

Patricia Placoná Diniz

“Estudo do potencial vacinal de proteínas de *Schistosoma mansoni* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Diniz, Patricia Placoná.

Estudo do potencial vacinal de proteínas de *Schistosoma mansoni* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro / Patricia Placoná Diniz. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Elizabeth Angélica Leme Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de vacinas.

Versão do título para o inglês: Study of the vaccine potential of proteins from *Schistosoma mansoni* using attenuated recombinant salmonellas as vehicle for antigen presentation to the host.

Descritores: 1. *Schistosoma mansoni* 2. Vacina contra esquistossomose 3. Salmonelas atenuadas vacinais 4. Expressão de proteínas *in vivo* I. Martins, Elizabeth Angélica Leme II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0130/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Patricia Placoná Diniz.

Título da Dissertação: Estudo do potencial vacinal de proteínas de *Schistosoma mansonii* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro.

Orientador(a): Elizabeth Angélica Leme Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Patricia Placoná Diniz

“Estudo do potencial vacinal de proteínas de *Schistosoma mansonii* utilizando Salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Elizabeth Angelica Leme Martins

São Paulo
2009

*Aos meus familiares e amigos pelo
incentivo, apoio, amor e dedicação
sempre. Sem vocês eu não teria chegado
até aqui. Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade que me foi dada de conseguir chegar até aqui, e seguir meu destino mantendo a minha fé e me fazendo superar os momentos de provação e dificuldade.

Gostaria de agradecer aos meus pais Leda e Pedro que me ensinaram sempre seguir os caminhos do bem e nunca desistir dos meus sonhos. Minha formação e caráter são graças a esses anjos que me geraram e amaram por toda a vida. Agradeço pelo carinho, paciência e atenção que sempre me dedicaram, por nunca deixar nada faltar e por serem exemplos de PESSOAS as quais tenho orgulho de seguir. Obrigada pela torcida e incentivo em todos os momentos e por nunca deixarem de acreditar em mim, amo vocês mais do que se possa traduzir em simples palavras.

Agradeço meus irmãos Gabriela e Daniel por me ensinarem que nem sempre concordaremos em tudo na vida. Cada um tem suas qualidades e defeitos e por isso cada um é único e especial. Amo muito vocês, obrigada por me ensinarem a partilhar tudo. Gabriela, obrigada por ser um exemplo de profissional e pesquisadora e Daniel, obrigada por me mostrar o que é humildade e simplicidade.

Minha família avós e avôs que não se encontram mais comigo, vocês serão eternamente guardados em meu coração aonde quer que eu vá. Vocês são como estrelas no céu que sempre brilharão e me ajudarão a escolher os caminhos. Tia Lenice, tio Núncio e meu primo Henrique vocês são muito especiais como uma segunda família, Obrigada!

Depois dos agradecimentos aos familiares gostaria de fazer agradecer uma pessoa mais do que especial para mim, uma pessoa única e maravilhosa que me inspira muito, pela qual eu tenho imensa admiração, respeito e carinho. Beth, tenho que te agradecer não apenas pela oportunidade que me deu de estar em seu laboratório realizando esse trabalho, me orientando, confiando em mim, acreditando nas minhas possibilidades e no meu crescimento como profissional. Quero te agradecer pelas conversas científicas ou não, pelos sorrisos que sempre me fez dar, pela amizade que temos, pelo seu jeito mãe de ser que sempre me acolheu, pelos desabafos, e acima de tudo por ser essa pessoa diferencial. Você é alguém que trabalha muito, e apesar do reconhecimento nem sempre chegar, as pessoas próximas sabem o quanto você se desdobra para fazer tudo da melhor forma possível. Além de excelente pesquisadora com idéias inovadoras, você sempre está preocupada com a praticidade das coisas, se a pesquisa e o dinheiro investidos de fato servirão em produtos para melhorar a saúde das pessoas. Definitivamente deveriam existir mais pessoas como você e não apenas pessoas preocupadas com a vaidade profissional. Por isso, e claro por puxar a minha orelha quando eu preciso, eu me espelho muito em você. Se um dia eu chegar a ser um pouco como você me sentirei imensamente realizada profissionalmente, só que se possível um pouco menos louca. Beth, o que eu quero te dizer é que você conquistou o coração da Patrícia, sendo um modelo de ser humano a ser seguido.

Além de conhecer a Beth, o Butantan me presenteou com pessoas com as quais aprendi muito e tenho que agradecer: Alexandre, Arleide, Beth Cheng, Darlene, Dona Luiza, Estela, Fátima, Márcia, Marisa, Nati, Paulo Vinicius, Obrigada por tudo!

Em especial gostaria de agradecer a Dra. Toshie Kawano e a Mestre Patrícia Aoki por serem sempre tão receptivas e nos auxiliarem com os experimentos de infecção dos animais. A Toshie é uma pessoa maravilhosa, sinto-me verdadeiramente lisonjeada de poder conhecê-la e ter sua presença em minha banca de qualificação, pois ela é uma daquelas pessoas que iluminam o ambiente, que por onde passa leva sorrisos e bem estar. A Pati tenho que agradecer pela cooperação, amizade e por ser essa pessoa linda que é sempre disposta a ajudar, obrigada por tudo sempre querida!

Gostaria de agradecer também a todos os professores da pós graduação por terem feito parte da minha formação como mestre.

Obrigada aos secretários Eliane, Fábria e Marcos da Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela disponibilidade e atenção sempre. Em especial ao Marcos que apesar de ser corinthiano, por além ser um amigo que me agüenta e acredita nas minhas possibilidades, por me ensinar a ter paciência com as pessoas ligadas no 110V.

Obrigado aos pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan pela possibilidade de usar os equipamentos e reagentes de seus laboratórios.

Agora gostaria de agradecer alguns anjos, que o Instituto Butantan me trouxe, aqueles que apesar de não possuírem asas estão sempre por perto e que às vezes chamamos de amigos.... Aqui eu jamais poderia deixar de agradecer o que algumas dessas pessoas fizeram e fazem a diferença em minha vida! Gostaria de agradecer pelo carinho, apoio, conversas, abraços, risadas, alegria e ensinamentos sempre, e são vocês quem eu agradeço: André pelo carinho especial e pelas conversas futebolísticas, Camilla por ser um exemplo de guerreira, Carmen por ser meu leãozinho mais querido, Cláudia pelas muitas risadas e por estar se tornando cada vez mais especial, afinal você já é uma das sete anãs! Cris pela sua simpatia e meiguice, Dani porque você é a mestre, melhor exemplo de ser humano correto que eu tenho! Daniel pelas nossas conversas malucas, Enéas por ser tão zeloso com os animais e por você ser tão engraçado apesar de não saber, Juliano pelo seu jeito ogro carinhoso de ser, Kátia pelos seus maravilhosos abraços, Lola que foi a primeira quem me acolheu, Luana por estar sempre levando alegria por onde passa, Mateus pelas conversas e brigas de rua, Omar por ter a maior cabeça do mundo e pelas conversas sempre engrandecedoras, Paulo pelo jeito mal humorado engraçadode ser, Raimunda pela sua irreverência, Régis pelo seu carisma, Sula por me agüentar quando nem eu me agüento e falar calma Fiiiii!!! Tati por ser um exemplo de organização, Van por ser sempre tão boazinha, Zébert, por me deixar sempre escrever no seu carro imundo. Meu muito obrigado a todos vocês por fazerem dos meus dias mais fáceis.

Desses anjos tem aqueles que se tornaram mais do que especiais, que eu considero além de amigos verdadeiros irmãos na minha vida. Pessoas que não importa quando, sempre estarão lá por mim, me dando o ombro e enxugando minhas lágrimas nas minhas derrotas, me incentivando e nas minhas vitórias me aplaudindo de pé, não tenho palavras para expressar o tamanho do carinho e amor que tenho por vocês meus queridos, só sei que por mais que venham tempestades não terei medo porque eu tenho vocês comigo. Eriquinha, obrigada por tudo mesmo, jamais esquecerei que em momentos como a morte dos meus bichinhos você estava ao meu lado, que em momentos como qualificação, nos meus momentos de nervoso pré-apresentações você estava lá batendo palmas depois, que quando eu vi as capivaras na marginal você também estava lá, obrigada por acreditar em mim e fazer eu acreditar em mim sempre! Ah e claro toda vez que eu ver um porquinho atravessando a rua ou um escorregador infantil lembrarei de você. Rô, Samara, Primo it, você não imagina o

quanto é importante pra mim também, um verdadeiro exemplo de mulher guerreira, entramos juntas na Fundap e cada vez mais você se torna insubstituível, crescemos muito esses anos todos juntas, você não tem noção do quanto você é forte mulher! Obrigada por ser essa irmã que você é em minha vida e por me ensinar a aceitar o que é diferente. Rico, o que falar da pessoa mais comedianta que eu conheço? A minha dupla de vídeos-clipes e apresentações em pleno refeitório, você além de ser superdivertido é um verdadeiro amigo que posso contar sempre! Toda vez que eu ouvir como uma deusa sei de quem lembrar... Momô, Lala a minha dupla sertaneja, você tem uma luz linda dentro de você, a pessoa que consegue ser funcionária e vortex ao mesmo tempo, sem dúvidas um exemplo de dedicação ao trabalho! Lú Leão, exemplo de ser humano, pessoa sem maldade no coração, que se doa pelo bem dos outros, minha irmã japonesa italiana com quem eu me identifico tanto, te amo! Vivis, jaca mais insana do mundo, pessoa que me faz rir muitooooo adooooooo!!!! Vocês estarão no meu coração pra todo o sempre! Simplesmente amo vocês! Acho que tudo se resume a isso, não importa o que aconteça sempre estarão dentro de mim....

Falando em amigos irmãos não posso deixar de falar na Tata, na Lú e na Fer, que estão presentes na minha vida desde que me conheço por gente. Tata obrigada por puxar minha orelha sempre que eu estou errada, você sabe que eu te amo! Lú, obrigada por ser a chatona mais especial do mundo e por estar presente em todos os momentos. Fer você é minha alma gêmea, melhor abraço da minha vida! A pessoa que me entende em pensamento, olhar e ação, adora me provocar e mesmo assim eu não consigo ficar longe! Só tenho que agradecer por vocês minhas amigas maravilhosas por estarem há tanto tempo do meu lado e não me abandonarem nunca!

Não posso deixar de agradecer a existência desses serezinhos maravilhosos que fizeram ou fazem da minha vida melhor, pois uma pessoa que não consegue amar um animal jamais poderá realmente amar verdadeiramente. Lady, Chade, Bianca, Minnie, Aigon, Esguicho, Caramelo, Sticth, Ligeirinho obrigado por terem me trazido tantas alegrias, vocês são estrelas do meu céu! Mila, Sushi, Garrincha, Becknbauer, Darwin e Catarina obrigada por continuarem me trazendo amor incondicional todos os dias. Amo vocês meus bebês!

Gostaria de agradecer por todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha formação e que por uma razão ou outra esqueci de colocar aqui, afinal depois de escrever a dissertação são poucos os neurônios que sobraram.

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação,
seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu
semelhante”.*

Albert Schweitzer

RESUMO

DINIZ, P.P. **Estudo do potencial vacinal de proteínas de *Schistosoma mansoni* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo de apresentação de antígenos ao hospedeiro.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.

A Esquistossomose é uma das mais importantes doenças endêmicas do mundo, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas em 76 países. É estimado que mais de 600 milhões de pessoas estejam em áreas endêmicas. Em 2003 dados do transcriptoma do *Schistosoma mansoni* foram disponibilizados. As informações de proteínas codificadas permitiram a análise de suas funções, e auxiliaram na procura de novos candidatos vacinais. A análise do transcriptoma permitiu a identificação de três famílias de proteínas homólogas à dineína de cadeia leve (DLC) de mamíferos. Uma delas é a família L8, com ao menos 18 membros, com proteínas em torno de 10 kDa. Essas proteínas são expressas em diferentes estágios do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Duas DLCs foram reconhecidas no tegumento de *S. japonicum*, sugerindo que elas são expostas ao sistema imune do hospedeiro. Salmonelas atenuadas como vacinas vivas têm sido descritas como bons veículos para apresentação de antígenos heterólogos. No nosso laboratório uma importante ferramenta tem sido desenvolvida para auxiliar o uso de salmonelas como vacinas vivas recombinantes, foi desenvolvido um vetor plasmidial baseado no regulon *soxRS* para controlar a expressão de genes heterólogos *in vivo*. Este sistema de expressão promove a expressão de proteínas recombinantes sob condições de estresse oxidativo, como aquele imposto ao microorganismo dentro do macrófago. Para investigar o potencial vacinal das DLCs, três genes foram selecionados para serem clonados e expressos em *E. coli* e em salmonelas atenuadas. A antigenicidade e imunogenicidade desses parálogos foram testadas em camundongos depois de serem imunizados com proteínas purificadas ou com salmonelas recombinantes. As DLCs mostraram ser bastante imunogênicas, aumentando os títulos de IgG. A proteína DLC1 também aumentou os níveis de IgE no soro dos animais, fato que poderia estar relacionado com reações alérgicas observadas em populações infetadas. Altos níveis de IgE também podem ser relacionados com uma marca de resistência existente em pessoas que vivem em áreas endêmicas. Depois de imunizados os animais foram desafiados com cercárias para investigar possível proteção. Foi observado que a imunização com proteínas purificadas

resultou em aproximadamente 40% de diminuição da carga parasitária. A análise dos granulomas hepáticos com 45 dias depois da infecção indicou uma significativa redução, maior que 70% das áreas dos granulomas, sugerindo que a imunização com as DLCs promove uma importante interferência na formação dos granulomas hepáticos. Por outro lado, nossos estudos com salmonelas atenuadas recombinantes, carregando as DLCs, mostraram que foram ineficientes na apresentação dos antígenos ao sistema imune. Relacionando os resultados de diminuição de carga parasitária e das áreas dos granulomas depois da imunização com as DLCs purificadas sugere-se que essas proteínas podem ser consideradas como interessantes candidatos vacinais, uma vez que elas afetam as mais importantes causas da patologia da esquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Vacina contra esquistossomose. Salmonelas atenuadas vacinais. Expressão de proteínas *in vivo*.

ABSTRACT

DINIZ, P.P. **Study of the vaccine potencial of proteins from *Schistosoma mansoni* using attenuated recombinant salmonellas as vehicle for antigen presentation to the host.** 2009. Master thesis (Biotechnology) - Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.

Schistosomiasis is one of the most important endemic diseases in the world, with more than 200 million people infected in 76 countries. It is estimated that more than 600 million people live in endemic areas. In 2003 extensive data from the transcriptome of *Schistosoma mansoni* was made available. The information on the encoded proteins allowed the analysis of protein function and improved the search for vaccine candidates. The analysis of the transcriptome allowed the identification of three families of proteins homologs to the mammalian dynein light chain (DLC). One of these was the L8 family, with at least 18 members, all proteins with around 10 kDa. These proteins were found to be expressed in the different stages of the *S. mansoni* life cycle. Two DLCs were recognized in the tegument of *S. japonicum*, suggesting that they are exposed to the host immune system. Attenuated salmonellas, as live vaccines, have been described as good vehicles for presentation of heterologous antigens. At our laboratory an important tool has been developed to improve the use of salmonellas as live recombinant vaccines, a plasmidial vector based on the soxRS regulon to control the expression of heterologous genes *in vivo*. This expression system promotes the expression of recombinant proteins under conditions of oxidative stress, such as that imposed to the microorganism in the macrophage environment. To investigate the vaccine potential of DLCs, three genes were selected to be cloned and expressed in *E. coli* and in attenuated salmonellas. Antigenicity and immunogenicity of these paralogous were tested in mice after immunization with purified proteins or with the recombinant salmonellas. The DLCs were proven to be very immunogenic, increasing the IgG titers. DLC1 also increased the IgE levels in the sera of animals, what could be related to allergenic reactions observed in infected population. High level of IgE can also be related to the resistance mark of people living in endemic areas. After immunization, the animals were challenged with cercarias to investigate the protective profile. It was observed that immunization with purified proteins resulted in approximately 40% decreasing in the worm burden. The analysis of the hepatic granulomas 45 days after infection indicated a significant, up to 70 %, reduction of the

granuloma areas, suggesting that immunization with DLCs promotes important interference in the hepatic granuloma formation. On the other hand, our studies with the attenuated recombinant salmonellas, carrying DLCs, showed no effective antigen presentation to the mice immune system. Taking together, the results of decreasing the worm burden and the granuloma size after immunization with purified DLCs suggest that these proteins could be considered as interesting vaccine candidates, affecting the main causes of the pathology of schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Vaccine against schistosomiasis. Attenuated salmonellas vaccine. *In vivo* protein expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Áreas de regiões endêmicas, onde são encontrados os hospedeiros intermediários de <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 2 - População de região endêmica exposta a uma área contaminada durante suas práticas diárias	26
Figura 3 - Distribuição mundial da Esquistossomose.....	28
Figura 4 - Distribuição da Esquistossomose no Brasil	29
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	31
Figura 6 - Ovo de <i>S.mansoni</i>	32
Figura 7 - Miracídio de <i>S. mansoni</i>	33
Figura 8 - Cercária de <i>S. mansoni</i>	34
Figura 9 - Esquistossômulo de <i>S. mansoni</i>	35
Figura 10 - Casal de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	36
Figura 11 - Representação esquemática dos componentes de um granuloma esquistossomótico.	39
Figura 12 - Granuloma esquistossomótico de tecido hepático de camundongo	40
Figura 13 - Desenvolvimento da resposta imune durante a infecção da esquistossomose.....	42
Figura 14 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos das dineínas de cadeia leve pertencentes à família L8 encontradas no projeto transcriptoma do <i>Schistosoma mansoni</i>	47
Figura 15 - Localização das dineínas de cadeia leve no tegumento de schistosomas	48
Figura 16 - <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium	49
Figura 17 - Esquema do sistema regulon soxRS e seu funcionamento sob estresse oxidativo.....	.52
Figura 18 - Esquema da construção do vetor pAEsox pela inserção do fragmento gênico soxR-promotor-soxS posicionado “upstream” do sítio de múltiplas clonagens no vetor pAE.....	53
Figura 19 - Perfusão dos camundongos pela artéria aorta	72
Figura 20 - Obtenção dos genes de DLCs para clonagem no vetor pAEsox	75
Figura 21 - Análise da expressão de DLCs recombinantes nas frações solúvel e insolúvel dos extratos de <i>E. coli</i> BL21 com vetor pAEDLC.....	76

Figura 22 - Análise da expressão de DLCs recombinantes nas frações solúvel e insolúvel dos extratos de <i>E.coli</i> BL21 com vetores pAEsoxDLC induzidos com paraquat	77
Figura 23 - Análise da expressão de DLCs recombinantes nas frações solúvel e insolúvel dos extrato de salmonelas (SL3261) com vetor pAEsoxDLC, induzidas com paraquat	78
Figura 24 - Purificação da proteína DLC1 a partir da fração solúvel dos lisados de <i>E.coli</i> BL21 com vetor pAEsoxDLC1 induzido com paraquat, por cromatografia de afinidade a metal.....	79
Figura 25 - Purificação da proteína DLC3 a partir da fração insolúvel dos lisados de <i>E.coli</i> BL21 com vetor pAEsoxDLC3 induzido com paraquat, por cromatografia de afinidade a metal.....	79
Figura 26 - Purificação da proteína DLC4 a partir da fração solúvel dos lisados bacterianos de <i>E.coli</i> BL21 vetor pAEsoxDLC4 induzido com paraquat, por cromatografia de afinidade a metal.....	80
Figura 27 - Dosagem de IgG total anti-DLC1 no soro de animais imunizados por ELISA..	82
Figura 28 - Dosagem de IgG total anti-DLC3 no soro de animais imunizados por ELISA	83
Figura 29 - Dosagem de IgG total anti-DLC4 no soro de animais imunizados por ELISA	84
Figura 30 - Determinação da concentração de IgE total no soro dos animais imunizados, antes e depois da infecção com cercárias	85
Figura 31 - Infecção dos animais por imersão das caudas em suspensões de cercárias	86
Figura 32 - Número de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados por camundongo nos grupos experimentais do primeiro ensaio de imunização e desafio	89
Figura 33 - Imagens dos granulomas hepáticos dos diferentes grupos de imunização	91
Figura 34 - Análise de IgG total anti DLC1 no soro de camundongos imunizados antes e depois da infecção.....	93
Figura 35 - Análise de IgG total anti DLC3 no soro de camundongos imunizados antes e depois da infecção.....	94
Figura 36 - Análise da concentração de IgE total no soro de camundongos imunizados antes e depois da infecção com cercarias	95
Figura 37 - Reconhecimento de DLC3 pelo soro de camundongos imunizados em ensaios de Western Blot.....	96
Figura 38 - Análise do reconhecimento cruzado dos soros gerado contra as DLCs sobre as proteínas purificadas	97
Figura 39 - Ensaio de reconhecimento de proteínas de diferentes frações de extratos protéicos de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> pelo soro anti DLC1.....	98

Figura 40 - Análise do reconhecimento das DLCs recombinantes pelo soro de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	99
Figura 41 - Dispositivo desenvolvido em nosso laboratório para a infecção dos camundongos por imersão das caudas em suspensões de cercárias.....	100
Figura 42 - Quantidade de vermes recuperados por camundongo com 45 ou 55 dias após a infecção	104
Figura 43 - Imagens dos granulomas hepáticos de camundongos com 45 dias de infecção.....	106
Figura 44 - Imagens dos granulomas hepáticos de camundongos com 55 dias de infecção.....	107
Figura 45 - Tamanho médio das medidas das áreas dos granulomas hepáticos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais com 45 e 55 dias após a infecção.....	108
Figura 46 - Aspecto anatômicos dos animais de cada grupo de imunização 80 dias após a infecção. A barriga dos animais vacinados com DLC era claramente menor que dos outros animais	109
Figura 47 - Fígados e Baços de camundongos dos diferentes grupos de imunização após 80 dias da infecção	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes de <i>Schistosoma mansoni</i> selecionados para esse estudo.....	48
Tabela 2 - Bactérias e vetores utilizados e suas características mais relevantes.....	55
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos parálogos de DLC indicando sítios e enzimas de restrição utilizados nas clonagens.....	56
Tabela 4 - Grupos experimentais e dosagem dos antígenos utilizados no ensaio prévio de imunização e desafio.....	65
Tabela 5 - Grupos experimentais e dosagem dos antígenos utilizados no primeiro ensaio de imunização e desafio.....	66
Tabela 6 - Grupos experimentais e dosagem dos antígenos utilizados no segundo ensaio de imunização e desafio.....	67
Tabela 7 - Análise do primeiro ensaio de imunização e desafio com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	87
Tabela 8 - Avaliação do tamanho dos granulomas hepáticos dos animais dos diferentes grupos de imunização.....	90
Tabela 9 - Análise do ensaio de infecção com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> do segundo ensaio de desafio em camundongos com 45 dias de infecção.....	102
Tabela 10 - Análise do ensaio de infecção com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> do segundo ensaio de desafio em camundongos com 45 dias de infecção.....	103
Tabela 11 - Análise do ensaio de infecção com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> do segundo ensaio de desafio em camundongos com 45 e 55 dias de infecção.....	104
Tabela 12 - Avaliação dos granulomas hepáticos dos animais nos diferentes grupos de imunização com 45 e 55 dias após a infecção.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa - aminoácido

Abs - Absorbância

Amp - ampicilina

ACN - Aconitase

BLAST - Basic local alignment search tool

BSA - albumina sérica bovina

DAB - tetrahidrocloridrato de 3,3' – diaminobenzidina

DLC - Dineína de cadeia leve

dNTP - desoxirribinucleico

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

EDTA - ácido etileno diamino tetra-acético

ELISA - Ensaio de adsorção imuno-enzimático

EndIV - Endonuclease IV

EST - Expressed Sequence Tag

F1 ori - origem de replicação do fago F1

FC - Fragmento C da toxina tetânica

FC - Flow Through

FumC - Fumarase C

G6PD - Glicose 6 fosfato desidrogenase

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

INF- γ - Interferon gama

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb - kilobase

kDa - Kilo Dalton

M - Marcador de peso molecular

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NO - óxido nítrico

Novo - novobiocina

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONSA FAPESP - Organização para análise de seqüenciamento de nucleotídeos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

OPD - O-dihidroclorato de felinodiamina

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

pb - pares de bases

PBS - salina tamponada com fosfato

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

PGSm - Projeto Genoma do Schistosoma mansoni

PIPES - piperazina-N,N'-bis (ácido 2-etanosulfônico)

psi - libras por polegada quadrada

PVDF - difluoreto de polivinilideno

Qsp - quantidade suficiente para

RBS - sítio de ligação do ribossomo

RT-PCR - Reação de Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SodA - superóxido dismutase A

soxR - promotor SoxR

SoxR - proteína soxR

SoxR@ - proteína soxR ativada

soxS - promotor SoxS

SoxS - proteína soxS

Sm - *Schistosoma mansoni*

T7 - promotor do fago T7

Th1 - células T auxiliaadoras tipo 1

Th2 - células T auxiliaadoras tipo 2

TNF- α - Tumor necrose factor alfa

TRIS - hidroxidometil amino-metano

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

WHO - World Health Organization

\emptyset - vazio

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Doenças Negligenciadas.....	24
1.2 Esquistossomose	24
1.3 Histórico da doença.....	26
1.4 Distribuição geográfica da Esquistossomose	27
1.5 Classificação e ciclo de vida do parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	29
1.6 Desenvolvimento da doença e Sintomatologia.....	37
1.6.1 Fase aguda da Esquistossomose.....	37
1.6.2 Fase crônica da Esquistossomose	38
1.6.2.1 Granuloma esquistossomótico	38
1.7 Imunobiologia da Esquistossomose	40
1.7.1 Resposta imune do hospedeiro ao <i>Schistosoma mansoni</i>	41
1.8 Desenvolvimento de vacinas contra a Esquistossomose.....	43
1.9 Estudos de genômica e proteômica do <i>Schistosoma mansoni</i> e a busca por candidatos vacinais.....	45
1.10 Dineínas de cadeia leve de <i>Schistosoma mansoni</i>	46

1.11 Salmonelas recombinantes como vetores vacinais	49
1.12 O sistema controlador do regulon soxRS	51
2 OBJETIVOS	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 Materiais	55
3.1.1 Bactérias e vetores.....	55
3.1.2 Oligonucleotídeos	56
3.1.3 Meios de cultura.....	56
3.1.4 Soluções.....	56
3.1.5 Anticorpos comerciais.....	58
3.1.6 Anestésicos	58
3.1.7 Antibióticos utilizados.....	58
3.2 Métodos	59
3.2.1 Amplificação e clonagem dos genes	59
3.2.1.1 Preparo de bactérias competentes e transformação.....	60
3.2.2 Extração de DNA plasmidial e análise dos clones.....	61
3.2.3 Indução de expressão das proteínas <i>in vitro</i>	61

3.2.4	Análise da expressão das proteínas recombinantes.....	62
3.2.5	Cultivo dos clones expressando as proteínas recombinantes em escala de 500mL.....	62
3.2.6	Purificação das proteínas recombinantes.....	63
3.2.7	Análises das proteínas purificadas recombinantes por SDS-PAGE	63
3.2.7.1	Preparo de frações de extratos proteicos de vermes.....	64
3.2.8	Imunização de camundongos e obtenção de soros com anticorpos anti-DLC	65
3.2.8.1	Preparo de soros dos animais imunizados	67
3.2.9	Análise da resposta imune induzida nos soros dos animais imunizados.....	68
3.2.9.1	ELISA	68
3.2.9.1.1	ELISA para detecção de IgG	68
3.2.9.1.2	ELISA de captura para detecção de IgE.....	69
3.2.9.2	"Western Blot"	69
3.2.10	Ensaio de desafio com cercárias.....	70
3.2.10.1	Infecção dos animais por penetração das cercárias através da cauda.....	71
3.2.10.2	Perfusão hepática dos camundongos para recuperação de vermes	71
3.2.11	Avaliação dos granulomas hepáticos	73
3.2.12	Teste de sobrevivência e avaliação patológica dos camundongos.....	73

4 RESULTADOS	74
4.1 Clonagem dos genes de DLC1, DLC3 e DLC4 em vetor pAEsox.....	74
4.2 Clones bacterianos e expressão das proteínas recombinantes	75
4.3 Purificação das proteínas recombinantes	78
4.4 Ensaios de imunização e desafio.....	80
4.4.1 Primeiro ensaio de imunização e desafio	81
4.4.1.1 Análise das respostas imunes induzidas nos camundongos do primeiro ensaio de imunização e desafio	81
4.4.1.1.1 Análises por ELISAs	81
4.4.1.2 Análise da carga parasitária dos animais do primeiro ensaio de imunização e desafio.....	85
4.4.1.3 Avaliação dos granulomas hepáticos dos animais do primeiro ensaio de imunização e desafio	90
4.4.2 Segundo ensaio de imunização e desafio	92
4.4.2.1 Análise das respostas imunes induzidas nos camundongos do segundo ensaio de imunização e desafio	92
4.4.2.1.1 Análises por ELISAs	92
4.4.2.1.2 Análise da resposta imune dos camundongos dos ensaios de imunização e desafio por "Western Blot"	96
4.4.2.1.2.1 Reconhecimento de anticorpos anti-DLC3 pela proteína recombinante após imunização com a proteína purificada ou com a SL-DLC3.....	96

4.4.2.1.2.2 Reconhecimento cruzado de anticorpos anti-DLCs pelas DLCs recombinantes.....	97
4.4.2.1.2.3 Reconhecimento de DLCs nativas em extratos de verme de <i>S.mansoni</i> por soros anti-DLC1.....	98
4.4.2.1.2.4 Avaliação da antigenicidade das DLCs	99
4.4.2.3 Análise da carga parasitária dos animais do segundo ensaio de imunização e desafio.....	100
4.4.2.4 Avaliação dos granulomas hepáticos dos animais do segundo ensaio de imunização e desafio	105
4.4.2.5 Análise do teste de sobrevivência e avaliação patológica dos camundongos	109
5 DISCUSSÃO	111
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS.....	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças negligenciadas

Estudos da Organização Mundial da Saúde apontam um grupo de doenças infecciosas que, considerando o alto impacto devido ao número de pessoas afetadas e importante alteração na qualidade de vida dessas pessoas, recebem pouco investimento para pesquisas e desenvolvimento de tratamentos. Essas doenças são por isso denominadas negligenciadas. O grupo das doenças negligenciadas compreende hoje 13 infecções (bacterianas e parasíticas) que ocorrem principalmente em países tropicais, especialmente em população de países de baixa renda. Essas doenças são promovidas em condições de pobreza e falta de saneamento, ocorrendo principalmente em áreas rurais em países das Américas, África e Ásia. Em geral produzem infecções crônicas, resultando em longos períodos de inaptidão, com significativo impacto no desenvolvimento econômico e educacional de populações (BOTTAZI *et al.*, 2006; HOTEZ *et al.*, 2006). Entre as doenças negligenciadas que ocorrem no Brasil está a esquistossomose.

1.2 Esquistossomose

Popularmente conhecida como xistose, doença do caramujo, barriga d'água ou bilharsíose, a esquistossomose é considerada uma das mais importantes doenças helmínticas, endêmica em muitas regiões no mundo. Estima-se que mais de 600 milhões de pessoas estejam em área de risco, em 76 países, incluindo o Brasil. Aproximadamente 200 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que cerca de 10% desses indivíduos podem desenvolver sintomas graves, e chegar a óbito (WHO, 2006). No Brasil, mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas e 2.5 milhões apresentam sintomas da doença (CARVALHO *et al.*, 2008). Dentro da clínica médica, a esquistossomose possui causa etiológica e modelo biológico de transmissão. É uma doença parasitária causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma* e seu diagnóstico é realizado com base em exames parasitológicos, clínicos e laboratoriais. O modelo biológico envolve a contaminação de coleções hídricas por fezes ou urina de indivíduos infectados contendo ovos de schistosoma. Essa contaminação pode ocorrer em função da eliminação de dejetos próximos às margens de rios, córregos, lagoas e

açudes, prática comum nas populações rurais, ou por despejo direto dos dejetos nas coleções hídricas dulcícolas. Seja qual for a forma de contaminação, ela se dá onde não há rede adequada de esgoto sanitário (Figura 1). Ao entrar em contato com a água, os ovos de esquistossomos eclodem liberando as larvas ciliadas, os miracídeos, que infectam o hospedeiro intermediário, o caramujo. Depois de passado o estágio de maturação, são liberadas as formas infectantes para os seres humanos, as cercárias. Quando os hospedeiros entram em contato com a água contaminada, seja para lazer ou para práticas diárias ficam expostos à infecção (Figura 2) (BARBOSA *et al.*, 2008).

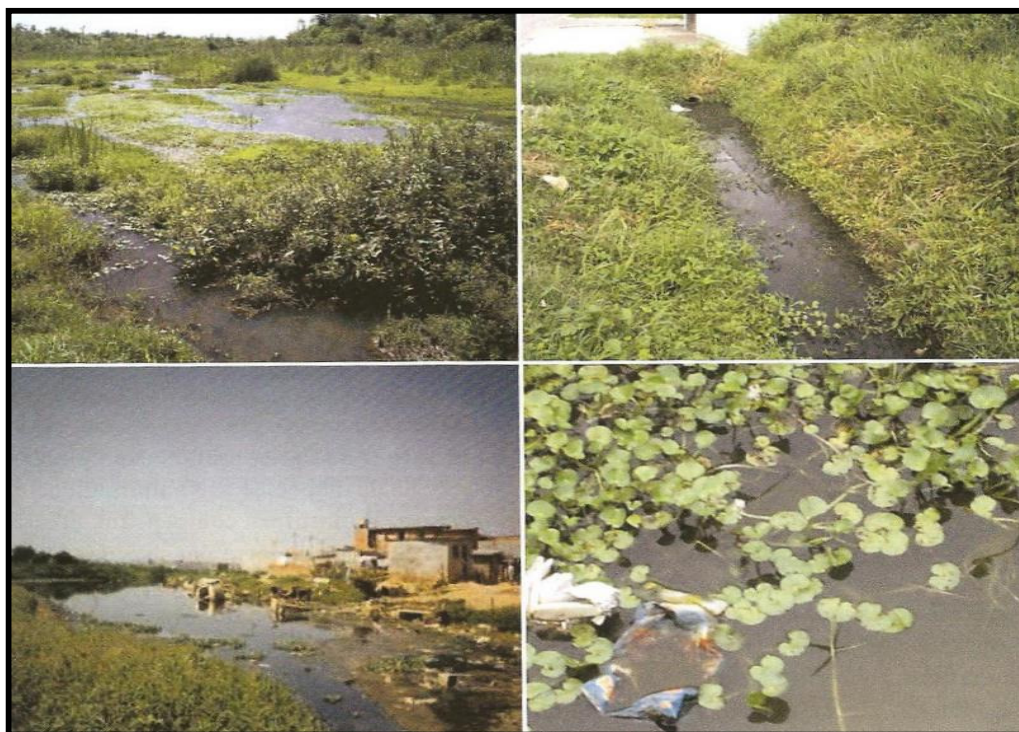


Figura 1 – Áreas de regiões endêmicas, onde são encontrados os hospedeiros intermediários de *S. mansoni*.

FONTE: Carvalho *et al.*, 2008.

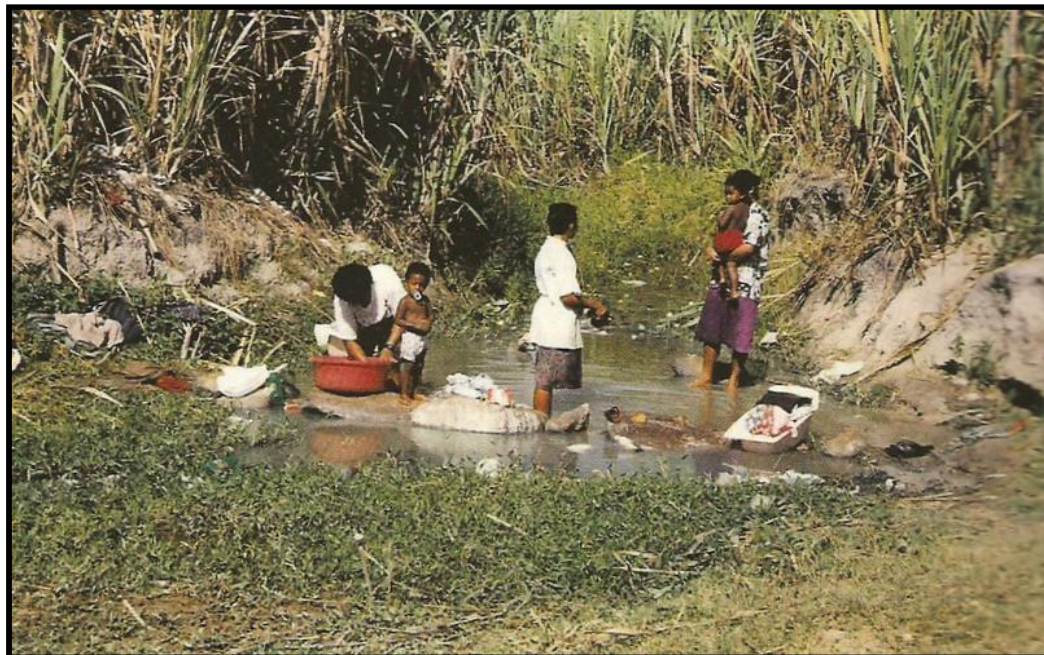


Figura 2 – População de região endêmica exposta a uma área contaminada durante suas práticas diárias.

