

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

**Avaliação da resposta imunológica e mecanismos efetores associados à proteção  
induzida pela preparação antigênica do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma  
mansoni***

por

**Tatiane Teixeira de Melo**

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

TESE DBCM-CPqRR T.T. MELO 2014

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

**Avaliação da resposta imunológica e mecanismos efetores associados à proteção  
induzida pela preparação antigênica do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma  
mansoni***

por

**Tatiane Teixeira de Melo**

Tese apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Doutor em Ciências na área de  
concentração Biologia Celular e Molecular

**Orientação**

Dra. Cristina Toscano Fonseca

**Co-orientação**

Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

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

M528a  
2014

**Melo, Tatiane Teixeira.**

Avaliação da resposta imunológica e mecanismos efetores associados à proteção induzida pela preparação antigênica do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* / Tatiane Teixeira de Melo. – Belo Horizonte, 2014.

XIX, 165 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 157 – 184

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/imunologia 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Vacinas/imunologia I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano (Orientação) III. Pereira, Rosiane Aparecida da Silva (Co-orientação) IV. Coelho, Paulo Marcos Zech (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

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

**Avaliação da resposta imunológica e mecanismos efetores associados à proteção  
induzida pela preparação antigênica do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma  
mansoni***

por

**Tatiane Teixeira de Melo**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristina Toscano Fonseca (Orientadora- Presidente)

Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

Dr. Sérgio Costa Oliveira

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Suplente: Dra. Caroline Junqueira Giusta

**Tese defendida e aprovada em: 19/02/2014**

Quantas vezes chorei?  
Quantas vezes clamei?  
Quantas vezes me desesperiei?  
(...)  
Deus veio acalantar  
Da maneira mais sublime  
Soube dar  
Aquilo que precisei  
Para continuar seguindo em frente  
Anjos vieram em forma de gente  
Fizeram acreditar, que, seguir em frente  
Era a melhor saída, e assim, fui  
Sem mais chorar  
E quando vi  
Estava lá  
(...)

Autor desconhecido

**Dedico este trabalho aos meus queridos pais, um exemplo de força e determinação que carrego comigo diariamente.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, se não fossem suas bênçãos sobre mim nunca conseguiria seguir em frente e alcançar uma vitória tão desejada, a ELE devo tudo que já conquistei até o momento e agradeço sempre por tudo.

Agradeço imensamente a minha orientadora e amiga Kika, você contribuiu demais na formação do meu conhecimento científico e pessoal também. Se hoje sou uma doutora é porque você acreditou em mim, depositou sua confiança em uma pessoa que logo no primeiro ano de doutorado não estava mais sob o cuidado de seus olhos. Acreditou que eu era capaz e que conseguiria mesmo com tantos obstáculos pela frente. Nunca vou esquecer seu exemplo, o levarei comigo sempre!!!! A você dedico esta tese.

Agradeço ao Doutor Paulo pela pessoa maravilhosa que é, pelo exemplo de pesquisador e ser humano. Muito obrigada por ter me deixado fazer parte de sua equipe.

Agradeço a Dra. Rosiane (Rosi) pelo cuidado e imensa contribuição dada aos meus experimentos e a escrita da tese e do artigo. Aprendi demais com você...

Agradeço a todos da EMBRAPA pela torcida, principalmente ao Laudares e Carol que não mediram esforços para me apoiar neste caminho me ajudando sempre que precisei.

À equipe do LESQ o meu muito obrigada a cada um de vocês, nunca vou esquecer a ajuda preciosa. Absolutamente todos contribuíram enormemente para esta vitória, vocês são minha família...

Agradeço à Maíra, Paola, Dra. Sophie e Janete pela amizade e por me ajudarem nos experimentos. Ao Dr. Marcelo Caliarri pela ajuda na análise dos granulomas e pela boa vontade em disponibilizar o laboratório de patologia.

Aos funcionários do René Rachou que, de alguma forma, contribuíram para realização do meu trabalho. À biblioteca pela disponibilização do acervo que me ajudou na formação do conhecimento.

Por último, mas não menos importante agradeço minha família: meus pais pelo carinho e por me permitirem estudar e ser hoje a pessoa que sou; a Ju pelo apoio incondicional, por acreditar em mim, obrigada irmã; ao David pelo amor, companheirismo, paciência, compreensão e apoio principalmente nos momentos que me pareciam não mais conseguir seguir em frente, você foi fundamental; e a todos os meus familiares pela torcida e compreensão da ausência nos finais de semana...



## **AGRADECIMENTO ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Agradeço ao apoio financeiro concedido pelas Instituições financiadoras: CPqRR-FIOCRUZ, INCT-DT, CNPq, FAPEMIG, Papes-VI, Proep-CPqRR e Ripag.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1 A esquistossomose	20
1.2 Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
1.3 Controle da esquistossomose	25
1.4 Imunobiologia da esquistossomose	27
1.5 Patologia da esquistossomose	32
1.5.1 Patologia aguda	32
1.5.2 Patologia crônica	33
1.6 Vacinas	34
1.6.1 Vacinas de Primeira Geração	35
1.6.2 Vacinas Recombinantes	35
1.6.3 Vacinas de DNA	36
1.6.4 Vacinas para esquistossomose	41
1.7 Tegumento do <i>Schistosoma mansoni</i> como alvo vacinal	47
1.8 Adjuvantes	50
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
2.1 Objetivo Geral	54
2.2 Objetivos específicos	54
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>55</b>
3.1 Obtenção de antígeno Smtæg	55
3.2 Protocolo de imunização com diferentes formulações vacinais	55
3.3 Protocolo de imunização gênica	57
3.4 Dosagens de anticorpos	58
3.5 Exame Parasitológico HPJ (Hoffman, Pons e Janner)	59
3.6 Recuperação de vermes adultos	59
3.7 Oograma	60
3.8 Área e número de granulomas hepáticos	60
3.9 Contagem do número de ovos do intestino e fígado	60
3.10 Avaliação da imunidade celular induzida pelas formulações vacinais	61
3.11 Detecção de anticorpos específicos na superfície de esquistossômulos	62
3.12 Ensaio de citotoxicidade	63
3.13 Transferência passiva de anticorpos	64
3.14 Eletroforese Bidimensional (2-DE)	65

3.14.1 Primeira dimensão - Focalização Isoelétrica	65
3.14.2 Segunda dimensão- SDS-PAGE	66
3.15 <i>Western-blotting</i> bidimensional	67
3.16 Digestão triptica <i>in gel</i> de proteínas	68
3.17 Espectrometria de massas	69
3.18 Identificação das proteínas	69
3.19 Análise <i>in silico</i> das proteínas	69
3.19.1 Predição de localização celular	69
3.19.2 Similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos	70
3.19.3 Predição de epitopos de células B e T	70
3.19.4 Predição de sítios de glicosilação e de adição de âncora de GPI	71
3.20 Clonagem	71
3.21 Transformação de <i>E. coli</i> DH5-alpha eletrocompetentes	72
3.22 PCR	73
3.23 Digestão do DNA plasmidiano com <i>BamHI</i> e <i>AgeI</i>	74
3.24 Sequenciamento do DNA plasmidiano	74
3.25 Expressão e análise de proteínas recombinantes em células HEK293T	75
3.25.1 Transfecção transiente de células HEK293T por lipossomos	75
3.25.2 Extração de proteínas a partir da lise das células HEK293T transfectadas	76
3.25.3 Análise dos extratos protéicos por SDS-PAGE	77
3.25.4 Análise das proteínas por <i>Western blotting</i> unidimensional	77
3.26 Análises estatísticas	78
4 RESULTADOS	79
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
6 ANEXOS	148
6.1 Aceite CEUA	148
6.2 Artigo Revisão “ <i>Schistosoma</i> tegument protein in vaccine and Diagnosis development: an Update”	149
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Mapa de distribuição mundial da esquistossomose</b> _____	<b>20</b>
<b>Figura 2: Morfologia dos <i>Schistosomas</i> adultos</b> _____	<b>23</b>
<b>Figura 3: Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i></b> _____	<b>25</b>
<b>Figura 4: Controle da esquistossomose no campo</b> _____	<b>27</b>
<b>Figura 5: Representação esquemática de um plasmídeo para uso como vacina de DNA</b> _____	<b>37</b>
<b>Figura 6: Representação esquemática da indução da imunidade celular e humoral por vacinas de DNA</b> _____	<b>40</b>
<b>Figura 7. Representação do tegumento do <i>Schistosoma mansoni</i> com antígenos do parasito identificados por estudos proteômicos</b> _____	<b>49</b>
<b>Figura 8: Protocolo de imunização</b> _____	<b>57</b>
<b>Figura 09: Protocolo de imunização gênica</b> _____	<b>58</b>
<b>Figura 10: Transferência passiva de anticorpos</b> _____	<b>65</b>
<b>Figura 11: Perfil eletroforético unidimensional de extrato protéico do tegumento (Smtég) de esquistossômulos de <i>S. mansoni</i></b> _____	<b>103</b>
<b>Figura 12: Perfil eletroforético bidimensional do extrato protéico do tegumento de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> (Smtég)</b> _____	<b>104</b>
<b>Figura 13: 2D-PAGE e respectivos 2D-WB de extrato protéico do tegumento de esquistossômulos do <i>Schistosoma mansoni</i></b> _____	<b>106</b>
<b>Figura 14: Amplificação da região codificadora do gene correspondente a SmCyp</b> _____	<b>110</b>
<b>Figura 15: Digestão do DNA plasmidiano pcDNA3.1/V5-His A vazio e contendo o gene codificador da proteína SmCyp</b> _____	<b>111</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Candidatos vacinais para esquistossomose</b> _____	<b>42</b>
<b>Tabela 2: Grupos de camundongos imunizados com PBS e/ou Smtg na presença e na ausência de adjuvante</b> _____	<b>56</b>
<b>Tabela 3: Análise <i>in silico</i> das proteínas do tegumento do esquistossômulo do <i>Schistosoma mansoni</i> identificadas por espectrometria de massas</b> _____	<b>108</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**2D-WB:** Western blotting bidimensional

**ADCC:** Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês: antibody-dependent cell cytotoxicity)

**APC:** Célula apresentadora de antígeno (do inglês: Antigen presenting cell)

**BCG:** Bacillus Calmette-Guérin

**CD40:** molécula co-estimuladora, ligante de CD154, expresso em linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais.

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

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

**CHAPS:** Tampão (3-colamidopropil)-imetilamonio]-1-propanosulfonato

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

**DTT:** Tampão *DITHIOTHREITOL*

**ELAC:** meio de cultura contendo sais de Earl's mais hidrolisado de lactoalbumina (do inglês: Earl's salts plus lactoalbumin hydrolysate)

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

**Foxp3:** fator de transcrição, (do inglês “ Forhead box protein 3”)

**GPI:** glicosilfosfatidilinositol

**GST:** Glutathione S-transferase

**HE:** Hematoxilina- Eosina

**HPJ:** Hoffman - Pons e Janer

**IEF:** Isoeletrofocalização

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

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama

**Ig:** Imunoglobulina

**IL:** Interleucina

**IPG:** Gradiente de pH imobilizado

**KOH:** Hidróxido de Potássio

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MALDI:** do inglês: Matrix-assisted laser desorption/ionization

**MHC:** Complexo principal de Histocompatibilidade (do inglês: major histocompatibility complex)

**mRNA:** RNA mensageiro

**MS:** espectrometria de massas ( do inglês: mass spectrometry)

**NK:** células natural killer (do inglês: “natural killer cells)

**PAMPs:** Padrões de reconhecimento de patógeno (do inglês: pathogen associated molecular patterns)

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

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

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

**PCR:** Reação da cadeia de polimerase (do inglês: polymerase chain reaction)

**PVDF:** Fluoreto Polivinidileno

**PZQ:** praziquantel

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

**Rpm:** Rotação por minuto

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

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

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

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

**SFB:** Soro fetal bovino

**Smtg:** Tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni*

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

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

**TEMED:** N, N, N', N'-tetra metiletileNODiamina

**TGF-β:** Fator de crescimento tumoral (do inglês: Transforming growth factor-β)

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

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

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

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

**TOF:** Time-Of-Flight

**TSP:** Tetraspanina

**Treg:** Células T reguladoras (do inglês: T regulatory cells)



## RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), atualmente 200 milhões de pessoas estão infectadas por espécies do gênero *Schistosoma*, uma vacina, administrada sozinha ou em combinação com drogas anti-helmínticas, seria importante para o controle da esquistossomose. Recentemente, nosso grupo demonstrou que uma preparação do tegumento de esquistossômulo do *S. mansoni* (Smteg) é capaz de elicitar uma diminuição estatisticamente significativa na carga parasitária quando formulado com adjuvante de Freund. Neste trabalho nós avaliamos a imunoproteção induzida em camundongos pelo Smteg sem adjuvante ou Smteg associado ao Alum ou Alum + CpG. Na ausência de adjuvante não houve diminuição estatisticamente significativa da carga parasitária. Apesar disso, o Smteg foi capaz de ativar a resposta imune produzindo níveis significativos de anticorpos específicos, aumentando a porcentagem de células TCD4+IFN- $\gamma$ + e de células TCD4+IL-10+ no baço e aumentando a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 pelas células esplênicas e IL-10 por células dendríticas,. Ao contrário, a associação Smteg/alum/CpG-ODN foi capaz de induzir uma redução parcial na carga parasitária (43,1%) além de uma reduzir significativamente o número de ovos eliminados nas fezes. Esta resposta protetora foi associada com um perfil predominantemente do tipo Th1, com o aumento na produção de IgG2c, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . O papel dos anticorpos na eliminação do parasito em animais imunizados com o Smteg também foi avaliado, e demonstramos que anticorpos específicos estão envolvidos na eliminação do parasito. Uma vez observada a importância dos anticorpos na imunidade protetora, realizamos análises proteômicas e sorológicas pela técnica de *Western-blotting* bidimensional (2D-WB) para identificar candidatos vacinais. Uma das proteínas identificadas, a ciclofilina do *S. mansoni* (SmCyp), foi utilizada como antígeno em um protocolo de imunização gênica, porém não observamos redução significativa da carga parasitária e do número de ovos nas fezes e no intestino e fígado de camundongos imunizados, apesar da imunização diminuir significativamente a área dos granulomas hepáticos em animais imunizados. Nossos resultados demonstram a importância do tegumento do esquistossômulo do *S. mansoni* como fonte de antígenos vacinais para a esquistossomose mansoni; a importância dos anticorpos na eliminação do parasito e identifica proteínas candidatas a serem utilizadas em formulações vacinais, abrindo novas possibilidades

de estudos avaliando as mesmas em diferentes formulações e estratégias vacinais em ensaios pré-clínicos.

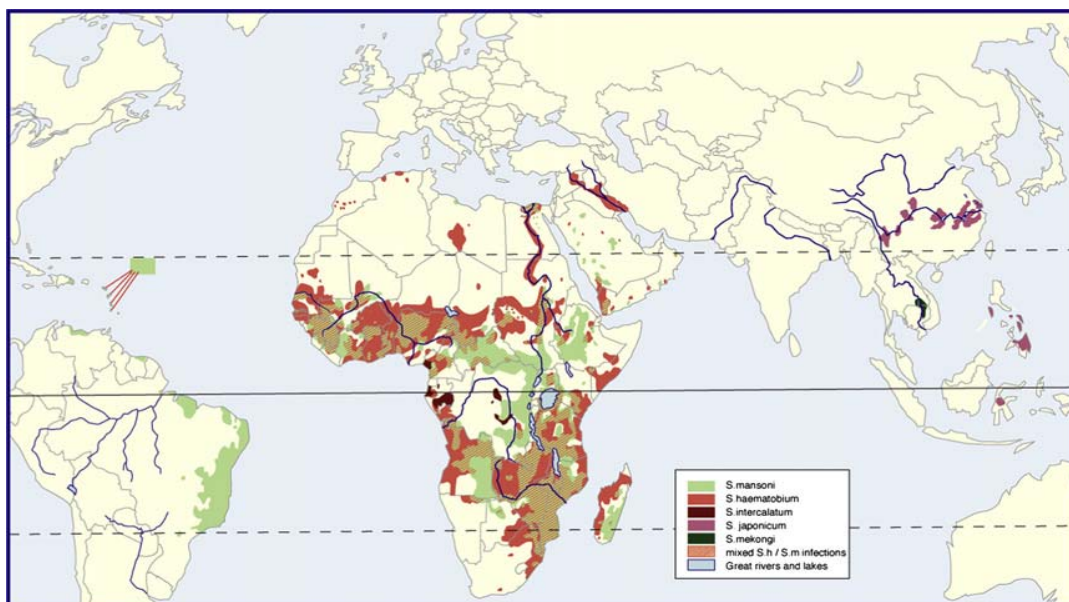
## ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), currently 200 million people are infected by *Schistosoma* species, the vaccine, administered alone or in association with anti-helminthic drugs, would be important to control schistosomiasis. Recently, our group demonstrated that the schistosomula tegument preparation from *S. mansoni* (Smteg) is able to induce a significant reduction in worm burden when formulated to Freund adjuvant. In this work we evaluated the protection induced by Smteg without adjuvant or Smteg with Alum or Alum + CpG. Without adjuvant any significant reduction in parasite burden was observed. However, Smteg immunization activate immune response inducing significant production of specific antibody; increased percentage of TCD4+IFN- $\gamma$ + and TCD4+IL-10+ cells in spleen and increased production of IFN- $\gamma$  and IL-10 cytokines by spleen cell and IL-10 by dendritic cells. On the other hand Smteg/alum/CpG-ODN formulation was able to induce partial reduction in worm burden (43.1%) and also a significant reduction in the number of eggs eliminated in the feces. This protective response was associated with a predominant Th1 type of immune response, with increased production of specific IgG2c, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . The role of antibodies in the elimination of parasites in animals immunized with Smteg was also evaluated and we have demonstrated that specific antibodies are involved in the elimination of the parasite. Once we have observed the importance of antibodies in protective immunity, we performed proteomic and serological analyzes by two-dimensional *Western blotting* (WB 2D) technique to identify vaccine candidates. One of the identified proteins, the *S. mansoni* cyclophilin (SmCyp), was used as antigen in a genetic immunization protocol, although no significant reduction in parasite burden and the number of eggs in the feces and intestine and liver of immunized mice was observed, immunization significantly decrease the area of hepatic granulomas in immunized animals. Our results demonstrate the importance of *S. mansoni* schistosomula tegument as a source of vaccine targets for schistosomiasis; the importance of antibodies in parasite elimination and also identify proteins to be used in vaccine formulations, opening new studies possibilities in the evaluation of these candidates in different formulations and vaccination strategies in preclinical trials.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas em termos de importância na saúde pública. Estima-se que 200 milhões de pessoas estejam constantemente infectadas, sendo que 779 milhões de indivíduos estão sob o risco de infecção em aproximadamente 78 países (WHO, 2013). Esta doença parasitária humana é causada por trematodos digenéticos do gênero *Schistosoma*. O ser humano é o hospedeiro definitivo das seis espécies de *Schistosoma* as quais são morfologicamente muito similares. Três destas espécies são de importância global ou regional: *S. japonicum* (China e sudeste da Ásia), *S. mansoni* (África, Arábia e América do Sul) as quais vivem nas vênulas peri-intestinais causando esquistossomose intestinal e hepatoesplênica e o *S. haematobium* (África e Arábia), espécie esta que vive no plexo perivesical que causa esquistossomose urinária. *S. intercalatum* (oeste e região central da África), *S. mekongi* (Mekong Delta) e *S. malayensis* (Malásia) estão limitados a poucos focos locais e possuem menor importância epidemiológica (Jordan et al., 1993; Ross et al., 2002; Gryssel et al., 2006; Chitsulo et al., 2000; WHO, 2002) (Fig. 1).



