados com DNA-Sm14, havia 63% de ovos imaturos, 24% de ovos maduros e 13% de ovos inviáveis. A utilização do “prime-boost” homólogo não modificou o estágio de desenvolvimento dos ovos em relação à administração do DNA-Sm14 sozinho e a inviabilidade dos ovos nos animais imunizados com DNA-Sm14 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65 foi significativamente maior quando comparada aos animais apenas infectados.

Além disso, observamos que a modificação no protocolo experimental de vacinação não alterou a propriedade que o DNA-Sm14 tem na inviabilização de uma pequena parte dos ovos de *S. mansoni* no intestino dos animais vacinados e infectados.

Figura 19. Estádio de desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* presentes na mucosa intestinal de camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14/DNA-Hsp65, utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo e infectados com *S. mansoni*. Fragmentos do intestino foram coletados 48 dias após infecção, e submetidos à técnica de Oograma. Os ovos visualizados ao microscópio óptico foram diferenciados em imaturos, maduros e inviáveis. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de cada estágio $\pm$ erro padrão de 6-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem imunização + Infecção.

Influência da vacinação no número de eosinófilos

Utilizando a estratégia de vacinação “prime-boost” homólogo, decidimos implementar a análise de eosinófilos circulantes, além da análise no lavado bronco-alveolar, a fim de verificar se a vacinação causa modificações sistêmicas no número desse granulócito, 48 dias após infecção.

O número absoluto de eosinófilos no lavado bronco-alveolar foi modestamente aumentado após infecção nos animais sem imunização, não havendo modificação quando os animais foram imunizados com DNA-Hsp65. A vacinação com DNA-Sm14 induziu aumento do recrutamento de eosinófilos, no entanto, o mesmo fenômeno não foi mantido quando utilizada a estratégia “prime-boost” homólogo (Figura 20A).

A fim de eliminar as variações do número células totais, que influencia diretamente no número absoluto das subpopulações celulares em cada grupo, analisamos o número relativo de eosinófilos. Neste caso, a infecção induziu aumento significativo dessas células no espaço bronco-alveolar. Nos animais vacinados com DNA-Hsp65 houve uma tendência de redução do granulócito. No entanto, a vacinação com DNA-Sm14 levou a aumento de eosinófilos semelhante aos animais apenas infectados, e quando o DNA-Hsp65 foi administrado simultaneamente ao DNA-Sm14, houve novamente redução do número dessas células no espaço bronco-alveolar (Figura 20B).

Sistemicamente, a infecção induziu aumento do número absoluto de eosinófilos. Após vacinação com DNA-Hsp65 houve redução desse número em relação aos animais apenas infectados. Por outro lado, após imunização com DNA-Sm14 o número de eosinófilos estava elevado, de forma semelhante aos animais infectados e não imunizados e após estratégia “prime-boost” homólogo o mesmo perfil foi mantido (Figura 20C). Em contrapartida, ao analisarmos o número relativo dessas células, observamos que na infecção e na vacinação com DNA-Sm14 há aumento desse granulócito, enquanto a vacinação com DNA-Hsp65 e com DNA-Sm14/DNA-Hsp65 levam à redução relativa de eosinófilos (Figura 20D).

Isso nos leva a crer que a vacinação com DNA-Hsp65 possui influência na produção de eosinófilos, o que pode ter refletido na diminuição do efeito protetor da vacinação neste protocolo experimental.

Figura 20. Número absoluto e relativo de eosinófilos em camundongos vacinados ou não com DNA-Sm14, DNA-Hsp65 ou através do protocolo “prime-boost” homólogo e infectados ou não com *S. mansoni*, 48 dias após infecção, presentes no A, B) lavado bronco-alveolar e C, D) sangue periférico. A) Número absoluto no LBA; B) Número relativo no LBA; C) Número absoluto no sangue; D) Número relativo no sangue. O LBA e o sangue foram coletados 48 dias após infecção dos animais vacinados e foi realizada a contagem de células totais pela coloração de Turk e as subpopulações de células foram diferenciadas após coloração com Panótico Rápido. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 6-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sem infecção.

4.2.4 ANÁLISE DA GERAÇÃO DE CÉLULAS DE MEMÓRIA NO BAÇO DOS ANIMAIS VACINADOS E INFECTADOS COM *S. mansoni*

Uma das principais características das vacinas de DNA é a sua capacidade de induzir a ativação de células B, células T CD4⁺ e CD8⁺ e diferenciação dessas células em células de memória. Em relação à esquistossomose, sabe-se que as células T CD4⁺ são as principais células atuantes na imunidade protetora após vacinação. Desse modo, decidimos observar como as diversas vacinações estariam atuando na formação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória utilizando a estratégia “prime-boost” homólogo. Foi analisada a presença de células de memória, com fenótipo CD44^{hi}CD62L^{low}, no baço dos camundongos 15, 48 e 105 dias após infecção, demonstrada pelo número de eventos adquiridos por citometria de fluxo.

O número de células T CD4⁺ de memória, 15 dias após infecção, não aumentou após vacinação com nenhuma das vacinas sozinhas, nem com a utilização das duas simultaneamente. O número de linfócitos T CD8⁺ de memória nos animais que receberam as vacinas DNA-Hsp65 ou DNA-Sm14 sozinhas também não foi estatisticamente maior que os animais não vacinados. Em contrapartida, após vacinação com DNA-Sm14/DNA-Hsp65 em “prime-boost” homólogo, houve aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ de memória (Figura 21A).

Após 48 dias após infecção, notamos que, em relação às células T CD4⁺, ocorreu exatamente o mesmo fenômeno observado aos 15 dias de infecção, com um aumento gradual de células em todos os grupos com o tempo de infecção, sem diferença entre as diferentes vacinações. Por outro lado, houve uma tendência de aumento de células T CD8⁺ de memória quando os animais foram imunizados com DNA-Hsp65 ou com DNA-Sm14 sozinhos, contudo sem diferença estatística em relação aos animais não vacinados. Houve aumento significativo dessas células após imunização pela estratégia “prime-boost” homólogo (Figura 21B).