FONTE: Carvalho *et al.*, 2008.

1.3 Histórico da doença

A origem do gênero *Schistosoma* é um assunto controverso. Alguns autores afirmam que o parasita e os moluscos hospedeiros intermediários a ele relacionados evoluíram na Gondwana antes da desintegração da Pangéia, e chegaram à Ásia pela placa indiana nos últimos 50 milhões de anos. Nessas condições, os ancestrais do helminto e dos moluscos transmissores já conviveriam nos territórios que hoje constituem a América do Sul e a África. Outros autores, porém, sugerem, através de estudos filogenéticos moleculares, que o gênero *Schistosoma* originou-se na Ásia e que um descendente colonizou a África, onde passou por extensa radiação, tornando-se parasita exclusivo dos moluscos planorbídeos. Depois recolonizou a Ásia e diversificou em grupos de espécies com ovos de espícula lateral e terminal (PARAENSE, 2008).

Investigando a filogenia molecular em sete espécies diferentes de esquistossomos, há sugestões de que eram parasitas de ruminantes e roedores na África de 1 a 10 milhões de anos, quando os primeiros homínídeos invadiram as savanas, ambientes favoráveis para a transmissão de parasitas. Os parasitas teriam sido transferidos da África para o hemisfério ocidental durante a época do tráfico de escravos (DESPRÈS *et al.*, 1992 , 1993).

Os relatos dos primeiros parasitismos de esquistossomas em humanos provem do Egito através de registros históricos por autores que incluem Homero, Hipócrates e Heródoto. Este se referia ao Egito como a terra onde os homens menstruavam, devido a hematúria decorrente da infecção por *S. haematobium*. Outras referências aparecem em escritos de historiadores do Egito medieval, onde o sintoma hematúria era conhecido como doença âââ, sendo mencionado em papiros escritos a cerca de 3.500 anos. O caso mais antigo de esquistossomose humana de que se tem notícia foi identificado por imunodiagnose (ELISA) na múmia de um adolescente egípcio, infectado por *S. haematobium*, que viveu há mais de 5.000 anos (DEELDER *et al.*, 1990). Ovos de *S. japonicum* também foram encontrados em múmias chinesas com cerca de 2.100 anos (ZHOU *et al.*, 1994).

As primeiras observações sobre o agente etiológico da esquistossomose foram feitas em 1851, no Egito pelo patologista alemão Theodor Bilharz, quando encontrou um helminto na veia porta ao necropsiar um jovem. Os ovos desse parasita possuíam espícula terminal. Em 1902, Manson descobriu outra espécie de *Schistoma*, o *Schistosoma mansoni*, que possuía ovos com espículas laterais, os quais eram depositados no reto, diferente da outra espécie, cujos ovos eram encontrados na bexiga (PARAENSE, 2008).

No Brasil, o primeiro relato de esquistossomose se dá em 1908, quando Pirajá da Silva, examinando o sangue fresco de um adolescente nativo de Salvador-Bahia, encontrou hematozoários. Examinando as fezes do rapaz, encontrou ovos muito semelhantes aos que Manson havia encontrado anteriormente e mais tarde foi verificado que se tratava de ovos de *Schistosoma mansoni* (FALCÃO, 2008).

1.4 Distribuição geográfica da Esquistossomose

Há três espécies de *Schistosoma* com grande distribuição mundial (Figura 3) que possuem maior importância quanto à infecção no hospedeiro definitivo: *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni* que desenvolvem a doença em humanos e *Schistosoma japonicum* que parasita grande diversidade de mamíferos, incluindo animais selvagens e domésticos.

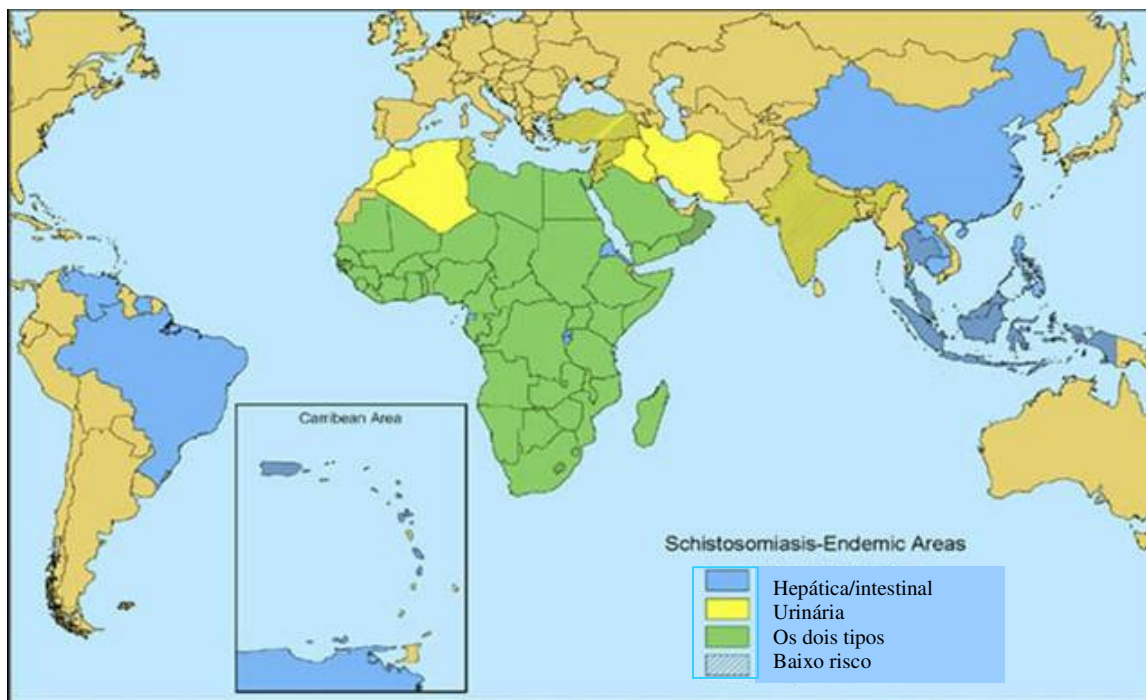


Figura 3 – Distribuição mundial da Esquistossomose.

FONTE: Adaptado de <http://www.nathnac.org/>, 2009.

Segundo Mahmoud (2001), O *S. haematobium* ocorre no norte africano e ilhas próximas ao Oceano Atlântico, além de regiões na Ásia e no Irã. O *S. japonicum* é a maior causa de esquistossomose humana no sudeste asiático e em algumas ilhas do oeste do Oceano Pacífico. Este parasita era comum na China, Japão e algumas ilhas das Filipinas.

O *S. mansoni* ocorre em muitas regiões do continente africano, na costa mediterrânea, no sudeste asiático e em ilhas no leste do Pacífico. Ocorre também em países mais jovens e possivelmente tenha sido introduzido na América, a partir do tráfico de escravos africanos. Na América latina o parasita é encontrado em diversos países como: Suriname, Venezuela e em algumas ilhas do Caribe. No Brasil, a doença ocorre em diversos estados, principalmente na região nordeste, sendo os estados de Minas Gerais e Bahia os que apresentam maior incidência (Figura 4).

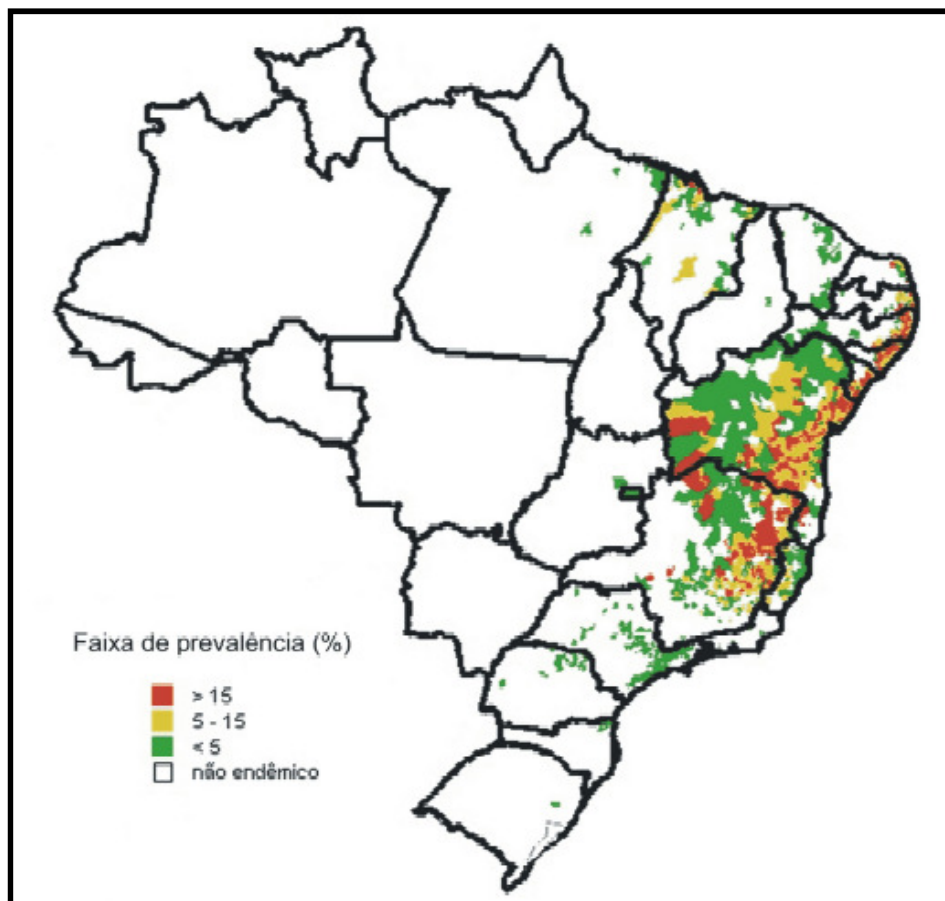


Figura 4 – Distribuição da Esquistossomose no Brasil.

FONTE: (Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2009).

1.5 Classificação e ciclo de vida do parasita *S.mansoni*

Em relação à posição taxonômica, e a classificação dos helmintos, o *Schistosoma mansoni* se encontra assim classificado:

- Filo Platyhelminthes (GEGENBAUER, 1859)
- Classe Trematoda (RUDOLPHI, 1808)
- Subclasse Digenea (CARUS, 1863)
- Ordem Strigeiforme (LA RUE, 1926)
- Superfamília Schistosomatoidea (STILES e HASSAL, 1898)
- Família Schistosomatidae (STILES e HASSAL, 1898)
- Gênero *Schistosoma* (WEILAND, 1858)
- Espécie *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907).

O Schistosoma é um parasita platelminto da classe trematódea que se alimenta de sangue e é o causador da esquistossomose em humanos. Seu ciclo de vida tem duas fases distintas, uma fase assexuada que ocorre num hospedeiro intermediário, um molusco (gênero *Biomphalaria* no caso do *S. mansoni*), e uma fase sexuada em um hospedeiro mamífero.

Quando ocorre a liberação de ovos de Schistosoma nas fezes de pessoas infectadas, as cápsulas ovíferas de parede fina eclodem e os miracídios são liberados no meio. Os miracídios são bem supridos com receptores sensoriais e procuram a espécie particular de caramujos de água doce. Após a penetração no caramujo, transformam-se em esporocistos (“germ ball”) que se diferenciam para liberação como cercárias no estágio seguinte. As cercárias deixam os hospedeiros intermediários e, em contato com a pele humana, se infiltram utilizando enzimas e movimentos de penetração muscular. Assim que penetram no hospedeiro definitivo perdem a cauda diferenciando-se em esquistossômulos, estes agora percorrem a corrente sanguínea, primeiro para os pulmões, depois para o fígado e finalmente para veias do intestino ou da bexiga. Durante este período os esquistossômulos maturam tornando-se vermes adultos. Os esquistossomas adultos são dióicos, com um macho e uma fêmea pareados por toda a vida. Ao por ovos, a fêmea se protraí a partir do sulco do verme macho e deposita os ovos nas pequenas vênulas intestinais. Depois disso os ovos rompem as vênulas utilizando espinhos e enzimas em direção à luz intestinal e são liberados nas fezes do hospedeiro, reiniciando o ciclo (Figura 5) (RUPPERT e BARNES, 1996).

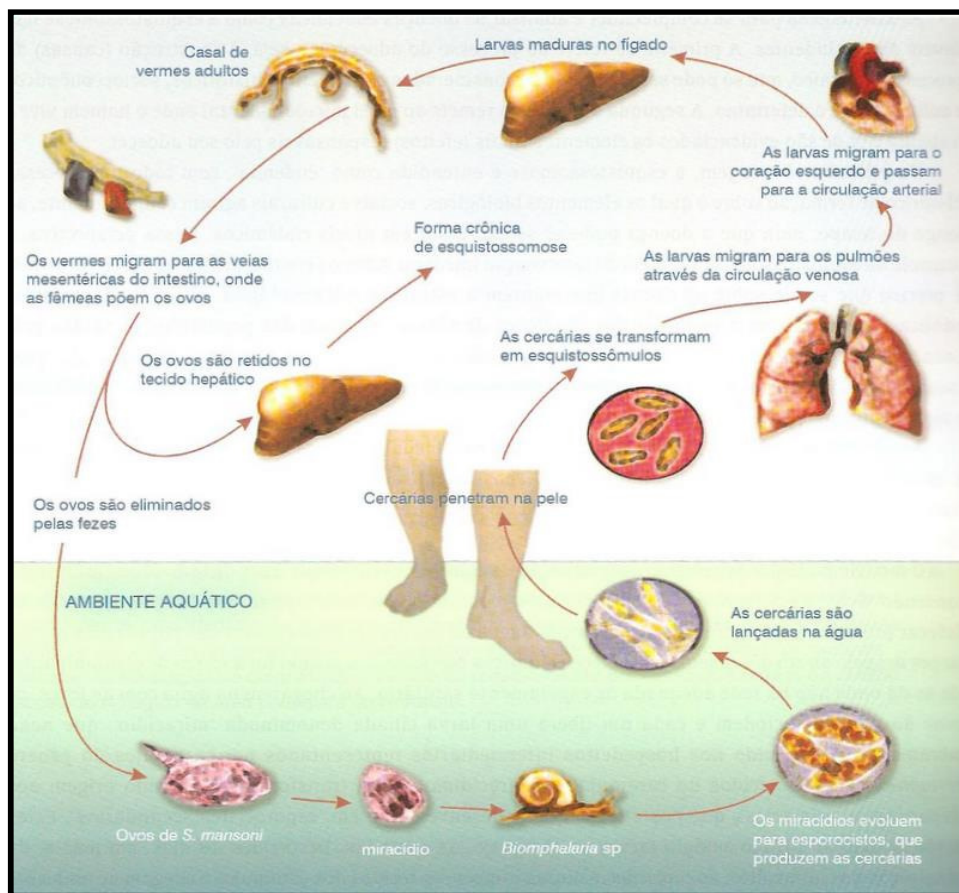


Figura 5 – Ciclo de vida do *S. mansoni*.

FONTE: BARBOSA *et al.*, 2008.

O desenvolvimento do *S. mansoni* inicia quando os ovos são liberados nas fezes de hospedeiros definitivos infectados. O ovo (Figura 6) é composto por células produzidas por dois diferentes órgãos das fêmeas: glândulas vitelínicas e ovário. Estudos indicam que o sexo do helminto já é cromossomicamente definido no ovo fertilizado (RIBEIRO-PAES e RODRIGUES, 1997). O miracídio do sexo feminino é heterozigoto e o macho, homozigoto. Por microscopia eletrônica o ovo foi caracterizado como uma casca protéica com uma densa série de microspinhos na sua parte externa e, internamente, maior conteúdo corresponde às células vitelínicas com citoplasma rico em mitocôndrias, gotículas de gordura, vesículas de vários tipos e inclusões granulares. Os ovos maduros (com um miracídio formado) medem 150 μm de comprimento médio por 65 μm de largura e são facilmente reconhecidos pela presença de um espinho lateral situado no pólo posterior do ovo. Os ovos possuem uma membrana que circunda o miracídio. Essa membrana é separada da casca por um espaço de 1 μm , o qual é preenchido por material granular. Por imunocitoquímica se verifica que a região da membrana é onde há maior atividade de secreção de proteínas, o que sugere que esta

camada é uma fonte secretora mais importante do que o miracídio. A secreção do ovo contribui para a sua travessia dos tecidos digestivos até atingir a luz intestinal, onde são eliminados com as fezes. Depois de eliminado a longevidade do ovo depende da temperatura e umidade (SILVA *et al.*, 2008).



Figura 6 – Ovo de *S.mansoni*.

O miracídio (Figura 7) possui uma forma cilindrocônica e mede cerca de 160-180 μm de comprimento por 60 μm de largura. A sua superfície é composta por 21 placas epidérmicas ciliadas, anucleadas, ligadas por junções septadas, as quais são ligadas a cristas que estão conectadas aos corpos celulares. Os cílios aumentam de tamanho da região anterior para a posterior. Em seu tegumento há pregas não ciliadas e retráteis, contendo a abertura de glândulas (adesivas e de penetração) e numerosos receptores sensoriais (SILVA *et al.*, 2008). Através da análise transcriptômica foi confirmada a presença de componentes de um sistema de detecção de luz (parálogo de rodopsina e rodopsina quinase) consistente com o fototropismo positivo (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003).



Figura 7 – Miracídio de *S. mansoni*.

FONTE: <http://www.parasitobiomed.blogspot.com>, 2008.

O sistema excretor é composto de dois pares de células em flama ou solenócitos que possuem conexão com o exterior nas laterais do corpo, Esses sistemas teriam a função de regular os fluidos internos e eliminar produtos de excreção. Nos ovos prestes a eclodir, o miracídio pode ser visto com movimentos de extensão e retração, batimento dos cílios e atividade dos solenócitos. No ambiente aquático, os miracídios eclodem do ovo devido à hipotonicidade do meio, o que promove a passagem de água para o interior da casca. Isso ocorre em determinada temperatura (ótima, em torno de 28 °C) e luminosidade e também devido a própria movimentação do embrião. Como o ovo não é operculado, a ruptura da casca ocorre em seu ponto de menor resistência que se apresenta como uma fenda oblíqua.

Após eclodirem dos ovos, os miracídeos nadam ativamente até o encontro de um hospedeiro. Quanto maior a sua atividade sem encontrar um hospedeiro, menor será a capacidade de infectá-lo. Uma das características da interação de *S. mansoni* com o molusco, é o seu grau de especificidade, que se inicia através da atração pelo molusco e continua com o desenvolvimento do miracídio nas fases intramolusco. O encontro do hospedeiro intermediário está ligado à presença de quimiorreceptores que são capazes de detectar substâncias presentes no muco produzido pelo molusco, atraindo ou repelindo o miracídio (HAAS, 1995). Os miracídios quando entram em contato com uma parte mole do molusco iniciam a penetração por secreções glandulares e movimentos rotatórios. A invasão dura de três a quinze minutos, cada molusco poderá ser infectado por apenas um miracídio. Nas fases seguintes no estágio intra-molusco, as células germinativas se dividem e se diferenciam

formando os esporocistos do mesmo sexo do miracídio infectante. Um único miracídio pode dar origem aproximadamente entre 100 a 300 mil cercárias (SILVA *et al.*, 2008).

A transição do caramujo para a vida livre requer que a cercária (Figura 8) atravesse o poro de nascimento no esporocisto e que esteja em condições de sobreviver no ambiente aquático, apresentando intensa locomoção e capacidade de localizar e penetrar em um hospedeiro vertebrado. Assim como os miracídios, as cercárias também possuem uma proteína semelhante à rodopsina que está ligada ao fototropismo positivo. A luz induz a eliminação das cercárias, ocorrendo preferencialmente nas horas mais claras do dia (REY, 2001).



Figura 8 – Cercária de *S. mansoni*.

FONTE:<http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/esquistossomose/esquistossomose.php>,2008.

A cercária mede aproximadamente 500 μm de comprimento e tem uma organização complexa, com corpo alongado e cilíndrico, com cauda de extremidade curta e bifurcada, fundamental para o deslocamento no ambiente. As cercárias no ambiente respondem a diversos estímulos: turbulência e escuridão aumentam o período de natação, enquanto que os estímulos químicos da pele são os mais estimulantes, pois causam constante natação e mudança de direção (CURWEN e WILSON, 2003). Não há evidência de movimento em relação ao hospedeiro, sendo aceito que a cercária responde a gradientes térmicos (MCKERROW, 2003). Porém quanto maior a movimentação das cercárias, maior a chance de encontrar um hospedeiro. A partir do contato com o hospedeiro a cercária precisa se fixar, invadir e migrar através da pele, em uma série de eventos que envolvem a resposta a sinais químicos do hospedeiro e alterações morfológicas da larva. As contrações e alongamentos das cercárias provocam o contato dos espinhos do tegumento com a pele do hospedeiro, o que

pode levar a uma abrasão e alargamento da cavidade de penetração. No processo de invasão, o qual não passa de 15 minutos, a cercária perde a cauda e o corpo começa a migração através da pele do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2008).

A transição de vida livre para uma vida parasitária, com diferenças de temperaturas, concentração de açúcar e osmolaridade, induz mudanças bioquímicas e morfológicas nas cercárias. A transformação das cercárias em esquistossômulo (Figura 9) é representada por respiração anaeróbica, perda da cauda, eliminação progressiva do glicocálix, esvaziamento das glândulas secretoras e reorganização do tegumento. A partir da penetração no hospedeiro vertebrado, o tegumento se torna especializado para absorção e secreção e para atuar como sítio das ações imunológicas do hospedeiro. Após a invasão da pele e o início da transformação em esquistossômulo, o parasita necessita se deslocar da epiderme em direção à derme e sair para via sanguínea ou linfática.

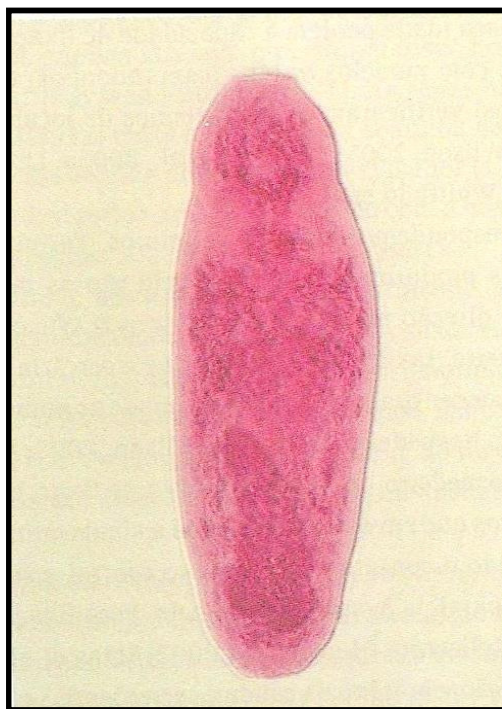


Figura 9 – Esquistossômulo de *S. mansoni*.
FONTE: CARVALHO *et al.*, 2008.

Após saírem da pele, os esquistossômulos invadem um vaso sanguíneo, passam pela pequena circulação e chegam aos pulmões, por volta de quatro a cinco dias após a infecção. Permanecem no pulmão cerca de dois a três dias e começam as mudanças de dimensões e atividades, sendo estes talvez pré-requisitos para a migração em direção ao fígado (REY,

2001). Os primeiros esquistossômulos chegam ao fígado com cerca de uma semana após o início da infecção. Nesta migração ocorrem mudanças fisiológicas e morfológicas capacitando os esquistossômulos a se transformar em vermes adultos. No fígado ocorre a diferenciação dos vermes para a fase adulta (Figura 10); os machos maturam antes das fêmeas com a formação do canal ginecóforo e definição dos lobos testiculares. A membrana externa tem característica heptalaminar com invaginações. O tegumento se liga às células subtegumentares por conexões aos microtúbulos (SILVA *et al.*, 2008).



Figura 10 – Casal de vermes adultos de *S. mansoni*.
FONTE: CARVALHO *et al.*, 2008.

Os vermes machos apresentam corpo esbranquiçado com comprimento médio de 10 mm. Na região anterior estão presentes a ventosa oral e a ventral, maior e mais proeminente do que a ventosa oral. A superfície entre as ventosas não apresenta tubérculos, espinhos e

papilas sensoriais. O canal ginecóforo alberga uma fêmea. As fêmeas apresentam comprimento médio de 14 mm, duas pequenas ventosas, corpo filiforme, mais escura que os machos, com coloração castanho-escura devido à maior taxa de ingestão e quebra de hemoglobina em hemozoína (OLIVEIRA *et al.*, 2000). O corpo é mais simples do que o dos machos, com a superfície inteira escavada e com poucos espinhos presentes, principalmente na extremidade posterior. Após o acasalamento, as fêmeas sofrem modificações ultraestruturais e metabólicas, tais como a diferenciação celular com produção de células vitelínicas. O acasalamento é fundamental para a manutenção da maturidade sexual das fêmeas, incluindo a produção de ovos (SILVA *et al.*, 2008).

1.6 Desenvolvimento da doença e Sintomatologia

A esquistossomose é seriamente debilitante e pode ser letal. A penetração dos ovos através da parede intestinal e da bexiga, o alojamento dos ovos em vários órgãos e os estágios de desenvolvimento no pulmão e no fígado podem causar inflamação, necrose ou fibrose, dependendo do grau de infecção. A resposta imunológica aos ovos é geralmente mais patogênica do que a resposta aos esquistossômulos ou aos vermes na fase adulta. (MAHMOUD, 2001; RUPPERT e BARNES, 1996).

A esquistossomose se apresenta no homem sob a forma aguda ou formas crônicas.

1.6.1 Fase aguda da Esquistossomose

A fase aguda da esquistossomose geralmente só é percebida em pessoas de área não endêmica e é dependente do número de cercárias infectantes. A não ocorrência desta fase em indivíduos de áreas endêmica pode estar relacionada ao fato dos fetos receberem informações imunológicas quando estão no útero de uma mãe sensibilizada, o que os permite responder à infecção de maneira diferente de indivíduos que nunca foram expostos ao parasita (PEARCE e MACDONALD, 2002). A intensidade da fase aguda varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme. Inicialmente, surgem coceira e vermelhidão no local de penetração da cercária com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a infecção. Após três a sete semanas de exposição, a doença é caracterizada por: febre, anorexia, dor abdominal e cefaléia. O paciente pode apresentar em menor

frequência, diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca. Durante o exame físico, pode-se detectar a hepatoesplenomegalia, isto é, o fígado e o baço aumentados de tamanho. O exame laboratorial aponta eosinofilia bastante elevada e, quando associado a dados epidemiológicos e clínicos, fecha-se o diagnóstico da esquistossomose aguda. Dificuldades em definir o diagnóstico da forma aguda da esquistossomose são frequentes, notadamente antes do surgimento dos ovos nas fezes (PORDEUS *et al.*, 2008; SUCEN, 2008).

1.6.2 Fase crônica da doença

A doença começa a tornar-se crônica a partir dos seis meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos. A doença crônica é graduada de acordo com a severidade, aparecem os sinais e sintomas de evolução da patologia no acometimento de vários órgãos. As manifestações clínicas variam, a depender da localização do parasito e da intensidade da carga parasitária, podendo apresentar as formas: intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e até neurológicaesplênica. A forma crônica intestinal pode se apresentar leve, geralmente assintomática, atingindo a maioria absoluta dos indivíduos infectados que vivem nas áreas endêmicas. O sintoma mais comum é a diarreia e pode acontecer perda de apetite, cansaço e dor abdominal à palpação. Na forma hepatointestinal os sintomas são os mesmos que na forma intestinal, porém mais acentuados. A forma hepatoesplênica tem este nome devido a lesões no fígado e baço. Geralmente é a forma mais severa e é usualmente acompanhada de grave fibrose periportal e hepática, além de hipertensão portal e obstrução de vasos sanguíneos, os quais podem romper-se causando hemorragia. O indivíduo queixa-se de tumor na barriga, já que fígado e baço estão muito aumentados de volume. Pode haver aumento do volume abdominal por ascite. Esta forma é observada mais frequentemente nas áreas em que ocorrem mais casos no Brasil: Nordeste e Minas Gerais (ANDRADE, 2008; PORDEUS *et al.*, 2008; SUCEN, 2008).

1.6.2.1 Granuloma esquistossomótico

Após maturação em vermes adultos no hospedeiro definitivo, ocorre a migração até os vasos venosos mesentéricos, próximos ao intestino, onde se dá o acasalamento e início da postura de ovos. Parte dos ovos é eliminada pelo lúmen intestinal e parte fica retida em vários

órgãos (parede intestinal, fígado, pâncreas, pulmões e outros). Os ovos, uma vez retidos nos tecidos, começam a liberar antígenos provocando uma reação inflamatória chamada de reação granulomatosa, ou granuloma (Figuras 11 e 12). O granuloma consiste em uma entidade organizada onde são encontradas diversas células migrantes do sistema imune, proteínas de adesão, componentes de matriz extracelular e fatores de crescimento e angiogênese, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo individualmente. Os granulomas apresentam componente exudativo e, com a secreção, ocorre a mobilização de grande quantidade de eosinófilos, linfócitos e macrófagos, determinando regiões de necrose e grande inflamação. Dependendo da localização, o granuloma pode relacionar-se a formas graves de fibrose hepática, aumento da pressão periportal, hepato e esplenomegalia (ANDRADE, 2008). De fato, os ovos de *Schistosoma* ou mesmo extratos de ovos são capazes de induzir a reação granulomatosa e também interagem com células endoteliais, induzindo a produção de citocinas que vão facilitar os mecanismos de adesão do ovo (LENZI *et al.*, 2008). Assim que o ovo morre, o granuloma diminui, deixando placas fibrosas em seu lugar. Essas placas aumentam a pressão sanguínea portal, assim como o diâmetro da veia porta (LENZI *et al.*, 2008; PEARCE e MACDONALD, 2002).

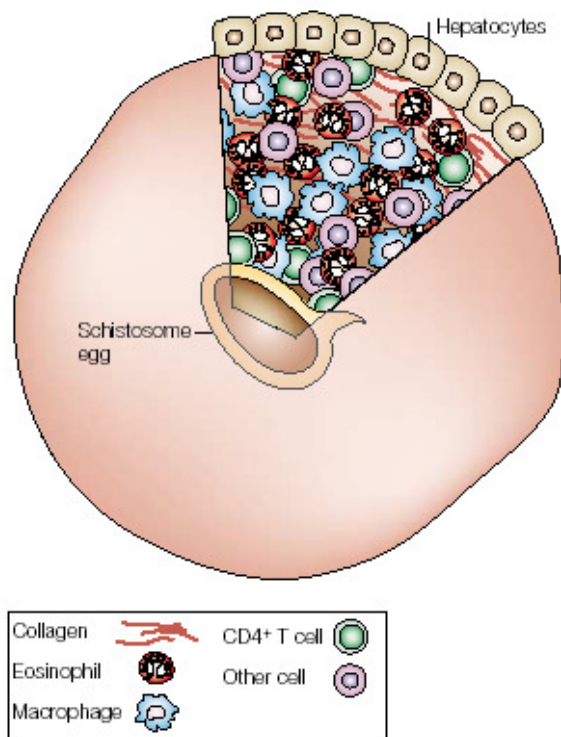


Figura 11 – Representação esquemática dos componentes de um granuloma esquistossomótico.
 FONTE: PEARCE e MACDONALD, 2002.

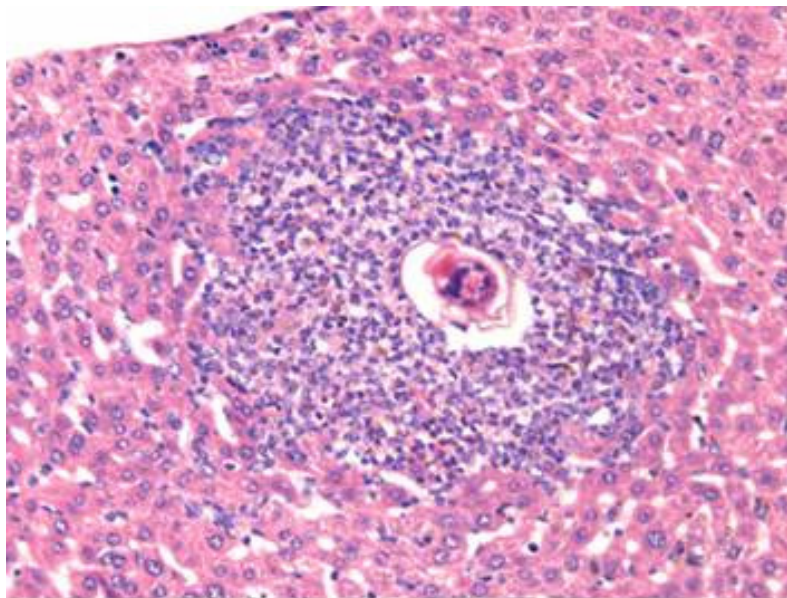


Figura 12 – Granuloma esquistossomótico de tecido hepático de camundongo.

Grande parte da patologia da esquistossomose está associada ao depósito de ovos do parasita nos tecidos do hospedeiro, especialmente no fígado, causando granulomas. A presença do ovo é tóxica para o hospedeiro e o granuloma é uma forma de contenção. Paradoxicamente às lesões que os granulomas causam no hospedeiro, eles representam uma forma de defesa contra os componentes tóxicos dos ovos de esquistossomas. Camundongos que não possuem a capacidade de formar granulomas apresentam sérios danos hepatotóxicos e morrem rapidamente (LENZI *et al.*, 2008; PEARCE e MACDONALD, 2002).

1.7 Imunobiologia da esquistossomose

A resposta imune está intimamente ligada ao desenvolvimento das patologias que acompanham a infecção. Alguns indivíduos infectados podem resistir a superinfecção e os esquistossomas podem sobreviver por muitos anos no hospedeiro, apesar da forte resposta imune contra eles. Já foi visto que a maturação e a fecundidade dos esquistossomas de alguma forma são dependentes da resposta imune do hospedeiro (PEARCE e MACDONALD, 2002). Neste processo de coevolução entre parasita-hospedeiro, o esquistossoma desenvolveu diversas formas para facilitar a sua sobrevivência. Uma das chaves de sucesso de

adaptação e sobrevivência do parasita no hospedeiro é a sua superfície de contato com o meio externo, o tegumento, que proporciona diversas vantagens ao seu desenvolvimento. Mudanças no tegumento que resultam na maturação do parasita e em mudanças conformacionais (transformação da camada trilaminada para uma camada heptalaminada) auxiliam na sua sobrevivência. Dentre as vantagens que o parasita utiliza para adaptação ao hospedeiro estão: capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro como forma de escape, ele utiliza de mimetismo antigênico, no qual o esquistossoma sintetiza moléculas similares ou rouba moléculas do hospedeiro; trocas contínuas do tegumento, recuperando áreas que possam eventualmente ter sido degradadas; possuem proteases de superfície que degradam proteínas do complemento e anticorpos; além de poder modular a expressão de proteínas de superfície, que podem ser expressas ou não em determinadas fases do ciclo de vida do parasita (ABATH e WERKHAUSER, 1996; VAN HELLEMOND *et al.*, 2006).

1.7.1 Resposta imune do Hospedeiro ao *Schistosoma mansoni*

Devido ao fato do camundongo configurar como bom modelo animal para estudo do desenvolvimento da esquistossomose, muito já se conhece sobre a resposta imune durante as diferentes etapas da infecção. Muitas diferenças também já foram apontadas entre o sistema imune de camundongos e de humanos. Utilizando animais deletados para algumas citocinas, uma rede bastante complexa respostas foi desenhada (WILSON *et al.*, 2007).

No decorrer da infecção a resposta imune progride em ao menos três fases. Entre 3 e 5 semanas, enquanto o hospedeiro está exposto a parasitas migrantes imaturos, uma resposta do tipo Th1 é dominante. Com a maturação dos parasitas, acasalamento e início da postura de ovos, entre 5 e 6 semanas do início da infecção, a resposta é alternada com diminuição da resposta do tipo Th1 e aumento de uma forte resposta do tipo Th2. Esta resposta é induzida primariamente pelos antígenos dos ovos. Durante a fase crônica da infecção, a resposta do tipo Th2 é modulada por células regulatórias do sistema imunitário, também chamadas Th0, sendo gerados granulomas menores em torno de novos ovos, em comparação com aqueles formados no início da infecção. Esta resposta mediada por células Th0 permite certa adaptação entre hospedeiro e parasita (Figura 13).