**Figura 1: Mapa de distribuição mundial da esquistossomose.** (Gryssel et al., 2006)

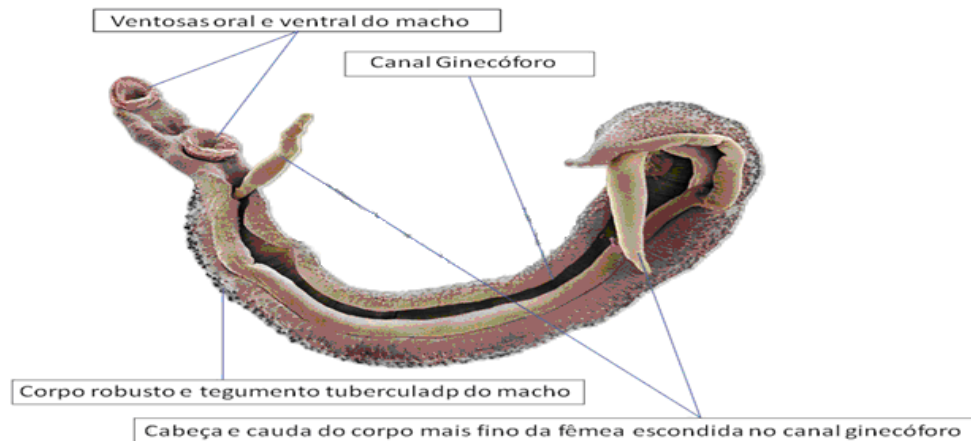
O Brasil é o país mais afetado pela esquistossomose nas Américas com aproximadamente 2 milhões de pessoas infectadas e mais de 36 milhões sob o risco de adquirir a Infecção (Steinmann et al., 2006; Lambertucci et al., 2010). As áreas endêmicas para a esquistossomose de maior prevalência da doença estão nos estados de Minas Gerais e Bahia. Há ainda focos isolados nos estados do Piauí, Amazonas, Amapá, Tocantins, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul (DATA SUS, 2013).

Negligência sanitária e migração humana têm contribuído enormemente para espalhar a esquistossomose tanto nas áreas rurais como em aglomerados urbanos (Jordan et al., 1993; Gryssel et al., 2006). Embora haja esforços globais para reduzir a doença através da quimioterapia via praziquantel (droga desenvolvida em 1970), as taxas de Infecções continuam altas nas regiões endêmicas (Hotez et al., 2006; Hotez et al., 2010). O praziquantel não elimina os esquistossômulos ou ovos, além disso, algumas preocupações em relação a essa droga têm sido relatadas uma vez que tolerância ao praziquantel foi facilmente induzida em modelo animal (Gryssels et al., 2001). Assim, torna-se importante a busca de metodologias alternativas de controle e cura dessa doença como, por exemplo, a vacinação.

## **1.2 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni***

O ciclo de vida do *S. mansoni* envolve duas gerações: a primeira no hospedeiro vertebrado em que ocorre a reprodução sexuada e maturação; e a segunda no hospedeiro intermediário invertebrado em que somente ocorre a reprodução assexuada. O hospedeiro intermediário para o *S. mansoni* é o caramujo do gênero *Biomphalaria* (Davis et al., 1985). Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto durante a reprodução assexuada no hospedeiro intermediário. As cercárias saem através da formação de vesículas no tegumento do molusco, que se rompem e liberam de forma intermitente nas horas mais claras do dia. (Gryssel, 2012; Souza et al., 2011). Na água, as cercárias possuem geotropismo negativo, fototropismo positivo e tendem a acumular-se sob a superfície líquida por até 72 horas (Rollinson & Simpsom, 1987; Gryssel et al., 2012). Quando a cercária encontra o hospedeiro definitivo, penetra pela sua pele ou mucosa por ingestão de água contaminada, àquelas que chegam ao estômago são destruídas, e as que penetram na mucosa oral desenvolvem-se normalmente perdendo a cauda (Souza et al., 2011). A capacidade invasora

das larvas depende de um esforço mecânico e da ação química exercida pelas secreções histolíticas das glândulas cefálicas de penetração. A ação mecânica ocorre por auxílio de uma ventosa oral. A ação química ocorre por proteases do tipo collagenase e elastase, ou por enzimas que são ativas contra as glicoproteínas da pele. Após penetrar, a cercária passa por mudanças na conformação da membrana, que se torna pentalamínada e no metabolismo, que se torna principalmente anaeróbico (Rollinson & Simpsons, 1987; Gordon & Griffiths, 1951). Inicia-se então o processo de transformação em esquistossômulos (Silva et al., 2008; Stirewalt et al., 1983). Após permanecer na pele por tempo variável, de minutos a 72 horas, os esquistossômulos, caso não sejam destruídos pelos mecanismos de defesa, iniciam a migração através do corpo do seu hospedeiro. Os esquistossômulos utilizam as secreções líticas das glândulas cefálicas posteriores para penetrar nos vasos cutâneos. Através da circulação, eles chegam direto ao coração e aos pulmões em aproximadamente 4 dias, tornando-se mais longos e delgados, o que facilita a sua migração através da rede vascular pulmonar (Miller & Wilson, 1980). Do pulmão, os esquistossômulos voltam ao coração e são enviados através da circulação geral a todas as partes do corpo do hospedeiro. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento (Rollinson & Simpsons, 1987; Miller et al., 1980). Quatro semanas após a infecção, a maioria dos vermes encontra-se maduros e prontos para se acasalarem. Os vermes acasalados deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta e migram para as veias mesentéricas inferiores pélvicas. As localizações habituais são as vênulas da parede do reto, sigmóide e intestino grosso (Rollinson & Simpsons, 1987; Bloch, 1980). O casal está em constante associação, encontrando-se a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho (Fig. 2). O macho mede cerca de 1 cm de comprimento, apresenta forma foliácea e cor esbranquiçada e a fêmea possui forma cilíndrica, com 1,2 a 1,6 cm de comprimento e coloração mais escura.

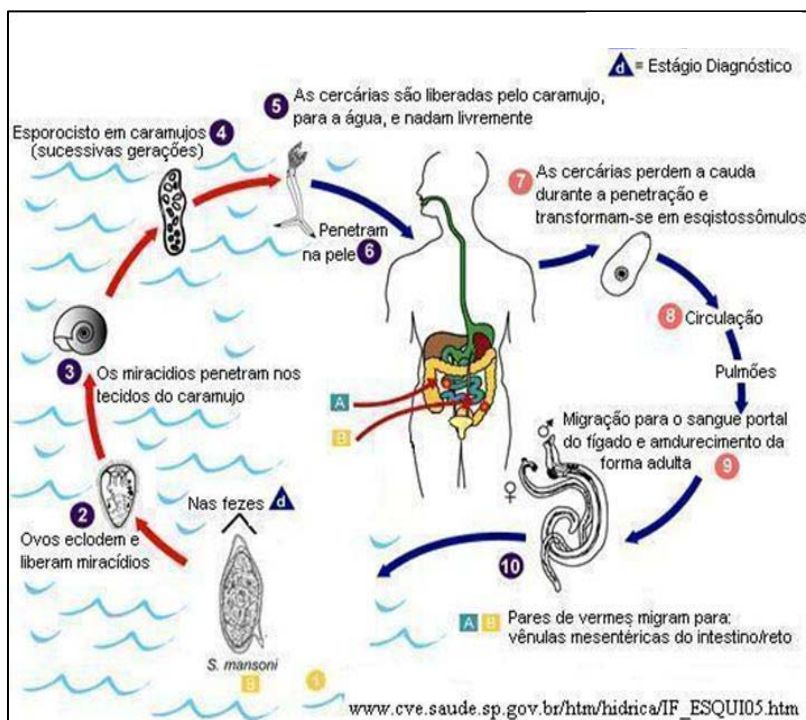


**Figura 2: Morfologia dos *Schistosomas* adultos.** (Museu histórico natural de Londres)

As fêmeas fecundadas, isoladas ou acopladas ao macho, migram contra a corrente sanguínea e iniciam a postura dos ovos na submucosa dos vasos de menor calibre da parede intestinal. A maior parte da energia das fêmeas é gasta na produção de ovos. Cerca de 300 a 400 ovos de *S. mansoni* são liberados por fêmea em camundongos infectados a cada dia, sendo que este número aumenta em primatas (Juberg et al., 2009; Cheever et al., 1994). A produção de ovos começa 30 a 40 dias após a infecção. Os ovos são eliminados para o ambiente através das fezes dos indivíduos infectados (Valadares et al., 1981). Muitos dos ovos não ultrapassam a parede intestinal e são levados a órgãos e tecidos do hospedeiro pela corrente sanguínea. A presença destes ovos nos tecidos resulta na formação de granulomas, proveniente da resposta do sistema imune do hospedeiro. No momento da ovoposição, o desenvolvimento embrionário é ainda incompleto, requerendo mais seis ou sete dias para completar-se. Os miracídios morrem caso a expulsão não se complete dentro de três a quatro semanas após a ovoposição. Os ovos eliminados pelo hospedeiro através das fezes, se encontrarem condições adequadas, como por exemplo: água natural com temperatura morna, baixa hipotonicidade e iluminação adequada, liberarão o miracídio de dentro da casca do ovo (Juberg et al., 2009). Uma vez que o ovo é rompido em água natural, o miracídio eclode e começa a nadar ativamente. O miracídio possui geotropismo negativo e fototropismo positivo, que o auxilia na localização do hospedeiro intermediário, além de ser atraído por substâncias químicas eliminadas pelo caramujo. O encontro deve ocorrer em um período de 8 horas e o

tempo total de penetração é de 10 a 15 minutos. O miracídio penetra no hospedeiro intermediário específico por movimentos rotatórios e ação lítica. Após a penetração, o miracídio perde seu revestimento epitelial e seus órgãos de penetração, atrofiando sua musculatura (Rollinson & Simpsons., 1987). Por volta do oitavo dia, o miracídio apresenta-se como um tubo enovelado, imóvel, repleto de células germinativas em multiplicação, se transformando em esporocisto primário. O esporocisto primário apresenta grandes células germinativas isoladas ou agrupadas. Por volta da segunda semana de existência, as células germinativas rompem-se para liberar esporocistos filhos, em número de 20 a 40 por poliembrionia. Os esporocistos secundários apresentam células germinativas, em constante multiplicação. Estes migram para as glândulas digestivas e ovotestis do planorbídeo. Pouco a pouco, aglomerados celulares vão se diferenciando para formar cercárias. Os esporocistos podem formar várias gerações de cercárias. A transformação dos esporocistos em cercárias ocorre apenas quando atingem sua localização permanente, nas glândulas digestivas do caramujo. A cercária deixa o hospedeiro intermediário caindo em água fresca, completando o ciclo do parasito (Rollinson & Simpsons, 1987) (Fig. 3).





**Figura 3: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.** As cercárias penetram pela pele no hospedeiro definitivo perdendo a cauda e iniciando-se o processo de transformação em esquistossômulos. Os esquistossômulos migram até o sistema porta-hepático, onde completam o desenvolvimento transformando-se em vermes adultos. O casal copula e as fêmeas depositam seus ovos que podem se alojar em órgãos ou serem eliminados com as fezes. Em água fresca os ovos eclodem e liberam os miracídeos que nadam e penetram no hospedeiro intermediário e transformando em cercárias.

### 1.3 Controle da esquistossomose

A estratégia de controle e prevenção da esquistossomose utilizada atualmente é baseada principalmente na quimioterapia, saneamento básico e educação ambiental (Jordan et al., 1993; Gryssel et al., 2006; Jordan et al., 2000). Em alguns países, mais notadamente no Japão em 1950, conseguiu-se eliminar a esquistossomose combinando abastecimento de água, saneamento básico e intervenções ambientais (Minai et al., 2003). Hoje em dia, o uso da

quimioterapia nas comunidades e grupos de riscos é comumente realizado (Molyneux, 2005; WHO, 2013). Dependendo dos recursos e epidemiologia local, comunidades em áreas endêmicas ou são examinadas e tratadas, caso o exame encontra-se positivo, ou toda a população é tratada independentemente do estado de infecção individual. Esta estratégia é especialmente aplicada com crianças em idade escolar, pois estão em maior risco de infecção e são facilmente acessíveis nas escolas. Os medicamentos são distribuídos por equipes especiais: os agentes de saúde local ou pelos professores da escola. Embora o objetivo primário de quimioterapia seja controlar e prevenir a morbidade, também é esperado que, eventualmente, a transmissão seja afetada e até mesmo interrompida (Fig. 4).

Devido ao fato de não ser fácil modificar as condições sanitárias e socioeconômicas, seja por causa do alto investimento necessário inicialmente, seja pela falta de vontade ou consciência política, tradicionalmente, o controle da esquistossomose tem sido feito através do tratamento com uma única droga, o praziquantel (PZQ). O desenvolvimento de resistência à droga pelos parasitos é, além disso, uma preocupação a ser considerada (Coles et al., 1986). O uso de tratamentos repetidos em intervalos curtos de dois a três anos, com custos operacionais importantes, justifica o desenvolvimento de estratégias de controle adicionais que possam ter um efeito mais duradouro. Assim, eliminar a esquistossomose apenas com o uso de drogas, sem a utilização de medidas adicionais como saneamento, abastecimento de água, controle do caramujo e educação é praticamente impossível.



**Figura 4: Controle da esquistossomose no campo.** (A) Tratamento em massa com praziquantel na comunidade. (B) Cuidados no suplemento de água. (C) Controle do caramujo com moluscicida. (Fonte: Gryssel, 2012).

#### 1.4 Imunobiologia da esquistossomose

Devido ao seu complexo ciclo de vida, o *S. mansoni* representa um desafio para o sistema imune do hospedeiro, principalmente porque o parasito apresenta diferentes estágios evolutivos e habita distintos nichos durante seu desenvolvimento no hospedeiro definitivo. Um aspecto fundamental da relação parasito-hospedeiro é o desenvolvimento de mecanismos eficientes de escape pelo *S. mansoni*, que permite a este evadir-se da resposta imune e sobreviver por décadas no hospedeiro utilizando-se de suas biomoléculas para completar o

ciclo, e também para desenvolver uma infecção crônica (Pearce et al., 2002). No curso da infecção, a resposta imune progride por, pelo menos, três fases, em todas as fases componentes do sistema imunológico do hospedeiro são importantes tanto para o desenvolvimento do parasito, quanto para sua eliminação ou regulação da resposta inflamatória desencadeada em resposta a seus antígenos. Produtos de células TCD4<sup>+</sup> modulam o desenvolvimento do parasito (Davies et al., 2001) visto que em hospedeiros imunodeprimidos, o desenvolvimento do parasito é retardado. Já foi demonstrado que o parasito utiliza TNF- $\alpha$  produzido pelo hospedeiro como sinal estimulatório para a produção de ovos (Amiri et al., 1992). A participação de IL-7 já foi demonstrada no crescimento e fecundidade do verme (Wolowczuk et al., 1989). A presença do receptor de TGF-  $\beta$  expresso na superfície do tegumento sincicial indica a utilização deste fator pelo verme (Davies et al., 1998). Fatores de crescimento epitelial humano estimulam a expressão do fator de crescimento epitelial no parasito (Vicogne et al., 2004). A primeira fase da resposta imunológica do hospedeiro à Infecção pelo *Schistosoma* acontece após infecção por cercárias no hospedeiro, que, posteriormente, se transformam em esquistossômulos e vermes adultos jovens os quais migram pelos tecidos (Cheever et al., 2001), nesta fase, a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1 (Pearce et al., 2002). Em indivíduos que já estiveram expostos ao parasito, e que, portanto, já desenvolveram uma sensibilização prévia, a partir das primeiras 12 horas após a penetração das cercárias, observa-se importante reação inflamatória dérmica e subdérmica, originando a dermatite cercariana, a qual é capaz de destruir um importante quantitativo de cercárias e esquistossômulos ainda na pele sendo a primeira linha de defesa contra a infecção (Lichtenbergova et al., 2008). Nesta reação predomina principalmente células mononucleares e polimorfonucleares e apresenta-se clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso (Mahmoud et al., 2009). Durante a passagem pela epiderme e derme, ocorre reação de hipersensibilidade do tipo imediata com ativação de vários componentes da resposta imune inata. Em dois dias organiza-se um infiltrado de polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans, além de produção local de quimiocinas- CCL3/MIP-1 $\alpha$  – e citocinas- IL-1 $\beta$ , IL-6, IL12 p40, IL-10. Depois de quatro a cinco dias, este cenário ainda é predominante, podendo se observar o influxo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e produção de IL12 p40, IFN-  $\gamma$  e IL-4, os quais se reduzem na segunda semana (Hogg et al., 2003; Kourilová et al., 2004).

À medida que essas formas do parasito imaturas se desenvolvem, copulam e produzem ovos, após cinco ou seis semanas de infecção, ocorre uma alteração considerável na resposta imunológica. A resposta imunológica que era predominantemente Th1 é substituída pelo domínio da resposta Th2, induzida principalmente por antígenos do ovo do *Schistosoma mansoni*. Acredita-se que a resposta imune do tipo Th1 seja responsável pelas lesões teciduais e manifestações clínicas da fase aguda. Além disso, outro aspecto importante é a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), com ação efetora sobre esquistossômulos, mas aparentemente inócua para os helmintos adultos (Souza et al., 2011). Tem-se evidenciado que as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade, a intensidade da infecção, e, provavelmente, com a duração da infecção. Alguns estudos têm demonstrado que a composição de isotipos de anticorpos anti-*Schistosoma* pode desempenhar uma influência marcante na eficiência de mecanismos efetores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (A.D.C.C.) e, conseqüentemente, na expressão da imunidade protetora ou na patologia (Dunne et al., 1993). Várias células efetoras, em presença de anticorpos anti-esquistossômulo, participam do mecanismo de A.D.C.C., dentre elas monócitos, eosinófilos, e plaquetas (Joseph et al., 1983). É sabido que, ao contrário de IgG1, o isotipo IgG4 é ineficiente na ativação de complemento e na ligação a receptores de imunoglobulinas presentes em monócitos e macrófagos. Além disso, compete com IgE específica na ligação a antígenos do verme nos sítios de ligação de mastócitos, bloqueando sua degranulação (Stanworth & Smith, 1973). Neste contexto, os anticorpos anafiláticos têm sido associados com a imunidade. Além disso, estes anticorpos induzem alto nível de proteção contra novas exposições às cercárias quando transferidos passivamente para ratos não infectados (Joseph et al., 1983)

Durante a terceira fase da resposta, entre a 16<sup>o</sup> e 17<sup>o</sup> semanas após a infecção, um aumento significativo na produção de IL-10 é responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999, Cheever et al., 2001). A ausência dessa modulação mantém altos os níveis de mediadores inflamatórios, o que pode ocasionar o desenvolvimento das formas graves da esquistossomose, com fibrose hepática e hipertensão portal podendo resultar em morte do hospedeiro (Hoffmann et al., 2000; Rutzky et al., 2001). Estudos em

camundongos deficientes das citocinas IL-10 e IL-12 demonstraram que estes animais desenvolveram uma vigorosa resposta do tipo Th2 com significativa mortalidade entre a 12<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> semanas após a infecção. Ainda neste trabalho, camundongos deficientes das citocinas IL-10 e IL-4 desenvolveram forte resposta Th1 com 100% de mortalidade 9 semanas após infecção. Isso indica que as citocinas características dos perfis Th1 e Th2 são ambas potencialmente patogênicas e também demonstra o papel regulador da IL-10 tanto no perfil Th1 como Th2 promovendo um granuloma capaz de reter os estímulos inflamatórios liberados pelo ovo os quais poderiam levar a destruição hepática (Hoffman et al., 2000). Por outro lado, a contribuição do IFN- $\gamma$  produzido por células Th1 e IL-4, IL-5 e IL-13 produzidas por células Th2 na resposta granulomatosa tem sido discutida sendo que a fibrose e os outros sintomas da patologia são mediados principalmente por citocinas do tipo Th2 (Cheever et al., 1994, Remain et al., 2006). Camundongos deficientes na sinalização de IFN- $\gamma$  apresentam redução no tamanho do granuloma e parecem transitar para fase crônica mais rapidamente. Uma forte atividade antifibrótica tem sido associada à presença de IFN- $\gamma$  (Mukai et al., 2006), porém, níveis excessivos de IFN- $\gamma$  podem causar graves consequências patológicas para o hospedeiro, como, por exemplo, efeito hepatotóxico (Hoffmann et al., 2000).