Analizamos ainda a presença dessas células durante a fase crônica da doença, 105 dias após infecção, e corroborando o resultado dos dias 15 e 48 após infecção, não houve modificação na presença de linfócitos T CD4⁺ em nenhum dos grupos vacinados, mesmo havendo número maior de células de memória quando comparado aos dias anteriores. As células T CD8⁺ estavam em maiores

quantidades nos animais vacinados com DNA-Sm14 e DNA-Sm14/DNA-Hsp65 em relação aos animais sem imunização (Figura 21C).

Além do número de linfócitos de memória, o número total de linfócitos T CD4+ e CD8+ também foram analisados 15 e 48 dias após infecção. Realizamos uma razão do número de células de memória pelo número total de células T CD4+ ou CD8+ em cada estratégia de vacinação e estas foram comparadas 15 e 48 dias. No que diz respeito às células T CD4+, 48 dias após infecção, o número de células de memória em relação ao total foi menor nos animais sem imunização e aumentou nos animais imunizados com DNA-Hsp65, seguido dos vacinados com DNA-Sm14, possuindo maior razão (0,04) nos animais imunizados utilizando protocolo “prime-boost” homólogo utilizando DNA-Sm14/DNA-Hsp65 (Figura 22A). Em relação às células T CD8+, o aumento da razão de células de memória por células totais seguiu o mesmo padrão das células T CD4+, no entanto, a razão de células T CD8+ de memória/células T CD8+ totais nos animais imunizados com DNA-Sm14/DNA-Hsp65 foi 0,2, um aumento de 5 vezes em relação às células T CD4+, fato verificado principalmente aos 48 dias de infecção (Figura 22B).

Ao analisar o aumento de células de memória com o tempo de infecção, foi visto que a vacinação levou a aumento da geração de células de memória CD4+ em menor instância, e por outro lado, levou à geração principalmente de células de memória CD8+, que aumentaram de 200 eventos adquiridos 15 dias após a infecção para mais de 1000 eventos na fase crônica da doença nos animais imunizados com ambas as vacinas (Figura 23).

Figura 21. Número de linfócitos T de memória ($CD44^{hi}CD62L^{low}$) $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ presentes no baço de camundongos vacinados e posteriormente infectados. A) 15 dias após infecção; B) 48 dias após infecção; C) 105 dias após infecção. Após imunização com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou ambas, os animais foram infectados e 15, 48 dias ou 105 dias pós-infecção, o baço dos camundongos foi retirado e foi realizada a expressão de marcadores com fenótipo de memória para células T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do número de eventos adquiridos de 3-5 camundongos por grupo experimental. * $p < 0,05$ vs Sem imunização + Infecção.

Figura 22. Relação de células de memória pelo número total de linfócitos, 15 ou 48 dias após infecção de animais imunizados ou não com DNA-Hsp65, DNA-Sm14 ou ambas em protocolo “prime-boost” homólogo. A) CD4+ e B) CD8+. Após imunização com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou ambas, os animais foram infectados e após 15 e 48 dias de infecção, o baço dos camundongos foi retirado e foi realizada a expressão de marcadores com fenótipo de memória para células T CD4+ e CD8+ por citometria de fluxo. Foi realizada uma razão do número de células de memória ($CD44^{hi}CD62L^{low}$) pelo número total de cada classe de linfócito, representado pelo número de eventos adquiridos.

Figura 23. Número de linfócitos T de memória (CD44^{hi}CD62L^{low}) presentes no baço de camundongos vacinados segundo protocolo “prime-boost” homólogo, 15, 48 e 105 dias após infecção. **A)** CD4+ CD44^{hi}CD62L^{low}; **B)** CD8+ CD44^{hi}CD62L^{low}. Após imunização com DNA-Sm14, DNA-Hsp65, ou ambas, os animais foram infectados e 15, 48 ou 105 dias pós-infecção, o baço dos camundongos foi retirado e foi realizada a análise de expressão de marcadores com fenótipo de memória para células T CD4+ e CD8+ por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do número de eventos adquiridos de 3-5 camundongos por grupo experimental. **Figura A:** * $p < 0,05$ DNA-Hsp65 48 dias vs 15 dias; # $p < 0,05$ DNA-Hsp65 105 dias vs 48 dias; DNA-Sm14 105 dias vs 48 dias. **Figura B:** * $p < 0,05$ DNA-Sm14/DNA-Hsp65 48 dias vs 15 dias; DNA-Sm14 48 dias vs 15 dias; DNA-Hsp65 48 dias vs 15 dias; # $p < 0,05$ DNA-Sm14/DNA-Hsp65 105 dias vs 48 dias; DNA-Sm14 105 dias vs 48 dias; DNA-Hsp65 105 dias vs 48 dias.

5. DISCUSSÃO

A utilização de vacinas de DNA vem sendo amplamente estudada como uma promissora ferramenta contra diversas doenças, incluindo as parasitárias. Não apenas por sua capacidade em induzir potente resposta celular e humoral, mas principalmente pela possibilidade de modulação do sistema imune, através da implementação de estratégias que potencializem a imunogenicidade das vacinas. Entre elas pode-se citar a utilização de sistemas de liberação para o DNA, incluindo polímeros, lipossomas e nano ou micro partículas, além da possibilidade da utilização de adjuvantes, que podem ser co-administrados como plasmídeos que carregam genes imunomoduladores, como de citocinas e fatores de coestimulação, os quais otimizam ou ajudam a direcionar o perfil de resposta desejada (LADDY e WEINER, 2006; CARVALHO et al., 2010). Estratégias como a associação de plasmídeos expressando diferentes antígenos foram testadas com sucesso, como no caso da filariose linfática humana, na qual foi usada a combinação de dois ou mais antígenos diferentes, com aumento da proteção e imunogenicidade (ANAND et al., 2008), ou contra leishmaniose, onde a associação de antígenos aumentou o número de epítomos alvo pelo sistema imune, com a propensão de uma resposta no mínimo aditiva, se não sinérgica (AHMED et al., 2009). Utilizando este raciocínio, desenvolvemos a idéia da vacinação com plasmídeos diferentes, na expectativa de observar um somatório nas respostas vistas pelo DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 quando administradas sozinhas.