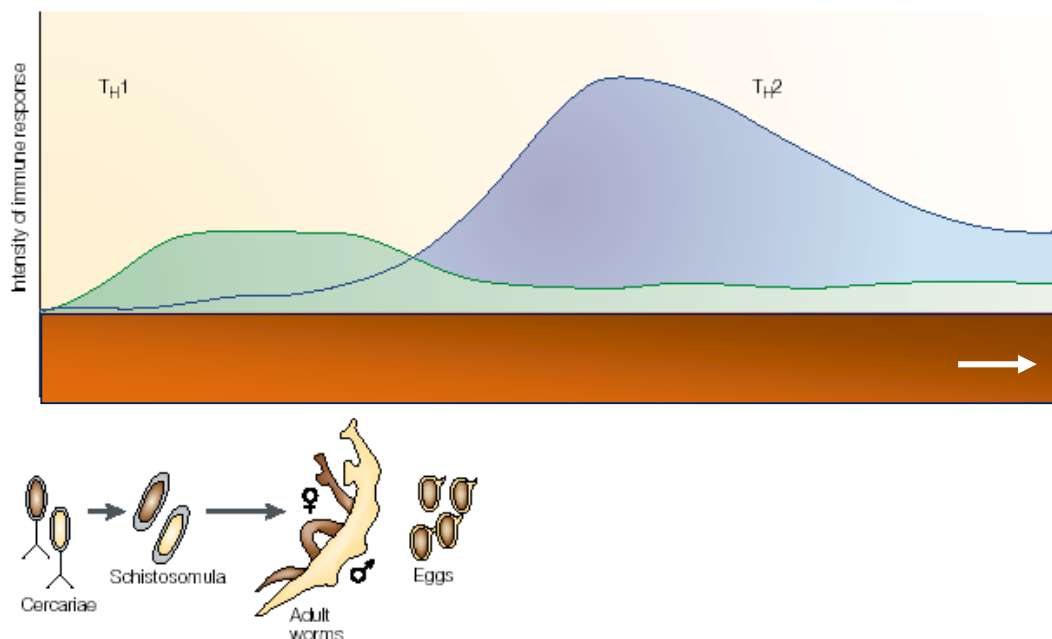


Figura 13 - Desenvolvimento da resposta imune durante a infecção da esquistossomose.
 FONTE: PEARCE e MACDONALD, 2002.

Nos primeiros estágios da infecção pode-se verificar que uma moderada resposta de células CD4 do tipo Th1 é observada envolvendo produção das citocinas INF- γ , IL-2, TNF- α atuando contra as fases iniciais de desenvolvimento do parasita. Na fase de maturação dos esquistossômulos (entre 3 a 4 semanas pós infecção) as pessoas que nunca foram expostas podem apresentar a febre de Katayama ou esquistossomose toxêmica aguda, com extrema prostração, anorexia e eosinofilia. A eosinofilia pode ser bastante acentuada mesmo antes do aparecimento dos ovos. Nos estágios de desenvolvimento do verme ocorre também a produção de NO por macrófagos e neutrófilos que sofrem apoptose. Nessa fase de resposta polarizada do tipo Th1 a citocina IL-10 possui papel central na regulação (WILSON *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2000; PEARCE e MACDONALD, 2002). Quando se inicia a postura de ovos no sangue ocorre uma mudança da resposta imune, sendo essa direcionada de maneira robusta para o tipo Th2, associada às interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-17. As IL-4 e IL-13 desempenham papel importante na fibrinogênese durante a formação dos granulonas. Os receptores dessas interleucinas, IL-4R α e IL-13R α 2 teriam um papel central na regulação, suprimindo a resposta exacerbada contra os ovos, induzindo uma adaptação parasita-hospedeiro num estágio crônico da doença. Na resposta imune aos antígenos de ovos

participam os macrófagos, mastócitos células de kupffer e eosinófilos, além de células dendríticas. Novamente a citocina IL-10 tem um papel central na regulação da resposta imune (WILSON *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2000; PEARCE e MACDONALD, 2002).

A supressão ou regulação da resposta Th2 exacerbada com participação de macrófagos, indução e NO-sintases e IL-10, promove um balanço Th1/Th2, com diminuição dos granulomas. O aumento de TNF- α nessa fase está associado com hepatoesplenomegalia, dando origem à forma crônica e severa da doença (WILSON *et al.*, 2007; PEARCE e MACDONALD, 2002).

1.8 Desenvolvimento de vacinas contra esquistossomose

O tratamento da esquistossomose consiste em quimioterapia utilizando praziquantel (TALLIMA e RIDI, 2007). Este é um fármaco barato (HAGAN *et al.*, 2000), porém com alguns problemas de efeitos colaterais, como náusea, vômito, dor abdominal, cólica aguda, diarreia sanguinolenta. O praziquantel tem eficácia parcial, não tendo efeito contra a patologia provocada pelos ovos ou contra esquistossômulos (GRYSEELS *et al.*, 2006). Por ser a única droga utilizada, teme-se o risco do tratamento selecionar uma população de esquistossomas resistentes. Além disso, o praziquantel não previne contra reinfecções, o que geralmente ocorre em regiões endêmicas. Apesar de a quimioterapia destruir os vermes, ela não trata as seqüelas causadas pelos ovos retidos nas vísceras. Portanto, uma medida preventiva seria essencial e a vacinação da população de área endêmica é bastante recomendável (HOTA-MITCHELL *et al.*, 1999).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a pesquisa da esquistossomose se concentre no desenvolvimento e avaliação de novas estratégias e ferramentas de controle da doença (WHO, 2006). A introdução, durante a última década, do tratamento da doença com drogas como o praziquantel e a oxamniquine, juntamente com o conceito de controle de morbidade em vez de controle da transmissão, levou ao pensamento errôneo de que ferramentas para o controle da esquistossomose não eram mais necessárias. Estudos posteriores mostram que embora o tratamento em massa com drogas determinasse uma redução na prevalência e intensidade da infecção, a reinfecção ocorria rapidamente. A necessidade de tratamentos repetidos em intervalos curtos, com custos operacionais importantes justifica o desenvolvimento de estratégias de controle alternativas, que possam ter

efeito duradouro. Entre estas medidas, está incluído o desenvolvimento de uma vacina eficiente e de baixo custo (DUNNE *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de vacinas contra infecções parasitárias constitui um difícil e excitante desafio, devido à complexidade do ciclo de vida dos parasitas, bem como pela diversidade de respostas imunes geradas em seus hospedeiros (DUPRÉ *et al.*, 2001). A maior dificuldade no desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose é a definição de antígenos que estimulem uma resposta imune apropriada, promovendo proteção (YANG *et al.*, 2001).

Outro fator que pode ser apontado como uma dificuldade no desenvolvimento de vacinas contra vermes é que a imunidade que ocorre em humanos resistentes é desenvolvida por um mecanismo mediado pela produção de IgE. Em humanos vários estudos demonstraram que a resistência a reinfeção é idade dependente, sendo mediada pela presença de IL-4 e IL-5. Isso por si só já é perigoso, pois uma vacina que promova a produção de IgE pode eliciar efeitos adversos indesejáveis, como a exacerbação de alergia (WILSON e COULSON, 1998; WYNN e HOFFMANN, 2000).

Estudos de genômica e proteômica de esquistosomas vêm permitindo a busca de proteínas com potencial vacinal de maneira mais sistemática. Tecnologias de sequenciamento de DNA associadas a programas de bioinformática possibilitam a identificação de proteínas e suas localizações no parasita, facilitando a busca de novos candidatos vacinais (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2007). Têm sido propostas como antígenos, em especial, proteínas do tegumento (BRASCHI, 2006), proteínas secretadas, enzimas antioxidantes e proteases (MACMANUS e LOUKAS, 2008). Alguns antígenos são apontados como capazes de conferir proteção parcial e hoje se pensa na possibilidade de uma vacina composta de diferentes proteínas, incluindo antígenos de diferentes fases do parasita no hospedeiro mamífero, e ainda antígenos de diferentes parasitas com alta incidência de co-infecção (HOTEZ *et al.*, 2008).

Muitos antígenos têm sido estudados como candidatos vacinais (MACMANUS e LOUKAS, 2008). Algumas proteínas estão sendo testadas quanto à antigenicidade e imunogenicidade protetora com subsídio especial da OMS (WILSON e COULSON, 2006). A proteína *Sm14* é uma das mais estudadas desde o início da busca por antígenos vacinais e sabe-se que ela determina proteção parcial. (RAMOS *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2005). Mais recentemente dois antígenos mostraram ser indutores de imunidade protetora, sendo uma delas um fragmento de uma tetraspanina (*SmTSP-2*), em estudo por um grupo australiano liderado pelo Dr. Alex Loukas. O outro antígeno é a *Sm29*, em estudo em um grupo de Belo

Horizonte, liderado pelo Dr. Sérgio Costa. Ambos antígenos mostraram bons resultados, com cerca de 60% de proteção (TRAN *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2008). Porém, apesar de apresentarem resultados promissores em modelos experimentais, quando foi retirado o adjuvante de Freund, o qual não é permitido para uso em humanos, os níveis de proteção diminuíram para aproximadamente 30-40% (Bergquist e COLLEY, 1998), semelhante à proteção observada com *Sm14*. Dessa forma, diversos autores concordam que a escolha destas moléculas para os testes iniciais não deve inibir a busca por novos antígenos candidatos e novos adjuvantes (BERGQUIST, 1995; DOENHOFF, 1998; WILSON e COULSON, 1998).

A proteção é medida pela inibição de desenvolvimento de vermes em ensaios de desafio. Também se considera que a redução do número de vermes em 40 % é um efeito importante. Modelos matemáticos demonstram que uma redução na parasitemia de 50% seria suficiente para causar um enorme impacto na endemia da doença (CHAN *et al.*, 1996). Outros aspectos analisados são diminuição na oviposição dos vermes e efeitos na geração de granulomas, este último como um dos mais importantes aspectos da patogênese. Neste contexto deve ser lembrado que a patologia é diretamente correlacionada ao número de ovos encontrados no hospedeiro e uma vacina deverá ter efeito tanto no impedimento da entrada de vermes como no desenvolvimento e produção de ovos (BERGQUIST, 1995).

O desenho de uma vacina eficiente será baseado não apenas na forma mais efetiva de indução de imunidade, incluindo o uso de adjuvantes adequados para aumento de resposta, mais também na facilidade e custo de produção (BERGQUIST, 1995). Possivelmente uma vacina composta de vários antígenos será necessária para efetiva proteção. A possibilidade de uma ação sinérgica pode ser aumentada pela incorporação de antígenos de diferentes fases de desenvolvimento do verme. Ainda diferentes tipos de resposta podem ser necessários e por isso antígenos e formas de apresentação, com capacidade de modulação de resposta imune, também configuram estudos importantes (BERGQUIST e COLLEY, 1998).

1.9 Estudos de genômica e proteômica do *Schistosoma mansoni* e a busca por candidatos vacinais.

A partir de meados da década de 1980, os estudos da biologia molecular do *Schistosoma* vêm possibilitando a caracterização de um grande número de moléculas e funções biológicas desse organismo. Recentemente, com o seqüenciamento de parte do genoma do parasita e os estudos de transcriptomas e proteomas, foi possível identificar novos

alvos para o desenvolvimento de vacinas e drogas para combater a esquistossomose, além de melhorar o entendimento de fenômenos biológicos do *S. mansoni* (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O projeto transcriptoma do *Schistosoma mansoni* foi desenvolvido no Brasil com suporte da rede ONSA da FAPESP, (Genoma-EST de *Schistosoma mansoni* (PGSm) (<http://verjo18.iq.usp.br/schisto/>). Através do conhecimento gerado pelo transcriptoma (Verjovisky-Almeida *et al.*, 2003) e pelo genoma (EL-SAYED *et al.*, 2004; HAAS *et al.*, 2007) do *Schistosoma mansoni* vários antígenos recombinantes vem sendo propostos. A identificação de candidatos vacinais por vacinologia reversa, ou seja, através da análise de seqüência do genoma, já foi realizada para *Neisseria meningitidis* (PIZZA *et al.*, 2000) e *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN *et al.*, 2001). Na busca de seqüências específicas, estes autores utilizaram algoritmos públicos que verificam motivos protéicos envolvidos no transporte ou ligação de proteínas à superfície celular. Os antígenos com potencial vacinal foram expressos em *E. coli* e testados quanto à indução de imunidade protetora.

1.10 Dineínas de cadeia leve de *Schistosoma mansoni*

A análise do transcriptoma do parasita *Schistosoma mansoni* possibilitou a identificação de algumas famílias de parálogos de cadeia leve de dineína (DLC); uma dessas famílias agrupa proteínas de cerca de 20 kDa, com domínios EF-hand; outra família, denominada Família L8, é composta por proteínas pequenas, de aproximadamente 10 kDa, somente com o domínio DLC (GITHUI *et al.*, 2008). Alguns membros DLC da família L8 já haviam sido caracterizados em *S. japonicum* (YANG *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2005). A primeira DLC de *S. mansoni* identificada pertencente à família L8 foi denominado *Sm10*. Esta proteína mostrou um caráter estimulador de proliferação de células T de pacientes de área endêmica (sensibilizados). Este antígeno foi testado em formulações vacinais induzindo cerca de 30% de proteção (ARGIRO *et al.*, 2000). A família L8 de *S. mansoni* possui ao menos 18 membros de proteínas ortólogas à proteína dineína de cadeia leve de mamíferos (DLC). As identidades e similaridades entre as DLC estão ilustradas na Figura 14. Verificou-se por imunolocalização que duas DLCs de *S. japonicum* se encontram no tegumento de verme adulto e que uma delas está presente apenas em machos, sendo atribuída uma função motora relacionada com o mecanismo de suporte com que ele mantém a fêmea firmemente conectada dentro do canal ginecóforo, enquanto ela reserva sua energia para a produção de ovos (HOFFMANN *et al.*, 2002).

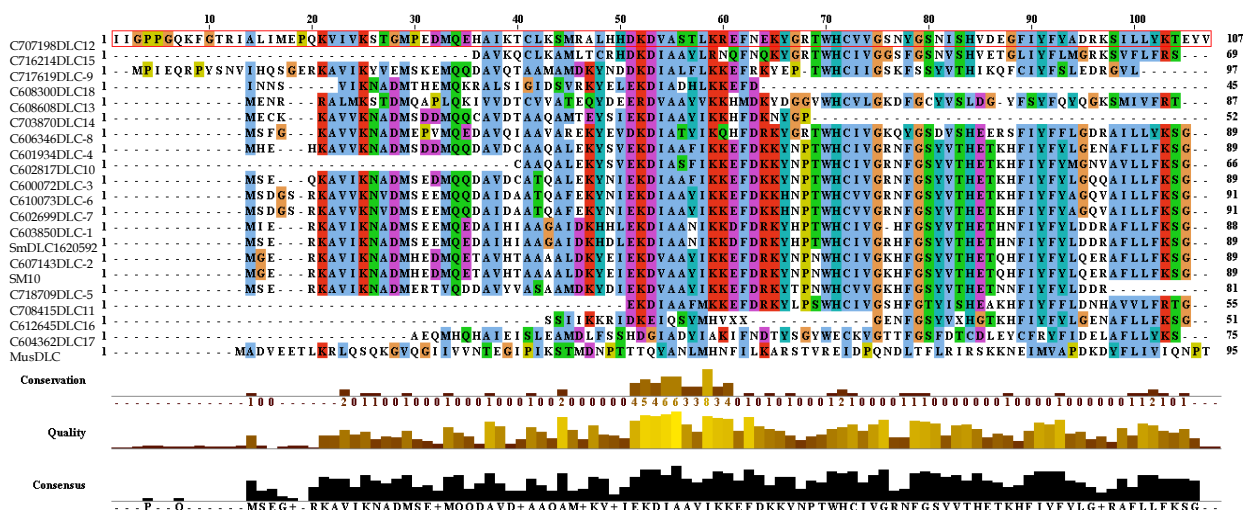


Figura 14 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos das dineínas de cadeia leve pertencentes à família L8 encontradas no projeto transcriptoma do *Schistosoma mansoni*.

Estudos mostram que o *Schistosoma* modula o sistema imune dos hospedeiros mimetizando suas proteínas, e também usando isoformas de proteínas para escapar do reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Uma das questões iniciais com relação à DLCs foi por qual motivo existiriam tantos genes codificando dineínas de cadeia leve em *S. mansoni*, provavelmente essas proteínas teriam funções diferentes, poderiam ser expressas nas diversas fases de desenvolvimento do verme, participar no transporte de nutrientes específicos, ou ainda poderia ter papel no escape do sistema imune. Considerando essas possibilidades, em um estudo inicial foram escolhidos dois genes entre os parálogos de DLCs, (C603850.1 e C608608.1, notação dos clusters do transcriptoma) para investigação. Demonstrou-se que são proteínas bastante imunogênicas, estimulando resposta imune celular e com possível papel vacinal. Os ensaios iniciais deveriam ser aprofundados e por isso demos continuidade a essa investigação. Neste estudo três parálogos de DLCs foram selecionados, sendo eles C608608.1, C707198.1 e C717619.1. Estes genes codificam seqüencialmente as proteínas DLC1, DLC3 e DLC4 de *Schistosoma mansoni* (numeração usada em nosso laboratório, Tabela 1, Figura A e B -Anexos). Na análise do transcriptoma a proteína DLC1 foi encontrada nas fases de “germ ball”, miracídeo, schistosômulo e adulto; a proteína DLC3 foi encontrada na fase de verme adulto e a proteína DLC4 foi encontrada na fase de “germ ball”. O tipo de preparo de material do projeto transcriptoma não permite afirmar se essas proteínas estão ou não presentes em outras fases do ciclo de vida do parasita, mas garante que estão presentes naquelas onde foram identificadas.

Tabela 1 – Genes de *Schistosoma mansoni* selecionados para esse estudo.

Cluster do Transcriptoma	Gene	Maior similaridade (Blast)	Fases do ciclo onde foram encontrados transcritos	Tamanho do gene (pb)	Tamanho da proteína (kDa)
C608608.1	DLC1	DLC1 de <i>Schistosoma japonicum</i>	Miracídio, esporocisto, esquistossômulo e verme adulto	267	10,37
C707198.1	DLC3	DLC citoplasmática de <i>Emericella nidulans</i>	verme adulto	273	10,60
C717619.1	DLC4	DLC3 de <i>Schistosoma japonicum</i>	Esporocisto	294	11,56

DLCs são associadas com atividades motoras e de transporte de nutrientes em células de mamíferos através de microtúbulos (COMOY *et al.*, 1998). Em *S. mansoni* ainda não foram caracterizadas as possíveis funções dessas proteínas, porém das proteínas componentes de citoesqueleto, as DLCs parecem ser as mais abundantes no tegumento (JONES *et al.*, 2004) Na Figura 15 pode-se verificar a localização das DLCs no tegumento de schistosomas.

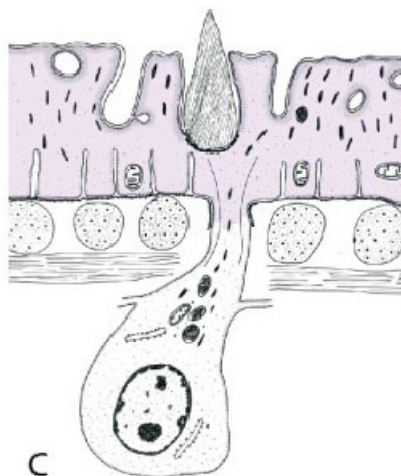


Figura 15 – Localização das dineínas de cadeia leve no tegumento de schistosomas - Indicação em lilás da localização das DLCs.
 FONTE: JONES *et al.*, 2004.

Considerando existência de tantas DLCs, suas possíveis funções e sua localização no tegumento do verme (possivelmente expostas ao sistema imune), além dos bons resultados de estudos anteriores realizados no nosso laboratório, decidimos estudar o potencial vacinal de

outros parálogos de dineínas de cadeia leve de *Schistosoma mansoni*. Propusemos também utilizar salmonelas vacinais recombinantes para apresentação desses antígenos ao sistema imune, para avaliar a contribuição da bactéria como adjuvante na modulação da resposta imune.

1.11 Salmonelas recombinantes como vetores vacinais

Salmonelas (Figura 16) são bacilos gram negativos, aeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Certas salmonelas possuem característica invasiva em mamíferos específicos. Salmonelas podem habitar o trato-intestinal dos seres humanos e muitos outros animais. Todas as salmonelas são consideradas patogênicas em algum grau, podendo causar salmonelose, gastroenterite ou febre tifóide em certas combinações de espécies de *Salmonella* e o mamífero hospedeiro. As salmonelas invasivas são caracterizadas por conseguir sobreviver em macrófagos devido aos seus mecanismos de defesa antioxidantes (TRABULSI, 1996; TORTORA *et al.*, 2000).

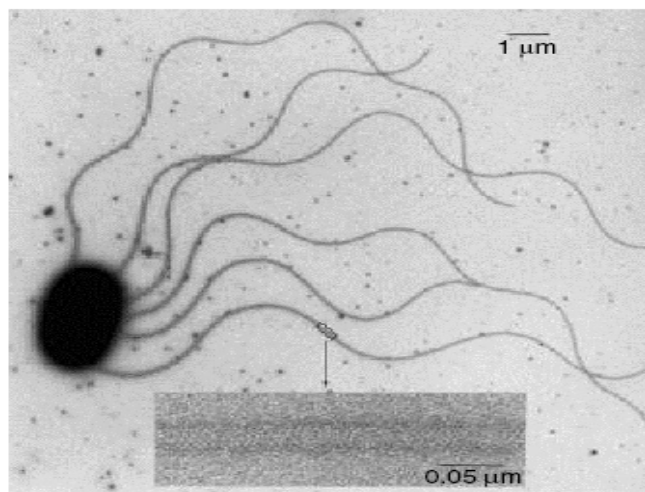


Figura 16 - *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.
FONTE: MOAT *et al.*, 2002.

A facilidade de manipulação genética de salmonelas possibilitou a geração de várias linhagens atenuadas recombinantes para expressão de antígenos heterólogos. Muitas vacinas vivas para humanos baseadas em *Salmonella* Thyphi estão em teste clínico (CVD908-htr) (ZHANG *et al.*, 2008; PACHECO *et al.*, 2005; CHEMINAY e HENSEL, 2008). Também

componentes de cápsula de salmonelas (TAGLIABUE e RAPPUOLI, 2008) e flagelinas (BEN-YEDIDIA e ARNON, 2007) têm sido propostos como adjuvantes.

Salmonelas atenuadas carregadoras de antígenos heterólogos são de particular interesse pela possibilidade de administração de vacinas por via oral, por induzirem resposta imune de mucosa ou sistêmica, humoral e celular, e ainda pela possibilidade de atuar como vacina múltipla.

Nas últimas décadas algumas linhagens vacinais de salmonelas foram bem estabelecidas, podendo constituir vacinas vivas multivalentes (GARMORY *et al.*, 2002). A atenuação em geral se baseia em limitações de sobrevivência no hospedeiro, mas as bactérias atenuadas permanecem por tempo suficiente para apresentar os antígenos e estimular a resposta imunológica (ROSENKRANZ *et al.*, 2003).

Os genomas de várias linhagens de salmonelas são conhecidos (EDWARDS *et al.*, 2002), possibilitando estudos de mecanismos de invasão e interação com os hospedeiros (RAUPACH *et al.*, 2001); seus sistemas de transporte e secreção de fatores de virulência no citosol de células fagocitárias (RUSSMANN *et al.*, 1998); seqüências sinalizadoras para localização de proteínas nos diferentes compartimentos celulares (HINDLE *et al.*, 2002); promotores no controle de expressão gênica em diferentes condições, e muitas outras características são bem conhecidas. Esses dados permitem a elaboração de salmonelas vacinais através de manipulação genética, não somente para a atenuação da patogenicidade, mas também para introdução de genes heterólogos, ampliando as perspectivas no desenvolvimento de vacinas vivas múltiplas (STOCKER, 2000).

Uma maior consideração no desenvolvimento de vacinas combinadas de salmonelas é a obtenção de um nível alto de expressão dos antígenos recombinantes para dirigir a resposta imune. De qualquer forma a alta expressão não regulada de antígenos heterólogos pode ser tóxica e afetar a viabilidade da célula microbiana, fazendo com que a salmonela seja um carregador ineficiente ou causando perda do DNA recombinante (KHAN *et al.*, 1994).

Demonstrou-se que vacinas contra febre tifóide baseadas em salmonelas atenuadas vivas são mais eficazes que vacinas baseadas em componentes celulares ou células mortas. Isso provavelmente relaciona-se com a diferença de resposta imune induzida, sendo que o microrganismo vivo é capaz de modular a resposta para celular do tipo Th1, com expressão de diversas interleucinas e interferon- γ (OKAMURA *et al.*, 2004; LEHMANN *et al.*, 2006). De fato, a única vacina licenciada contra febre tifóide utiliza a *Salmonella Typhi*, Ty21a, viva atenuada, Vivotif® (CHEMINAY e HENSEL, 2008). O uso de salmonelas como vetor vivo para a administração de antígenos heterólogos já foi demonstrado com sucesso modulando

resposta humoral e celular contra vários antígenos de parasitas (PACHECO *et al.*, 2005; GARMORY *et al.*, 2002). Uma característica da salmonela é conseguir sobreviver ao estresse oxidativo imposto por macrófagos durante infecções. Um dos sistemas responsáveis por essa capacidade é o regulon *soxRS* que controla a transcrição de vários genes relacionados com defesa antioxidante (DEMPLE, 1996 ; KOUTSOLIOUTSOU *et al.*, 2001).

Neste projeto propomos a utilização de salmonelas recombinantes com o sistema *soxRS* controlando a expressão e genes heterólogos.

1.12 O sistema controlador do regulon *soxRS*

O regulon *soxRS* é ativado em várias enterobactérias em resposta a estresse oxidativo, como aquele que ocorre durante infecção nos hospedeiros mamíferos (DEMPLE, 1996, KOUTSOLIOUTSOU *et al.*, 2001). O regulon é ativado quando a bactéria está no macrófago que produz radicais superóxido e óxido nítrico. O controle de expressão do regulon se dá em dois estágios com uma proteína sensora de estresse oxidativo, SoxR, a qual ativada, atua sobre o promotor do gene *soxS*, induzindo uma forte transcrição do gene *soxS*. A proteína SoxS promove a expressão de ao menos quinze genes relacionados com a defesa contra estresse oxidativo, como superóxido dismutase A, aconitase, glicose-6-fosfato desidrogenase, fumarase C, endonuclease IV (Figura 17).

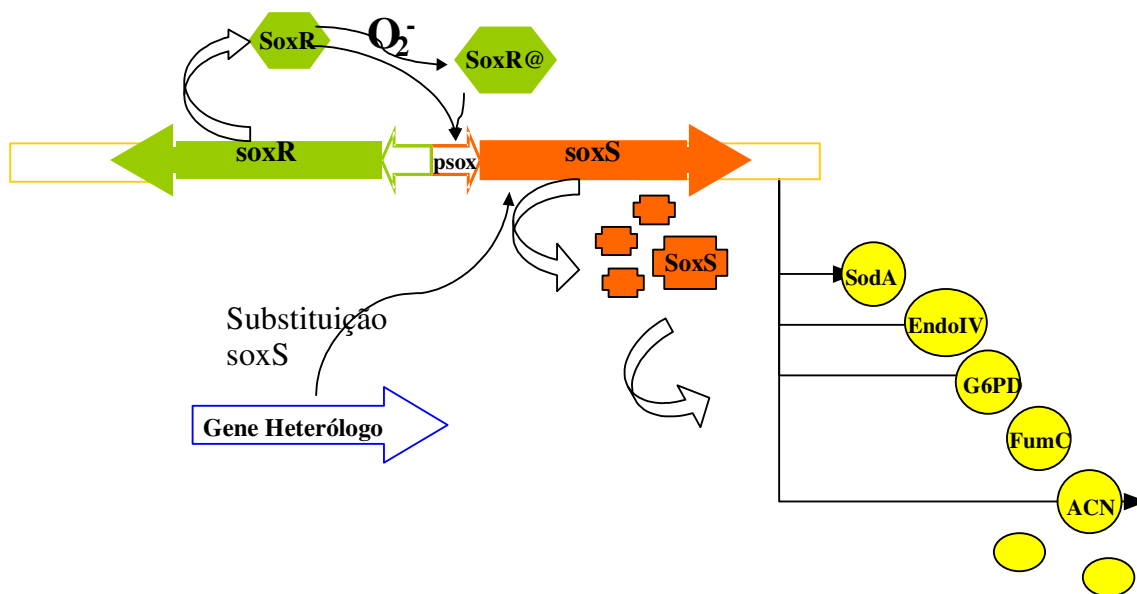


Figura 17 – Esquema do sistema regulon soxRS e seu funcionamento sob estresse oxidativo.

Um vetor de expressão foi especialmente gerado em nosso laboratório para facilitar clonagens de genes de interesse. Esse vetor foi modificado sobre o vetor pAE (RAMOS *et al.*, 2004) por inserção do fragmento gênico *soxR*-promotor-*soxS* posicionado “upstream” de um sítio de múltiplas clonagens e foi denominado vetor pAEsox (Figura 18). Genes clonados no vetor pAEsox podem ser induzidos *in vitro* em bactérias expostas à paraquat, uma droga que metabolizada pela bactéria, gera ânions superóxido, promovendo estresse oxidativo e mimetizando a condição no macrófago.

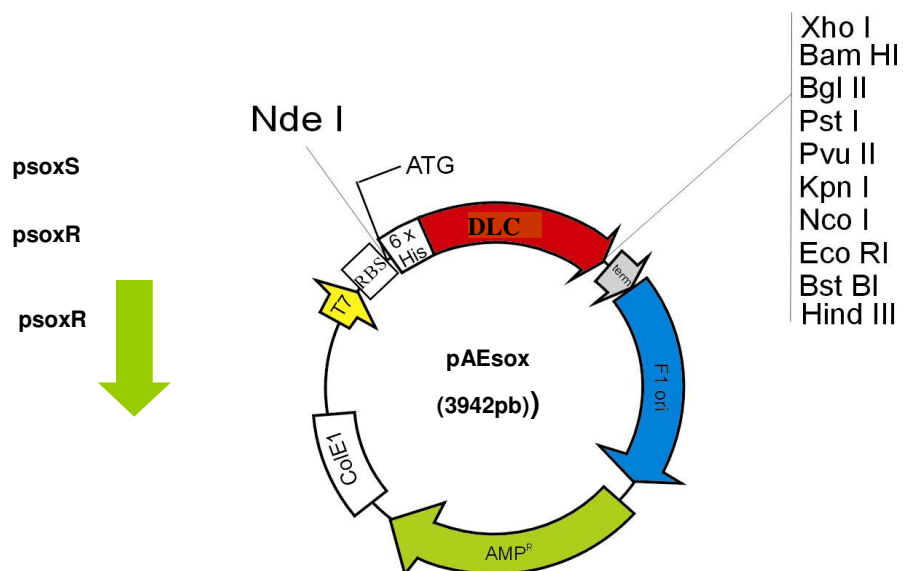


Figura 18 – Esquema da construção do vetor pAEsox pela inserção do fragmento gênico soxR-promotor-soxS posicionado “upstream” do sítio de múltiplas clonagens no vetor pAE. Posição de clonagem dos genes das DLCs. O vetor de expressão possibilita a purificação de proteínas recombinantes em resinas de afinidade a metal (níquel), por adição de seis resíduos de histidinas na extremidade amino-terminal da proteína expressa.

Demonstrou-se, no laboratório da Dra. Martins, que a proteína fragmento C de toxina tetânica (FC) foi expressa em salmonelas transformadas com o vetor pAEsoxFC. Demonstrou-se também que a proteína foi expressa *in vivo* após imunização de camundongos com a linhagem de Salmonela recombinante carregando o vetor pAEsoxFC. Nesses ensaios os animais apresentaram anticorpos contra FC e foram protegidos contra a toxina tetânica (paper em preparação). Portanto, propusemos a utilização do vetor pAEsox para carregar os genes selecionados como antígenos vacinais.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto são:

- Estudar as características imunogênicas e antigênicas de parálogos da proteína DLC de *Schistosoma mansoni*, quer apresentadas ao sistema imune como proteínas purificadas ou por salmonelas recombinantes carregando os genes das DLCs para expressão *in vivo* sob controle do sistema soxRS;
- Avaliar a possível imunidade protetora induzida pelos parálogos de DLC com imunizações mistas com proteínas purificadas e as salmonelas recombinantes, seguidas de ensaios de desafio com cercárias;
- Avaliar possíveis diferenças no desenvolvimento dos granulomas hepáticos nos animais parasitados após imunizações com proteínas purificadas ou com salmonelas recombinantes carregando os genes de DLC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Bactérias e vetores

As bactérias e vetores utilizados no desenvolvimento desse projeto estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Bactérias e vetores utilizados e suas características mais relevantes.

Bactérias	Características
<i>E. coli</i> BI21DE3plys	Para a expressão de proteínas
<i>E. coli</i> DH5 α	Utilizada para clonagem de fragmentos e obtenção de grande quantidade de plasmídeo.
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium SL3261	Linhagem vacinal para camundongos, atenuada por mutação do gene <i>aroA</i> , impedindo a síntese de aminoácidos aromáticos. Utilizada em ensaios para expressão dos antígenos de interesse <i>in vivo</i> .
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium SL4213	Deficiente no sistema de restrição para reconhecimento e clivagem de DNA exógeno. Intermediária na transferência de construções plasmídeais entre linhagens de <i>E. coli</i> e salmonela SL3261.
Vetores	
pGEM-Teasy (Promega)	Vetor de clonagem de produtos de PCR por ligação A-T. Fragmentos gênicos podem ser obtidos por digestão do vetor pGEM-Teasy e transferidos para outros vetores.
pAE	Vetor construído no Centro de Biotecnologia a partir dos vetores comerciais pRSET e pET (Ramos <i>et al.</i> , 2004). Usado para expressão de proteínas em <i>E. coli</i> por indução com IPTG. Possui pUC ori, amp ^R , sítio RBS, promotor do fago T7, códon de iniciação seguido de códon para adição de 6 histidinas na posição N terminal das proteínas expressas e sítio de múltiplas clonagens.
pAEsox	Construído sobre o vetor pAE, por inserção do sistema controlador do regulon <i>soxRS</i> , o gene de <i>soxR</i> e o promotor de <i>soxS</i> . O vetor permite indução da expressão de genes de interesse <i>in vitro</i> , por exposição das bactérias transformadas à paraquat, ou <i>in vivo</i> (estresse oxidativo em macrófagos).

3.1.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para realização das ampliações gênicas dos parálogos de dineínas de cadeia leve e as endonucleases de restrição utilizadas para a transferência dos genes de interesse para o vetor pAEsox estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos parálogos de DLC indicando sítios e enzimas de restrição utilizados nas clonagens.

Proteína	Oligonucleotídeos e enzimas de restrição
DLC-1 forward para pAE	5' <u>GGATCC</u> ATGGAAAATCGTCGTGCTCT 3' <i>BamH I</i>
DLC-1 reverse para pAE	5' <u>GGTACC</u> GGTCTTCAATTTATTGTGTTC 3' <i>Kpn I</i>
DLC-3 forward para pAE	5' <u>GGATCC</u> ATGGAACCACAGAAAGTAATTG 3' <i>BamH I</i>
DLC-3 reverse para pAE	5' <u>GGTACC</u> GGTTACAATAATCAGCAACTG 3' <i>Kpn I</i>
DLC-4 forward para pAE	5' <u>GGATCC</u> ATGCCAATTGAACAAAGACC 3' <i>BamH I</i>
DLC-4 reverse para pAE	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'

3.1.3 Meios de cultura

1. 2YT: Triptona (16 g), extrato de levedo (10 g), cloreto de sódio (5 g) e água Milli Rios (para completar 800 mL);
2. 2YT sólido – Meio de cultura líquido, Ágar 1.5%;
3. SOB – Triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,05%, cloreto de potássio 2,5 mM.

3.1.4 Soluções

A água utilizada nas soluções foi água deionizada MilliQ (Millipore).

1. Tampão TAE 1X – EDTA 1 mM, Tris-acetato 40 mM em água deionizada;
2. Tampão de amostra 10x para gel de agarose – azul de bromofenol 0,25%, ficol (tipo 400) 15%, xileno cianol FF 0,25% em água deionizada;
3. Acrilamida 30% - acrilamida 29%, N.N'- metilenobisacrilamida 1% em água deionizada.

4. Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE – azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 6,8 em água deionizada;
5. Tampão de corrida para SDS-PAGE – Glicina 192 mM, SDS 0,1%, Tris 25 mM em água deionizada;
6. Tampão para Stacking Gel: Tris Base 0,5 M pH 6,8;
7. Tampão para Gel de Separação: Tris Base 1,5 M pH 8,8;
8. Corante Comassie Blue R250: ácido acético glacial 10%, azul de Comassie R250 0,25%, metanol 45%;
9. Descorante: Etanol 30%, ácido acético glacial 10% e água deionizada;
10. Solução RF I - KCl 10 mM, $MnCl_4$ 50 mM, acetato de potássio 30 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8, esterilizar em membrana de 0,22 μ m;
11. Solução RF II - KCl 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, $MgCl_2$ 20 mM, Na-MOPS 10 mM, glicerol 15 %, pH 5,8, esterilizar em membrana de 0,22 μ m;
12. PIPES - cloreto de cálcio 60 mM; glicerol 15%; PIPES 10 mM; (em água deionizada); pH 7,0; Filtrada para esterilizar em membrana de 0,22 μ m;
13. Imidazol nas concentrações: 5mM, 10 mM, 20 mM, 80 mM, 150 mM, 300 mM, 500 mM e 1 M em tampão 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8,0;
14. Padrão de albumina 2 mg/mL (PIERCE);
15. Coomassie Plus – Bradford Assay TM Kit (PIERCE);
16. Carbonato de sódio 2% (dissolvido em NaOH 0,1 M);
17. PBS – cloreto de potássio 2,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato dibásico de sódio 8,1 mM, fosfato monobásico de potássio 1,5 mM, pH7,0;
18. PBS T – Tween 20 0,05% em tampão PBS;
19. Tampão de adsorção para ELISA – IgG - bicarbonato de sódio 0,05 M/ carbonato de sódio 0,05 M em água deionizada, pH 9,6;
20. Tampão de adsorção para ELISA IgE – carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5;
21. Solução de Bloqueio: PBST e leite desnatado 10% ou PBS T e BSA 5%;
22. Tampão citrato/fosfato – citrato de sódio 0,1 M, fosfato monobásico de sódio 0,2 M em água deionizada pH 5,0;
23. Solução de revelação para ELISA – detecção de anticorpos (OPD 0,04%, água oxigenada 0,015% em tampão citrato/fosfato);
24. Solução de revelação para ELISA de IgE: TMB da KPL;
25. Solução para parar reação para ELISA: H_2SO_4 2N;
26. Solução para parar reação para ELISA IgE: Stop solution da KPL;

27. Tampão de Transferência: Tris Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.02% e Metanol 20%;
28. Solução Basal: TBS – NaCl 150 mM, Tris Base 10 mM e Tween 0.05%;
29. Corante para western blotting - Ponceau;
30. Solução de Revelação para western blotting: Tris 60 mM, 0.7 mg/mL Diaminobenzidina (DAB), 0,7 mg/mL peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Uréia 2 mg/mL.

3.1.5 Anticorpos comerciais

Anticorpo secundário: Pierce 31450 rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugado;

Anticorpo de captura IgE – BD;

Anticorpo secundário anti-IgE – BD.

3.1.6 Anestésicos

Pentobarbital - administração 40-80 mg por kg de peso do animal.

Xilasina – 10 mg por por kg de peso do animal

Ketamina – 1000 mg por por kg de peso do animal

Uretano – solução 150 mg/ml, injeções de 500 µl por animal

3.1.7 Antibióticos utilizados

- Ampicilina em concentração final 100 µg/µL; Solução estoque 100 mg/mL.

- Novobiocina em concentração final 1 µg/µL. Solução estoque 100 mg/mL

3.2 Métodos

3.2.1 Amplificação e clonagem dos genes

Em estudo anterior genes de quatro parálogos de DLC (DLC1, DLC2, DLC3 e DLC4) gerados pelo projeto Genoma do *Schistosoma mansoni* foram amplificados por PCR. As amplificações dos genes foram feitas utilizando como molde clones da biblioteca do projeto *Schistosoma mansoni* EST genome. Foram utilizadas reações com: Água MilliQ, Tampão com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 (3 mM final), dNTP mix (10 mM), oligonucleotídeos iniciadores “forward” e “reverse” 10 pmol cada, iniciador 10 pmol e enzima DNA taq polimerase (Fermentas), ou TLI da Promega. O Volume total da reação foi de 50 μL , e foram realizados 40 ciclos de amplificação. Para a realização desses experimentos foi utilizado o aparelho para PCR, PTC100TM (Programmable Thermal controller) – MJ Reserch, Inc.

Depois de amplificados os fragmentos gênicos foram inseridos no vetor de clonagem pGEM-Teasy, e em seguida subclonados no vetor de expressão pAE. No presente estudo, três desses parálogos (DLC1, DLC3 e DLC4) foram digeridos por enzimas de restrição (*Bam*H I e *Kpn* I ou *Bam*H I e *Pst* I), os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e purificados com kit de purificação ConcertTM Gel Extraction Systems (Life TechnologiesTM). Entre uma digestão e outra o DNA das amostras foram precipitados e lavados. As reações completas liberaram dois fragmentos de tamanho diferentes, um menor correspondendo a dos insertos de interesse e outro maior correspondendo ao vetor de clonagem. Em seguida os fragmentos digeridos foram transferidos usando reações de ligase para o vetor de expressão pAEsox que também havia sido digerido com as mesmas enzimas.

As reações de ligação com o vetor pAEsox foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli* DH5a competentes. As culturas foram plaqueadas e as placas incubadas por aproximadamente 16 horas a 37 °C. As colônias que cresceram nas placas foram inoculadas para crescimento em meio de cultura líquido overnight e posteriormente foram estocadas em meio de cultura contendo glicerol a -80 °C. A partir destas amostras foram feitas mini preparações para obtenção de DNA para verificação da construção inserto e sistema soxRpsoxS por seqüenciamento.

3.2.1.1 Preparo de bactérias competentes e transformação.

- Estriar bactéria *E. coli* em placa 2YT-ágar e incubar à 37 °C por 16 horas.
- Inocular uma colônia em 2 mL de meio SOB. Incubar à 37 °C por 16 horas sob agitação.
- Transferir o inóculo para 100 mL de meio SOB pré-aquecido a 37 °C.
- Incubar por 2-3 horas à 37° C sob agitação. Fazer leituras em espectrofotômetro a 600 nm até a cultura atingir DO = 0,6 (fase logarítmica de crescimento).
- Transferir e manter a cultura em gelo para estacionar divisão celular.
- Dividir o inóculo em dois tubos de 50 mL, adicionar 2 mL MgCl₂ 1 M, manter em gelo.
- Centrifugar a 3.214 g por 10 min a 4 °C. Ressuspender o precipitado em 5 mL de solução RF I gelada.
- Centrifugar 15 minutos a 2.057 g a 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender cada precipitado em 1 mL de solução RF II gelada (repetir a centrifugação e ressuspensão).
- Distribuir 50 µL em tubos de 1,5 mL gelados, congelar com auxílio do nitrogênio líquido e armazenar a -70 °C.

As bactérias *E. coli* DH5 α utilizadas para amplificação de plasmídeos foram tornadas competentes para transformação por tratamento com soluções de CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989; AUSUBEL *et al.*, 1989). Após tratamento as bactérias foram alíquotadas e armazenadas a -80 °C.

As linhagens de *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium SL3261 e SL4213 foram tornadas competentes para transformação por tratamento com solução tampão Pipes (CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%, Pipes 10 mM pH7,0).

As bactérias competentes foram transformadas por incubação com plasmídeos e tratamento por choque térmico. Clones bacterianos foram selecionados por crescimento em placas de ágar e resistência a antibióticos, e cultivados para diferentes finalidades, como purificação dos vetores. Os clones foram utilizados para indução de expressão das proteínas para purificação e também para imunização de camundongos.

3.2.2 Extração de DNA plasmidial e análise dos clones

Os clones bacterianos selecionados foram utilizados para gerar plasmídeos que foram purificados utilizando kits comerciais de mini-preparações. As construções foram analisadas por ensaios de restrição e por seqüenciamento de DNA. Para a extração do DNA plasmidial, cerca de 2 µL dos clones congelados foram inoculados em meio de cultura 2YT contendo ampicilina e deixados crescendo “overnight” a 37 °C sob agitação. Para a extração dos plasmídeos foi utilizado o kit GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amershan Biosciences), seguindo o protocolo do fabricante. Para análise das seqüências foi utilizado o seqüenciador que se encontra no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. O método utilizado para seqüenciamento foi a técnica de Sanger adaptado para seqüenciador automático capilar ABI3100 (Perkin Elmer).

3.2.3 Indução de expressão das proteínas *in vitro*

Para que as proteínas fossem expressas, primeiramente as construções plasmideais em vetor pAEsox contendo os fragmentos de DLCs foram amplificadas em bactérias *E. coli* DH5α. Os plasmídeos foram extraídos e usados para transformar a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)plys, que é utilizada para indução da expressão das proteínas *in vitro*. Para tanto, 5 µL das construções em pAEsox purificados das bactérias *E. coli* DH5α foram utilizados para a transformação das linhagens de *E. coli* BL21(DE3)plys.

Linhagens de *Salmonella* também foram transformadas para posterior indução e expressão das proteínas recombinantes *in vitro* e *in vivo*. As construções pAEsoxDLCs foram utilizadas para transformar linhagens de *salmonella* SL4213 (intermediária) e SL3261 para expressão de proteínas recombinantes *in vivo*. A transformação com a linhagem de *salmonella* intermediária é necessária, pois a *salmonella* SL3261 reconhece o DNA exógeno e o degrada. Com a passagem dos plasmídeos de interesse na *salmonella* SL4213 o DNA é modificado para padrão *salmonella* (metilações específicas) e a *salmonella* SL3261 recebe o DNA exógeno sem clivá-lo.

As bactérias transformadas com as construções em vetor pAEsox foram induzidas a expressar a proteína recombinante *in vitro* por exposição à 150 µM de paraquat (uma bupiridina que induz o estresse oxidativo e ativação do regulon soxRS).

A linhagem *E. coli* BL21(DE3)plys foi cultivada em meio 2YT contendo ampicilina a 37 °C. As linhagens de salmonela foram cultivadas em meio 2YT e foram selecionadas por ampicilina e novobiocina.

Para indução de expressão das proteínas, um pré-inoculo das amostras das culturas de bactérias foram crescidas “overnight” e no dia seguinte diluídas em 30 mL de meio de cultura 2YT contendo antibiótico, para que tivessem uma DO600 nm de 0,2 inicial. Ao atingirem um crescimento com DO600 nm 0,6 as amostras foram expostas aos agentes indutores. Após 4 horas de indução as bactérias foram lisadas por sonicação e centrifugadas para separação da fração sobrenadante com proteínas solúveis e o precipitado, com as proteínas insolúveis.

3.2.4 Análise da expressão das proteínas recombinantes

Para a análise de expressão amostras das frações solúvel e insolúvel de cada extrato protéico foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (SAMBROOK, 1989), usando em gel 13% de acrilamida, considerando a baixa massa molecular das proteínas em estudo, avaliando-se a bandas diferenciadas em posição de massa molecular esperada das proteínas recombinantes. Utilizamos como padrão 1 µg de albumina bovina para estimar a intensidade de expressão das proteínas recombinantes. Após análise das expressões das proteínas, amostras das culturas bacterianas foram crescidas em maior volume com a finalidade de purificação das proteínas recombinantes.

3.2.5 Cultivo dos clones expressando as proteínas recombinantes em escala de 500 mL

Os clones de células expressando as proteínas de interesse foram selecionados para cultivo em maior volume. Foram feitos pré-inóculos de 30 mL em meio 2YT contendo ampicilina. As amostras cresceram “overnight” a 37 °C, sob agitação. No dia seguinte foi feita a diluição em 500 mL de meio de cultura com antibiótico para DO 600 nm de 0,2 inicial e como no teste de menor volume induzidos quando chegasse a uma DO 600 nm de 0,6. Após as 4 horas de indução o cultivo foi dividido em dois recipientes de 250 mL para centrifugação a 7.438 g, a 4 °C por 10 minutos. O meio de cultura foi descartado e os sedimentos bacterianos estocados a -20 °C. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 20 mL de tampão Tris-HCl pH8.5, NaCl 100 mM e Imidazol 10 mM, e esta suspensão foi submetida

à lise por alta pressão (2000 psi) em French Press. A amostra foi centrifugada a 11.952 g, a 4 °C por 10 minutos e a fração contendo as proteínas solúveis (sobrenadante) foi separada da fração contendo as proteínas insolúveis (sedimento). As frações foram armazenadas a -20 °C.

3.2.6 Purificação das proteínas recombinantes

Os genes clonados em vetor pAEsox geram proteínas híbridas com 6 resíduos de histidinas, o que permite purificação por cromatografia de afinidade a metal. As proteínas recombinantes foram purificadas em colunas com resina Chelating Sepharose Fast Flow® com Ni²⁺ imobilizado (His Trap™ HP - GE HealthCare). Quando necessário as colunas foram mantidas por algumas horas com Sulfato de Níquel (0,3 M), permitindo ligação do metal. As purificações seguiram com lavagem da coluna com tampão de equilíbrio, passagem da amostra, repassagem de tampão de equilíbrio e tampões de eluição com Imidazol em diferentes concentrações, variando de 20 mM até 1 M. Os volumes das lavagens foram de 10 vezes o volume da coluna utilizada na purificação. As frações foram aliqüotadas de 2 em 2 mL para colunas de 1 mL, e frações de 10 em 10 mL para colunas de 5 mL. No caso das purificações a partir da fração insolúvel, os sedimentos dos lisados bacterianos foram solubilizados “overnight” com solução 8M uréia antes da aplicação à coluna de cromatografia. Após a purificação as amostras recolhidas contendo a proteína de interesse foram dialisadas contra PBS 1x para diluir Imidazol e uréia residuais.

3.2.7 Análises das proteínas purificadas recombinantes por SDS-PAGE

As análises das purificações das proteínas foram feitas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 13%. Essa técnica permite a separação das proteínas pela massa molecular, onde as proteínas de maior peso ficam retidas nas primeiras frações do gel, e as proteínas mais leves migram mais rapidamente. Antes de serem submetidas à separação por eletroforese, as massas das proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford, Lowry ou ainda estimadas por comparação com o padrão 1 µg de albumina bovina no gel. Para dosagem de massa protéica pelo método de Bradford foram utilizadas curvas padrão com concentrações de albumina entre 0 a 25 µg por mL de reação, sendo as leituras de absorbância espectrofotométrica realizadas em 595 nm. A equação linear gerada é usada para

determinação das massas de proteínas de interesse. As amostras são usadas em volume de 200 μL e adiciona-se 800 μL de solução de Bradford® para leitura de absorbância. O cálculo das massas de proteína nas amostras de interesse é elaborado utilizando a equação da curva de calibração e as absorbâncias das amostras. Para medidas de concentração pela técnica de Lowry, foram utilizadas curvas padrões de 0 a 50 μg de BSA em 1 mL de reação. Em 1 mL de reação foram adicionados 3 mL de reagente A (1 mL de tartarato de sódio 2%, 1 mL de sulfato de cobre 2% em 100 mL de Na_2CO_3 dissolvido em NaOH 0,1 M). As amostras foram agitadas por 10 minutos a $T^\circ\text{C}$ ambiente e em seguida foram adicionados 300 μL de reagente de Folin, os tubos foram agitados novamente e deixados a 30 minutos em $T^\circ\text{C}$ ambiente e em seguida as absorbâncias lidas a 750 nm. Como na metodologia de Bradford, uma equação linear é usada para determinação das concentrações das proteínas de interesse com base nos dados da curva padrão.

3.2.7.1 Preparo de frações de extratos protéicos de vermes

Os extratos de vermes adultos foram analisados por SDS-PAGE para utilização em ensaios de western blot.

A obtenção da fração solúvel de extrato total de verme adulto foi feita por congelamento e descongelamento da amostra contendo aproximadamente 200 vermes, seguido de centrifugação a 14.000 g para separação das frações solúvel e insolúvel.

Para a extração da fração do tegumento foi realizado o mesmo procedimento, porém as amostras de vermes foram agitadas fortemente usando vortex.

Para obtenção da fração de vermes sem tegumento os vermes foram submetidos a um método de congelamento e descongelamento, em seguida foram agitadas fortemente usando vortex na velocidade máxima. O sobrenadante foi coletado e as membranas peletadas por centrifugação de 30 minutos, 4°C a 100 g. O pelet foi ressuscitado em 0.5 mL de 10 mM Tris. Essa fração nos foi gentilmente cedida pela Dra. Luciana Leite do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

3.2.8 Imunização de camundongos e obtenção de soros com anticorpos anti-DLC

Os ensaios de imunização foram realizados em camundongos Balb C fêmeas de quatro a seis semanas com aproximadamente 18 gramas. Foi realizado um ensaio prévio com grupos de cinco animais. As imunizações foram feitas via intraperitoneal com 5 µg das proteínas recombinantes em 250 µl em salina apirogênica e 0,3% de hidróxido de alumínio, ou com 3×10^7 salmonelas recombinantes. Foram feitas quatro imunizações com intervalos de duas semanas. As sangrias foram feitas dois dias antes de cada imunização e a última sangria após quinze dias da última imunização. Além dos grupos imunizados com as proteínas ou salmonelas foram utilizados grupos controles, um que não recebeu nenhum antígeno e outro que recebeu a salmonela vazia, sem o vetor de expressão (Tabela 4).

Tabela 4 – Grupos experimentais e dosagem dos antígenos utilizados no ensaio prévio de imunização e desafio.

Grupos	Dosagem
Controle	Não imunizado
SLØ	3×10^7 células
DLC1 purificada	5 µg
DLC4 purificada	5 µg
SLDLC1	3×10^7 células
SLDLC4	3×10^7 células

No primeiro ensaio de imunização e desafio algumas variáveis foram aprimoradas. Foram utilizados grupos de oito animais, divididos em duas caixas para facilitar a manipulação durante o desafio. Foram realizadas três imunizações em intervalos de 15 dias. As imunizações foram feitas via intraperitoneal com 5µg das proteínas recombinantes em 250 µl em salina apirogênica e 0,3% de hidróxido de alumínio, ou com 3×10^7 salmonelas recombinantes. Os grupos SLDLC/pp foram imunizados duas vezes com salmonelas recombinantes e uma imunização intermediária com proteínas purificadas. As sangrias foram feitas sete dias após cada imunização. Na infecção a metade de cada grupo (uma caixa) foi infectada pela manhã e outra metade à tarde do mesmo dia. Os grupos utilizados e as dosagens de imunógenos estão apresentados na Tabela 5. Neste ensaio utilizamos como

controle um grupo que não foi imunizado e outro que recebeu a salmonela carregando o vetor pAEsox vazio.

Tabela 5 – Grupos experimentais e dosagem dos antígenos utilizados no primeiro ensaio de imunização e desafio.

Grupos (caixas 1 e 2)	Dosagem
Controle	Não imunizado
SL Ø (pAEsox-vazio)	3×10^7 células
SL DLC1	3×10^7 células
SL DLC1/proteína purificada	3×10^7 células / 5 µg
SL DLC3/proteína purificada	3×10^7 células / 5 µg
SL DLC4/proteína purificada	3×10^7 células / 5 µg
DLC1 purificada	5 µg
DLC3 purificada	5 µg
DLC4 purificada	5 µg

No segundo ensaio de imunização e desafio os grupos eram compostos por 18 animais cada, divididos em três caixas (seis animais por caixa). A caixa 1 foi destinada a perfusão dos animais com 45 dias de infecção, a caixa 2 para perfusão com 55 dias de infecção e a caixa 3 para observação do desenvolvimento da patologia e teste de sobrevivência. Os animais foram imunizados três vezes com intervalos de 15 dias, por via intraperitoneal com $10 \mu\text{g}$ das proteínas recombinantes em 250 µl em salina apirogênica e 0,3% de hidróxido de alumínio. Neste ensaio o grupo controle recebeu o veículo da formulação com proteínas recombinantes (PBS/hidróxido de alumínio). A dose nas s imunizações com salmonelas recombinantes foi de 3×10^7 células. Os grupos experimentais e as doses administradas do segundo ensaio de imunização e desafio seguem abaixo na tabela 6.

Tabela 6 – Grupos experimentais e dosagem dos antígenos utilizados no segundo ensaio de imunização e desafio.

Grupos (caixas 1 e 2)	Dosagem
Controle	Salina (250 µl) e 0,3% hidróxido de alumínio
SL Ø (pAEsox-vazio)	3×10^7 células
SL DLC1	3×10^7 células
SL DLC3	3×10^7 células
DLC1 purificada	10 µg
DLC3 purificada	10 µg

Para a imunização com salmonelas, a preparação das amostras consistiu em crescimento das bactérias “overnight” em pré-inóculos de 10 mL de meio 2YT contendo ampicilina e novobiocina. Os inóculos crescidos “overnight” foram diluídos para DO 600 nm 0,1 e deixados crescer em meio 2YT com ampicilina até atingir DO 600 nm 0,5. Estudos anteriores do laboratório permitem considerar a concentração de salmonelas em cultura com 3×10^8 células/ml para DO 600 nm = 0,5. 10 mL dessas culturas foram centrifugados a 4.000 RPM (centrifuga Jouan, rotor T40) por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 25 mL de salina apirogênica. As suspensões de salmonelas foram injetadas por via intraperitoneal, em volume de 250 µL com concentração aproximada de 3×10^7 células por dose.

3.2.8.1 Preparo de soros dos animais imunizados

O sangue dos animais foi coletado por punção no plexo retro-orbital com o auxílio de pipeta Pasteur, uma semana antes de cada imunização, para avaliação dos títulos de anticorpos induzidos. As amostras de sangue foram mantidas em tubo microtainer (BD) à temperatura ambiente por 30 minutos para coagulação. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2300 g, a 4 °C por 3 minutos para sedimentação do coágulo. Os soros foram recuperados, aliquotados e armazenados a -20 °C.

3.2.9 Análise da resposta imune induzida nos soros dos animais imunizados

Para análise da presença de anticorpos nos soros dos animais imunizados foram feitos ELISAs medindo concentrações de IgG e IgE, e ensaios de reconhecimento por “Western Blot”.

3.2.9.1 ELISA

O ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) foi feito para determinar as concentrações de IgG anti-DLC representando as respostas imunes dos camundongos. Foram utilizadas placas de fundo chato Nunc-MaxiSorp™-USA. Além de dosagem de IgG, a mesma técnica foi utilizada para a detecção de anticorpos do tipo IgE (total) por ELISA de captura, esse tipo de anticorpo é encontrado em altas concentrações nas respostas alérgicas e em infecções parasitárias.

3.2.9.1.1 ELISA para detecção de IgG

As placas foram sensibilizadas com a proteína recombinante na concentração de 500 ng/poço em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas à 4 °C “overnight”. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (PBST) e bloqueadas com leite em pó desnatado 10% em solução PBST, por 2 horas à 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes e então incubadas com o soro dos animais em diluições seriadas em solução de bloqueio a 37 °C. Depois de três horas de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo feito em coelho, conjugado com peroxidase à 37 °C por 2 horas. Como solução reveladora, foi utilizada ortofenilenodiamina (OPD) em tampão citrato/fosfato 0,1 M pH 5 e 0,5 µL/mL de solução de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi parada com 50 µL solução H₂SO₄ 2N.

Para a leitura das placas e medida da coloração obtida na reação, foi utilizado um leitor de placa de microdiluição em comprimento de onda 492 nm, utilizando como branco da reação os poços da placa que receberam todas as soluções com exceção dos soros.

3.2.9.1.2 ELISA de captura para detecção de IgE

As placas foram sensibilizadas com anticorpo de captura (marca comercial) diluído 1:250 em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5. As placas foram mantidas uma noite a 4 °C e então bloqueadas com BSA 5% por três horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBST e incubadas com diluições do soro 1:20, 1:40 ou 1:50. Foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de IgE (1,56 a 100ng) para correlacionar com as medidas de IgE das amostras. As placas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente e em seguida lavadas por cinco vezes antes de receberem o anticorpo de detecção (anti-IgE BD conjugado com peroxidase), na diluição 1:1000. A reação com anticorpo secundário foi mantida em temperatura ambiente por uma hora, as placas foram lavadas sete vezes com PBST antes da adição da solução reveladora com substrato para peroxidase sure-blue - TMB (tetrametil benzidina KPL). Esta reação foi mantida por 30 minutos no escuro e então bloqueada por solução stop (KPL). A absorbância das placas foram lidas em 450 nm.

3.2.9.2 “Western Blot”

Nos ensaios de “Western Blot”, proteínas DLC purificadas ou proteínas de extratos de vermes adultos foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF (difluoreto de polivinilideno). As proteínas ligadas covalentemente às membranas foram usadas para detecção imunológica pelos soros dos animais imunizados como descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Foram realizados ensaios para verificar o reconhecimento dos soros pelas DLCs e pelas proteínas nativas dos extratos diferenciais de vermes adultos. A transferência foi feita por 1,5 h a 100 V. Após a transferência das proteínas as membranas foram coradas com solução de Ponceau S para avaliação da eficiência de transferência. As membranas foram descoradas por sucessivas lavagens com água e incubadas por três horas a temperatura ambiente com PBS contendo 5% leite em pó desnatado para bloquear ligações inespecíficas de anticorpo. As membranas foram lavadas com solução basal três vezes por 10 minutos cada e então incubadas com os soros dos animais imunizados em diluição 1:1000 ou 1:500 em PBS 1X com 5% leite em pó desnatado “overnight” a 4 °C sob agitação. No dia seguinte as membranas foram lavadas três vezes com solução basal e incubadas como soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:20.000 em PBS 1X / 5% leite em pó desnatado. A incubação foi mantida por duas horas à temperatura ambiente. As

bandas de reconhecimento de anticorpos por antígenos foram reveladas com DABI (diaminobenzidina), 0,7 mg/mL em Tris 60 mM Uréia 2 mg/mL. As membranas foram lavadas com água MilliQ para interromper a reação.

3.2.10 Ensaio de desafio com cercárias

O ensaio de desafio com o parasita *Schistosoma mansoni* consiste na infecção dos animais com número preciso de cercárias e contagem dos vermes adultos recuperados após 45 dias, período de desenvolvimento no hospedeiro definitivo. As cargas parasitárias obtidas em cada grupo de imunização é comparada com a carga parasitária recuperada no grupo controle e a porcentagem de proteção é calculada utilizando-se a fórmula:

$$\frac{(M_{\text{controle}} - M_{\text{grupo vacinado}}) * 100}{M_{\text{controle}}}$$

M – é a média do número de vermes recuperados em cada grupo.

A análise estatística da proteção em relação ao grupo controle foi determinada pelo Teste T de Student. Para que seja considerada uma diferença estatística entre as amostras testadas o valor de p (probabilidade das amostras terem médias iguais nos dois grupos) deve ser menor do que 0,05.

As cercárias utilizadas nas infecções foram fornecidas pelo grupo colaborador do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, coordenado pela Dra. Toshie Kawano, onde o ciclo do parasita é mantido.

Para obtenção das cercárias, caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário do *S.mansoni*) foram infectados artificialmente com aproximadamente 10 miracídeos. Após 30 dias da infecção, os caramujos foram colocados em um becker contendo água deionada e então expostos a luz artificial por duas horas para liberação de cercárias. Cada miracídeo infectante libera em média 300 cercárias. A suspensão de cercárias foi transferida para outro recipiente, cuidadosamente homogeneizada e 500 µL da suspensão foram transferidos para uma placa de petri para contagem das cercárias. A amostra recebeu

uma gota de corante vermelho neutro (lugol) 4%, para ajudar a paralisar as cercárias que foram então contadas com o auxílio de uma lupa. O número de cercárias foi estimado e em seguida foram preparadas diluições para o número desejado de cercárias para infecção.

3.2.10.1 Infecção dos animais por penetração das cercárias através da cauda

O método escolhido para realização da infecção dos animais foi exposição das caudas dos camundongos a uma suspensão de 130 cercárias. Os animais foram adormecidos com injeção intraperitoneal de anestésico pentobarbital (Hypnol) ou ketamina/xilasina, que é calculado pelo peso do camundongo. Pentobarbital - utilizamos o padrão de 60 mg/Kg de peso, ketamina/xilasina – 10 mg/kg xilasina e 100 mg/kg de ketamina. No primeiro ensaio de imunização e desafio, depois de anestesiados, os animais foram colocados deitados em placas de isopor de modo a manter as suas caudas imersas em um tubo contendo a suspensão de cercárias. A exposição prosseguiu por 40 minutos para que ocorresse a penetração das cercárias pela pele. No segundo ensaio de imunização e desafio utilizamos a mesma metodologia de infecção de penetração pela cauda, porém utilizado um dispositivo desenvolvido no laboratório para contenção dos animais, de forma que a infecção fosse mais eficiente e segura. O dispositivo baseia-se na contenção dos animais em tubos tipo falcon com furo na parte inferior para expor as caudas e um suporte para os falcon de maneira a manter as caudas na suspensão de cercárias. Desta forma mesmo que o animal acorde, ele não pode retirar a cauda da suspensão.

3.2.10.2 Perfusão hepática dos camundongos para recuperação de vermes

Após 45 ou 55 dias de infecção do hospedeiro definitivo os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ (cuba de vidro contendo gelo seco) ou foram injetados com dose letal de uretano (anestésico, 75 mg/animal). Os animais foram rapidamente perfundidos (figura 19), através do coração ou da artéria aorta, com solução salina 150 mM e EDTA 0.5%.

No processo de perfusão de cada animal, os vermes foram coletados do sistema porta hepático em placas de petri e contados. Nesse momento foi feita uma minuciosa verificação nos tecidos, vênulas do mesentério e na região porta hepática de cada animal para garantir a ausência de vermes retidos.

Logo antes da perfusão o animal é imerso em água para evitar entrada de pêlos nas regiões a serem analisadas (os pêlos atrapalham a visualização dos vermes). O animal é acomodado em uma bandeja de metal na posição ventral. É feito um pequeno corte na pele na altura do estômago de modo que ela possa ser aberta por toda a volta do animal e rebatida, expondo a membrana peritoneal. O animal é então mergulhado em uma solução de salina contendo EDTA a membrana que envolve o peritônio é cortada, expondo os órgãos do animal. Os ossos do tórax são cortados em V e rebatidos no sentido lateral direita da cabeça expondo o coração e a aorta. A veia porta hepática é cortada e o animal segurado sobre uma placa de petri, juntando-se as patas dianteiras e traseiras para cima, posicionando a veia porta para baixo. Inicia-se a perfusão com solução salina/EDTA através da artéria aorta com auxílio de uma agulha acoplada a uma mangueira ligada a uma bomba peristáltica. A agulha é inserida na aorta na região próxima ao coração de modo que, acionando-se a bomba peristáltica, a solução atravesse o sistema circulatório sistêmico do camundongo, perfundindo-o ao mesmo tempo em que a solução é recolhida na placa de petri. Os vermes encontrados nas vênulas do intestino e na região do sistema porta-hepático são arrastados pela solução de perfusão e saem pelo corte na veia porta-hepática.

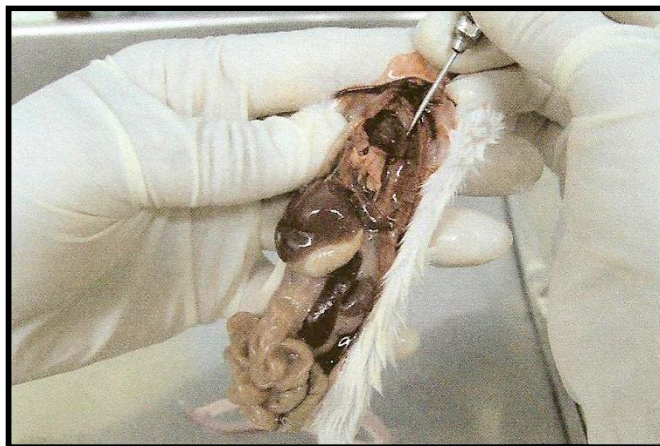


Figura 19 – Perfusão dos camundongos pela artéria aorta.
FONTE: Carvalho *et al.*, 2008.

3.2.11 Avaliação dos granulomas hepáticos

Após a perfusão, os fígados dos animais imunizados foram extraídos para análise dos granulomas hepáticos formados devido à resposta imune do hospedeiro contra os ovos de *Schistosoma mansoni*. Os fígados foram mantidos em solução de paraformaldeído 4% e foram encaminhados para o laboratório Histotec, especializado no preparo de cortes histológicos. Foram feitas lâminas de tecido hepático, com cortes de 6 µm de espessura, que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). A análise biométrica dos granulomas foi feita utilizando um microscópio óptico em aumento de 200 vezes. As imagens foram obtidas e analisadas com auxílio do software Axion Vision LE (Zeiss) ou com o software Image Express. As áreas dos granulomas no fígado dos animais foram determinadas para avaliar possíveis diferenças de morfologia.

No primeiro ensaio de imunização e desafio foram feitas análises biométricas de aproximadamente 30 granulomas hepáticos para cada grupo de imunização. As áreas dos granulomas foram calculadas pela medida de contorno e as médias das áreas dos granulomas foram calculadas para cada grupo. Os valores médios das áreas dos granulomas, assim como os desvios-padrão foram utilizados para determinação da significância das diferenças pelo método teste T de Student.

No segundo ensaio de imunização e desafio foram avaliados granulomas hepáticos após 45 e 55 dias da infecção com cercárias, para determinar possíveis diferenças morfológicas e morfométricas com o decorrer do tempo. Neste ensaio foram analisados 60 granulomas de cada grupo experimental. Utilizamos o microscópio óptico existente no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan e recebemos auxílio da Dra. Marta Maria Antoniazzi. Como no primeiro ensaio, as análises estatísticas foram determinadas pelo teste T de Student.

3.2.12 Teste de sobrevivência e avaliação patológica dos camundongos

No segundo ensaio de imunização e desafio utilizamos seis animais por grupo experimental para avaliar o desenvolvimento da patologia e determinar a sobrevivência em cada grupo. Os animais foram mantidos por até 80 dias após a infecção. Os aspectos gerais como aumento das barrigas devido a hepatoesplenomegalia que a doença causa, diarreia, anemia e falta de apetite foram verificados.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem dos genes DLC1, DLC3 e DLC4 em vetor pAEsox

Em estudo anterior de nosso laboratório, os genes de DLC1, DLC3 e DLC4 haviam sido amplificados e clonados a partir dos clones gerados do projeto genoma EST de *Schistosoma mansoni*. Os produtos de PCR foram clonados em vetor pGEM-Teasy e transferidos para o vetor pAE, para expressão das proteínas baseadas no promotor T7. As construções plasmideais foram armazenadas em bactéria *E. coli* DH5a.

Neste estudo, para clonagem dos genes de DLC no vetor pAEsox, os três clones em vetor pAE foram cultivados e os DNAs plasmideais extraídos utilizando-se kit comercial para mini preparações. Após as extrações, as amostras plasmideais foram analisadas em gel de agarose 1% (Figura 20). Os fragmentos gênicos de DLC1, DLC3 e DLC4 foram obtidos por digestão das amostras das mini preparações das clonagens em vetor pAE ou pGEM-Teasy com enzimas de restrição, *Bam*H I e *Kpn* I para os genes de DLC1 e DLC3, e *Bam*H I e *Pst* I para o gene de DLC4. Foram feitas digestões duplicadas e separadas com cada enzima (Primeiro com uma das enzimas e depois com a segunda, trocando a ordem para verificar se as duas enzimas de interesse estavam funcionando eficientemente) e a recuperação dos fragmentos de interesse analisadas em gel de agarose (Figura 20).

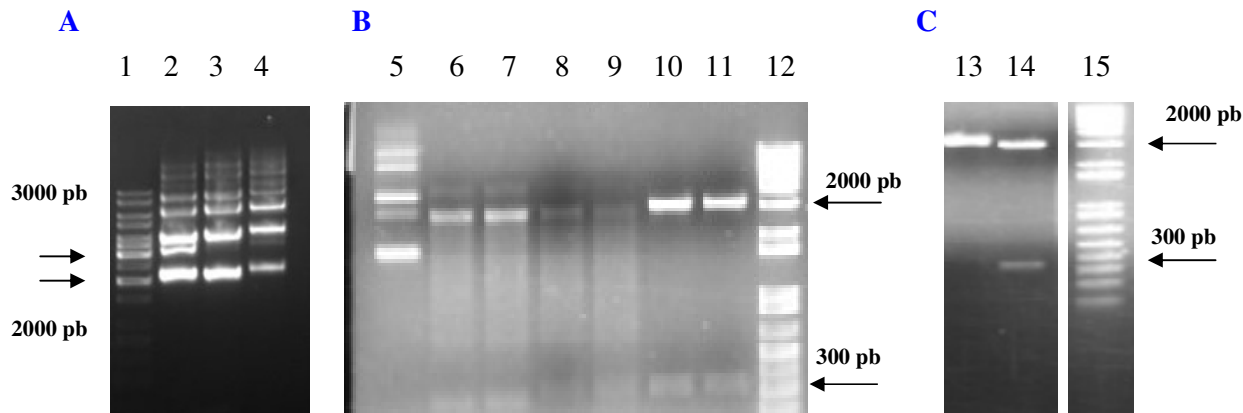


Figura 20 – Obtenção dos genes de DLCs para clonagem no vetor pAEsox. **A**- Extrações plasmideais de vetor pAE com os genes de DLC1, DLC3 e DLC4. Nos poços: 1) marcador molecular de DNA, 2) pAE-DLC1, 3) pAE-DLC3, 4) pAE-DLC4. **B** e **C** - análise de digestão dos clones plasmideais em vetores pGEM-Teasy e pAE com as enzimas de restrição. Nos poços: 5) pAE-DLC1 não digerido, 6) e 7) pAE-DLC1 digerido com *Bam*H I e *Kpn*I; 8) e 9) pAE-DLC3 digerido com *Bam*HI e *Kpn*I, 10) e 11) pGEM-Teasy-DLC3 digerido com *Bam*HI e *Kpn*I; 12) marcador molecular de DNA, 13) pGEM-Teasy-DLC4 digerido com *Bam*H I, 14) pGEM-TeasyDLC4 digerido com *Bam*HI e *Pst*I, 15) marcador molecular de DNA.