A polarização da resposta imune na direção de um perfil Th1, Th2 ou Th17 é prejudicial se não letal para o hospedeiro (Hoffmann et al., 2000; Stadecker et al., 2004; Wilson et al., 2007). Similar ao paradigma Th1-Th2, o antagonismo se estende às células secretoras de IL-17, com ambas as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 suprimindo a sua secreção (Cruz et al., 2006; Lubberts et al., 2000). Dado aos elevados níveis de IFN- $\gamma$  e IL-4 durante vários momentos da Infecção pelo *S. mansoni*, é provável que a produção de IL-17 seja rigidamente controlada. Em um trabalho desenvolvido por Rutitzky et al. (2005), camundongos CBA apresentavam uma vigorosa resposta com alta produção de IL-17 durante o curso da Infecção por *S. mansoni* induzindo uma patologia severa do fígado. A neutralização com anti-IL-17 mAb levou a uma regularização do tamanho do granuloma sendo este comparado aos tamanhos dos granulomas presentes no fígado dos camundongos controles. Apesar de se observar também um aumento das células T CD8<sup>+</sup>e uma redução da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> durante o curso da Infecção, o papel destas células na imunidade celular anti-*Schistosoma* ainda não está totalmente elucidado (Yanget al., 2000). Embora o recrutamento de células T

CD8<sup>+</sup> por antígenos exógenos seja primeiramente não esperado, estudos recentes têm demonstrado que estas células são propensas a responder a esses antígenos em doenças infecciosas via ativação dirigida por estimulação antigênica persistente (Manfras et al., 2002); citocinas (Martins-Filho et al., 1999) ou por apresentação cruzada via MHC de classe I (Grant & Rock, 1992; Rock et al., 1990; Lipscomb & Masten, 2002).

Um possível papel para as células CD8<sup>+</sup> na eliminação do *Schistosoma* pode estar relacionado à sua função citotóxica sobre esquistossômulos. Em um ensaio de imunização realizado por Zhou et al. (2012) foram utilizados dois antígenos presentes na superfície do esquistossômulo: Sj22.6/ 26GTS os quais foram ligados em esferas magnéticas de Sepharose 4B a fim de mimetizar o esquistossômulo do *Schistosoma japonicum*. Neste trabalho observou-se uma apresentação cruzada pelas células dendríticas às células T CD8<sup>+</sup> com um aumento da expressão de MHC I pelas células dendríticas e estimulação e proliferação de células T CD8<sup>+</sup>. Estas exerceram função citotóxica matando os esquistossômulos em um ensaio *in vitro* e, *in vivo* foi observada uma diminuição significativa da carga parasitária e redução do número de ovos no fígado.

Outra população de células, as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Treg) também contribuem para manter a homeostase imunológica suprimindo a ativação de células autoreativas, bem como controlando a magnitude da resposta imune aos patógenos invasores (Sakaguchi et al., 2006; Belkaid & Rouse, 2005). A descoberta do “Forkhead box protein 3” (Foxp3) como um fator de transcrição natural das células Treg foi importante para diferenciar as células Treg natural das células Treg induzíveis mas que apresentam propriedades regulatórias similares. Células Treg naturais expressam Foxp3 e desenvolvem-se no timo sendo componentes essenciais do repertório de células T periféricas. A expressão constitutiva da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25), Foxp3, o requerimento de IL-2, juntamente com a expressão do co-receptor inibitório, CTLA-4, e o receptor de TNF- $\alpha$  induzido por glicocorticóides, GITR, servem como marcadores de Tregs naturais. Já as células T reguladoras induzíveis frequentemente se espelham nas respostas das células T efetoras e se originam das células CD4<sup>+</sup> convencionais, a nomenclaturas para as essas células Tregs induzíveis incluem: caso secretam IL-10 são consideradas células Tr1, se secretam TGF- $\beta$  são células Th3 e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>. Durante a infecção pelo *S. mansoni*, ambas as células reguladoras

natural e induzível tem sido descritas com papéis variados incluindo a supressão ou ativação das células dendríticas, a orquestração da resposta Th2 e a regulação dessa resposta no desenvolvimento do granuloma e fibrose (Wilson et al., 2007). Quatro semanas após a infecção com *S. mansoni*, há uma significativa expansão de células Treg natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> que se desenvolvem no linfonodo mesentérico e com grande expansão e acumulação de Treg no fígado e baço (Baumgart et al., 2006; Taylor et al., 2006; Singh et al., 2005). Assim, uma única imunização com ovos do *S. mansoni* ocorre uma significativa resposta de células Treg Foxp3<sup>+</sup>, sugerindo que antígenos imunogênicos do ovo podem ser um potente indutor de ambas as células efetoras e Treg durante a Infecção (Baumgart et al., 2006; Taylor et al., 2006; Singh et al., 2005).

## **1.5 Patologia da esquistossomose**

### **1.5.1 Patologia aguda**

Minutos após a infecção por cercárias pode aparecer urticária local que, usualmente, diminui em poucas horas. Em casos mais raros, pode persistir por dias. O substrato fisiopatológico é a morte na pele de cerca de até a metade das cercárias que a penetram caracterizando-se por erupção micropapular eritematosa e discretamente edemaciada (Lambertucci et al., 2005). De uma a quatro semanas após a Infecção, a migração e maturação do esquistossômulo podem causar uma reação de hipersensibilidade sistêmica (Gryssels, 2012). Esta forma aguda da esquistossomose é também conhecida como febre de Katayama (distrito do Japão onde foi primeiramente descrita). Possui como sintomas febre, prostração, fadiga, mialgia, dor de cabeça e tosse seca (Jordan et al., 1993; Ross et al., 2002; Gryssels et al., 2006; Jelinek et al., 1996; Ross et al., 2007; Clerinx & Van Gompel, 2011). Os exames de fezes ou urina ainda são negativos, mas eosinofilia, sorologia positiva, e um histórico de contato com a água tropical geralmente indicam o diagnóstico. O fígado ou baço pode estar aumentado e a radiografia de tórax pode revelar infiltrados irregulares. Mais tarde, a migração e o posicionamento dos vermes adultos para as veias mesentéricas podem levar aos mais pronunciados sintomas abdominais, incluindo cólicas intestinais e diarreia (Gazzinelli et al. 1987).



### 1.5.2 Patologia crônica

Durante a fase crônica, que pode durar a vida do hospedeiro, os vermes continuam a produção de ovos (aproximadamente 300 ovos/dia/fêmea), e os granulomas que se formam ao redor dos ovos ficam menores se comparados ao período inicial da Infecção (Pearce et al., 2002). Nesta fase surge, abruptamente, febre elevada acompanhada de calafriose, significativa sudorese, mal-estar geral, eventualmente com crise asmátiforme, anorexia, náuseas e vômitos, os quais podem ser intensos, com mialgias e cefaléia (Coura et al., 1970). É possível observar também diarreia com numerosas evacuações. Ao exame físico, é possível detectar emagrecimento, desidratação, hepatoesplenomegalia, microadenomegalia, taquicardia e hipotensão arterial sistêmica (Milan & Keim, 2007). Nesta fase, os indivíduos exibem uma baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3 e alta produção de IgG4 e IgE a antígenos de esquistossômulos e de verme adulto (Jassim et al., 1987). Indivíduos da forma clínica intestinal apresentam menor produção de IFN- $\gamma$  e maior produção de IL-10 em resposta a estimulação de PBMC com antígeno solúvel do ovo (SEA) ou do verme adulto (SWAP) (Correa-Oliveira et al., 1998). O papel da IL-10 nesta fase é fundamental para o controle da morbidade contribuindo para a sobrevivência do hospedeiro (Sadler et al., 2003; Teixeira-Carvalho et al., 2008; Malaquias et al., 1997; Falcão et al., 1998).

Os granulomas, que estão associados à patologia da doença, se desenvolvem quando parte dos ovos produzidos pela fêmea fica retida em vários órgãos como: intestino, fígado, pâncreas, pulmões e outros provocando uma reação inflamatória peculiar, chamada de reação inflamatória granulomatosa. Essa inflamação granulomatosa provoca microulcerações, pseudopólipos, irritação muscular, dentre outros sintomas. A frequência e a severidade dos sintomas dependem da intensidade da Infecção (King et al., 2005). A formação dos granulomas em díspares órgãos e tecidos explica as manifestações da doença tais como: hipertensão portal (granulomas hepáticos com a desorganização da arquitetura sinusoidal hepática); formação de pseudotumores (granulomas na parede intestinal); disfunções neurológicas (granuloma no sistema nervoso central, principalmente na medula); lesões vasculares pulmonares (granuloma nos vasos pulmonares) (Carvalho et al., 2008).

O processo de formação dos granulomas hepáticos se inicia quando antígenos provenientes do envelope periovular (Von Lichtenberg's) são liberados através de microporos localizados na casca dos ovos estimulando a resposta inflamatória (Boros et al., 1989). Esses antígenos são transportados para órgãos linfóides através de vasos sanguíneos e linfáticos. Nestes órgãos, os antígenos são capturados e processados por células apresentadoras de antígenos que incluem linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. Posteriormente, os antígenos são apresentados aos linfócitos pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade MHC de classe II presente nas células apresentadoras de antígenos (Phillips et al., 1986). Esta interação leva à ativação de células T, expansão clonal, secreção de citocinas e recrutamento de leucócitos adicionais. Desta resposta participam linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, células epitelióides, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (Von Lichtenberg et al., 1964; Moore et al., 1977; Silva-Teixeira et al., 1996). As células recrutadas acumulam-se em torno dos ovos dando origem ao granuloma propriamente dito, que pode apresentar um volume até 100 vezes maior do que os ovos. A destruição local dos tecidos é seguida de fibrose, um processo de cicatrização no qual os fibroblastos são conduzidos para a lesão e a consequente produção de colágeno resulta em cicatriz que pode ocasionar a obstrução de vasos sanguíneos ou linfáticos (Von Lichtenberg et al., 1964; Domingo & Warren, 1969; Cheever et al. 1972; Warren et al., 1973). A fibrose é mediada pela IL-13, o principal produto de células polarizadas Th2 (Barrie et al., 2012).

## **1.6 Vacinas**

As vacinas estão entre as intervenções mais efetivas na era atual. Desde a primeira utilização por Edward Jenner, o uso da vacina tem-se tornado indispensável na erradicação de doenças. Atualmente mais de 70 vacinas foram licenciadas para uso contra cerca de 30 microorganismos poupando muitas vidas (Nabel, 2013).

O progresso no entendimento de diferentes áreas como imunologia, virologia, genética, biologia molecular, genômica e proteômica proporcionou o desenvolvimento de um conjunto de ferramentas para a abordagem atual da vacinologia, não apenas para doenças infecciosas agudas, mas também infecções crônicas, alergias, doenças auto-imune e câncer (Nabel, 2013; Andre, 2003).

Ao longo destes dois séculos, três gerações de vacinas foram desenvolvidas. As vacinas de primeira geração constituídas de microorganismos inativados ou mortos, as de segunda geração que são vacinas de subunidades constituídas de antígenos purificados ou recombinantes. As vacinas de terceira geração são as vacinas de DNA, nas quais os genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos imunogênicos são carregados por DNA plasmidiano e são inoculados nesta forma (Mir, 2004).

### **1.6.1 Vacinas de Primeira Geração**

As vacinas de primeira geração são produzidas a partir de microorganismos vivos e atenuados (vacina de BCG) ou mortos inativados (vacinas contra *Bordetella pertussis*) (Bloom, 1989). Consequentemente, não há a possibilidade de replicação de tais microorganismos no hospedeiro. Sendo assim existe a necessidade de administração de doses maiores e múltiplas além da limitação da produção da vacina (Palatnick, 2008).

### **1.6.2 Vacinas Recombinantes**

A técnica de expressão de proteína recombinante consiste em isolar, clonar e expressar os genes que codificam uma proteína de interesse (Mir, 2004). As proteínas heterólogas são produzidas tanto em organismos procariotos como em eucariotos e, uma vez expressas, podem ser rapidamente purificadas e administradas aos animais em altas concentrações. Isto, somado às novas estratégias de apresentação de antígenos e uma nova geração de adjuvantes, aumenta significativamente o potencial destas subunidades antigênicas de induzirem uma imunidade celular e humoral (Clark et al., 2005).

A bactéria *E. coli* é um importante microorganismo utilizado na expressão de proteínas recombinantes (Makrides et al., 1996). No entanto, em alguns casos, esta metodologia de produção pode apresentar alguns problemas como, por exemplo, a não realização de modificações pós-transducionais, como a glicosilação (Mir, 2004). Além disso, a estimulação do sistema imune pelas proteínas recombinantes pode ser variável já que uma série de fatores pode interferir, tais como, características peculiares do antígeno, formas de apresentação do mesmo ao sistema imune e via de imunização utilizada. Sistemas de expressão de proteínas baseados em *E. coli* ou em leveduras podem gerar uma conformação

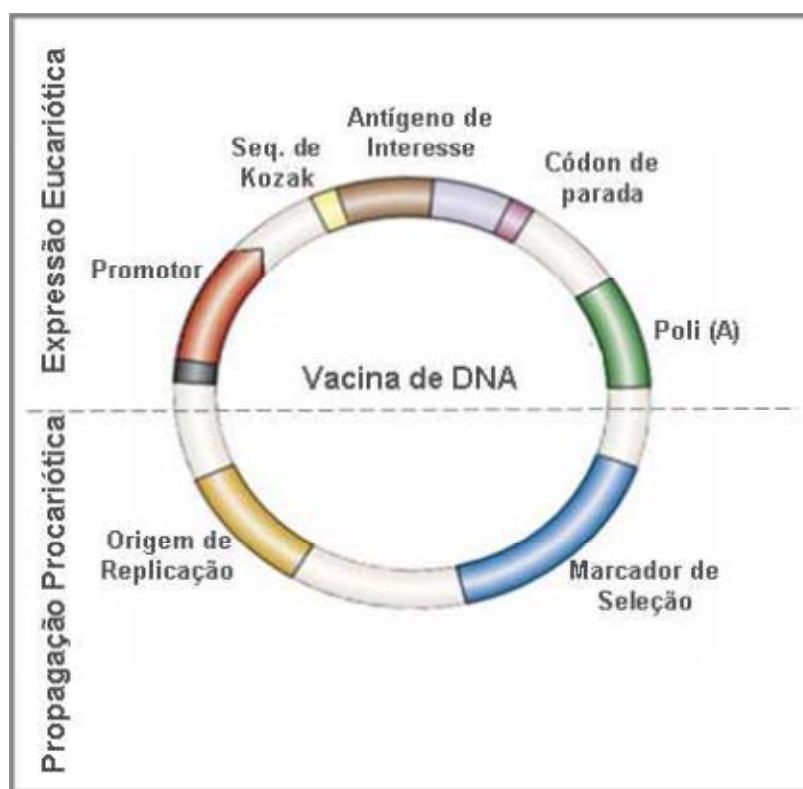
incorreta da proteína, acarretando ausência de epitopos conformacionais requeridos na produção de anticorpos neutralizantes protetores em algumas Infecções (Swartz, 2001). Similarmente, a formação de agregados protéicos (corpúsculos de inclusão), comumente formados devido a níveis muito elevados de expressão, compromete a estrutura tridimensional nativa das proteínas (Swartz, 2001). Por outro lado, níveis baixos de expressão podem estar relacionados com a degradação das proteínas por proteases do hospedeiro, a utilização de códons não preferenciais, toxicidade da proteína recombinante para a célula hospedeira e a ausência de modificações pós-traducionais (Segatori et al., 2005).

### 1.6.3 Vacinas de DNA

Dentre as atuais formulações vacinais, as “vacinas de DNA” são as mais recentes e representam uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas antigênicas ao sistema imune. As vacinas de DNA consistem na administração de vetores plasmídicos contendo o gene de interesse, responsável por codificar o antígeno no hospedeiro (Gurunathan et al., 2000a).

Os primeiros estudos que sugeriram que a injeção de uma vacina de DNA, *in vivo*, poderia levar à expressão do antígeno e à produção da proteína foram realizados por Ito (1960), o qual demonstrou que a injeção de DNA de papilomavírus induzia tumores em coelhos. Resultados semelhantes foram observados por Atanasiu e colaboradores (1962) após a inoculação do DNA de papilomavírus em hamster. No entanto, a primeira evidência na literatura do uso imunológico da molécula de DNA foi publicada em 1992 por Tang e colaboradores. Seus estudos mostraram que a injeção da sequência codificadora do hormônio do crescimento humano na pele de camundongos utilizando a técnica de *gene gun*, foi capaz de aumentar o nível de anticorpos específicos contra este hormônio, sugerindo que o DNA poderia ser utilizado para induzir resposta imune contra Infecções patogênicas. Naquele ano, durante a Reunião Anual de Vacinas no “*Cold Spring Harbor Laboratory*”, pesquisadores deram origem a uma nova era da vacina, com a apresentação de trabalhos reportando o uso de vacinas de DNA para estimulação da resposta imune humoral e celular. Dois trabalhos demonstraram a geração de resposta imune contra o vírus influenza e o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV1) (Ulmer et al., 1993; Wang et al., 1993). Posteriormente,

resultados semelhantes foram obtidos após imunização com DNA contra o vírus herpes bovino (Cox et al., 1993) e contra o vírus da raiva (Xiang et al., 1994). As vacinas de DNA são compostas de vetores plasmidiano que codificam antígenos vacinais. Tais vetores contêm um gene de resistência ao antibiótico controlado por um promotor procarioto, e uma origem procariótica de replicação, permitindo a seleção e a replicação dos plasmídeos em bactérias transformadas, respectivamente. A unidade de transcrição é geralmente composta por um promotor viral forte e constitutivo, que confere um alto nível de expressão do gene de interesse em células eucarióticas pela sequência Kozak e por uma sequência sinal de poliadenilação (Fig. 5).



**Figura 5: Representação esquemática de um plasmídeo para uso como vacina de DNA.**

Na parte superior da figura encontra-se a Região de Expressão Eucariótica, responsável pela expressão do antígeno em células eucarióticas, contendo o promotor que promove a expressão da *Open Read Frame* (ORF) de interesse, a sequência de Kozak e o códon de parada de tradução, e a sequência sinal de poliadenilação (Poli-A) para estabilização do transcrito primário. Na parte inferior encontra-se a Região de Propagação Procariótica, responsável pela

propagação e manutenção do plasmídeo vacinal na célula bacteriana, contendo assim uma origem de replicação procariótica e um marcador de seleção, respectivamente (Adaptado de Kutzler & Weiner, 2008).

