

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Bioquímica)

HENRIQUE ROMAN RAMOS

Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante.

São Paulo  
Data do Depósito na SPG:  
13/04/2009

HENRIQUE ROMAN RAMOS

**Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante.**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho*

São Paulo  
2009

Henrique Roman Ramos

Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante.

Tese apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ao meu avô (*in memoriam*).  
Um grande cientista.

Ao meu filho.  
A razão de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo Lee Ho, pela orientação, pela oportunidade de realizar este trabalho e, principalmente, pela paciência.

Ao meu pai pelo exemplo de caráter, pela presença constante nos momentos de maior dificuldade, por me mostrar o caminho da verdade e da dignidade de um homem, por ser o meu herói quando eu ainda era uma criança, pelos incentivos constantes, por me mostrar o melhor time de futebol do mundo! O Glorioso Tricolor do Morumbi! Mas, principalmente, por me ensinar a ser um grande pai!

À minha mãe, por todo amor, carinho e dedicação em todos os anos de minha vida. Pelas noites em claro quando estive doente. Pelos abraços que só uma mãe é capaz de dar.

Ao meu avô, Antonio Juan Roman Crespo. Por ser o maior cientista que eu já conheci. Por me fazer rir quando quis chorar. Por me dar o ombro sempre que precisei. Por me ensinar a levantar quando cair. Por ser um grande homem, o qual jamais serei capaz de esquecer! Por tudo... e mais um pouco.

À minha avó Camila, pelo amor incondicional e pelos churros com chocolate quente que trazem leveza a vida, calor nos dias de frio e ácidos graxos à barriga. Por ser uma avó maravilhosa!

Aos meus irmãos, Jacqueline, Simone e Frederico por todo amor e companheirismo.

À Marcela Sorelli Carneiro Ramos, por ter sido uma excelente esposa, ser uma excelente mãe e por me dar o maior presente que um homem pode querer.

Meu filho. Pedro, eu te amo! Desejo que nossa amizade e nosso elo se fortaleça e cresça a cada dia mais; como violetas na janela.

Aos meus tios e tias, Antônio, Esperanza, Camila, Meire, Francisco e Giuseppe. Por serem maravilhosos e por mostrar que uma família deve sempre permanecer unida!

Aos meus primos: Giuseppe, Diego e Ana Carolina. Por toda a amizade, carinho e amor.

A toda minha família. Obrigado por tudo!

Ao amigo Leonardo Paiva Farias, pela amizade, companheirismo, pelas ajudas em diversas ocasiões e pelas intervenções em todas as vezes em que procurei trafegar com meu carro pela contramão.

À Juliana Branco Novo, pelas conversas agradáveis sempre regadas com um bom café, mas principalmente pela amizade sincera e carinhosa que desenvolvemos ao redor de todos estes anos de convívio.

À Patrícia Aoki, pela participação fundamental no desenvolvimento deste projeto e, principalmente, pela amizade e conversas agradáveis que transformam até mesmo o momento da perfusão dos animais em um trabalho agradável.

Ao Celso Raúl Romero Ramos, pela amizade e pelo trabalho essencial com as formas mutantes de Sm14.

À Ana Paula de Mattos Arêas, pela amizade e pelo excelente trabalho na construção do gene sintético de CTB.

Aos grupos das Doutoradas Luciana Leite, Elizabeth Martins e Ana Lucia Nascimento, pelos anos de convívio e pelo acesso às dependências de seus laboratórios

Aos funcionários do Instituto Butantan, principalmente ao pessoal do Infectório Central, pela ajuda na manutenção dos animais.

Ao Núcleo Espírita Dr. João de Deus e todos os seus integrantes (antigos, novos e que ainda estão por vir), pedra fundamental para o meu desenvolvimento.

À Karina Aires pela orientação valiosa no início, pelo exemplo de dedicação e disciplina e claro, pela amizade carinhosa.

À Vanessa Cristina Rescia, por todo carinho e amizade dispensados em todos estes anos de convívio.

À Luciana Iwanaga Leão, pelo carinho, pela amizade sincera e por me mostrar que é possível fritar sorvete sem derretê-lo.

À Patt, Erika e Roberta, por todas as vezes em que demos risadas juntos, pela amizade sincera nos momentos em que mais precisei e por serem as melhores amigas que alguém pode querer.

À Vivian “Toroço” por ser exatamente esta pessoa que ela é. Adooooooooo.

À Ana Tung, pela amizade e por me ensinar a alertar os chineses no caso de um cavalo resolver adentrar as dependências de uma padaria.

Ao Enéas de Carvalho, por me ensinar a aumentar o *fitness*.

À Aline, Débora, Felipe, Ingrid e Érika Regazolli pela amizade e auxílio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

À Agatóvisk! Mais conhecida como Ágtha (sic). Por nos ensinar a termos paciência com seu jeito EMO de ser.

Ao Inácio de Loiola Meir... (bem, é comprido mesmo e não quero que pensem, depois, que estou querendo aumentar o número total de páginas de

minha tese apenas por que aproveitei o seu nome extenso e praticamente infinito, até mesmo porque, por mais que eu o escreva aqui, o máximo que posso conseguir são algumas linhas a mais). Então, por tudo isso e mais um pouco, o que quero dizer aqui, neste momento é apenas obrigado e valeu por tudo! Saudações tricolores.

Ao Henrique K. Rofatto, à Cibele Tararam e ao Boguitar pela amizade e discussões sobre esquistossomose, futebol e rock n' roll.

A todos os colegas do Instituto Butantan e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

A todos aqueles colegas, cujos nomes não estão aqui. Acreditem, esqueci mesmo! Milhares de desculpas! Vocês sabem que estarão sempre em meu coração!

Aos espíritos.

Ao CNPq, à Fundação Butantan e à FAPESP (processo 03/06011-2), pelo auxílio financeiro.



*“... Στο τέλος πήγα στους χειροτέχνες. Γιατί ήξερα ότι εγώ δεν γνωρίζω τίποτα, ήξερα όμως ότι αυτούς θα τους έβρισκα να γνωρίζουν πολλά και καλά. Και σ' αυτό δεν διαψεύστηκα, γιατί γνώριζαν αυτά που εγώ δεν γνώριζα και ως προς αυτά ήταν σοφότεροι από μένα. Αλλά, άνδρες Αθηναίοι, μου φάνηκαν να έχουν το ίδιο ελάττωμα με τους ποιητές και οι καλοί καλλιτέχνες. Επειδή ασκούσε καλά την τέχνη του, ο καθένας απ' αυτούς νόμιζε ότι και στα άλλα είναι πάρα πολύ σοφός, και αυτό το σφάλμα τους σκίαζε κι εκείνη τη σοφία τους. Έτσι λοιπόν κατέληξα να αναρωτιέμαι — για να δικαιώσω τον χρησμό — τι θα προτιμούσα, να είμαι όπως είμαι, δηλαδή να μην είμαι ούτε σοφός με τη δικιά τους σοφία αλλά ούτε και αμαθής με τη δικιά τους αμάθεια, ή να είμαι και σοφός και αμαθής όπως εκείνοι. Απαντούσα λοιπόν και στον εαυτό μου και στον χρησμό ότι είναι καλύτερα να είμαι όπως είμαι. ...”*

#### Πλάτων - Απολογία Σωκράτους (Η Δίκη Του Σωκράτη)

*“... Por fim, também fui aos artífices, porque estava persuadido de que por assim dizer nada sabiam e, ao contrário, tenho que dizer que os achei instruídos em muitas e belas coisas. Em verdade, nisso me enganei: eles, de fato sabiam aquilo que eu não sabia e eram muito mais sábios do que eu. Mas, cidadãos atenienses, parece-me que também os artífices tinham o mesmo defeito dos poetas: pelo fato de exercitar bem a própria arte, cada um pretendia ser sapientíssimo também nas outras coisas de maior importância, e esse erro obscurecia o seu saber. Assim, eu ia interrogando a mim mesmo, a respeito do que disse o oráculo, se devia mesmo permanecer como sou, nem sábio da sua sabedoria, nem ignorante da sua ignorância, ou ter ambas as coisas, como eles o tem. Em verdade, respondo a mim e ao oráculo que me convém ficar como sou. ...”*

#### Platão – Apologia e defesa de Sócrates

## RESUMO

Roman-Ramos, H. **Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante.** 2008. 106 p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

**Introdução:** o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose será um importante avanço no controle desta doença crônica e muitas vezes debilitante, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Neste trabalho, descrevemos o uso da subunidade B da toxina colérica (CTB) geneticamente fusionada com Sm14 – uma proteína ligadora de ácidos graxos de *Schistosoma mansoni* – como uma tentativa de desenvolver uma vacina antiesquistossomose. **Métodos:** proteínas recombinantes foram expressas em um sistema procariótico, purificadas por diferentes métodos cromatográficos e caracterizadas tanto por métodos imunológicos como por métodos espectroscópicos. Experimentos de imunização foram realizados em camundongos fêmeas, da linhagem BALB/c e a eficácia da vacina determinada através da análise da carga parasitária após o desafio com cercárias de *S. mansoni* e através da análise histopatológica das reações granulomatosas ao redor dos ovos aprisionados no tecido hepático dos camundongos. **Resultados:** a administração subcutânea de Sm14 reduziu em 27% a carga parasitária nos animais vacinados. Por outro lado, a vacinação intranasal apenas demonstrou uma redução estatisticamente significativa quando CTB esteve presente na formulação. Além disso, a co-administração de CTB e Sm14 reduziu em média 30% a área das lesões granulomatosas hepáticas. **Conclusão:** o uso de CTB demonstrou ser um importante adjuvante de mucosas; contudo, quando utilizada juntamente com a proteína Sm14, esta molécula não resultou em níveis satisfatórios de redução parasitária em um modelo murino para infecção esquistossomótica.

**Palavras-chave:** Esquistossomose. Vacina. Sm14. CTB. Biotecnologia. Cromatografia.

## ABSTRACT

Roman-Ramos, H. **Development and characterization of an anti-schistosomiasis vaccine composed by the Sm14 protein, from *Schistosoma mansoni*, using the B subunit of cholera toxin (CTB) as adjuvant.** 2008. 106p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

**Introduction:** developing a vaccine against schistosomiasis would be an important advance on the control of this chronic and debilitating disease which afflicts millions of people worldwide. Herein we describe the use of the non-toxic B subunit of cholera toxin (CTB) genetically fused to Sm14 – a fatty-acid binding protein from *Schistosoma mansoni* - as an attempt to the development of an anti-schistosomiasis vaccine. **Methods:** recombinant proteins were expressed on a prokaryotic system, purified by different chromatographic methods and both immunochemically and spectroscopically characterized. Immunization experiments were made on females BALB/c mice and vaccine's efficacy was assessed by analyzing the worm-burden after challenge infection with *S. mansoni* cercariae and by analyzing its effect on the hepatic granulomatous reactions around trapped eggs. **Results:** subcutaneous administration of Sm14 reduced in 27% the worm burden on animals. On the other hand, intranasally vaccination only displayed a statistically significant reduction when CTB was added to the formulation. Furthermore, coadministrating CTB and Sm14 reduces in 30% the area of hepatic granulomas. **Conclusion:** the use of CTB may be an important tool for mucosal adjuvanticity; however it did not provide, together with Sm14, satisfactory levels of protection on a murine model for Schistosomiasis infection.

**Keywords:** Schistosomiasis. Vaccine. Sm14. CTB. Biotechnology. Chromatography.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos;
- AOX – Acil-COA Oxidase;
- APS – Persulfato de Amônio;
- BCG – Calmette-Guérin;
- BSA – Albumina Sérica Bovina;
- cDNA – DNA complementar;
- CT – Toxina Colérica;
- CTB – Subunidade B da Toxina Colérica;
- dATP – Desoxiadenosina Trifosfato;
- DAUDA – Ácido 11-(dansilamino)undecanóico;
- dCTP – Desoxicitosina Trifosfato;
- dGTP – Desoxiguanosina Trifosfato;
- DNA – Ácido Desoxiribonucléico;
- dTTP - Desoxitimidina-Trifosfato;
- EDTA – Ácido Etilaminotetracético;
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay);
- FABP – Proteína Ligadora de Ácidos-Graxos;
- GST – Glutathione-S-Transferase;
- HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B;
- HBV – Vírus da Hepatite B;
- IFN- $\gamma$  – Interferon Gamma;
- IgA – Imunoglobulina A;
- IgE – Imunoglobulina E;

IgG – Imunoglobulina G;

IL-4 – Interleucina 4;

IL-5 – Interleucina 5;

IL-10 – Interleucina 10;

IL-13 – Interleucina 13;

IMAC – Cromatografia de Afinidade à Íon Metálico;

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo;

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade;

MOPS – Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico;

OPD - o-fenilenodiamino;

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida;

pb – Pares de bases;

PBS – Tampão Fosfato Salino;

PBS-T – Tampão Fosfato Borato 0,05% (V/V) Tween-20;

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

rCTB – CTB recombinante;

rCTB-Sm14 – CTB-Sm14 recombinante;

RNA – Ácido Ribonucléico;

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*;

rSm14 – Sm14 recombinante;

SDS – Dodecilsulfato de Sódio;

Sm14s – Sm14 sintético;

SOC – Meio de Cultura Super Ótimo com Repressor Catabólico;

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA;

TEMED – Tetrametiletilenodiamino;

Th0 – Linhagem de linfócitos auxiliares *T helper 0*;

Th1 – Linhagem de linfócitos auxiliares *T helper 1*;

Th2 – Linhagem de linfócitos auxiliares *T helper 2*;

TPI – Triose fosfato Isomerase;

TSP-1 – Tetraspanina – 1;

TSP-2 – Tetraspanina – 2;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 .....	24
Figura 2 .....	25
Figura 3 .....	26
Figura 4 .....	27
Figura 5 .....	30
Figura 6 .....	39
Figura 7 .....	42
Figura 8 .....	49
Figura 9 .....	50
Figura 10 .....	51
Figura 11 .....	58
Figura 12 .....	62
Figura 13 .....	69
Figura 14 .....	72
Figura 15 .....	73
Figura 16 .....	74
Figura 17 .....	75
Figura 18 .....	75
Figura 19 .....	76
Figura 20 .....	77
Figura 21 .....	78
Figura 22 .....	79
Figura 23 .....	80

Figura 24.....	80
Figura 25.....	82
Figura 26.....	82
Figura 27.....	83
Figura 28.....	84
Figura 29.....	85
Figura 30.....	86
Figura 31.....	87
Figura 32.....	88
Figura 33.....	90
Figura 34.....	91
Figura 35.....	105
Figura 36.....	106
Figura 37.....	106
Figura 38.....	107
Figura 39.....	107
Figura 40.....	108
Figura 41.....	109
Figura 42.....	110
Figura 43.....	111



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 .....	51
Tabela 2 .....	52
Tabela 3 .....	60
Tabela 4 .....	60
Tabela 5 .....	60
Tabela 6 .....	67
Tabela 7 .....	68
Tabela 8 .....	86
Tabela 9 .....	87
Tabela 10 .....	89
Tabela 11 .....	89
Tabela 12 .....	90
Tabela 13 .....	105

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	24
1.1. <i>Esquistossomoses</i>	24
1.2. <i>O ciclo do Schistosoma mansoni</i>	25
1.3. <i>Patologia da esquistossomose</i>	31
1.3.1. <i>Patologia aguda</i>	31
1.3.2. <i>Patologia crônica</i>	31
1.4. <i>Respostas do sistema imunológico à infecção por Schistosoma mansoni</i>	32
1.5. <i>Por quê desenvolver uma vacina contra Schistosoma mansoni</i>	33
1.6. <i>Bases para a produção de uma vacina antiesquistossomose</i>	34
1.7. <i>Lipídeos em Schistosoma mansoni</i>	37
1.8. <i>Sm14: uma proteína ligadora de ácidos graxos como antígeno vacinal</i>	39
1.9. <i>A toxina colérica</i>	42
1.9.1. <i>A utilização da subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante</i>	43
<b>2. OBJETIVOS</b>	46
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	47
3.1. <i>Soluções</i>	47
3.1.1. <i>Solução tampão TAE</i>	47
3.1.2. <i>Solução tampão de amostra para eletroforese de DNA (10X concentrada)</i>	47
3.1.3. <i>Solução tampão de amostra para SDS-PAGE (5X concentrada)</i>	47
3.1.4. <i>Tampão tris-glicina</i>	47
3.1.5. <i>Solução de Azul de Coomassie</i>	47
3.1.6. <i>Solução descorante</i>	47

<i>3.1.7. Tampão Fosfato Salino</i> .....	47
<i>3.1.8. Solução tampão carbonato-bicarbonato</i> .....	47
<i>3.1.9. Solução PBS-T</i> .....	48
<i>3.1.10. Solução tampão citrato-fosfato</i> .....	48
<i>3.1.11. Solução tampão de transferência (5X concentrada)</i> .....	48
<i>3.1.12. Solução RFI</i> .....	48
<i>3.1.13. Solução RF II</i> .....	48
<i>3.1.14. Solução de acrilamida/bisacrilamida 30%</i> .....	48
<i>3.2. Meios de cultura</i> .....	48
<i>3.2.1. Meio 2YT líquido</i> .....	48
<i>3.2.2. Meio 2YT sólido</i> .....	49
<i>3.2.3. Meio SOB líquido</i> .....	49
<i>3.3. Vetores</i> .....	49
<i>3.3.1. pAE</i> .....	49
<i>3.3.2. pGEM-T easy</i> .....	50
<i>3.4. Linhagens de Escherichia coli utilizadas</i> .....	51
<i>3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i> .....	51
<i>3.5.1. PCR de colônia</i> .....	52
<i>3.6. Clivagem de DNA com endonucleases</i> .....	52
<i>3.7. Ligação de extremidades coesivas de DNA utilizando enzima T4 DNA Ligase</i> .....	52
<i>3.8. Sequenciamento automático de DNA</i> .....	53
<i>3.9. Preparo de bactérias quimicamente competentes</i> .....	53
<i>3.10. Transformação química de bactérias competentes</i> .....	54

3.11. Eletroforese em gel de agarose.....	54
3.12. Purificação de DNA a partir de gel de agarose.....	55
3.13. Minipreparação de DNA plasmidial.....	55
3.14. Extração de DNA através de uma solução 1:1 fenol-clorofórmio.....	56
3.15. Construção de um sistema de expressão contendo as sequências dos genes <i>ctb</i> e <i>sm14</i> em fusão.....	56
3.16. Expressão heteróloga das proteína recombinantes.....	59
3.17. Reestruturação da proteínas recombinantes.....	60
3.18. SDS-PAGE.....	60
3.19. Transferência de proteínas a partir de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose.....	61
3.20. Cromatografia por afinidade a íon metálico.....	62
3.21. Cromatografia por permeação em gel.....	62
3.22. Cromatografia por afinidade a galactose.....	63
3.23. Diálise.....	63
3.24. Ultra filtração.....	63
3.25. Dicroísmo circular.....	64
3.26. Fluorescência intrínseca do triptofano.....	64
3.27. GM1-ELISA.....	64
3.28. Ensaio de ligação a ácidos graxos.....	65
3.29. Western-blot.....	66
3.30. Aumento da estabilidade de <i>rCTB-Sm14</i> utilizando galactose.....	66
3.31. Ensaio de imunização subcutânea.....	67
3.32. Ensaio de imunização nasal.....	67

3.33. Sangrias.....	68
3.34. Lavado vaginal.....	68
3.35. Desafio e perfusão.....	68
3.36. Avaliação da atividade protetora da vacina.....	69
3.37. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	69
3.38. Dosagem de citocinas por ELISPOT.....	70
3.39. Análise estatística dos resultados.....	71
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
4.1. A Sm14 mutante Cys62Val é mais estável em comparação com a proteína selvagem e/ou a mutante Sm14 Cys62Ser.....	72
4.2. Construção de um sistema de expressão contendo as sequências nucleotídicas de <i>ctb</i> e <i>sm14</i> em fusão.....	74
4.3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	75
4.3.1. rCTB.....	75
4.3.2. rSm14.....	76
4.3.3. rCTB-Sm14.....	77
4.4. A proteína rCTB-Sm14 apresenta maior estabilidade na presença de galactose.....	81
4.5. A proteína rCTB-Sm14 é reconhecida tanto por anticorpos anti-Sm14 como por anticorpos anti-CTB.....	82
4.6. Dicroísmo circular.....	83
4.7. Tanto rCTB como rCTB-Sm14 são capazes de ligar-se ao receptor gangliosídeo GM1.....	83

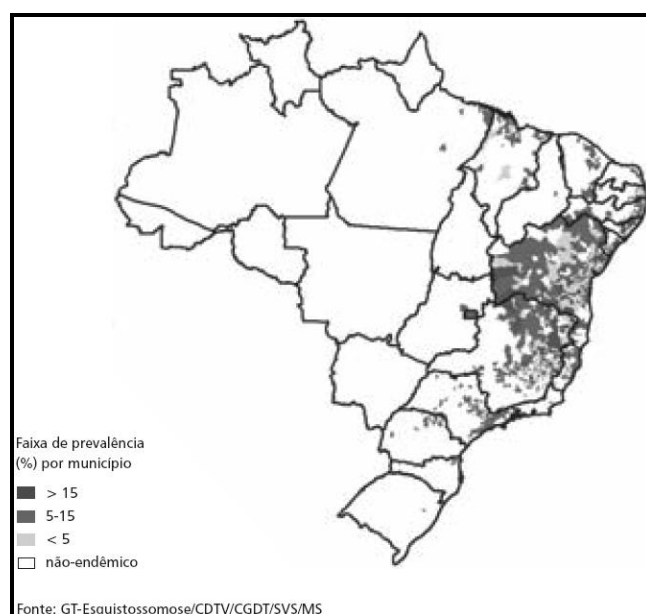
<i>4.8. Tanto rSm14 como rCTB-Sm14 possuem habilidade de ligação a ácidos graxos</i> .....	84
<i>4.9. Ensaios de imunização e desafio</i> .....	85
<i>4.9.1. Via subcutânea</i> .....	85
<i>4.9.1.1. Títulos de anticorpos</i> .....	85
<i>4.9.1.2. Atividade protetora da vacina</i> .....	86
<i>4.9.1.3. Análise histológica dos tecidos hepáticos</i> .....	87
<i>4.9.1.4. Citocinas secretadas por esplenócitos dos animais vacinados</i> .....	88
<i>4.9.2. Via nasal</i> .....	88
<i>4.9.2.1. Títulos de anticorpos</i> .....	88
<i>4.9.2.2. Atividade protetora da vacina</i> .....	89
<i>4.9.2.3. Análise histológica dos tecidos hepáticos</i> .....	90
<i>4.9.2.4. Citocinas secretadas por esplenócitos dos animais vacinados</i> .....	91
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	92
<i>5.1. Imunização subcutânea</i> .....	92
<i>5.2. Imunização nasal</i> .....	94
<i>5.3. Algumas considerações</i> .....	96
<i>5.3.1. Th1, Th2 ou Th0?</i> .....	96
<i>5.3.2. Genoma, transcriptoma e proteoma</i> .....	97
<i>5.3.3. Qual o modelo a ser seguido?</i> .....	99
<i>5.3.4. Considerações finais</i> .....	100
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	103
<b>7. ATIVIDADES EXTRAS</b> .....	104

<i>7.1. Síntese de um gene codante para a proteína Sm14 com códons otimizados para expressão em leveduras</i> .....	104
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	112
<b>9. CURRICULUM VITAE</b> .....	137

### 1.1. Esquistossomoses

As esquistossomoses, conhecidas popularmente por barriga-d'água, devido à hepatoesplenomegalia característica nos casos mais graves, são doenças causadas por helmintos do gênero *Schistosoma*. Tem como principais agentes etiológicos as espécies *S. haematobium*, presente predominantemente em regiões africanas, *S. japonicum*, localizada na Indonésia, China e Filipinas e *S. mansoni*, presente na África, na América do Sul e nas Antilhas (Rey, 1992).

Estima-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam contaminadas com a doença e outras 600 milhões de pessoas com risco de serem infectadas (Chitsulo, Engels *et al.*, 2000). A gravidade que a doença assume muitas vezes acaba por tornar as esquistossomoses em um sério problema de saúde pública em países tropicais. No Brasil, especula-se que mais de seis milhões de pessoas possam estar contaminadas com o *Schistosoma mansoni* (Figura 1).



**Figura 1.** Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica. Brasil, 2004.



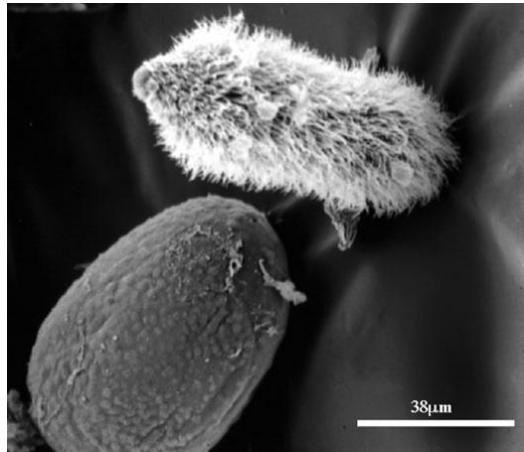
### 1.2. O ciclo do *Schistosoma mansoni*.

O ciclo do parasita inicia-se com a eliminação, pelas fezes do hospedeiro vertebrado, dos ovos do parasita, sendo que a ao atingirem uma coleção de água doce, devido à hipotonicidade do meio, a qual promove a passagem de água para o interior da casca protéica, à temperatura (ótima, em torno dos 28°C), à luminosidade e à própria movimentação do embrião (é possível observar, nos ovos prestes a eclodir, o miracídio com movimentos de extensão e retração, batimento dos cílios e atividade dos solenócitos), há a eclosão dos ovos liberando os miracídios, forma larval infectante, de vida livre, que penetra no tecido de um molusco do gênero *Biomphalaria* (Silva, Neves et al., 2008).



**Figura 2.** Ovo maduro de *Schistosoma mansoni*.

Os miracídios apresentam forma cilíndrico-cônica e medem entre 160-180  $\mu\text{m}$  de comprimento por 60  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 3) e, diferente de outros trematódeos, não apresentam glândulas cefálicas. No entanto, parálogos de rodopsina e rodopsina quinase foram identificados através de análise transcriptômica (Verjovski-Almeida, Demarco *et al.*, 2003) indicando a presença de um componente de detecção de luz consistente com o fototropismo positivo.



**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura de um miracídio de *Schistosoma mansoni* recém saído de um ovo.

Não há evidências de que o miracídio se alimente no ambiente aquático, com sua longevidade estando relacionada com a exaustão de suas reservas de glicogênio. Quanto maior a sua atividade sem encontrar o caramujo menor será a sua capacidade infectante.

Outra característica da interação de *Schistosoma mansoni* com o molusco é o seu grau de especificidade, que se manifesta a partir da atração do molusco pelo miracídio e continua durante as fases de reprodução intramolusco. O encontro com o hospedeiro intermediário está ligado a quimiorreceptores localizados nas fibras conectadas às células nervosas. Esses quimiorreceptores são capazes de perceber substâncias existentes no muco produzido pelo molusco, atraindo ou repelindo (Silva, Neves *et al.*, 2008). A presença de glicoconjugados da camada superficial do muco do caramujo é o fator desencadeador para sua localização pelo miracídio (Haas, Korner *et al.*, 1995). Os movimentos destas larvas aumentam quando elas são colocadas em água previamente condicionada pela presença de *Biomphalaria glabrata* (Hassan, Haberl *et al.*, 2003).

Os miracídios, quando entram em contato direto com o molusco, aderem-se e penetram neles através das secreções glandulares e movimentos rotatórios. A

invasão dura de três a quinze minutos e pode ser feita em qualquer parte mole do tegumento (Silva, Neves *et al.*, 2008). Em seguida, devido às diferentes condições inerentes de uma vida no interior do hospedeiro, (osmolaridade, temperatura, pH, entre outros), os miracídios sofrem rápidas alterações estruturais já no seu ponto de penetração, onde permanecem neste local (pé, manto etc.) e crescem. Após duas horas da penetração, o revestimento epitelial ciliado e demais estruturas de penetração são gradualmente substituídas até que, no segundo dia, uma nova camada superficial contínua aparece, formando então o esporocisto primário.

O fato do esporocisto primário não possuir boca, nem tampouco um sistema digestivo, juntamente com as observações de que o novo tegumento sincicial contém mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, glicogênio, lipídio e permanecem conectados com os corpos celulares nucleados situados mais a superfície, é um indício de que os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento são absorvidos através do seu tegumento. Além de ser no tegumento o local onde são lançados os produtos de excreção/secreção e onde as moléculas do hospedeiro e o plasma interagem com o parasita, desencadeando as respostas imunopatológicas do hospedeiro (Yoshino, Boyle *et al.*, 2001).

Durante o desenvolvimento posterior, as camadas musculares e as células parenquimatosas degeneram, as células germinativas difusas se tornam mais proeminentes e a porção central do esporocisto se diferencia em uma câmara de maturação, onde as células propagatórias ou germinativas se reproduzem assexuadamente. Em menos de uma semana, o embrião do esporocisto começa a se formar por subdivisões e diferenciações das células germinativas que brotaram da parede interna do esporocisto primário. Após cinco ou seis dias, o esporocisto secundário abandona o esporocisto primário e se desloca para o hepatopâncreas e

o ovotéstis do molusco. Nesta etapa os esporocistos medem cerca de 250µm de comprimento, contêm fibras musculares, sistema nervoso e protonefrídeos. O tegumento assemelha-se à fase anterior pelo seu aspecto sincicial, anucleado, sob uma membrana basal com conexões com os corpos celulares nucleados abaixo das fibras musculares (Brusca e Brusca, 1990; Silva, Neves *et al.*, 2008).

Em torno de três a quatro semanas de desenvolvimento, as cercárias (larvas infectantes para hospedeiro vertebrado) (Figura 4) já se encontram maduras e são liberadas do esporocisto pelo poro de nascimento. (Silva, Neves *et al.*, 2008). Um molusco infectado por um único miracídio pode liberar milhares de cercárias por dia durante meses. Este mecanismo pode ser explicado pela ocorrência de esporocistos replicadores, capazes de produzir novas gerações de esporocistos produtores de cercárias. Estes recebem a denominação de esporocistos terciários, quaternários etc (Bayne e Greveling, 2003; Silva, Neves *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Cercária de *Schistosoma mansoni*.