Utilizando o protocolo “prime-boost” heterólogo, onde o DNA-Hsp65 é administrada após o DNA-Sm14, esperava-se que a estimulação do sistema imune após a vacinação específica, levasse a aumento da imunogenicidade da vacinação, com aumento da produção de anticorpos específicos anti-Sm14 e aumento da produção de citocinas pelas células do baço dos animais imunizados.

Fonseca e colaboradores (2004) demonstraram que a imunização com rSm14 induziu a produção dos isotipos anti-Sm14 IgG1 em maior quantidade e IgG2a em menores títulos. Por outro lado, estudos prévios mostraram que a imunização com DNA-Hsp65 sozinho leva à produção de ambos os isotipos de IgG de forma similar (SOUZA et al., 2008). Após imunização utilizando ambos os protocolos “prime-boost” notamos que 48 dias após infecção, houve maior produção de IgG1 em relação à IgG2a por todos os animais, imunizados ou não, fato que está diretamente relacionado com a indução da resposta imune causada pelo helminto. No entanto, o

DNA-Sm14 sozinho ou em associação com DNA-Hsp65 levou à diminuição de IgG1, e ao aumento de IgG2a, na fase inicial e 48 dias após infecção. O aumento do isotipo IgG2a, junto com os eosinófilos participam da citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) contra parasitos extracelulares (CAPRON et al., 1992). Interessantemente, a utilização dos protocolos “prime-boost” não alteraram a produção específica induzida pelo DNA-Sm14 sozinho, o que sugere que neste protocolo, o DNA-Hsp65 não alterou a produção de anticorpos pelos linfócitos B Sm14-específicos. A razão IgG1/IgG2a reflete o perfil imunológico que cada vacinação induz. Visto que a produção de IgG1 é estimulada por IL-4 e a produção de IgG2a por IFN- γ (FINKELMAN et al., 1990), então, quanto menor o valor da razão, mais o perfil imune estará voltado para o padrão Th1. Desse modo, vimos que a razão IgG1/IgG2a é na maioria das vezes menor nos animais vacinados apenas com DNA-Sm14, indicando que esses animais possuem maior direcionamento para o perfil Th1 quando comparados aos animais imunizados com DNA-Sm14 em associação ao DNA-Hsp65 nos esquemas “prime-boost”. Neste caso, o DNA-Hsp65 participa na indução do isotipo de imunoglobulina reduzindo a formação de IgG2a em relação à IgG1. Dados semelhantes foram publicados mostrando que a administração de rHsp65 após imunização com proteína específica, reduziu a produção específica do isotipo IgG2a, apesar de não ter modificado a produção de IgG1 em modelo de uveíte autoimune murina (MARENGO et al., 2009).

O perfil de citocinas gerado após imunização com DNA-Sm14 e reestímulo das células do baço com rSm14 foi similar ao observado por Fonesca e colaboradores (2006), com elevada produção de IFN- γ e IL-10. Contudo, a adição do DNA-Hsp65 à vacinação, utilizando protocolo “prime-boost” heterólogo reduziu a produção dessas citocinas sob reestímulo da rSm14 *in vitro*. Este resultado não era esperado, uma vez que a vacinação com DNA-Hsp65 leva a aumento da produção de IFN- γ com reestímulo específico utilizando a rHsp65, ou estímulo policlonal, com Con A (BONATO et al., 1998; SOUZA et al., 2008). Esperávamos que um microambiente fortemente Th1 fosse criado após as vacinações “prime-boost”, visto que tanto DNA-Sm14, quanto DNA-Hsp65 induzem aumento de citocinas Th1, principalmente de IFN- γ . Contudo, o efeito de adição ou sinergia não foi verificado utilizando a estratégia “prime-boost”, e até o presente não temos explicação para tal

fenômeno. Por outro lado, utilizando o protocolo “prime-boost” homólogo, verificamos que a imunização com ambas as vacinas, não modificou a proliferação de linfócitos T, estimulados *in vitro* com a proteína rSm14 ou com estímulo policlonal, Con A. Em conjunto, esses achados sugerem que mesmo sem a modificação da expansão clonal antígeno específica, as células presentes nos animais vacinados usando os protocolos “prime-boost” têm uma resposta reduzida, vista pela diminuição da produção de IFN- γ , citocina de fundamental importância na eliminação dos esquistossômulos no pulmão (JANKOVIC et al., 1999), e também pela diminuição de IL-10, citocina indispensável para imunorregulação durante a doença (revisado em BELKAID et al., 2006).