Atualmente todos os vetores utilizados para vacina gênica ou terapêutica utilizam origens de replicação teta e a grande maioria destes plasmídeos são derivados de pBR322 ou pUC, com a origem de replicação ColE1 de *Escherichia coli* (Williams et al., 2009). ColE1 é o sistema melhor caracterizado, sendo capaz de manter mais de 20 plasmídeos por célula de *E. coli*, o que resulta em alta produção de DNA plasmidiano em um período relativamente curto (Ingolotti et al., 2010).

Os marcadores de seleção mais utilizados são genes que conferem resistência a antibióticos, sendo também responsáveis pela estabilidade/manutenção do plasmídeo na célula bacteriana (Ingolotti et al., 2010).

No cassete de expressão eucariótica, os promotores virais, tais como o do Citomegalovírus (pCMV), Rous vírus (pRSV), Símio vírus (pSV40), Baculovírus (promotor da polihedrina) e Herpes simplex vírus tipo 1 (promotor da timidina quinase) são frequentemente utilizados para a expressão do transgene ou antígeno de interesse em uma grande variedade de células dos mamíferos (Becker et al., 2008)

A inserção de uma sequência consenso específica presente no mRNA eucarioto, sinalizando o *start codon*, denominada sequência Kozak, é necessária para iniciação da síntese protéica em células eucariotas. Para garantir a terminação correta da proteína, também é importante a inserção de um ou mais *stop codons*, impedindo a leitura incorreta do mRNA, como produtos de alto peso molecular e com conformação incorreta (Kutzler e Weiner, 2008).

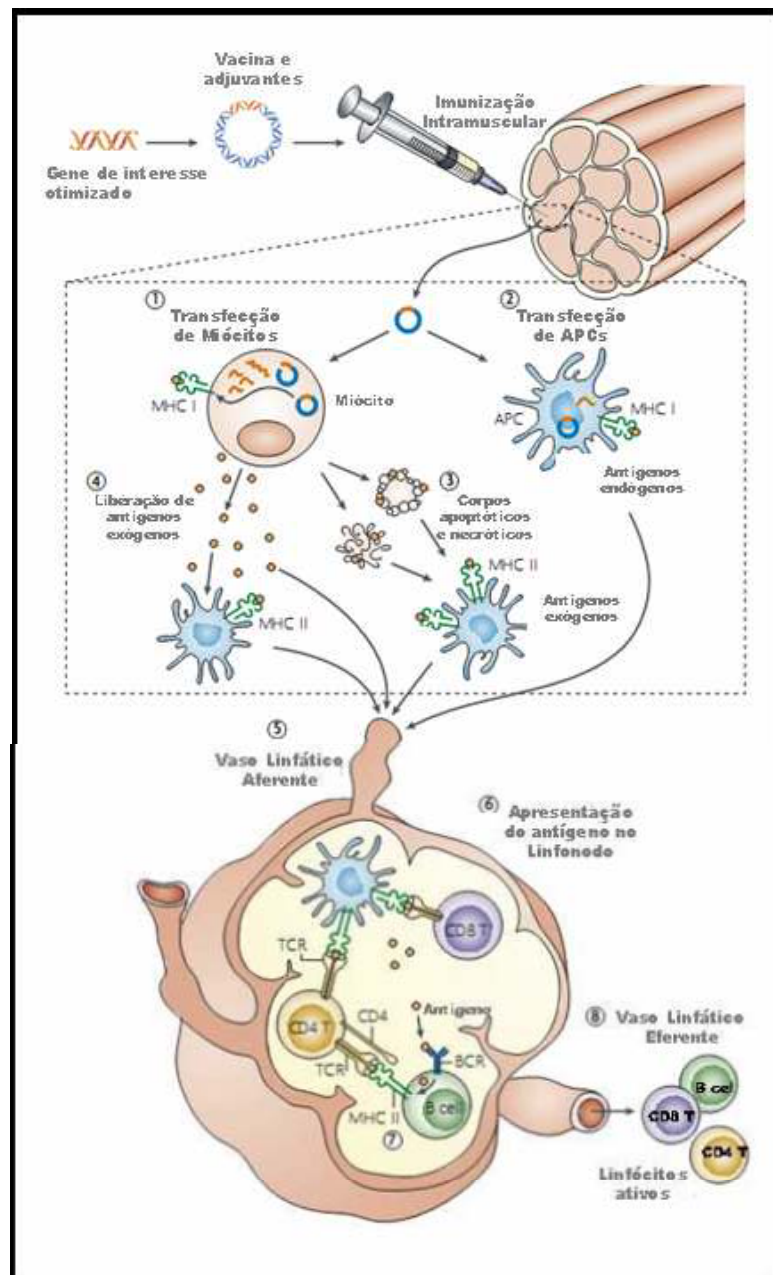
A inclusão de uma sequência sinal de poliadenilação (AAUAAA) junto à extremidade 3' da sequência de interesse é essencial para expressão eucariótica. O sinal de poliadenilação é necessário para correta finalização da transcrição da janela aberta de leitura de interesse, adição da cauda poli-A e exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, desempenhando um papel importante na estabilidade do mRNA (Kutzler e Weiner et al., 2008). A maioria dos

vetores contém o sinal de poliadenilação de SV40 ou do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH). Estudos têm revelado que a sequência sinal de poliadenilação do BGH é até duas vezes mais eficiente que as demais, sendo, por isso, mais utilizada (Xu et al. 2002).

Embora o mecanismo de indução da imunidade por vacinas de DNA ainda permaneça incerto, o lento aumento da resposta imune após a vacinação com DNA sugere que esta siga um caminho complexo que pode mimetizar a infecção natural. Acredita-se que uma vez que o DNA plasmidiano é administrado e internalizado pela célula, estes utilizam a rede de microtúbulos e suas proteínas motoras associadas para o tráfego através do citoplasma para o núcleo (Vaughan & DeGiulio, 2006), e a transcrição do imunogene é iniciada utilizando o maquinário celular do hospedeiro (Kutzler e Weiner, 2008).

Diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas de DNA resultam em uma exibição antigênica via moléculas de MHC I e MHC II, como a infecção natural, ativando linfócitos T CD4+, TCD8+ e a produção de anticorpos. Logo após a imunização, APCs carregadas com o antígeno podem migrar para o linfonodo, ativando linfócitos T via MHC e receptores de células T (TCR), ativando também linfócitos B via receptores de células B (BCRs), induzindo assim a produção de anticorpos (Kutzler e Weiner, 2008)(Figura 6).

Assim, os diferentes tipos de resposta imune induzida pela imunização gênica justificam sua aplicação nos campos das doenças infecciosas, das alergias e dos tumores. Tanto uma resposta tipo Th1 quanto Th2 são induzidas, dependendo da via de entrega da vacina de DNA, podendo ser empregada para controle de infecções intracelulares, como leishmaniose, tuberculose, toxoplasmose, brucelose e listeriose assim como direcionado ao controle de infecções extracelulares, como esquistossomose e outras doenças (Azevedo & Oliveira, 2003).



**Figura 6: Representação esquemática da indução da imunidade celular e humoral por vacinas de DNA.** Após a imunização intramuscular com a vacina de DNA, (1) miócitos e (2) APCs são transfectados. Após a expressão do antígeno de interesse, estes são apresentados ao sistema imune via MHC I. O antígeno pode ainda ser secretado pelos miócitos ou há a formação de corpos apoptóticos/necróticos que irão levar a apresentação antigênica por APCs via MHC II. As APCs migram para o linfonodo e ativam linfócitos T CD4+ e T CD8+. TCR: Receptor de Célula T; BCR: Receptor de Célula B, (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).



#### 1.6.4 Vacinas para esquistossomose

Nos últimos tempos, tentativas de desenvolvimento de vacinas para esquistossomose têm-se revelado uma tarefa difícil por inúmeras razões. Um dos obstáculos para esta dificuldade é a necessidade de compreender os mecanismos da imunidade protetora em humanos. Ainda há um entendimento insuficiente dessa complexa interação entre o hospedeiro humano e o parasito (Siddiqui et al., 2011).

Entretanto, algumas observações dão suporte à ideia de que uma efetiva vacina para este complexo parasito multicelular pode ser desenvolvida, entre elas:

1: A imunização de camundongos com uma dose de cercária irradiada resultou em 50%-70% na redução da carga parasitária, sendo que esta redução pode ser aumentada para acima de 80% caso sejam feitas duas ou três doses da imunização (Smythies et al., 1996);

2: Em modelos de animais não permissivos, tais como ratos e macaco *Reshus*, por exemplo, a eliminação dos vermes está associada a ativação da resposta imune do hospedeiro (Cutts & Wilson, 1997; Wilson et al., 2008);

3: A população humana submetida a exposições seguidas, como os habitantes das áreas endêmicas, invariavelmente, desenvolve algum grau de proteção natural contra o parasito (Hagan et al., 1991; Hagan et al., 1992).

Assim, o desenvolvimento de uma vacina que limita a penetração de cercárias ou a maturação em vermes adultos, que seja capaz de reduzir o número de ovos, de controlar a patologia, e, conseqüentemente a morbidade da doença, é de extrema importância. Mais de 100 antígenos candidatos à vacina já foram identificados, devido principalmente, ao avanço do entendimento da imunidade protetora do hospedeiro, além de uma melhor compreensão da biologia do parasito possibilitada pelos estudos de transcriptoma, genoma e proteoma. Mais de um quarto dos mesmos tem mostrado algum nível de proteção em modelo murino (Siddiqui, 2011). A tabela 1 apresenta alguns dos candidatos à vacina incluindo o(s) estágio(s) de expressão durante o desenvolvimento do *Schistosoma*, nível de proteção e técnica utilizada para sua descoberta.

**Tabela 1: Candidatos vacinais para esquistossomose.**

Antígeno	Estágio de expressão	Nível de proteção	Método de descoberta
Sm TSP-2 *	Esquistossômulo, vermes adultos	57%	Busca de peptídeo sinal
Sm14/SJ14/ FABP	Todos os estágios	> 40%	Soro contra extrato de vermes adultos usado em screening de biblioteca de cDNA
Sm28GST/Sh28GST/SJ28GST *	Todos os estágios	30-50%	Soro contra extrato de vermes adultos usado em screening de biblioteca de cDNA
Sm TSP 1	Esquistossômulos, vermes adultos	34%	Busca de peptídeo sinal
Sm 23	Todos os estágios	30-50%	Anticorpo monoclonal contra extrato de esquistossômulos usados em screening de biblioteca de cDNA
Sm 21.7 *	Esquistossômulos, vermes adultos	41-70%	Não determinado
Sm 28-TPI	Todos os estágios	70%	Anticorpo monoclonal contra extrato de esquistossômulos, peptídeo sequência
Sm-p80	Tegumento verme adulto, esquistossômulos	39% (administrada sozinha) ou 57% quando administrada com IL-12.	Soro contra extrato de vermes adultos usado em screening de biblioteca de cDNA
Sm29 *	Esquistossômulos, vermes adultos	51%	InterProScan; BLAST; SignalIP 3.0; Signal IP neural; WolfpSORT, SOSUI, Compute pI/Mw tool, vacinologia reversa.
Cu/Zn superoxide dismutase *	Vermes adultos	44-60%	Não determinado
ECL (200 kDa protein) *	Vermes adultos	38.1 %	Não determinado
Sm22.6 *	Esquistossômulos, vermes adultos	34.5%	Screening de biblioteca de cDNA
Ciclofilina (Cyp) *	Todos os estágios	17.2%	Screening de biblioteca de cDNA

\* antígenos do tegumento do *Schistosoma mansoni*

Uma subfamília de proteínas que são localizadas predominante no tegumento externo do *S. mansoni* são as tetraspaninas, que possuem quatro domínios transmembrana expressos na superfície de células eucarióticas incluindo células T e B (Levy & Shohan, 2005) e são promissoras como candidatas a vacinas. Uma dessas tetraspaninas, a Sm23, expressa no tegumento do *S. mansoni* (Reynolds et al., 1992) é uma das candidatas à vacina selecionada pela WHO para compor uma vacina de subunidade contra a esquistossomose. A Sm23 é a mais eficiente quando apresentada na forma de DNA e não confere proteção na forma de proteína recombinante quando formulada com alum (Da’Dara et al., 2006). Mais recentemente, o rastreamento de peptídeo sinal em células de mamíferos foi usado como estratégia para a identificação de duas novas tetraspaninas de *S. mansoni*: SmTSP1 e SmTSP2 também expressas no tegumento do *S. mansoni* (Tran et al., 2006). A TPS2 em particular, induz altos níveis de proteção quando usada como vacina recombinante em modelo murino, e ambas as proteínas são reconhecidas por IgG1 e IgG3 de indivíduos resistentes a Infecção pelo *S. mansoni*, mas não pelo soro de indivíduos cronicamente Infectados (Tran MH et al., 2006).

A literatura sobre as tetraspaninas de mamíferos sugere que tais proteínas têm um importante papel na formação de uma rede estrutural para manutenção da integridade da membrana do tegumento do parasito (Levy & Shohan, 2005). Uma vez que foram descritas proteínas do hospedeiro na superfície do parasito, alternativamente, as tetraspaninas poderiam funcionar como receptores para moléculas do hospedeiro (Tran et al., 2006). Em um trabalho realizado por Tran e colaboradores (2010), que utilizou a técnica de RNA de interferência para explorar os papéis da SmTSP-1 e TSP-2 em esquistossômulos e vermes adultos foram observadas mal-formação do tegumento dos vermes adultos quando realizado experimento de cultura *in vitro*. Além disso, o silenciamento de TSP-1 e TSP2 em esquistossômulos os quais foram, posteriormente, injetados via intramuscular em camundongos, resultou na diminuição de até 90% na maturação das larvas em vermes adultos comparado ao grupo controle. Tal trabalho destaca a importância das tetraspaninas na biogênese do tegumento.

Recentemente uma nova proteína do tegumento selecionada a partir de uma biblioteca de cDNA de verme adulto de *S. mansoni* foi identificada por Cardoso e colaboradores (2006) e denominada Sm29. A reatividade de soros de indivíduos de áreas endêmicas para a

esquistossomose à Sm29 recombinante foi avaliada. Anticorpos IgG1 e IgG3 anti-Sm29r foram os isotipos predominantemente identificados no soro de indivíduos naturalmente resistentes à infecção e reinfeção (Cardoso et al., 2006).

Entre as proteínas que estão em fase de testes clínicos encontram-se a Sm14 e Sm28/Sh28 GST. A Sm14 é uma proteína de 14 kDa do *S. mansoni* pertencente à família de proteínas ligadoras de ácido graxos que foi identificada em uma biblioteca de cDNA de verme adulto do *S. mansoni* por soro de camundongos imunizados com extrato salino de vermes adultos (SE) (Moser et al., 1991). Esta proteína é expressa em todos os estágios do parasito presentes no hospedeiro vertebrado (Brito et al., 2002). A forma recombinante desta proteína foi utilizada com sucesso em protocolos de imunização no modelo murino, sendo capaz de induzir uma redução parcial no número de vermes adultos variando de acordo com o adjuvante utilizado, porém, sem nenhum efeito sobre a área do granuloma hepático (Tandler et al., 1996; Ribeiro et al., 2002; Fonseca et al., 2004). Recentemente, a utilização da Sm14 como antígeno vacinal foi aprovada em testes clínicos de fase 1, em voluntários humanos, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e patentado pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz). Como tem potencial multivalente, a vacina já mostrou ser eficaz para fasciolose. A proteína foi construída de forma recombinante e escalonada mantendo sua capacidade de produção em volume industrial comprovada chegando-se a produção do chamado lote semente da vacina para testes clínicos aprovado pela ANVISA (Comunicação/ Instituto Oswaldo Cruz - [www.fiocruz.br/ioc](http://www.fiocruz.br/ioc)).

A Sm28 ou Glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que exerce um importante papel na detoxificação de xenobióticos e funciona como uma proteína ligadora intracelular, ligando-se a uma série de anti-helmínticos, protegendo o parasito do ataque das células imunes do hospedeiro (Mannervik et al., 1985; Brophy & Barret, 1990). A Sm28 foi a princípio isolada de vermes adultos do *S. mansoni*, mas é expressa também na superfície de esquistossômulos, além de ser secretada pelo miracídio dentro do ovo (Balloul et al., 1987; Porchet et al., 1994). A Sm28 demonstrou ser eficiente quando utilizada em protocolos de imunização, reduzindo a carga parasitária, a fecundidade da fêmea e a viabilidade do ovo do parasito (Balloul et al., 1987; Boulanger et al., 1991). A forma nativa da Sm28 é capaz de induzir uma redução de 70% na carga parasitária de camundongos e ratos, e a resposta a esta

proteína em ratos está associada a uma grande produção de IgG2a, capaz de induzir citotoxicidade *in vitro* mediada por eosinófilos (Balloul et al., 1987). No modelo murino, a imunidade protetora induzida pela Sm28 envolve um mecanismo celular no qual a produção de citocinas como o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-6 estão envolvidas nos mecanismos citotóxicos contra o esquistossômulo (Damonville et al., 1988; Pancre et al., 1990). O efeito anti-fecundidade da Sm28 parece estar associado à indução de anticorpos capazes de inibir a atividade enzimática da proteína (Xu et al., 1991). Estudos pré-clínicos tem sido realizados utilizando a Sm28 proveniente de *Schistosoma haematobium*. A forma recombinante da proteína (rSh28GST) foi produzida em leveduras sob boas condições de fabricação. O principal objetivo dos primeiros passos dos ensaios clínicos foi avaliar a segurança de tal proteína em voluntários adultos saudáveis, crianças saudáveis e adultos e crianças previamente infectados com *Schistosoma*. Resultados semelhantes de citotoxicidade em ratos e coelhos foram apresentados: nenhuma reação local ou sistêmica foi observada bem como nenhuma reação cruzada com GST de ratos e humanos (Capron et al., 2005).

ECL ou Sm200 é uma proteína ancorada por GPI (glicosilfosfatidilinositol) e tem sido associada com a eficácia do praziquantel, uma vez que os anticorpos contra a mesma podem restaurar a eficácia da droga em camundongos nocautes para células B (Sauma & Strand, 1990; Brindley et al., 1989). Em camundongos, a vacina de DNA da Sm200 elicitou uma proteção de 38,1%, além disso, a imunização de camundongos com proteínas ancoradas por GPI provenientes do tegumento resultou em uma redução de 43% da carga parasitária (Nascimento et al., 2007; Martins et al., 2012).

A Sm 21.7 é uma proteína do tegumento e foi isolada utilizando biblioteca de cDNA de vermes da cepa egípcia de *Schistosoma mansoni* presentes no fígado. Utilizou-se a técnica de “immunoscreening” com soro de coelhos infectados para a identificação. A proteína Sm21.7 foi testada como vacina recombinante e vacina de DNA. A imunização de camundongos utilizando a proteína recombinante rSm21.7 resultou em uma diminuição de 41% - 70% da carga parasitária, enquanto a vacinação utilizando o DNA reduziu em 41,5% (Ahmed & Romeih, 2001; Romeih et al., 2008).

A expressão da enzima antioxidante Cu/Zn superóxido dismutase é regulada durante o desenvolvimento do parasito. Os maiores níveis de expressão foram encontrados no estágio de verme adulto, sugerindo que as enzimas antioxidantes são importantes na evasão imune dos vermes adultos (Mei H & Lo Verde, 1997). Além disso, ensaios utilizando RNAi demonstraram que a diminuição da expressão dessas enzimas, resultou numa dramática diminuição da sobrevivência do esporocisto (Mourão et al., 2012). Camundongos imunizados com a enzima antioxidante Cu/Zn superóxido dismutase na forma de vacina de DNA apresentaram redução de 44-60% na carga parasitária (Shalaby et al., 2003).