Ao encontrar um hospedeiro definitivo, a cercária precisa se fixar, invadir e migrar para a pele do hospedeiro, em uma série de eventos que envolvem a resposta a sinais químicos do hospedeiro e alterações morfológicas da larva. Estabelecido o contato, a cercária se contrai e se fixa à pele pelas ventosas,

adotando uma posição paralela à superfície cutânea. A invasão da pele do mamífero é decorrente de intensa ação vibratória da cauda e secreções das glândulas pré e pós-acetabulares, após estímulo por ácidos graxos como o linoléico (Silva, Neves *et al.*, 2008).

A transformação de cercárias para esquistossômulos é caracterizada por respiração anaeróbica, perda da cauda, eliminação progressiva do glicocálix, esvaziamento das glândulas secretoras e reorganização do tegumento, com acúmulo de uma proteína transportadora de glicose (SGTP) nos cítons (corpos membranosos) subtegumentares (Skelly e Shoemaker, 2000).

A análise histológica de secções seriadas de pele humana exposta a 150 cercárias de *S. mansoni* mostrou parasitas em várias camadas da pele em diferentes intervalos após a infecção. Durante as quatro horas iniciais, esquistossômulos foram encontrados na cutícula e nas camadas externas da epiderme. Oito horas após a exposição, 94% dos esquistossômulos estavam presentes na epiderme. Secções da pele analisadas após 12 e 16 horas demonstraram parasitas em processo de penetração da derme. Após 24 horas, apenas 11% dos parasitas atingiram a derme, ao passo que 89% estavam na epiderme. No entanto, uma vez atingida a derme, os esquistossômulos aparentam mover-se rapidamente até atingirem um vaso sanguíneo. A maioria dos parasitas observados 72 horas após infecção estava tanto no interior ou próximos de vasos sanguíneos (He, Chen *et al.*, 2002). Como consenso, admite-se que a penetração do parasita na epiderme envolva a degradação de moléculas de adesão extracelular, como as proteínas da família caderina (Curwen e Wilson, 2003).

Após atingirem a corrente sanguínea, os esquistossômulos migram para o pulmão, onde sofrem um processo de maturação e em seguida dirigem-se ao

sistema porta-hepático, atingindo a fase adulta. Os vermes adultos então juntam-se em casais e migram para as veias mesentéricas inferiores.

Após o acasalamento as fêmeas sofrem diferenciação celular com produção de células vitelínicas maduras, aumento da taxa de captação de tirosina, timidina e aumento do acúmulo de cálcio (Erasmus, 1973). O acasalamento é fundamental para a manutenção da maturidade sexual das fêmeas, incluindo-se a produção de ovos (Silva, Neves *et al.*, 2008). As fêmeas produzem milhares de ovos por dia, os quais secretam enzimas proteolíticas que ajudam os ovos a migrarem até a luz intestinal a fim de serem eliminados nas fezes e fechando o ciclo (Figura 5).

Alguns ovos, porém, podem ser depositados no interior dos vasos pré-sinusóides do fígado, promovendo um grande estímulo imunológico em resposta às suas grandes quantidades e antigenicidade, provocando uma resposta granulomatosa de hipersensibilidade tardia, cuja intensidade está relacionada com a morbidade da doença (Sadler, Rutitzky *et al.*, 2003).

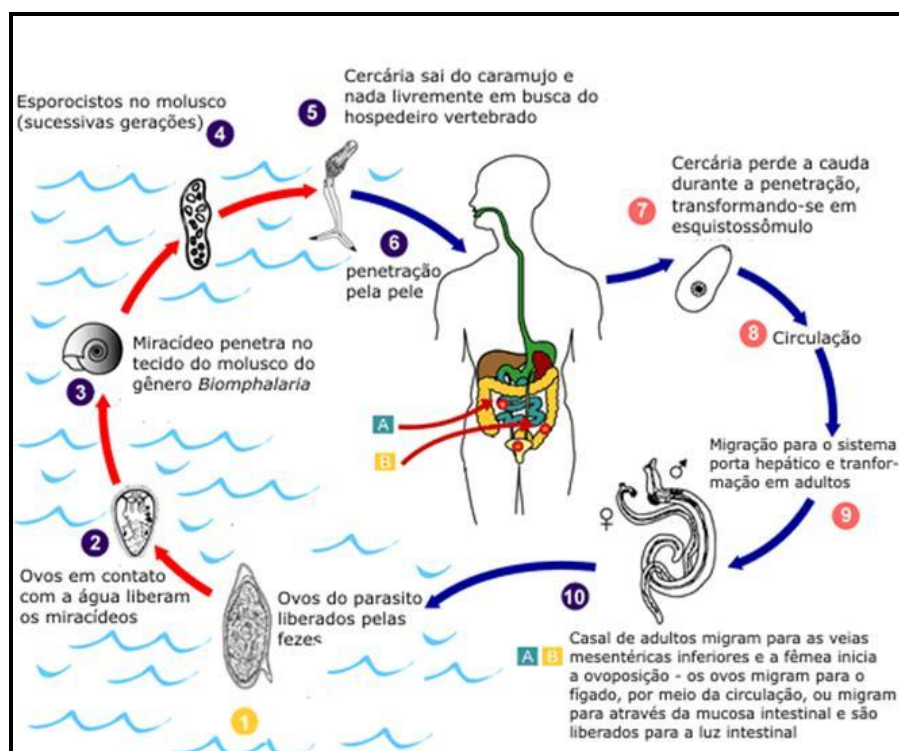


Figura 5. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

### 1.3. Patologia da esquistossomose.

#### 1.3.1. Patologia aguda.

A penetração percutânea das cercárias pode provocar urticária, as quais podem persistir por dias, especialmente após infecções primárias em turistas ou imigrantes para regiões endêmicas (Bottieau, Clerinx *et al.*, 2006). A forma aguda da doença, também chamada de febre de Katayama, trata-se de uma reação de hipersensibilidade sistêmica, a qual ocorre após algumas semanas ou até mesmo meses após o primeiro contato (Lambertucci, 1993; Rocha, Pedroso *et al.*, 1995; Rocha, Rocha *et al.*, 1995; Bottieau, Clerinx *et al.*, 2006). Os principais sintomas ocorrem de forma abrupta dentre os quais destacam-se febre, fadiga, tosse seca, mialgia, sensação de mal-estar e eosinofilia. Fortes dores abdominais e diarreia podem ocorrer em decorrência da migração e estabelecimento dos vermes adultos nas veias do plexo mesentérico e deposição dos ovos nas fezes.

Por outro lado, os sintomas agudos decorrentes de infecção por *Schistosoma mansoni* são raramente observados em pacientes provenientes de regiões endêmicas. Além disso, crianças nascidas de mães infectadas também raramente respondem com os sintomas agudos clássicos da doença, possivelmente por um processo de sensibilização *in utero* (King, Malhotra *et al.*, 1998).

#### 1.3.2. Patologia crônica.

A forma crônica da doença pode ser dividida em uma forma leve e uma forma grave. A forma crônica habitual ou leve é a forma em que se encontram a maioria dos infectados residentes em regiões endêmicas. São assintomáticas ou, no máximo, com sintomas vagos, geralmente discretos e inespecíficos. No entanto, a forma grave da esquistossomose é caracterizada morfológicamente por uma

fibrose hepática periportal acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas da veia porta intra-hepática (Andrade, 2008).

As principais lesões decorrentes de uma infecção crônica são decorrentes da presença de ovos aprisionados nos tecidos hepáticos durante a ovoposição. As enzimas proteolíticas secretadas por estes ovos provocam reações inflamatórias ricas em eosinófilos, as quais são progressivamente substituídas por fibrose e perda da função hepática (Cheever, Hoffmann *et al.*, 2000).

#### *1.4. Respostas do sistema imunológico à infecção por Schistosoma mansoni.*

A principal característica desta patologia é atribuída ao desenvolvimento de reações granulomatosas dependentes de células T CD4<sup>+</sup> ao redor de ovos aprisionados em tecidos do hospedeiro, principalmente o fígado e intestinos. Estas células estão divididas em dois grupos principais (Th1 e Th2) dependendo do tipo de citocinas que secretam e funções que exercem. Uma resposta imune a qual induz o recrutamento de células Th1 induz uma imunidade mediada por células, ao passo que uma resposta Th2, induz uma imunidade humoral.

Apesar de o *Schistosoma mansoni* apresentar diferentes mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, seja pela secreção de moléculas antiinflamatórias (Ramaswamy, Kumar *et al.*, 2000), seja pela adesão de antígenos do próprio hospedeiro à sua superfície (Loukas, Jones *et al.*, 2001), o hospedeiro acaba por desenvolver uma reação inflamatória em resposta aos antígenos do parasita. Contudo, o desenvolvimento de uma resposta celular dependente de linfócitos T CD4 parece não prejudicar o parasita. Pelo contrário, parece ser necessário para o desenvolvimento do mesmo (Davies, Grogan *et al.*, 2001).



Outro ponto importante a ser destacado é a capacidade do verme modular o sistema imunológico humano. Na fase aguda da doença, há a presença de uma resposta inflamatória predominantemente Th1, com secreção de IFN- $\gamma$ . À medida que a doença vai avançando, o parasita realiza um processo de imunomodulação no hospedeiro e o perfil de citocinas secretadas passa a ser predominantemente Th2, neste caso, principalmente de IL-5. (Pearce, Caspar *et al.*, 1991). Esta mudança Th1 para Th2 aparenta ser essencial para a sobrevivência do parasita, uma vez que na ausência desta imunomodulação o hospedeiro inicia uma resposta inflamatória exacerbada e muitas vezes letal (Macdonald, Patton *et al.*, 2002).

Desta forma, torna-se de vital importância ter em mente que “*os esquistossomas não são estúpidos, eles tiveram dezenas de milhares de anos para desenvolverem mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro definitivo*” (Wilson e Coulson, 2006) e saber quais são todos esses mecanismos está entre os principais desafios a serem solucionados na busca por uma vacina eficaz.

### *1.5. Por quê desenvolver uma vacina contra Schistosoma mansoni?*

Mesmo após duas décadas de intensa quimioterapia com a utilização de drogas eficientes e seguras como o praziquantel, o índice de pessoas infectadas pelo *Schistosoma mansoni* em todo mundo continua ao redor de 200 milhões de pessoas.

A utilização de medicamentos quimioterápicos não impede a possibilidade de reinfecções em regiões endêmicas, havendo a necessidade de tratamentos

repetitivos. Além disso, o praziquantel não age sobre esquistossômulos, desta forma o tratamento de pessoas recém infectadas torna-se inviável.

Outros fatores importantes que devem ser levados em consideração são os recentes relatos de casos de resistência ao praziquantel (Liang, Coles *et al.*, 2001; Doenhoff, Kusel *et al.*, 2002) e a possibilidade de proliferação da doença em áreas até então não afetadas, como por exemplo através da construção de uma represa sobre o rio Yangtzé no sul da China (Capron, Riveau *et al.*, 2002).

Desta forma, a utilização de uma vacina antiesquistossomose seria um método eficaz e de baixo custo para impedir o surgimento de linhagens resistentes às atuais medicações, diminuindo significativamente a possibilidade de reinfecção e proliferação da doença.

#### *1.6. Bases para a produção de uma vacina antiesquistossomose.*

Os esquistossomos são organismos não replicantes em seus hospedeiros e conseqüentemente, a aquisição de uma imunidade parcial, adquirida naturalmente ou induzida através de uma vacina, poderia reduzir consideravelmente a patologia da doença e sua taxa de transmissão em regiões endêmicas. Além disso, a aquisição de uma imunidade total seria improvável de se atingir, pois nenhum método experimental foi capaz, até o momento, de induzir 100% de proteção. Ao menos alguns parasitas atingiriam a fase adulta (Mcmanus, 1999). Vale lembrar que a patologia desta doença está intimamente relacionada com a quantidade de ovos que é depositada pelo parasita nos tecidos do hospedeiro e uma vacina poderia surtir seus efeitos diminuindo tanto a entrada e o desenvolvimento dos vermes como também diminuindo a produção de ovos (Bergquist, 1998).

Espera-se que uma vacina contra esquistossomose possa causar uma resposta dependente de células T CD4<sup>+</sup> por parte do sistema imunológico do hospedeiro. No entanto, não está bem definido qual tipo de resposta seria mais importante. Uma resposta do tipo Th1, com a secreção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), importante na ativação de macrófagos e responsável por uma forte resposta imunológica mediada por células, ou uma resposta do tipo Th2, onde uma variedade de citocinas são secretadas, dentre as quais, a interleucina 4 (IL-4), IL-5, IL-10 e IL-13, importantes na ativação de uma resposta imunológica humoral.

A resistência à doença em humanos foi correlacionada com um ligeiro aumento na produção de anticorpos IgE (Rihet, Demeure *et al.*, 1991). Verificou-se também através de culturas de células humanas que uma citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) seria importante para a destruição de larvas de *S. mansoni* (Butterworth, Sturrock *et al.*, 1975). Desta forma, anticorpos IgE, juntamente com plaquetas e eosinófilos, aparentam estar intimamente relacionados com um mecanismo protetor. Levando-se em consideração a importância de IL-4 e IL-5 para o desenvolvimento de anticorpos IgE e eosinófilos, seria lógico afirmar que uma vacina que induzisse uma resposta humoral (Th2) seria ideal.

Entretanto, os mecanismos de proteção adquirida através de vacinas foram amplamente estudados. Camundongos vacinados com cercárias irradiadas desenvolveram resistência parcial através de uma resposta baseada na produção de IFN- $\gamma$ . A imunidade adquirida é reduzida em camundongos deficientes de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Vignali, Crocker *et al.*, 1989), linfócitos B (Jankovic, Wynn *et al.*, 1999) e IFN- $\gamma$  (Smythies, Coulson *et al.*, 1992) ou IL-12 (Anderson, Shires *et al.*, 1998), o que sugere que uma resposta imune mediada do tipo Th1 seria ideal.

Poderíamos concluir, portanto, que uma vacina que explorasse os extremos de ambas as respostas seria a mais indicada. No entanto, levando-se em consideração o antagonismo entre as duas respostas, tal vacina seria improvável de se conseguir (Wynn e Hoffmann, 2000).

Com o intuito de desvendar os mecanismos de proteção de ambos os tipos de respostas, um estudo envolvendo camundongos *knock out* para interleucinas 10 e 4 e camundongos *knock out* para interleucinas 10 e 12 mostrou que os níveis de proteção adquiridos em ambas as respostas são similares. Além disso, animais *knock out* apenas para IL-10, os quais são incapazes de modular o sistema imunológico e, conseqüentemente, apresentam uma resposta mista (Th1/Th2), foram os que apresentaram os maiores níveis de proteção (Hoffmann, James *et al.*, 1999). Desta forma foi proposta a teoria do “*Happy Valley*” (vale feliz) (Wilson e Coulson, 1999), onde o parasita modularia o sistema imune do hospedeiro para atingir uma resposta relativamente ineficiente do tipo Th0 (entre ambos os pólos).

Em contrapartida, porém, a observação de que a extrema polarização para uma determinada resposta (Th1 ou Th2) pode ser letal para o hospedeiro (Hoffmann, Cheever *et al.*, 2000) nos leva a crer que há muito ainda a ser desvendado sobre os mecanismos de proteção observados em modelo de cercaria irradiada e, independente da resposta imunológica, será de suma importância chegar-se a uma definição sobre os componentes ideais de uma vacina, seus efeitos sobre o sistema imunológico humano e os níveis de proteção adquiridos.

### 1.7. Lipídeos em *Schistosoma mansoni*.

Uma das características mais marcantes no *Schistosoma mansoni* adulto é a presença de uma dupla bicamada lipídica no tegumento, sendo esta uma grande adaptação à vida intravascular no hospedeiro definitivo.

No entanto, em estudo realizado por Franz Meyer e colaboradores, a incubação de parasitas adultos com acetato de sódio marcado radioativamente e subsequente caracterização das frações lipídicas por cromatografia de camada delgada em sílica, seguida de descarboxilação indica que a incorporação do acetato não ocorre de forma uniforme, sendo incorporado apenas em regiões de alongamento. No caso de síntese *de novo*, a incorporação do carbono do acetato seria uniforme ao longo da cadeia do ácido graxo, o que não foi o resultado obtido. Estes dados viriam a concluir que, apesar da presença desta complexa bicamada lipídica, parece que o *Schistosoma mansoni* perdeu a capacidade de sintetizar ácidos graxos *de novo*, porém, quando providos com fontes alimentares, possuem a capacidade de síntese de todos os seus lipídeos complexos e deve ser o resultado evolutivo da vida parasitária deste verme (Meyer, Meyer *et al.*, 1970). De fato, quando o verme encontra-se em contato com fontes de lipídios, o mesmo provoca uma grande incorporação e utilização destes compostos (Rumjanek e Simpson, 1980; Rumjanek e McLaren, 1981).

Inicialmente, foi descrito que a composição lipídica da membrana do verme adulto diferenciava de alguma forma daquela do hospedeiro definitivo, indicando que o parasita, de alguma maneira, modificava os ácidos graxos que eram incorporados (Fripp, Williams *et al.*, 1976). Estudos subsequentes indicariam ainda, a presença de compostos considerados raros em células de mamíferos,

como o ácido eicosanóico C20:1 (Allan, Payares *et al.*, 1987) e o ácido 5-octadecenóico (Brouwers, Versluis *et al.*, 1998).

A aquisição destes compostos pode ocorrer de diferentes maneiras. Primeiramente foi observado que, quando em contato com o verme, eritrócitos do hospedeiro são lisados e a membrana destes fusionada com a membrana externa do parasita (Golan, Brown *et al.*, 1986). Em outro estudo, evidenciou-se que lipoproteínas interagem diretamente com a superfície do *Schistosoma* (Rumjanek, Campos *et al.*, 1988) podendo inclusive esconder antígenos do parasita contra anticorpos do hospedeiro ou até mesmo competir pelos mesmos sítios de ligação destes anticorpos (Chiang e Caulfield, 1989).

Outros estudos viriam mais tarde analisar a incorporação e compartimentalização destes lipídios (Furlong, Thibault *et al.*, 1992; Moffat e Kusel, 1992; Furlong, Thibault *et al.*, 1995) e ainda mostrar fortes indícios da existência de receptores para LDL na membrana do verme (Tempone, Bianconi *et al.*, 1997). A verdade é que os dados obtidos sugerem uma estreita relação entre as necessidades lipídicas do parasita e mecanismos de evasão do sistema imunológico. Observou-se, por exemplo, que na presença de ácido linoléico, o parasita produz prostaglandina E2, um potente antiinflamatório (Ramaswamy, Kumar *et al.*, 2000). Neste mesmo estudo, pôde-se observar também que a simples presença deste ácido graxo induz a perda da cauda por parte da cercária.

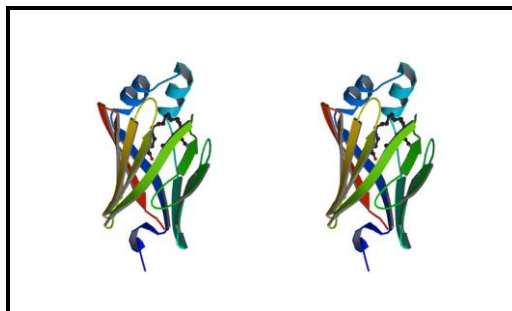
A relação do parasita com os ácidos graxos, no entanto, parece não se restringir a isto. Um outro exemplo de interação se dá quando cercárias incubadas com ácidos graxos perdem a cauda e iniciam não apenas um processo de transformação em esquistossômulo *in vitro*, mas também uma penetração em

meios artificiais como, por exemplo, ágar (Gilbert, Da Rosa *et al.*, 1972; Haas e Schmitt, 1982; Haas, 1984).

#### *1.8. Sm14: uma proteína ligadora de ácidos graxos como antígeno vacinal.*

Quando uma célula atua sobre ácidos graxos, seja  $\beta$ -oxidando para a síntese de ATP, seja utilizando estes compostos para a síntese de moléculas complexas como triacilglicerol, as reações ocorrem na mitocôndria e no citoplasma, respectivamente. Para lidar com estes compostos no interior celular, os mamíferos fazem uso de proteínas específicas capazes de ligarem ácidos graxos e os transportarem de um local para outro. Estas proteínas são conhecidas como *Proteínas Ligadoras de Ácidos Graxos (FABP)*, sendo que nos seres humanos já foram identificados 9 tipos distintos de FABP, cada uma delas localizada em um tecido específico, com funções específicas porém relacionadas ao tráfego de lipídeos.

Tendo em vista a vasta utilização de ácidos graxos pelo *Schistosoma mansoni*, não é de se estranhar que o mesmo venha a possuir um gene codante para uma FABP. De fato, em 1991 foi descrita pela primeira vez a presença de um polipeptídeo de aproximadamente 14 kDa e homólogo à família dessas proteínas (Moser, Tendler *et al.*, 1991) (Figura 6). Não levou muito tempo para que estudos fossem realizados com esta proteína e a possibilidade da mesma ser utilizada como um potente antígeno vacinal, visto a grande importância vital que ela teria para o parasita (Tendler, Vilar *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Representação em estéreo proteína Sm14 juntamente com uma molécula de ácido oléico em seu interior.(Angelucci, Johnson *et al.*, 2004)

A utilização da proteína ligadora de ácidos graxos como antígeno vacinal data de 1996, quando se observou uma proteção de 89% em coelhos vacinados com este antígeno juntamente com adjuvante completo de Freund. Nesta mesma ocasião, Sm14 foi administrada em camundongos *Swiss* e, mesmo na ausência de um forte adjuvante foi capaz de reduzir em 59,6 % a quantidade de vermes (Tendler, Brito *et al.*, 1996). Estes resultados seriam reproduzidos posteriormente, desta vez com Sm14 sendo expressa em um sistema de expressão onde não haveria a fusão com a principal proteína do capsídeo do fago T7. Nesta ocasião, camundongos *Swiss* que receberam Sm14 pela via plantar apresentaram uma redução de 43,9% na carga parasitária (Ramos, Vilar *et al.*, 2001). Com estes resultados, a proteína Sm14 tornou-se alvo de intensos estudos (Ramos, Figueredo *et al.*, 2003), tendo sido determinada sua estrutura cristalográfica (Pertinhez, Sforca *et al.*, 2004) e também sua estrutura em solução (Ramos, Spisni *et al.*, 2009a).

Diferentes pesquisas foram iniciadas, não apenas na tentativa de melhorar a eficácia de uma vacina composta pela proteína Sm14, mas também buscando a formulação de vacinas polivalentes. Vilar MM (Vilar, Barrientos *et al.*, 2003), selecionando peptídeos específicos de Sm14 conseguiu promover uma proteção em torno de 40% em animais imunizados na presença de hidróxido de alumínio.



Já em uma tentativa de criar uma vacina bivalente contra tétano e esquistossomose, Sm14 foi fusionada geneticamente ao fragmento C da toxina tetânica. Nesta ocasião observou-se uma redução em torno de 48,8% na carga parasitária nos animais vacinados com esta fusão (Abreu, Miyasato *et al.*, 2004). De forma similar, bacilos de Calmette e Guérin (BCG) recombinantes foram transformados com vetores contendo o gene da proteína Sm14 e administrados em camundongos numa tentativa de se produzir uma vacina bivalente contra esquistossomose e tuberculose. A proteção obtida foi de 48% nos animais vacinados (Varaldo, Leite *et al.*, 2004).

Wilson RA e Coulson PS da Universidade de York, Inglaterra, em revisão recente (Wilson e Coulson, 2006) lembraram a descoberta realizada em 1976 por Butterworth AE *et al.* (Butterworth, Sturrock *et al.*, 1974), de um mecanismo de morte de esquistossômulos *in vitro* mediado por uma citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Além disso, quando cercárias são transformadas *in vitro* em esquistossômulos, muitos candidatos vacinais (Sm28GST, IrV5, Sm23, 9B-Ag, TPI) são detectados de forma transiente na superfície do parasita. Curiosamente, esta exposição transitória coincide com o período em que as cercárias eliminam o tegumento durante a penetração *in vivo* indicando um possível momento de vulnerabilidade no processo de penetração.

É sabido que o parasita não atinge a derme antes de 48h o que impediria o acesso de anticorpos e leucócitos antes que todos os mecanismos de evasão estivessem ativados, sendo assim uma adaptação importante ao hospedeiro definitivo.

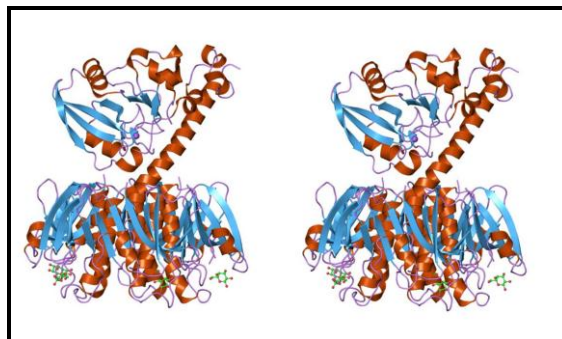
Tendo isto em vista, no momento em que ensaios de vacinação onde o desafio por penetração natural de cercárias foi instaurado, os resultados obtidos

não foram os mesmos, com Sm14 apresentando uma taxa de proteção média em torno de 25% na ausência de adjuvante. Apesar disso, pesquisas com esta proteína continuaram a ser realizadas e, de fato, observou-se uma melhora considerável quando a proteína Sm14 foi utilizada na presença de interleucina 12 (IL-12), acarretando em níveis de proteção em torno de 40% (Fonseca, Brito *et al.*, 2004; Fonseca, Pacifico *et al.*, 2006).

A proposta deste trabalho é verificar se a subunidade B da toxina colérica é capaz de aumentar os níveis de proteção elicitados por Sm14 em um modelo de desafio por penetração natural.

### 1.9. A toxina colérica

Cólera é uma doença responsável por uma grande mortalidade entre crianças em países desenvolvidos. Seus sintomas são causados pela combinação das subunidades A (CTA) e B (CTB) da toxina colérica, formando uma holotoxina AB<sub>5</sub> (Figura 7). A atividade tóxica desta proteína está relacionada à subunidade A, ao passo que a subunidade B está relacionada com a ligação à membrana celular através da interação com o gangliosídeo GM1.



**Figura 7.** Representação em estéreo da toxina colérica; com sua subunidade A ancorada à subunidade B pentamérica.

Antes da secreção da toxina colérica pelo *Vibrio cholerae*, a subunidade A é clivada em um sítio único através de uma protease bacteriana resultando em dois

fragmentos: A1 (amino terminal) e A2 (carboxi terminal), as quais mantêm-se unidas através de uma ponte dissulfeto (Voet e Voet, 2004).

No momento em que a toxina colérica se liga ao receptor gangliosídico GM1, a subunidade A é então transportada para o interior da célula através de endocitose e em seguida segue para o complexo de golgi e retículo endoplasmático através da ligação de uma sequência KDEL (Lisina – Aspartato – Glutamato – Leucina) na região carbóxi terminal da subunidade A2 ao receptor KDEL. O fragmento A1 é então separado do fragmento A2 e atinge o citoplasma através do translocon através de um processo no qual a subunidade A1 é desestruturada através da ação chaperona da proteína dissulfeto isomerase (PDI) (Voet e Voet, 2004).

Uma vez no interior da célula, A1 catalisa a transferência irreversível de uma unidade ADP-ribose (proveniente de NAD<sup>+</sup>) a um resíduo de arginina específico da cadeia lateral da adenilato ciclase. Esta ADP-ribosilação acaba por eliminar a atividade de GTPase da adenilato ciclase, mantendo esta última em constante atividade de conversão de AMP em AMP cíclico (cAMP) (Voet e Voet, 2004).

O aumento na concentração intracelular de cAMP nas células epiteliais do intestino acarreta na fosforilação (através da proteína quinase A (PKA)) de bombas de Na<sup>+</sup> e conseqüente liberação de enormes quantidades de fluídos digestivos, produzindo desta maneira os sintomas característicos da coléra (Voet e Voet, 2004).

### *1.9.1. A utilização da subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante.*

Apesar da utilização de derivados não tóxicos de CT como potentes adjuvantes de mucosas (Pizza, Giuliani *et al.*, 2001). A utilização da subunidade não tóxica (CTB) para o mesmo fim tem demonstrado que a dose de antígeno necessária para induzir uma resposta imunológica pode ser reduzida consideravelmente, além de incrementar a capacidade de ativar o sistema complemento pelas células apresentadoras de antígenos (George-Chandy, Eriksson *et al.*, 2001).

Quando fusionada com o fragmento S1 da toxina de *B. pertussis*, CTB provou ser imunogênica e capaz de desenvolver uma proteção contra infecção por *B. pertussis* (Lee, Halperin *et al.*, 2003). CTB em coadministração, por via nasal, com o fragmento H12 da proteína SfbI de *Streptococcus pyogenes* desenvolveu uma imunidade protetora de longa duração (Schulze, Medina *et al.*, 2003). Além disso, demonstrou-se que macrófagos e monócitos, quando pré-tratados com CTB, diminuem suas respostas inflamatórias aos lipopolissacarídeos, porém sem alteração na síntese de IL-10 (Burkart, Kim *et al.*, 2002).

No que tange a esquistossomose, uma forma de reduzir a morbidade desta doença seria diminuindo a imunopatologia induzida pelos ovos do parasita. Desta forma, a administração nasal de CTB juntamente com antígenos solúveis dos ovos de *Schistosoma mansoni*, provou ser capaz de suprimir uma resposta inflamatória mediada pelas células T CD4+, de diminuir a resposta imune mediada por leucócitos presentes no fígado (relacionados com a formação de granulomas ao redor dos ovos) e reduzir significativamente a mortalidade em camundongos com infecção crônica (Sun, Stadecker *et al.*, 2001; Hernandez, Rutitzky *et al.*, 2002). Conjugada com glutathione-S-transferase (GST) de *Schistosoma mansoni* (um dos seis antígenos vacinais propostos pela OMS), CTB

foi capaz de suprimir significativamente a formação de granulomas no fígado, diminuindo a patologia da doença (Sun, Mielcarek *et al.*, 1999). Em estudo similar, CTB foi fusionada a uma proteína híbrida, constituída de dois epitopos de GST capazes de induzir uma resposta específica por parte de células B e T e, além de ter diminuído consideravelmente a imunopatologia da doença, induziu também uma proteção contra *Schistosoma mansoni* nos animais vacinados (Lebens, Sun *et al.*, 2003).