As reações foram completas liberando os fragmentos de interesse e um fragmento maior correspondendo ao vetor de clonagem. Os fragmentos de interesse foram purificados e transferidos por reações de ligase para o vetor pAEsox, o qual foi previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para a liberação dos fragmentos do vetor pAE.

As reações de ligação com o vetor pAEsox foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli* DH5 α competentes. As culturas foram plaqueadas e os clones selecionados por resistência a ampicilina. A partir desses clones foram feitas mini preparações para confirmação das construções corretas por seqüenciamentos de DNA e em seguida, tanto os plasmídeos pAEDLC como os pAEsoxDLC foram transferidos para a linhagem de *E. coli* BL21 enquanto as construções pAEsoxDLC foram também transferidas para linhagens de *Salmonelas*.

4.2 Clones bacterianos e expressão das proteínas recombinantes

Para obtenção das proteínas DLCs recombinantes, culturas dos clones de *E. coli* BL21 com vetores pAEDLCs foram expostos a IPTG, enquanto que os clones de BL21 e de salmonelas com vetor pAEsoxDLC foram induzidos por exposição à paraquat. Após indução, cerca de 1 mL de cada cultura foi separado para avaliação da expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE. As figuras 21 a 23 mostram os géis com as bandas das DLCs com massas moleculares aproximadas em 12 kDa.

É importante notar que a clonagem nos vetores de expressão pAE e pAEsox a partir do sítio de *Bam*H I determina a expressão das proteínas com uma metionina inicial, 6 histidinas e mais 3 aminoácidos codificados pelo vetor, acrescentando 1,4 kDa à massa molecular de cada proteína expressa. Dessa forma as clonagens nesses vetores devem resultar na expressão das DLCs 1, 3 e 4 com massas aproximadas respectivamente 11,8; 12,0 e 13 kDa.

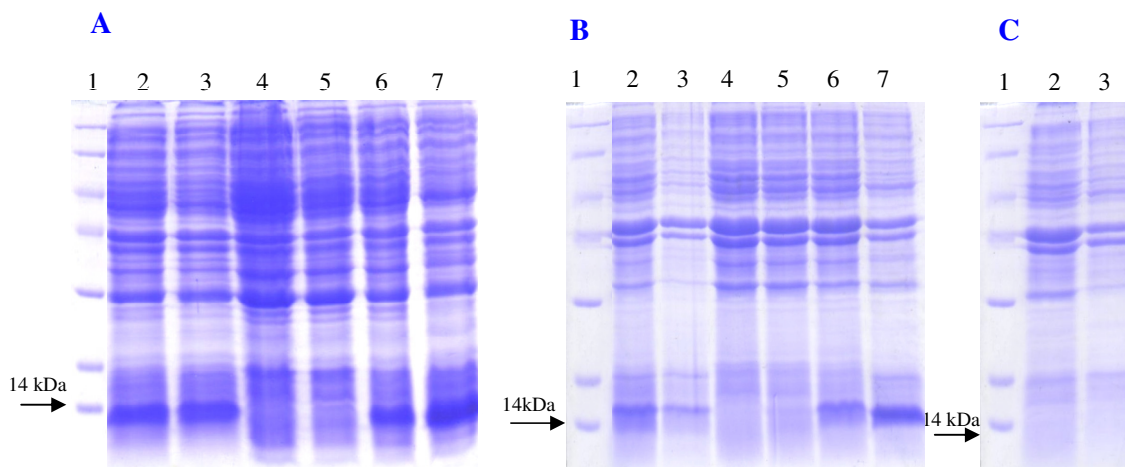


Figura 21 – Análise da expressão de DLCs recombinantes nas frações: solúvel (A) e insolúvel (B) dos extratos de *E. coli* BL21 com vetor pAEDLC. Indução de expressão por exposição dos clones a IPTG. (SDS-PAGE 13% poliacrilamida). A posição esperada das bandas de DLCs em torno de 12 kDa. Nos poços: 1) marcador de massa molecular, 2) DLC1 não induzido, 3) DLC1 induzido, 4) DLC3 não induzido, 5) DLC3 induzido, 6) DLC4 não induzido, 7) DLC4 induzido. Em C 1)- controle de expressão com extratos de clones com vetor vazio não induzido e 3) induzido.

Nota-se na análise de expressão das proteínas que DLC1 e DLC4 em *E. coli* BL21 com vetor pAEDLCs são expressas com certo “vazamento” (expressão mesmo na ausência do indutor IPTG), tanto na forma solúvel como insolúvel. Já a expressão da proteína DLC3 não pode ser detectada em nenhuma das frações.

Clones de *E. coli* com as construções plasmídeais pAEsoxDLC foram induzidos para expressão das proteínas recombinantes por exposição à paraquat (Figura 22).

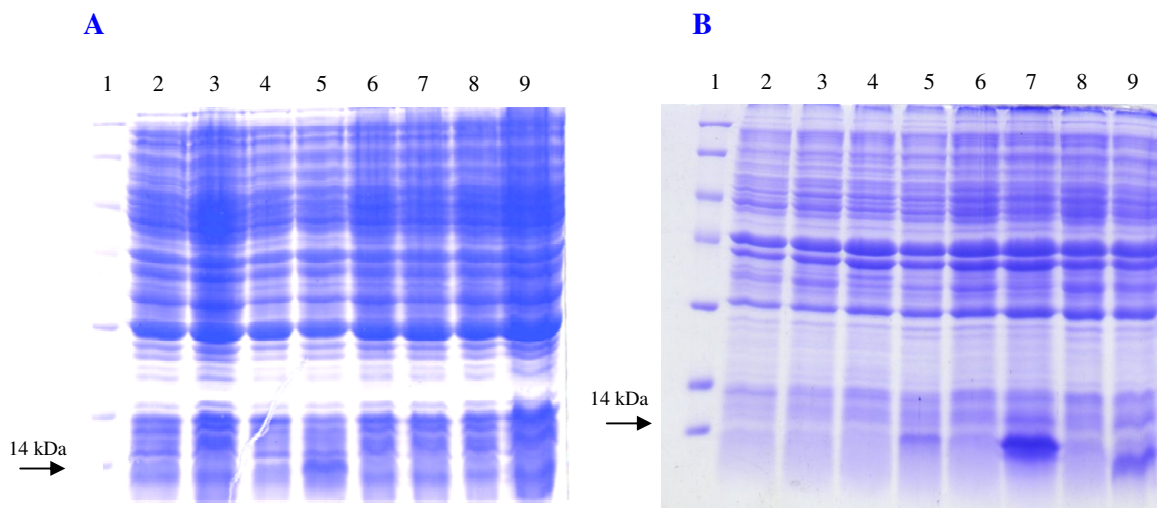


Figura 22 - Análise da expressão de DLCs recombinantes nas frações solúvel (A) e insolúvel (B) dos extratos de *E. coli* BL21 com vetores pAEsoxDLC induzidos com paraquat. (SDS-PAGE 13% poliacrilamida). Posição esperada das bandas de DLCs em 12 kDa. Poços: 1) marcador de massa molecular, 2) vetor pAEsox vazio não induzido, 3) vetor pAEsox vazio induzido, 4) clone DLC1 não induzido, 5) DLC1 induzido, 6) DLC3 não induzido, 7) DLC3 induzido, 8) DLC4 não induzido, 9) DLC4 induzido.

Com a análise do gel é possível verificar que houve expressão, mesmo que fraca, das proteínas de interesse na forma solúvel. Porém, a expressão das três proteínas foi maior na forma insolúvel. Apesar disso, a purificação das proteínas DLC1 e DLC4 foram obtidas a partir da fração solúvel.

A expressão das proteínas DLCs recombinantes também foi analisada nos clones de salmonelas linhagem SL3261 com vetor pAEsox, tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel (Figura 23).

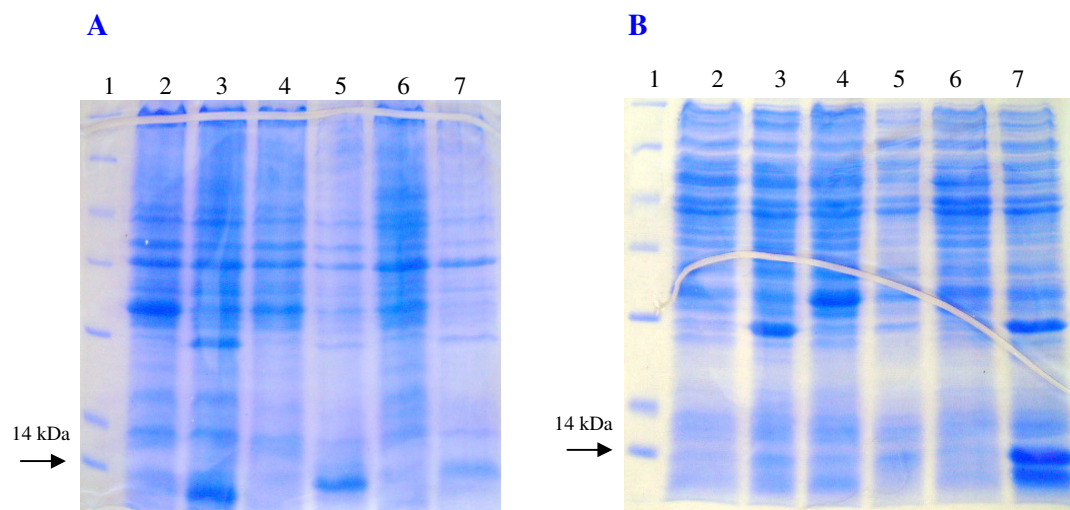


Figura 23 - Análise da expressão de DLCs recombinantes nas frações solúvel (A) e insolúvel (B) dos extrato de salmonelas (SL3261) com vetor pAEsoxDLC, induzidas com paraquat. (SDS-PAGE 13% poliacrilamida). Bandas de DLCs em posição aproximada 12 kDa. Poços: 1) marcador de massa molecular, 2) DLC1 não induzido, 3) DLC1 induzido, 4) DLC3 não induzido, 5) DLC3 induzido, 6) DLC4 não induzido, 7) DLC4 induzido.

Nota-se a expressão das DLCs 1, 3 e 4 nos clones recombinantes de salmonelas induzidos por paraquat, tanto na forma solúvel como na forma insolúvel. As expressões das proteínas DLC1 e DLC3 ocorreram mais fortemente na forma solúvel em salmonela, enquanto a DLC4, ao contrário, foi maior na forma insolúvel.

4.3 Purificação das proteínas recombinantes

Depois de analisadas as expressões das proteínas DLC foram feitos cultivos em maior volume dos clones de *E. coli* BL21 com vetores pAEsoxDLC para purificações. As bactérias foram recuperadas das culturas induzidas e foram lisadas como descrito anteriormente. As frações solúvel e insolúvel foram separadas para purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a metal. Após alguns testes foram utilizadas as frações solúveis para purificação das DLCs 1 e 4 e fração insolúvel para purificação da DLC3. Os géis de purificação das proteínas são mostrados nas Figuras 24, 25 e 26.

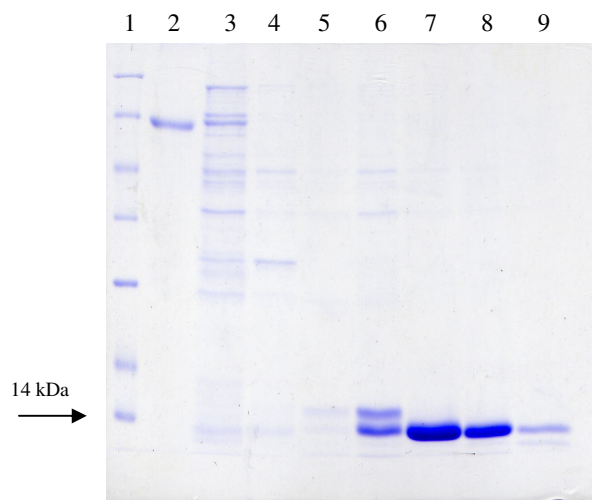


Figura 24 - Purificação da proteína DLC1 a partir da fração solúvel dos lisados de *E.coli* BL21 com vetor pAEsoxDLC1 induzido com paraquat, por cromatografia de afinidade a metal. Poços: 1) marcador de massa molecular, 2) 1 µg de albumina bovina (para comparar massa de proteína), 3 e 4) Fração eluída com 80 mM de Imidazol (duas diferentes amostras), poços 5 a 9) Frações eluídas com 150 mM de Imidazol. A eluição das amostras foi estocada de 2 em 2 mL. O volume de amostra aplicada no gel foi de 15 µL.

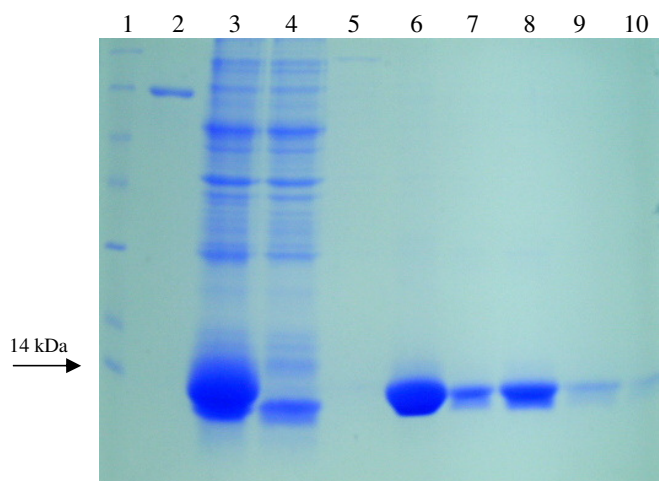


Figura 25 - Purificação da proteína DLC3 a partir da fração insolúvel dos lisados de *E.coli* BL21 com vetor pAEsoxDLC3 induzido com paraquat, por cromatografia de afinidade a metal. Poços: 1) marcador de massa molecular, 2) 1 µg de albumina bovina, 3) fração solúvel de extrato 4) Flow through, 5) Fração 20 mM Imidazol, 6) Fração 80 mM Imidazol 7) Fração 150 mM Imidazol, 8) Fração 300mM Imidazol, 9) Fração 500 mM Imidazol, 10) Fração 1 M Imidazol. A eluição das amostras foi estocada de 2 em 2 mL. O volume de amostra aplicada no gel foi de 15 µL.

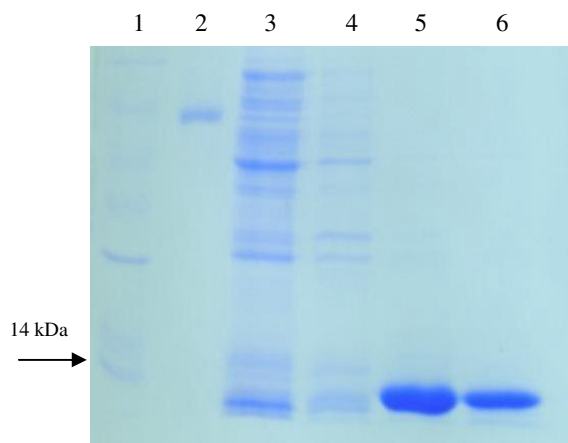


Figura 26 - Purificação da proteína DLC4 a partir da fração solúvel dos lisados bacterianos de *E.coli* BL21 vetor pAEsoxDLC4 induzido com paraquat, por cromatografia de afinidade a metal. Poços: 1) marcador molecular, 2) 1 µg de albumina bovina, 3) Fração solúvel inicial de extrato, 4) Fração 80 mM Imidazol, 5 e 6) Eluição com 150 mM Imidazol. A eluição das amostras foi estocada de 2 em 2 mL. O volume de amostra aplicada no gel foi de 15 µL.

As três proteínas foram eluídas com concentrações de imidazol entre 80 mM e 150 mM. Foram então dialisadas contra PBS para eliminação de Imidazol ou uréia (no caso da DLC3) residuais e foram armazenadas em alíquotas de 2.0 mL a -20 °C. As concentrações de proteína foram determinadas pelas técnicas de Bradford e Lowry ou estimadas por comparação com a banda de 1µg de albumina no gel.

4.4 Ensaio de Imunização e Desafio

As proteínas recombinantes purificadas e as salmonelas recombinantes expressando as proteínas *in vitro* foram utilizadas nos ensaios de imunização e desafio em camundongos. Fizemos um ensaio prévio de imunização e desafio que foi muito importante para determinação das variáveis mais significativas e para padronização da metodologia de infecção. Além desse ensaio inicial foram realizados mais dois ensaios que são apresentados aqui.

Os grupos de imunização, bem como o esquema e as doses de antígenos que cada grupo recebeu estão descritos nos Materiais e Métodos. Durante os ensaios foram obtidos soros por sangrias dos animais imunizados para análises imunológicas por técnicas de ELISA

(IgG e IgE) e “Western Blot”. No primeiro ensaio os camundongos foram imunizados com 5 µg de proteína purificada e no segundo ensaio com 10 µg de proteína purificada, sempre utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante. Os grupos controles foram imunizados com salina e hidróxido de alumínio ou com salmonela carregando o vetor pAEsox vazio.

4.4.1 Primeiro ensaio de Imunização e Desafio

4.4.1.1 Análise das respostas imunes induzidas nos camundongos do primeiro ensaio de imunização e desafio

4.5.1.1.1 Análises por ELISAs

A imunogenicidade das DLCs foi medida por ELISA como descrito em Materiais e Métodos. Os soros dos animais imunizados foram utilizados para determinar os títulos de anticorpos IgG anti-DLCs induzidos (Figuras 27, 28 e 29). Consideramos o título de anticorpos como a maior diluição que ainda determina Abs de 492 nm maior que 0,1. O “coating” das placas foi feito com 500 ng de proteínas purificadas por poço. A diluição inicial dos soros foi de 1:40. O anticorpo secundário utilizado anti- IgG de camundongo conjugado com peroxidase, a revelação da reação foi feita com substrato OPD .

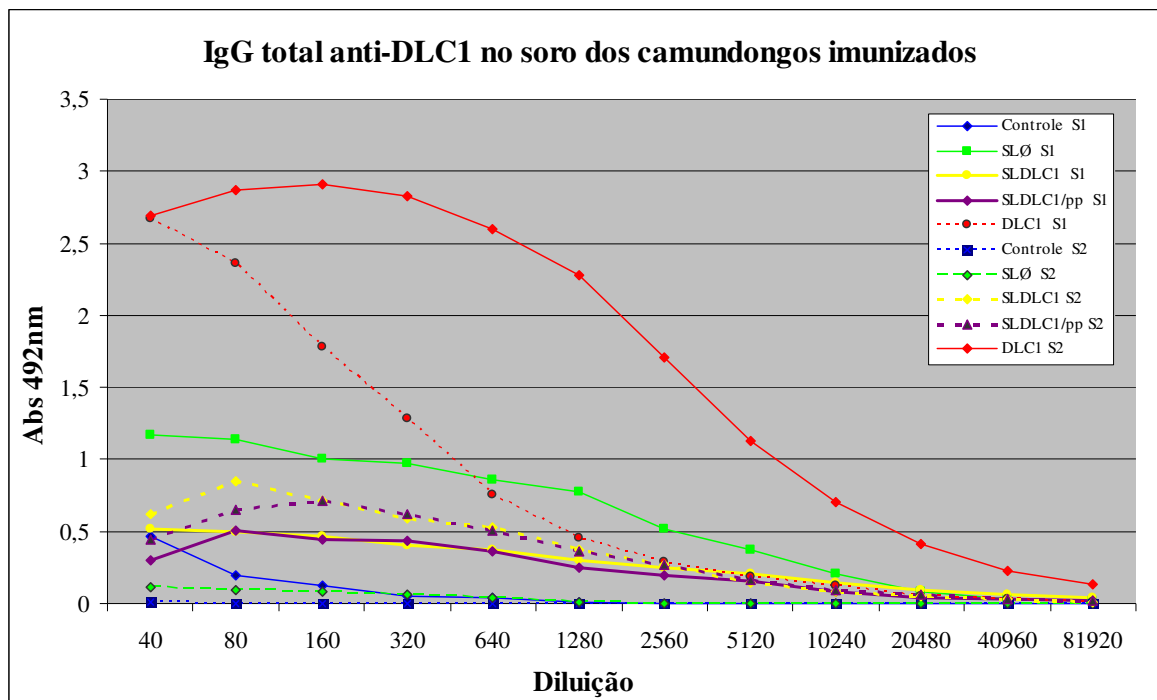


Figura 27 - Dosagem de IgG total anti-DLC1 no soro de animais imunizados por ELISA. Os grupos controles não foram imunizados, os grupos imunizados com DLC1 receberam 5 μ g de proteína purificada e os grupos imunizados com salmonelas receberam 3×10^7 células. Na legenda S1 - Sangria depois de duas imunizações, S2 - Sangria depois de três imunizações.

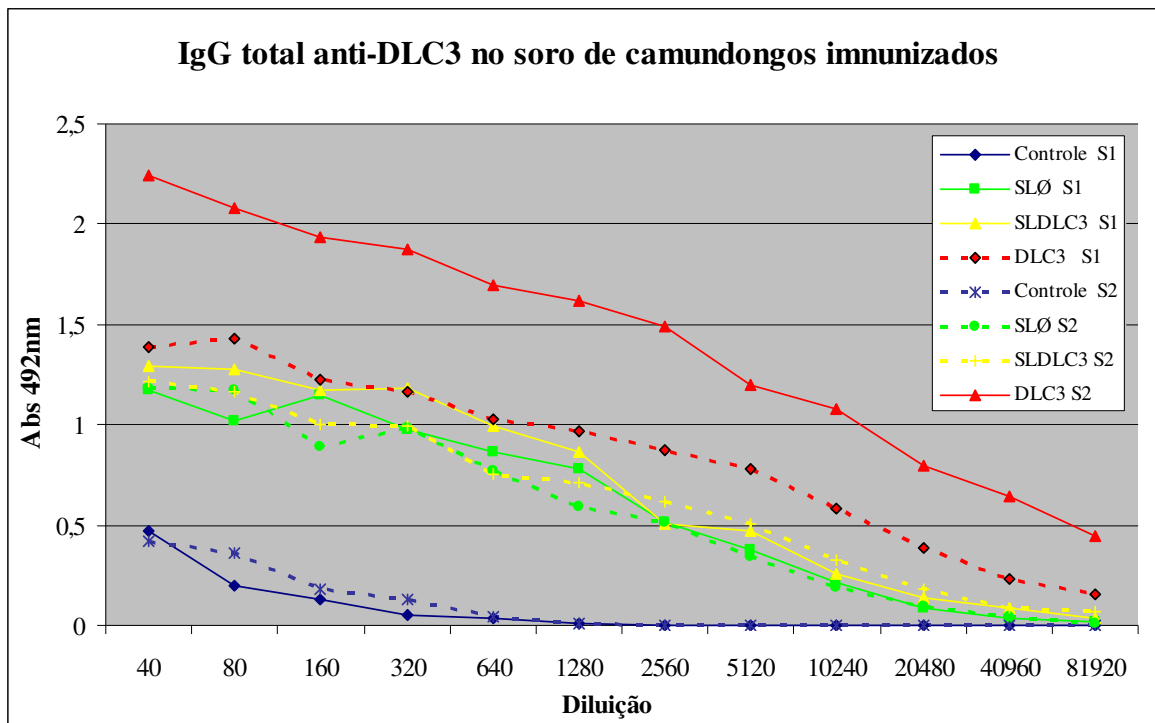


Figura 28 - Dosagem de IgG total anti-DLC3 no soro de animais imunizados por ELISA. Os grupos controles não foram imunizados, os grupos imunizados com DLC3 receberam 5 µg de proteína purificada e os grupos imunizados com salmonelas receberam 3×10^7 células. Na legenda S1 - Sangria depois de duas imunizações, S2 - Sangria depois de três imunizações.

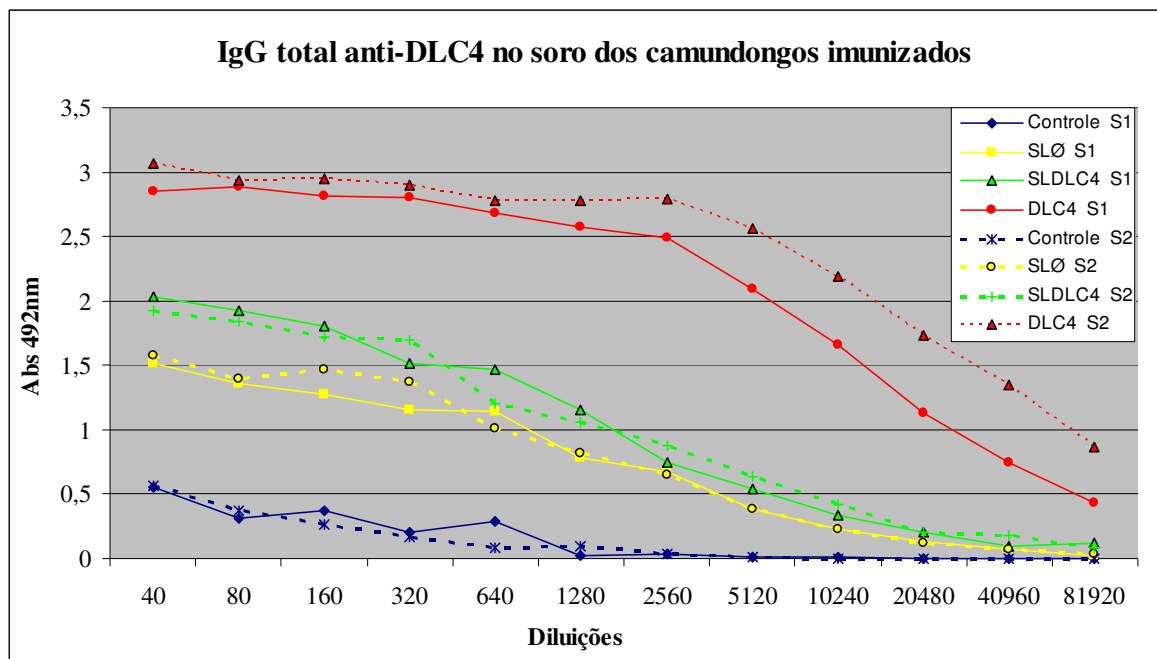


Figura 29 - Dosagem de IgG total anti-DLC4 no soro de animais imunizados por ELISA. Os grupos controles não foram imunizados, os grupos imunizados com DLC4 receberam 5 µg de proteína purificada e os grupos imunizados com salmonelas receberam 3×10^7 células. Na legenda S1 - Sangria depois de duas imunizações, S2 - Sangria depois de três imunizações.

Os resultados de ELISA indicam que as proteínas purificadas são imunogênicas, já que altos níveis de anticorpos foram detectados desde a primeira sangria (após duas imunizações). A proteína DLC1 purificada aumentou os níveis de anticorpos, apresentando o título de aproximadamente 1:40.000 depois da última imunização. As proteínas DLC3 e DLC4 purificadas induziram títulos mais elevados que a DLC1, atingindo cerca de 1:80.000 depois da terceira imunização. Já nos ensaios de determinação de IgG nos soros de animais imunizados com salmonelas carregando as proteínas heterólogas não foi detectada indução de anticorpos específicos quando comparado ao grupo controle imunizado com Salmonela vazia. É importante observar que mesmo utilizando proteínas purificadas como “coating”, essas frações também apresentavam alguns contaminantes de *E. coli*, como verificado nos ensaios de “Western Blot”. Portanto, o IgG total detectado contém anticorpos gerados contra os contaminantes de *E. coli*.

No primeiro ensaio de imunização de camundongos foram coletados os soros dos animais antes e após a infecção e foram utilizados em ELISAs de captura para determinação dos níveis de IgE induzidos (Figura 30). O resultado obtido indicou que houve indução de IgE

pela proteína DLC1 purificada, mesmo antes da infecção com cercárias. Isso sugere que essa proteína pode ter um caráter alérgico. Pacientes de área endêmica apresentam títulos elevados de IgE. Possivelmente esses anticorpos reconheçam as DLCs nativas do verme.

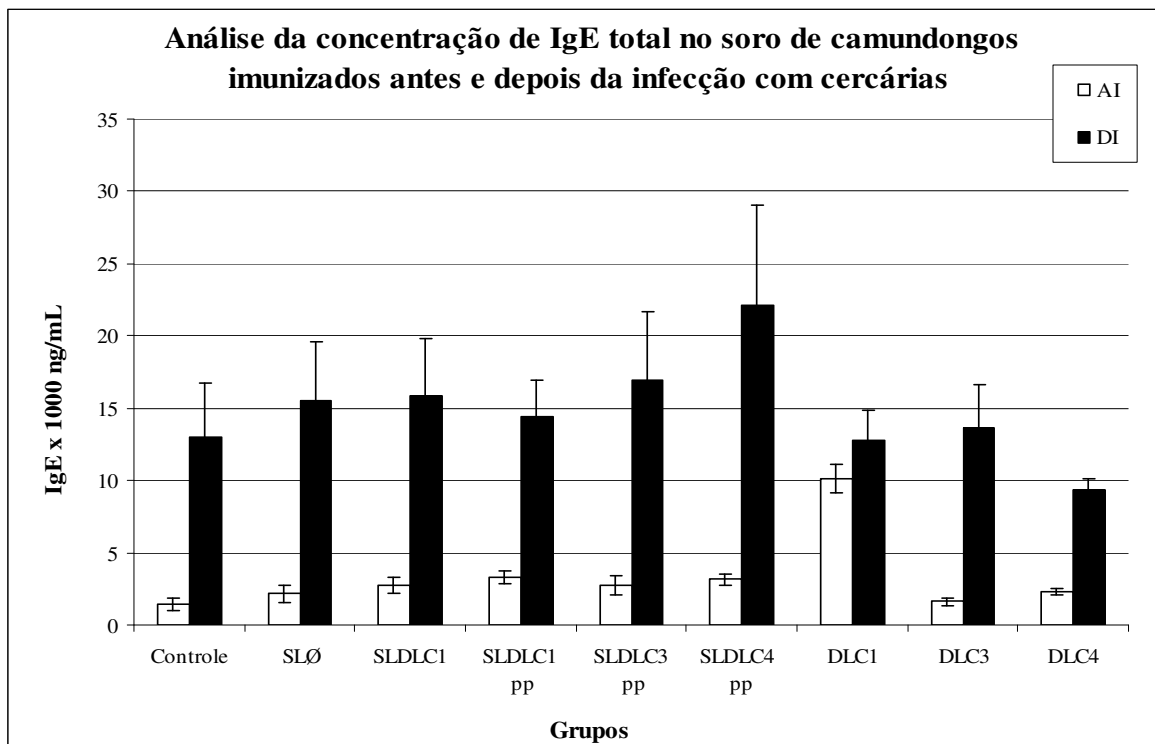


Figura 30 – Determinação da concentração de IgE total no soro dos animais imunizados, antes (AI) e depois (DI) da infecção com cercárias. O coating da placa foi feito com anticorpo de captura para IgE de camundongo. O soro dos animais foi introduzido na diluição inicial 1:50. Foi utilizado anticorpo secundário anti-IgE conjugado com agente Peroxidase. A revelação foi feita com a solução Sure blue da KPL (substrato para peroxidase) e a reação foi parada com solução “stop” do mesmo fabricante.

4.4.1.2 Análise da carga parasitária nos animais no primeiro ensaio de desafio

Os grupos experimentais de camundongos foram desafiados quinze dias após a última imunização com cercárias de *S. mansoni*, como descrito em Materiais e Métodos. A infecção foi realizada durante 40 minutos por imersão das caudas dos animais anestesiados em suspensões de cercarias (Figura 31).



Figura 31 – Infecção dos animais por imersão das caudas em suspensões de cercárias.

Neste ensaio algumas observações foram importantes como o fato de alguns animais acordarem da anestesia precocemente, tornado difícil cumprir o tempo estipulado de infecção. Também observamos que alguns animais retiravam as caudas da suspensão por movimentos involuntários, prejudicando a precisão do desafio. Assim, após as infecções as suspensões foram analisadas por contagem das cercárias residuais a fim de melhor precisar o número de cercárias infectantes por animal.

Os grupos experimentais continham oito animais separados em duas caixas para facilitar manipulação durante o desafio. Os números de vermes recuperados por animal em cada grupo experimental estão apresentados na Tabela 7. A porcentagem de proteção foi calculada considerando a média de vermes encontrados por grupo experimental comparado com a média de vermes recuperados dos animais não imunizados.

A Figura 32 mostra o número de vermes recuperados por animal de cada grupo de imunização.

Os animais foram imunizados com as proteínas purificadas ou com salmonelas apresentando os antígenos. Nos grupos SL DLC/pp os animais foram imunizados com duas doses de salmonelas e uma dose de proteína purificada, administrada entre as imunizações com salmonela.

Tabela 7 - Análise do primeiro ensaio de imunização e desafio com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

	Grupo	Vermes recuperados (por animal)	Média por caixa	Vermes recuperados media por grupo	Proteção (%) em relação ao grupo controle
	Controle				-
Caixa 1	Animal 01	66	50,7	32,6	
	Animal 02	42			
	Animal 03	41			
	Animal 04	†			
Caixa 2	Animal 01	20	19,8		
	Animal 02	19			
	Animal 03	19			
	Animal 04	21			
	SLØ				
Caixa 1	Animal 01	31	34,0	30,8	5,7
	Animal 02	27			
	Animal 03	24			
	Animal 04	54			
Caixa 2	Animal 01	20	27,5		
	Animal 02	30			
	Animal 03	29			
	Animal 04	31			
	SLDLC1				
Caixa 1	Animal 01	†	35,0	33,3	0
	Animal 02	44			
	Animal 03	33			
	Animal 04	28			
Caixa 2	Animal 01	31	32,0		
	Animal 02	33			
	Animal 03	25			
	Animal 04	39			
	SLDLC1/PP				
Caixa 1	Animal 01	33	27,5	27,8	15,0
	Animal 02	22			
	Animal 03	25			
	Animal 04	30			
Caixa 2	Animal 01	21	28,0		
	Animal 02	32			
	Animal 03	40			
	Animal 04	19			
	SLDLC3				
Caixa 1	Animal 01	27	27,0	38,3	0
	Animal 02	†			
	Animal 03	†			
	Animal 04	†			
Caixa 2	Animal 01	60	44,0		
	Animal 02	28			
	Animal 03	†			
	Animal 04	†			

(continua)

Tabela 7 - continuação

	Grupo	Vermes adultos recuperados (por animal)	Media por caixa	Média de vermes recuperados por grupo	Proteção (%) em relação ao grupo controle
	SLDLC4				8
Caixa 1	Animal 01	22	22,0	30,0	8,0
	Animal 02	26			
	Animal 03	13			
	Animal 04	27			
Caixa 2	Animal 01	52	40,7		
	Animal 02	37			
	Animal 03	33			
	Animal 04	†			
	DLC1				
Caixa 1	Animal 01	25	22,5	22,0	32,5
	Animal 02	17			
	Animal 03	15			
	Animal 04	33			
Caixa 2	Animal 01	24	24,5		
	Animal 02	27			
	Animal 03	20			
	Animal 04	15			
	DLC3				
Caixa 1	Animal 01	29	29,3	26,4	19,0
	Animal 02	31			
	Animal 03	28			
	Animal 04	†			
Caixa 2	Animal 01	20	24,3		
	Animal 02	33			
	Animal 03	22			
	Animal 04	22			
	DLC4				
Caixa 1	Animal 01	29	28,3	26,4	19,0
	Animal 02	19			
	Animal 03	21			
	Animal 04	44			
Caixa 2	Animal 01	28	24,0		
	Animal 02	3*			
	Animal 03	16			
	Animal 04	28			

* Esse animal foi desconsiderado nos cálculos para determinação de média

† - animal que morreu durante o ensaio

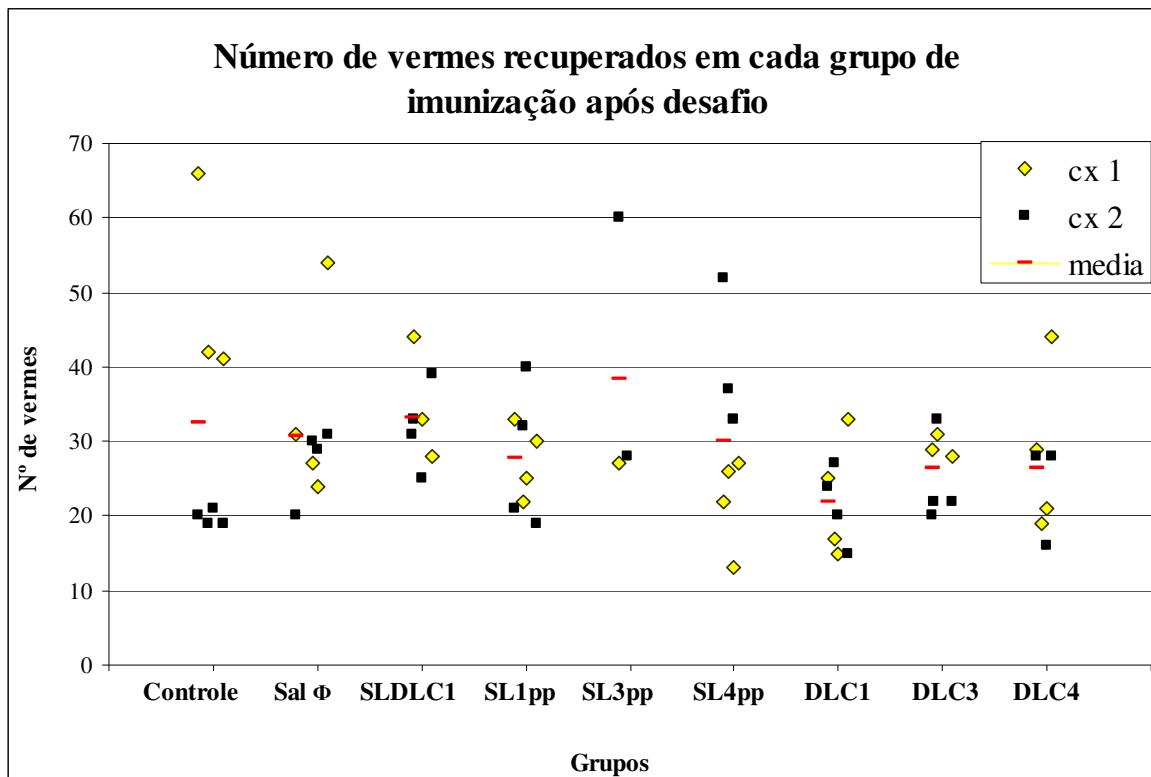


Figura 32 - Número de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* recuperados por camundongo nos grupos experimentais do primeiro ensaio de imunização e desafio. Os losangos amarelos correspondem aos animais da caixa 01 de infecção e os quadrados pretos aos animais da caixa 02 de infecção. Os traços vermelhos correspondem as médias de vermes recuperados em cada grupo de imunização.