As evidências que confirmam os resultados encontrados nos ensaios de imunogenicidade surgem após infecção. Inicialmente notamos que durante a fase pulmonar da doença, estudada no protocolo “prime-boost” heterólogo aos 06 dias de infecção, apesar de não haver diferenças significativas no recrutamento de células para o espaço bronco-alveolar, os maiores produtores de IFN- γ nos pulmões foram os animais vacinados com DNA-Sm14, e os menores produtores de IL-10 foram os que receberam as duas vacinas, corroborando com os resultados obtidos na cultura de células do baço. Após utilizar o protocolo de vacinação “prime-boost” homólogo, 15 dias após infecção, não obtivemos os mesmos resultados vistos na imunização heteróloga, esse resultado pode ter sofrido influência da própria modificação do protocolo, ou mais provavelmente, da resposta imune pulmonar gerada pela infecção numa fase mais tardia, 15 dias ao invés de 06. No entanto, apesar de no parênquima não ter diferença na produção de citocinas, a produção de IFN- γ pelas células recuperadas do espaço bronco-alveolar foi significativamente maior nos animais vacinados com DNA-Sm14, quando comparados aos animais vacinados com as duas vacinas simultaneamente. Relatos sobre a diminuição de IFN- γ e IL-10 após vacinação com DNA-Hsp65 foram vistos em ratos submetidos à indução de encefalomielite auto-imune experimental quando as células dos linfonodos foram reestimuladas com Con A (ZORZELLA-PEZAVENTO et al., 2010). O nosso grupo também mostrou que camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *M. tuberculosis*, quando vacinados com DNA-Hsp65, produzem menos IL-10 no pulmão (FRANTZ et al., 2010).

Todos esses eventos são refletidos no principal parâmetro da eficácia da vacinação, a carga parasitária 48 dias após infecção, na qual, independente do protocolo utilizado, observamos redução de aproximadamente 34% do número de vermes nos animais vacinados com DNA-Sm14 sozinho, enquanto a vacinação com ambas as vacinas, administradas de forma homóloga ou heteróloga, falha em induzir a mesma proteção. A modificação no protocolo administrando as duas vacinas simultaneamente, em “prime-boost” homólogo, foi realizada na tentativa de sincronizar a ação das duas proteínas após serem traduzidas, onde esperava-se aumento na proteção devido à possível melhoria na imunomodulação causada pelo DNA-Hsp65 e também por ação de chaperona, propriedade que as proteínas de choque térmico possuem, na qual ajudam na formação de outras proteínas dentro da célula (revisado em SAIBIL, 2008). Assim como no nosso trabalho, outros grupos de pesquisa relataram anteriormente que a utilização de mais de um plasmídeo, incluindo a coadministração de plasmídeos de citocinas, não aumentou a proteção conferida pelo plasmídeo que continha o gene mais efetivo (GARG e TARLETON, 2002).

O foco principal para indução de proteção nas estratégias utilizadas é indução de resposta Th1, nesse caso principalmente no início da infecção, com a expectativa de eliminação dos esquistossômulos no pulmão. Porém, após estabelecimento da doença, o verme adquire mecanismos de escape tornando-se mais difícil a eliminação. Aos 48 dias de infecção, período em que o helminto está estabelecido no sistema porta-hepático, é induzida resposta Th2, com aumento na produção de eosinófilos. Os eosinófilos são classicamente células importantes na eliminação de helmintos. Nosso grupo já demonstrou sua importância em helmintíases como na *estrongiloides* (MACHADO et al., 2009) e na toxocaríase (FACCIOLI, L. H. et al., 1998; ANIBAL et al., 2007). Por isso, mesmo que o objetivo principal da vacinação, seja a resposta de células Th1, é importante que sejam analisados e investigados todos os possíveis mecanismos efetores da resposta imune contra os helmintos, como a presença de eosinófilos no organismo. O número de eosinófilos no organismo nos animais vacinados, aos 48 dias após infecção, é mais uma evidência que pode justificar em parte a falta de eficácia da estratégia “prime-boost”, na qual houve redução do número desses granulócitos no lavado bronco-alveolar e no sangue dos animais em que havia a co-administração do DNA-Hsp65.

A expressão gênica de Sm14 estudada em diferentes estágios de vida do *S. mansoni* foi identificada nos esquistossômulos, vermes adultos e ovos (BRITO et al., 2002). Esta informação é particularmente importante no que diz respeito à geração e efetividade da resposta imune adaptativa, que é gerada especificamente contra o antígeno em questão. Nesse caso, a geração de células T e de anticorpos específicos para a proteína Sm14 do helminto, que podem atuar nos três estágios antes descritos, é mais uma forma de defesa gerada após vacinação. No nosso trabalho, esta resposta específica foi observada não apenas na geração de anticorpos específicos e produção de citocinas, mas quando foi avaliada a viabilidade dos ovos no intestino dos animais vacinados e infectados, nos quais notamos discreto aumento do número de ovos inviáveis quando na vacinação existia o DNA-Sm14, independentemente do protocolo utilizado e da utilização conjunta do DNA-Hsp65 ou não, mostrando que apesar de discreta, existe uma resposta específica gerada contra os ovos de *S. mansoni*. Em suma, o DNA-Sm14 reduziu a carga parasitária e aumentou a inviabilidade dos ovos no intestino dos animais infectados. No entanto, a associação do DNA-Sm14 com o DNA-Hsp65 seja em “prime-boost” heterólogo ou homólogo não melhora a eficácia do DNA-Sm14 sozinho em nenhum desses aspectos, mas pode ter impacto benéfico na formação do granuloma e deposição de colágeno, aspecto que ainda precisa ser esclarecido.

O achado talvez de maior importância e influência na falta de efetividade vista pelas vacinações “prime-boost”, analisado após as imunizações homólogas, foi a frequência de células de memória no baço dos animais. A baixa indução de linfócitos T CD4⁺ de memória foi um resultado inesperado, visto que, em teoria, as vacinas de DNA induzem ambos os tipos de linfócitos T. Ao que parece, a nossa vacinação ou o protocolo utilizado, culminou em um desvio da ativação das células T CD4⁺ para ativação majoritária de células T CD8⁺. Este resultado pode explicar a baixa eficácia dos protocolos de vacinação testados neste trabalho, pois sabe-se que células T CD8⁺ são essenciais para a erradicação de patógenos intracelulares, estando no caso do parasito extracelular *S. mansoni*, sem função na eliminação do patógeno. Os resultados obtidos contrastam com o de estudos anteriores, os quais mostram que o DNA-Hsp65 é capaz de estimular igualmente o aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos dos animais vacinados e que a maioria dessas células apresentavam fenótipo CD44^{hi} (SILVA, 1999).