Desta maneira, CTB pode ser uma ferramenta muito útil na formulação de vacinas anti-esquistossomose, podendo ser utilizada tanto para induzir uma proteção contra o parasita, como ser administrada mesmo após a infecção, diminuindo consideravelmente a patologia da doença.

Outro ponto importante seria com relação ao observado no modelo de vacinação com cercaria irradiada, onde o estágio larval pulmonar é o principal alvo de uma imunidade protetora (Mclaren, 1989; Wilson e Coulson, 1989). Como resultado, é plausível propor que uma vacina nasal, composta por CTB, resulte em uma resposta imunológica eficaz no trato respiratório dos animais vacinados.

## 2. OBJETIVOS

---

*Objetivo geral:* avaliar o uso de CTB em co-administração ou em fusão genética com Sm14, na proteção e formação de granulomas nos animais vacinados.

*Etapas:*

- 1) Expressar, purificar e caracterizar bioquimicamente a fusão genética entre a proteína Sm14 e CTB;
- 2) Avaliar os efeitos protetores desta proteína de fusão como um antígeno vacinal contra esquistossomose mansônica;
- 3) Analisar histopatologicamente os efeitos desta vacina sobre a formação de granulomas ao redor dos ovos localizados no fígado dos animais vacinados;
- 4) Analisar as reações imunológicas dos animais vacinados em resposta a esta proteína.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### *3.1. Soluções.*

##### *3.1.1. Solução tampão TAE.*

Tris base 40 mM; Ácido acético 19 mM; EDTA 1 mM; pH 7.6.

##### *3.1.2. Solução tampão de amostra para eletroforese de DNA (10X concentrada).*

Azul de bromofenol 3 mM; Xileno cianol 7,7 mM; glicerol 50% (V/V).

##### *3.1.3. Solução tampão de amostra para SDS-PAGE (5X concentrada).*

Tris-Cl 250 mM; SDS 350 mM; Azul de Bromofenol 7,5 mM; glicerol 50% (V/V).

##### *3.1.4. Tampão tris-glicina.*

Tris base 24 mM; Glicina 250 mM, SDS 3,5 mM.

##### *3.1.5. Solução de Azul de Coomassie.*

Azul de Coomassie 3 mM, etanol 40% (V/V), ácido acético 10% (V/V).

##### *3.1.6. Solução descorante.*

Etanol 30% (V/V), ácido acético 10% (V/V).

##### *3.1.7. Tampão Fosfato Salino (PBS).*

NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4

##### *3.1.8. Solução tampão carbonato-bicarbonato.*

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM; NaHCO<sub>3</sub> 50 mM; pH 9.6.

*3.1.9. Solução PBS-T.*

NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; Polisorbato 20 0,05% (V/V);  
pH 7.4.

*3.1.10. Solução tampão citrato-fosfato.*

Citrato de sódio 100 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 300 mM.

*3.1.11. Solução tampão de transferência (5X concentrada).*

Glicina 190 mM; Tris 25 mM; 10% Metanol (V/V).

*3.1.12. Solução RFI*

KCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; Acetato de Potássio 30 mM; CaCl<sub>2</sub> 10mM;  
Glicerol 15% (V/V).

*3.1.13. Solução RF II*

KCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; MOPS 10 mM; Glicerol 15% (V/V).

*3.1.14. Solução de acrilamida/bisacrilamida 30%.*

Bisacrilamida 1% (m/V); Acrilamida 29% (m/V)

*3.2. Meios de cultura.*

*3.2.1. Meio 2YT líquido.*

Triptona 1,6% (m/V), extrato de levedura 1% (m/V), NaCl 0,5% (m/V).



*3.2.2. Meio 2YT sólido.*

Meio 2YT líquido adicionado de bactoágar 1,5% (m/V)

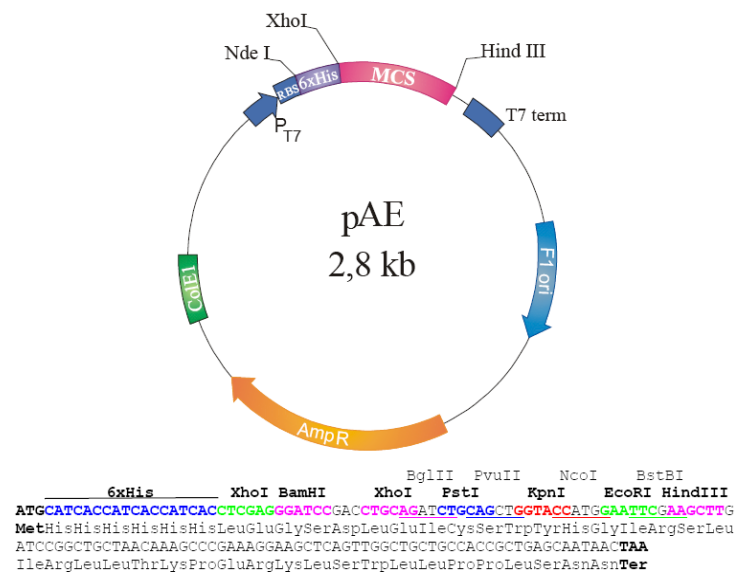
*3.2.3. Meio SOB Líquido.*

Triptona 2,0% (m/V), extrato de levedura 0,5% (m/V), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM.

*3.3. Vetores.*

*3.3.1. pAE.*

Trata-se de um vetor de expressão heteróloga em *Escherichia coli* desenvolvido em nosso laboratório (Ramos, Abreu *et al.*, 2004) (Figura 8).



**Figura 8.** Mapa do vetor de expressão pAE e a sequência do sítio de clonagem múltiplo.

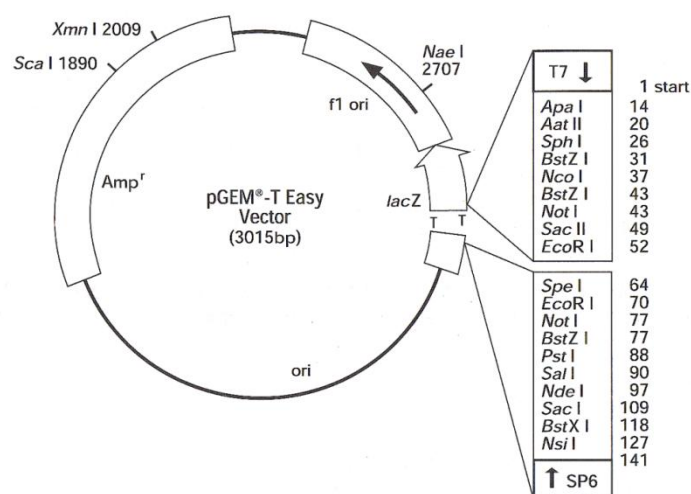
Este vetor possui origem de replicação e sítio de clonagem múltiplo, provenientes do vetor pRSET-A (*Invitrogen Corporation*), e uma sequência codificadora para seis resíduos de histidina, proveniente do vetor pET3-His (Chen e Hai, 1994), na região amino terminal da proteína expressa, permitindo a

purificação através de cromatografia por afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC). Como marcador de seleção, este vetor possui sequência codante para  $\beta$ -lactamase, conferindo resistência a ampicilina às células transformadas.

Além disso, este vetor não possui sequência do gene *rop*, o qual codifica para uma proteína repressora da transcrição de iniciadores de RNA necessários para o início da duplicação do DNA, tornando este vetor como sendo de alto número de cópias.

### 3.3.2. *pGEM-T easy*.

Para a clonagem de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987) amplificados com a enzima *Taq* Polimerase, a qual adiciona uma adenina à posição 3' do DNA, utilizou-se o vetor *pGEM-T* (*Promega Corporation*) (Figura 9). Além disso, este vetor foi utilizado para a realização de reações de sequenciamento de DNA (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977) a fim de verificarmos se houve mutações durante a PCR.



**Figura 9.** Mapa do vetor *pGEM-T Easy*, o qual foi utilizado para clonagens de produtos de PCR realizadas neste trabalho.

### 3.4. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$** : Utilizada em procedimentos de manipulação de plasmídeos, os quais dispensam a expressão de proteínas recombinantes.

***Escherichia coli* BL21(DE3)**: Utilizada em procedimentos de expressão heteróloga de proteínas.

### 3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para realizar a PCR (Mullis e Faloona, 1987), utilizou-se a enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen Corporation). As condições da reação estão de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 1)

**Tabela 1.** Condições utilizadas nas reações em cadeia da polimerase.

Composto	Concentração
Tris-Cl (pH 8.4)	20 mM
KCl	50 mM
dATP	0,2 mM
dCTP	0,2 mM
dGTP	0,2 mM
dTTP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Iniciador senso	0,5 $\mu$ M
Iniciador antisenso	0,5 $\mu$ M
<i>Taq</i> DNA Polimerase	2,5 U
DNA inicial	$\approx$ 0,02 g L <sup>-1</sup>

Após o preparo das soluções, os tubos foram dispostos em um termociclador PTC 100 (*MJ Research, INC*) programado conforme figura 10:

5 minutos	96°C	} 30 ciclos
30 segundos	96°C	
30 segundos	55°C	
1 min e 30 segundos	72°C	
10 minutos	72°C	
$\infty$	4°C	

**Figura 10.** Programação do termociclador para reação em cadeia da polimerase.

### 3.5.1. PCR de colônia.

Alternativamente, PCRs foram realizadas utilizando como DNA inicial, colônias de bactérias obtidas através de plaqueamento em meio sólido. Trata-se de um método rápido e eficiente para verificar a presença de determinados genes em clones diferentes.

### 3.6. Clivagem de DNA com endonucleases.

Diferentes endonucleases foram utilizadas para a clivagem de DNA. No entanto todas as digestões foram realizadas a 37°C durante 90 min utilizando tampão apropriado para cada enzima conforme tabela 2.

**Tabela 2.** Tampões utilizados nas reações de clivagem de DNA.

<i>HindIII</i>	<i>MluI</i>
NaCl 50 mM	NaCl 100 mM
Tris-Cl 10 mM	Tris-Cl 50 mM
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	MgCl <sub>2</sub> 10 mM
Ditiotreitol 1 mM	Ditiotreitol 1 mM
pH 7.9	pH 7.9

### 3.7. Ligação de extremidades coesivas de DNA utilizando enzima T4 DNA Ligase.

Extremidades coesivas de DNA foram ligadas através da enzima DNA ligase do bacteriófago T4, produzida de forma heteróloga em *Escherichia coli* e fornecida por *New England Biolabs, Inc.* Esta enzima catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre as regiões 5' e 3' terminais justapostas de um DNA dupla fita ou RNA.

Para tanto, mantiveram-se quantidades apropriadas de DNA juntamente com 1 U de enzima durante 12h a 16°C na presença de 50 mM Tris-Cl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP; 10mM Ditioneitol; pH 7.5.

### *3.8. Sequenciamento automático de DNA.*

O sequenciamento de DNA foi realizado através do método didesoxi proposto por Frederick Sanger, o qual consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxiribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição. (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *BigDye Terminator* (Applied Biosystems) e a detecção realizada utilizando o equipamento *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

### *3.9. Preparo de bactérias quimicamente competentes.*

Inoculou-se uma colônia de *Escherichia coli* de linhagem de interesse em meio SOB, o qual foi mantido sob agitação em 250 rpm a 37°C até o momento em que obteve-se densidade óptica de 0.6 a 600 nm. A partir deste momento, as bactérias foram mantidas a 0°C a fim de terem o crescimento estacionado.

Adicionou-se solução de MgCl<sub>2</sub> (concentração final ≈10 mM) mantendo-se em repouso durante 15 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas a 2500 g por 15 minutos e – após descarte do sobrenadante – lavadas em solução RF I.

Após 15 minutos de repouso no gelo, as células foram novamente centrifugadas a 2500 *g* e – após descarte do sobrenadante – dispostas em suspensão aquosa de solução RF II e em seguida mantidas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### *3.10. Transformação química de bactérias competentes.*

Aproximadamente 50ng de plasmídeo foram adicionados a 50 $\mu\text{L}$  de bactérias quimicamente competentes, as quais foram mantidas a  $0^{\circ}\text{C}$ .

Após aproximadamente 30 minutos, aumentou-se a temperatura para  $42^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos e, logo em seguida, retornou-se a bactéria para o gelo por mais 5 minutos. Foram adicionados 450  $\mu\text{L}$  de meio SOC às bactérias, mantendo as mesmas sob agitação leve durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Plaqueeu-se as bactérias em meio 2YT sólido contendo antibiótico adequado para seleção de clones positivos.

### *3.11. Eletroforese em gel de agarose.*

Para a separação de moléculas de DNA, preparou-se 50 mL de uma solução de agarose a 1% (m/V) em tampão TAE, a qual foi fundida em forno de microondas. Em seguida, brometo de etídeo para concentração final de 1  $\mu\text{M}$  foi adicionado e a solução despejada em uma fôrma apropriada com um pente adequado para a aplicação das amostras.

Após a completa solidificação, o gel foi disposto em uma cuba de eletroforese contendo tampão TAE. Em seguida, as amostras adicionadas de

tampão para eletroforese de DNA foram aplicadas ao gel e submetidas a uma voltagem de 90 V até que o corante azul de bromofenol atingisse o fim do gel.

Após o término da eletroforese, expôs-se o gel a luz ultravioleta para análise.

### *3.12. Purificação de DNA a partir de gel de agarose.*

Para extração de DNA a partir de géis de agarose utilizou-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare)*, o qual utiliza uma solução de NaI como agente caotrópico para solubilizar a agarose e lâ de vidro para ligar as moléculas de DNA solubilizadas. Todas as eluições foram realizadas utilizando água deionizada.

### *3.13. Minipreparação de DNA plasmidial.*

Para extração de DNA plasmidial de bactérias, utilizou-se o kit *GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, Inc.)* seguindo as recomendações do fabricante.

O processo de extração baseia-se na utilização de uma solução alcalina de SDS combinada com NaOH para a lise das células bacterianas e desnaturação do DNA. Em seguida, a solução é neutralizada utilizando Acetato de Sódio. Desta forma, ao mesmo tempo em que DNA cromossômico é renaturado formando agregados insolúveis, a alta concentração de Acetato de Sódio acaba também por precipitar proteínas e formar complexos SDS-proteínas e de RNAs de alto peso.

Centrifugando-se a solução final, é possível separar a fase aquosa, contendo DNA plasmidial, da fase insolúvel (Birnboim e Doly, 1979)

*3.14. Extração de DNA através de uma solução 1:1 fenol – clorofórmio.*

Uma maneira rápida e eficiente de se realizar a triagem de clones contendo um plasmídeo com o inserto de interesse é através de um procedimento de extração por uma solução 1:1 de fenol-clorofórmio (Beuken, Vink *et al.*, 1998).

Inicialmente, centrifuga-se, por 3 minutos a 10000 *g*, 400µL de um inóculo de bactérias contendo o plasmídeo a ser investigado. Descarta-se o sobrenadante e às células adiciona-se 100 µL de solução tampão para eletroforese de DNA (1X concentrada) juntamente com 38µL de uma solução 1:1 fenol-clorofórmio. Em um agitador de tubos, agita-se os tubos por aproximadamente 10 segundos e em seguida centrifuga-se por mais 3 minutos a 10000 *g*.

O sobrenadante deverá ser aplicado em um gel de agarose e submetido a uma eletroforese.

Como controle, todo o processo deverá ser feito também com um inóculo de bactérias contendo o plasmídeo sem o inserto. Clones contendo o plasmídeo com o inserto, por serem de tamanho ligeiramente maior, devem apresentar migração mais lenta durante o processo eletroforético.

*3.15. Construção de um sistema de expressão contendo as sequências dos genes *ctb* e *sm14* em fusão.*

Tanto o gene *sm14* como o gene *ctb* já encontravam-se inseridos no plasmídeo pAE. Para a construção de um vetor contendo estes genes em fusão, o gene *sm14* foi isolado e amplificado através de uma PCR (Mullis e Faloona, 1987) utilizando-se um iniciador senso contendo um sítio de restrição para a endonuclease *Mlu* I e um iniciador antisenso complementar a uma sequência presente no próprio vetor.

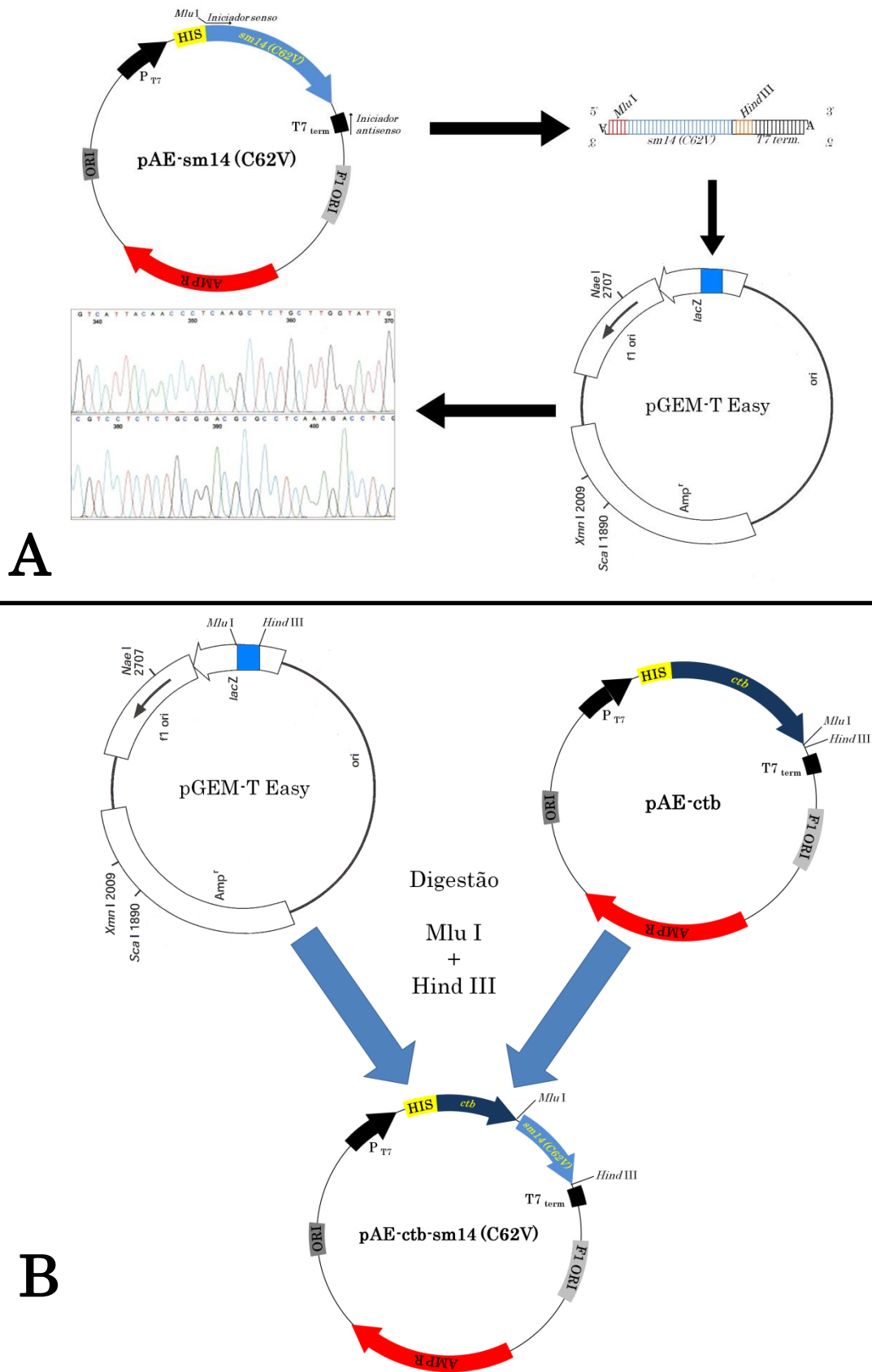


O produto da PCR foi analisado através de uma eletroforese em gel de agarose, purificado utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (*GE Healthcare*) e submetido a uma reação de ligação juntamente com o vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (*Promega Corporation*).

Bactérias *Escherichia coli DH5a* foram então transformadas com a reação de ligação e plaqueadas em meio 2YT sólido com ampicilina. Após 16 horas de incubação a 37°C, selecionou-se algumas colônias, as quais foram submetidas a uma reação de PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para sm14. Desta forma, foi possível verificar entre os clones, aqueles que apresentavam o vetor *pGEM-T Easy* contendo o gene sm14.

Os clones positivos foram inoculados em meio 2YT líquido contendo ampicilina e incubados a 37°C durante 12 horas. Em seguida os vetores foram extraídos através de minipreparações e submetidos a reações de sequenciamento (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977) utilizando iniciador específico para o gene sm14 para verificar eventual ocorrência de mutações durante a PCR.

O vetor *pGEM-T Easy* contendo o gene sm14 sem mutações foi duplamente digerido com as endonucleases *MluI* e *HindIII* e, logo após, submetido a uma eletroforese em gel de agarose, através da qual foi possível isolar e purificar o gene sm14. Da mesma forma, o vetor pAE-ctb foi duplamente digerido com as mesmas endonucleases e purificado após eletroforese. Em seguida, foi realizada uma reação de ligação entre o gene sm14 e o vetor pAE-ctb, acarretando na construção pAE-ctb-sm14 (Figura 11).



**Figura 11.** Construção de um sistema de expressão contendo as sequências dos genes *ctb* e *sm14* em tandem. **A.** O gene *sm14* foi isolado e amplificado a partir do vetor pAE, inserido no vetor pGEM-T easy e sequenciado em busca de eventuais mutações. **B.** O gene *sm14*, sem mutações, foi removido do vetor *pGEM-T easy* através de dupla digestão com as endonucleases *Mlu I* e *Hind III* e então subclonado no vetor pAE-*ctb* previamente digerido com as mesmas enzimas.

*Escherichia coli DH5α* competentes foram transformadas com a reação de ligação entre pAE-ctb e sm14, distribuídas em meio 2YT sólido contendo ampicilina e incubadas durante 16 horas a 37°C. Selecionaram-se alguns clones, os quais foram inoculados em 3 mL de 2YT líquido contendo ampicilina e mantidos a 37°C durante 16 horas.

Aproximadamente 300 µL de cada clone foram então submetidos a um processo de extração de DNA por fenol-clorofórmio e aplicados em uma eletroforese em gel de agarose de modo que pudéssemos verificar a presença do gene sm14, em fusão com o gene ctb, no vetor pAE. Vetores contendo ambos os genes possuem tamanho ligeiramente maior em relação aos vetores contendo apenas o gene ctb e, portanto, apresentam migração diferente em um processo eletroforético.

Os vetores positivos foram extraídos e purificados através de minipreparações realizadas com o restante da solução (aproximadamente 2,7mL).

### *3.16. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes.*

O vetor contendo o gene de interesse foi inserido em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) quimicamente competentes, as quais foram incubadas e crescidas a 37°C em meio 2YT líquido contendo 0,1 g L<sup>-1</sup> ampicilina. No momento em que a densidade óptica em 600 nm atingiu 0,6, as células foram induzidas por 3 horas pela adição de 1 mM Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosideo (IPTG).

Após o período de indução, as células foram rotas por *French Pressure* (*Thermo Electron Corporation*) e os corpúsculos de inclusão contendo a proteína recombinante isolados e solubilizados em 20 mL de tampão de solubilização de corpúsculos adequado (Tabela 3).

**Tabela 3.** Soluções tampão de solubilização de corpúsculos de inclusão.

	rSm14	rCTB	rCTB-Sm14
Uréia	8M	8M	8M
NaCl	150mM	150mM	150mM
Tris-Cl	50mM	50mM	50mM
$\beta$ -mercaptoetanol	5mM	5mM	5mM
pH	8.0	8.0	7.0

### 3.17. Reestruturação das proteínas recombinantes.

Para reestruturação das proteínas recombinantes, a solução contendo os corpúsculos de inclusão solubilizados foi diluída duzentas vezes através de gotejamento lento em um balão de Erlenmeyer contendo tampão de reestruturação adequado conforme tabela 4.

**Tabela 4.** Soluções tampão para reestruturação de proteínas. ¶ Galactose foi adicionada à solução de reestruturação de rCTB-Sm14 se, e somente se, esta última não foi submetida a purificação por afinidade a galactose (ver adiante).

	rSm14	rCTB	rCTB-Sm14
NaCl	150mM	150mM	150mM
Tris-Cl	50mM	50mM	50mM
Galactose	-	-	100mM ¶
pH	8.0	8.0	7.0

### 3.18. SDS-PAGE.

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada conforme procedimento descrito anteriormente (Shapiro, Vinuela *et al.*, 1967).

Os géis de poliacrilamida foram preparados conforme a tabela 5 e, após a completa solidificação, os mesmos foram dispostos em uma cuba para eletroforese contendo tampão tris-glicina.

**Tabela 5.** Receita para preparo de gel de poliacrilamida.

	12%	15%
Acrilamida	11,6 % (m/V)	14,5 % (m/V)
Bisacrilamida	0,4 % (m/V)	0,5 % (m/V)
Tris pH 8.8	0,4 M	0,4 M
SDS	0,1 % (m/V)	0,1 % (m/V)
APS	0,1 % (m/V)	0,1 % (m/V)
TEMED	0,04 % (V/V)	0,04 % (V/V)

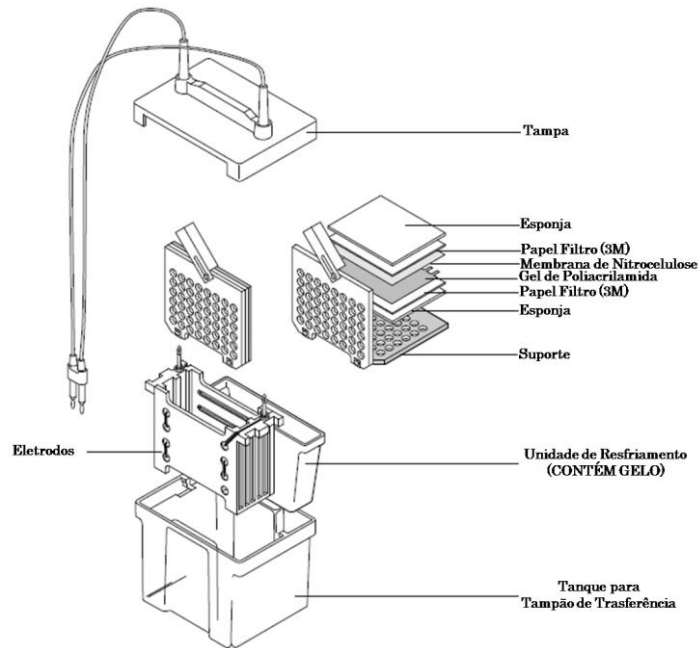
As amostras a serem analisadas foram acrescidas de tampão de amostra para SDS-PAGE e aplicadas sobre o gel de poliacrilamida. Para eletroforese em condições redutoras, adicionou-se 200 mM  $\beta$ -mercaptoetanol às amostras, as quais também foram aquecidas durante  $\approx$  5 minutos. O sistema foi submetido a uma corrente elétrica de  $\approx$  30mA até que o corante azul de bromofenol saísse completamente do gel.

Para análise, o gel foi submerso em uma solução de azul de coomassie durante 45 minutos e o excesso de corante foi removido com solução descorante.

*3.19. Transferência de proteínas a partir de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose.*

Inicialmente, as proteínas foram submetidas a uma separação eletroforética por SDS-PAGE. Em seguida, o gel de acrilamida foi posto em contato direto com uma membrana de nitrocelulose e ambos foram dispostos entre um conjunto de três papéis-filtro (*3M Corp.*) e três esponjas absorventes.

Todo o conjunto foi disposto no interior de um sistema apropriado (*Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.*), contendo tampão de transferência em seu interior e conectado a uma corrente elétrica de  $\approx$  350 mA durante 1 hora e 30 minutos (Figura 12).



**Figura 12.** Montagem do sistema para transferência de proteínas a partir de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Adaptado do manual de instruções do fabricante (*Bio Rad Laboratories, Inc.*)

### 3.20. Cromatografia por afinidade a íon metálico.

A solução de proteínas reestruturadas foi adsorvida em uma resina de sefarose de alto desempenho capaz de reter íons metálicos (*Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare*) previamente ativada com cinco volumes de coluna (CV) de 300 mM NiSO<sub>4</sub> e equilibrada com cinco CV de tampão de reestruturação (Tabela 4).

Para a lavagem da resina, adicionou-se ao tampão 60 mM de imidazol, ao passo que para a eluição das proteínas, utilizou-se 1 M de imidazol.

### 3.21. Cromatografia por permeação em gel.

Cromatografia por filtração em gel foi realizada utilizando-se coluna XK-26 (*GE Healthcare*) contendo 500 mL de resina *Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare)*. As proteínas foram permeadas pela resina com um fluxo de 1 mL

min<sup>-1</sup>. Coletou-se frações de 5mL das quais foram obtidas as absorbâncias em 280nm.

### *3.22. Cromatografia por afinidade a galactose.*

A proteína rCTB-Sm14 foi adsorvida, sob um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, em 5 mL de resina contendo galactose imobilizada (*PIERCE*), empacotados em uma coluna adequada e equilibrados com cinco CV de tampão 150 mM NaCl e 50mM Tris-Cl pH 8.0. A resina foi lavada com cinco CV do mesmo tampão utilizado para o equilíbrio e a eluição realizada pela adição de 100 mM galactose ao tampão.

Foram coletadas frações de 5 mL durante a lavagem e frações de 1 mL durante a eluição das proteínas, as quais foram analisadas em SDS-PAGE (Shapiro, Vinuela *et al.*, 1967).