Como pode ser observado a infecção do grupo controle foi muito heterogênea considerando as caixas 1 e 2. Isso talvez possa ser explicado pelo fato de ausência de luz parte do tempo da infecção da segunda caixa controle (aproximadamente 20 minutos dos 45 minutos de infecção). É sabido que as cercarias são mais ativas em presença de luz.

Os grupos imunizados com as DLCs purificadas neste experimento apresentaram uma significativa diminuição na carga parasitária recuperada em relação ao grupo controle, com proteção variando entre 19 e 32%. As proteções apresentadas pelos grupos imunizados com as salmonelas recombinantes carregando as DLCs foram menores, o grupo sal vazia apresentou uma proteção de 5,7%, o grupo SalDLC4 de 8% e o grupo com imunizações mistas, SalDLC1pp apresentou proteção de 15%.

4.4.1.3 Avaliação dos granulomas hepáticos dos animais do primeiro ensaio de desafio

No primeiro ensaio de desafio com *S. mansoni*, os fígados dos animais imunizados foram recuperados após a perfusão para avaliação dos granulomas hepáticos em cortes histológicos. As imagens foram obtidas com auxílio de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio óptico e foram realizadas análises biométricas das áreas granulomatosas. Ao menos 30 granulomas de cada grupo de imunização foram analisados. Os tamanhos de todos os granulomas foram comparados estatisticamente nos diferentes grupos de imunização pelo teste T de Student (Tabela 8). Na Figura 33 pode-se verificar as imagens de um granuloma hepático demonstrativo de cada grupo de imunização que foi obtido por microscopia. São apresentados granulomas de tamanhos medianos entre aqueles analisados.

Tabela 8 – Avaliação do tamanho dos granulomas hepáticos dos animais dos diferentes grupos de imunização.

Grupo	Média das áreas (x10³) μM²	Desvio Padrão (10⁻³) μM²	% Redução	Valor de p^{**}
controle	7,0	2,9	—	
SLØ	4,6	4,4	32 ^a	0,01
SLDLC1	3,2	2,5	—	
SLDLC1pp	3,5	2,6	—	
SLDLC3pp	3,0	2,8	37 ^b	0,03
SLDLC4pp	2,4	2,4	48 ^b	0,006
DLC1	1,5	1,4	78 ^a	1,4x10 ⁻⁰⁹
DLC3	2,0	1,6	71 ^a	1,0 x10 ⁻⁰⁸
DLC4	2,8	2,7	59 ^a	2,2 x10 ⁻⁰⁶

^a – em comparação com o grupo controle.

^b – em comparação com o grupo salmonela vazia.

** – significância calculada por teste t

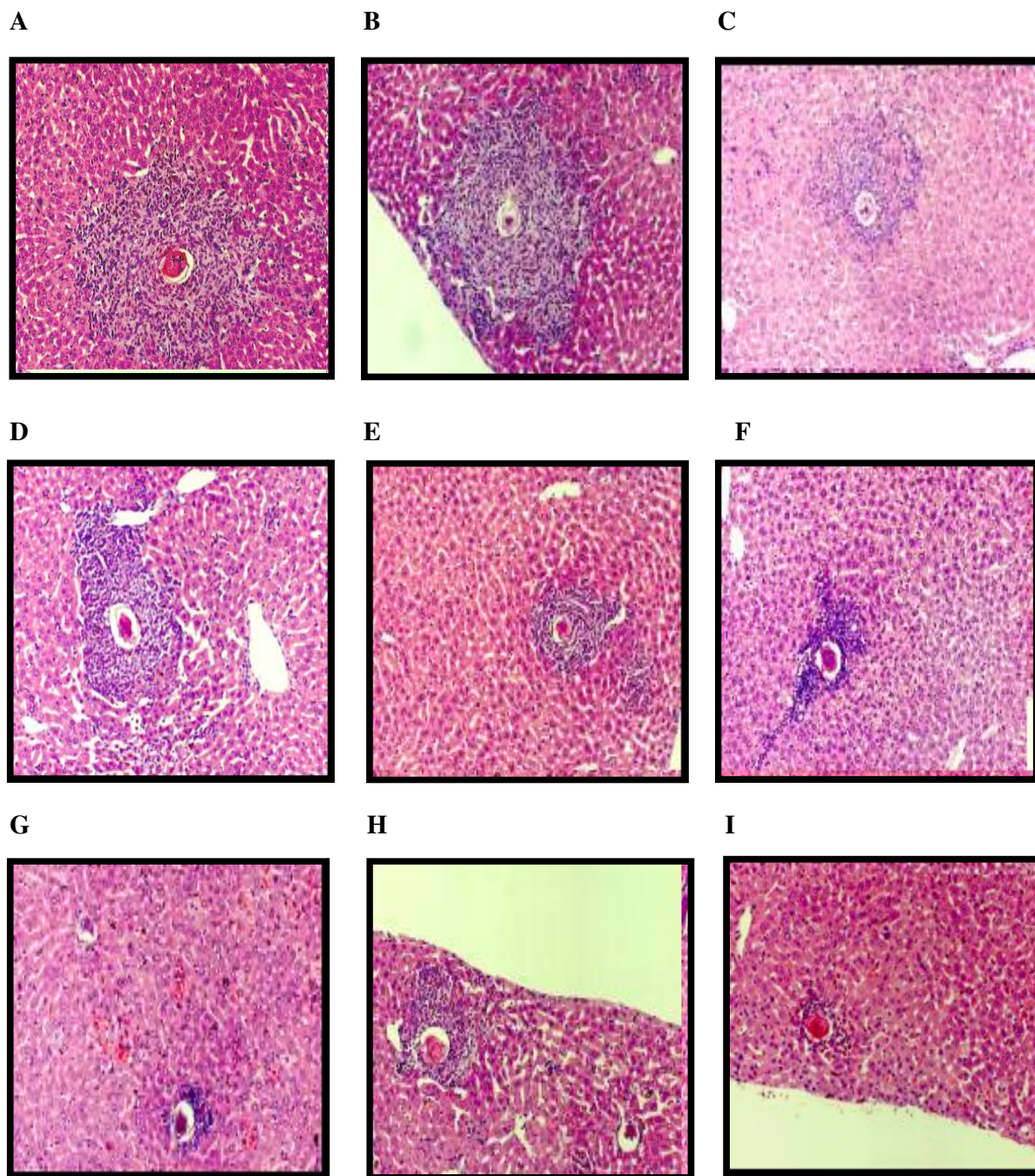


Figura 33 - Imagens dos granulomas hepáticos dos diferentes grupos de imunização. Aumento de 200xs. Grupos: A - controle, B - SLØ, C - SLDLC1, D - SLDLC1/pp, E - SLDLC3/pp, F - SLDLC4/pp, G - DLC1 purificada, H - DLC3 purificada, I - DLC4 purificada.

Observamos que os grupos imunizados com as proteínas purificadas ou com as salmonelas carregando as proteínas apresentaram uma diminuição significativa da área dos granulomas hepáticos em comparação com os granulomas do grupo controle. Isto sugere que essas proteínas podem ter um papel na formação dos granulomas. Foi possível verificar que a imunização apenas com salmonela vazia também resultou em granulomas aproximadamente 30% menores, sugerindo que a salmonela promove uma afetação na resposta imunológica do hospedeiro aos ovos do parasita. É possível verificar que os grupos que foram imunizados xx vezes com salmonelas, e então receberam uma dose de proteínas purificadas também apresentaram áreas granulomatosas reduzidas em relação ao grupo salmonela vazia, sugerindo novamente que as DLCs exercem efeito na formação dos granulomas hepáticos em camundongos.

4.4.2 Segundo ensaio de Imunização e Desafio

No segundo ensaio de Imunização e Desafio os animais receberam 3×10^7 salmonelas carregando as proteínas DLC ou 10 μg das proteínas purificadas. Os animais foram imunizados três vezes em intervalos de 15 dias. Os soros foram coletados para análises de respostas imunes.

4.4.2.1 Análise das respostas imune induzidas nos animais no segundo ensaio de imunização e desafio

Neste ensaio foram realizados ELISAs para determinação de IgG anti-DLC nos soros dos animais após as três imunizações (sangue coletado dois dias antes da infecção) e nos soros dos animais 43 dias depois da infecção com cercárias. O “coating” das placas de ELISA foi feito com 200 ng de proteína purificada por poço e os soros introduzidos na diluição inicial de 1:100. As Figuras 34 e 35 mostram as curvas de concentração de IgG anti-DLCs e anti-SLDLCs.

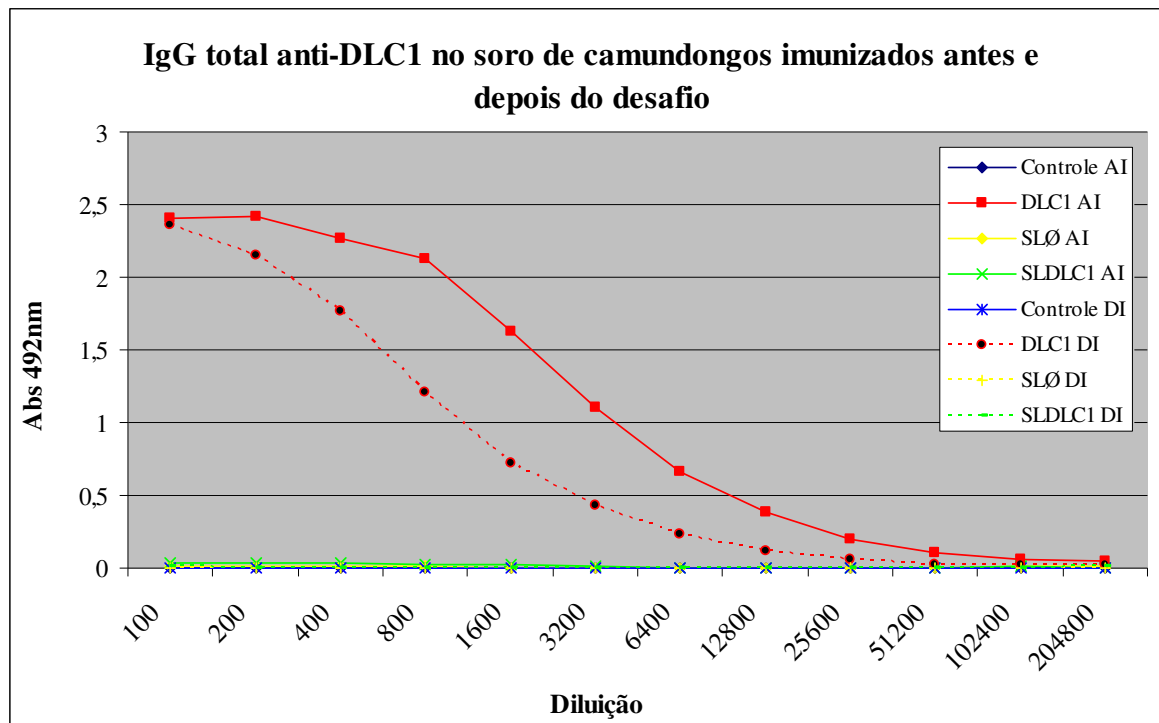


Figura 34 – Análise de IgG total anti DLC1 no soro de camundongos imunizados antes (AI) e depois (DI) da infecção. O “coating” da placa foi feito com 200 ng de DLC1 purificada, a diluição inicial do soro foi de 1:100 e a absorvância lida em 492 nm.

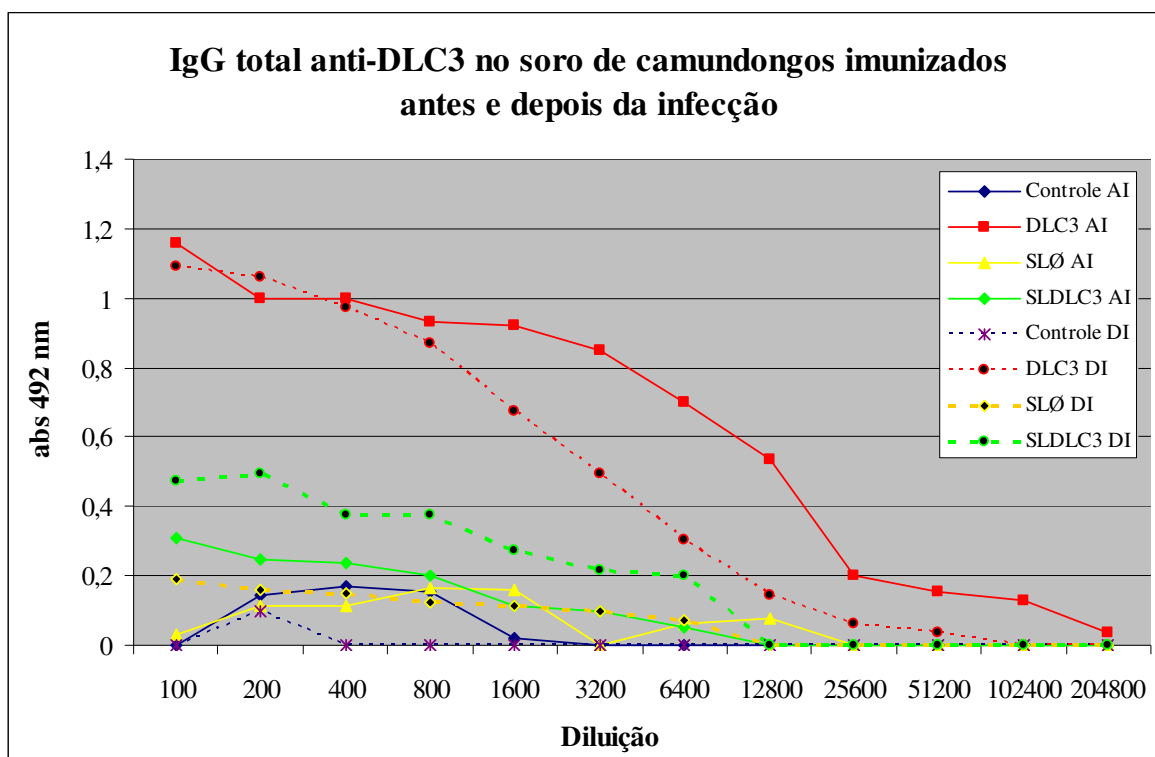


Figura 35 – Análise de IgG total anti DLC3 no soro de camundongos imunizados antes (AI) e depois (DI) da infecção. O “coating” da placa foi feito com 200 ng de DLC3 purificada, a diluição inicial dos soros foi de 1:100 e a absorbância lida em 492 nm.

Pela análise dos títulos de IgG induzidos verifica-se que as proteínas DLCs são bastante imunogênicas. Como no ensaio anterior a proteína DLC3 induziu nível maior de anticorpos em relação à proteína DLC1. Os títulos antes do desafio foram de 1:200.000 para DLC3 e 1:25.000 para a proteína DLC1. Depois da infecção é possível verificar que os níveis de IgG anti-DLC caem nos soros dos animais, o que pode estar relacionado com o tempo pós imunização e também com um consumo desses anticorpos contra os vermes. Quarenta e três dias depois da infecção os títulos de anticorpos específicos foram de aproximadamente 1:12.000 nos animais imunizados com DLC1, e de 1:25.000 nos animais imunizados com DLC3.

Além da análise de anticorpos do tipo IgG, também foi realizado um ELISA de captura para detecção dos anticorpos do tipo IgE. Neste ensaio a concentração de IgE nos soros dos animais imunizados com as proteínas purificadas e nos soros dos animais controles antes e depois da infecção foram determinadas por comparação com uma curva de concentrações conhecidas de IgE (Figura 36).

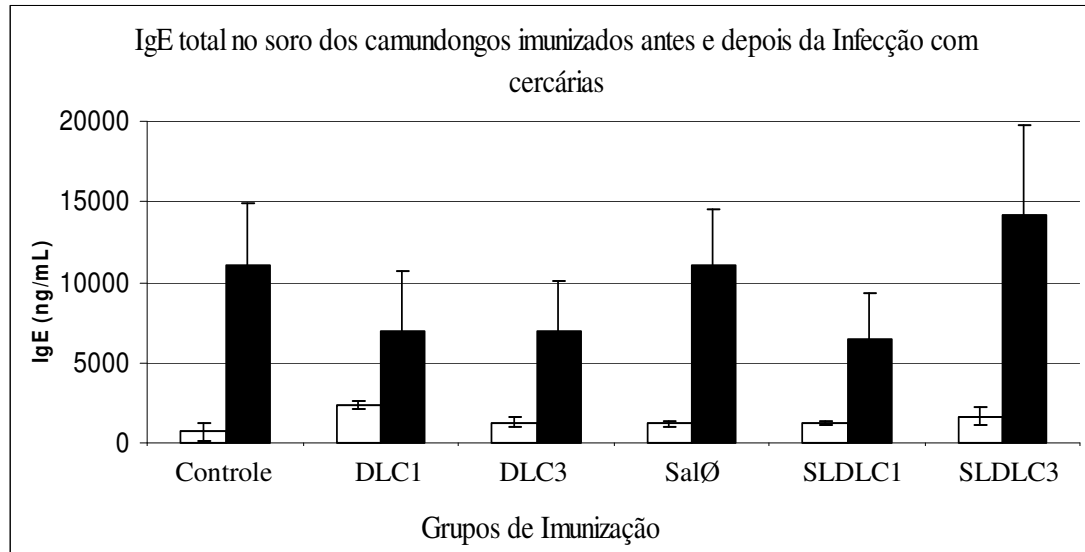


Figura 36 – Análise da concentração de IgE total no soro de camundongos imunizados antes e depois da infecção com cercárias. Concentração determinada por comparação com a curva padrão. As barras de erros correspondem aos desvios padrão das amostras dos cinco animais do grupo.

Pela análise das concentrações de IgE é possível verificar que a imunização com a proteína DLC1 induziu níveis significativamente mais altos em relação ao grupo controle. O grupo controle apresentou concentração de IgE 700 ng/ml, enquanto que o grupo imunizado com a proteína DLC1 apresentou aproximadamente 2300 ng/ml de soro. Esse resultado foi semelhante ao observado no primeiro ensaio de imunização e desafio.

Como esperado, após a infecção todos os animais em todos os grupos apresentaram altos níveis de IgE. É possível verificar que, assim como no primeiro ensaio de detecção de IgE nos soros dos animais infectados, os grupos imunizados com as proteínas DLC sofrem um aumento na concentração de IgE, porém bem menor do que o dos grupos controles. Não foi possível detectar IgE específico anti DLCs. No entanto é conhecido que IgE em pessoas de área endêmica exerce um papel protetor ou de adaptação hospedeiro/parasita. Isto sugere que as DLCs nativas participam na resposta imunológica, incluindo a indução de IgE pelos vermes.

4.4.2.2 Análise da resposta imune nos camundongos dos ensaios de imunização e desafio por “Western Blot”

4.4.2.2.1 Reconhecimento de anticorpos anti-DLC3 pela proteína recombinante após imunização com a proteína purificada ou com a SL-DLC3

Avaliamos inicialmente a indução de anticorpos nos animais imunizados com a proteína DLC3 ou com a salmonela recombinante apresentando esse antígeno (SLDLC3) por ensaios de “Western Blot”. Os soros controle desse ensaio eram provenientes de animais não imunizados (soro pré-imune) ou animais imunizados com SLØ (Figura 37).

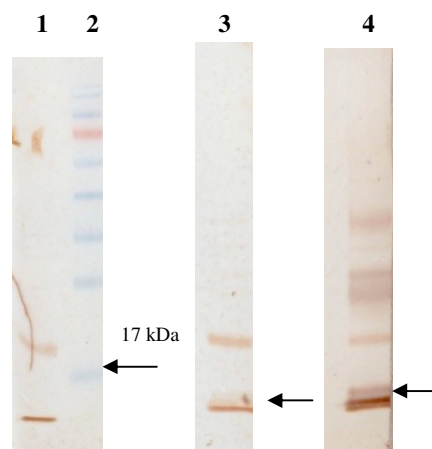


Figura 37 – Reconhecimento de DLC3 pelo soro de camundongos imunizados em ensaios de “Western Blot”. Amostras de DLC3 recombinante purificada foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF. As membranas foram cortadas e incubadas com diferentes soros. linhas 1) soro de animal imunizado com salmonela vazia, 2) padrão de massa molecular, 3) soro de animal imunizados com salmonela-pAEsoxDLC3 e 4) soro de animal imunizados com DLC3 purificada.

Na membrana incubada com soro anti-salmonela vazia pode-se observar bandas de reconhecimento que são possíveis contaminantes e nenhuma banda é observada na posição esperada da proteína DLC3 (aproximadamente 13 kDa).

É possível verificar, na membrana incubada com soro anti-SLDLC3, uma banda tênue de reconhecimento na posição esperada de DLC3 (indicada pela seta linha 3), além das bandas de contaminantes semelhante às observadas na membrana incubada com soro anti-salmonela vazia.

Utilizando o soro anti-DLC3 observa-se a determinação de diversas bandas (linha 4), indicando possíveis contaminantes de *E. coli* presentes na preparação da proteína purificada, os quais também induziram anticorpos na imunização. A presença desses contaminantes de *E. coli* no imunógeno tem efeito booster, uma vez que os organismos dos mamíferos são naturalmente expostos a essa bactéria. Observa-se também uma banda tênue correspondente à DLC3 (indicada pela seta).

4.4.2.2 Reconhecimento cruzado de anticorpos anti-DLCs pelas DLCs recombinantes

Um ensaio de “western blot” foi realizado para verificar possível reconhecimento cruzado dos soros anti-DLCs pelas proteínas homólogas purificadas. Houve reconhecimento cruzado dos soros anti-DLC1, 3 e 4 pelas parálogas recombinantes (Figura 38). Esses resultados eram esperados devido às similaridades entre as proteínas, sendo que DLC1 e DLC3 compartilham 59% de similaridade e 31% de identidade de aminoácidos; DLC1 e DLC4 possuem 61% de similaridade e 29% de identidade; e DLC3 e DLC4 possuem 59% de similaridade e 35% de identidade.

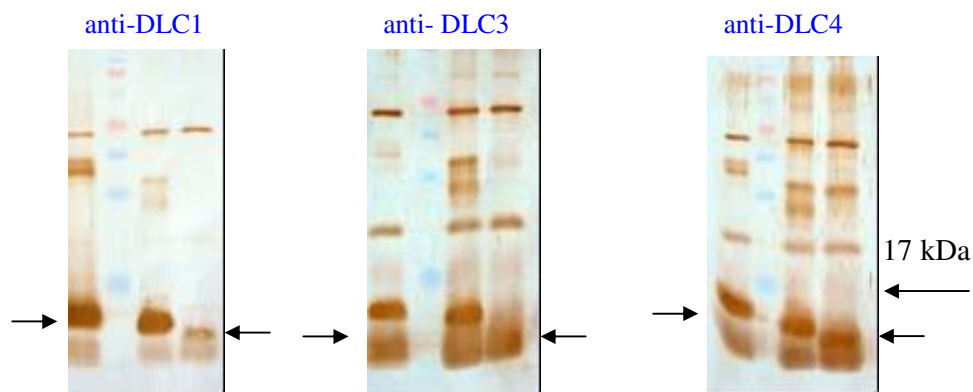


Figura 38 – Análise do reconhecimento cruzado dos soros gerado contra as DLCs sobre as proteínas purificadas. Membranas incubadas com soros anti-DLC1, 2 ou 4. Nos poços: M) Marcador de peso molecular, 1) DLC1 purificada, 2) DLC3 purificada, 3) DLC4 purificada. Foram colocados 2 μ g de proteína por poço. A diluição dos anticorpos anti-DLCs foi de 1:1000.

O ensaio mostrou o reconhecimento cruzado dos soros específicos pelas DLCs parálogas. Pode-se observar bandas de diversas massas moleculares, o que possivelmente reflete as contaminações com proteínas de *E. coli* nas frações das proteínas recombinantes purificadas.

4.4.2.2.3 Reconhecimento de DLCs nativas em extratos de verme de *S. mansoni* por soros anti-DLC

Para avaliar o reconhecimento das proteínas nativas de verme de *S. mansoni* pelo soro dos animais imunizados com as DLCs, foi realizado ensaio de western blot com diferentes frações de extratos protéicos de vermes adultos, fração de tegumento, fração solúvel do extrato total e fração de vermes sem tegumento (Figura 39).

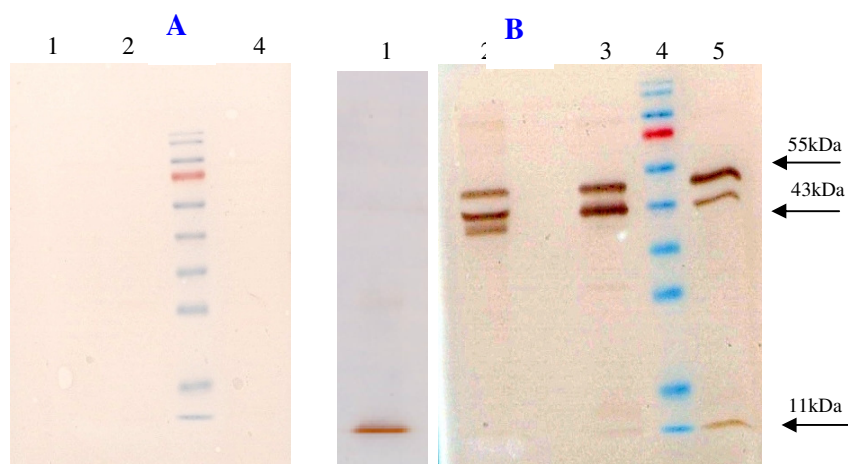


Figura 39 – Ensaio de reconhecimento de proteínas de diferentes frações de extratos protéicos de vermes adultos de *S. mansoni* pelo soro anti DLC1. (A) controle com soro pré-imune, (B) soro anti-DLC1. Nos poços: 1) DLC1 purificada, 2) extrato protéico de verme adulto sem tegumento, 3) extrato protéico de tegumento de verme adulto, 4) marcador molecular, 5) extrato total de verme adulto.

O experimentos de “Western Blot” revelou o reconhecimento de proteínas nas frações de extratos protéicos de vermes adultos na posição esperada de DLC1 e foram fortemente detectadas outras bandas em posições de mais alta massa molecular, nas três frações de extratos protéicos de vermes. Esse reconhecimento pode estar relacionado ao fato das dineínas de cadeia leve serem componentes de complexos protéicos motores, que provavelmente não teriam sido dissolvidos na presença dos agentes denaturantes; ou ainda as dineínas estariam se apresentando na forma de multímeros não dissociados. Também já foi visto que algumas proteínas de *Schistosoma mansoni* de maior massa molecular possuem em sua composição domínios similares aos de dineínas de cadeia leve. Não podemos afirmar se essas proteínas apresentariam epitopos reconhecíveis pelos soros anti-DLCs.

4.4.2.2.4 Avaliação da antigenicidade de DLC

Uma questão importante da proposta de utilização das DLCs como vacina refere-se à sua antigenicidade. Portanto foi realizado um western blot utilizando o soro dos animais infectados (não imunizados) para reconhecimento das DLCs recombinantes imobilizadas na membrana (Figura 40).

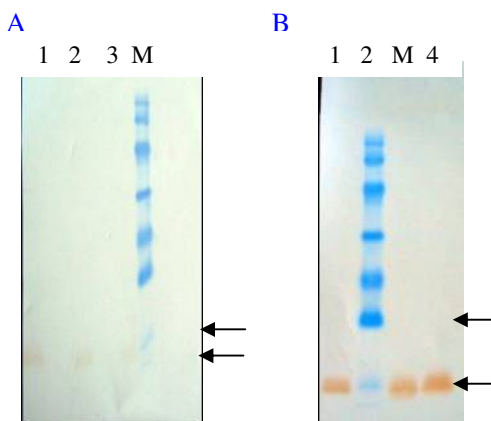


Figura 40 – Análise do reconhecimento das DLCs recombinantes pelo soro de camundongos infectados com *S. mansoni*. A – Membrana incubada com soro de animais controles (antes da infecção). B – Membrana incubada com soro de animais infectados. Nos poços: 1) DLC1 purificada, 2) DLC3 purificada, 3) DLC4 purificada, M) Marcador de massa molecular.

Analisando a Figura 40, podemos verificar que as proteínas purificadas foram reconhecidas pelo soro de camundongos infectados demonstrando que as DLCs testadas são proteínas antigênicas, sugerindo que são proteínas que estão expostas ao sistema imune durante a infecção. Esse dado reforça o potencial vacinal das DLCs. Também é possível verificar que a membrana incubada com soro de camundongos controles antes da infecção possui reconhecimentos tênues de proteínas de menor massa molecular, provavelmente as mesmas contaminantes sendo reconhecidas por anticorpos naturalmente presentes nos soros dos camundongos.

4.4.2.3 Análise da carga parasitária nos animais do segundo ensaio de imunização e desafio

Devido às dificuldades nos ensaios anteriores de desafio, neste segundo ensaio desenvolvemos um dispositivo para melhorar a precisão e segurança da infecção dos animais. Com o auxílio do Sr. Gilmar Jorge do setor de Engenharia do Instituto Butantan, foi elaborado um suporte para contenção dos camundongos, para garantir que as caudas dos animais permanecessem imersas na suspensão de cercárias pelo período de 45 minutos. Essa metodologia de infecção se mostrou bastante eficiente e mesmo quando os camundongos acordavam era fácil manter as caudas imersas pelo período determinado de infecção. Na Figura 41 (A, B, C, D) ilustra o dispositivo de contenção.

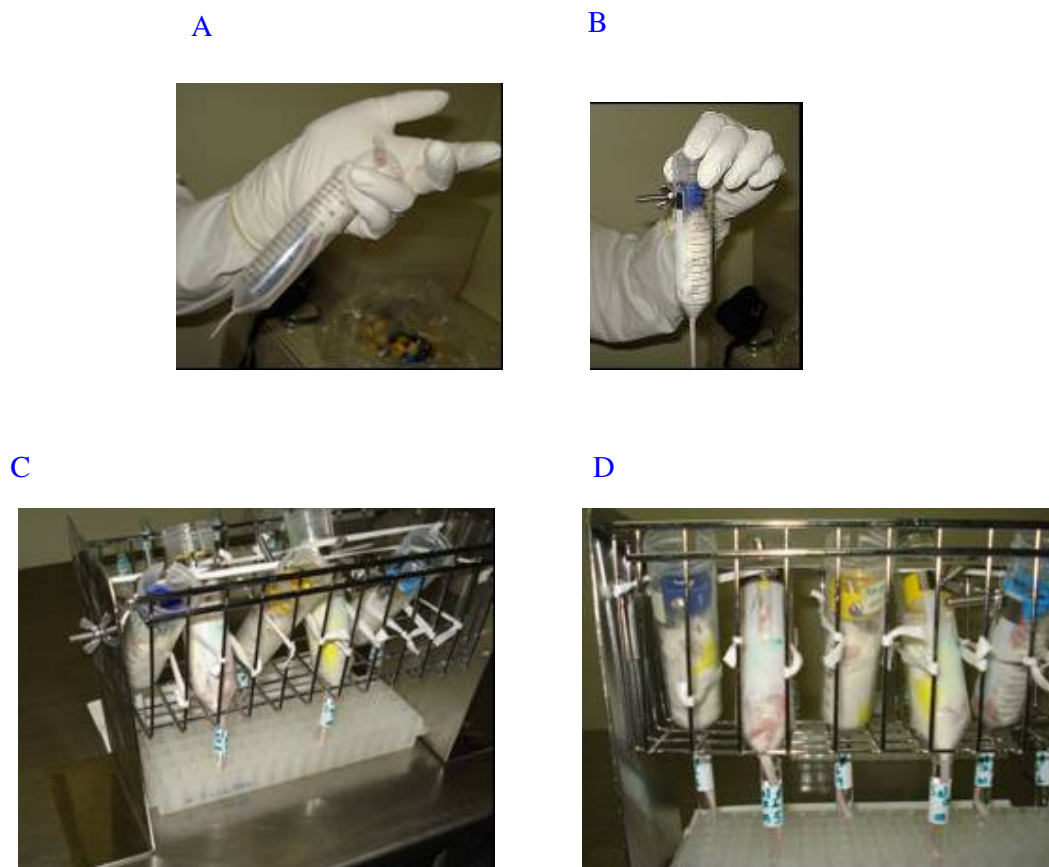


Figura 41 – Dispositivo desenvolvido em nosso laboratório para a infecção dos camundongos por imersão das caudas em suspensões de cercárias. A e B – Compartimentos para contenção dos camundongos com ajuste de altura. C e D – suporte para manter os animais durante a infecção. Os animais são anestesiados para o processo.

Após a infecção com cercárias os animais foram perfundidos para recuperação de vermes adultos. Na Tabela 9 pode-se verificar a recuperação de vermes adultos em camundongos com 45 dias de infecção, bem como a média de vermes encontrada por grupo de imunização e a proteção relativa ao controle. Na Tabela 10 são encontrados as mesmas variáveis, porém em camundongos com 55 dias de infecção. Na Tabela 11 e na Figura 42 está mostrado a união da recuperação de vermes dos grupos imunizados com 45 e 55 dias de infecção.

Tabela 9 – Análise do ensaio de infecção com cercárias de *Schistosoma mansoni* do segundo ensaio de desafio em camundongos com 45 dias de infecção.

Grupo	Vermes adultos recuperados com 45 dias após a infecção	Média de vermes recuperados	Proteção em relação ao grupo controle (%)
Controle			-
Animal 01	46	37,5	
Animal 02	42		
Animal 03	41		
Animal 04	33		
Animal 05	25		
Animal 06	38		
SL Ø			
Animal 01	†	44	0
Animal 02	59		
Animal 03	21		
Animal 04	49		
Animal 05	40		
Animal 06	51		
DLC1			
Animal 01	20	21,5	42,67
Animal 02	16		
Animal 03	23		
Animal 04	19		
Animal 05	35		
Animal 06	16		
SLDLC1			
Animal 01	36	35,7	4,89
Animal 02	30		
Animal 03	41		
Animal 04	†		
Animal 05	†		
Animal 06	†		
DLC3			
Animal 01	24	20,8	44,44
Animal 02	22		
Animal 03	23		
Animal 04	16		
Animal 05	18		
Animal 06	22		
SLDLC3			
Animal 01	32	27,7	26,22
Animal 02	27		
Animal 03	29		
Animal 04	20		
Animal 05	25		
Animal 06	33		

† - animal que morreu durante o ensaio

Tabela 10 – Análise do ensaio de infecção com cercárias de *Schistosoma mansoni* do segundo ensaio de desafio em camundongos com 45 dias de infecção.

Grupo	Vermes adultos recuperados após 55 dias de infecção	Média de vermes recuperados	Proteção em relação ao grupo controle (%)
Controle			
Animal 01	9*	34,8	-
Animal 02	34		
Animal 03	†		
Animal 04	39		
Animal 05	43		
Animal 06	23		
SLØ			
Animal 01	30	34,3	1,2
Animal 02	37		
Animal 03	36		
Animal 04	38		
Animal 05	39		
Animal 06	26		
DLC1			
Animal 01	33	20,3	41,49
Animal 02	24		
Animal 03	21		
Animal 04	15		
Animal 05	17		
Animal 06	12		
SLDLC1			
Animal 01	†		
Animal 02	†		
Animal 03	†		
Animal 04	†		
Animal 05	†		
Animal 06	†		
DLC3			
Animal 01	20	14	59,71
Animal 02	14		
Animal 03	†		
Animal 04	11		
Animal 05	12		
Animal 06	13		
SLDLC3			
Animal 01	36	39,2	0
Animal 02	51		
Animal 03	29		
Animal 04	28		
Animal 05	52		
Animal 06	†		

* Esse animal foi desconsiderado nos cálculos para determinação de média

† - animal que morreu durante o ensaio

Tabela 11 – Análise do ensaio de infecção com cercárias de *Schistosoma mansoni* do segundo ensaio de desafio em camundongos com 45 e 55 dias de infecção.