De fato, uma série de fatores podem ter contribuído para a falta de eficácia das estratégias de vacinação “prime-boost” no modelo experimental de infecção por *S. mansoni*. Entre elas, os animais vacinados pela estratégia “prime-boost” apresentavam diminuição da imunogenicidade e da resposta pulmonar pela redução de IFN- γ , IL-10; redução do número de eosinófilos 48 dias após infecção e maciça geração de células T CD8+ de memória sob estímulo das vacinas durante todo o curso da infecção, além da importante alteração da relação IgG1/IgG2a observada. Como sugerido por Caldas e colaboradores (2000), mais importante que a resposta imune específica correlacionada com resistência, o grau de imunidade pode depender do resultado do equilíbrio entre imunidade bloqueadora e imunidade protetora. E isso é de crítica importância na especificidade de uma resposta vacinal, na qual a estimulação de uma reação “indesejada” pode não apenas resultar na ausência de efeito, como também pode levar a aumento da susceptibilidade e ainda elevação da patologia gerada (BERGQUIST, 2002).

6. CONCLUSÃO

A co-administração das vacinas DNA-Sm14 e DNA-Hsp65 nas estratégias “prime-boost” heterólogo ou homólogo não foi capaz de gerar proteção contra infecção experimental por *S. mansoni*, e sugerimos que, em parte, a diminuição de IFN- γ , IL-10, a alteração na relação IgG1/IgG2a e a estimulação de células T CD8+ ao invés de CD4+, podem ter contribuído para baixa eficácia dos protocolos vacinais testados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, G.; ZHANG, W.; TORBEN, W.; DAMIAN, R. T.; WOLF, R. F.; WHITE, G. L.; CHAVEZ-SUAREZ, M.; KENNEDY, R. C.; SIDDIQUI, A. A. Protective and antifecundity effects of Sm-p80-based DNA vaccine formulation against *Schistosoma mansoni* in a nonhuman primate model. **Vaccine**, v. 27, p. 2830-2837, 2009a.
- AHMAD, G.; ZHANG, W.; TORBEN, W.; HASKINS, C.; DIGGS, S.; NOOR, Z.; LE, L.; SIDDIQUI, A. A. Prime-boost and recombinant protein vaccination strategies using Sm-p80 protects against *Schistosoma mansoni* infection in the mouse model to levels previously attainable only by the irradiated cercarial vaccine. **Parasitol Res**, v. 105, p. 1767-1777, 2009b.
- AHMED, S. B.; TOUIHRI, L.; CHTOUROU, Y.; DELLAGI, K.; BAHLOUL, C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania* (*Leishmania*) major antigens confers full protection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 27, p. 99-106, 2009.
- AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 79-85, 2006.
- ANAND, S. B.; MURUGAN, V.; PRABHU, P. R.; ANANDHARAMAN, V.; REDDY, M. V.; KALIRAJ, P. Comparison of immunogenicity, protective efficacy of single and cocktail DNA vaccine of *Brugia malayi* abundant larval transcript (ALT-2) and thioredoxin peroxidase (TPX) in mice. **Acta Trop**, v. 107, p. 106-112, 2008.
- ANIBAL, F. F.; ROGERIO, A. P.; MALHEIRO, A.; MACHADO, E. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; ANDRADE, M. C.; SOARES, E. G.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Impact of MK886 on eosinophil counts and phenotypic features in toxocariasis. **Scand J Immunol**, v. 65, p. 344-352, 2007.
- BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S. M.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B.; MORAES, C. N.; SPINELLI, V. [An outbreak of acute schistosomiasis at Porto de Galinhas beach, Pernambuco, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 17, p. 725-728, 2001.
- BARTLEY, P. B.; RAMM, G. A.; JONES, M. K.; RUDELL, R. G.; LI, Y.; MCMANUS, D. P. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. **Int J Parasitol**, v. 36, p. 993-1001, 2006.
- BELKAID, Y.; SUN, C. M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory T cells. **Curr Opin Immunol**, v. 18, p. 406-412, 2006.
- BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 309-314, 2002.
- BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccine: research to development. **Parasitol Today**, v. 14, p. 99-104, 1998.

- BILLECOCQ, A. Protection by phospholipids of *Schistosoma mansoni* schistosomula against the action of cytotoxic antibodies and complement. **Mol Biochem Parasitol**, v. 25, p. 133-142, 1987.
- BONATO, V. L.; LIMA, V. M.; TASCONE, R. E.; LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect Immun.**, v. 66, p. 169-175., 1998.
- BRITO, C. F.; CALDAS, I. R.; COURA FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S. C. CD4⁺ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scand J Immunol**, v. 51, p. 595-601, 2000.
- BRITO, C. F.; OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, S. C.; STREET, M.; RIENGROJPITAK, S.; WILSON, R. A.; SIMPSON, A. J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 377-381, 2002.
- BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; MCMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, p. 163-176, 2009.
- CALDAS, I. R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLOSIMO, E.; CARVALHO, O. S.; MASSARA, C. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELLI, G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 62, p. 57-64, 2000.
- CAPRON, A.; DESSAINT, J. P.; CAPRON, M.; PIERCE, R. J. Schistosomiasis: from effector and regulation mechanisms in rodents to vaccine strategies in humans. **Immunol Invest**, v. 21, p. 409-422, 1992.
- CAPRON, A.; RIVEAU, G. J.; BARTLEY, P. B.; MCMANUS, D. P. Prospects for a schistosome vaccine. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v. 2, p. 281-290, 2002.
- CARVALHO, J. A.; RODGERS, J.; ATOUGUIA, J.; PRAZERES, D. M.; MONTEIRO, G. A. DNA vaccines: a rational design against parasitic diseases. **Expert Rev Vaccines**, v. 9, p. 175-191, 2010.
- CAULADA-BENEDETTI, Z.; AL-ZAMEL, F.; SHER, A.; JAMES, S. Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. **J Immunol**, v. 146, p. 1655-1660, 1991.
- CHIU, B. C.; CHENSUE, S. W. Chemokine responses in schistosomal antigen-elicited granuloma formation. **Parasite Immunol**, v. 24, p. 285-294, 2002.