### *3.23. Diálise.*

Diálises foram realizadas utilizando-se membranas de corte 7000 Da (*Thermo Scientific, Inc.*) e todas as trocas de tampão foram realizadas a 4°C.

### *3.24. Ultra filtração.*

Para procedimento de ultra filtração, foram utilizadas unidades Centricon Plus-70® (*Millipore Corp.*), as quais foram utilizadas conforme recomendações do fornecedor.

### *3.25. Dicroísmo Circular*

A estrutura secundária das proteínas foi analisada através de ensaios de dicroísmo circular em um espectropolarímetro Jasco J-810 (*Jasco Inc.*) conectado a um sistema *Peltier Jasco PFD-425S* para controle de temperatura. Comprimentos de onda de 195 – 260 nm foram detectados cinco vezes a 20°C, de 0.5 em 0.5 nm, a uma velocidade de 50 nm·min<sup>-1</sup>, utilizando-se uma célula de quartzo com 0,1 mm de caminho óptico.

### *3.26. Fluorescência intrínseca do triptofano.*

Com o objetivo de observarmos a perda de estrutura das proteínas, à medida que concentrações crescentes de uréia foram sendo adicionadas à solução protéica, a fluorescência intrínseca do triptofano foi observada em um espectrofluorímetro *SLM-AMINCO Bowman Series II (Spectronic Instruments)* fixando-se o comprimento de onda de excitação em 285nm e coletando-se um espectro de emissão entre 300nm e 400nm.

### *3.27. GM1-ELISA.*

Este ensaio, o qual é capaz de verificar a capacidade de ligação de rCTB e rCTB-Sm14 ao receptor gangliosídeo GM1, foi realizado conforme procedimento descrito anteriormente (Arêas, 2005).

Placas de 96 poços foram revestidas com  $\approx 1\mu\text{g}$  de GM1 gangliosídeo por poço. Para tanto, adicionou-se a cada poço uma solução de GM1 (*Merck Chemicals Ltd.*) dissolvido em tampão PBS e, em seguida, incubou-se a placa a 37°C durante 16h.



Após 3 lavagens com  $\approx 200 \mu\text{L}$  de PBS-T,  $100 \mu\text{L}$  de tampão PBS-T contendo 1% BSA (m/V) foram adicionados a cada poço e a placa incubada durante 2 horas a temperatura ambiente de modo a bloquear eventuais sítios inespecíficos.

Proteínas recombinantes, diluídas em diferentes concentrações (300 nM a 0,3 nM) em tampão PBS-T contendo 1% BSA (m/V), foram então adicionadas aos poços e as placas incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Proteínas não ligadas foram removidas da placa através de lavagens com PBS-T e então, uma diluição adequada do anticorpo comercial anti-CT produzido em coelhos (*Sigma*) foi adicionada às placas seguido por incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS-T, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (*Sigma*), em uma diluição apropriada, foi adicionado à placa e incubado por 1 hora à temperatura ambiente.

As placas foram lavadas novamente e em seguida reveladas adicionando-se a cada poço  $100 \mu\text{L}$  de uma solução de 8 mg de o-fenilenodiamina (OPD) em 20 mL de solução tampão citrato-fosfato e  $10 \mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio a 30%. A reação foi interrompida pela adição de  $50 \mu\text{L}$  de ácido sulfúrico a 4M e a absorbância foi medida em 492nm.

### *3.28. Ensaios de ligação a ácidos graxos.*

A capacidade das proteínas rSm14 e rCTB-Sm14 de ligarem ácidos graxos foi verificada utilizando-se um espectrofluorímetro *SLM-AMINCO Bowman Series II (Spectronic Instruments)* juntamente com o análogo fluorescente de ácido graxo *11-[(5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl) amino] undecanoic acid*

(DAUDA) (*Molecular Probes*). Quando em solução aquosa, o DAUDA possui emissão máxima em comprimentos de onda em torno de 550nm, porém quando este análogo é isolado do meio aquoso, há um aumento na intensidade de fluorescência emitida e em comprimentos de onda de maior energia. Para a realização do ensaio, foram utilizados 2 $\mu$ M DAUDA na presença ou ausência de 2 $\mu$ M Sm14. A solução foi excitada em um comprimento de onda de 345nm e um espectro de emissão foi coletado de 360nm a 670nm.

### *3.29. Western-Blot.*

Membranas de nitrocelulose, após transferência de proteínas a partir de gel de poliacrilamida, foram bloqueadas com 5% leite em pó desnatado (m/V) dissolvido em tampão PBS-T. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS-T e incubadas durante 1 hora em uma solução de anticorpos policlonais IgG anti-Sm14 ou IgG anti-CTB diluídos em PBS-T contendo 5% leite em pó desnatado (m/V).

Em seguida, as membranas foram novamente lavadas conforme descrito acima e então incubadas por 1 hora em uma solução contendo Anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com peroxidase (*Sigma-Aldrich*).

Após uma terceira lavagem, a detecção foi realizada utilizando-se o kit *ECL Advance Western Blotting Detection (GE Healthcare)* e expondo as membranas a um filme auto-radiográfico (*Kodak BioMax Light*).

### *3.30. Aumento da estabilidade de rCTB-Sm14 utilizando-se galactose.*

Proteínas foram mantidas na presença ou ausência de 100 mM galactose e armazenadas a 4°C, -20°C ou sob a forma liofilizada durante 3 meses e

analisadas em seguida através de SDS-PAGE em condições não redutoras e sem ferver.

### *3.31. Ensaio de imunização subcutânea*

Cinquenta camundongos BALB/c ♀, com idade entre cinco e sete semanas, foram distribuídos em cinco grupos de dez animais cada e submetidos a um regime de imunização pela via subcutânea (Tabela 6).

**Tabela 6.** Via subcutânea. Grupos vacinais e seus respectivos antígenos e doses.

<b>Grupo</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Dose</b>
1	Salina 0,9%	100 µL
2	CTB	15 µg
3	Sm14	15 µg
4	CTB + Sm14	15 µg CTB + 15 µg Sm14
5	CTB-Sm14	30 µg

Foram administradas cinco doses consecutivas com intervalo de uma semana entre cada dose. O desafio foi realizado 14 dias após a última dose e a perfusão realizada 45 dias após o desafio. Seis sangrias foram realizadas nos animais vacinados; quatro delas foram realizadas com intervalo de uma semana a partir da segunda imunização, a quinta sangria foi realizada no momento do desafio e a sexta e última sangria foi realizada no momento da perfusão dos animais.

### *3.32. Ensaio de imunização nasal.*

Cinquenta camundongos BALB/c ♀, com idade entre cinco e sete semanas, foram distribuídos em cinco grupos de dez animais cada e submetidos a um regime de imunização nasal. Foram administradas quatro doses consecutivas através da inalação de 10µL de solução contendo antígeno específico (Areas,

Oliveira *et al.*, 2004) (Tabela 7) com intervalo de uma semana. O desafio foi realizado quinze dias após a última dose.

Três sangrias foram realizadas nos animais vacinados pela via nasal, a primeira sendo uma semana após a última imunização, a segunda no momento do desafio e a terceira e última juntamente com a perfusão. Realizou-se também um lavado vaginal nestes animais uma semana após a última imunização.

**Tabela 7.** Via nasal. Grupos vacinais e seus respectivos antígenos e doses.

Grupo	Antígeno	Dose
1	Salina 0,9%	10 µL
2	CTB	4 µg em 10µL
3	Sm14	4 µg em 10µL
4	CTB + Sm14	4 µg CTB + 4 µg Sm14 em 10µL
5	CTB-Sm14	8 µg em 10µL

### 3.33. Sangrias.

Todas as sangrias foram realizadas através do plexo retrorbital dos camundongos com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de vidro.

### 3.34. Lavado vaginal.

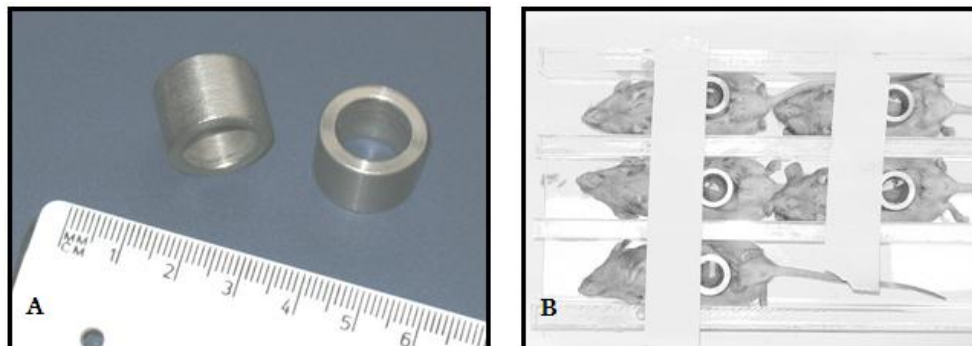
Diariamente, durante uma semana, as vaginas dos animais imunizados pela via nasal foram lavadas com 50 µL de solução salina 0,9%. Ao final do processo, volumes iguais de cada dia foram condicionados em um único tubo e armazenados a - 80 °C até o momento da análise por ELISA.

### 3.35. Desafio e perfusão.

Os animais foram desafiados através da exposição cutânea a cercárias de *Schistosoma mansoni* durante uma hora. Para tanto, os camundongos foram

anestesiados e tiveram seus abdomens depilados. Um anel de metal foi então colocado sobre a pele onde adicionou-se 1 mL de água contendo aproximadamente 100 cercárias (Figura 13).

45 Dias após o desafio, os animais foram perfundidos e a quantidade de vermes observada em cada animal foi computada para o cálculo da atividade protetora da vacina.



**Figura 13.** *A.* Anéis de metal utilizados no momento do desafio. *B.* Camundongos no momento do desafio.

### *3.36. Avaliação da atividade protetora da vacina.*

O nível de proteção obtido foi calculado através da equação  $[(C - V) \times C^{-1}] \times 100$ , onde C é a quantidade média de vermes recuperada nos animais do grupo controle e V é a quantidade média de vermes recuperada nos animais vacinados.

### *3.37. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).*

Em uma microplaca de 96 escavações, 2 µg de proteína recombinante, diluída em Tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9.6, 50 mM, foram adicionados a cada escavação deixando-se incubar por 12 horas a 4°C. Três lavagens com 200 µL de PBS-T foram realizadas após cada período de incubação. O bloqueio foi

feito utilizando-se uma solução 10% (m/V) de leite em pó desnatado dissolvido em tampão PBS-T, incubando-se durante uma hora à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, os soros ou lavados vaginais coletados dos animais foram diluídos em diferentes concentrações em PBS-T com 1% de BSA, adicionados aos poços e mantidos a 37°C durante uma hora. Em seguida, após três lavagens com PBS-T, adicionou-se um anticorpo apropriado, conjugado com enzima peroxidase, o qual foi mantido em incubação a 37°C pelo período de 1 hora.

A revelação foi feita conforme descrito anteriormente em GM1-ELISA.

### *3.38. Dosagem de citocinas por ELISPOT.*

Os baços dos animais foram retirados e mantidos durante 30 minutos a 37°C em uma solução de colagenase + DNAase. Em seguida os tecidos foram processados em um separador de células (*BD Biosciences, San Diego, California*) e o macerado centrifugado durante 10 minutos em 1200 *g*. O precipitado foi então lavado com 5 mL de meio RPMI 1640 (*Sigma*) contendo 2 mM L-Glutamina (*Merck, Darmstad, Alemanha*) e 50 µg mL<sup>-1</sup> de sulfato de gentamicina (*Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil*) e centrifugado novamente por 10 minutos em 1200*g*.

As células foram suspensas em 1 mL de meio RPMI contendo 2 mM de L-Glutamina (*Merck, Darmstad, Alemanha*), 50 µg mL<sup>-1</sup> de sulfato de gentamicina (*Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil*), 50 mM β-mercaptoetanol, 10% de soro fetal bovino e 10 µg mL<sup>-1</sup> de polimixina B. As células foram dispensadas em placas de ELISPOT, onde seguiu-se o protocolo conforme descrito pelo fabricante (*BD Biosciences, São Diego, Califórnia*).

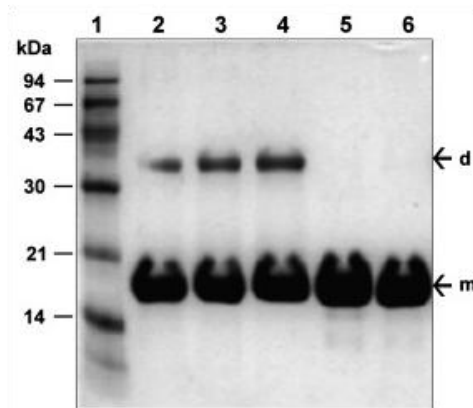
*3.39. Análise estatística dos resultados.*

Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando o Teste T de *Student*, bicaudal, não pareado com variância desigual e considerando resultados com significância estatística para  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A *Sm14* mutante *Cys62Val* é mais estável em comparação com a proteína selvagem e/ou a mutante *Sm14 Cys62Ser*.

Uma vez que os níveis de proteção obtidos com a proteína *Sm14* estão diretamente relacionados com uma correta estruturação desta proteína (Ramos, Figueredo *et al.*, 2003), a observação de que um único resíduo de cisteína, presente na posição 62 da proteína *Sm14*, acarretava na perda precoce de estrutura e consequente precipitação e perda de atividade (Figura 14), estes resultados levaram o nosso grupo à construção de dois mutantes. Em um deles, a cisteína foi substituída por uma serina, por ser um análogo estrutural. No outro mutante, a cisteína foi substituída por uma valina, uma vez que a FABP de *Schistosoma japonicum* apresenta este resíduo nesta mesma posição.



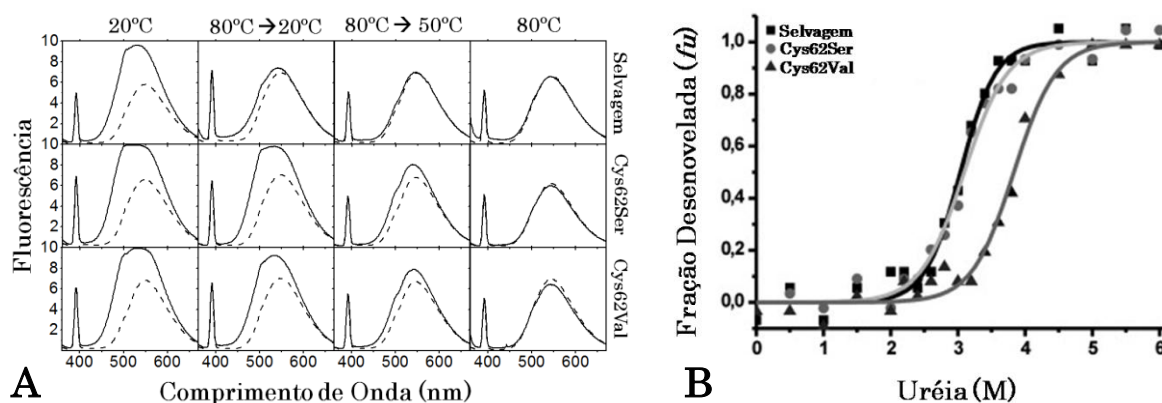
**Figura 14.** SDS-PAGE ilustrando a formação de dímeros devido à presença de um resíduo de cisteína tanto em *Sm14* selvagem (Met20 e Cys62) como por suas isoformas (Thr20Cys62 e Ala20Cys62). **1.** Marcador de massa molecular; **2.** *Sm14-M20(C62)*; **3.** *Sm14-T20(C62)*; **4.** *Sm14-A20(C62)*; **5.** *Sm14-M20(Cys62Ser)*; **6.** *Sm14-M20(Cys62Val)*. Todas as proteínas foram purificadas ao mesmo tempo e a formação de dímeros foi induzida por aquecimento durante cinco minutos a 95°C. Os dímeros estão indicados pela letra “d” e as formas monoméricas estão indicadas pela letra “m”. *Sm14-T20(C62)* e *Sm14-A20(C62)* foram obtidas conforme descrito em trabalho anterior (Ramos, Figueredo *et al.*, 2003) e estão inclusas nesta figura como referências adicionais. Figura publicada (Ramos, Spisni *et al.*, 2009b).

Com o intuito de verificarmos qual destes mutantes seria o mais estável para posterior utilização em nossos ensaios de imunização, realizamos um ensaio



de atividade com todas as proteínas. Através da análise da figura 15A, pode-se observar que mesmo após o aquecimento a 80°C e posterior resfriamento a 20°C, tanto o mutante Cys62Val como o mutante Cys62Ser mantiveram sua atividade de ligação ao DAUDA. Além disso, uma atividade residual pôde ser observada nestes mutantes ao serem aquecidos a 80°C e resfriados para 50°C ( $T_m$ , determinada em trabalho anterior (Ramos, Figueredo *et al.*, 2003)). A proteína selvagem, como era esperado, após aquecimento, perde totalmente a sua atividade de ligação ao DAUDA tanto após resfriamento a 50°C como após resfriamento a 20°C.

Outro ensaio realizado com as três proteínas foi através do monitoramento da fluorescência intrínseca do triptofano em concentrações crescentes de uréia. Estes resultados, ilustrados na figura 15B, mostram que a proteína mutante Cys62Val é a mais estável das três proteínas estudadas, com um ponto de inflexão na curva ocorrendo na concentração de 3,9M, ao passo que as outras formas (selvagem e Cys62Ser) apresentaram pontos de inflexão em 3,0M.

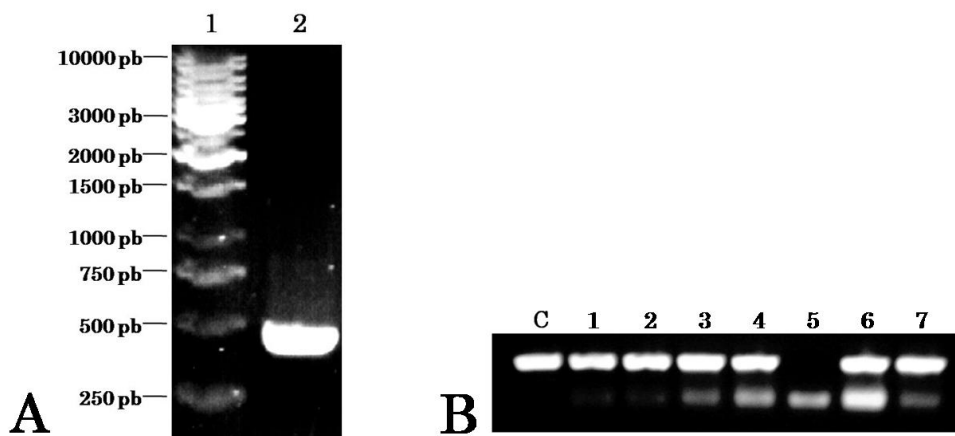


**Figura 15. A.** Capacidade de ligação ao DAUDA por Sm14 selvagem e pelas Sm14 mutantes Cys62Ser e Cys62Val. Foram realizadas medições a 20°C (antes e após aquecimento a 80°C), a 50°C após aquecimento a 80°C e a 80°C. **Linhas tracejadas:** 2μM Dauda. **Linhas contínuas:** 2μM Dauda + 2μM Sm14. **B.** A proteína Sm14 selvagem e as duas mutantes, Cys62Ser e Cys62Val foram estudadas quanto a estabilidade na presença de uréia. A emissão máxima do triptofano foi coletada em concentrações crescentes de uréia e os dados obtidos foram submetidos a regressão não linear pelo modelo de Boltzmann do programa *Microcal Origin*<sup>TM</sup>. Figuras publicadas (Ramos, Spisni *et al.*, 2009b).

Tendo em vista que a proteína Sm14 Cys62Val é a mais estável (Ramos, Spisni *et al.*, 2009a), todos os ensaios realizados neste projeto foram realizados com este mutante, identificado ao longo deste trabalho, genericamente, como Sm14.

#### 4.2. Construção de um sistema de expressão contendo as sequências nucleotídicas de *ctb* e *sm14* em fusão.

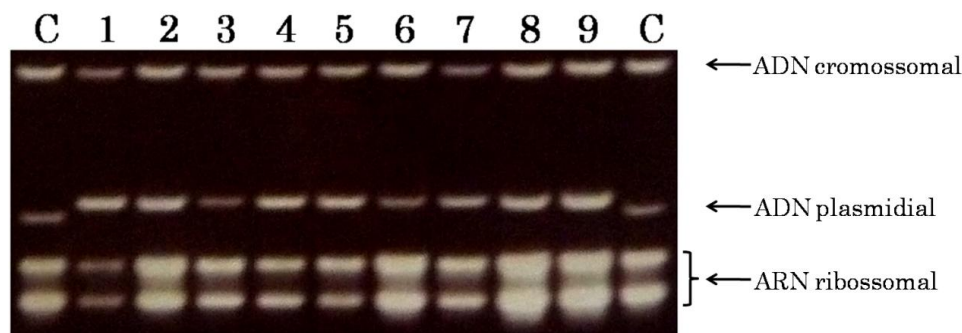
A amplificação do cDNA de Sm14 foi realizada por PCR (Figura 16A), permitindo a sua purificação e a subsequente ligação em vetor *pGEM-T Easy* (Promega Corporation). A confirmação foi feita após a realização de uma PCR de colônia a partir de bactérias transformadas com a reação de ligação entre *pGEM-T* e o cDNA de Sm14 (Figura 16B).



**Figura 16.** A. Amplificação do gene *sm14*. **Linha 1.** Marcador de peso molecular. **Linha 2.** Amplicon contendo a sequência do gene *sm14*. **pb.** Pares de Base. **B.** PCR de colônia realizado para detecção de clones que incorporaram o vetor *pGEM-T Easy* contendo a sequência do gene *sm14*. **C.** controle = *sm14* amplificado a partir do vetor *pAE*. **2 a 8.** Diferentes clones de *Escherichia coli* transformadas com o vetor *pGEM-T Easy*.

Reações de sequenciamento realizadas junto aos vetores *pGEM-T* detectaram ao menos um cDNA *sm14* sem mutações (dados não exibidos). Além disso, a subclonagem de *sm14* em *pAE-ctb* pôde ser confirmada através de uma eletroforese em gel de agarose dos DNAs plasmidiais, obtidos através de uma

extração por fenol-clorofórmio de diferentes colônias de bactérias transformadas com a reação de ligação entre pAE-ctb e o cDNA da proteína Sm14 (Figura 17).

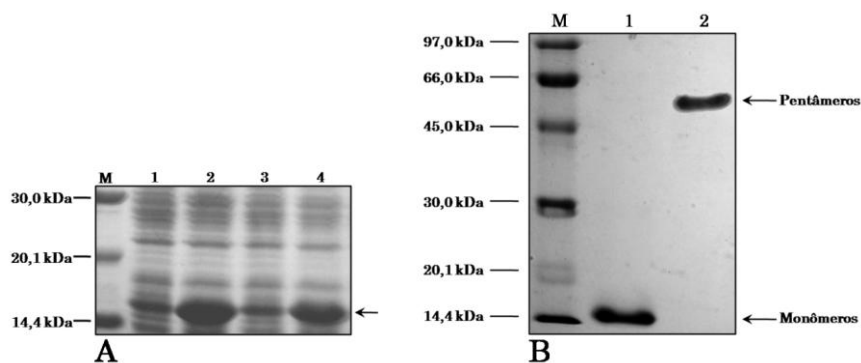


**Figura 17.** Fenol-clorofórmio para confirmação de ligação de sm14 em pAE-ctb. **C.** Controle: pAE-ctb. **1 a 9.** pAE-ctb-sm14. Vetores pAE-ctb-sm14 apresentam tamanho ligeiramente maior comparados aos vetores pAE-ctb.

### 4.3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

#### 4.3.1. rCTB.

SDS-PAGE de extratos protéicos de *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o vetor pAE-ctb demonstra claramente a expressão de rCTB após a adição de IPTG (Figura 18A). Além disso, verificou-se um alto grau de pureza após purificação através de IMAC. Ainda, em condições não redutoras, verificou-se que rCTB manteve sua característica pentamérica (Figura 18B).



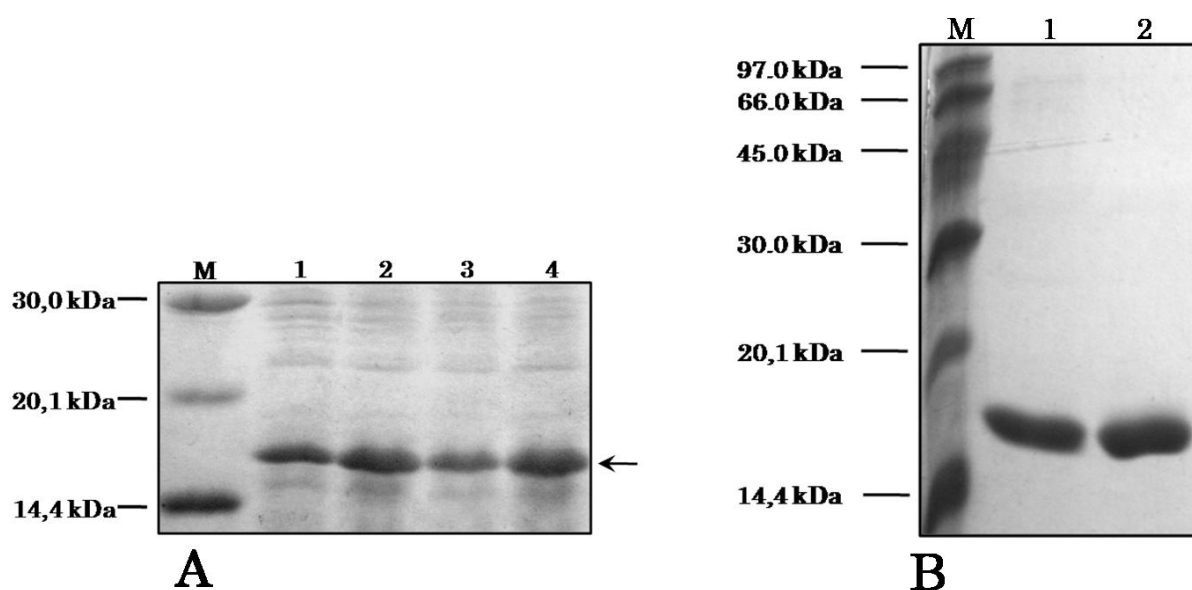
**Figura 18.** Expressão e purificação de rCTB. **A.** SDS-PAGE de extratos protéicos de *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pAE-ctb. *M*: marcador de massa molecular; *1 e 3*: Bactérias não foram induzidas (sem IPTG); *2 e 4*: Bactérias com expressão heteróloga induzida pela adição de IPTG. **B.** SDS-PAGE de rCTB após purificação por IMAC onde é possível observar a capacidade de rCTB formar pentâmeros. *M*: marcador de massa molecular; *1*: rCTB em condições redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol adicionado ao tampão de amostra); *2*: rCTB em condições não redutoras (tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol) e sem aquecimento a 90°C por 5 minutos.

Ao final do processo de purificação, as proteínas foram dialisadas contra tampão 2mM Tris pH 8.0, 20mM NaCl, 0.1% glicina, conforme descrito previamente por nosso laboratório (Arêas, 2005).

#### 4.3.2. rSm14.

Da mesma forma, rSm14 foi expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3), após adição de IPTG. Nota-se ainda que mesmo antes da indução, há a presença de proteínas recombinantes presentes, indicando um ligeiro escape da expressão (Figura 19A).

rSm14 também foi purificada através de IMAC obtendo-se alto grau de pureza, como pode ser visto na figura 19B.



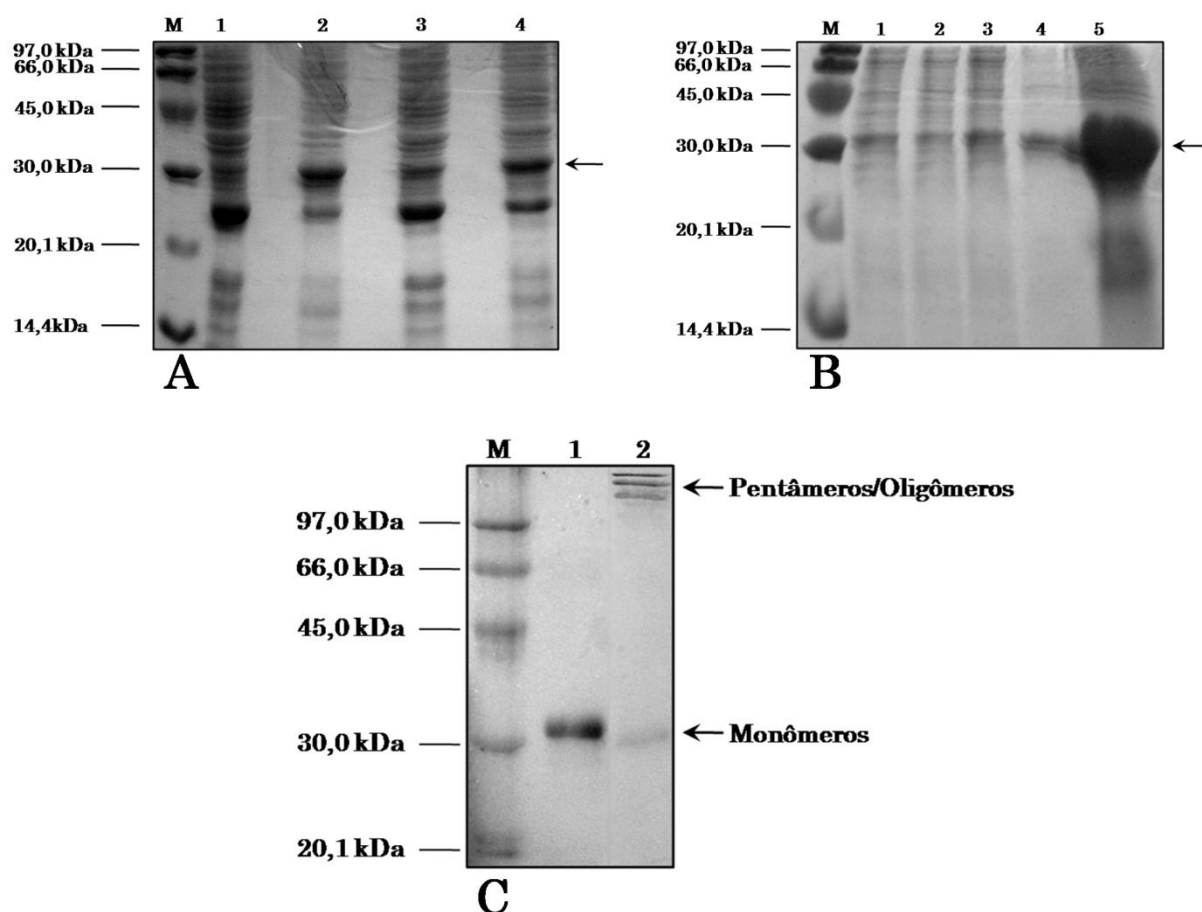
**Figura 19.** Expressão e purificação de rSm14. **A.** SDS-PAGE de extratos protéicos de *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pAE-sm14. *M*: marcador de massa molecular; *1 e 3*: Bactérias não foram induzidas (sem IPTG); *2 e 4*: Bactérias com expressão heteróloga induzida pela adição de IPTG. **B.** SDS-PAGE de rSm14 após purificação por IMAC. *M*: marcador de massa molecular; *1 e 2*: rSm14.