Grupo (n° animais por grupo de imunização)	Média de vermes recuperados 45 e 55 dias	Desvio Padrão	Proteção em relação ao grupo controle (%)
Controle (10)	36,4	7,63	-
SLØ (11)	38,7	11,1	0
DLC1 (12)	20,9	7,01	42,5
SLDLC1 (3)	35,7	5,51	2,0
DLC3 (11)	17,7	4,46	51,4
SLDLC3 (11)	32,9	10,1	9,6

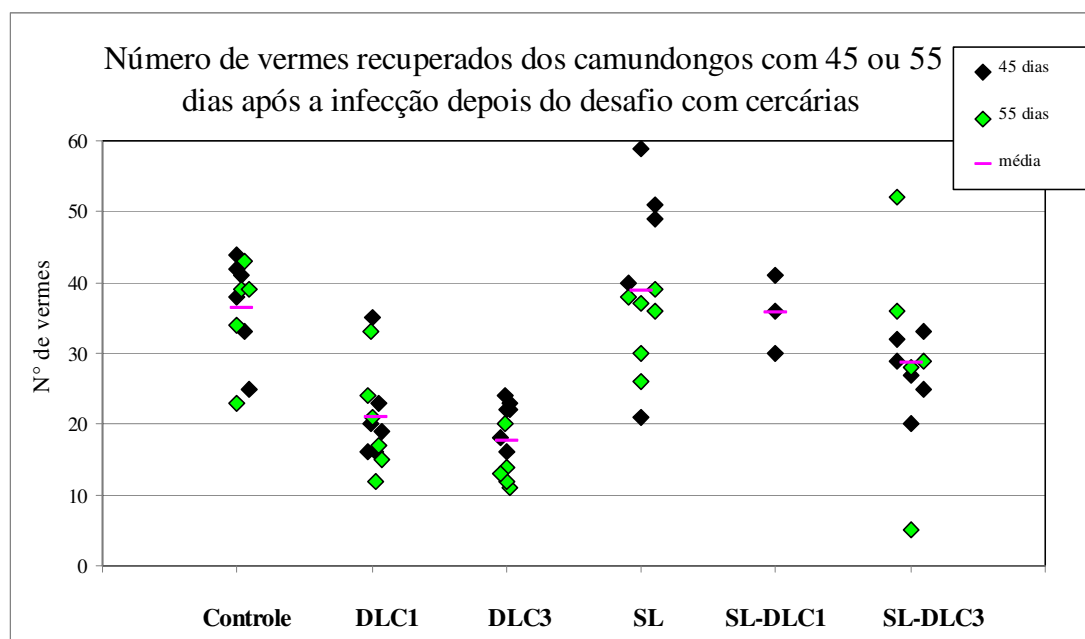


Figura 42 – Quantidade de vermes recuperados por camundongo com 45 ou 55 dias após a infecção. Os losangos pretos correspondem a animais perfundidos após 45 dias de infecção e os losangos verdes a animais perfundidos após 55 dias de infecção. As barras rosas correspondem a média de vermes recuperados nos animais dos dois grupos.

É possível verificar que com 45 dias após a infecção os grupos imunizados com as proteínas purificadas apresentaram uma significativa redução na carga parasitária quando comparado à quantidade de vermes recuperados do grupo controle. O grupo salmonela DLC3 também mostrou certa redução na carga parasitária recuperada. Já com 55 dias após a infecção é possível verificar que os dados de proteção em relação às proteínas purificadas se

repetem, sendo que o grupo imunizado com DLC3 apresentam maior nível de proteção, que pode estar relacionado a esse antígeno ainda continuar combatendo os vermes conforme o passar dos dias de infecção. Os animais do grupo salmonela-DLC3 não apresentaram proteção quando comparados ao grupo controle.

Os resultados de proteção utilizando as DLCs purificadas como antígenos vacinais se mostraram bastante promissores, pois nenhum antígeno até o presente momento foi capaz de conferir esses níveis de proteção utilizando como adjuvante hidróxido de alumínio.

4.5.2.4 Avaliação dos granulomas hepáticos dos animais do segundo ensaio de desafio

Assim como no primeiro ensaio de desafio com infecção por *S. mansoni*, os fígados dos animais imunizados foram recuperados para avaliação do tamanho dos granulomas em cortes histológicos. Porém no segundo ensaio de imunização e desafio resolvemos analisar granulomas hepáticos com 45 e com 55 dias após a infecção para determinar se eles continuariam menores com o decorrer do tempo ou não. As imagens obtidas através de microscopia de luz foram utilizadas para a medição dos granulomas hepáticos dos camundongos com 45 e 55 dias após a infecção para avaliação de redução da área granulomatosa e também para determinar se os antígenos e as formas de apresentação teriam algum efeito no desenvolvimento do granuloma esquistossomótico. Para melhorar a análise, foram medidos aproximadamente 60 granulomas por cada grupo de imunização Neste ensaio utilizamos um microscópio de luz normal, que possui uma câmera fotográfica acoplada que permite a obtenção das imagens. O software utilizado para medição de áreas dos granulomas foi o Image Express e obtivemos auxílio da Dra. Marta Antoniazzi do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. É possível verificar as imagens de granulomas medianos com 45 dias de infecção na Figura 43 e de granulomas com 55 dias de infecção na Figura 44. Os tamanhos dos granulomas foram comparados estatisticamente nos diferentes grupos de imunização pelo teste T de Student (Figura 45, Tabela 12).

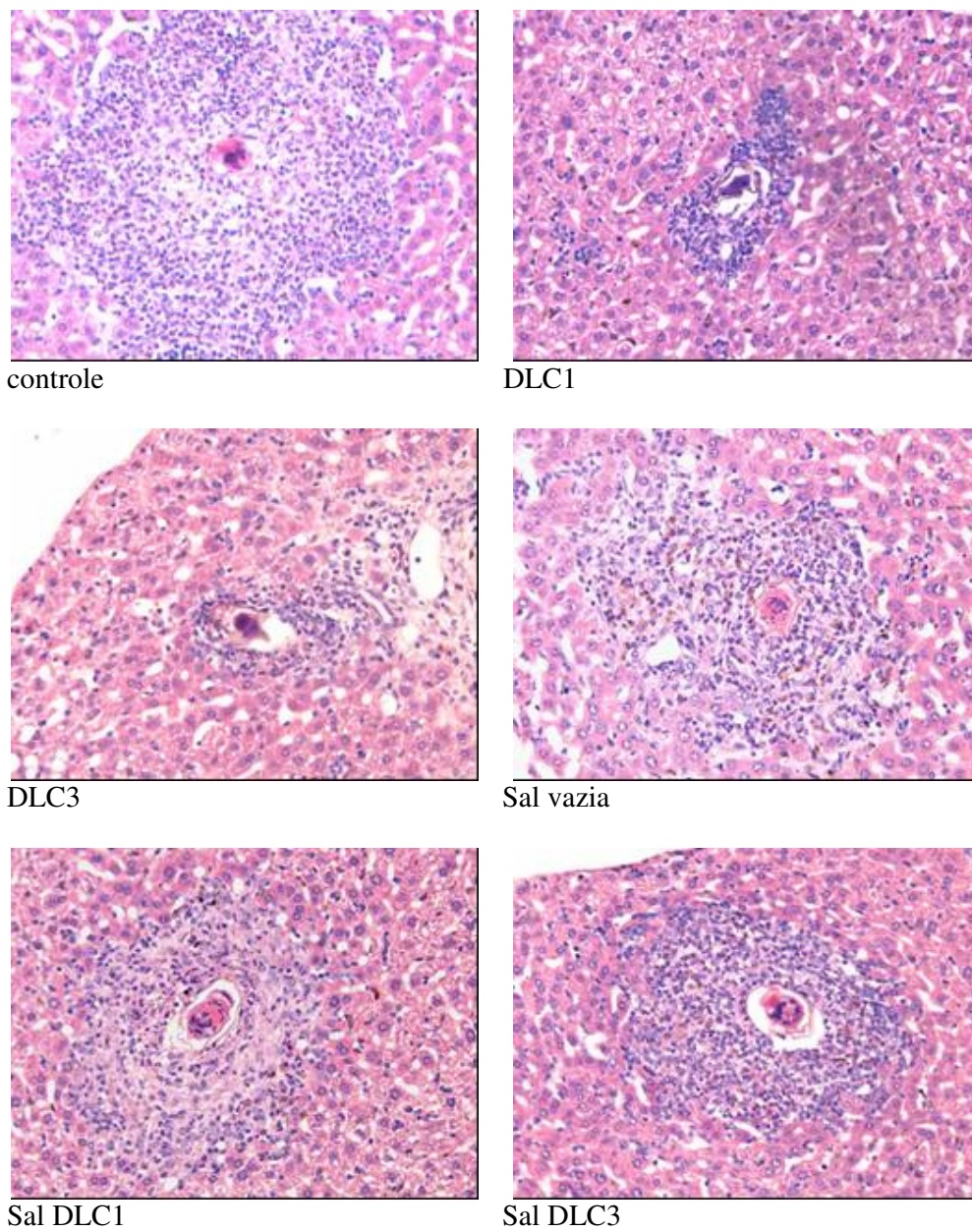
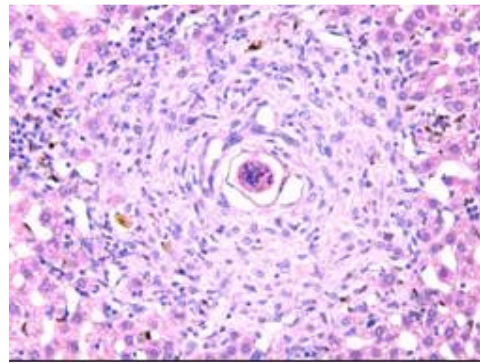
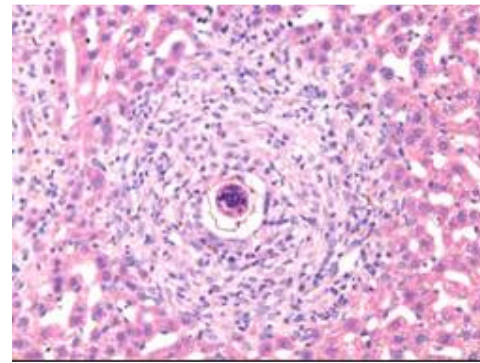


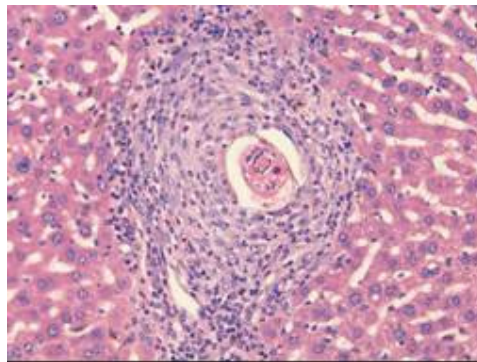
Figura 43 – Imagens dos granulomas hepáticos de camundongos com 45 dias de infecção.



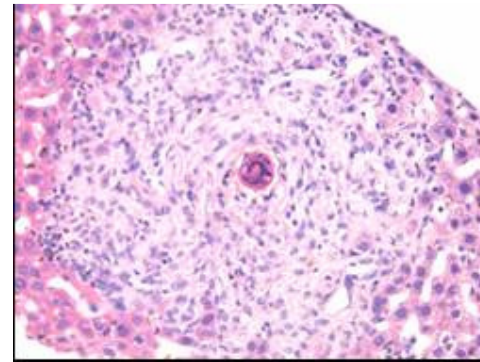
Controle



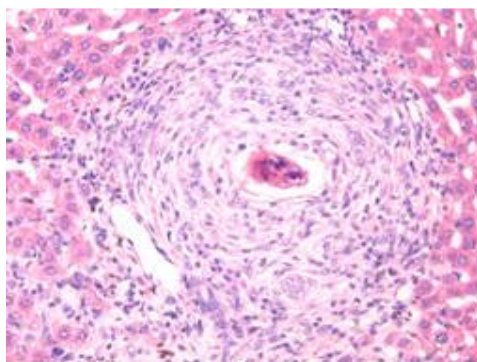
DLC1



DLC3



Sal vazia



Sal DLC3

Figura 44 - Imagens dos granulomas hepáticos de camundongos com 55 dias de infecção.

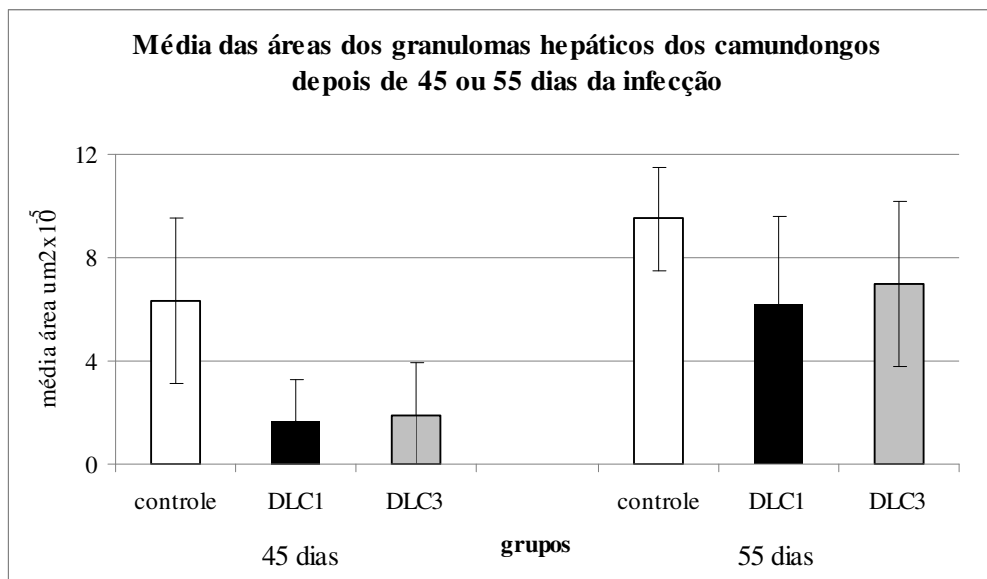


Figura 45 – Tamanho médio das medidas das áreas dos granulomas hepáticos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais com 45 e 55 dias após a infecção. As barras de erros correspondem aos desvios dos tamanhos de granuloma entre os animais do grupo.

Tabela 12 – Avaliação dos granulomas hepáticos dos animais nos diferentes grupos de imunização com 45 e 55 dias após a infecção.

Grupos	45 dias depois da infecção				55 dias depois da infecção			
	Média área μm^2	Desvio	Valor P	% de redução	Média área μm^2	Desvio	Valor P	% de redução
controle	6.3	3.1		-	9.4	2.0		-
DLC1	1.7	1.6	$1,26 \times 10^{-15}$	72	6.1	3.3	$4,06 \times 10^{-9}$	35
DLC3	1.9	2.0	$3,88 \times 10^{-14}$	70	7.0	3.1	$3,18 \times 10^{-6}$	25
Sal θ	4.1	3.1	0,0003	34	8.3	3.2	0,029	12
SLLC1	3.6	2.9	$9,11 \times 10^{-6}$	42	-	-	-	-
SLDLC3	3.9	3.2	0,0001	37	8.6	3.7	0,15	9

Pela análise biométrica dos granulomas hepáticos é possível verificar que após 45 dias de infecção todos os grupos de imunização testados apresentaram granulomas significativamente menores quando comparados aos do grupo controle. Os grupos imunizados com DLCs purificadas apresentaram atingiram granulomas com média de área 70% menor, indicando que esses antígenos influenciam de alguma forma a patologia da esquistossomose. É possível observar que 55 dias após a infecção os grupos imunizados com as DLCs apresentavam granulomas com áreas significativamente menores que os do controle. O

mecanismo envolvido na inibição do crescimento do granuloma por imunização com as DLCs ainda não foi investigado. É possível que a diminuição do número de vermes e, conseqüentemente, diminuição no número de ovos aportando no fígado tenha sido suficiente para diminuir o quadro pró-inflamatório que exacerba a formação do granuloma. Uma análise mais detalhada sobre possíveis variações no quadro de citocinas e quantidade de células do sistema imune presentes nesses granulomas poderá ajudar a esclarecer a participação da resposta imune às DLCs.

4.4.2.5 Análise do Teste de sobrevivência e avaliação patológica dos camundongos

Além dessas análises fizemos ainda um experimento para verificar se os animais imunizados com as proteínas purificadas teriam sua longevidade aumentada. Para tanto, grupos experimentais com seis animais cada, foram mantidos por 80 dias após a infecção. Foi possível verificar que os animais imunizados com as DLCs apresentavam melhor quadro clínico quando comparados aos demais grupos. Apenas dois animais do grupo controle e um do grupo salmonela vazia morreram nesse período. Alguns animais que apresentaram diarreia, afetação na circulação sanguínea e aspecto de morbidez foram sacrificados. Os animais imunizados com as DLCs pareciam mais saudáveis, sendo mais ativos e mantendo seus padrões de alimentação. As barrigas desses animais eram menores quando comparadas ao grupo controle de infecção (Figura 42).

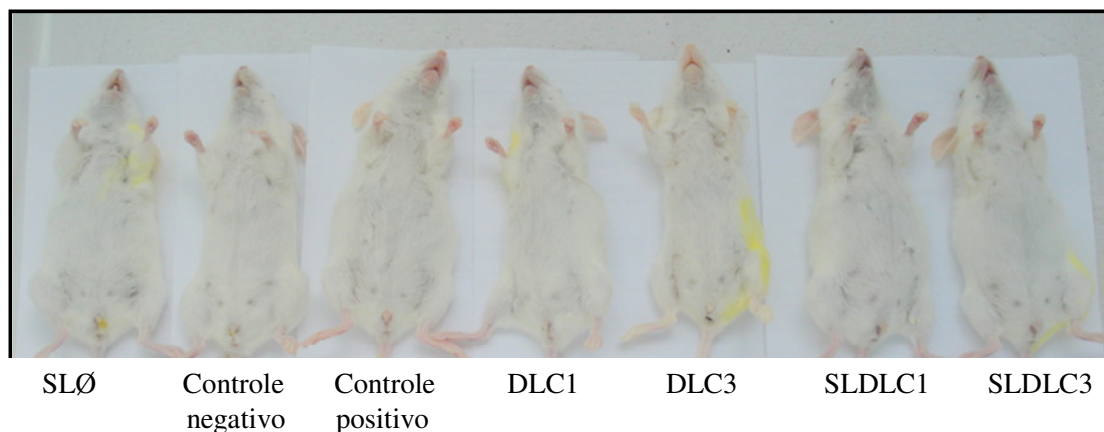


Figura 46– Aspecto anatômico dos animais de cada grupo de imunização 80 dias após a infecção. A barriga dos animais vacinados com DLC era claramente menor que dos outros animais.

Os baços e os fígados também se apresentavam menores e com aspectos mais saudáveis embora maiores que dos animais não infectados (Figura 43). Os animais dos outros grupos de imunização ficaram doentes mais precocemente, com diminuição de atividade. É importante salientar que em um aspecto geral sobre a doença, mesmo os animais vacinados que apresentaram menor número de vermes recuperados, com fígados e baços visivelmente menos afetados, sofreram com a infecção esquistossomótica, ficando mais letárgicos do que animais não infectados.

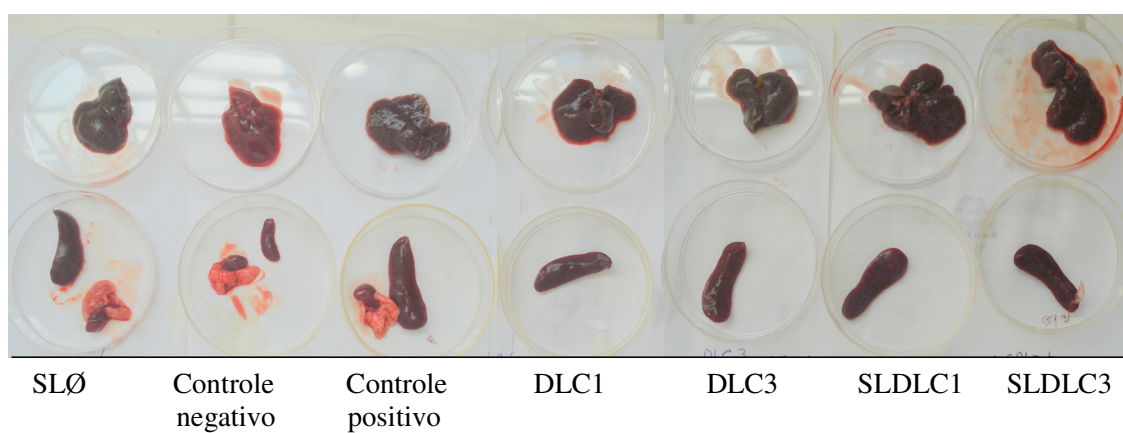


Figura 47 – Fígados e Baços de camundongos dos diferentes grupos de imunização após 80 dias da infecção.

5 DISCUSSÃO

Atualmente existe um maior investimento no desenvolvimento de vacinas contra parasitas eucariotos humanos, no entanto, a complexidade dos vermes e suas interações com o hospedeiro mostram que os pesquisadores estão diante de um grande desafio. Ainda não existe uma vacina contra a esquistossomose e os antígenos mais promissores demonstram apenas proteção parcial contra infecção. Os parasitas induzem fraca imunidade natural e são capazes de evadirem ou resistirem às respostas imunes específicas dos hospedeiros. A persistência dos esquistossomas no hospedeiro leva a reações imunológicas crônicas que resultam em lesões teciduais e complicações patológicas. Essas complicações são mais relacionadas com a resposta imune do hospedeiro ao parasita e seus ovos do que à própria infecção.

Hoje é bem conhecido que a seleção de adjuvantes e sistemas de apresentação de antígenos pode estimular uma resposta imune mais adequada (BERGQUIST, 1995; DOENHOFF, 1998; COMOY *et al.*, 1998) e que esse é um ponto crítico no desenvolvimento de vacinas. O adjuvante de Freund que vem sendo testado em modelos animais mostrou resultados interessantes de proteção com antígenos de *Schistosoma* (MCMANUS e LOUKAS, 2008; CARDOSO *et al.*, 2008), porém seu uso é proibido em humanos devido a efeitos adversos (lesão inflamatória no local da injeção, granulomas e abscessos). Por isso, outros sistemas estão sendo explorados quanto aos seus potenciais adjuvantes, entre eles o utilizado em nosso projeto, salmonelas vivas atenuadas recombinantes como apresentadoras de antígenos heterólogos.

A linhagem vacinal de salmonelas que foi utilizada possui atenuação por mutação no gene *aroA*. O gene *aroA* está relacionado com a síntese de aminoácidos aromáticos, que são necessários para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Salmonelas com atenuação em genes *aro* perdem a capacidade de se multiplicar em macrófagos e em tecidos de mamíferos (MASTROENI *et al.*, 2000), mas mantém a capacidade invasora, sendo por isso úteis como vacinas e como carregadoras de antígenos heterólogos.

Durante a infecção com esquistossoma, a resposta imune do hospedeiro contra cercárias e esquistossômulos é inicialmente mediada por células tipo Th1. Com o progresso da infecção, a resposta é substituída por células Th2, induzida em especial durante a formação de granulomas gerados pelos produtos tóxicos de ovos retidos em tecidos do hospedeiro. Estudos demonstraram que uma vacina anti esquistossomose eficiente requer forte indução de respostas dos tipos Th1 e Th2 (LOUKAS e MCMANUS, 2008). A estratégia de utilizar

salmonelas atenuadas recombinantes apresentando antígenos de *Schistosoma* foi desenhada devido ao fato dessa forma de apresentação modular a resposta imune para um tipo Th1 que é a requerida contra o verme nos seus estágios iniciais de desenvolvimento no hospedeiro mamífero. Neste sentido, o aumento da resposta imune para o padrão Th1 provavelmente resultaria em um efeito de bloqueio na maturação dos vermes.

Em nossos estudos foram considerados dados de um projeto anterior que foi desenvolvido em nosso laboratório, que investigou a resposta imune em camundongos imunizados com proteínas DLCs de *S. mansoni*. As DLCs são proteínas altamente conservadas e são essenciais para motilidade em eucariotos, sendo expressas em diferentes tecidos (WILSON *et al.*, 2001). A análise bioinformática do transcriptoma de *S. mansoni* revelou a existência de uma família de parálogos de dineínas com pelo menos 18 membros com similaridades variando de 54 a 91% com uma DLC de mamífero. A existência de tantos parálogos sugere que essas proteínas sejam importantes para o desenvolvimento do verme.

Em *S. japonicum* foi descrita uma família de parálogos de dineínas de cadeia leve com cinco parálogos (YANG *et al.*, 1999). A imunolocalização de duas dessas proteínas mostrou que estão presentes nas diferentes frações do tegumento de verme adulto, sugerindo exposição ao sistema imune. Esse autor, trabalhando com duas DLCs, mostrou que uma delas ocorre em todo o ciclo de vida do parasita, enquanto a outra ocorre apenas nos estágios intra-hospedeiros (ZHANG *et al.*, 2005).

Selecionamos três parálogos de DLCs para produção das proteínas recombinantes, as quais foram expressas inicialmente na forma insolúvel em *E. coli*. Após otimizações do método de cultivo e diminuindo da temperatura de 37 °C para 30 °C durante a expressão, conseguimos recuperar as três proteínas nas frações solúveis dos extratos bacterianos, duas delas mais facilmente.

Verificamos, pelos ensaios de imunização dos animais com as DLCs purificadas, que essas proteínas foram capazes de induzir alta produção de IgG específica, apresentando títulos crescentes a cada imunização, e portanto, mostrando-se bastante imunogênicas.

Os grupos imunizados com salmonela não apresentaram anticorpos IgG anti-DLC mensuráveis por ELISA. No laboratório o sistema salmonelas é utilizado para apresentação de outros antígenos com resposta de anticorpos variável, sugerindo que o antígeno pode influenciar o tipo de resposta imune associada. Nos ensaios de “Western Blot” com soro de animais imunizados com salmonela-DLC3 foi possível verificar uma banda com massa molecular esperada para a proteína DLC3, indicando que houve expressão da proteína *in vivo*, porém, essa expressão teria sido fraca, não sendo possível detectar os anticorpos por ELISA.

As análises de ELISA e “Western Blot” indicam que as salmonelas não apresentaram eficazmente as DLCs *in vivo*. Além disso, as análises de carga parasitária e de medidas de granulomas hepáticos sugerem que os antígenos não foram apresentados, uma vez que os resultados foram similares aos obtidos nos grupos controle e salmonela vazia. Apesar da apresentação de outros antígenos por salmonelas terem se mostrado eficazes, induzindo anticorpos e modulando a resposta para melhor balanço Th1/Th2, nos nossos estudos não foi possível verificar aumento da resposta utilizando esse sistema. Entretanto, os antígenos purificados mostraram-se mais interessantes como propostas vacinais.

Capron e colaboradores (2005) e Gryseels e colaboradores (2006) correlacionaram a resistência adquirida com a idade de pessoas de áreas endêmicas a reinfecções esquistossomóticas com uma resposta mediada por IgE. Existe uma família de proteínas de *S. mansoni*, com peso molecular de aproximadamente 20 kDa que foi associada com a resistência do hospedeiro contra reinfecção, sendo a resistência correlacionada com os níveis de IgE induzidos por esses antígenos. Essas proteínas pertencem a outra família de DLCs com motivos protéicos EF-Hand (FITZSIMMONS *et al.*, 2006). Em nossos ensaios de detecção de IgE no soro dos animais imunizados verificamos que a proteína DLC1 elevou os títulos de IgE mesmo antes da infecção com cercárias. Esse aspecto sugere que DLCs podem estar relacionadas a um perfil alergênico que os parasitas desenvolvem no hospedeiro, e que imunizações com DLC poderiam induzir uma resposta alérgica. Porém elevado nível de IgE contra certos antígenos constitui uma marca em indivíduos resistentes residentes de área endêmica. É importante ressaltar que alguns autores apóiam a idéia de que um antígeno vacinal para ser eficiente contra a esquistossomose deve ser capaz de elevar anticorpos do tipo IgE (WILSON e COULSON, 1998). Por outro lado, em uma formulação vacinal deve-se considerar como efeito adverso os possíveis perigos e a indesejável exacerbação de alergia em indivíduos imunizados.

Outro fator bastante curioso que pode ser observado em relação aos anticorpos do tipo IgE foi que apesar dos grupos imunizados com DLC1 elevarem os níveis desse tipo de anticorpos antes da infecção, curiosamente, depois da infecção os grupos imunizados com DLCs apresentaram menores níveis de IgE no soro. Isso pode estar relacionado a um fato das DLCs contribuírem para um certo controle de exacerbação da resposta pós infecção.

Por ensaios de “Western Blot” verificamos o reconhecimento cruzado de soro específico anti-DLC contra as outras DLCs em estudo. Esses resultados eram esperados devido às similaridades entre as proteínas, sendo que DLC1 e DLC3 compartilham 59% de similaridade e 31% de identidade de aminoácidos; DLC1 e DLC4 possuem 61% de

similaridade e 29% de identidade; e DLC3 e DLC4 possuem 59% de similaridade e 35% de identidade.

Os ensaios de “Western Blot” feitos com soro anti-DLC1 contra diferentes extratos protéicos de vermes adultos de esquistossomas, determinaram duas bandas de massas moleculares entre 45 e 55 kDa, mais altas que a massa esperada das DLCs (~13 kDa). Essas bandas de alta massa podem estar relacionadas com a interação das DLCs com outras proteínas, inclusive com as dineínas citoplasmáticas de cadeia intermediária e pesada, para compor os “complexos motores” de transporte de cargas (KING, 2003). Talvez os complexos protéicos não tenham se separado mesmo em presença dos agentes desnaturantes e redutores, SDS e β -mercaptoetanol, usados no SDS-PAGE. As bandas de maior massa molecular podem ainda ser resultantes do reconhecimento do soro por outras proteínas de *S. mansoni* que possuem o domínio DLC como descrito anteriormente.

Ainda pelos ensaios de “Western Blot” foi possível verificar que as proteínas DLC mostraram-se antigênicas, sendo reconhecidas pelo soro de camundongos do grupo controle infectados que foram imunizados apenas com salina e hidróxido de alumínio. Isso sugere que as DLCs nativas estariam sendo expostas ao sistema imune durante a infecção em camundongos, o que provavelmente também ocorre em humanos. Neste sentido reforçam o potencial dessas proteínas como candidatos vacinais.

O ensaio de desafio com *Schistosomas* é também um desafio ao pesquisador pelo número de variáveis envolvidas. A metodologia de infecção é muito discutida devido às dificuldades de padronização, buscando-se um formato similar à infecção natural. Anteriormente os ensaios eram feitos por injeção subcutânea com número exato de cercárias capturadas em seringa. Esses ensaios foram criticados por não simularem corretamente o momento da infecção, importante na sensibilização do sistema imune. A captura das cercárias era feita, observando-se em lupa, por sucção com seringa e agulha, o que poderia provocar danos à larva incapacitando o desenvolvimento do verme e afetando os resultados. A cauda da cercária é importante na penetração e pode ser facilmente removida por quebra mecânica, como agitação e, possivelmente, durante a captura na seringa. Alguns grupos desenvolveram o método de exposição da pele da barriga dos camundongos para penetração das cercárias, ainda com cuidados de depilar com antecedência a região a ser exposta e permitir a cicatrização de possíveis micros lesões. Nosso grupo buscou um método de infecção por exposição das caudas dos camundongos a suspensões de cercárias penetrantes, o que se aproximaria mais de uma infecção natural.

Nosso ensaio prévio de desafio (dados não mostrados) mostrou bastante heterogeneidade na infecção. Algumas dificuldades puderam ser apontadas para explicar o resultado, como 1- o material do tubo onde mantivemos a suspensão de cercárias não era o mais apropriado, retendo as cercárias nas paredes (não comprovado); 2- somente pequena parte da ponta da cauda dos animais foi exposta as cercárias, e talvez essa região seja de mais difícil penetração. De fato, o volume de suspensão de cercárias utilizado não teria sido suficiente para cobrir maior parte das caudas dos camundongos; 3- a contagem de cercárias foi feita com agulhas o que pode ter causado danos as cercárias e diminuição da capacidade de infectar os animais; 4- o tempo de permanência das cercárias na água entre a liberação do caramujo até a infecção pode ter representado modificações na capacidade infectante. Em decorrência dessas observações alteramos alguns aspectos para o que chamamos de primeiro ensaio de desafio: 1-para evitar a retenção das cercárias utilizamos tubos de vidro; 2- utilizamos volume maior de suspensão de cercárias para cobrir maior área da cauda durante infecção; 3- As suspensões de cercárias foram preparadas por estimativa, sem a captura por seringa. Neste ensaio houve maior homogeneidade quanto ao número de cercárias penetrantes por animal, porém tivemos problemas durante a infecção de parte do grupo controle. Trabalhamos com 12 animais por grupo e decidimos dividir cada grupo em duas caixas (1 e 2) para facilitar a manipulação, sendo a metade de cada grupos (caixas 1) infectados pela manhã e a outra metade (caixas 2) à tarde. No momento da infecção do grupo controle caixa 2 houve uma queda na energia elétrica e falta de luz que durou 25 minutos dos 40 de infecção. É conhecido que a luz interfere na atividade das cercárias. Com a perfusão foi possível verificar que este grupo teve a infecção prejudicada em relação à outra metade grupo controle (caixa1). Segundo Curwen e Wilson (2003) a turbulência e sombra aumentam o período de natação das cercárias. Não sabemos o quanto a maior migração da cercária interfere na sua capacidade invasiva, mas nossos resultados mostraram significativa diminuição da infecção no grupo desafiado em ausência de luz.

No primeiro ensaio de desafio verificou-se que os grupos imunizados com as salmonelas recombinantes, carregando as construções plasmídeos com DLC, não elevaram os títulos de anticorpos e nem diminuíram a carga parasitária. Muito provavelmente houve uma fraca apresentação das DLCs ao sistema imune. O número de vermes recuperados foi semelhante ao obtido no grupo controle. Além disso, a caracterização dos granulomas hepáticos mostrou que, em especial o grupo salmonela-DLC1 e o grupo salmonela-DLC1pp (que recebeu proteína purificada em uma das imunizações), não tiveram morfometria modificada em relação ao controle, bastante diferente do observado no grupo imunizado com

a proteína DLC1 purificada que teve 78% de redução do tamanho do granuloma. Isso sugere que a proteína DLC1 não foi expressa *in vivo* quando apresentada por salmonela. O grupo imunizado com salmonela pAEsox vazio não mostrou redução da infecção, porém, verificamos que houve redução na formação dos granulomas em aproximadamente 30% em relação ao controle, sugerindo que a resposta imune a salmonela pode interferir na resposta imune contra os ovos de *Schistosoma mansoni*. Nos grupos imunizados com salmonela-DLC3 e salmonela-DLC4 também não houve diminuição da carga parasitária, porém a caracterização dos granulomas no fígado dos animais desses grupos mostrou redução significativa em relação ao grupo imunizado com salmonela-pAEsox vazio. Esses resultados sugerem que o papel da salmonela na redução do granuloma, formado em resposta a presença de ovos, é bastante importante. Provavelmente o tipo de resposta que as salmonelas exercem contra o desenvolvimento dos vermes é diferente daquele que as salmonelas exercem na formação granulomatosa.

Ainda em relação ao primeiro ensaio de desafio foi possível verificar que os grupos imunizados com as proteínas purificadas tiveram sua carga parasitária diminuída em relação ao grupo controle. O grupo imunizado com a proteína DLC1 teve uma redução de 30% na quantidade de vermes recuperados, enquanto os grupos imunizados com DLC3 e DLC4 tiveram redução de aproximadamente 20%. É importante salientar que o número de vermes recuperados do grupo controle inclui o resultado da caixa 2 apesar da infecção essa caixa ter sido prejudicada pela falta de luz. Utilizando somente os resultados do grupo controle da caixa 1 a proteção calculada para os grupos vacinados seria significativamente maior.

No segundo ensaio de imunização e desafio nós desenvolvemos um dispositivo para facilitar a infecção que se demonstrou muito mais eficiente e segura. O funcionamento dos contentores foi um sucesso e mesmo quando os camundongos acordavam da anestesia foi possível manter a infecção. A infecção ocorreu por 40 minutos homogeneamente entre os grupos imunizados e utilizamos, além da luz da sala, o auxílio de lâmpadas extras. O número de vermes recuperados no grupo controle foi semelhante àqueles de quando utilizado outros métodos de infecção, porém a infecção foi mais homogênea.