A Smp80 ou Calpaina é expressa no tegumento dos vermes adultos, mais especificamente na membrana interna do tegumento (Braschi & Wilson, 2006) e está envolvida com a renovação da membrana (Siddiqui et al., 1993). Essa proteína tem sido reportada como alvo de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, induzindo morte de esquistossômulos, *in vitro*, por macrófagos peritoneais (Jankovic et al., 1996). Subseqüentes esforços para aumentar a eficácia da vacina têm sido feitos com foco na construção de vacina de DNA para camundongos e babuínos (Siddiqui et al., 2003). Em um experimento com camundongos, a utilização da Sm-p80 na forma de DNA induziu uma redução de 59% da carga parasitária além de uma diminuição de 84% na produção de ovos (Ahmad et al., 2009). Em baboons, a vacina de DNA induziu uma redução de 38% da carga parasitária e 32% de diminuição do número de ovos (Ahmada et al., 2009). Além disso, a transferência passiva de soro de babuínos previamente imunizado com Sm-p80 conferiu uma diminuição da carga parasitária de 31-45% nos animais receptores do soro (Torben et al., 2011).

As ciclofilinas (Cyps) são proteínas extremamente conservadas da família das ubiquinonas. Conhecidas por possuir o domínio peptidil-prolil cis-trans isomerasas (PPIase) é alvo da droga imunossupressora ciclosporina A (Galat et al., 1993; Walsh et al., 1992). Estudos sugerem que a ciclosporina A é uma importante droga anti-parasitária. No caso da esquistossomose, a ciclosporina A é capaz de reduzir a carga parasitária, fecundidade da fêmea e a atividade de hemoglobinas (Bueding et al., 1981). Uma vez que as ciclofilinas são capazes de se ligar às ciclosporina, as ciclofilinas possuem importante papel nos efeitos danosos ao *Schistosoma* provocado pela ciclosporina. Imunizações de camundongos utilizando ciclofilina recombinante de *Schistosoma japonicum* (rSJCyPA) resultou em uma

diminuição estatisticamente significativa da carga parasitária (17,2%) e em 52,7% na redução de ovos presos no fígado (Hongxiao et al., 2012).

Como apresentado na tabela 1, vários níveis de proteção foram observados em modelos animais após utilização de diferentes formulações vacinais. Entretanto, ainda não se conseguiu alcançar o elevado nível de proteção obtido com os modelos de parasitos atenuados pela radiação. Assim, novos candidatos e formulações vacinais ainda precisam ser descobertos.

### **1.7 Tegumento do *Schistosoma mansoni* como alvo vacinal**

Muitos estudos têm revelado que o tegumento do *Schistosoma mansoni* possui papel fundamental na relação parasito-hospedeiro (Fonseca et al., 2012; Abath & Werkhauser, 1996; Han et al., 2009). A cercária é revestida por um tegumento sincicial com uma região citoplasmática anucleada, diretamente subjacente à membrana superficial contínua, com corpos celulares situados mais profundamente no parênquima. Uma membrana plasmática trilaminada sob uma membrana basal também trilaminada formam a superfície externa do tegumento, que é coberta por numerosas fibrilas (glicocálice). O glicocálice é uma molécula complexa formada por oligossacarídeos que atuam, entre outras funções, protegendo a permeabilidade da cercária (Dorsey, 2002).

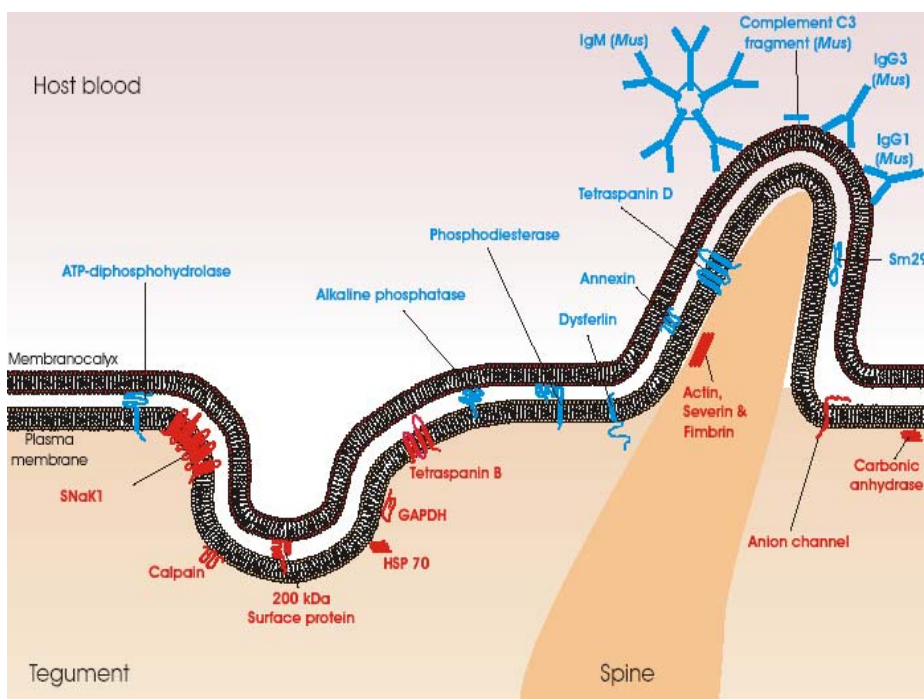
A transformação de cercárias para esquistossômulos é representada por eliminação progressiva do glicocálice, esvaziamento das glândulas secretoras e reorganização do tegumento, com acúmulo de uma proteína transportadora de glicose (SGTP4) na rede de cítons (corpos membranosos) subtegumentares (Skelly & Shoemaker, 2000). Uma consequência da ausência do glicocálice é o aumento da permeabilidade do esquistossômulo à água.

A partir da penetração no hospedeiro vertebrado, o tegumento se torna especializado na absorção e secreção e representa o principal sítio das ações imunológicas do hospedeiro (Jones et al., 2004). Os estudos ultraestruturais dos esquistossômulos recuperados 30 minutos após a passagem pela pele ou mantidos *in vitro* ainda apresentam membrana externa trilaminada, porém menos espessa. As células subtegumentares contêm pequenos corpos

laminares que são transportados para o tegumento por conexões citoplasmáticas. Nos espécimes com 60 minutos, os corpos membranosos se fundem para formar grandes vacúolos com a membrana externa heptalaminada. Com três horas, a maior parte da membrana externa é heptalaminada e o tegumento contém grandes vacúolos, corpos alongados e pequenos corpos membranosos. No esquistossômulo de 24 horas, a principal modificação é a formação de pregas e cavidades na superfície (Mc Laren, 1980; Hockley, 1973). A transição do esquistossômulo pulmonar para o sistema hepático envolve significativas mudanças na topografia da superfície do parasito, além de mudanças fisiológicas. Os esquistossômulos apresentam superfície estriada e pregueada, sem evidências de depressões como nas formas pulmonares. O tegumento tem uma espessura de cerca de 2  $\mu\text{m}$ , sem diferenças entre as formas com duas ou três semanas de idades (Mc Laren, 1980).

O tegumento do verme adulto consiste em um sincício citoplasmático (Mc Laren, 1980, Mc Laren, 1977). O tegumento é ligado na sua superfície basal por uma membrana plasmática convencional invaginada e possui em sua superfície apical uma aparência heptalaminada pouco usual. Esta última estrutura foi interpretada como sendo uma membrana plasmática normal, sobreposta por uma bicamada secretada denominada membranocálice, por analogia com glicocálice das células eucariotas (Braschi & Wilson, 2006). Corpos celulares nucleados estão situados abaixo das camadas musculares, conectados ao tegumento por canais citoplasmáticos alinhados a microtúbulos. A maquinaria de síntese protéica, constituída por ribossomos, retículo endoplasmático e pelo Complexo de Golgi está situada nos corpos celulares. Duas formas de inclusões secretórias, corpos discóides e vesículas multilaminadas, são produzidos nos corpos celulares e se direcionam ao tegumento através das conexões citoplasmáticas. Espículas, pequenas mitocôndrias e uma variedade de outras inclusões estão presentes no citoplasma do tegumento (Fig. 7) (Wilson & Barnes, 1974).





**Figura 7. Representação do tegumento do *Schistosoma mansoni* com antígenos do parasito identificados por estudos proteômicos. (Braschi & Wilson, 2006)**

Os mecanismos de evasão como mimetismo antigênico, modificações da membrana, produção de moléculas imunomodulatórias e modulação da expressão de antígenos de superfície contribuem para a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Por esta razão, os componentes do tegumento são importantes alvos de vacinação. Na tabela 1 os antígenos do tegumento estão representados por um asterisco.

Estudos revelam que o estágio mais susceptível à resposta do sistema imune é o esquistossômulo. Além dos antígenos do tegumento de vermes adultos, o tegumento do esquistossômulo é um alvo importante, já que esse estágio é o primeiro que interage com o sistema imune do hospedeiro ativando as células apresentadoras de antígenos e promovendo a ativação e diferenciação de linfócitos B e T (Teixeira de Melo et al., 2010). Em experimento realizado por Durães e colaboradores (2009) foi demonstrado que o tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* (Smtteg) foi capaz de ativar as células dendríticas a expressar marcadores de ativação CD80 e CD86, além disso, aumentou de forma significativa a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-12 e IFN- $\gamma$ . Ao se utilizar o Smtteg como

antígeno vacinal acrescentado de adjuvantes, o mesmo foi capaz de reduzir de forma significativa a carga parasitária em 43-48% quando administrado com adjuvante de Freund (Teixeira de Melo, 2010) e reduzir de forma significativa a carga parasitária em 43,1% quando administrado com CpG-ODN (Teixeira de Melo 2012). Essa resposta protetora está associada a um perfil de resposta imunológica Th1 com o aumento da produção de anticorpos específicos. Estudos demonstram que os anticorpos estão associados à eliminação do *Schistosoma* pelo hospedeiro (Torben et al., 2011; Dunne et al., 1993). Melo et al. e colaboradores (2014) demonstraram que os anticorpos específicos contra o tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* (Smteg) foram capazes de se ligar à superfície do parasito aumentando consideravelmente a morte dos esquistossômulos pela ativação do complemento. Além disso, nos camundongos que receberam o soro por transferência passiva, houve diminuição estatisticamente significativa da carga parasitária e do número de ovos presos no intestino e fígado.

## **1.8 Adjuvantes**

Adjuvantes são moléculas, componentes ou macromoléculas complexas que aumentam a potência e a longevidade de uma resposta imune específica a um antígeno (Wack & Rappuoli, 2005). A adição de adjuvantes às formulações vacinais aumenta, sustenta e direciona a resposta imunológica reduzindo, assim, a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias (Kenney et al., 2004). Adjuvantes possuem eficácia dependente de uma formulação apropriada. Contudo, tanto os componentes quanto a formulação do adjuvante (ex: óleo e água, tamanho da partícula, etc) são cruciais para o aumento da eficiência de uma vacina (Reed et al., 2009).

Adjuvantes podem promover uma resposta imune através do recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APCs) ao local de vacinação liberando os antígenos para as mesmas as quais, ativadas, além de apresentarem o antígeno, produzem citocinas o que promove a ativação de células T (Mckee et al., 2010). Os adjuvantes podem induzir inflamação local aumentando o contato do antígeno com células adicionais que são atraídas para o local da inoculação, além de promover a liberação lenta de antígeno, prolongando assim sua interação com as células apresentadoras de antígeno (Rush & Flaminio, 2000).

Além disso, podem induzir imunidade de mucosas e aumentar a resposta imunológica em indivíduos imunologicamente imaturos ou senis (Singh et al., 1999). O início da resposta imune é controlado pelas células da imunidade inata juntamente com um grande grupo de receptores intra e extracelulares chamados receptores de reconhecimento padrão. A melhor classe descrita de tais receptores são os denominados Tolls (TLR) responsáveis pelo reconhecimento de várias vias de padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs) expressas por um amplo espectro de agentes infecciosos, adicionalmente existem outros receptores tais como NOD-Like (NLRs que estão relacionados à estímulos microbianos e NALP3, um membro da família NLR e que está relacionado à formação de IFN $\lambda$  que regula a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 (Sutterwala et al., 2006; Rimaniol et al., 2004; Li et al., 2007). Avanços nos estudos do sistema imune inato têm revelado que muitos adjuvantes agem através de receptores tais como Toll-Like, NOD-Like, RIG-I-Like, C-Type Lectinas ativando as células dendríticas a apresentarem os antígenos para as células T (Kim et al., 2011; Van Duim et al., 2006).

O hidróxido de alumínio (Alum) tem sido comumente utilizado como adjuvante apesar de sua forma de ação só agora estar sendo esclarecida (Marrack et al., 1996; Spreacific et al., 2010; McKee et al., 2010). Dentre os adjuvantes, esta formulação tem sido utilizada em vários tipos de vacinas humanas como: tétano, difteria, hepatite B, dentre outras e vacinas veterinárias como: vacinas para febre efêmera, Haemophilus e encefalite japonesa. Muitos estudos têm evidenciado a neurotoxicidade de compostos de alumínio e relacionam os mesmos às doenças como Alzheimer e encefalopatias (Goto et al., 1993). Este adjuvante induz o aumento na migração macrófagica e neutrofílica para o sítio de inoculação, o que pode explicar o eritema, nódulos subcutâneos, hipersensibilidade de contato e Inflamação granulomatosa, efeitos colaterais, associados ao uso do hidróxido de alumínio. Estudos revelam que, o Alum direciona a resposta imunológica para um perfil Th2. Em relação à resposta humoral, o Alum induz uma maior produção de IgG1 e IgE. (El-Ridi et al., 2009; Mosmann & Sad, 1996).

O MF59 é um adjuvante licenciado para humanos desde 2000 na Europa. Este foi o primeiro adjuvante a ser utilizado em uso humano depois do Alum. O MF59 é uma emulsão de óleo em água contendo esqualeno, Tween-80 e outros componentes. Embora os

mecanismos de ação exatos desse adjuvante não sejam conhecidos, parece que ele atua na ativação de células apresentadoras de antígenos. Extensos dados clínicos demonstram que o MF59 aumenta fortemente a resposta imunológica induzida pela vacina contra a gripe em indivíduos idosos (OMS, 2001).

Monofosfolípideo A (MPL), derivado do LPS de salmonela, é um promissor adjuvante estimulante de uma resposta imunológica tipo Th1. MPL é formulado como uma emulsão estável para injeção chamada MPL-SE, capaz de interagir com o TLR-4 (OMS, 2001). O MPL foi aprovado para o uso na vacina contra o papilomavírus juntamente com o Alum (Mckee et al., 2010).

O adjuvante completo de Freund (CFA) é uma suspensão de componentes da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo mineral e um agente emulsionante. É preparado de acordo com a técnica de Freund que utiliza *M. tuberculosis* H37 Ra ao invés de *M. butyricum*. O adjuvante incompleto de Freund (IFA) é similar ao adjuvante completo, sem a adição do *M. tuberculosis* (Billiau & Matthys, 2001). A adição de micobactéria a este adjuvante provoca o aumento da resposta imune aos antígenos, particularmente aos antígenos solúveis. Um componente essencial desta resposta é a reação inflamatória intensa no local de deposição do antígeno resultando em um influxo de leucócitos e sua interação com o antígeno. O CFA pode resultar em reações granulomatosas no local da injeção quando usado de forma abusiva e também pode causar efeitos colaterais, como inflamação crônica, ulceração da pele, abscesso local, febre e dor (Broderson et al., 1989). A administração de CFA/ IFA como adjuvante associada a vários antígeno do *S. mansoni* induz uma resposta protetora contra a esquistossomose com perfil Th1 associada com alta produção de citocinas inflamatórias como IFN-gama e TNF-alfa, bem como de anticorpos do isotipo IgG e IgG2c (Cardoso, et al., 2008, Fonseca et al., 2004, Pacífico et al., 2006b; Teixeira de Melo et al., 2010). Entretanto, pelo seu exacerbado efeito inflamatório, o adjuvante de Freund não é licenciado para utilização em humanos (Chu et al., 1997).

Recentes descobertas demonstraram que certas preparações de DNA possuem efeito na produção de citocinas pelas células do sistema imune. *In vitro*, DNA bacteriano induz a expressão de IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos que não são induzidas por DNA de mamíferos

(Chace et al., 1997; Stacey et al., 1996). Além disso, o DNA bacteriano induz a ativação de células NK com expressiva produção de IFN- $\gamma$ , esta produção é dirigida pela IL-12 anteriormente produzida por macrófagos em resposta ao DNA bacteriano (Chace et al., 1997; Halperin et al., 1996, Yamamoto et al., 1992; Ballas et al., 1996). A fim de definir os componentes do DNA bacteriano que possuem efeito imunomodulatório, um painel de Oligodeoxinucleotídeos (ODN) sintéticos foi usado para a posterior identificação das sequências de pares de seis bases específicas as quais conferiam esta atividade (Krieg et al., 1995). Estas sequências chamadas de motivos de CpG, contendo um dinucleotídeo central não metilado preferencialmente flanqueado por 5`purinas e 3`pirimidinas. Os dinucleotídeos CpG estão presentes no DNA bacteriano na proporção 1/16 bases, estando presente em uma proporção 3 a 4 vezes menor em DNA de mamíferos, fenômeno conhecido como supressão de CpG (Bird et al., 1986). Além disso, a citosina do CpG de mamíferos é altamente metilada, sendo que essa metilação não é encontrada no DNA bacteriano (Bird et al., 1986).

Ao se utilizar CpG-ODN em cultura de esplenócitos, observou-se um perfil de resposta Th1 associada à produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 e nenhuma produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Isto sugere que a administração de CpG-ODN, *in vivo*, induz uma resposta imune do tipo Th1. Adicionalmente, vacina com DNA plasmidiano bacteriano, o qual continha motivos de CpG, levou a ativação de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, mas não IL-4<sup>+</sup> ou IL-5<sup>+</sup> (Sato et al., 1996; Raz et al. 1996). Devido a atividade imunoestimulatória do CpG-ODN envolvendo receptores do tipo Toll, mais especificamente o TLR-9, o mesmo vem sendo utilizado como adjuvante em formulações vacinais (Kim et al., 2011). Uma vez observado este perfil de resposta imune Th1 induzido pelo CpG-ODN, este composto vem sendo utilizado em vacinas para patógenos intracelulares (Krieg et al., 1998) bem como para testes de vacinas contra o *Schistosoma mansoni*, uma vez que é bem demonstrado pela literatura que o perfil Th1 é protetor levando a redução da carga parasitária em modelo murino (Teixeira de Melo et al., 2012; Sparwasser et al., 1998, Yamamoto et al., 1992)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil imunológico e mecanismos protetores induzido pela imunização com uma preparação antigênica do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* (Smteg) em um antígeno recombinante identificado nesta preparação.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificar padrões imunológicos associados à redução da carga parasitária induzida pela imunização com antígenos do tegumento de esquistossômulo do *S. mansoni*, através da avaliação da resposta protetora induzida pelo Smteg na presença de diferentes formulações adjuvantes.
2. Avaliar o papel dos anticorpos específicos contra os antígenos do Smteg na eliminação do parasito por ensaios de citotoxicidade *in vitro* e transferência de anticorpos *in vivo*.
3. Identificar antígenos imunogênicos do tegumento de esquistossômulos do *S. mansoni* por *Western-blotting* bidimensional seguido por espectrometria de massas;
4. Avaliar a capacidade do antígeno SmCyp, identificado por imunoproteômica, de induzir imunidade protetora contra o *S. mansoni* em protocolo de imunização gênica em camundongos através da determinação do número de vermes recuperados por perfusão do sistema porta, número de ovos nas fezes, fígado e intestino.
5. Avaliar o perfil de resposta imune humoral e celular induzida pelas imunizações através da detecção de anticorpos IgG, IgG1, IgG2c específicos, avaliação do perfil celular e quantificação de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2e IL-17 no sobrenadante de cultura de esplenócitos e por marcação intracitoplasmática de linfócitos.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Obtenção de antígeno Smtæg**

O ciclo de vida da cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) do *S. mansoni* tem sido mantido pela passagem em caramujos *Biomphalaria glabrata*, hamsters e camundongos Swiss ou Balb/c. As cercárias foram obtidas no moluscário do Centro de Pesquisa René Rachou e transformadas mecanicamente em esquistossômulos através da técnica descrita por Ramalho-Pinto e colaboradores (1974). Resumidamente, as cercárias foram deixadas no gelo durante 30 minutos, acondicionadas em tubos cônicos, para reduzir a sua movimentação. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 1800 x g por 3 minutos. O “pellet” então foi ressuspensionado em 1mL de meio Earl’s salts plus lactoalbumin hydrolysate (ELAC) gelado. As caudas foram quebradas utilizando-se o vórtex na velocidade máxima (Genie 2- Scientific industries-USA) por um período de dois minutos. Posteriormente as caudas foram retiradas do meio através de repetidas lavagens com ELAC à 37°C restando, então, os esquistossômulos. Estes foram incubados por 90 minutos no banho-maria a 37° C.