Ao final do processo de purificação, as proteínas foram dialisadas contra tampão PBS, conforme descrito previamente por nosso laboratório (Ramos, 2002).

## 4.3.3. rCTB-Sm14.

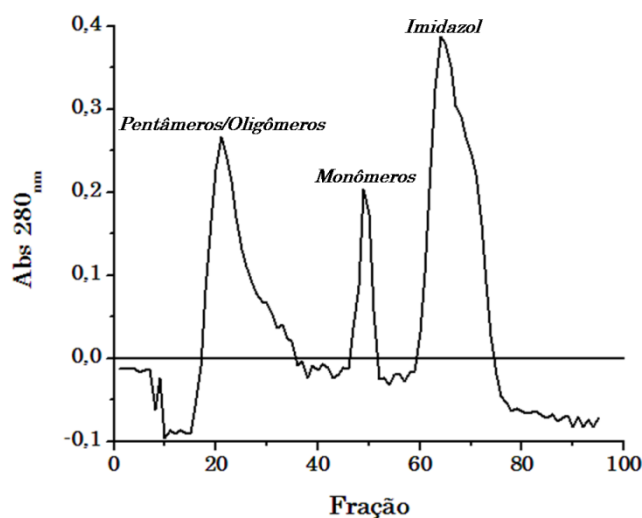
Com relação à proteína rCTB-Sm14, pudemos observar a expressão heteróloga da mesma após indução por IPTG (Figura 20A).

A grande maioria das proteínas expressas encontrava-se sob a forma de corpúsculos de inclusão (Figura 20B). No entanto, após solubilização em 8M uréia, reestruturação das proteínas e purificação em IMAC, observou-se que as proteínas foram capazes de formar estruturas pentaméricas/oligoméricas (Figura 20C).



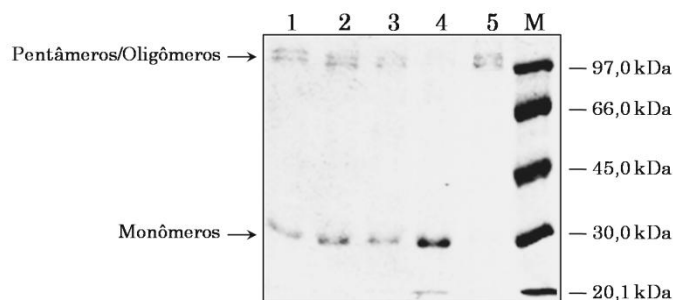
**Figura 20.** Expressão e purificação de rCTB-Sm14. **A.** SDS-PAGE de extratos protéicos de *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pAE-ctb-sm14. *M*: marcador de massa molecular; *1 e 3*: Bactérias não foram induzidas (sem IPTG); *2 e 4*: Bactérias com expressão heteróloga induzida pela adição de IPTG; a seta indica a proteína recombinante. **B.** SDS-PAGE a partir das frações solúveis e insolúveis indicando a expressão de rCTB-Sm14 sob a forma de corpúsculos de inclusão. *M*: marcador de massa molecular; *1 a 3*: fração solúvel; *4*: lavagem corpúsculos de inclusão com 2M uréia; *5*: corpúsculos de inclusão solubilizados em 8M uréia; a seta indica a proteína recombinante. **C.** SDS-PAGE de rCTB-Sm14 após purificação por IMAC onde é possível observar a formação de pentâmeros. *M*: marcador de massa molecular; *1*: rCTB-Sm14 em condições redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol adicionado ao tampão de amostra); *2*: rCTB-Sm14 em condições não redutoras (tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol) e sem aquecimento a 90°C por 5 minutos.

Foi possível também observar que apesar de a proteína ser capaz de formar pentâmeros/oligômeros, algumas proteínas ainda encontravam-se monoméricas. Tendo isso em vista, optamos por realizar a separação destas proteínas através de uma permeação em gel.



**Figura 21.** Filtração em gel realizada para separação de proteínas pentaméricas das monoméricas.

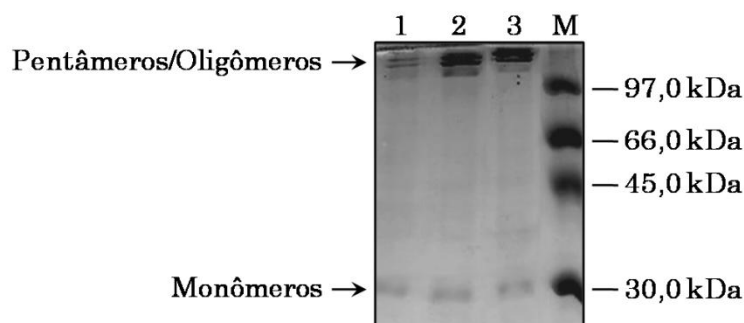
Três picos distintos, referentes às proteínas pentaméricas/oligoméricas, monoméricas e ao imidazol que estava presente na solução, puderam ser visualizados após a gel filtração (Figura 21). No entanto, ao analisarmos estas frações em *SDS-PAGE* em condições não redutoras, pudemos observar que mesmo após a filtração em gel, as alíquotas referentes às proteínas pentaméricas/oligoméricas apresentavam também proteínas monoméricas, indicando uma possível perda de estrutura quaternária. Curiosamente, observamos também que a fração 49, correspondente a proteína monomérica, apresentou em sua grande maioria proteínas pentaméricas, indicando que houve uma possível reestruturação destas proteínas (Figura 22).



**Figura 22.** – Análise em gel de poliacrilamida 12% concentrada em condições não redutoras de diferentes frações coletadas durante a filtração em gel. **1.** Fração 19; **2.** Fração 21; **3.** Fração 24; **4.** Fração 33; **5.** Fração 49; **M.** Marcador de massa molecular.

Sabendo que a ligação entre CTB e seu receptor celular se dá, em parte, através da interação de determinados resíduos de aminoácidos com uma molécula de galactose (Merritt, Sarfaty *et al.*, 1994) e baseados em trabalho realizado com a subunidade B da toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (Guidry, Cardenas *et al.*, 1997), optamos por realizar uma cromatografia por afinidade a este sacarídeo. Desta forma estaríamos verificando a viabilidade deste método cromatográfico para a purificação da fusão na sua forma pentamérica, ao mesmo tempo que eliminaríamos da solução proteínas monoméricas e/ou com baixa afinidade a galactose.

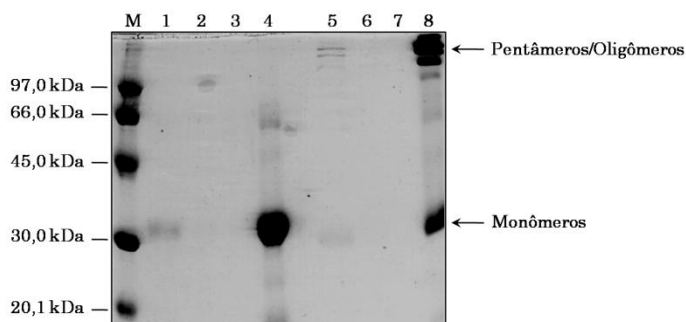
Verificamos que as frações correspondentes ao material não retido e lavagem, as quais teoricamente deveriam apresentar somente proteínas monoméricas, também apresentaram proteínas pentaméricas. Da mesma forma, as frações correspondentes às eluições, que em tese deveriam ser constituídas integralmente de estruturas pentaméricas, apresentaram monômeros. Estes resultados nos levaram a suspeitar da existência de uma relação de associação e dissociação constante entre monômeros e estruturas oligoméricas (Figura 23).



**Figura 23.** Análise em *SDS-PAGE* de cromatografia por afinidade a galactose realizada com a fusão CTB-Sm14. **1.** Material não retido; **2.** Fração referente a lavagem da coluna; **3.** Material recolhido após eluição com 0,3 M Galactose. **M.** Marcador de massa molecular.

Para comprovarmos esta hipótese, logo após purificação das proteínas por IMAC, realizamos uma ultra filtração em uma unidade Centriprep® (*Millipore, Inc.*) contendo uma membrana com limite de exclusão em 100 kDa e os resultados foram analisados em SDS-PAGE.

A análise deste último gel indica fortemente que a proteína rCTB-Sm14 apresenta um equilíbrio entre monômeros e pentâmeros, uma vez que a solução protéica não retida pela membrana, ao ser analisada em gel, apresentou proteínas pentaméricas (Figura 24).



**Figura 24.** SDS-PAGE a partir de amostras resultantes da ultra filtração de rCTB-Sm14 em Centriprep® com limite de exclusão em 100 kDa. **M.** Marcador de massa molecular; **1 a 4.**  $\beta$ -mercaptoetanol foi adicionado ao tampão e as amostras foram aquecidas. **5 a 8.** Amostras não foram aquecidas e  $\beta$ -mercaptoetanol não foi adicionado. **1 e 5.** Material não retido; **2 e 6.** Lavagem da membrana; **3 e 7.** Lavagem da membrana; **4 e 8.** Material retido.



A única maneira de haver proteínas pentaméricas/oligoméricas nesta solução seria a fusão monomérica (30kDa) voltar a formar pentâmeros. De forma similar, ao analisarmos o material que ficou retido na membrana, percebe-se a perda de estrutura do mesmo e, conseqüentemente, a presença de proteínas monoméricas.

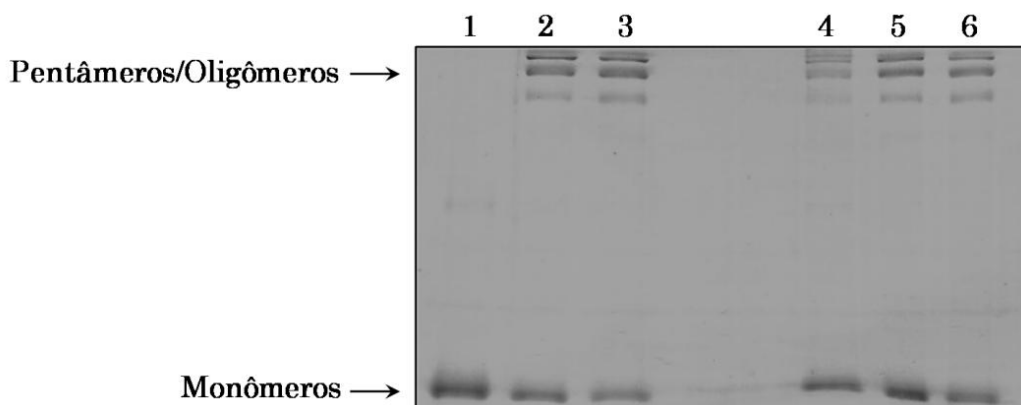
#### *4.4. A proteína rCTB-Sm14 apresenta maior estabilidade na presença de galactose.*

Apesar dos resultados mostrando que a proteína rCTB-Sm14 apresenta uma relação de associação e dissociação constante entre monômeros e estruturas oligoméricas, quando armazenada por longos períodos de tempo, esta proteína perde sua estrutura quaternária de forma definitiva e assim, uma vacina com esta formulação seria inviável.

Levando em consideração o fato de que a presença do ligante estabiliza a estrutura tridimensional de proteínas, quisemos verificar se a proteína rCTB-Sm14, quando na presença de galactose, apresenta uma maior estabilidade.

De fato, pôde-se observar que as proteínas armazenadas na presença de 100 mM galactose apresentaram maior estabilidade, particularmente aquelas armazenadas a +4°C. Na ausência de galactose, estas proteínas perderam totalmente a capacidade de formar estrutura pentamérica ao passo que aquelas proteínas armazenadas da mesma maneira, porém na presença do sacarídeo, ainda mantêm a capacidade de formar estruturas quaternárias (Figura 25).

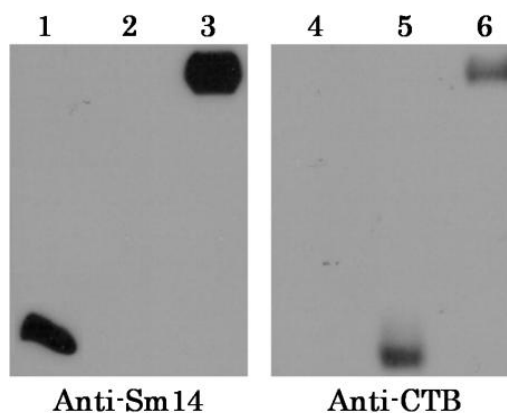
Este resultado nos levou a optar por armazenar as proteínas em tampão PBS 1X na presença de 100 mM galactose a – 20°C.



**Figura 25.** Análise em SDS-PAGE de estudo de incremento de estabilidade da proteína rCTB-Sm14 utilizando galactose. **1, 2 e 3.** Proteínas mantidas na ausência de galactose durante 5 meses a + 4°C, - 20°C ou sob a forma liofilizada, respectivamente. **4, 5 e 6.** Proteínas mantidas na presença de 100 mM galactose durante 5 meses a + 4°C, - 20°C ou sob a forma liofilizada, respectivamente.

*4.5. A proteína rCTB-Sm14 é reconhecida tanto por anticorpos anti-Sm14 como por anticorpos anti-CTB.*

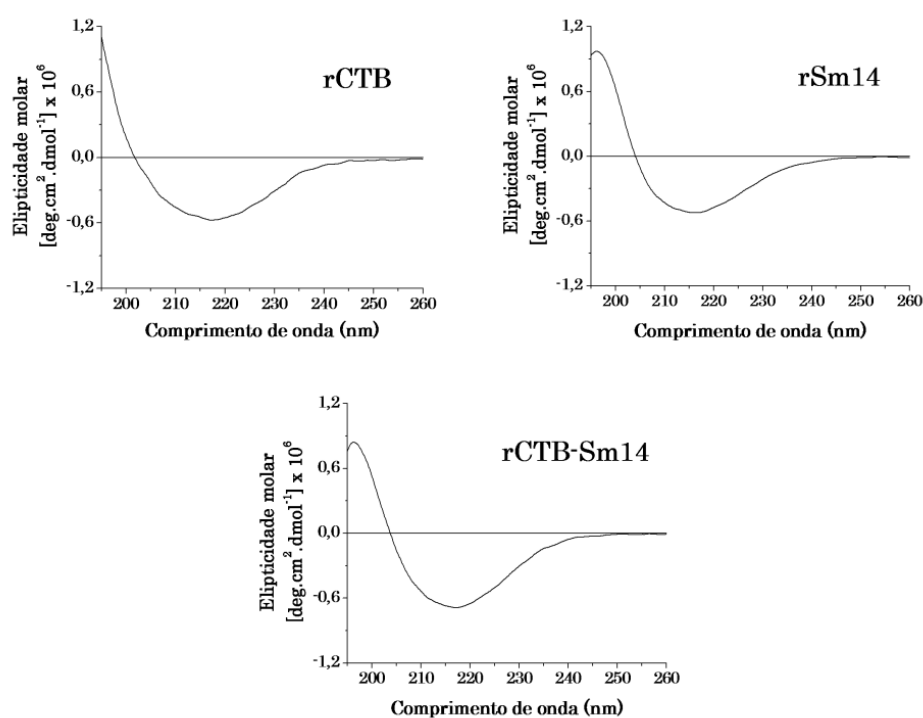
*Western-blot* realizado com as proteínas recombinantes demonstrou que a proteína rCTB-Sm14 é passível de reconhecimento tanto por anticorpos anti-Sm14 como por anticorpos anti-CTB, ao passo que rCTB e rSm14 foram identificadas apenas por seus respectivos anticorpos. Este dado confirma que a fusão genética entre CTB e Sm14 não afeta o reconhecimento individual dessas proteínas (Figura 26).



**Figura 26.** Western-blot indicando o reconhecimento da proteína rCTB-Sm14 por anticorpos anti-Sm14 e anti-CTB. **1 e 4.** rSm14; **2 e 5.** rCTB; **3 e 6.** rCTB-Sm14.

#### 4.6. Dicroísmo circular.

Através de ensaios de dicroísmo circular observou-se que todas as proteínas recombinantes apresentaram uma estrutura secundária regular, indicando que o processo de expressão, reestruturação e purificação das mesmas ocorreu de forma esperada (Figura 27).

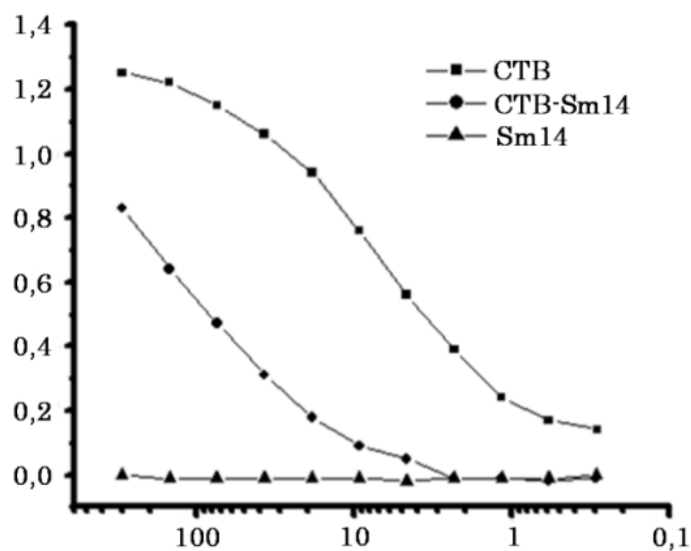


**Figura 27.** Dicroísmo circular realizado com as proteínas recombinantes.

#### 4.7. Tanto rCTB como rCTB-Sm14 são capazes de ligar-se ao receptor gangliosídeo GM1.

Através de um GM1-ELISA, observamos que tanto a proteína rCTB como rCTB-Sm14 ligaram-se ao GM1 de forma dose dependente, no entanto, fica evidente que a presença de cinco moléculas de Sm14 na estrutura final, acarretou na diminuição da afinidade ao GM1 uma vez que a fusão rCTB-Sm14 mostrou uma afinidade aproximadamente trinta vezes menor em comparação com rCTB (Figura 28).

Na verdade, a afinidade de CTB a GM1 quando em fusão com outras proteínas pode ser reduzida de forma significativa, a depender da proteína a ser fusionada (Liljeqvist, Stahl *et al.*, 1997; Bublin, Hoflehner *et al.*, 2007).



**Figura 28.** GM1-ELISA realizado com as proteínas recombinantes.

#### 4.8. *rSm14* e *rCTB-Sm14* ligam ácidos graxos.

Pôde-se observar que tanto a proteína Sm14 como a fusão rCTB-Sm14 foram capazes de ligar o análogo fluorescente de ácido graxo, ainda que a fusão tenha mostrado uma capacidade de ligação em torno de 20% menor quando comparada à proteína Sm14. Os resultados demonstraram também que a capacidade de ligação a ácidos graxos de Sm14 não diminui quando esta está em coadministração com CTB. Neste caso, apesar da capacidade de ligação ao DAUDA ser maior, este aumento se deve às moléculas de CTB presentes na solução, uma vez que CTB apresenta 20% da capacidade de ligação apresentada pela proteína Sm14 (Figura 29).

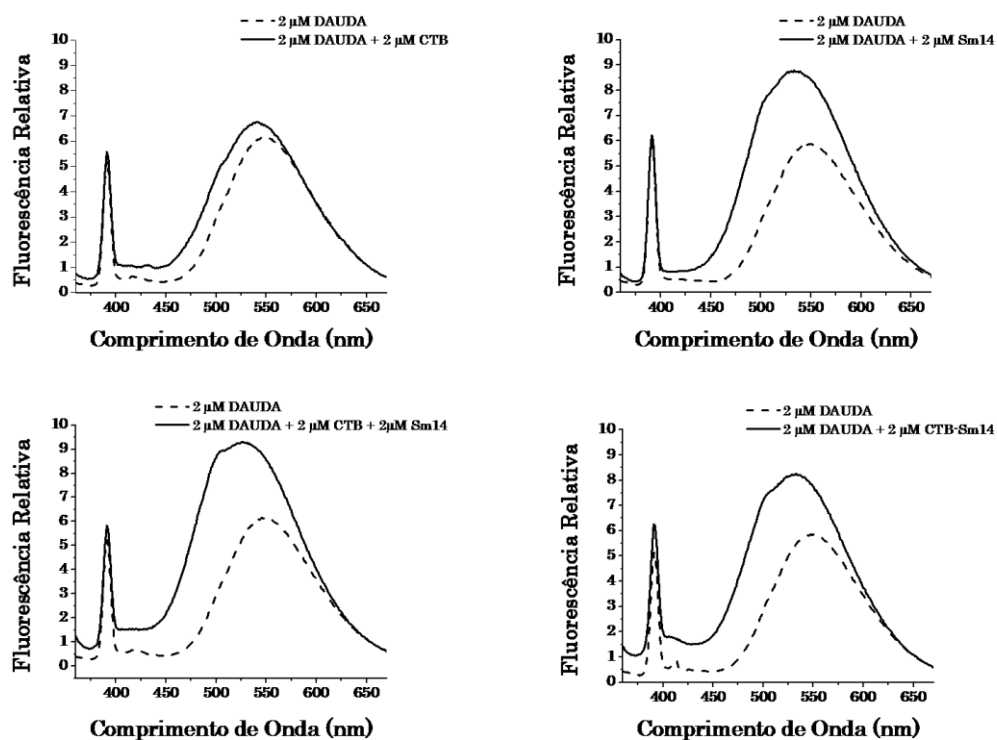


Figura 29 – Ensaio de ligação a ácido graxo envolvendo as proteínas CTB, Sm14 e CTB-Sm14.

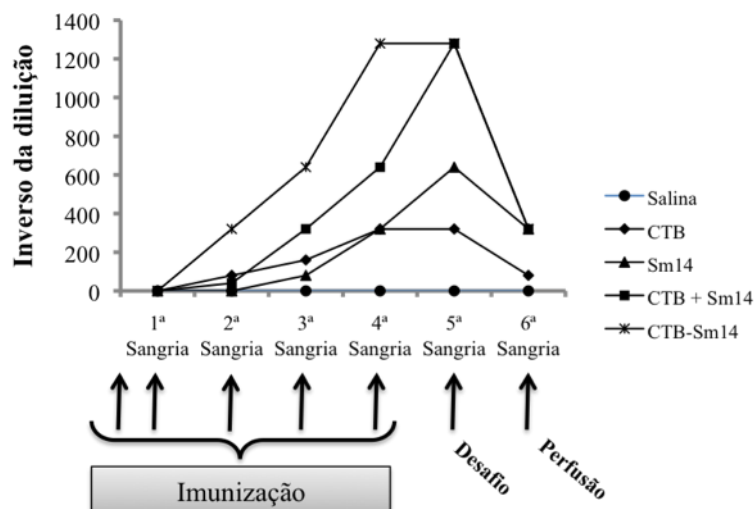
#### 4.9. Ensaio de imunização e desafio.

##### 4.9.1. Via subcutânea.

##### 4.9.1.1. Títulos de anticorpos.

Ao longo das doses administradas aos animais vacinados, nota-se um aumento nos títulos de anticorpos IgG anti-Sm14 presentes nos animais vacinados. Além disso, quando CTB é utilizado como adjuvante, os títulos são ainda maiores do que aqueles dosados nos animais vacinados com a proteína Sm14 apenas.

Contudo, é muito claro o declínio nas taxas de anticorpos após o desafio, chegando a valores até três vezes menor daqueles observados no momento da exposição a cercárias (Figura 30).



**Figura 30.** Níveis de anticorpos IgG anti-Sm14 em animais vacinados subcutaneamente.

#### 4.9.1.2. Atividade protetora da vacina.

Os últimos ensaios realizados pela via subcutânea indicaram que a proteína Sm14 reduziu em 27% a carga parasitária, porém este efeito não foi observado quando CTB é utilizado como adjuvante (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores obtidos durante a perfusão dos camundongos vacinados pela via subcutânea

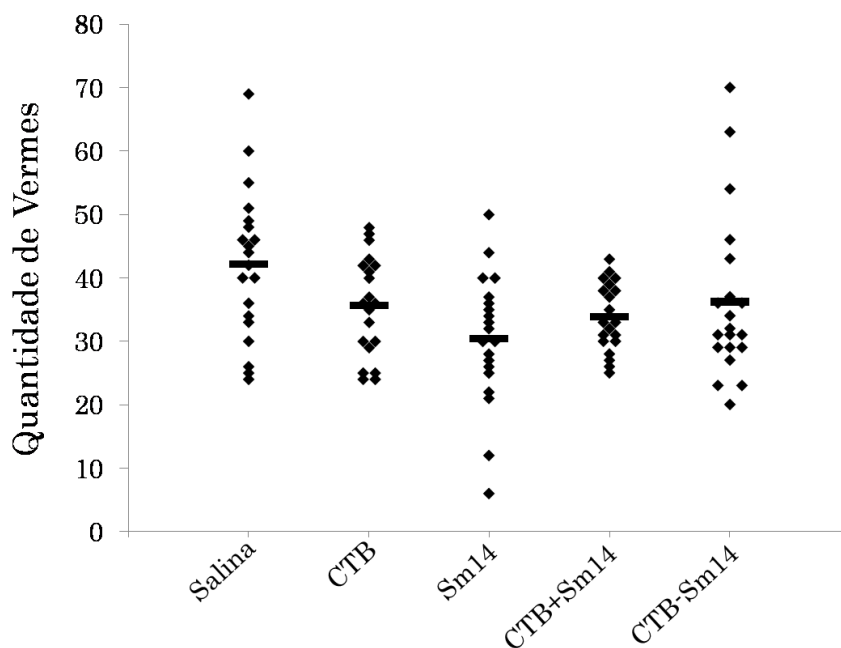
Grupo	Quantidade média de vermes $\pm$ Desvio Padrão	Proteção (%)	Valor de <i>P</i>
<b>Salina</b>	42,16 $\pm$ 12,10	—	—
<b>CTB</b>	35,65 $\pm$ 8,61	15,44 <sup>a</sup>	0,075
<b>Sm14</b>	30,42 $\pm$ 10,62	27,84 <sup>a</sup>	0,003
<b>CTB + Sm14</b>	33,88 $\pm$ 5,87	4,95 <sup>b</sup>	0,490
<b>CTB-Sm14</b>	36,22 $\pm$ 13,88	-1,61 <sup>b</sup>	0,885

\* Média de dois experimentos independentes

<sup>a</sup> Em comparação com grupo Salina

<sup>b</sup> Em comparação com grupo CTB

Na figura 31, estão ilustradas as quantidades individuais de vermes recuperados nos animais vacinados juntamente com as respectivas médias.



**Figura 31.** Gráfico de dispersão ilustrando a quantidade de vermes recuperados nos animais vacinados através da via subcutânea. **Barras:** Médias. **Losangos:** Animais individuais.

#### 4.9.1.3. Análise histológica dos tecidos hepáticos.

A análise histológica dos tecidos hepáticos de camundongos vacinados pela via subcutânea indicou uma redução de 25,19% na área dos granulomas ao redor dos ovos aprisionados no fígado dos animais imunizados com rSm14 em coadministração com rCTB. Já aqueles animais que receberam a fusão rCTB-Sm14 obtiveram uma redução em torno de 14% na área dessas reações granulomatosas (Tabela 9).

**Tabela 9.** Área das reações granulomatosas ao redor dos ovos aprisionados no tecido hepático de animais vacinados pela via subcutânea.

Grupo	Média ( $\times 10^4$ ) $\pm$ D.P. ( $\times 10^4$ ) $\mu\text{m}^2$ *	Redução (%)	Valor de <i>P</i>
<b>Salina</b>	8,61 $\pm$ 2,73	-	-
<b>CTB</b>	9,71 $\pm$ 3,70	-12,72 <sup>a</sup>	0,10379
<b>Sm14</b>	8,95 $\pm$ 2,83	-3,93 <sup>a</sup>	0,56915
<b>CTB + Sm14</b>	7,26 $\pm$ 2,27	25,23 <sup>b</sup>	0,00005
<b>CTB-Sm14</b>	8,30 $\pm$ 2,91	14,52 <sup>b</sup>	0,01971

\* Média de dois experimentos independentes.

<sup>a</sup> Em comparação com grupo Salina.

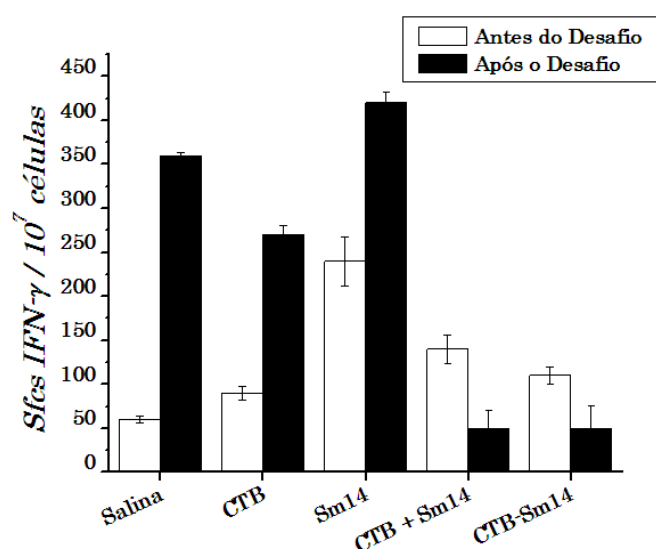
<sup>b</sup> Em comparação com grupo CTB.