- CIOLI, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Curr Opin Infect Dis**, v. 13, p. 659-663, 2000.
- COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; LIMA KDE, M.; SILVA, C. L.; RODRIGUES, J. M., JR.; FERNANDES, A. P. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection. **Parasitol Res.**, v. 98, p. 568-575. Epub 2006 Jan 2024., 2006.
- DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J.; WANG, M. M.; HARN, D. A. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. **Vaccine**, v. 20, p. 359-369, 2001.
- DAVIS, H. L. Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. **Curr Opin Biotechnol**, v. 8, p. 635-646, 1997.
- DAVIS, H. L.; MCCLUSKIE, M. J. DNA vaccines for viral diseases. **Microbes Infect**, v. 1, p. 7-21, 1999.
- DEAN, D. A.; MANGOLD, B. L. Evidence that both normal and immune elimination of *Schistosoma mansoni* take place at the lung stage of migration prior to parasite death. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, p. 238-248, 1992.
- EBERL, M.; LANGERMANS, J. A.; FROST, P. A.; VERVENNE, R. A.; VAN DAM, G. J.; DEELDER, A. M.; THOMAS, A. W.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A. Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees. **Infect Immun**, v. 69, p. 5352-5362, 2001.
- EL RIDI, R.; TALLIMA, H. *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. **Vaccine**, v. 27, p. 666-673, 2009.
- EL RIDI, R.; TALLIMA, H.; MOHAMED, S. H.; MONTASH, M. Depletion of *Schistosoma mansoni* lung-stage schistosomula cholesterol by methyl-beta-cyclodextrin dramatically increases specific antibody binding to surface membrane antigens. **J Parasitol**, v. 90, p. 727-732, 2004.
- ENGERS, H. D.; BERGQUIST, R.; MODABBER, F. Progress on vaccines against parasites. **Dev Biol Stand**, v. 87, p. 73-84, 1996.
- FACCIOLI, L. H.; MEDEIROS, A. I.; MALHEIRO, A.; PIETRO, R. C.; JANUARIO, A.; VARGAFTIG, B. B. Interleukin-5 modulates interleukin-8 secretion in eosinophilic inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 7, p. 41-47, 1998.
- FACCIOLI, L. H.; MOKWA, V. F.; SILVA, C. L.; ROCHA, G. M.; ARAUJO, J. I.; NAHORI, M. A.; VARGAFTIG, B. B. IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. **Mediators of Inflammation** v. 5, p. 8, 1996.

- FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F., JR.; BECKMANN, M. P.; PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; PAUL, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 303-333, 1990.
- FONSECA, C. T.; BRITO, C. F.; ALVES, J. B.; OLIVEIRA, S. C. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. **Vaccine**, v. 22, p. 503-510, 2004.
- FONSECA, C. T.; PACIFICO, L. G.; BARSANTE, M. M.; RASSI, T.; CASSALI, G. D.; OLIVEIRA, S. C. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. **Microbes Infect**, v. 8, p. 2509-2516, 2006.
- FRANTZ, F. G. ; ITO, T ; CAVASSANI, K A ; HOGABOAM, C M ; SILVA, C. L. ; KUNKEL, S. ; FACCIOLI, L. H. . Therapeutic DNA vaccine reduces *Schistosoma mansoni*-induced tissue damage through cytokines balance and decreased migration of myofibroblasts. **The American Journal of Pathology** (no prelo), 2011.
- FRANTZ, F. G.; ROSADA, R. S.; PERES-BUZALAF, C.; PERUSSO, F. R.; RODRIGUES, V.; RAMOS, S. G.; KUNKEL, S. L.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Helminth coinfection does not affect therapeutic effect of a DNA vaccine in mice harboring tuberculosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, p. e700, 2010.
- GARG, N.; TARLETON, R. L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 70, p. 5547-5555, 2002.
- GARSIA, R. J.; HELLQVIST, L.; BOOTH, R. J.; RADFORD, A. J.; BRITTON, W. J.; ASTBURY, L.; TRENT, R. J.; BASTEN, A. Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. **Infect Immun**, v. 57, p. 204-212, 1989.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 927-974, 2000.
- HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 271-280, 2005.
- HSU, S. Y.; HSU, H. F.; LUST, G. L.; DAVIS, J. R.; EVELAND, L. K. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in the liver of hamsters, guinea pigs, and albino rats. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 67, p. 349-356, 1973.
- HURST, M. H.; WILLINGHAM, A. L., 3RD; LINDBERG, R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of