Como a infecção deste ensaio foi mais confiável, os resultados apresentados são também mais confiáveis. A contagem de cercárias residuais nos tubos após a infecção foram muito baixas ou zero.

A infecção é feita com aproximadamente 100 cercárias e apenas 50 % chega a desenvolver-se e ser recuperada como vermes adultos nos grupos controle. Pode-se verificar que mesmo que as cercárias tenham aderido à superfície epitelial dos camundongos e

penetrem nas camadas da pele, elas podem ainda não ter sucesso no desenvolvimento até vermes adultos.

Neste segundo ensaio a carga parasitária dos grupos imunizados com as DLCs purificadas foi significativamente menor do que a do grupo controle. Na análise após 45 dias de infecção, o grupo imunizado com DLC1 teve proteção calculada em aproximadamente 43%, enquanto o grupo imunizado com DLC3 apresentou cerca de 45% de proteção. O grupo salmonela-DLC3 com 45 dias de infecção mostrou 26% de proteção, porém na análise com 55 dias de infecção esse grupo mostrou 0% de proteção em relação ao grupo controle. Considerando as análises de proteção depois de 55 dias de infecção, o grupo imunizado com DLC1 apresentou 41,5% de proteção e o grupo imunizado com DLC3 apresentou aproximadamente 60 % de proteção. Nos ensaios de desafio convencionais, a perfusão dos animais é feita após 45 dias da infecção, quando os vermes já maturaram. Em nossos ensaios parte dos animais foi mantida até 55 para observarmos outros aspectos da patologia, porém o número de vermes adultos nos animais em cada grupo não deveria se alterar. Dessa forma, os dados de análises de vermes recuperados 45 e 55 dias após infecção deveriam ser reunidos para, considerando número maior de animais, diminuir o erro experimental. Dessa maneira o resultado de proteções em relação ao grupo controle foram: DLC1 – 42,5%, DLC3 – 51,5% e Salmonela-DLC3 – 9,5%. Apesar das oscilações de proteção é possível afirmar que esses antígenos são bastante interessantes e afetaram o desenvolvimento dos vermes. Note-se que utilizamos hidróxido de alumínio como adjuvante. Os antígenos mais promissores até hoje citados na literatura atingiram 60% de proteção quando utilizado o adjuvante de Freund, o qual é proibido em humanos. Quando os mesmos candidatos foram testados com hidróxido de alumínio, a capacidade protetora caiu para metade. É importante salientar também que o aumento da dose de proteínas administradas no segundo ensaio de desafio pode ter contribuído para a maior proteção verificada.

Além da diminuição da carga parasitária, foi possível verificar que os granulomas hepáticos dos camundongos dos grupos imunizados com as DLCs com 45 dias de infecção apresentaram área aproximadamente 70% menor que os dos animais do grupo controle. Os grupos imunizados com as salmonelas apresentaram também granulomas cerca de 30% menores. A avaliação dos granulomas hepáticos de camundongos após 55 dias de infecção foi bastante importante, pois foi possível verificar que os granulomas aumentaram, mesmo nos grupos vacinados. Com 55 dias de infecção os grupos imunizados com as salmonelas tinham granulomas similares aos do grupo controle, enquanto os grupos imunizados com as DLCs ainda apresentavam granulomas 25 a 35% menores do que os do grupo controle. Esse

resultado sugere que a resposta imune às DLCs de alguma maneira afeta o desenvolvimento dos granulomas hepáticos, que seja via indução de IgE, diminuição de vermes, ou ainda mais complexo, induzindo a resposta adaptativa parasita/hospedeiro mais precocemente.

Uma vacina contra esquistossomose deve ser capaz de elicitar os dois tipos de resposta imune. Para bloquear o desenvolvimento do verme nos estágios iniciais de infecção, o tipo de resposta requerida é Th1. Com a evolução da infecção, quando são liberados os primeiros ovos e estes ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, ocorre a resposta imune mediada por células Th2. A formação dos granulomas caracteriza a principal patologia da esquistossomose. Segundo Lenzi *et al.*, (2008) o desenvolvimento dos granulomas esquistossomóticos pode ser modulado para mais (*up-modulation*) ou para menos (*down-regulation*) dependendo dos tipos de citocinas envolvidas. A participação das DLCs no desenvolvimento dos granulomas pode apenas relacionar-se à diminuição dos vermes ou talvez estejam elicitando um tipo de resposta imune ou inibindo a exacerbação da resposta aos ovos, interferindo mais diretamente no atraso da formação dos granulomas.

A diminuição no tamanho dos granulomas pode estar relacionada com o número menor de ovos que chegam ao fígado, uma vez que os grupos vacinados com DLC tem número menor de vermes. A menor quantidade de ovos poderia contribuir para um ambiente menos pró – inflamatório. Também é possível que a imunização com as DLCs possa induzir a regulação da resposta Th2 mais rapidamente, a que ainda permite a formação dos granulomas, porém de forma menos exacerbada.

Em relação ao teste de sobrevivência para verificar aspectos gerais causados pela patologia da doença, podemos verificar que os grupos imunizados com as DLCs apresentaram aspectos físicos e anatômicos melhores do que os dos grupos controles, além de manterem de uma forma geral seus comportamentos etiológicos. Apesar disso, com o decorrer do tempo mesmo os camundongos vacinados também apresentaram sinais de enfraquecimento decorrente da doença, o que demonstra que mesmo uma proteção de 40 a 50% contra o desenvolvimento dos vermes ainda acarreta em morbidade aos animais infectados.

Os epidemiologistas concordam que, uma vez que o parasita não se multiplica dentro do hospedeiro, uma redução em torno de 40 a 50% da carga parasitária aliada a estratégias de controle nas áreas endêmicas (incluindo saneamento básico, educação sanitária e uso de novas drogas), levaria ao controle da doença (BARBOSA *et al.*, 2008). Neste sentido as DLCs correspondem como fortes candidatos vacinais, pois elas além de diminuir a carga parasitária em níveis consideráveis, elas promovem a diminuição de granulomas, o aspecto mais importante na patologia da doença. A utilização de vacinas, mesmo que compostas de vários

antígenos, que levem a uma real diminuição da infecção, é uma ferramenta indispensável para controle da doença. Provavelmente a vacina anti-esquistossomótica deverá ser composta por múltiplos antígenos. Muitos estudiosos preconizam que uma vacina ideal deverá atuar contra a patologia da doença, considerando em especial o aspecto da formação de granulomas hepáticos. Nesse sentido as DLCs constituem-se interessantes candidatos vacinais.

Um programa eficiente para controlar a esquistossomose deve contemplar ainda pesquisas para encontrar novos fármacos para o tratamento da doença, e novos antígenos vacinais, e adjuvantes. Além disso, devem-se adotar medidas de controle e conscientização junto à população, como programas educativos, principalmente em regiões endêmicas.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os três parálogos de dineínas testados nesse projeto foram obtidos na forma solúvel em *E.coli* e salmonelas;
- As proteínas recombinantes DLC1, DLC3 e DLC4 mostraram ser imunogênicas em camundongos aumentando os níveis de IgG depois das imunizações;
- Os soros gerados contra as DLCs mostraram reconhecimento cruzado, como esperado devido a similaridades entre elas;
- As DLCs mostraram ser antigênicas, uma vez que foram reconhecidas pelo soro de camundongos controles infectados;
- Com a apresentação de antígenos por salmonelas não foi possível verificar indução de anticorpos anti-DLC por ELISA;
- A proteína DLC1 elevou os níveis de IgE nos soros dos camundongos imunizados, mesmo antes da infecção com cercárias. Este dado sugere que a DLC1 pode estar relacionada a um caráter alérgico ou a uma marca de resistência a infecção observada em pacientes de área endêmica;
- Depois da infecção todos os grupos apresentaram altos níveis de IgE no soro, como esperado devido a presença dos vermes; Os grupos imunizados com as DLCs apresentaram menor indução de IgE pós infecção;
- O soro anti salmonela-DLC3 reconheceu de maneira tênue a proteína purificada por western blot, mostrando que a proteína foi fracamente expressa *in vivo*;
- O soro anti-DLC1 reconheceu proteínas de massa molecular esperada e também proteínas com massas moleculares maiores nos diferentes extratos protéicos de vermes adultos;

- Os grupos imunizados com DLCs/hidróxido de alumínio mostraram significativa diminuição na carga parasitária, correlacionando com o aumento de IgG anti-DLC;
- 45 dias após a infecção os granulomas de todos os grupos de imunização foram significativamente menores quando comparados aos do grupo controle, em especial os grupos imunizados com as DLCs;
- 55 dias após a infecção os granulomas hepáticos dos camundongos imunizados com as DLCs ainda eram menores, sugerindo que essas proteínas interferem direta ou indiretamente na formação ou atraso no crescimento dos granulomas;
- A diminuição no tamanho dos granulomas pode estar relacionada a um número menor de ovos chegando no fígado, uma vez que o número de vermes nos grupos imunizados com DLCs também era menor. A diminuição na quantidade de ovos pode estar contribuindo para um ambiente hepático menos pró – inflamatório;
- É possível que a imunização com DLCs induza a regulação mais rápida da resposta Th2 mediada por células T regulatórias, permitindo a formação dos granulomas, porém controlando a exacerbação da resposta Th2;
- Os estudos para compreensão da resposta imune induzida por DLC deverão prosseguir, incluindo medidas de alterações nos níveis de citocinas relacionadas com resposta alérgica, indução de IgE e formação de granulomas. Também aspectos da estrutura dos granulomas e da composição das células do sistema imune no sangue antes e depois de desafiados;
- A formação de granulomas é considerada uma das principais patologias da esquistossomose, e alguns pesquisadores estão chamando atenção para a necessidade de uma vacina contra a patologia da doença; Neste sentido nossos dados sugerem que as DLCs estão correspondendo a essa necessidade como antígenos bastante interessantes. Além de diminuir a carga parasitária, direta ou indiretamente contribuíram para diminuição da formação dos granulomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABATH, F.G.C.; WERKHAUSER, R.C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. **Parasite Immunology**, v.18, p.15-20, 1996.

ANDRADE, Z.A. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **A Patologia da Esquistossomose humana**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, p.549-564.

ARGIRO, L.; HENRI, S.; DESSEIN, H.; KOURIBA, B.; DESSEIN, A.J.; BOURGOIS, A. Induction of protection against *S.mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and SM10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum. **Vaccine**, v.3, n.18, p.2033-2038, 2000.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STHRUL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1989.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; AMARAL, R.S.; PIERI, O.S. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansonii**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.549-564, 2008.

BEM-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Epitope-based vaccine against influenza. **Expert Rev. Vaccines**, v.6, n.6, p.939-948, 2007.

BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. **Memb. Inst. Oswaldo Cruz**, v.90, n.2, p.221-227 1995.

BERGQUIST, N.R.; COLLEY, D.G. Schistosomiasis vaccines: research to development. **Parasitol. Today**, v.14, p.99-104, 1998.

BOTTAZI, M.E.; MILES, A.P.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P.J. An ounce of prevention on a budget: a nonprofit approach to developing vaccines against neglected diseases. **Expert Rev. Vaccines**, v.5, n.2, p.189-198, 2006.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASCHI, S.; CURWEN, R.S.; ASHTON, P.D.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WILSON, A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after different extraction. **Proteomics**, v.6, p.1471-1482, 2006.

CAPRON, A.; RIVEAU, G.; CAPRON, M.; TROTTEIN, F. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends Parasitol.**, v. 21, n.3, p.143-149, 2005.

CARDOSO, F.C.; MACEDO, G.C.; GAVA, E.; KITTEN, G.T.; MATI, V.L.; DE MELO, A.L.; CALIARI, G.T.; VENANCIO, T.M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA S.C. *Schistosoma mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, Oct v 1, n.10, p.308, 2008.

CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p.1123.

CHAN, M.S.; GUYATT, H.L.; BUNDY, D.A.; MEDLEY, G.F. Dynamic models of Schistosomiasis morbidity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.1, n. 155, p.52-62, 1996.

CHEMINAY, C.; HENSEL, M. Rational design of Salmonella recombinant vaccines. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.1, n.2, p.87-98, 2008.

COMOY, E.E.; CAPRON, A.; THYPHONITS, G. Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm 28 GST. **Scand. J. Immunol.**, v.47, p.444-452, 1998.

CURWEN, R.S.; WILSON, A.R. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitol.**, v.19, n.2, p.63-68, 2003.

DEELDER, A.M.; MILLER, R.L.; DE JONGE, R.N.; KRIJGER, F.W. Detection of schistosome antigens in mummies. **Lancet**, v.24, n.335, p.24-725, 1990.

DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon – a review. **Gene –Int. J. Genes Genomes**, v.179, p.53-57, 1996.

DÈSPRES, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; COMBES, C.; BONHOMME, F. Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes:Trematoda). **Mol. Phylog. Evol.**, v.1, p.295-304, 1992.

DÈSPRES, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.60, p.221-229, 1993.

DOENHOFF, M.J. A Vaccine for Schistosomiasis: Alternative Approaches. **Parasitol. Today**, v.9, n.10, p.462-7, 1998.

DUPRÉ, L.; KREMER, L.; WOLOWCZUK, I.; RIVEAU, G.; CAPRON, A.; LOCHT, C. Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. **Vaccines**, v.19, p.1373-1380, 2001.

DUNNE, D.W.; HAGAN, P.; ABATH, F.G. Prospects for immunological control of Schistosomiasis. **Lancet**, v.345, n.8963, p.1488-1491, 1995.

EDWARDS, R.A.; OLSEN, G.J.; MALOY, S.R.. Comparative genomics of closely related salmonellae. **Trends Microbiol.**, v.10, n.2, p.4-9, 2002.

EL-SAYED, N.M.; BARTHOLOMEU, D.; IVENS, A.; JOHNSTON, D.A.; LOVERDE, P.T. Advances in Schistosome genomics. **Trends Parasitol.**, v.20, n.4, p.154-7, 2004.

FALCÃO, E.C. **Pirajá da Silva, o Incontestável descobridor do *Schistosoma mansoni***. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008, 311 p.

FITZSIMMONS, C.M.; MCBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; WALTER, K.; HOFFMANN, K.; KARIUKI, H.C.; MWATHAS, J.K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N.B.; VENNERVARD, B.J.; OUMA, J.H.; DUNNE, D.W. Factors affecting Human IgE and IgG responses to allergen-like Schistoma mansoni antigens: Molecular structure and patterns *in vivo*. **Int. Arch. Allergy Immun.**, v.142, p.40-50, 2006.

GARYMORY, H.S.; BROWN, K.A.; TITBALL, R.W. Salmonella vaccines for use in humans present and future perspectives. **FEMS Microb. Rev.**, v.26, p.339-353, 2002.

GITHUI, E.K.; DAMIAN, R.T.; AMAN, R.A.; ALI, M.A.; KAMAU, J.M. Schistosoma spp.: Isolation of microtubule associated proteins in the tegument and definition of dynein light chains components. **Exp. Parasitol.**, v.121, n.1, p.96-104; 2008.

GERÊNCIA DO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. **Distribuição da Esquistossomose**. Disponível em:
<<http://www.dpi.inpe.br/geoschisto/imagem/DistribuicaoSchisto.pdf>> Acesso: 05 nov 2008.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v.368, n.9541, p.1106-18, 2006.

HAAS, W.; HABERL, B.; KALBE, M.; FUCHS, H.; STROBEL, M.; SCHMALFUSS. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: miracidial host-finding behavior is stimulated by macromolecules. **Int. J. Parasitol.**, v.25, n.5, p.551-60, 1995.

HAAS, B.J.; BERRIMAN, M.; HIRAI, H.; CERQUEIRA, G.G.; LOVERDE, P.T.; EL-SAYED, N.M. *Schistosoma mansoni* genome: closing in on a final gene set. **Exp. Parasitol.**, v.117, n.3, p.225-8, 2007.

HAGAN, P.; DOENHOLFF, M.J.; WILSON, R.A.; AL-SHERBINY, M.; BERGQUIST, R. Schistosomiasis Vaccines: A Response to a Devils Advocates's View. **Parasitol. Today**, v.16, n.8, p.322-3, 2000.

HINDLE, Z.; CHATFIELD, S.N.; PHILLIMORE, J.; BENTLEY, M.; JOHNSON, J.; COSGROVE, C.A.; GHAEM-MAGHAMI, M.; SEXTON, A.; KHAN, M.; BRENNAN, F.R.; EVEREST, P.; WU, T.; PICKARD, D.; HOLDEN, D.W.; DOUGAN, G.; GRIFFIN, G.E.; HOUSE, D.; SANTANGELO, J.D.; KHAN, S.A.; SHEA, J.E.; FELDMAN, R.G.; LEWIS, D.J. Characterization of Salmonella enteric derivatives harboring defined aroC and Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system (ssaV) mutations by immunization of healthy volunteers. **Infect. Immun.**, v.70, n.7, p.3457-3467, 2002.

HOFFMANN, K.F.; STRAND, M. Molecular characterization of a 20.8-kDa *Schistosoma mansoni* antigen. Sequence similarity to tegumental associated antigens and dynein light chains. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.23, p.14509-15, 1997.

HOFFMANN, K.F.; JOHNSTON, D.A.; DUNNE, D.W. Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. **Gen. Biol.**, v.3, n.8, p.1-12, 2002.

HOTA-MITCHEL, S.; CLARKE, M.W.; PODESTA, R.B.; DEBAKAN, G.A. Recombinant vaccinia viruses and gene gun vectors expressing the large subunit of *Schistosoma mansoni* calpain used in a murine immunization-challenge model. **Vaccine**, v.17, p.1338-1354, 1999.

HOTEZ, P.J.; FERRIS, M.T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v.26, 24, n.31-32, p.5787-99, 2006.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M.; OLIVEIRA, S.C. BRINDLEY, P.J.; LOUKAS, A. Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. **Exp. Rev. Vac.**, v.7, n.6, p.745-752, 2008.

JONES, M.K.; GEOFFREY, N.G.; ZHANG, L.; SUNDERLAND, P.; MCMANUS, D.P. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **Rev. BioEssays**, v.26, p.752-765, 2004.

KHAN, A.C.M.; RAMOS, B.V.; PIERCE, R.J.; RIVEAU, G.; HORMAECHE, R.D.; MCNEILL, H.; ALI, T.; FAIRWEATHER, N.; CHATFIELD, S.; CAPRON, A.; DOUGAN, G.; HORMAECHE, C.E. Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in live attenuated vaccine strain of *Salmonella*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.91, p.11261-11265, 1994.

KING, S.M. Organization and regulation of the dynein microtubule motor. **Cell. Biol. Int.**, v.27, n.3, p.213-215, 2003.

KOUTSOLIOUTSOU, A.; MARTINS, E.A.; WHITE, D.G.; LEVY, S.B.; DEMPLE, B. A soxRS-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enteric* (Serovar typhimurium). **Antim. Agents Chem.**, v.45, n.1, p.38-43. 2001.

LEHMANN, J.; SPRINGER, S.; WERNER, C.E.; LINDNER, T.; BELLMANN, S.; STRAUBINGER, R.K.; SELBITZ, H.J.; ALBERT, G. Immunity induced with a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis live vaccine is regulated by Th1-cell-dependent cellular and humoral effector mechanisms in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, v.29:24, n.22, p.4779-4793, 2006.

LENZI, H.L.; ROMANHA, W.S.; MACHADO, M.P.; MOTA, E.M.; LENZI, J.A. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p.575-627.

MAHMOUD, A.A.F. **Schistosomiasis**. London, UK: Editora: Imperial College Press, 2001.

MCMANUS, D.P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for Schistosomiasis. **Clin. Microb. Rev.**, v.21, n.1, p.225-242, 2008.

MCKERROW, J.J. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitol.**, v.19, p.66-68, 2003.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. **Microbial Physiology**. 4. ed. New York: Wiley-Liss Inc, 2002. 738 p.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H.S.; RAYBOURNE, R.B.; BABU, U.S.; HECKERT, R.A. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma production. **Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.27, n.4, p.255-272, 2004.

OLIVEIRA, M.F.; D'AVILA, J.C.; TORRES, C.R.; OLIVEIRA, P.L.; TEMPONE, A.J.; RUMJANECK, F.D.; BRAGA, C.M.; SILCA, J.R.; DANSA-PETRESKI, M.; OLIVEIRA, M.A.; DE SOUZA, W.; FERREIRA, S.T. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.111, n.1, p.217-21, 2000.

OLIVEIRA, G.C. The *Schistosoma mansoni* transcriptome: An update. **Exp. Parasitol.**, v.117, p.229-235, 2007.

OLIVEIRA, G.C.; ABATH, F.G.C.; FRANCO, G.R. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Genômica e Biologia Molecular de Schistosoma mansoni**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, p. 247-271.

PACHECO, L.G.C.; ZUCCONI, E.; MATI, V.L.T.; GARCIA, R.M.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S.C.; MELO, A.L.; AZEVEDO, V. 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, p.132-142, 2005.

PARAENSE, W.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Histórico do Schistosoma mansoni**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 31-37, 2008.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M.M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, JENNINGS, G.T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C.L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D.W.; JEFFRIES, A.C.; SAUNDERS, N.J.; GRANOFF, D.M.; VENTER, J.C.; MOXON, E.R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. **Science**, v.10, n.5459, p.1767-1768; 2000.

PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L.R.; QUININO, L.R.M.; BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidem. Serv. Saúde**, v.17, n.3, p.163-175, 2008.

PROJETO GENOMA DE EST de *Schistosoma mansoni*. Disponível em: <<http://www.verjo18.iq.usp.br/schisto/>>. Acesso em: 20 Maio 2008.

RAMOS, C.R.R.; VILAR, M.G.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L.; THAUMATURGO, N.; EDELEYNI, R.; ALMEIDA, M.; DIAS, W.O.; DIOGO, C.T.; TENDLER, M. r-SM14 – pRSETA Efficacy in Experimental Animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.96, p.131-135, 2001.

RAMOS, C.R.R.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L. 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, p.1103-9, 2004.

RAUPACH, B.; MONACK, D.M.; HRROMOCKYJ, A.E.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, n.18, p.9833–9838, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 888 p.

RIBEIRO-PAES, J.T.; RODRIGUES, V. Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma*: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.39, p.337-344, 1997.

ROBERTS, M.; JINGLI, LI.; BACON, A.; CHATFIELD, S. Oral vaccination against Tetanus: Comparison of the Immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from *nirB* and *htrA* promoters. **Infect. Immun.**, v.66, n.7, p.3080-3087, 1998.

ROSENKRAZ, C.D.; CHIARA, D.; AGORIO, C.; BAZ, A.; PASETTI, M.F.; SCHREIBER, F.; DEMATTEIS, S.; MARTINEZ, M.; SZTEIN, M.B.; CHABALGOITY, J.A. Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the immune system using live attenuated *Salmonella*. **Vaccine**, v.30:21, n.7-8, p.798-801, 2003.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 236-241.

RUSSMAN, H.; SHAMS, H.; POBLETE, F.; FU, Y.; GALÁN, J.E.; DONIS, R.O. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. **Science**, v.24, n.5376, p.565-568, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVA, J.R.M.; NEVES, R.H.; GOMES, D.C. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar / **Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni***. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.45-73, 2008.

STOCKER, B.A.D. Aromatic-dependent Salmonella as anti-bacterial vaccines and presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them. **J. Biotechnol.**, 29, v.83, n.1-2, p.45-50, 2000.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. **Esquistossomose mansônica**. Disponível em: <[HTTP://www.sucen.sp.gov.br/doencas/esquisto](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/esquisto)>. Acesso em: 07 nov. 2008.

TAGLIABUE, A.; RAPPUOLI, R. Vaccine adjuvants: the dreams becomes real. **Hum. Vaccine**, 4, v.5, p.347-349, 2008.

TALLIMA, H.; EL-RIDI, R. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. **Int. J. Antim. Agents**, v.29, n.5, p.570-5, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6^{ed}. Rio de Janeiro, Editora: Artmed, 2000.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 386 p.

TRAN, M.H.; PEARSON, M.S.; BETHONY, J.M.; SMYTH, D.J.; JONES, M.K.; DUKE, M.; DON, T.A.; MCMANUS, D.P.; OLIVEIRA-CORREA, R.; LOUKAS, A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nature**, v.12, p.835-840, 2006.

VAN HELLEMOND, J.J.; RETRA, K.; BROUWERS, J.F.H.M.; VAN BALKOM, B.W.M.; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C.B.; TIELENS, A.G.M. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **Int. J. for Parasitol.**, v.36, p.1-9, 2006.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A.; GUIMARAES, P.E.; OJOPI, E.P.; PAQUOLA, A.C.; PIAZZA, J.P.; NISHIYAMA, M.Y.; KITAJIMA, J.P.; ADAMSON, R.E.; ASHTON, P.D.; BONALDO, M.F.; COULSON, P.S.; DILLON, G.P.; FARIAS, L.P.; GREGORIO, S.P.; HO, P.L.; LEITE, R.A.; MALAQUIAS, L.C.;

MARQUES, R.C.; MIYASATO, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; OHLWEILER, F.P.; REIS, E.M.; RIBEIRO, M.A.; SA, R.G.; STUKART, G.C.; SOARES, M.B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A.M.; WILSON, R.A.; MENCK, C.F.; SETUBAL, J.C.; LEITE, L.C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat Genet.**, v.35, n.2, p.148-57, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TDR - Report on Schistosomiasis**. Geneva-Suíça: WHO, 2006.123 p.

WILSON, M.J.; SALATA, M.W.; SUSALKA, S.J.; PFISTER, K.K. Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: Identification and characterization of a family of LC8 light chains. **Cell. Motil. Cytosk.**, v.49, n.4, p.229-240, 2001.

WILSON, M.S.; MENTINK-KANE, M.M.; PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; THOMPSON, R.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Imunol. Cell Biol.**, v.85, p.148-154, 2007.

WILSON, R.A.; COULSON, P.S. Why Don't We Have a Schistosomiasis Vaccine? **Parasitol. Today**, v.14, n.3, p.97-99, 1998.

WILSON, R.A.; COULSON, P.S. Schistosoma vaccine: a critical appraisal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, p.13-20, 2006. Suppl. n.1.

WIZEMANN, T.M.; HEINRICHS, J.H.; ADAMOU, J.E.; ERWIN, A.L.; KUNSCH, C.; CHOI, G.; BARASH, S.C.; ROSEN, C.A.; MASURE, H.R.; TUOMANEN, E.; GAYLE, A.; BREWAH, W.W.; BARREN, P.; LATHIGRA, R.; HANSON, M. 2001. Use of a Whole Genome Approach to Identify Vaccine Molecules affording Protection against *Streptococcus pneumoniae* Infection. **Infect. Immun.**, v.69, n.3, p.1593-1598.

WYNN, T.A.; HOFFMANN, K.F. Defining a Schistosomiasis Vaccination Strategy – Is it really Th1 versus Th2? **Parasitol. Today**, v.11, n.16, 497-501, 2000.

YANG, W.; JONES, M.K.; FAN, J.; SHEREE, R.; HUGHES-STAMM; MCMANUS, D.P. Characterisation of a family of *Schistosoma japonicum* proteins related to dynein light chains. **Biochem Biophys. Acta**, v.1432, p.13-26, 1999.

YANG, W.; JACKSON, D.C.; ZENG, Q.; MCMANUS, D.P. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.19, n.1, p.103-113, 2001.

ZHANG, L.H.; MCMANUS, D.P.; SUNDERLAND, P.; LU, X.M.; YE, J.J.; LOUKAS, A.; JONES, M.K. The cellular distribution and stage-specific expression of two dynein light chains from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.37, p.1511-1524, 2005.

ZHANG, J.; YANG, J.; ACOSTA, C.J.; SI, G.A.; ZENG, J.; LI, C.Y.; LIANG, D.B.; OCHIAI, R.L.; PAGE, A.L.; DANOVARO-HOLLIDAY, M.C.; ZHOU, B.D.; LIAO, H.Z.; WANG, M.L.; TAN, D.M.; TANG, Z.Z.; GONG, J.; PARK, J.K.; ALI, M.; IVANOFF, B.; LIANG, G.C.; YANG, H.H.; PANG, T.; XU, Z.Y.; DONNER, A.; GALINDO, C.M.; DONG, B.Q. & CLEMENS, J.D. A mass vaccination campaign targeting adults and children to prevent typhoid fever in Hechi; expanding the use of Vi polysaccharide vaccine in southeast China: a cluster-randomized trial. **BMC Pub. Health**, v.18, p.5-49, 2008.

ZHOU, D.; LI, Y.; YANG, X. Schistosomiasis control in China. **World Health Forum**, v.15, p.387-389, 1994.

Tabela 1 - Características dos parálogos de DLC de *Schistosoma mansoni*

SmAE	Best hit at NCBI	e-value / identity %		Amount of Ests (Stage of life cycle)
		hit nr	DYL1	
1	C603850.1 DLC2 gi 1620592 DYL1_SCHMA DYNEIN LIGHT CHAIN	2e-46 / 97%	2e-48 / 89%	3 (2A, 1S)
2	C607143.1 gi:2842736_DYL2_SCHMA PROBABLE DLC	2e-47 / 100%	1e-38 / 89%	26 (19G, 6S, 1A)
3	C600072.1 gi 1808773 DLC2; [Mus musculus]	3e-44 / 98%	1e-35 / 88%	21 (2L, 2M, 4S, 1L, 2E, 10A)
4	C601934 gi:17552836 DLC-1 (10.3 kD) [C. elegans]	2e-41 / 93%	2e-35 / 91%	12 (6L, 2E, 2A, 1G, 1S)
5	C718709.1 gi 2842736 DYL2_SCHMA PROBABLE DLC	3e-33 / 81%	5e-35 / 84%	1 (1E)
6	C610073.1 sp Q39580 DLC (8KD), Flagellar outer arm C. reinhardti	1e-42 / 91%	3e-33 / 78%	10 (3E 5L)
7	C602699.1 gi 2494219 DYNEIN 8 KD LIGHT CHAIN; C. reinhardtii	1e-42 / 91%	2e-32 / 76%	5 (2S 3A)
8	C606346.1 gi 17933574 DROME Dlc1, cytoplasmic (8 kDa)	1e-26 / 76%	4e-28 / 89%	5 (4 ^a 1G)
9	C717619.1 DLC4 gi 5305391 dlc 3 [Schistosoma japonicum]	3e-50 / 98%	2e-26 / 87%	1 (1G)
10	C602817.1 gi 17137630 Cytoplasmic dlc 2 [D. melanogaster]	5e-31 / 96%	4e-24 / 65%	5 (4L 1E)
11	C708415.1 gi 2842736 DYL2_SCHMA PROBABLE DLC	1e-18 / 86%	2e-19 / 60%	1 (1C)
12	C707198.1 DLC3 gi 12230030 Dynein lc, cytoplasmic (8kDa)[E. nidulans]	5e-19 / 69%	3e-18 / 76%	1 (1A)
13	C608608.1 DLC1 gi 5305387 dynein light chain 1 [S. japonicum]	7e-16 / 63%	5e-14 / 65%	4 (1A 1L 1G 1S)
14	C703870.1 gi 1808773 dynein light chain 2; [Mus musculus]	2e-14 / 82%	3e-11 / 66%	1 (1A)
15	C716214.1 gi 1808773 dynein light chain 2; [Mus musculus]	2e-14 / 67%	9e-11 / 54%	1 (1G)
16	C612645.1 >gi 1808773 dynein light chain 2; [Mus musculus]	9e-11 / 67%	2e-10 / 66%	3 (1L 2G)
17	C604362.1 >gi 19115280 dlc [Schizosaccharomyces pombe]	7e-8 / 88%	1e-08 / 54%	2 (2A)
18	C608300.1 gi 5305389 dynein light chain 2[S. japonicum]	2e-15 / 51%	3e-08 / 80%	2 (2S)

Características das seqüências SmAEs da família de DLC. Melhor “hit”, e-value e similaridade com as seqüências de aminoácidos (positividade) por blastX da seqüência SmAE no banco de dados do NCBI (nr). e-value e valores de similaridade das SmAEs com a sonda DYL1-SCHMA (gi:1620591). As seqüências SmAEs em verde foram as escolhidas para nosso estudo.

C603850DLC-1	(1)	-----MIERKAVYIKNADMSSEMQEDAITHIAAGALDDKHHLLEKDI AAN IKKDFD RKKYHP TWHCIYVG-----HFGSSYVTHEITNFTIYFYLD DRAEFLLEKSG
C607143DLC-2	(1)	-----MGERKAVYIKNADMDHEDMQETAVHTIAAALDDKYLELEKDVAAAY IKKEFD RKKYNP NWHCIYVG-----HFGSSYVTHEITQEF IYFYLOERAEFLLEKSG
C600072DLC-3	(1)	-----MSEQKAVYIKNADMSMEDMQDVAVDCATQALEKYNLEKDI AAF IKKEFD RKKYNP TWHCIYVG-----NFGSSYVTHEITKFF IYFYLGQAFLLEKSG
C601934DLC-4	(1)	-----MHEHKAVYIKNADMSDDMQDVAVDCAAQALEKYSVEKDI AAF IKKEFD RKKYNP TWHCIYVG-----NFGSSYVTHEITKFF IYFYLGENAFLLEKSG
C718709DLC-5	(1)	-----MSERKAVYIKNADMERITVQDDAVVYVASAAMDKYDLEKDVAAAY IKKEFD RKYVTP NWHCIYVG-----HFGSSYVTHEITNFTIYFYLD DR-----
C610073DLC-6	(1)	-----MSDGRKAVYIKNVDMSSEMQQDAIDATQAFFEKYNTLEKDI AAY IKKEFD RKHNP TWHCIYVG-----NFGSSYVTHEITKFF IYFYAGQVALLEKSG
C602699DLC-7	(1)	-----MSDGRKAVYIKNVDMSSEMQQDAIDATQAFFEKYNTLEKDI AAY IKKEFD RKHNP TWHCIYVG-----NFGSSYVTHEITKFF IYFYAGQVALLEKSG
C606346DLC-8	(1)	-----MSFGKAVYIKNADMEPVMQEDAVVQIAAVAREKYEVDKDI ATY IKQHFD RKYGR TWHCIYVG-----QYGSADVSHERSFIYFELGDRALILEKSG
C717619DLC-9	(1)	-----MPIEQRPYSNVIHQSGERKAVYIKYVEMSKEMQDVAVQTAAMAAMD KYNDKDI ALF LKKEFRK-YEPTWHCIIGS-----KFSYVTHIKQFCIYFSL EDRGVL-----
C602817DLC10	(1)	-----CAQAQLEKYSVEKDI AASF IKKEFD RKKYNP TWHCIYVG-----NFGSSYVTHEITKFF IYFYVGNVAVLEKSG
C708415DLC11	(1)	-----EKDIAAF MKKEFD RKKYLP SWHCIVGS-----HFGYIISHAKFFIYFELDNHAYVLEFRIG
C7077198DLC12	(1)	-----MEPQKYIVKSTGMPEDMQEHAIKTCLIKSMRALHHDKDVAST LKREFNEKYGR TWHCIYVGS TWHCVGNYSNISHVDEGF IYADR--KSTLLKYTE
C608608DLC13	(1)	-----MENFRAIMKSTDMQAFLQKIVVDTCVVAITEQYDEERDVAAAY VKKHM DKYDGGVWHCVLQK-----DFGCYVSLDQ-YFSYFQYQKSMVLEFRV
C703870DLC14	(1)	-----MECKKAVYIKNADMSDDMQQCAVDTAQAQMT EYSLEKDI AAY IKKHFD KNYGP-----DFGCYVSLDQ-YFSYFQYQKSMVLEFRV
C716214DLC15	(1)	-----DAVKQCLKAMLT CRHDKDI AAY LRNQFNQKYGRTWHCIYVG-----GSFGSNVSHVETGLIYFLMGRKSVFLFRS
C612645DLC16	(1)	-----SSI IKKRIDKEIQSYMHVXXGE-----NFGSSYVXHGTKEFIYFYLGENAFLLEKSG
C604362DLC17	(1)	-----AEQMHQAHEISLEAMDLESSHHDGIADY IAKIFNDTYSGYWECKVGT-----TFGSFDIQDLEKFCFRYFDEIAFLILEKSG
C608300DLC18	(1)	-----INN SVIKNADMTHEMQKRALISIGIDSVRKYELEKDI ADH LKKEFD-----HFGSSYVTHEITNFTIYFYLD DRAEFLLEKSG
SMDL C1620592	(1)	-----MSERKAVYIKNADMSSEMQEDAITHIAAGALDDKHDLLEKDI AAN IKKDFD RKKYHP TWHCIYVG-----HFGSSYVTHEITNFTIYFYLD DRAEFLLEKSG
MusDLC	(1)	-----MADVEETLKR LQSQKGVQGIIVNTEGIPKSTMDNPTTQ YANLIMHN-FILKARS TVRE IDPQNDL TFLRIRSKKNELVAPDKDYFLIYQNP T
Consenso	(1)	M KAVIKN DM EEMQ DAY A AMEKY IEKDIAAY IKKEFDKRY PTWHCIYVG FGSYVTHEIT HEIYFYL AILLEKSG

Figura 1 – Alinhamento das 18 sequências de aminoácidos da família de DLCs encontradas no PGE5m. SmAEs em verde correspondem às proteínas selecionadas para nosso estudo.