D.P. = Desvio Padrão

#### 4.9.1.4. Citocinas secretadas por esplenócitos dos animais vacinados.

Ao realizarmos as dosagens de IFN- $\gamma$  secretados pelos esplenócitos dos animais imunizados, notamos que antes do desafio, os animais que receberam a proteína rSm14 foram os que apresentavam o maior número de células secretando esta citocina pró-inflamatória.

Por outro lado nota-se claramente que quando CTB está presente, os valores de IFN- $\gamma$  após o desafio estão reduzidos, indicando uma ação modulatória para uma resposta polarizada para Th2 (Figura 32).



**Figura 32.** Quantidade de esplenócitos secretando IFN- $\gamma$  após estímulo *in vitro* com rSm14.

#### 4.9.2. Via nasal.

##### 4.9.2.1. Títulos de anticorpos.

Três sangrias foram realizadas nos animais imunizados pela via nasal. A primeira foi realizada 7 dias após a última dose, a segunda no momento do desafio e a última sangria no momento da perfusão dos animais.

Com exceção daqueles observados nos animais que receberam a fusão CTB-Sm14, os títulos de IgG total anti-Sm14 observados em todos os grupos imunizados são muito baixos, mesmo no momento do desafio. Sendo que não



foram observados valores detectáveis de IgG em nenhum dos animais no momento da perfusão (Tabela 10).

Da mesma forma, ao analisarmos a quantidade de anticorpos IgA nos lavados vaginais destes camundongos, podemos notar que apenas aqueles animais que receberam a fusão CTB-Sm14 apresentaram um título detectável de anticorpos IgA (Tabela 10).

**Tabela 10.** Níveis de anticorpos IgG e IgA observados nos animais vacinados pela via nasal.

Grupo	IgG			IgA
	1ª sangria	2ª Sangria *	3ª Sangria †	Lavado Vaginal †
Salina	< 20	< 20	< 20	< 4
CTB	20	< 20	< 20	< 4
Sm14	< 20	< 20	< 20	< 4
CTB + Sm14	20	80	< 20	< 4
CTB-Sm14	640	1280	80	20

\* No momento do desafio.

† No momento da perfusão.

#### 4.9.2.2. Atividade protetora da vacina.

Pela via nasal, observamos que Sm14, quando administrada sem adjuvante, não é capaz de promover alguma proteção aos grupos vacinados, no entanto, os grupos vacinados na presença de CTB apresentaram uma redução em torno de 20% na quantidade de vermes recuperados (Tabela 11).

**Tabela 11.** Valores obtidos durante a perfusão dos camundongos vacinados pela via nasal

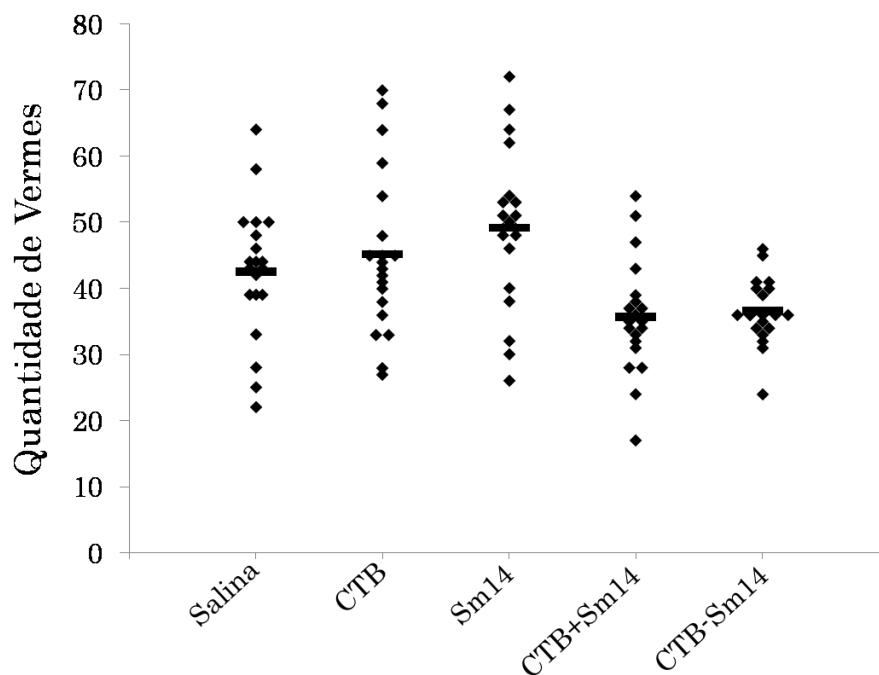
Grupo	Quantidade média de vermes $\pm$ Desvio Padrão *	Proteção (%)	Valor de <i>P</i>
Salina	42,53 $\pm$ 11,86	–	–
CTB	45,69 $\pm$ 13,77	–7,42 <sup>a</sup>	0,501
SM14	49,18 $\pm$ 13,00	–7,64 <sup>a</sup>	0,460
CTB + Sm14	35,65 $\pm$ 9,43	21,98 <sup>b</sup>	0,020
CTB-Sm14	36,87 $\pm$ 5,73	19,31 <sup>b</sup>	0,029

\* Média de dois experimentos independentes.

<sup>a</sup> Em comparação com grupo Salina.

<sup>b</sup> Em comparação com grupo CTB.

Na figura 33 estão ilustradas as quantidades individuais de vermes recuperados nos animais vacinados pela via nasal juntamente com as respectivas médias.



**Figura 33.** Gráfico de dispersão ilustrando a quantidade de vermes recuperados nos animais vacinados através da via nasal. **Barras:** Médias. **Losangos:** Animais individuais.

#### 4.9.2.3. Análise histológica dos tecidos hepáticos.

De forma similar aos animais vacinados pela via subcutânea, observamos que os grupos que receberam tanto a proteína rSm14 em coadministração com rCTB como a proteína rCTB-Sm14 apresentaram reduções em torno de 15 % nas áreas granulomatosas ao redor dos ovos no fígado desses animais (Tabela 11).

**Tabela 12.** Área das reações granulomatosas ao redor dos ovos aprisionados no tecido hepático de animais vacinados pela via nasal.

Grupo	Média ( $\times 10^4$ ) $\pm$ D.P. ( $\times 10^4$ ) $\mu\text{m}^2$ *	Redução (%)	Valor de <i>P</i>
Salina	10.32 $\pm$ 4.12	-	-
CTB	8.89 $\pm$ 3.84	13,82 <sup>a</sup>	0,0826
Sm14	9.99 $\pm$ 3.82	3,23 <sup>a</sup>	0,7188
CTB + Sm14	7.44 $\pm$ 2.71	16.35 <sup>b</sup>	0,0107
CTB-Sm14	7.60 $\pm$ 2.79	14.51 <sup>b</sup>	0,0419

\* Média de dois experimentos independentes.

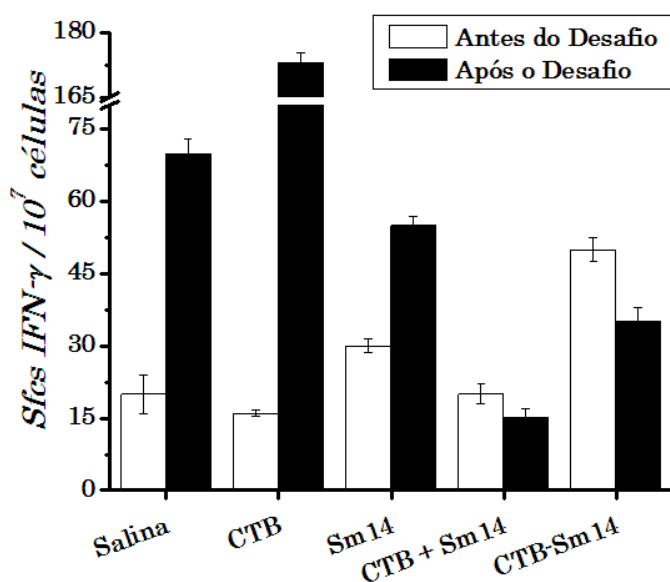
<sup>a</sup> Em comparação com o grupo Salina.

<sup>b</sup> Em comparação com o grupo CTB.

D.P. = Desvio Padrão.

#### 4.9.2.4. Citocinas secretadas por esplenócitos dos animais vacinados.

Observou-se que antes do desafio, a quantidade de esplenócitos secretando IFN- $\gamma$  é consideravelmente maior naqueles animais que receberam a fusão rCTB-Sm14, no entanto, de forma análoga aos resultados obtidos pela via subcutânea, após o desafio, a quantidade de células secretando IFN- $\gamma$  é menor quando CTB é utilizado como adjuvante de Sm14 (Figura 34).



**Figura 34.** Quantidade de esplenócitos secretando IFN- $\gamma$  após estímulo *in vitro* com rSm14.

A busca por uma vacina contra esquistossomose nas últimas décadas se tornou um desafio a ser alcançado por diferentes grupos de pesquisa em diferentes partes do globo. E o resultado obtido com o ensaio de vacinação utilizando modelo de cercárias irradiadas, onde níveis de redução na carga parasitária de mais de 90% são atingidos, vem demonstrando ser, a cada nova tentativa, mais difícil de ser reproduzido utilizando-se antígenos individuais, ou até mesmo em formulações contendo diferentes espécies de adjuvante. Nas condições experimentais usadas neste trabalho, Sm14 não foi capaz de eliciar uma proteção acima de 30% e a utilização de CTB só demonstrou alguma eficácia quando a vacina foi administrada pela via nasal, indicando ser mesmo um adjuvante com ação em mucosas.

### *5.1. Imunização subcutânea*

Os dados de imunização subcutânea mostraram uma redução em torno de 27% nos animais imunizados com rSm14, o que corrobora os dados publicados por Fonseca CT *et al.* (Fonseca, Brito *et al.*, 2004), onde registrou-se uma proteção de 25%. Por outro lado, no momento que CTB foi utilizado, tanto em coadministração como em fusão com Sm14, não pudemos observar um incremento na redução da carga parasitária, pelo contrário; os animais que receberam CTB não apresentaram redução na quantidade de vermes (Tabela 8), o que difere de estudo realizado em nosso laboratório, onde o uso sistêmico de CTB em fusão com a proteína PspA de pneumococo acarretou em proteção contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* (Areas, Oliveira *et al.*, 2005). Estes dados mostraram

que o uso de CTB como adjuvante depende do antígeno e do modelo de infecção em questão.

Com relação aos títulos de anticorpos IgG anti-Sm14, observou-se que o uso de CTB promove um aumento considerável nos níveis destas imunoglobulinas. Contudo, este aumento parece não correlacionar-se com os níveis de proteção obtidos, uma vez que, conforme já descrito, os animais que apresentaram redução na quantidade de vermes foram aqueles que receberam a proteína rSm14 na ausência de CTB. Outro detalhe não menos importante é o fato de que, no momento da perfusão, os títulos de anticorpos apresentavam-se muito abaixo daqueles quando do momento do desafio (Figura 24). De alguma forma, parece que a presença do verme influenciou de modo negativo os níveis de anticorpos.

Em contrapartida, diferentemente dos resultados de proteção, pôde-se observar um declínio em torno de 15% e 25% nas reações granulomatosas ao redor dos ovos aprisionados no tecido hepático dos animais imunizados com rCTB-Sm14 e rSm14 em co-administração com rCTB, respectivamente (Tabela 9). Dados que corroboram, em parte, aqueles observados anteriormente com Sm29GST e CTB (Sun, Mielcarek *et al.*, 1999; Lebens, Sun *et al.*, 2003).

De certa maneira, os níveis de IFN- $\gamma$  secretados pelos esplenócitos dos animais imunizados, após estímulo *in vitro* com rSm14, podem justificar esta redução no processo inflamatório dos tecidos hepáticos. Nota-se que após o desafio, os animais que receberam CTB como adjuvante apresentaram um declínio significativo nos níveis desta citocina, além disso, mesmo antes do desafio, os níveis de IFN- $\gamma$  são os mais baixos em comparação com os outros grupos (Figura 26). Estes resultados podem, ainda, estar correlacionados com o

fato de CTB já ter sido descrito como um indutor de tolerância imunológica (Holmgren, Adamsson *et al.*, 2005; Bublin, Hoflehner *et al.*, 2007; Takagi, Hiroi *et al.*, 2008).

Outro ponto importante a ser destacado diz respeito aos níveis de IFN- $\gamma$  presentes naqueles animais vacinados com rSm14. Os elevados níveis desta citocina, tanto antes como após o desafio, e a não detecção de IL-5, indicam uma resposta imunológica do tipo Th1. Tendo isto em vista e levando-se em consideração os dados apresentados por Fonseca CT *et al.* (Fonseca, Brito *et al.*, 2004; Fonseca, Pacifico *et al.*, 2006), os quais indicam este tipo de resposta como sendo protetora em modelos murinos, são plausíveis e condizentes os valores de proteção em torno de 25% naquele grupo (Figura 26).

### 5.2. Imunização nasal.

Uma das características do ciclo do *Schistosoma mansoni* é a presença de uma fase de maturação no interior do hospedeiro vertebrado que se dá nos pulmões. Além disso, em modelo de vacinação com cercárias irradiadas, o principal local de morte dos parasitas em desenvolvimento ocorre justamente neste tecido (Mclaren, 1989; Wilson e Coulson, 1989). Desta maneira, devido à já bem estabelecida ação adjuvante de CTB em mucosas, foi levantada a possibilidade de realizar um ensaio de vacinação através de imunização nasal, que poderia induzir uma resposta imune de mucosas, principalmente da mucosa pulmonar. Com isto, seria possível combater a infecção do verme em um sítio ainda não explorado, em uma fase específica e importante do verme.

Camundongos que receberam a proteína Sm14 não registraram proteção contra desafio com cercárias de *Schistosoma mansoni*. No entanto CTB, como era de se esperar, demonstrou ser um efetivo adjuvante de mucosas, uma vez que quando presente na formulação, seja em coadministração ou em fusão com Sm14, induziu uma resposta protetora ao redor de 20% (Tabela 11). Infelizmente estes dados ainda estão muito aquém dos desejáveis para uma vacina antiesquistossomose e mostram uma resposta diferenciada nos animais, a depender da via de imunização, nasal ou subcutânea.

De forma similar à via subcutânea, anticorpos IgG anti-Sm14 puderam somente ser detectados naqueles animais que receberam CTB como adjuvante. Porém, nesta via, estes níveis parecem correlacionar-se com os resultados de proteção obtidos, uma vez que níveis detectáveis destas imunoglobulinas foram observados somente nos grupos CTB+Sm14 e CTB-Sm14. Já com relação aos títulos de anticorpos IgA anti-Sm14, somente o grupo que recebeu a fusão genética CTB-Sm14 apresentou níveis detectáveis (Tabela 10).

Pela via nasal, uma redução na resposta inflamatória no tecido hepático também pôde ser observada, no entanto, esta redução foi mais discreta em comparação com aquela obtida pela via subcutânea, com valores de redução em torno de 15% na área dos granulomas hepáticos (Tabela 12).

No que tange aos níveis de IFN- $\gamma$ , aqui novamente parecem estar correlacionados com o processo antiinflamatório no fígado, ou seja, os animais que apresentaram alguma redução na área dos granulomas foram os mesmo que apresentaram, após o desafio, menores níveis desta citocina (Figura 27).

### 5.3. Outras considerações.

#### 5.3.1. Th1, Th2 ou Th0?

Nos últimos anos, diversos estudos tentando estabelecer qual seria a melhor resposta imunológica a ser obtida por uma vacina antiesquistossomose foram realizados e apesar de teorias como a do *Happy-valley* (Wilson e Coulson, 1999) onde tanto o pólo Th1 como o Th2 são eficazes em reduzir a carga parasitária, uma resposta Th1 para antígenos recombinantes vem demonstrando ser aquela cujos níveis de proteção são maiores (Fonseca, Brito *et al.*, 2004; Pacheco, Zucconi *et al.*, 2005; Fonseca, Pacifico *et al.*, 2006).

Uma questão importante a ser destacada, no entanto, é a estreita relação entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro. As relações fisiológicas existentes entre helmintos e hospedeiros são complexas e ainda não são perfeitamente entendidas. Os vermes adultos completam o ciclo biológico em diversos hospedeiros: humanos, babuínos, hamster, camundongos, ratos e coelhos, com os quais são estabelecidas interações que provocam diferenças nas características morfológicas, fisiológicas e comportamentais do helminto (Silva, Neves *et al.*, 2008).

O desenvolvimento do parasita em um hospedeiro não permissivo, por exemplo, resulta em vermes atrofiados com retardo e desenvolvimento incompleto do tegumento. O intrigante é o fato de que ao se transplantar parasitas adultos, obtidos a partir de hospedeiros não permissivos, em hamster, estes parasitas retomam o crescimento e desenvolvimento normal do tegumento. Por outro lado, se retornarmos estes parasitas a um hospedeiro não permissivo, os mesmos voltam a se atrofiar (Cioli, Knopf *et al.*, 1977; Senft, Gibler *et al.*, 1978).



A convivência do parasita com o sistema imunológico do hospedeiro, desde longa data, desenvolveu uma relação de dependência do helminto para com as características do hospedeiro. Interleucina 7, por exemplo, demonstrou estar intimamente relacionada não apenas com o desenvolvimento o parasita, mas também como um fator determinante para a intensidade da patologia (Wolowczuk, Delacre *et al.*, 1997; Wolowczuk, Nutten *et al.*, 1999; Wolowczuk, Roye *et al.*, 1999). Além disso, a presença de receptores para TGF- $\beta$  no tegumento do parasita (Beall, Mcgonigle *et al.*, 2000; Beall e Pearce, 2001; Verjovski-Almeida, Demarco *et al.*, 2003) ilustra outro mecanismo de íntima relação parasita-hospedeiro, o qual aparenta estar relacionado com o desenvolvimento embrionário do verme (Freitas, Jung *et al.*, 2007).

Estes dados nos levam a crer que independente do tipo de resposta a ser explorada, o parasita estará respondendo conforme suas necessidades aos diferentes estímulos. Identificar quais estímulos (citocinas, quimiocinas) podem levar a um prejuízo do parasita seria um passo importante na busca por uma vacina eficaz.

### 5.3.2. Genoma, transcriptoma e proteoma.

O advento dos projetos genoma e transcriptoma do *Schistosoma mansoni* (Verjovski-Almeida, Demarco *et al.*, 2003; Taft, Vermeire *et al.*, 2009) e de diferentes estudos de proteômica realizados, em diferentes fases do ciclo e em diferentes porções do parasita (Knudsen, Medzihradzky *et al.*, 2005; Braschi, Curwen *et al.*, 2006; Cass, Johnson *et al.*, 2007; Delcroix, Medzihradsky *et al.*, 2007; Hansell, Braschi *et al.*, 2008), nos levou à obtenção de um grande número

de dados sobre os genes e proteínas presentes no parasita. É possível que para uma proteção mais efetiva, seja necessária a utilização de combinação de antígenos. Dessa maneira, o uso da informação genômica pode representar uma forma importante para a identificação de novos antígenos vacinais.

Levando-se em consideração que o parasita consegue sobreviver por mais de trinta anos nos vasos sanguíneos do hospedeiro definitivo, mesmo este último produzindo diferentes anticorpos contra diferentes proteínas do verme, foi sugerido que uma forma racional de se buscar um antígeno eficaz seria localizando proteínas, preferencialmente expostas no tegumento e, principalmente, que não sejam identificadas por anticorpos presentes em soro de pacientes com esquistossomose (Wilson e Coulson, 2006).

Na verdade, a utilização de proteínas de tegumento como antígenos vacinais já vinha sendo pesquisada há alguns anos (Ali, Jeffs *et al.*, 1991; Lee, Shalaby *et al.*, 1995; Abath, Xavier *et al.*, 2000; Rao e Ramaswamy, 2000). No entanto, três proteínas recentemente identificadas e testadas em ensaios de imunização envolvendo camundongos mostraram capacidade protetora. Uma delas, Sm29, identificada por análise bioinformática (Cardoso, Pinho *et al.*, 2006), reduziu em 51% a carga parasitária nos animais imunizados (Cardoso, Macedo *et al.*, 2008). As outras duas proteínas, pertencentes à família das tetraspaninas, denominadas TSP-1 e TSP-2, reduziram em até 64% a carga parasitária (Tran, Pearson *et al.*, 2006).

### 5.3.3. Qual o modelo a ser seguido?

A questão principal que devemos ter em mente, é com relação ao modelo animal, através do qual, os ensaios devam ser realizados. É bem verdade que não há muitas opções disponíveis. Se optarmos pelo modelo em babuínos, a ovoposição é ligeiramente inibida e, quando há ovos, os mesmos são rapidamente destruídos tornando inviável a análise dos danos hepáticos (Cheever e Duvall, 1974). Por outro lado, a utilização de chimpanzés torna-se uma boa opção, por ser o primata mais próximo ao ser humano, pela fecundidade dos vermes ser mantida e os danos hepáticos e as lesões obstrutivas do sistema porta serem cumulativas (Sadun e Gore, 1970). No entanto, e obviamente, esta seria uma boa opção em teoria, uma vez que a manutenção destes animais e seu uso em pesquisas é bastante controversa.

Resta-nos os camundongos, animais de fácil manutenção em biotérios e com diferentes linhagens disponíveis. E, de fato, a vasta maioria dos ensaios de imunização e desafio são realizados com estes animais. Algumas considerações, porém, devem ser destacadas, conforme revisão de Cheever, A.W. *et al.* (Cheever, Lenzi *et al.*, 2002):

*“... A. A intensidade das infecções esquistossomóticas experimentais é, geralmente, extremamente alta. Um simples casal de vermes de Schistosoma mansoni seria equivalente a mais de 1000 pares em uma pessoa infectada (Cheever, 1969; Gryseels e De Vlas, 1996);*

*B. A maioria das infecções em humanos são adquiridas gradualmente durante os anos, ao passo que a maioria das infecções experimentais são realizadas como uma única exposição;*

*C. A maioria dos humanos com esquistossomose são filhos de mulheres que estão contaminadas ou já estiveram contaminadas com o parasita. Há amplas razões para se pensar que esta exposição intra uterina possa, de alguma maneira, modificar a resposta a subseqüentes infecções em seres humanos;*

*D. A cronicidade da doença em humanos é, obviamente, não reprodutível na maioria dos modelos animais. Apesar de alguns acreditarem que uma semana ou duas na vida de um camundongo seria o equivalente a um ano na vida de um homem, o cálculo exato é difícil de ser determinado...”*

Dessa maneira, os resultados obtidos em modelo de camundongos devem ser considerados com precaução.

#### *5.3.4. Considerações finais.*

O objetivo principal deste trabalho foi determinar a viabilidade de uma vacina contra o *Schistosoma mansoni* utilizando a proteína Sm14 em fusão genética com CTB ou em coadministração com esta última. Os resultados obtidos demonstraram que apesar dos valores de proteção obtidos estarem muito aquém daqueles desejados para uma vacina contra este parasita, CTB demonstrou possuir atividade adjuvante, com principal destaque para utilização em mucosas. O presente estudo demonstrou também que a fusão genética entre ambas as proteínas teve uma influência significativa na função individual destas. Sm14 manteve sua capacidade de ligação a ácidos graxos ligeiramente menor e CTB manteve sua capacidade de interação com o receptor gangliosídeo celular GM1 cerca de trinta vezes menor. Uma solução para este problema possa ser, talvez, a inclusão de alguns resíduos de prolina e glicina entre as sequências das

proteínas, podendo resultar em uma proteína de fusão melhor estruturada, apresentando apenas a forma pentamérica além de que poderia resultar em uma interferência menor da proteína Sm14 na capacidade de ligação ao receptor celular GM1.

Ainda que os problemas estruturais possam ter influenciado na resposta protetora observada na fusão CTB-Sm14, a co-administração de Sm14 e CTB também não resultou em uma capacidade protetora muito maior, mostrando de qualquer forma, que CTB em fusão ou em co-administração, apesar de sua ação adjuvante, não foi efetivo para aumentar a capacidade protetora do antígeno Sm14 nos níveis desejados.

A verdade é que Sm14 não produziu, mesmo em ensaios de vacinação subcutâneos e com hidróxido de alumínio (dados não mostrados) os níveis de proteção esperados para este antígeno (os mesmos girando em torno de 25% apenas). Recentemente, com o projeto genoma de *Schistosoma mansoni* em curso, a identificação de uma outra provável proteína ligadora de ácidos graxos no parasita (FABP, código de acesso no banco de dados\* CAZ32238) pode indicar que mesmo com o direcionamento do sistema imunológico contra Sm14, o verme ainda assim poderia estar apto a utilizar os ácidos graxos do hospedeiro utilizando a FABP recentemente identificada pelo sequenciamento do seu genoma. Portanto, uma resposta imune contra Sm14 não seria suficiente para eliminar a sua capacidade de captação de ácidos graxos por FABPs.

Por fim, o fato de o modelo com cercárias irradiadas produzir altas reduções nas cargas parasitárias em camundongos nos leva a crer na

---

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

possibilidade de desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a esquistossomose. Estudos já foram realizados focando no tipo de resposta imunológica que este ensaio de imunização provoca e algumas hipóteses já foram propostas (Hoffmann, James *et al.*, 1999; Wynn e Hoffmann, 2000). Falta-nos, porém, a ponte que nos levará deste modelo para um modelo com antígenos recombinantes.

De forma geral, qualquer que seja o estudo envolvendo ensaios de imunização e desafio a ser realizado em seguida, devemos examinar os resultados tentando compreender o por quê do seu sucesso ou de seu fracasso, analisando as diferentes citocinas secretadas, os genes expressos em resposta aos estímulos e, conseqüentemente, as respostas do parasita aos mesmos.

## 6. CONCLUSÕES

---

Este trabalho possui como principais conclusões:

- 1) A proteína Sm14 Cys62Val é mais estável quando em comparação com a forma selvagem.
- 2) A fusão genética entre CTB e Sm14 mantém parcialmente as características bioquímicas de ambas as proteínas;
- 3) O desafio através da penetração cutânea reduz consideravelmente os valores de proteção ora eliciados por Sm14;
- 4) Quando administrado pela via nasal, CTB é capaz de induzir uma resposta protetora modesta;
- 5) CTB apresenta efeito antiinflamatório reduzindo a área dos granulomas ao redor dos ovos e reduzindo os níveis de IFN- $\gamma$  após o desafio.

## 7. ATIVIDADES EXTRAS

---

### 7.1. Síntese de um gene codante para a proteína Sm14 com códons otimizados para expressão em leveduras.

A utilização de *Escherichia coli* para a produção de proteínas recombinantes tem sido bastante útil em processos biotecnológicos. No entanto, é importante salientar tratar-se de um organismo rico em lipopolissacarídeos (LPS), substância capaz de ativar a resposta imunológica inata do hospedeiro e, dependendo de sua quantidade, ocasionar choque séptico e morte do indivíduo (Kirschning, Wesche *et al.*, 1998; Yang, Mark *et al.*, 1998; Chow, Young *et al.*, 1999)

Por outro lado, há a possibilidade da produção destas proteínas recombinantes em organismos que não apresentem tais empecilhos, como é o caso das leveduras. De fato, a vacina recombinante utilizada atualmente contra o vírus da hepatite B (HBV) é baseada na expressão, em *Hansenula polymorpha*, do antígeno de superfície HBsAg.

Com a idéia de expressarmos a proteína Sm14 em leveduras, optamos por sintetizar um gene utilizando os códons preferencialmente utilizados pelos organismos *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris*, realizando um processo de montagem seguido de amplificação por PCR baseado em técnica descrita por Withers-Martinez, C., *et al* (Withers-Martinez, Carpenter *et al.*, 1999). Além disso, decidimos sintetizar em fusão com este gene, a sequência de secreção em leveduras (fator  $\alpha$ ) presente no vetor pPICZ $\alpha$ <sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>). Desta forma, podemos obter a expressão desta proteína sob a forma secretada.

A síntese foi iniciada com uma reação de montagem composta por um conjunto de oligonucleotídeos (Tabela 13), dNTPs e *Pfu* DNA polimerase em



condições similares às aquelas descritas na tabela 1. A reação foi realizada em um termociclador configurado conforme figura 35.