- different stages of single low- or high-dose infections. **Am J Trop Med Hyg**, v. 62, p. 45-56, 2000.
- JANKOVIC, D.; WYNN, T. A.; KULLBERG, M. C.; HIENY, S.; CASPAR, P.; JAMES, S.; CHEEVER, A. W.; SHER, A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. **J Immunol**, v. 162, p. 345-351, 1999.
- JINDAL, S.; DUDANI, A. K.; SINGH, B.; HARLEY, C. B.; GUPTA, R. S. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. **Mol Cell Biol**, v. 9, p. 2279-2283, 1989.
- KALINNA, B. H. DNA vaccines for parasitic infections. **Immunol Cell Biol**, v. 75, p. 370-375, 1997.
- KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. DNA vaccines: general concerns and its applications in human and veterinary medicine/ Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina : Ciências Agrárias** v. 28, p. 709-716, 2007.
- KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. [Critical analysis of the estimated number of *Schistosomiasis mansoni* carriers in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 303-308, 2000.
- KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nat Rev Genet**, v. 9, p. 776-788, 2008.
- LADDY, D. J.; WEINER, D. B. From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. **Int Rev Immunol**, v. 25, p. 99-123, 2006.
- LIU, M.; ACRES, B.; BALLOUL, J. M.; BIZOUARNE, N.; PAUL, S.; SLOS, P.; SQUIBAN, P. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101 Suppl 2, p. 14567-14571, 2004.
- LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L.; COLSTON, M. J.; RAGNO, S.; TASCON, R. E. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. **Vaccine**, v. 15, p. 834-838, 1997.
- LU, S. Heterologous prime-boost vaccination. **Curr Opin Immunol**, v. 21, p. 346-351, 2009.
- MACHADO, E. R.; CARLOS, D.; LOURENCO, E. V.; SORGI, C. A.; SILVA, E. V.; RAMOS, S. G.; UETA, M. T.; ARONOFF, D. M.; FACCIOLI, L. H. Counterregulation of Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. **Microbes Infect**, v. 11, p. 571-578, 2009.
- MARENGO, E. B.; COMMODARO, A. G.; PERON, J. P.; DE MORAES, L. V.; PORTARO, F. C.; BELFORT, R., JR.; RIZZO, L. V.; SANT'ANNA, O. A.

- Administration of Mycobacterium leprae rHsp65 aggravates experimental autoimmune uveitis in mice. **PLoS One**, v. 4, p. e7912, 2009.
- MCMANUS, D. P. Prospects for development of a transmission blocking vaccine against Schistosoma japonicum. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 297-308, 2005.
- MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, p. 225-242, 2008.
- MICHALUART, P.; ABDALLAH, K. A.; LIMA, F. D.; SMITH, R.; MOYSES, R. A.; COELHO, V.; VICTORA, G. D.; SOCORRO-SILVA, A.; VOLSI, E. C.; ZARATE-BLADES, C. R.; FERRAZ, A. R.; BARRETO, A. K.; CHAMMAS, M. C.; GOMES, R.; GEBRIM, E.; ARAKAWA-SUGUENO, L.; FERNANDES, K. P.; LOTUFO, P. A.; CARDOSO, M. R.; KALIL, J.; SILVA, C. L. Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Gene Ther**, v. 15, p. 676-684, 2008.
- MOSER, D.; TENDLER, M.; GRIFFITHS, G.; KLINKERT, M. Q. A 14-kDa Schistosoma mansoni polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. **J Biol Chem**, v. 266, p. 8447-8454, 1991.
- NASCIMENTO, E.; LEO, I. C.; PEREIRA, V. R.; GOMES, Y. M.; CHIKHLIKAR, P.; AUGUST, T.; MARQUES, E.; LUCENA-SILVA, N. Protective immunity of single and multi-antigen DNA vaccines against schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97 Suppl 1, p. 105-109, 2002.
- NEVES, D. (2000). Parasitologia Humana. São Paulo.
- OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; FARIAS, L. P.; LEITE, L. C. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop**, v. p. 2008.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, p. 499-511, 2002.
- PELLEGRINO, J.; FARIA, J. The Oogram Method for the Screening of Drugs in Schistosomiasis Mansoni. **Am J Trop Med Hyg**, v. 14, p. 363-369, 1965.
- PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. IV. Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 11, p. 215-221, 1969.
- RAMALHO-PINTO, F. J.; CARVALHO, E. M.; HORTA, M. F. Mechanisms of evasion of Schistosoma mansoni schistosomula to the lethal activity of complement. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 4, p. 111-116, 1992.
- RAMASWAMY, K.; HE, Y. X.; SALAFSKY, B. ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of Schistosoma mansoni. **Exp Parasitol**, v. 86, p. 118-132, 1997.

- RAMOS, C. R.; VILAR, M. M.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L.; THAUMATURGO, N.; EDELENYI, R.; ALMEIDA, M.; DIAS, W. O.; DIOGO, C. M.; TENDLER, M. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96 Suppl, p. 131-135, 2001.
- RAMSHAW, I. A.; FORDHAM, S. A.; BERNARD, C. C.; MAGUIRE, D.; COWDEN, W. B.; WILLENBORG, D. O. DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease. **Immunol Cell Biol**, v. 75, p. 409-413, 1997.
- REDE GENOMA DE MINAS GERAIS - Schistosoma mansoni transcriptome project. Disponível em <http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br/content/schistosoma-mansoni-transcriptome-project>. Acesso em 19/03/2011.
- REY, L. (2001). Parasitologia: parasitoses e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.. Rio de Janeiro.
- RIBEIRO, A. M.; BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; FACCIOLI, L. H.; GALETTI, F. C.; ZARATE-BLADES, C. R.; FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; FELIPE, M. S. DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against Paracoccidioides brasiliensis infection. **Vaccine**, v. 27, p. 606-613, 2009.
- ROMEIH, M. H.; HASSAN, H. M.; SHOUSHA, T. S.; SABER, M. A. Immunization against Egyptian Schistosoma mansoni infection by multivalent DNA vaccine. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 40, p. 327-338, 2008.
- SAIBIL, H. R. Chaperone machines in action. **Curr Opin Struct Biol**, v. 18, p. 35-42, 2008.
- SANTOS-JUNIOR, R. R.; SARTORI, A.; DE FRANCO, M.; FILHO, O. G.; COELHO-CASTELO, A. A.; BONATO, V. L.; CABRERA, W. H.; IBANEZ, O. M.; SILVA, C. L. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. **Hum Gene Ther**, v. 16, p. 1338-1345, 2005.
- SANTOS JUNIOR, R. R.; SARTORI, A.; BONATO, V. L.; COELHO CASTELO, A. A.; VILELLA, C. A.; ZOLLNER, R. L.; SILVA, C. L. Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. **Clin Exp Immunol**, v. 149, p. 570-578, 2007.
- SHALABY, K. A.; YIN, L.; THAKUR, A.; CHRISTEN, L.; NILES, E. G.; LOVERDE, P. T. Protection against Schistosoma mansoni utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. **Vaccine**, v. 22, p. 130-136, 2003.
- SILVA, C. L.; LOWRIE, D. B. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun.**, v. 68, p. 3269-3274., 2000.
- SILVA, C. L. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 429-435., 1999.