Após a incubação, os esquistossômulos foram lavados com 5 mL de salina apirogênica e centrifugados a 200 x g por 1 minuto. Para a remoção do tegumento dos esquistossômulos (Smtæg), foram acrescentados 2mL de CaCl<sub>2</sub>0,3M, e as larvas foram agitadas no vórtex no canal 3 por um período de 7 minutos e centrifugados a 200 x g por 1 minuto por duas vezes. O sobrenadante, contendo o tegumento, foi coletado e posteriormente, centrifugado a 50000 x g durante uma hora a 4°C. O pellet enriquecido com membranas foi submetido à diálise contra 6 litros de salina 1,7% com duas trocas sendo que na última troca foi utilizada salina 0,9%. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford , 1976).

#### **3.2 Protocolo de imunização com diferentes formulações vacinais**

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram separados para a vacinação, sendo que os mesmos foram divididos em grupos de 10 camundongos cada. Um grupo controle da Infecção foi utilizado para avaliar a qualidade da Infecção, os grupos não vacinados inoculados apenas com salina sem adjuvante (Salina), ou Salina + alum (Salina+ alum) ou salina + alum + 50ug de CpG-ODN 1826 (Salina + alum + CpG-ODN). Os grupos experimentais consistiram de

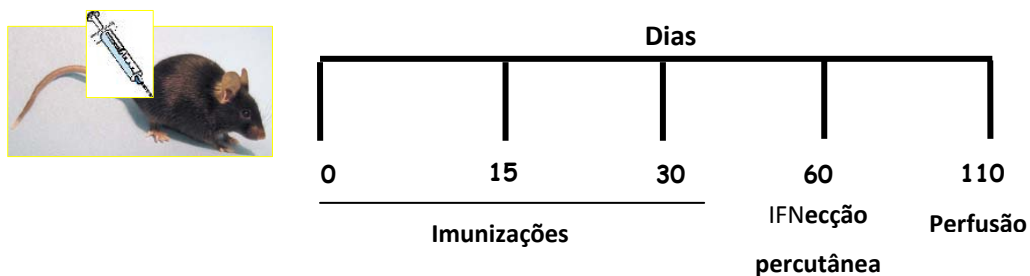
camundongos imunizados com 25µg Smtteg diluído em salina na ausência de adjuvantes (Smtteg), na presença de alum (Smtteg + alum) ou na presença de alum + 50ug de CpG-ODN (Smtteg + alum +CpG-ODN). As formulações vacinais estão representadas na tabela 2.

**Tabela 2: Grupos de camundongos imunizados com PBS e/ou Smtteg na presença e na ausência de adjuvante**

<b>Grupos</b>	<b>Salina</b>	<b>Smtteg</b>	<b>Alum</b>	<b>CpG-ODN</b>
Salina	200µL/cdg	–	–	–
Smtteg	–	25µg/cdg	–	–
Salina + alum	100µL/cdg	–	100µL/cdg	–
Smtteg + alum	–	25µg/cdg	100µL/cdg	–
Salina + alum + CpG-ODN	100µL/cdg	–	100µL/cdg	50µg/cdg
Smtteg + alum + CpG-ODN	–	25µg/cdg	100µL/cdg	50µg/cdg
Controle da infecção	–	–	–	–

A imunização foi realizada por via subcutânea, em três doses com intervalos de 15 dias entre elas. Trinta dias após a terceira dose, os camundongos foram Infectados com 100 cercárias por via percutânea. Após 50 dias, os animais foram eutanasiados e perfundidos pela veia porta (Pellegrino & Siqueira, 1956). O fígado e o intestino de cada animal foram retirados para determinação do número de ovos do parasito. Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital dos camundongos para obtenção do soro de 15 em 15 dias a partir de 15 dias após a primeira dose da vacina. A figura 8 abaixo ilustra o esquema de imunização (Figura 8). Foram realizados 3 ensaios de imunização independentes para cada formulação vacinal.

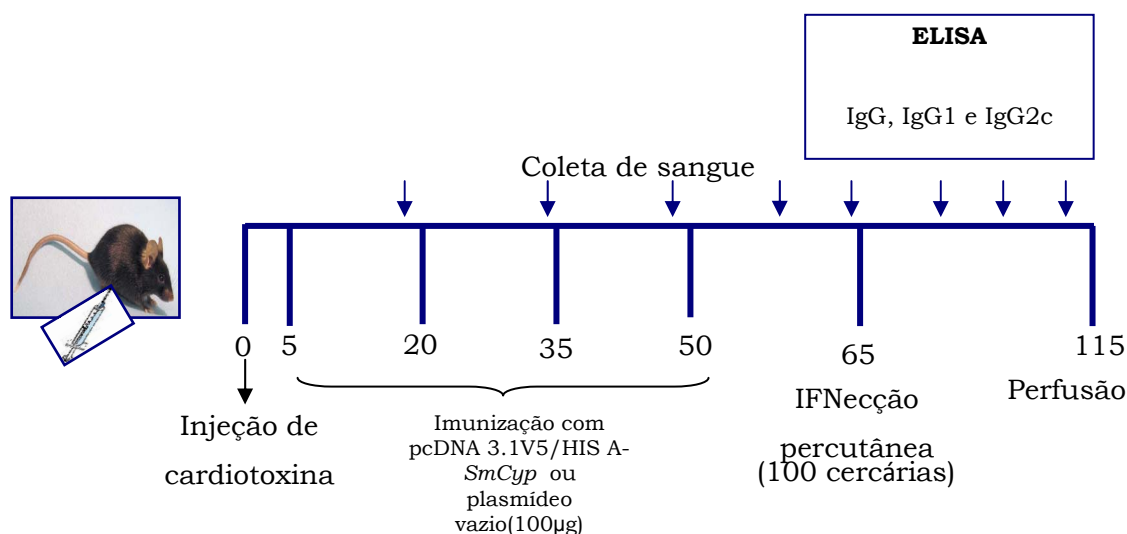




**Figura 8: Protocolo de imunização.** A primeira dose da imunização foi realizada no dia 0, a segunda e a terceira doses foram realizadas com um intervalo de quinze dias. Trinta dias após a terceira dose, a Infecção percutânea foi realizada utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo e, cinquenta dias após a Infecção a perfusão do sistema porta hepático foi realizada.

### 3.3 Protocolo de imunização gênica

Trinta camundongos C57BL/6 fêmeas foram separados para a vacinação, sendo que os mesmos foram divididos em três grupos de 10 camundongos cada. Um grupo controle da Infecção, outro inoculado com plasmídeo pcDNA 3.1V5/HIS.A vazio, e um grupo vacinado com o pcDNA3.1.V5/HIS.A contendo o inserto do gene *SmCyp*. Cinco dias antes da primeira dose da vacinação aplicou-se 100µL/camundongo de cadiotoxina 1X (0,06mg/mL), sendo 50µL no músculo da coxa de cada pata traseira do animal. O protocolo de imunização gênica consistiu de 4 doses de 100µg de DNA/camundongo por via intramuscular, sendo 50 µg no músculo da coxa de cada perna, com intervalo de 15 dias entre as doses. Quinze dias após a quarta dose, os camundongos foram Infectados com 100 cercárias por via percutânea. Cinquenta dias após a Infecção, os animais foram sacrificados e perfundidos pela veia porta (Pellegrino & Siqueira, 1956). Fragmentos do fígado foram retirados para análise histopatológica, fígado e intestino foram retirados para contagem do número de ovos. Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital dos camundongos para obtenção do soro de 15 em 15 dias a partir de 15 dias após a primeira dose da vacina. A figura 09 abaixo ilustra o esquema de imunização.



**Figura 09: Protocolo de imunização gênica.** Realizou-se a injeção de cardiotoxina cinco dias antes da primeira dose de imunização. A primeira dose da imunização foi realizada no dia 5, no qual camundongos foram imunizados com DNA 100µg contendo o inserto ou plasmídeo vazio. A segunda, a terceira e a quarta doses foram realizadas com um intervalo de quinze dias utilizando as mesmas formulações anteriores. Quinze dias após a quarta dose, a Infecção percutânea foi realizada utilizando 100 cercárias da cepa LE por camundongo e, cinquenta dias após a Infecção foi realizada a perfusão do sistema porta hepático.

### 3.4 Dosagens de anticorpos

Análise de anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2c foi realizada pelo método de ELISA. Placas de microensaio de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com 1 µg/mL de Smtcg ou 1µg/mL de peptídeo sintético (imunização gênica) em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 por 12 a 16 horas à 4°C. As placas foram então bloqueadas por 20 horas à 4°C com 300µL por poço de PBST<sub>20</sub> (phosphate-buffered saline e0,05% de Tween 20) acrescentado a 10% de SFB (soro fetal bovino). Cem microlitros de soros diluídos em PBST<sub>20</sub> nas seguintes concentrações: 1:100 (para IgG e IgG1) e 1:200 (para IgG2c) e 1:50 (para IgG-imunização gênica), foram adicionados por poço em duplicata nas placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Cem microlitros por poço de anti-IgG (Southern Biotech), anti-IgG1 (Southern Biotech), anti-IgG2c (Southern Biotech) conjugados à peroxidase foram

diluídos em PBST<sub>20</sub>, respectivamente, a 1: 5000, 1:20000, 1:4000, 1:10000 (anti-IgG Imunização Gênica) e adicionados à placa. A reação de cor foi desencadeada pela adição de 100µL/ poço do substrato (TMB- Tetramethylbenzidine) e parada com 50µL/ poço de 5% de ácido sulfúrico. As placas foram lidas a 450 nm em um leitor de microplacas.

### **3.5 Exame Parasitológico HPJ (Hoffman, Pons e Janner)**

Três amostras de fezes frescas colhidas nos dias 48, 49 e 50 após a Infecção (0,5g de fezes por grupo) foram colocadas em um cálice contendo água desclorada e formol 10%. As fezes foram trituradas com o auxílio de um bastonete de alumínio e filtradas em uma gaze dobrada 4 vezes. A suspensão de fezes foi deixada no cálice com água desclorada e formol 10% por uma hora para sedimentação espontânea dos ovos. Após este período, o sobrenadante foi descartado e uma nova etapa de sedimentação espontânea foi realizada. Todo o sedimento contendo os ovos foi avaliado em microscópio de luz para determinação do número de ovos por grama de fezes.

### **3.6 Recuperação de vermes adultos**

Camundongos C57BL/6 foram desafiados 30 dias após a terceira imunização para as formulações vacinais contendo salina/Smteg/CpG-ODN e 15 dias após a quarta imunização com DNApela exposição percutânea da pele do abdômen com 100 cercárias da cepa LE. Cinquenta dias após o desafio, vermes adultos foram recuperados do sistema porta-hepático por perfusão das veias mesentéricas (Pellegrino & Siqueira, 1956). Os níveis de proteção foram calculados comparando o número de vermes recuperados no grupo imunizado com o grupo não imunizado, através da seguinte fórmula:

$$NP = \frac{CRGNI - CRGI}{CRGNI} \times 100$$

CRGNI

Onde: NP: nível de proteção; CRGNI: carga recuperada do grupo não imunizado e CRGI: carga recuperada do grupo imunizado

### **3.7 Oograma**

Após a perfusão para recuperação dos vermes adultos, um fragmento do intestino (íleo terminal) de cada animal foi removido para análise dos estádios de desenvolvimento dos ovos. Esses fragmentos foram colocados entre lâmina de vidro e uma lamínula de plástico. A preparação foi pressionada em uma prensa de ferro. As lâminas então foram levadas ao microscópio a fim de se verificar a presença e determinar os estádios de desenvolvimento dos ovos em cada grupo. Os estádios foram divididos em: primeiro, segundo, terceiro e quarto estádios, ovos maduros e ovos mortos.

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

Seções do fígado de cada camundongo dos grupos controle e experimental foram coletados 50 dias após a Infecção para avaliar os efeitos da imunização na formação do granuloma. Esses fragmentos do fígado foram fixados em formol 10%. Cortes histológicos foram feitos com o auxílio de um micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Imagens dos granulomas foram capturadas através de uma câmera acoplada em um microscópio e analisadas no software KS300 do Laboratório de Patologia do ICB - UFMG. Para realizar as medidas da área dos granulomas, imagens de 100 granulomas/ grupo que se encontravam no estágio exudativo-produtivo e que continham apenas um ovo com miracídio vivo foram capturadas utilizando o microscópio na objetiva de 10X através da microcâmera JVC TK-1270/RGB. Utilizando um cursor digital, a circunferência total do granuloma foi delimitada e, posteriormente, analisada no software KS300. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ . Para determinar o número de granulomas por área, o número total de granulomas por lâmina foi contado em um microscópio na objetiva de 10X. Todas as lâminas foram escaneadas e a área de corte foi determinada utilizando o software KS300. Os resultados foram expressos em ovos/ $\text{mm}^2$ .

### **3.9 Contagem do número de ovos do intestino e fígado**

Durante a perfusão, o fígado e o intestino de cada camundongo foram retirados. Esses órgãos foram pesados, acondicionados em béqueres com KOH10% onde foram mantidos por cerca de 16 horas. Em seguida a solução foi incubada à 37° por 30 min a em banho-maria. Os

órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 900 x g e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso com salina 0,85%. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Depois da última centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 1mL de salina 0,85% e o número de ovos presentes em uma amostra de 10 µL da solução foi contado em microscópio de luz. Foram realizadas 3 contagens para cada amostra.

### **3.10 Avaliação da imunidade celular induzida pelas formulações vacinais**

Camundongos (5 por grupo) foram submetidos aos protocolos de imunizações descritos anteriormente e uma semana após a última dose, os animais foram eutanasiados para retirada do baço. Este órgão foi macerado, as hemácias foram lisadas e os esplenócitos foram lavados com salina e ajustados para  $1 \times 10^6$  células por poço. Para a análise de citocinas, os esplenócitos foram mantidos em cultura à 37°C 5% CO<sub>2</sub> em meio (RPMI); na presença de meio, mitógeno Concanavalina A (5µg/mL), Smtg (25µg/mL), SmCyp (94-108), SmCyp (107-121), estes dois últimos estímulos foram utilizados para cultura de esplenócitos provenientes de camundongos submetidos à imunização gênica. A detecção de citocinas no sobrenadante de cultura foi realizada por ELISA sanduíche utilizando os Kits duoset (R&D system) ou Ready set GO (e-bioscience) ou por Cytometric Bead Array (CBA), utilizando o Kit anti-mouse Th1,Th2,Th17 (BD Bioscience, USA) conforme instruções do fabricante.

Para dosagem de citocinas intracitoplasmáticas,  $0,5 \times 10^6$  esplenócitos foram mantidos em cultura à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio (RPMI) na presença de mitógeno (ConA-5µg/mL) ou antígenos por 18 horas. A secreção de citocinas foi interrompida pela adição de brefeldina A (1µg/mL) à cultura nas 4 últimas horas de cultura. Após este período as células foram centrifugadas e os receptores Fc foram bloqueados pela adição de anticorpo anti-CD16/CD32 de camundongo (BD-bioscience). As células foram então lavadas, centrifugadas a 387 x g por 7 minutos e marcadas com anticorpo anti-CD4 de camundongo ou anti-CD8 de camundongo e seus controles de isotipo por 15 minutos à 4°C. Após marcação de superfície, as células foram lavadas, fixadas com formaldeído a 2% por 30 minutos à temperatura ambiente e permeabilizadas com uma solução de saponina 0,5% por 10 minutos à temperatura ambiente. Após permeabilização da membrana plasmática, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti IFN-γ, anti IL-10, anti-TNF-α e anti IL-4 (e seus controles de isotipo por 30

minutos à temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, as células foram fixadas e a aquisição dos dados (30000 eventos dentro do gate de linfócitos) foi realizada no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree star, Ashland).

Para o ensaio de marcação *ex vivo*, células do baço provenientes de 4 camundongos/grupo foram ajustadas para  $5 \times 10^5$  células por poço. Antes da marcação, estas células foram bloqueadas com anti-mouse CD16/CD32 mAbs (Fc-Block, BD bioscience). As superfícies dessas células foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-F4/80, anti-CD86, anti-IaB, anti-CD25 e anti-CD69, anti-CD44, anti-CD62, anti-CD27 e seus respectivos controle de isotipo por 20 minutos a 4°C. Após este tempo as células foram lavadas com PBS 0,15M, 0,5%BSA, 2mM NaNO<sub>3</sub> e submetidas a incubação com uma solução de estreptavidina-Percp ou estreptavidina-APC-Cy7 (e-bioscience) na diluição 1:200 a 4°C por 20 minutos. As células foram, então, lavadas e fixadas com formaldeído. A aquisição dos dados foi obtida utilizando FACS Calibur (Becton Dickinson) ou LSR Fortessa (Becton Dickinson, San José, CA) para as análises referentes a cultura de células provenientes da imunização com DNA. Os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree star, Ashland).

### **3.11 Detecção de anticorpos específicos na superfície de esquistossômulos**

Cercárias foram transformadas mecanicamente em esquistossômulos utilizando o meio de cultura Glasgow segundo a técnica de Ramalho Pinto e colaboradores (1974) com algumas modificações. Os esquistossômulos foram incubados por 90 minutos em banho maria à 37°C para que ocorresse a transformação morfofisiológica. Após esse processo, os esquistossômulos foram acondicionados em tubos eppendorfs de 1,5mL e lavados com DMEM sem soro fetal bovino através da centrifugação a 1800 x g por 5 minutos, repetiu-se este procedimento por três vezes. Os esquistossômulos foram fixados em PBS + 1% de formaldeído por 1h à 4 °C. Após este período os esquistossômulos foram lavados em PBS como descrito anteriormente por três vezes. Os esquistossômulos foram incubados em RPMI por 30 minutos, lavados e incubados em PBS + BSA 1% por 30 minutos, e novamente lavados e incubados com soro de camundongos inoculados com salina + CFA/IFA ou

imunizados Smtg + CFA/IFA conforme descrito em Teixeira de Melo (2010) na proporção de 1:100 *overnight* sob agitação. Após este processo, os esquistossômulos foram lavados com PBS + BSA 1% por 3 vezes como descrito anteriormente, incubados com RPMI por 30 minutos, lavados e incubados em PBS + BSA 1% por 30 minutos. Incubou-se então os esquistossômulos com anti-soro secundário fluorescente (anti-IgG conjugado a FITC) (Sigma) por 2h a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este tempo os esquistossômulos foram lavados com PBS por centrifugação a 1800 x g por 5 minutos por 3 vezes. Três lâminas foram montadas: esquistossômulos apenas fixados e lavados; esquistossômulos sem passar pelo anticorpo primário (soros de camundongos); esquistossômulos incubados com soros de camundongos e anticorpo secundário fluorescente utilizando do *antifading mowiol* para preservar a fluorescência. A ligação dos anticorpos aos esquistossômulos foi avaliada por microscopia de fluorescência. A intensidade média de fluorescência foi determinada por análise da imagem dos esquistossômulos pelo software ImageJ.