**Tabela 13.** Oligonucleotídeos utilizados para síntese de gene Sm14.

Oligo		Seqüência
Sm14s 01	FW	5' - AAG CTT ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA - 3'
Sm14s 02	FW	5' - AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC - 3'
Sm14s 03	FW	5' - GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG - 3'
Sm14s 04	FW	5' - GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA GAG - 3'
Sm14s 05	FW	5' - TTC TTG GGT AAG TGG AAG TTG TCT GAG TCT CAC AAC TTC GAC GCC GTT - 3'
Sm14s 06	FW	5' - GCC ACC AGA CAG ATT GGT AAC ACC GTT ACC CCA ACC GTT ACC TTC ACC - 3'
Sm14s 07	FW	5' - TTG ACC GAG TCT ACC TTC AAG AAC TTG TCT GTT ACC TTC AAG TTC GGT - 3'
Sm14s 08	FW	5' - GAC GGT AGA AAC GTT AAG TCT GTT GTT GAG AAG AAC TCT GAG TCT AAG - 3'
Sm14s 09	FW	5' - AAG AAC ACC ACC GTT ATT GTT AGA GAG GTT GAC GGT GAC ACC ATG AAG - 3'
Sm14s 10	FW	5' - ACC GCC ATT AGA AAC TAC AAG AGA TTG TCT TAA ATC GAT GGT ACC CTG - 3'
Sm14s 01	RV	5' - TGT TGT AGT GTT GAC TGG AGC AGC TAA TGC GGA GGA TGC TGC GAA TAA - 3'
Sm14s 02	RV	5' - AAC ATC GAA ATC CCC TTC TAA ATC TGA GTA ACC GAT GAC AGC TTC AGC - 3'
Sm14s 03	RV	5' - AGC AAT GCT GGC AAT AGT AGT ATT TAT AAA CAA TAA CCC GTT ATT TGT - 3'
Sm14s 04	RV	5' - CTT ACC CAA GAA AGA AGA CAT GAA TTC AGC TTC AGC CTC TCT TTT CTC - 3'
Sm14s 05	RV	5' - CTG TCT GGT GGC CCA AGA AAC ACC CAA CTT AGA CAT AAC GGC GTC GAA - 3'
Sm14s 06	RV	5' - AGA CTC GGT CAA CAT GGT CAT CTT GTC ACC GTC CAT GGT GAA GGT AAC - 3'
Sm14s 07	RV	5' - GTT TCT ACC GTC AGA GGT CTT CTC GTC GAA CTC CTC ACC GAA CTT GAA - 3'
Sm14s 08	RV	5' - GGT GGT GTT CTT TGG GTC AAC CTG GGT CTG GGT CAA CTT AGA CTC AGA - 3'
Sm14s 09	RV	5' - TCT AAT GGC GGT AAC GTC ACC AAC GGT AAC GGT GGT CTT CAT GGT GTC - 3'
Sm14s 10	RV	5' - GTC GAC CGA TCG GCT AGC CTG CAG GGT ACC ATC GAT - 3'

Em seguida realizou-se uma PCR para amplificação dos fragmentos recém montados. A amplificação se deu utilizando-se os oligonucleotídeos mais externos das reações de montagem seguindo um protocolo padrão de PCR (*vide* Tabela 1 e Figura 5). A síntese ocorreu em etapas e as reações estão esquematizadas e ilustradas nas Figuras 36 e 37, respectivamente. Na Figura 38 podemos observar, em um gel de agarose, as etapas da síntese.

5 minutos	95°C	} 30 ciclos
30 segundos	95°C	
2 minutos	30°C	
30 segundos	72°C	
2 minutos	72°C	
∞	4°C	

**Figura 35.** Reação de montagem dos fragmentos do gene sintético.

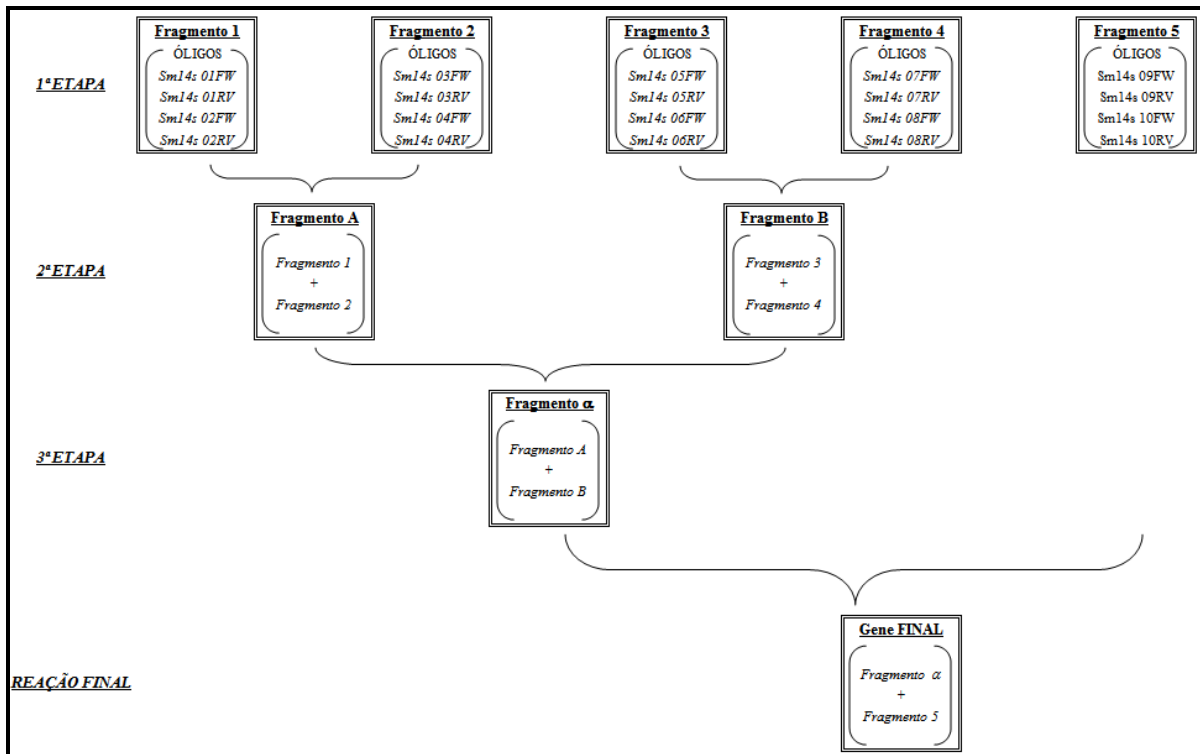


Figura 36. Esquema de síntese do gene Sm14s

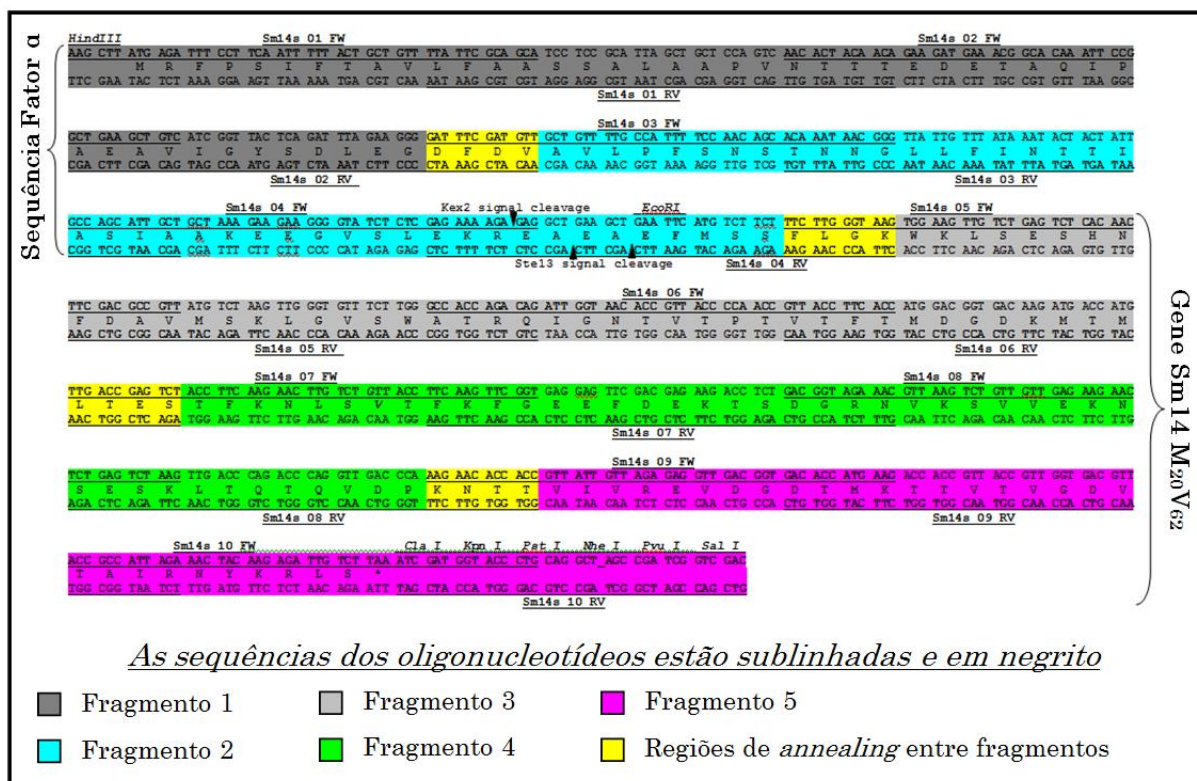
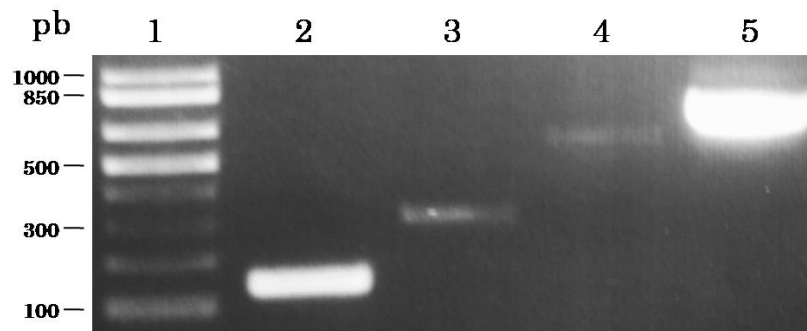


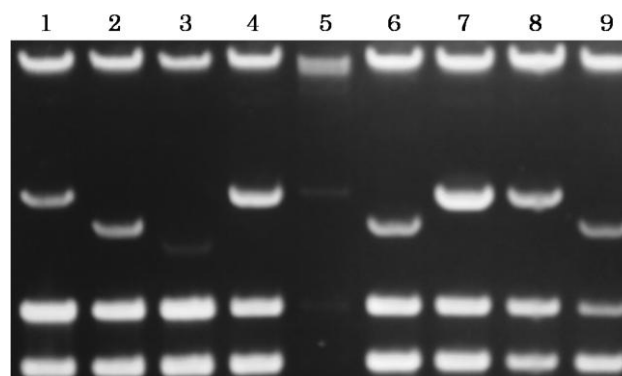
Figura 37. Sequência do gene sm14 juntamente com a sequência de secreção em leveduras com códon otimizado para expressão em *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris*.



**Figura 38.** Eletroforese em gel de agarose 1% onde podemos observar a síntese progressiva do gene sm14. **1.** Marcador de pares de base. **2.** 1ª Etapa. **3.** 2ª Etapa. **4.** 3ª Etapa. **5.** Reação Final.

Ao término da síntese, o gene sintético foi clonado no vetor pGEM-T easy® (Promega Corporation), o qual foi inserido, por transformação química, em *E. coli* DH5α. As bactérias transformadas foram estriadas em meio 2YT sólido contendo antibiótico ampicilina e cultivadas a 37°C por 12 horas.

Oito clones foram selecionados e incubados por aproximadamente 6 horas a 37°C, em 5mL de meio 2YT líquido, suplementado com ampicilina e aqueles contendo o vetor pGEM-T Easy® com o gene sm14s foram identificados através de extração de DNA por fenol-clorofórmio, conforme descrito em *Materiais e métodos, Sessão 3.14, pág. 46* (Figura 39).



**Figura 39.** Fenol-clorofórmio para confirmação de ligação de sm14s em pGEM-T Easy®. **1 a 8.** pGEM-T Easy-sm14s. **9.** Controle: pGEM-T Easy.

Os clones 1, 4, 7 e 8 foram então submetidos a mini preparações de DNA plasmidial (*Materiais e métodos, sessão 3.13, pág. 46*), através das quais foram realizadas reações de sequenciamento com o intuito de verificarmos a presença ou não de mutações.

Após verificarmos e selecionarmos um gene sm14 sintético com a sequência correta, optamos por cloná-lo no vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPICHOLI (*MoBiTec®*) (Figura 40), o qual se mantém sob a forma epissomal e possui um promotor AOX, com indução de expressão por metanol, tornando-o um sistema rápido e eficiente para observarmos a viabilidade do gene sintético.

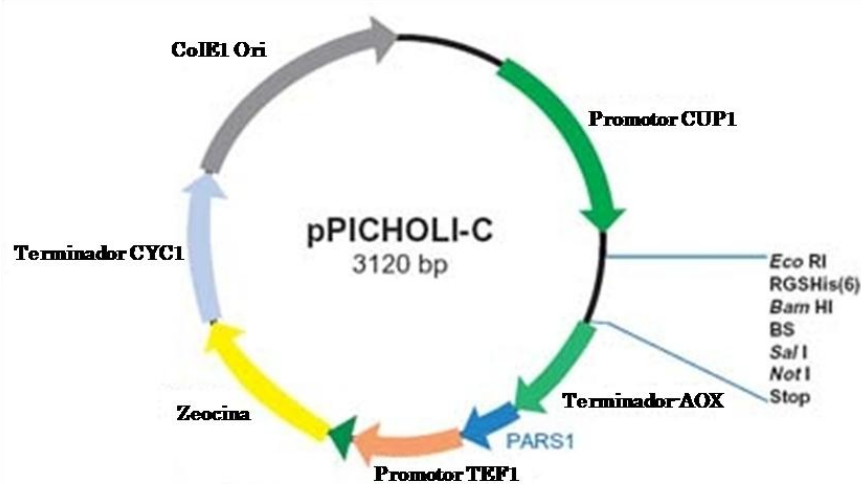


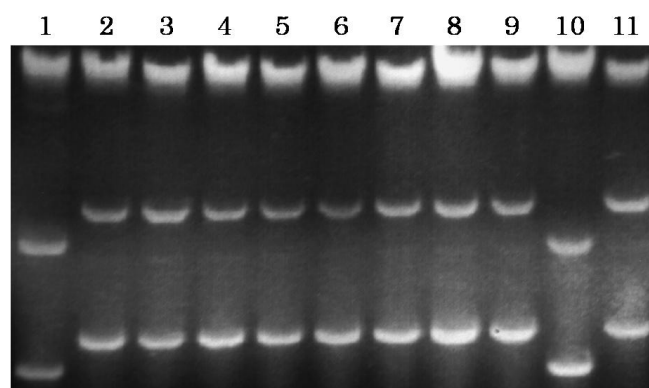
Figura 40. Vetor de expressão pPICHOLI.

Para a realização da clonagem em pPICHOLI®, realizamos inicialmente uma digestão do vetor pGEM-T-sm14 com a endonuclease *HindIII*, seguido de tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I. Desta forma, obtivemos um vetor linearizado com as extremidades cegas, o qual foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose e purificado conforme descrito em *Materiais e métodos, Sessão 3.12, pág. 46*. Após a purificação, removeu-se o gene sm14

sintético do restante do vetor pGEM-T *Easy*® através de digestão com a endonuclease *SaI* e purificação através de uma nova eletroforese em gel de agarose.

De forma similar, digeriu-se o vetor pPICHOLI® com as endonucleases *EcoRI* e *SaI*, sendo que a extremidade digerida com *EcoRI* foi igualmente tratada com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I. Em seguida, uma reação de ligação de DNA utilizando enzima T4 DNA ligase foi realizada entre o gene *sm14s* e o vetor pPICHOLI® linearizado.

Aqui, novamente, bactérias DH5 $\alpha$  foram transformadas com a reação de ligação acima, plaqueadas em meio 2YT sólido suplementado com antibiótico zeocina e cultivadas por aproximadamente 12 horas. Dez clones foram então selecionados e incubados em 5mL de meio 2YT suplementado com zeocina e triados por fenol-clorofórmio com o intuito de observarmos a presença do gene *sm14s* no vetor pPICHOLI® (Figura 41).

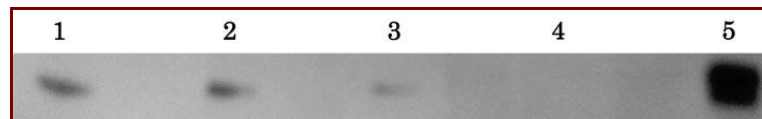


**Figura 41.** Fenol-clorofórmio para confirmação de ligação de *sm14s* em pGEM-T *Easy*®. 1. Controle: pPICHOLI; 1 a 8. pPICHOLI-*sm14s*.

Clones positivos foram então submetidos a minipreparações de DNA plasmidial (*Materiais e métodos, sessão 3.13, pág. 46*) e então inseridos em

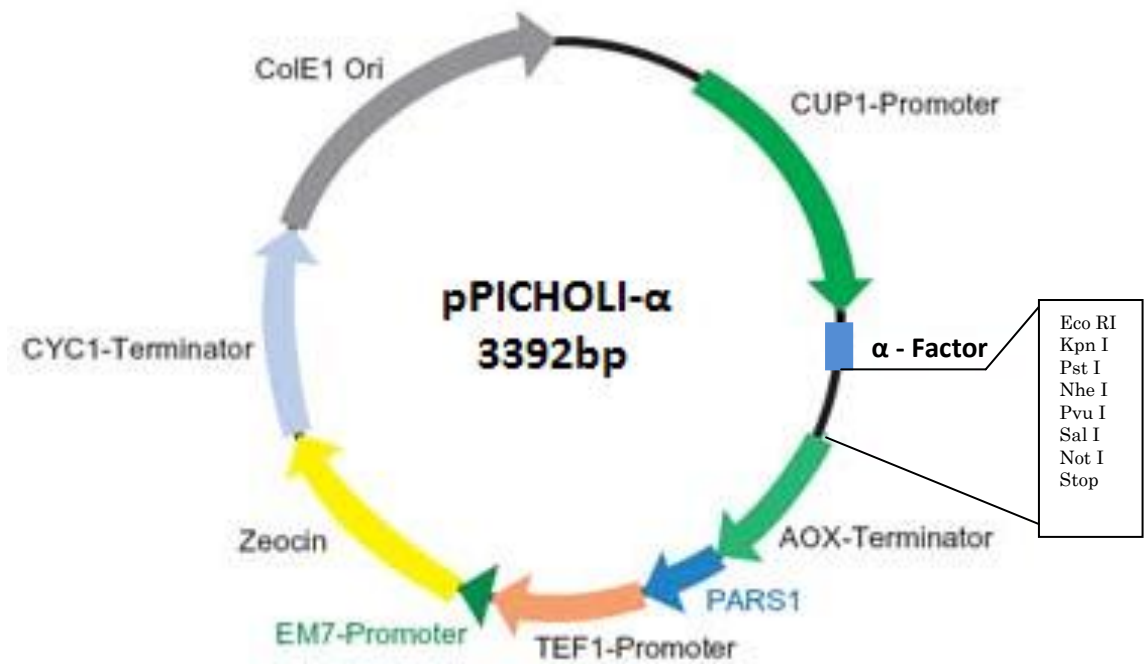
células de *Pichia pastoris* eletrocompetentes, as quais foram submetidas a indução por metanol conforme instruções do fornecedor (MoBiTec).

Na figura 42, pode-se observar a expressão da proteína Sm14 através de um western-blot (*Materiais e métodos, sessão 3.29, pág. 56*) realizado a partir do sobrenadante de um cultivo de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPICHOLI-Sm14s.



**Figura 42.** Western blot realizado a partir do sobrenadante do cultivo de *Pichia pastoris* contendo o plasmídeo pPICHOLI com o gene Sm14 sintético. **1.** 96h de cultivo. **2.** 72h de cultivo. **3.** 48h de cultivo. **4.** 24h de cultivo. **5.** 2µg rSm14.

Estes resultados indicam a viabilidade do gene sintético para expressão em células de leveduras, ainda que aparentemente os níveis sejam baixos. Realizamos também, uma dupla digestão do vetor pPICHOLI-Sm14s com as enzimas de restrição *EcoRI* e *ClaI*, seguido de tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I e religação posterior. Assim, removemos o gene do vetor e construímos um vetor de expressão em leveduras com uma sequência de secreção em sistema episomal, o qual foi identificado como pPICHOLI $\alpha$  (Figura 43).



### *α-factor and MCS sequence*

**ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC  
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA  
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC  
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG  
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA  
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val

Xho I      Kex2 Signal Cleavage      EcoRI      Kpn I      Pst I  
TCT **CTC GAG** AAA AGA **▼**GAG GCT GAA GCT **GAA TTC GAT** **GGT ACC** **CTG CAG**  
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala **▲**Glu Ala **▲**Glu Phe Asp Gly Thr Leu Gln

Ste13 Signal Cleavage  
Nhe I      Pvu I      Sal I      Not I  
**GCT AGC CGA TCG GTC GAC** **CTG CAA GAT CTG CGG CCG C**  
Ala Ser Arg Ser Val Asp Leu Gln Asp Leu Arg Pro

**Figura 43.** Vetor pPICHOLIα.

## 8. REFERÊNCIAS

---

Abath, F. G., E. M. Xavier, R. Allen, Y. M. Gomes, N. Lucena-Silva, M. Baliza e A. J. Simpson. Characterization of Sm13, a tegumental antigen of *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res, v.86, n.9, Sep, p.745-52. 2000.

Abreu, P. A., P. A. Miyasato, M. M. Vilar, W. O. Dias, P. L. Ho, M. Tandler e A. L. Nascimento. Sm14 of *Schistosoma mansoni* in fusion with tetanus toxin fragment C induces immunoprotection against tetanus and schistosomiasis in mice. Infect Immun, v.72, n.10, Oct, p.5931-7. 2004.

Ali, P. O., S. A. Jeffs, H. M. Meadows, T. Hollyer, C. A. Owen, F. G. Abath, R. Allen, F. Hackett, S. R. Smithers e A. J. Simpson. Structure of Sm25, an antigenic integral membrane glycoprotein of adult *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v.45, n.2, Apr, p.215-22. 1991.

Allan, D., G. Payares e W. H. Evans. The phospholipid and fatty acid composition of *Schistosoma mansoni* and of its purified tegumental membranes. Mol Biochem Parasitol, v.23, n.2, Mar, p.123-8. 1987.

Anderson, S., V. L. Shires, R. A. Wilson e A. P. Mountford. In the absence of IL-12, the induction of Th1-mediated protective immunity by the attenuated schistosome vaccine is impaired, revealing an alternative pathway with Th2-type characteristics. Eur J Immunol, v.28, n.9, Sep, p.2827-38. 1998.



Andrade, Z. D. A. A patologia da esquistossomose mansônica. In: Fiocruz (Ed.). Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. A patologia da esquistossomose mansônica., p.547 - 568

Angelucci, F., K. A. Johnson, P. Baiocco, A. E. Miele, M. Brunori, C. Valle, F. Vigorosi, A. R. Troiani, P. Liberti, D. Cioli, M. Q. Klinkert e A. Bellelli. Schistosoma mansoni fatty acid binding protein: specificity and functional control as revealed by crystallographic structure. Biochemistry, v.43, n.41, Oct 19, p.13000-11. 2004.

Arêas, A. P. Estudo do efeito adjuvante de CTB em fusões com as proteínas pneumocócicas PsaA e PspA no desenvolvimento de vacinas protéicas contra Streptococcus pneumoniae. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. 121 p.

Areas, A. P., M. L. Oliveira, E. N. Miyaji, L. C. Leite, K. A. Aires, W. O. Dias e P. L. Ho. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in Escherichia coli: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. Biochem Biophys Res Commun, v.321, n.1, Aug 13, p.192-6. 2004.

Areas, A. P., M. L. Oliveira, E. N. Miyaji, L. C. Leite e P. L. Ho. Intradermal immunization of mice with cholera toxin B-pneumococcal surface protein A fusion

protein is protective against intraperitoneal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, v.73, n.6, Jun, p.3810-3. 2005.

Bayne, C. J. e C. G. Grevelding. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. J Parasitol, v.89, n.5, Oct, p.1056-60. 2003.

Beall, M. J., S. Mcgonigle e E. J. Pearce. Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. Mol Biochem Parasitol, v.111, n.1, Nov, p.131-42. 2000.

Beall, M. J. e E. J. Pearce. Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem, v.276, n.34, Aug 24, p.31613-9. 2001.

Bergquist, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.93 Suppl 1, p.95-101. 1998.

Beuken, E., C. Vink e C. A. Bruggeman. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. Biotechniques, v.24, n.5, May, p.748-50. 1998.

Birnboim, H. C. e J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res, v.7, n.6, Nov 24, p.1513-23. 1979.

Bottieau, E., J. Clerinx, M. R. De Vega, E. Van Den Enden, R. Colebunders, M. Van Esbroeck, T. Vervoort, A. Van Gompel e J. Van Den Ende. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. J Infect, v.52, n.5, May, p.339-45. 2006.

Braschi, S., R. S. Curwen, P. D. Ashton, S. Verjovski-Almeida e A. Wilson. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. Proteomics, v.6, n.5, Mar, p.1471-82. 2006.

Brouwers, J. F., C. Versluis, L. M. Van Golde e A. G. Tielens. 5-Octadecenoic acid: evidence for a novel type of fatty acid modification in schistosomes. Biochem J, v.334 ( Pt 2), Sep 1, p.315-9. 1998.

Brusca, R. C. e G. J. Brusca. *Invertebrates*: Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland. 1990.

Bublin, M., E. Hoflehner, B. Wagner, C. Radauer, S. Wagner, K. Hufnagl, D. Allwardt, M. Kundi, O. Scheiner, U. Wiedermann e H. Breiteneder. Use of a genetic cholera toxin B subunit/allergen fusion molecule as mucosal delivery system with immunosuppressive activity against Th2 immune responses. Vaccine, v.25, n.50, Dec 5, p.8395-404. 2007.

Burkart, V., Y. E. Kim, B. Hartmann, I. Ghiea, U. Syldath, M. Kauer, W. Fingberg, P. Hanifi-Moghaddam, S. Muller e H. Kolb. Cholera toxin B

pretreatment of macrophages and monocytes diminishes their proinflammatory responsiveness to lipopolysaccharide. J Immunol, v.168, n.4, Feb 15, p.1730-7. 2002.

Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, V. Houba, A. A. Mahmoud, A. Sher e P. H. Rees. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. Nature, v.256, n.5520, Aug 28, p.727-9. 1975.

Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, V. Houba e P. H. Rees. Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. Nature, v.252, n.5483, Dec 6, p.503-5. 1974.

Capron, A., G. J. Riveau, P. B. Bartley e D. P. Mcmanus. Prospects for a schistosome vaccine. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, v.2, n.3, Oct, p.281-90. 2002.

Cardoso, F. C., G. C. Macedo, E. Gava, G. T. Kitten, V. L. Mati, A. L. De Melo, M. V. Caliari, G. T. Almeida, T. M. Venancio, S. Verjovski-Almeida e S. C. Oliveira. Schistosoma mansoni Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.10, p.e308. 2008.

Cardoso, F. C., J. M. Pinho, V. Azevedo e S. C. Oliveira. Identification of a new Schistosoma mansoni membrane-bound protein through bioinformatic analysis. Genet Mol Res, v.5, n.4, p.609-18. 2006.

Cass, C. L., J. R. Johnson, L. L. Califf, T. Xu, H. J. Hernandez, M. J. Stadecker, J. R. Yates, 3rd e D. L. Williams. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. Mol Biochem Parasitol, v.155, n.2, Oct, p.84-93. 2007.

Cheever, A. W. Quantitative comparison of the intensity of *Schistosoma mansoni* infections in man and experimental animals. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.63, n.6, p.781-95. 1969.

Cheever, A. W. e R. H. Duvall. Single and repeated infections of grivet monkeys with *Schistosoma mansoni*: parasitological and pathological observations over a 31-month period. Am J Trop Med Hyg, v.23, n.5, Sep, p.884-94. 1974.

Cheever, A. W., K. F. Hoffmann e T. A. Wynn. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. Immunol Today, v.21, n.9, Sep, p.465-6. 2000.

Cheever, A. W., J. A. Lenzi, H. L. Lenzi e Z. A. Andrade. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.7, Oct, p.917-40. 2002.

Chen, B. P. e T. Hai. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. Gene, v.139, n.1, Feb 11, p.73-5. 1994.

Chiang, C. P. e J. P. Caulfield. Human lipoprotein binding to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Displacement by polyanions, parasite antigen masking, and persistence in young larvae. *Am J Pathol*, v.135, n.6, Dec, p.1015-24. 1989.

Chitsulo, L., D. Engels, A. Montresor e L. Savioli. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*, v.77, n.1, Oct 23, p.41-51. 2000.

Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ e F. Gusovsky. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, v.274, n.16, Apr 16, p.10689-92. 1999.

Cioli, D., P. M. Knopf e A. W. Senft. A study of *Schistosoma mansoni* transferred into permissive and nonpermissive hosts. *Int J Parasitol*, v.7, n.4, Aug, p.293-7. 1977.

Curwen, R. S. e R. A. Wilson. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends Parasitol*, v.19, n.2, Feb, p.63-6; discussion 66-8. 2003.

Davies, S. J., J. L. Grogan, R. B. Blank, K. C. Lim, R. M. Locksley e J. H. Mckerrow. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. *Science*, v.294, n.5545, Nov 9, p.1358-61. 2001.

Delcroix, M., K. Medzihradsky, C. R. Caffrey, R. D. Fetter e J. H. Mckerrow. Proteomic analysis of adult *S. mansoni* gut contents. *Mol Biochem Parasitol*, v.154, n.1, Jul, p.95-7. 2007.

Doenhoff, M. J., J. R. Kusel, G. C. Coles e D. Cioli. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? Trans R Soc Trop Med Hyg, v.96, n.5, Sep-Oct, p.465-9. 2002.

Erasmus, D. A. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. Parasitology, v.67, n.2, Oct, p.165-83. 1973.

Fonseca, C. T., C. F. Brito, J. B. Alves e S. C. Oliveira. 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, n.3-4, Jan 2, p.503-10. 2004.

Fonseca, C. T., L. G. Pacifico, M. M. Barsante, T. Rassi, G. D. Cassali e S. C. Oliveira. 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, n.9-10, Aug, p.2509-16. 2006.

Freitas, T. C., E. Jung e E. J. Pearce. TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog, v.3, n.4, Apr, p.e52. 2007.

Fripp, P. J., G. Williams e M. A. Crawford. The differences between the long chain polyenoic acids of adult *Schistosoma mansoni* and the serum of its host. Comp Biochem Physiol B, v.53, n.4, p.505-7. 1976.

Furlong, S. T., K. S. Thibault, L. M. Morbelli, J. J. Quinn e R. A. Rogers. Uptake and compartmentalization of fluorescent lipid analogs in larval *Schistosoma mansoni*. J Lipid Res, v.36, n.1, Jan, p.1-12. 1995.

Furlong, S. T., K. S. Thibault e R. A. Rogers. Fluorescent phospholipids preferentially accumulate in sub-tegumental cells of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J Cell Sci, v.103 ( Pt 3), Nov, p.823-30. 1992.