- SILVA, C. L.; BONATO, V. L.; LIMA, V. M.; FACCIOLI, L. H.; LEO, S. C. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. **Immunology**, v. 97, p. 573-581., 1999.
- SILVA, C. L.; SILVA, M. F.; PIETRO, R. C.; LOWRIE, D. B. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. **Infect Immun**, v. 64, p. 2400-2407, 1996.
- SILVA, C. L.; LOWRIE, D. B. A single mycobacterial protein (hsp 65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. **Immunology**, v. 82, p. 244-248, 1994.
- SILVA, C. L.; SILVA, M. F.; PIETRO, R. C.; LOWRIE, D. B. Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. **Immunology**, v. 83, p. 341-346, 1994.
- SILVA, C. L.; PALACIOS, A.; COLSTON, M. J.; LOWRIE, D. B. Mycobacterium leprae 65hsp antigen expressed from a retroviral vector in a macrophage cell line is presented to T cells in association with MHC class II in addition to MHC class I. **Microb Pathog**, v. 12, p. 27-38, 1992.
- SOUZA, P. R.; ZARATE-BLADES, C. R.; HORI, J. I.; RAMOS, S. G.; LIMA, D. S.; SCHNEIDER, T.; ROSADA, R. S.; TORRE, L. G.; SANTANA, M. H.; BRANDAO, I. T.; MASSON, A. P.; COELHO-CASTELO, A. A.; BONATO, V. L.; GALETTI, F. C.; GONCALVES, E. D.; BOTTE, D. A.; MACHADO, J. B.; SILVA, C. L. Protective efficacy of different strategies employing Mycobacterium leprae heat-shock protein 65 against tuberculosis. **Expert Opin Biol Ther**, v. 8, p. 1255-1264, 2008.
- STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, p. 411-425, 2006.
- STRUGNELL, R. A.; DREW, D.; MERDIECA, J.; DINATALE, S.; FIREZ, N.; DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; VADOLAS, J. DNA vaccines for bacterial infections. **Immunol Cell Biol**, v. 75, p. 364-369, 1997.
- TASCON, R. E.; COLSTON, M. J.; RAGNO, S.; STAVROPOULOS, E.; GREGORY, D.; LOWRIE, D. B. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. **Nat Med**, v. 2, p. 888-892., 1996.
- TENDLER, M.; BRITO, C. A.; VILAR, M. M.; SERRA-FREIRE, N.; DIOGO, C. M.; ALMEIDA, M. S.; DELBEM, A. C.; DA SILVA, J. F.; SAVINO, W.; GARRATT, R. C.; KATZ, N.; SIMPSON, A. S. A Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 269-273, 1996.

- VARALDO, P. B.; LEITE, L. C.; DIAS, W. O.; MIYAJI, E. N.; TORRES, F. I.; GEBARA, V. C.; ARMOA, G. R.; CAMPOS, A. S.; MATOS, D. C.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VILAR, M. M.; MCFADDEN, J.; ALMEIDA, M. S.; TENDLER, M.; MCINTOSH, D. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the Sm14 antigen of Schistosoma mansoni protects mice from cercarial challenge. **Infect Immun**, v. 72, p. 3336-3343, 2004.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A.; GUIMARAES, P. E.; OJOPI, E. P.; PAQUOLA, A. C.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y., JR.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P.; HO, P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C.; MARQUES, R. C.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A.; SA, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni. **Nat Genet**, v. 35, p. 148-157, 2003.
- VICTORA, G. D.; SOCORRO-SILVA, A.; VOLSI, E. C.; ABDALLAH, K.; LIMA, F. D.; SMITH, R. B.; MOYSES, R. A.; ZARATE-BLADES, C. R.; MICHALUART, P.; SILVA, C. L.; KALIL, J.; COELHO, V. Immune response to vaccination with DNA-Hsp65 in a phase I clinical trial with head and neck cancer patients. **Cancer Gene Ther**, v. 16, p. 598-608, 2009.
- WHO. (2004). "Schistosomiasis disease information." Retrieved 28/05, 2008, from <http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/diseaseinfo.htm>.
- WHO (2006). Neglected Tropical Diseases, Hidden successes, Emerging opportunities, Department of Control of Neglected Tropical Diseases. WHO: 52.
- WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosome vaccines: a critical appraisal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 13-20, 2006.
- WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, p. 1465-1468., 1990.
- ZACKIEWICZ, M.; BONACELLI, M. B.; SALLES-FILHO, S. Estudos prospectivos e a organização de sistemas de inovação no Brasil. **São Paulo em Perspectiva**, v. 19(1), p. 2005.
- ZERLOTINI, A.; HEIGES, M.; WANG, H.; MORAES, R. L.; DOMINITINI, A. J.; RUIZ, J. C.; KISSINGER, J. C.; OLIVEIRA, G. SchistoDB: a Schistosoma mansoni genome resource. **Nucleic Acids Res**, v. 37, p. D579-582, 2009.
- ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; FRANCA, T. G.; ISHIKAWA, L. L.; MARTINS, D. R.; SILVA, C. L.; SARTORI, A. Immunization with pVAXhsp65 decreases inflammation and modulates immune response in

experimental encephalomyelitis. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, p. 287-297, 2010.

ZOU, W. L.; YANG, Z.; ZANG, Y. J.; LI, D. J.; LIANG, Z. P.; SHEN, Z. Y. Inhibitory effects of prostaglandin E1 on activation of hepatic stellate cells in rabbits with schistosomiasis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 6, p. 176-181, 2007.