### 3.12 Ensaio de citotoxicidade

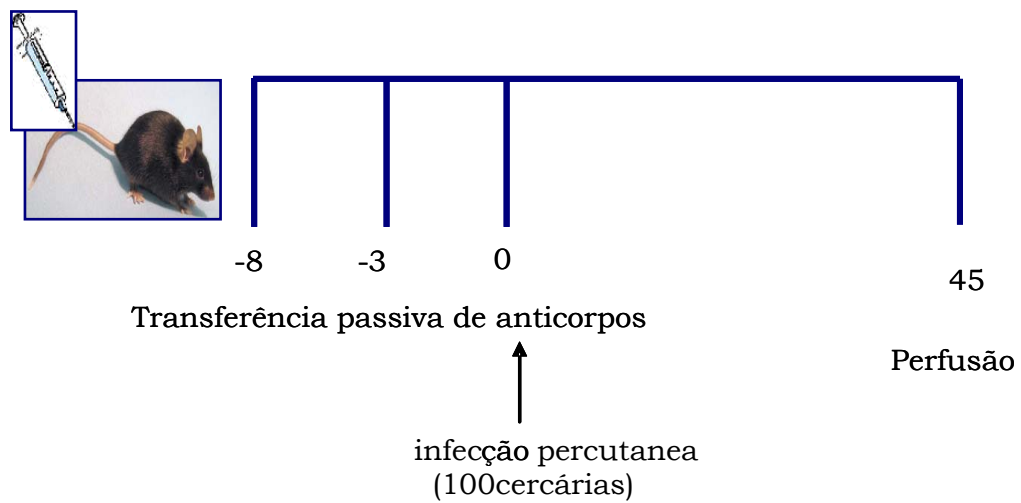
Cercárias foram transformadas mecanicamente em esquistossômulos utilizando o meio de cultura Glasgow conforme descrito no item 3.9. Cinquenta esquistossômulos/poço em 100µL de meio de cultura Glasgow suplementado com 10% de soro fetal bovino foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços de fundo chato. Foi acrescentado em cada poço: soro inativado de camundongos inoculados com salina + CFA/IFA, soro inativado de camundongos imunizados com Smtg + CFA/IFA na diluição 1:10. A placa de cultura foi levada à estufa por 30 minutos à 37°C–5%CO<sub>2</sub>. Após esse período, foi acrescentado em cada poço complemento (Guinea pig- Sigma) ativo ou inativado na diluição 1:10, de forma que se tivesse todas as combinações possíveis para a análise do envolvimento do sistema do complemento na morte do esquistossômulos. Incubou-se esta placa por 16h em estufa à 37°C–5%CO<sub>2</sub>. Após este período, acrescentou-se 5 µL/poço das sondas fluorescentes *acridine orange* [0,3 mg/mL] (marcação de células viáveis) e brometo de etídio [1mg/mL] (marcação de células mortas). A placa foi mantida por 20 minutos em estufa à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Após este tempo, centrifugou-se a placa a 1800 x g por 5 minutos retirando metade do meio de cultura (50µL/poço) e acrescentando a mesma quantidade do meio Glasgow a 37°C antes da próxima

centrifugação. Repetiu-se este procedimento por três vezes. A viabilidade dos esquistossômulos foi observada por microscopia de fluorescência através de três contagens de 20 µL/poço.

### **3.13 Transferência passiva de anticorpos**

Soro de camundongos inoculados com PBS + CFA/IFA ou Smtg + CFA/IFA conforme descrito por Teixeira de Melo e colaboradores (2010) foram coletados 30 dias após a última imunização e inativados para serem utilizados nos protocolos de transferência de anticorpos. Após a obtenção do soro, 45 camundongos C57BL/6 fêmeas foram utilizados no ensaio de transferência passiva de anticorpos, sendo que os mesmos foram divididos em três grupos de 15 camundongos cada. Um grupo controle da Infecção, um grupo que recebeu soro de camundongos inoculados com PBS CFA/IFA (grupo PBS) e um grupo que recebeu soro de camundongos imunizados com Smtg + CFA/IFA (grupo Smtg). Os camundongos receberam três doses de 200µL de soro por via intravenosa através da veia da cauda, sendo a primeira 8 dias antes da Infecção, a segunda 3 dias antes da Infecção e a terceira no mesmo dia em que foi realizada a Infecção percutânea desses animais com 100 cercárias/camundongo. Quarenta e cinco dias após Infecção, os camundongos foram perfundidos (Pelegriño & Siqueira, 1956) para a recuperação de vermes e tiveram fígado e intestino coletados para a contagem do número de ovos (Figura 10).





**Figura 10: Transferência passiva de anticorpos.** Os camundongos dos grupos controle da Infecção, PBS e Smtteg receberam três doses (200 microlitros) de soro por via intravenosa através da veia da cauda, sendo a primeira no dia -8, a segunda no dia -3 e a terceira no dia 0. Neste mesmo dia, foi realizada a Infecção percutânea desses animais com 100 cercárias/camundongo e 45 dias após Infecção, os camundongos foram perfundidos (Pelegriño & Siqueira, 1956) para a recuperação de vermes.

### 3.14 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

#### 3.14.1 Primeira dimensão - Focalização Isoelétrica

Antes de realizar a separação das proteínas por eletroforese uni ou bidimensional, o extrato protéico bruto (Smtteg) foi precipitado com acetona. Para isso, a cada 400 $\mu$ L da amostra (1,6 $\mu$ g/ $\mu$ L) foram adicionados 1,6mL de acetona (Merck) gelada, sendo esta solução mantida à -20°C por cerca de 16 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada por 15 minutos à 4°C, 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 200  $\mu$ L de tampão de rehidratação IEF incompleto (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%).

Após serem dosadas pelo método de Bradford, as proteínas do tegumento de esquistossômulos foram separadas, primeiramente, por eletroforese unidimensional para

avaliar a qualidade dos extratos obtidos. Para isso, 1, 3 e 5µg de proteínas foram submetidos à separação eletroforética em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado por Nitrato de Prata.

Os mesmos extratos protéicos foram utilizados para a separação das proteínas na primeira dimensão por focalização isoeletrica. Para tal, ao volume equivalente a 100µg de proteínas totais foi acrescentado tampão de reidratação IEF [Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, Azul de Bromofenol, 0,025%, DTT 65mM e 1% anfólito Biolyte 3-10 buffer 100x (Bio - Rad) para um volume final de 125µL. As amostras foram mantidas sob agitação por uma hora e centrifugadas a 16.000 x g, 20-25°C por 30 minutos para retirada de material não solubilizado. O sobrenadante foi aplicado sobre fitas de IPG de 7cm com gradiente de pH 3-10 não linear (NL). As fitas foram submetidas à reidratação e focalização isoeletrica no equipamento Protean IEF Cell (Bio - Rad) a 50µA/gel a 20°C. As condições de reidratação e focalização isoeletrica foram: re-hidratação passiva por 4h, re-hidratação ativa a 50V por 12h e focalização isoeletrica a 500V por 30 minutos, 1000V por 30 minutos, 4000V por 1h e 4000V até 16000V/h. Após o término da focalização isoeletrica, as fitas foram retiradas do equipamento e congeladas a -70 °C ou utilizadas imediatamente para separação das proteínas por SDS-PAGE.

### **3.14.2 Segunda dimensão- SDS-PAGE**

Para a realização da separação das proteínas pela segunda dimensão, as fitas de IPG foram submetidas às etapas de equilíbrio (redução e alquilação das proteínas). As fitas foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação, em tampão de equilíbrio [6M Uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 50mM Tris-HCL (pH 8,8) e 0,001% azul de Bromofenol] contendo DTT 130mM, e, em seguida, por mais 15 minutos no mesmo tampão contendo iodocetamida 135mM.

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE 12%. O padrão de peso molecular Benchmark (Invitrogen) foi aplicado em um pedaço de papel filtro, colocado sobre o gel de poliácridamida e selado com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol. As fitas de IPG foram lavadas em tampão de corrida 1X antes de serem colocadas sobre o gel de poliácridamida. Assim como o padrão de peso molecular, as fitas foram seladas ao gel com

agarose 0,5% contendo azul de bromofenol para facilitar o acompanhamento da corrida eletroforética no sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). A eletroforese foi realizada a 50V por aproximadamente 10 min e a 100V até o corante atingir a porção inferior do gel.

As réplicas dos géis de poliacrilamida que não foram utilizadas nos ensaios de *Western blotting* foram coradas pelo protocolo compatível com a espectrometria de massas o qual utiliza o Azul de Coomassie Coloidal G-250 (Neuhoff et al., 1988). De acordo com este método os géis foram fixados em três soluções: ácido ortofosfórico 2% e etanol 30%; ácido ortofosfórico 2%; ácido ortofosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 12%. Em seguida foi adicionado Azul de Coomassie Coloidal G-250 0,02% à última solução. Os géis foram mantidos nesta solução por até 72 horas.

### **3.15 Western-blotting bidimensional**

Logo após a eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas Immun-Blot PVDF 0,2 $\mu$ m (Bio-Rad) em cuba de transferência mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) usando tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol) por 2h a 100V. As membranas foram bloqueadas por 16h em TBS-T/BSA 3% (TBS: 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5; Tween-20 0,1%, BSA 3%) à temperatura ambiente, e então, incubadas por 16h com o *pool* de soro de camundongos imunizados com salina + CFA/IFA ou Smtg + CFA/IFA na diluição 1:100 em TBS-T/BSA1%. Após duas lavagens em TBS-T/BSA1%, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG total de camundongo conjugado a peroxidase (Southern Biotec) na diluição 1:2000 em TBS-T/BSA1%. Após duas lavagens em TBS-T e uma em TBS, a reação foi revelada utilizando Diaminobenzidina (DAB). Para a detecção, as membranas foram incubadas com 15 mL da solução de PBS 1x por 5 minutos em agitação. Após este período, pesou-se 3mg de DAB (Sigma) para cada 15mL de solução. A solução de PBS foi aspirada e a solução de DAB foi acrescentada às membranas e nesta solução acrescentou-se 15  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida lavando as membranas em água.

### 3.16 Digestão triptica *in gel* de proteínas

Os *spots* reconhecidos pelos anticorpos específicos foram localizados visualmente em um gel corado por Azul de Coomassie Coloidal idêntico ao que foi utilizado para transferência, e extraídos manualmente para identificação das proteínas por espectrometria de massas. Inicialmente, os *spots* excisados do gel foram transferidos para tubos siliconados pré-lavados com metanol P.A (Merck) e água Milli-Q. Os *spots* foram lavados em 1mL de água Milli-Q por 15 min, seguido de 400µL de uma solução de acetonitrila (ACN) 50% (Fisher Scientific)/ bicarbonato de amônio (AB) 25mM (Sigma) pH 8,0 para descoloração. Este procedimento foi realizado com duas lavagens de 15min cada, sob agitação constante. Em seguida, os pedaços de gel foram desidratados pela adição, por 5 min, de 200µL de acetonitrila (Fischer Scientific). Os *spots* foram incubados em 200µL AB 100mM por 5 min e após este tempo foi acrescentado o mesmo volume de ACN por mais 5 minutos. Esta solução foi removida e os géis foram completamente secos em *Speed Vac* (Eppendorf) por cerca de 20 min. Para a digestão das proteínas, foram adicionados 0,3µg de Tripsina (Promega) em um volume de 10µL, e, posteriormente, cerca de 20µL de uma solução AB 25mM pH 8,0 para evitar o ressecamento do *spot*. A digestão foi conduzida à 37°C por cerca de 16h. O conteúdo de cerca de 30µL de solução foi transferido para novos tubos. Aos antigos tubos foram acrescentados 30µL de solução de ácido fórmico 5% (Merck)/ ACN 60% para extração de peptídeos tripticos. Este procedimento foi realizado por duas vezes sob agitação constante de 30 minutos cada, sendo que, após o término do tempo referido, a solução de extração contendo os peptídeos foi transferida para o respectivo tubo contendo os 30 µL iniciais. As amostras foram concentradas em *Speed Vac* para um volume de cerca de 10µL e, em seguida, os peptídeos foram purificados em microcolunas de fase reversa Zip Tip C<sub>18</sub> (Eppendorf<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos purificados foram novamente concentrados em *Speed Vac* para um volume final de 4 µL e encaminhados para a Plataforma de Espectrometria de Massas - IOC/FIOCRUZ para identificação das proteínas por espectrometria de massas.

### **3.17 Espectrometria de massas**

A identificação das proteínas por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF-ToF foi realizada em um espectrômetro de massas modelo 4700 *Proteomic Analyser* (*Applied Biosystems*). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, em colaboração com o Dr. Jonas Perales e Dr. André Teixeira, responsáveis pela Plataforma de Espectrometria de Massas-RJ, PDTIS- FIOCRUZ.

Um volume de 0,5µL da amostra de peptídeos purificados foi misturado a 0,2µL de matrix ácido alpha-cyano-4-hydroxycinnamic (20mg/mL na mesma solução). A amostra em matrix foi aplicada à placa de MALDI para a ionização dos peptídeos. Os parâmetros estabelecidos foram: 2.000 tiros de MS e 4.000 tiros de MS/MS dos 10 picos mais intensos.

### **3.18 Identificação das proteínas**

O espectro de massas dos peptídeos gerados pela digestão com tripsina e dos fragmentos de peptídeos foram analisados utilizando o programa MASCOT (Matrix Science, Boston, MA) e o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes do NCBI. Os parâmetros utilizados foram: tolerância de peptídeos MS de + 0.6 Da, tolerância de fragmento de massa MS/MS de + 0.2 Da, duas falhas de clivagem por tripsina permitidas, carga de peptídeo +1 e modificações variáveis em cisteína (carbamidometilação e adição de propionamida) e em metionina (oxidação). A fim de evitar identificações aleatórias, foram consideradas seguramente identificadas apenas proteínas que apresentaram pelo menos 1 íon com valor de *score* individual acima do valor fornecido pela análise do MASCOT, o qual indica identidade e homologia extensiva ( $p < 0,05$ ).

### **3.19 Análise *in silico* das proteínas**

#### **3.19.1 Predição de localização celular**

Após análise dos parâmetros disponibilizados pelo software MASCOT (tais como: peso molecular, ponto isoelétrico, dentre outros), as proteínas selecionadas foram submetidas

à predição de domínio transmembrana, solubilidade e predição de localização celular. Para a predição de região transmembrana e análise de solubilidade, usou-se o programa SOSUI (SOSUI engine ver. 1.11) ([http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui\\_submit.html](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui_submit.html) - Outubro, 2010). As sequências de aminoácidos das proteínas foram inseridas individualmente e o resultado foi gerado utilizando os parâmetros padrões do programa. A predição de localização celular foi realizada utilizando o programa SherLoc (<http://www-bs.IFNormatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/>-Outubro,2010). Primeiramente escolheu-se o método de predição de localização para células de organismo animal, em seguida, as sequências de aminoácidos das proteínas foram inseridas individualmente e o valor de e-value do blast de 0.1, parâmetro padrão do algoritmo, foi utilizado. Para liberação dos resultados, foi selecionado o formato avançado, no qual 3 predições de localização celular com seus *scores* foram geradas. Para se ter maior confiabilidade da predição de localização celular, foi realizada uma segunda predição utilizando-se o programa TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> - Outubro, 2010).

### **3.19.2 Similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos**

A sequência das proteínas identificadas foram submetidas a uma busca por sequências homólogas utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast->Outubro, 2010). A busca foi feita utilizando a ferramenta BLASTp e o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes do NCBI.

### **3.19.3 Predição de epítopos de células B e T**

As sequências de proteínas selecionadas pelas três análises anteriores (predição de localização celular, predição de domínio transmembrana e similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos) foram submetidas à predição de epítopos de células B no programa BCPRED (*B-cell Epitope Prediction Server*-<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html> - Outubro, 2010). No Bcpred foi realizada uma seleção de busca por epítopos com comprimento de 20 aminoácidos com especificidade

padrão de 75%. Para liberação dos resultados selecionou-se a opção de apresentarem epitopos que não continham sobreposição de sequências.

Para a predição de epitopos para célula T, utilizou-se o programa Rankpep (<http://imed.med.ucm.es/tools/rankpep.html> - Outubro, 2010), no qual foi inserida a sequência de aminoácidos no formato FASTA, alinhando aos ligantes do MHCII em posições específicas (HLA-DR1, HLA DR2, etc). Após liberação dos resultados foi possível identificar o score ótimo, o limiar de ligação e o ranqueamento das posições na sequência de peptídeos com maiores *scores* de ligação. Para a síntese dos peptídeos sintéticos, no programa Rankpep, realizou-se a predição alinhando aos ligantes de MHCII IaB que é específica para a linhagem de camundongos em estudo: C57BL-6. Após as predições, dois peptídeos sintéticos foram comprados: *SmCyp* 94-108 (SLSMANAGPNTNGSQ) e *SmCyp* 107-121 (SQFFITTVPCSWLDG) para serem usados no experimento de cultura de células e ELISA

#### **3.19.4 Predição de sítios de glicosilação e de adição de âncora de GPI**

Para análise das regiões de glicosilação utilizou-se o programa YinOYang ([www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/](http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/) - Outubro, 2010). Submeteu-se a sequência da proteína em formato FASTA e aperfeiçoou-se para que fossem apresentados apenas os sítios positivos. Após obtenção dos resultados foi possível identificar quantas e quais sequências possuíam potenciais sítios de glicosilação. Utilizou-se o programa bigPI Predictor ([mendel.imp.ac.at/goi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/goi_server.html) - Outubro, 2010) para avaliar se a proteína possui potencial sítio para adição de âncora de GPI. Submeteu-se a sequência em formato FASTA e aperfeiçoou-se para o reino Metazoa. O programa apresentou os possíveis sítios com os maiores *scores*.