George-Chandy, A., K. Eriksson, M. Lebens, I. Nordstrom, E. Schon e J. Holmgren. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. Infect Immun, v.69, n.9, Sep, p.5716-25. 2001.

Gilbert, B., M. N. Da Rosa, R. Borojevic e J. Pellegrino. *Schistosoma mansoni*: in vitro transformation of cercariae into schistosomula. Parasitology, v.64, n.2, Apr, p.333-9. 1972.

Golan, D. E., C. S. Brown, C. M. Cianci, S. T. Furlong e J. P. Caulfield. Schistosomula of *Schistosoma mansoni* use lysophosphatidylcholine to lyse adherent human red blood cells and immobilize red cell membrane components. J Cell Biol, v.103, n.3, Sep, p.819-28. 1986.



Gryseels, B. e S. J. De Vlas. Worm burdens in schistosome infections. Parasitol Today, v.12, n.3, Mar, p.115-9. 1996.

Guidry, J. J., L. Cardenas, E. Cheng e J. D. Clements. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Infect Immun, v.65, n.12, Dec, p.4943-50. 1997.

Haas, W. *Schistosoma mansoni*: cercaricidal effect of 2-tetradecenoic acid, a penetration stimulant. Exp Parasitol, v.58, n.2, Oct, p.215-22. 1984.

Haas, W., M. Korner, E. Hutterer, M. Wegner e B. Haberl. Finding and recognition of the snail intermediate hosts by 3 species of echinostome cercariae. Parasitology, v.110 ( Pt 2), Feb, p.133-42. 1995.

Haas, W. e R. Schmitt. Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. II. Conditions and mode of action. Z Parasitenkd, v.66, n.3, p.309-19. 1982.

Hansell, E., S. Braschi, K. F. Medzihradzky, M. Sajid, M. Debnath, J. Ingram, K. C. Lim e J. H. Mckerrow. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.7, p.e262. 2008.

Hassan, A. H., B. Haberl, J. Hertel e W. Haas. Miracidia of an Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* differentiate between sympatric snail species. J Parasitol, v.89, n.6, Dec, p.1248-50. 2003.

He, Y. X., L. Chen e K. Ramaswamy. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin. Exp Parasitol, v.102, n.2, Oct, p.99-108. 2002.

Hernandez, H. J., L. I. Rutitzky, M. Lebens, J. Holmgren e M. J. Stadecker. Diminished immunopathology in *Schistosoma mansoni* infection following intranasal administration of cholera toxin B-immunodominant peptide conjugate correlates with enhanced transforming growth factor-beta production by CD4 T cells. Parasite Immunol, v.24, n.8, Aug, p.423-7. 2002.

Hoffmann, K. F., A. W. Cheever e T. A. Wynn. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. J Immunol, v.164, n.12, Jun 15, p.6406-16. 2000.

Hoffmann, K. F., S. L. James, A. W. Cheever e T. A. Wynn. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. J Immunol, v.163, n.2, Jul 15, p.927-38. 1999.

Holmgren, J., J. Adamsson, F. Anjuere, J. Clemens, C. Czerkinsky, K. Eriksson, C. F. Flach, A. George-Chandy, A. M. Harandi, M. Lebens, T. Lehner, M. Lindblad, E. Nygren, S. Raghavan, J. Sanchez, M. Stanford, J. B. Sun, A. M. Svennerholm e S. Tengvall. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. Immunol Lett, v.97, n.2, Mar 15, p.181-8. 2005.

Jankovic, D., T. A. Wynn, M. C. Kullberg, S. Hieny, P. Caspar, S. James, A. W. Cheever e A. Sher. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. J Immunol, v.162, n.1, Jan 1, p.345-51. 1999.

King, C. L., I. Malhotra, P. Mungai, A. Wamachi, J. Kioko, J. H. Ouma e J. W. Kazura. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. J Immunol, v.160, n.7, Apr 1, p.3578-84. 1998.

Kirschning, C. J., H. Wesche, T. Merrill Ayres e M. Rothe. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. J Exp Med, v.188, n.11, Dec 7, p.2091-7. 1998.

Knudsen, G. M., K. F. Medzihradzsky, K. C. Lim, E. Hansell e J. H. Mckerrow. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. Mol Cell Proteomics, v.4, n.12, Dec, p.1862-75. 2005.

Lambertucci, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.35, n.5, Sep-Oct, p.399-404. 1993.

Lebens, M., J. B. Sun, H. Sadeghi, M. Backstrom, I. Olsson, N. Mielcarek, B. L. Li, A. Capron, C. Czerkinsky e J. Holmgren. A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection. Vaccine, v.21, n.5-6, Jan 17, p.514-20. 2003.

Lee, K. W., K. A. Shalaby, A. M. Medhat, H. Shi, Q. Yang, A. M. Karim e P. T. Loverde. Schistosoma mansoni: characterization of the gene encoding Sm23, an integral membrane protein. Exp Parasitol, v.80, n.1, Feb, p.155-8. 1995.

Lee, S. F., S. A. Halperin, D. F. Salloum, A. Macmillan e A. Morris. Mucosal immunization with a genetically engineered pertussis toxin S1 fragment-cholera toxin subunit B chimeric protein. Infect Immun, v.71, n.4, Apr, p.2272-5. 2003.

Liang, Y. S., G. C. Coles, J. R. Dai, Y. C. Zhu e M. J. Doenhoff. Biological characteristics of praziquantel-resistant and -susceptible isolates of Schistosoma mansoni. Ann Trop Med Parasitol, v.95, n.7, Oct, p.715-23. 2001.

Liljeqvist, S., S. Stahl, C. Andreoni, H. Binz, M. Uhlen e M. Murby. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. J Immunol Methods, v.210, n.2, Dec 29, p.125-35. 1997.

Loukas, A., M. K. Jones, L. T. King, P. J. Brindley e D. P. Mcmanus. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. Infect Immun, v.69, n.6, Jun, p.3646-51. 2001.

Macdonald, A. S., E. A. Patton, A. C. La Flamme, M. I. Araujo, C. R. Huxtable, B. Bauman e E. J. Pearce. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. J Immunol, v.168, n.9, May 1, p.4643-9. 2002.

McIaren, D. J. Will the real target of immunity to schistosomiasis please stand up. Parasitol Today, v.5, n.9, Sep, p.279-82. 1989.

Mcmanus, D. P. The search for a vaccine against schistosomiasis--a difficult path but an achievable goal. Immunol Rev, v.171, Oct, p.149-61. 1999.

Merritt, E. A., S. Sarfaty, F. Van Den Akker, C. L'hoir, J. A. Martial e W. G. Hol. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. Protein Sci, v.3, n.2, Feb, p.166-75. 1994.

Meyer, F., H. Meyer e E. Bueding. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. Biochim Biophys Acta, v.210, n.2, Jul 14, p.257-66. 1970.

Michel, A., J. Knobloch e W. Kunz. P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. Parasitology, v.127, n.Pt 6, Dec, p.519-24. 2003.

Moffat, D. e J. R. Kusel. Fluorescent lipid uptake and transport in adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology, v.105 ( Pt 1), Aug, p.81-9. 1992.

Moser, D., M. Tendler, G. Griffiths e M. Q. Klinkert. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. J Biol Chem, v.266, n.13, May 5, p.8447-54. 1991.

Mullis, K. B. e F. A. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, v.155, p.335-50. 1987.

Pacheco, L. G., E. Zucconi, V. L. Mati, R. M. Garcia, A. Miyoshi, S. C. Oliveira, A. L. De Melo e V. Azevedo. Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. Acta Trop, v.95, n.2, Aug, p.132-42. 2005.

Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, F. A. Lewis e A. Sher. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med, v.173, n.1, Jan 1, p.159-66. 1991.

Pertinhez, T. A., M. L. Sforca, A. C. Alves, C. R. Ramos, P. L. Ho, M. Tendler, N. I. Zanchin e A. Spisni. <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C resonance assignments of the apo Sm14-M20(C62V) protein, a mutant of *Schistosoma mansoni* Sm14. J Biomol NMR, v.29, n.4, Aug, p.553-4. 2004.

Pizza, M., M. M. Giuliani, M. R. Fontana, E. Monaci, G. Douce, G. Dougan, K. H. Mills, R. Rappuoli e G. Del Giudice. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. Vaccine, v.19, n.17-19, Mar 21, p.2534-41. 2001.

Ramaswamy, K., P. Kumar e Y. X. He. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J Immunol, v.165, n.8, Oct 15, p.4567-74. 2000.

Ramos, C. R., P. A. Abreu, A. L. Nascimento e P. L. Ho. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. Braz J Med Biol Res, v.37, n.8, Aug, p.1103-9. 2004.

Ramos, C. R., R. C. Figueredo, T. A. Pertinhez, M. M. Vilar, A. L. Do Nascimento, M. Tandler, I. Raw, A. Spisni e P. L. Ho. Gene structure and M20T polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein. Molecular, functional, and immunoprotection analysis. J Biol Chem, v.278, n.15, Apr 11, p.12745-51. 2003.

Ramos, C. R., A. Spisni, S. Oyama, Jr., M. L. Sforca, H. R. Ramos, M. M. Vilar, A. C. Alves, R. C. Figueredo, M. Tandler, N. I. Zanchin, T. A. Pertinhez e P. L. Ho. Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: Structural and functional characterization of a vaccine candidate. Biochim Biophys Acta, v.1794, n.4, Apr, p.655-662. 2009a.

\_\_\_\_\_. Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: structural and functional characterization of a vaccine candidate. Biochim Biophys Acta, v.1794, n.4, Apr, p.655-62. 2009b.

Ramos, C. R., M. M. Vilar, A. L. Nascimento, P. L. Ho, N. Thaumaturgo, R. Edelenyi, M. Almeida, W. O. Dias, C. M. Diogo e M. Tendler. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.96 Suppl, p.131-5. 2001.

Ramos, C. R. R. A proteína ligadora aos ácidos graxos Sm14 de Schistosoma mansoni: estrutura gênica, polimorfismo, expressão heteróloga em E. coli e significado estrutural e funcional das suas formas polimórficas e mutantes. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

Rao, K. V. e K. Ramaswamy. Cloning and expression of a gene encoding Sm16, an anti-inflammatory protein from *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v.108, n.1, Apr 30, p.101-8. 2000.

Rey, L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1992. 352 p.

Ribeiro-Paes, J. T. e V. Rodrigues. Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma*: a review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.39, n.6, Nov-Dec, p.337-44. 1997.



Rihet, P., C. E. Demeure, A. Bourgois, A. Prata e A. J. Dessein. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. Eur J Immunol, v.21, n.11, Nov, p.2679-86. 1991.

Rocha, M. O., E. R. Pedroso, J. R. Lambertucci, D. B. Greco, R. L. Rocha, D. F. Rezende e J. Neves. Gastro-intestinal manifestations of the initial phase of schistosomiasis mansoni. Ann Trop Med Parasitol, v.89, n.3, Jun, p.271-8. 1995.

Rocha, M. O., R. L. Rocha, E. R. Pedroso, D. B. Greco, C. S. Ferreira, J. R. Lambertucci, N. Katz, R. S. Rocha, D. F. Rezende e J. Neves. Pulmonary manifestations in the initial phase of schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.37, n.4, Jul-Aug, p.311-8. 1995.

Rumjanek, F. D., E. G. Campos e L. C. Afonso. Evidence for the occurrence of LDL receptors in extracts of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v.28, n.2, Mar, p.145-52. 1988.

Rumjanek, F. D. e D. J. McLaren. *Schistosoma mansoni*: modulation of schistosomular lipid composition by serum. Mol Biochem Parasitol, v.3, n.4, Aug, p.239-52. 1981.

Rumjanek, F. D. e A. J. Simpson. The incorporation and utilization of radiolabelled lipids by adult *Schistosoma mansoni* in vitro. Mol Biochem Parasitol, v.1, n.1, Mar, p.31-44. 1980.

Sadler, C. H., L. I. Rutitzky, M. J. Stadecker e R. A. Wilson. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. Eur J Immunol, v.33, n.4, Apr, p.880-8. 2003.

Sadun, E. H. e R. W. Gore. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. Exp Parasitol, v.28, n.3, Dec, p.435-49. 1970.

Sanger, F., S. Nicklen e A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

Schulze, K., E. Medina, G. S. Chhatwal e C. A. Guzman. Stimulation of long-lasting protection against *Streptococcus pyogenes* after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. Vaccine, v.21, n.17-18, May 16, p.1958-64. 2003.

Senft, A. W., W. B. Gibler e P. M. Knopf. Scanning electron microscope observations on tegument maturation in *Schistosoma mansoni* grown in permissive and non-permissive hosts. Am J Trop Med Hyg, v.27, n.2 Pt 1, Mar, p.258-66. 1978.

Shapiro, A. L., E. Vinuela e J. V. Maizel, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun, v.28, n.5, Sep 7, p.815-20. 1967.

Silva, J. R. M. E., R. H. Neves e D. C. Gomes. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: O. D. S. Carvalho, P. M. Z. Coelho, *et al* (Ed.). Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, v.1, 2008. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*, p.45 - 84

Skelly, P. J. e C. B. Shoemaker. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. Int J Parasitol, v.30, n.5, Apr 24, p.625-31. 2000.

Smythies, L. E., P. S. Coulson e R. A. Wilson. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. J Immunol, v.149, n.11, Dec 1, p.3654-8. 1992.

Sun, J. B., N. Mielcarek, M. Lakew, J. M. Grzych, A. Capron, J. Holmgren e C. Czerkinsky. Intranasal administration of a *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase-cholera toxoid conjugate vaccine evokes antiparasitic and antipathological immunity in mice. J Immunol, v.163, n.2, Jul 15, p.1045-52. 1999.

Sun, J. B., M. J. Stadecker, N. Mielcarek, M. Lakew, B. L. Li, H. J. Hernandez, C. Czerkinsky e J. Holmgren. Nasal administration of *Schistosoma mansoni* egg

antigen-cholera B subunit conjugate suppresses hepatic granuloma formation and reduces mortality in *S. mansoni*-infected mice. Scand J Immunol, v.54, n.5, Nov, p.440-7. 2001.

Taft, A. S., J. J. Vermeire, J. Bernier, S. R. Birkeland, M. J. Cipriano, A. R. Papa, A. G. Mcarthur e T. P. Yoshino. Transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* larval development using serial analysis of gene expression (SAGE). Parasitology, Mar 5, p.1-17. 2009.

Takagi, H., T. Hiroi, L. Yang, K. Takamura, R. Ishimitsu, H. Kawauchi e F. Takaiwa. Efficient induction of oral tolerance by fusing cholera toxin B subunit with allergen-specific T-cell epitopes accumulated in rice seed. Vaccine, v.26, n.48, Nov 11, p.6027-30. 2008.

Tempone, A. J., M. L. Bianconi e F. D. Rumjanek. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. Mol Cell Biochem, v.177, n.1-2, Dec, p.139-44. 1997.

Tendler, M., C. A. Brito, M. M. Vilar, N. Serra-Freire, C. M. Diogo, M. S. Almeida, A. C. Delbem, J. F. Da Silva, W. Savino, R. C. Garratt, N. Katz e A. S. Simpson. 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, n.1, Jan 9, p.269-73. 1996.

Tendler, M., M. M. Vilar, C. A. Brito, N. M. Freire, N. Katz e A. Simpson. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? Mem Inst Oswaldo Cruz, v.90, n.2, Mar-Apr, p.255-6. 1995.

Tran, M. H., M. S. Pearson, J. M. Bethony, D. J. Smyth, M. K. Jones, M. Duke, T. A. Don, D. P. Mcmanus, R. Correa-Oliveira e A. Loukas. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. Nat Med, v.12, n.7, Jul, p.835-40. 2006.

Varaldo, P. B., L. C. Leite, W. O. Dias, E. N. Miyaji, F. I. Torres, V. C. Gebara, G. R. Armoa, A. S. Campos, D. C. Matos, N. Winter, B. Gicquel, M. M. Vilar, J. Mcfadden, M. S. Almeida, M. Tendler e D. McIntosh. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. Infect Immun, v.72, n.6, Jun, p.3336-43. 2004.

Verjovski-Almeida, S., R. Demarco, E. A. Martins, P. E. Guimaraes, E. P. Ojopi, A. C. Paquola, J. P. Piazza, M. Y. Nishiyama, Jr., J. P. Kitajima, R. E. Adamson, P. D. Ashton, M. F. Bonaldo, P. S. Coulson, G. P. Dillon, L. P. Farias, S. P. Gregorio, P. L. Ho, R. A. Leite, L. C. Malaquias, R. C. Marques, P. A. Miyasato, A. L. Nascimento, F. P. Ohlweiler, E. M. Reis, M. A. Ribeiro, R. G. Sa, G. C. Stukart, M. B. Soares, C. Gargioni, T. Kawano, V. Rodrigues, A. M. Madeira, R. A. Wilson, C. F. Menck, J. C. Setubal, L. C. Leite e E. Dias-Neto. Transcriptome

analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nat Genet, v.35, n.2, Oct, p.148-57. 2003.

Vignali, D. A., P. Crocker, Q. D. Bickle, S. Cobbold, H. Waldmann e M. G. Taylor. A role for CD4+ but not CD8+ T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. Immunology, v.67, n.4, Aug, p.466-72. 1989.

Vilar, M. M., F. Barrientos, M. Almeida, N. Thaumaturgo, A. Simpson, R. Garratt e M. Tendler. An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. Vaccine, v.22, n.1, Dec 8, p.137-44. 2003.

Voet, D. e J. G. Voet. Biochemistry: John Wiley & Sons, INC., v.1. 2004. 1600 p.

Wilson, R. A. e P. S. Coulson. Lung-phase immunity to Schistosomes: a new perspective on an old problem? Parasitol Today, v.5, n.9, Sep, p.274-8. 1989.

\_\_\_\_\_. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? Microbes Infect, v.1, n.7, Jun, p.535-43. 1999.

\_\_\_\_\_. Schistosome vaccines: a critical appraisal. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101 Suppl 1, Sep, p.13-20. 2006.

Withers-Martinez, C., E. P. Carpenter, F. Hackett, B. Ely, M. Sajid, M. Grainger e M. J. Blackman. PCR-based gene synthesis as an efficient approach for

expression of the A+T-rich malaria genome. Protein Eng, v.12, n.12, Dec, p.1113-20. 1999.

Wolowczuk, I., M. Delacre, O. Roye, S. L. Giannini e C. Auriault. Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon-gamma production and leads to an aggravation of the disease. Immunology, v.91, n.1, May, p.35-44. 1997.

Wolowczuk, I., S. Nutten, O. Roye, M. Delacre, M. Capron, R. M. Murray, F. Trottein e C. Auriault. Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. Infect Immun, v.67, n.8, Aug, p.4183-90. 1999.

Wolowczuk, I., O. Roye, S. Nutten, M. Delacre, F. Trottein e C. Auriault. Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host. Microbes Infect, v.1, n.7, Jun, p.545-51. 1999.

Wynn, T. A. e K. F. Hoffmann. Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th1 versus Th2? Parasitol Today, v.16, n.11, Nov, p.497-501. 2000.

Yang, R. B., M. R. Mark, A. Gray, A. Huang, M. H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W. I. Wood, A. L. Gurney e P. J. Godowski. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. Nature, v.395, n.6699, Sep 17, p.284-8. 1998.

Yoshino, T. P., J. P. Boyle e J. E. Humphries. Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface. Parasitology, v.123 Suppl, p.S143-57. 2001.



## Henrique Roman Ramos

Curriculum Vitae

---

### Dados Pessoais

<b>Nome</b>	Henrique Roman Ramos
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	ROMAN-RAMOS, H; RAMOS, HR
<b>Sexo</b>	masculino
<b>Filiação</b>	Edson Lourenço Ramos e Maria del Carmen Roman Ramos
<b>Nascimento</b>	29/06/1978 - São Paulo/SP - Brasil
<b>Carteira de Identidade</b>	24.742.088-8 SSP - SP – 27/01/1999
<b>CPF</b>	178.143.888-99
<b>Endereço profissional</b>	Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia Molecular I Av. Vital Brazil, 1500 Butantã - Sao Paulo 05503-900, SP - Brasil Telefone: 11 3726-7222 ramal 2244
<b>Endereço eletrônico</b>	ramoshr@gmail.com

---

### Formação Acadêmica/Titulação

<b>2003 - 2009</b>	Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14, de Schistosoma mansoni, utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante., Ano de obtenção: 2009 Orientador: Paulo Lee Ho Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>1997 - 2001</b>	Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica. Universidade de Santo Amaro, UNISA, Sao Paulo, Brasil Título: Hiperplasia Adrenal Congênita: seqüenciamento total do gene CYP21 Orientador: João Marcos Machado Mercado
<b>1993 - 1996</b>	Ensino Médio (2o grau). Colégio Arquidiocesano de São Paulo, ARQUI, Brasil

---

### Formação complementar

<b>1997 - 1997</b>	Extensão universitária em XXI Jornada e XIV Semana Biomédica. Universidade de Santo Amaro, UNISA, Sao Paulo, Brasil
<b>1998 - 1998</b>	Extensão universitária em XXII Jornada e XV Semana Biomédica. Universidade de Santo Amaro, UNISA, Sao Paulo, Brasil
<b>2000 - 2000</b>	Curso de curta duração em Biologia Molecular Aplicada à Medicina. Laboratório Fleury, FLEURY, Brasil
<b>2002 - 2002</b>	Curso de curta duração em Biologia Molecular da Transformação Maligna. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

---

### Atuação profissional

## 1. Universidade de São Paulo - USP

---

### Vínculo institucional

- 2006 - 2006** Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 40, Regime: Integral  
Outras informações:  
Professor do 1º Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular promovido pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo no período de 09 a 20 de Janeiro de 2006.
- 2003 - Atual** Vínculo: Aluno de Pós-Graduação , Enquadramento funcional: Aluno de Pós-Graduação , Carga horária: 40, Regime: Integral

---

### Atividades

- 02/2006 - Atual** Estágio, Instituto de Química  
*Monitor da disciplina de Biologia Molecular ministrada para o curso de Farmácia Bioquímica.*
- 08/2005 - 12/2005** Estágio, Instituto de Química  
*Monitor da disciplina de Bioquímica, estrutura de biomoléculas e metabolismo, ministrada para o curso de Farmácia Bioquímica.*

## 2. Instituto Butantan - IBU

---

### Vínculo institucional

- 2009 - Atual** Vínculo: Pós Doutorando, Enquadramento funcional: Pesquisador.
- 2002 - 2009** Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Estudante.

---

### Atividades

- 08/2003 - 06/2009** Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia  
*Participação em projetos:  
Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de Schistosoma mansoni, utilizando a subunidade B da toxina colérica como adjuvante.*

## 3. Central de Radioimunoensaio de São Paulo - CRIESP

---

### Vínculo institucional

- 2002 - 2003** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Sênior , Carga horária.
- 2001 - 2003** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Júnior
- 1998 - 2000** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário

---

### Atividades

- 01/2001 - 03/2003** Serviço Técnico Especializado, Departamento de Biologia Molecular  
*Especificação:  
Realizou ensaios baseados em seqüenciamento automático de DNA (Genotipagem do HIV, Genotipagem do HCV, Seqüenciamento total do Gene CYP21 - 21-Hidroxilase, Seqüenciamento parcial do gene p53).*
- 01/2001 - 03/2003** Serviço Técnico Especializado, Departamento de Biologia Molecular  
*Especificação:*

*Realizou ensaios de diagnóstico laboratorial baseados em técnicas de Biologia Molecular, utilizando kits comerciais Roche Amblicor (HIV, HCV, HBV, Clamídia e Micobactéria) e Organon NASBA (HIV)*

**06/1999 - 12/2000** Projetos de pesquisa, Departamento de Biologia Molecular

*Participação em projetos:*

*Desenvolvimento de um ensaio de diagnóstico clínico baseado no seqüenciamento total do gene CYP21 - 21-Hidroxilase.*

*Seqüenciamento e genotipagem do vírus da imunodeficiência humana (HIV)*

*Seqüenciamento e genotipagem do vírus da hepatite C (HCV)*

*Seqüenciamento do gene p53.*

**06/1999 - 03/2003** Pesquisa e Desenvolvimento, Departamento de Biologia Molecular

*Linhas de Pesquisa:*

*Desenvolvimento de ensaios de diagnóstico baseados no seqüenciamento automático de DNA.*

**11/1998 - 06/1999** Estágio, Departamento de Biologia Molecular

*Estágio:*

*Manteve contato com técnicas de Biologia Molecular: Purificação de DNA e RNA, PCR, NASBA, Seqüenciamento de DNA e auxiliou na realização de ensaios do departamento.*

---

## Linhas de pesquisa

1. Desenvolvimento de ensaios de diagnóstico baseados no seqüenciamento automático de DNA.

Objetivos: Desenvolver ensaios inéditos de diagnóstico molecular para posterior disponibilização dos mesmos à comunidade médica.

*Palavras-chave: Diagnóstico molecular, Ensaios laboratoriais, Seqüenciamento de DNA*

*Áreas do conhecimento : Biologia Molecular*

*Setores de atividade : Desenvolvimento de produtos tecnológicos voltados para a saúde humana*

2. Desenvolvimento de vacina contra esquistossomose mansônica

Objetivos: Verificar a eficácia da utilização de antígenos selecionados pela OMS em formulações de vacinas contra esquistossomose mansônica

*Palavras-chave: Schistosoma mansoni, Sm14, CTB, Esquistossomose, Vacina*

*Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Helminologia Humana, Imunologia Aplicada*

*Setores de atividade : Produtos e processos biotecnológicos vinculados à saúde humana ou dos animais*

---

## Projetos

- 2003 - 2009** Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de Schistosoma mansoni, utilizando a subunidade B da toxina colérica como adjuvante.

Descrição: Classificada como um dos seis antígenos vacinais estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e sendo a único caracterizado por pesquisadores brasileiros, a proteína de Schistosoma mansoni, ligadora aos ácidos graxos, Sm14 tem demonstrado uma capacidade de induzir uma proteção de até 60% em ensaios de desafios e vem sendo amplamente utilizada na formulação de vacinas antiesquistossomose. O presente estudo tem por objetivo desenvolver e avaliar uma vacina composta pela proteína Sm14 geneticamente fusionada à subunidade B da toxina colérica (CTB). CTB, por sua vez, é bem conhecida pela sua capacidade adjuvante em diferentes sistemas e sua capacidade de reduzir fortes respostas imunológicas ocasionadas pelos antígenos presentes nos ovos do parasita. A vacina será avaliada pela sua capacidade de induzir proteção em camundongos BALB/C, pelo seus efeitos no desenvolvimento de eventuais vermes, pelo tipo de resposta imunológica obtida nos animais vacinados e pela sua influência na formação de reações granulomatosas ao redor dos ovos do parasita aprisionados no tecido hepático dos animais vacinados. **CONCLUÍDO**

Financiador(es): FAPESP, CNPq, Fundação Butantan

- 1999 - 2000** Desenvolvimento de um ensaio de diagnóstico clínico baseado no seqüenciamento total

do gene CYP21 - 21-Hidroxilase.

Descrição: Considerada uma das principais doenças endócrinas, a Hiperplasia Adrenal Congênita é ocasionada em mais de 90% dos casos devido a alterações genéticas no gene CYP21, o qual codifica a enzima 21-Hidroxilase. O projeto visa o desenvolvimento de um ensaio clínico baseado no seqüenciamento automático total do gene em questão para um diagnóstico molecular confiável da doença. **CONCLUÍDO**

---

## Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Bioquímica
3. Biotecnologia

---

## Idiomas

- Inglês** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
- Espanhol** Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem
- Português** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

---

## Prêmios e títulos

- 2008** Prêmio de melhor pôster apresentado na XXXVII reunião anual da SBBq., Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

---

## Produção em C, T & A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. Ramos CR, Spisni, A, Oyama Jr, S, Sforça, M, **Ramos, HR**, Vilar, MM, Alves, A, Figueredo, R, Tendler, M, Zanchin, N, Pertinhez, TA, Ho, PL  
Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: Structural and functional characterization of a vaccine candidate. *Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzymology.* , v.1794, p.655 - 662, 2009.
2. Silva, T, Moura, S de P, **Ramos, HR**, De Araujo, PS, da Costa, MH  
Design of a Modern Liposome and Bee Venom Formulation for the Traditional VIT-Venom Immunotherapy. *Journal of Liposome Research.* , p.1 - 16, 2008.

#### Artigos aceitos para publicação

1. Hauk, P., Guzzo, C.R., **Ramos, HR**, Ho, PL, Farah, C.S.  
Structure and Calcium-Binding Activity of LipL32, the Major Surface Antigen of Pathogenic *Leptospira* sp.. *Journal of Molecular Biology.* , 2009.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **Roman-Ramos, H**, Miyasato, PA, Ramos CR, Arêas, AP, Ho, PL.  
Genetic fusion of CTB with Sm14: Biochemical characterization and its use as an anti-schistosomiasis vaccine. In: 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008, Atenas.  
**The FEBS Journal.** Cambridge: Wiley-Blackwell, 2008. v.275. p.426 - 426
2. Pradal, MG, MERCADO, JMM, Carloni, AC, **Roman-Ramos, H**, Dio, RD  
Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia in Clinical Laboratories: Results of 18 month application. In: AACC - American Association for Clinical Chemistry, 2004, Los Angeles.

**Clinical Chemistry** , 2004. v.50. p.A117 - A117

3. Mercado, JMM, **Roman-Ramos, H**, Dio, RD, Pradal, MG

Genotypic diversity of Hepatitis C virus in Brazilian patients In: AACC - American Association for Clinical Chemistry, 2002, Orlando, FL.

**Clinical Chemistry** , 2002. v.48. p.A66 - A66

4. Mercado, JMM, **Roman-Ramos, H**, Dio, RD, Pradal, MG.

Genotypic diversity of HIV-1 infected patients from Brazil In: AACC - American Association for Clinical Chemistry, 2002, Orlando, FL.

**Clinical Chemistry** . , 2002. v.48. p.A66 - A66

5. **Roman-Ramos, H**, Mercado, JMM, Dio, RD, Pradal, MG.

Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in a clinical laboratory In: AACC - American Association for Clinical Chemistry, 2002, Orlando, FL.

**Clinical Chemistry** . , 2002. v.48. p.A130 - A130