#### **3.20 Clonagem**

Uma vez identificadas as proteínas de interesse, selecionamos a proteína identificada no Spot 29 a qual denominamos de “SmCyp” (por ter sido anotada como ciclofilina de *S. mansoni*) para ser testada como potencial antígeno vacinal na forma de DNA. O gene sintético que codifica esta proteína foi desenhado utilizando-se o software ApE ([www.apesoftware.com](http://www.apesoftware.com)) e otimizado para expressão em bactérias e *Mus musculus*. O mini

gene foi desenhado inserindo sítios para as enzimas de restrição: *BamHI* (GGATCC) a 5' e *XhoI* (CTCGAG) e *AgeI* (ACCGGT) a 3'. Assim, foi possível fazer a clonagem do inserto tanto no vetor para expressão em células de mamífero pcDNA 3.1 V5/ His A (utilizando os sítios das enzimas de restrição *BamHI* e *AgeI*) como no vetor para expressão em procariontos pETtev (utilizando os sítios das enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*). Após esta otimização, realizamos a compra deste gene sintético clonado no vetor de clonagem IDTSmartamp que é comercializado liofilizado pela empresa IDT. O DNA liofilizado foi ressuscitado em água e incorporado por *E. coli* da cepa XL1Blue por choque térmico. Clones contendo o gene sintético foram utilizados para extração do DNA plasmidiano com o kit de mini-prep (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a clonagem do mini-gene que codifica a proteína presente no *Spot29* (SmCyp) em pcDNA 3.1 V5/His A (Invitrogen), a construção contendo o gene sintético foi digerida com as devidas enzimas de restrição nas seguintes condições: 0,5µL do produto de mini-prep do gene sintético *SmCyp*, 16,3 µL de água (DEPEC), 0,2 µL de BSA (10mg/mL - Promega), 2 µL de tampão D (10x- Promega), 0,5 µL *BamHI*(10 U/ µL - Promega), 0,5 µL de *AgeI* (10 U/ µL Promega). O plasmídeo pcDNA 3.1 V5/His A foi primeiramente digerido com *BamHI*: 30µL do produto do mini-prep, 5,1 µL de água (DEPEC), 0,4 µL de BSA (10mg/mL- Promega), 4 µL de tampão E (10x- Promega), 0,5 µL *BamHI*(10 U/ µL - Promega), e, posteriormente, realizou-se a digestão com *AgeI*: 30µL do produto da extração da banda, 5,1 µL de água (DEPEC), 0,4 µL de BSA (10mg/mL- Promega), 4 µL de tampão K (10 x- Promega), 0,5 µL *AgeI* (10 U/ µL - Promega). A clonagem foi realizada utilizando a enzima de ligação T4 ligase (1,5 µL do vetor pcDNA 3.1 V5/His, 7,2 µL do fragmento correspondente ao mini-gene (SmCyp, 0,3 µL de T4 ligase (3U/ µL), 1 µL do tampão de ligação (10x -300mM – Promega) totalizando um volume de 10 µL por 18h à 16° C.

### **3.21 Transformação de *E. coli* DH5-alpha eletrocompetentes**

A reação de ligação entre o inserto que codifica a proteína SmCyp e o vetor pcDNA 3.1 V5/His A foi utilizada para a transformação em bactérias *E. coli* da cepa DH5-alpha por eletroporação. Para isso, 2µL da reação de ligação foram adicionados à 60µL da bactéria eletrocompetente. Vagarosamente, toda a solução foi transferida para uma cubeta de



eletroporação (0,2cm). A cubeta foi acondicionada no gelo até o seu uso no eletroporador (GenePulser Xcell-BioRad). Realizou-se a seguinte calibração do aparelho: voltagem: 250V; capacitância (25 $\mu$ F); resistência (200 $\Omega$ ). Imediatamente após a eletroporação, acrescentou-se 500  $\mu$ L de meio de cultura SOC (20mM-pht) à temperatura ambiente. Esta solução foi transferida para um tubo autoclavado de 5mL o qual foi incubado a 37°C por 1h sob agitação constante. A cultura foi então plaqueada em meio LB-ágar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL), utilizando 250  $\mu$ L por placa, e incubou-seas mesmas à 37°C por 16h.

Após a seleção das colônias de bactérias que cresceram na placa, as mesmas foram estriadas em uma nova placa e, posteriormente, cultivadas em 5mL de meio LB com ampicilina (100  $\mu$ g/mL) em agitador a 200 rpm, à 37°C por 16h. Os mesmos foram utilizados para a extração do DNA plasmidiano com o kit de mini-prep (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.22 PCR

O DNA plasmidiano dos clones selecionados foi utilizado em uma Reação da Cadeia de Polimerase (PCR) para confirmação da inserção do gene que codifica a proteína SmCyp no plasmídeo pcDNA 3.1 V5/HisA. Para isto, utilizou-se os iniciadores BGH (reverso) e T7 (forward) que se anelam no DNA do vetor utilizado. Para a reação de PCR foram usados 1,5  $\mu$ L PCR Taq buffer 1X, 1 $\mu$ L DNTP mix (10mM- concentração estoque), 0,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1  $\mu$ L do primer BGH (10 picomoles/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L do primer T7(10 picomoles/ $\mu$ L), 0,4  $\mu$ L *Platinum taq* (5U/ $\mu$ L- Invitrogen), 9,3  $\mu$ L de água Milli-Q, 2  $\mu$ L do produto da mini-prep. A PCR foi realizada em termociclador com a etapa inicial de ativação de 94°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de: desnaturação à 94°C por 30 seg, anelamento à 55°C por 45 seg e extensão à 72°C por 5 minutos. Após a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos à análise em gel de agarose 1%. A colônia confirmadamente positiva foi cultivada em 10mL de meio LB com ampicilina (100  $\mu$ g/mL) em agitador à 200 rpm, à 37°C por 16h (pré-inóculo) e, posteriormente, foi realizado um inóculo distribuindo esta cultura em 2,5L de meio LB com ampicilina (100  $\mu$ g/mL) em agitador à 200 rpm, à 37°C por 16h. Esta cultura bacteriana foi utilizada para a extração do DNA plasmidiano com o kit Endofree Giga-Prep (QIAGEN®) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.23 Digestão do DNA plasmidiano com *BamHI* e *AgeI*

O DNA plasmidiano do clone contendo o gene que codifica a proteína SmCyp inserido no plasmídeo pcDNA 3.1 V5/His A foi submetido a uma digestão com as enzimas de restrição *BamHI* (Promega) e *AgeI* (Promega) para verificação da correta clonagem. Para esta digestão utilizou-se: 1,5ul de tampão multi-core (10x - Promega); 1,5ul de BSA 10x(10mg/mL), 2ul do DNA plasmidiano (1ug/ul), 1ul da enzima *AgeI* (10U/ $\mu$ L-Promega); 1ul da enzima *BamHI*(10U/ $\mu$ L-Promega); 8ul de água. Essa reação foi incubada à 37°C por 5 horas. Após este período, os produtos de digestão foram submetidos à análise em gel de agarose 1% corado com *Sybr Gold* (Invitrogen).

### 3.24 Sequenciamento do DNA plasmidiano

O sequenciamento parcial de DNA do clone selecionado foi realizado no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/ Fiocruz - plataforma de Sequenciamento de DNA-BH, PDTIS- FIOCRUZ. Para esta reação, utilizou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Life Technologies). Na placa de PCR para sequenciamento foram adicionados 300ng do DNA plasmidiano recombinante, 0,5  $\mu$ L de Big Dye, 1,75 $\mu$ L de tampão, 1 $\mu$ L do iniciador (10 pmol/ $\mu$ L) (forward e reverso específicos para o gene *SmCyp*, T7 e BGH) e completou-se com água apirogênica para um volume total de 10 $\mu$ L. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o programa: 96°C por 1 min (desnaturação), após esta etapa utilizou-se 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 minutos (extensão final) por 40 ciclos consecutivos. Adicionou-se 1  $\mu$ L de EDTA (125mM) a cada poço. Em seguida, foram adicionados 1 $\mu$ L de acetato de amônio 7,5M e 50 $\mu$ L de etanol 100% para precipitação do DNA. A placa foi selada e agitada brevemente em vortex. Esta placa foi então incubada por 15 minutos a T.A e centrifugada a 4800 x g por 45 min a temperatura ambiente. Verteu-se a placa para descartar o sobrenadante e adicionou-se 100  $\mu$ L de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 15 min a 4800 x g T.A. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida por 1 minuto. A reação de sequenciamento foi ressuspendida em 10 $\mu$ L de tampão de amostra contendo 70% de formamida, 1mM EDTA. A placa foi inserida no sequenciador de DNA (ABI3730 *DNA Analyzer*) e os cromatogramas fornecidos foram analisados.

### 3.25 Expressão e análise de proteínas recombinantes em células HEK293T

#### 3.25.1 Transfecção transiente de células HEK293T por lipossomos

Para verificar a expressão da proteína heteróloga SmCyp em células de mamífero foi utilizada a linhagem HEK293T, derivada de células de rim de embrião humano, previamente cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM (GIBCO, Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e com 1% dos antibióticos penicilina/estreptomicina, a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A transfecção foi realizada por meio da técnica de lipofecção (transfecção por lipossomos) com o uso de *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) e do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His A que contém a região codificadora do gene de SmCyp de *S. mansoni* em fusão com os códons para o epitopo V5 e 6xHis. Os plasmídeos pcDNA 3.1/V5-His-TOPO/*lacZ* (Invitrogen), que contém o gene de β-galactosidase também inserido em fusão com o epitopo V5 e 6xHis, e o plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His B, que contém a região codificadora de SmPGM (fosfoglicerato mutase de *S. mansoni*), foram utilizados como controles da transfecção, bem como do experimento de *Western blotting* utilizando anticorpo anti-6xHis. Além deste, foi utilizado também como controle positivo da transfecção o plasmídeo pcDNA3-RFP, que contém o gene repórter da *Red Fluorescent Protein* (RFP - Proteína vermelha fluorescente). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Alexandre Magalhães/FIOCRUZ. Esta proteína emite luz vermelha quando excitada por luz ultravioleta que pode ser observada em microscopia de fluorescência. Foi utilizado o microscópio de fluorescência AXIO – Observer. A1 (Zeiss), com câmera integrada AxioCam MRc, do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração/CPqRR.

Como controle negativo do experimento foi utilizado o plasmídeo pcDNA3.1/V5-HisB vazio, ou seja, sem inserto, assim como células não transfectadas que foram mantidas na presença e ausência de lipofectamina. Em cada poço da placa de cultura de 24 poços foram inoculadas  $2,0 \times 10^5$  células em 500μL de meio DMEM com 10% SFB e sem antibióticos. Esta placa foi incubada à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por cerca de 24 horas, de forma que no momento da transfecção houvesse uma confluência de aproximadamente 80%.

Cada amostra de DNA e a lipofectamina foram separadamente diluídos em meio DMEM, sendo utilizado 0,8µg de DNA em 50µL de meio de cultura e 2µL de lipofectamina em 50µL de meio de cultura para cada poço. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a lipofectamina diluída foi misturada a cada uma das amostras de DNA. Esta mistura foi incubada por 20 min à temperatura ambiente, permitindo a formação dos complexos DNA-lipossomo. Decorrido esse tempo, cada mistura foi adicionada aos respectivos poços da placa de cultura, sendo esta mantida por aproximadamente 5hr a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. As células haviam sido previamente lavadas para retirada do SFB e adição apenas de meio DMEM. Após as 5 hr de incubação foi realizada uma nova lavagem das células, sendo adicionado meio DMEM sem antibiótico e contendo 10% SFB. A placa foi então incubada por 48 hr a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. O experimento foi realizado utilizando todas as amostras em duplicata.

Após 48 hr, as células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-RFP foram analisadas em microscópio de fluorescência para verificação da expressão do gene repórter (RFP). As demais culturas transfectadas foram submetidas à lise para extração de proteínas.

### **3.25.2 Extração de proteínas a partir da lise das células HEK293T transfectadas**

Quarenta e oito horas após a transfecção, as células transfectadas foram lavadas com 1mL de PBS gelado. A placa de cultura foi analisada em microscópio invertido trinocular (OLYMPUS - CK2, ULWCD 0.30) para certificar que as células não haviam sido removidas com a lavagem. Em seguida, estas foram lisadas em 100µL de tampão Laemmli 2X (4% SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol e 0,125M Tris HCl, pH6,8 - BioRad) acrescido de β-mercaptoetanol (950µL do tampão Laemmli 2X + 50µL de β-mercaptoetanol). Os extratos de células foram recolhidos em tubos de 1,5mL e estes foram mantidos no gelo. Os poços foram lavados com 50µL adicionais do tampão Laemmli 2X e esta solução foi posteriormente adicionada aos tubos descritos anteriormente. Em seguida, as amostras foram fervidas a aproximadamente 100°C por 5 min para desnaturação das proteínas e inativação de proteases. Em seguida, as mesmas foram brevemente centrifugadas a 14.000 x g e armazenadas a -70°C. A qualidade dos extratos protéicos obtidos foi avaliada por SDS-PAGE 12%.

### 3.25.3 Análise dos extratos protéicos por SDS-PAGE

No sistema de eletroforese unidimensional foram montados dois mini-géis com resolução a 12% utilizando o sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). Aos 2 géis foram aplicadas as mesmas amostras, porém em quantidades diferentes devido às suas finalidades distintas, sendo 15µL para o *Western blotting* e 10µL para coloração do gel por *Coomassie Brilliant Blue G-250* e análise da qualidade do extrato protéico. O sistema de eletroforese foi submetido a uma voltagem inicial de 50V para a entrada das amostras no gel de separação, e depois de 100V, para a corrida eletroforética. A eletroforese estendeu-se até a saída do azul de bromofenol do gel.

### 3.25.4 Análise das proteínas por *Western blotting* unidimensional

O outro gel de poliacrilamida mencionado no item anterior, no qual foram aplicados 10µL do marcador de peso molecular *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) e 15µL dos extratos protéicos das células transfectadas e controles, já em tampão de amostra, foi utilizado para transferência de proteínas para membrana *Imuno-Blot PVDF* (Bio-Rad), utilizando-se o sistema de transferência *mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Para isso, foi montado um sistema do tipo sanduíche contendo o gel e a membrana. Este aparato foi colocado em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol) e a transferência das proteínas foi realizada em gelo, a 100V na primeira hora e a 110V na segunda hora. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por aproximadamente 16 hr em TBS-T/BSA 3% (TBS: 20mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5; Tween-20 0,1%; BSA 3%) sob leve agitação à temperatura ambiente. Após lavagem rápida com TBS 1X, a membrana foi incubada por 3 hr com anticorpo anti-6xHis conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Invitrogen), diluído 1:5000 em TBS-T/BSA 1%. Em seguida, a membrana foi submetida a 2 lavagens de 15 min cada com TBS-T e a uma lavagem, também de 15 min, com TBS 1X. A reação foi revelada utilizando *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE-Healthcare) e a imagem foi capturada em Image Quant LAS 4000 (GE-Healthcare) pelo método quimioluminescente.

### **3.26 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Ca, USA). Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando: análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste T de Student foi empregado quando comparadas somente duas variáveis.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste Mann-Whitney foi empregado quando comparadas somente duas variáveis. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p \leq 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

Como demonstrado em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo, o Smtteg foi capaz de ativar células dendríticas da medula óssea (BMDC) aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias, tais como CD40 e CD86 e induzindo a produção de quantidades significativas de IL-12p40 e TNF- $\alpha$  (Durães et al., 2009). Além disso, em camundongos imunizados com Smtteg juntamente com adjuvante Completo/Incompleto de Freund, observou-se uma redução da carga parasitária de 43%-48%, bem como diminuição do número de ovos nas fezes e no fígado (Teixeira de Melo et al., 2010). A fim de saber se a imunização com Smtteg sem a adição de adjuvantes ou com a administração de outros tipos de adjuvantes seria capaz de induzir uma resposta imune protetora, camundongos foram imunizados com Smtteg, Salina, Alum, Smtteg/Alum, Salina/Alum/CpG e Smtteg/Alum/CpG.

A imunização de camundongos com Smtteg na ausência de adjuvante, surpreendentemente não resultou na diminuição significativa da carga parasitária além de não diminuir o número de ovos presos no intestino e fígado de forma significante. Este resultado demonstra a importância do adjuvante em uma formulação vacinal. Entretanto, a imunização com Smtteg na ausência de adjuvante foi capaz de ativar uma resposta imune, pois resultou em uma significativa produção de anticorpos específicos além de um aumento da porcentagem de células esplênicas CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> com um aumento estatisticamente significativo na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10. Além disso, foi observado neste trabalho que células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) estimuladas *in vitro* com Smtteg aumentaram significativamente a produção de IL-10. Esta alta produção de IL-10 pode ter contribuído por uma menor resposta inflamatória pelas células do sistema imune e conseqüentemente pela ausência de proteção (Araújo JM, 2012).



## Schistosoma mansoni schistosomula tegument (Smtg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4<sup>+</sup> cells and failed to protect mice against challenge infection

Juliano Michel Araujo<sup>a,1</sup>, Tatiane Teixeira de Melo<sup>a,1</sup>, Isabela Campos de Sena<sup>a</sup>, Clarice Carvalho Alves<sup>a</sup>, Neusa Araujo<sup>a</sup>, Fernanda do Valle Durães<sup>b</sup>, Sergio Costa Oliveira<sup>b</sup>, Cristina Toscano Fonseca<sup>a,c,\*</sup>

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

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

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil

### article info

#### Article history:

Received 6 December 2011

Received in revised form 18 July 2012

Accepted 19 July 2012

Available online 27 July 2012

**Keywords:** Schistosoma mansoni Schistosomula tegument Immunization Regulatory response

### abstract

The *Schistosoma mansoni* tegument interaction with the immune system plays a key role in disease establishment or elimination. We have recently demonstrated that *S. mansoni* schistosomula tegument (Smtg) is able to activate innate immune response and to induce protective immunity in a vaccine formulation with Freund's adjuvant. In this work, we evaluated the ability of Smtg to elicit protection in the absence of adjuvant. Smtg mice immunization resulted in significant antibody production, increased percentage of CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> cells in spleen and increased production of IFN- $\gamma$  and IL-10 by spleen cells, but failed to reduce parasite burden, female fecundity and morbidity. We also demonstrated that BMDC stimulation with Smtg resulted in significant IL-10 production. Our results demonstrate that Smtg has immune modulatory properties.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The success in developing an efficient vaccine formulation depends on the use of immunogenic antigens together with an appropriated adjuvant able to induce an inflammatory response that will polarize the response to the desirable immunological profile. In the case of schistosomiasis, protective immunity in mice has been described to be dependent on antibody response and to involve a cellular immune response dependent on CD4<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$  (Jankovic et al., 1999; Smythies et al., 1992; Vignali et al., 1989; Wilson et al., 1996). Additionally, the use of rIL-12 as adjuvant has been proved to enhance the protective immunity induced by the antigen alone or associated with others adjuvants (Wynn et al., 1995; Wynn and Cheever, 1995), indicating that a Th1 profile is desirable.

The *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtg) is an interesting parasite structure to be used in a vaccine formulation against schistosomiasis. The tegument is a dynamic

host-interactive layer involved in nutrition, immune evasion and modulation, excretion, osmoregulation, sensory reception and signal transduction (Jones et al., 2004; Van Hellemond et al., 2006). In addition, the larval schistosomula have been described to be the most susceptible parasite life stage to host immune system attack (Foley et al., 1988; James, 1981; Simpson et al., 1983).

Recently we have demonstrated that Smtg is able to activate bone marrow dendritic cells (BMDC) by up-regulating the expression of essential co-stimulatory molecules, such as CD40 and CD86, and also by inducing the production of IL-12p40 and TNF- $\alpha$  cytokines in a TLR-4 dependent manner (Durães et al., 2009). We had also demonstrated that mice immunization with Smtg plus Freund's adjuvant is able to reduce parasite burden, egg elimination and disease morbidity. The immune response elicited by immunization, characterized by IFN- $\gamma$ , IgG1 and IgG2c production, was able to induce damage in parasite tegument (Teixeira de Melo et al., 2010). These results indicate that Smtg contains protective antigens as well as inflammatory inducing molecules in its formulation.

In this study, we have evaluated the immunological response triggered by Smtg immunization in the absence of adjuvants and its ability to induce protection against *S. mansoni* challenge infection. We demonstrated that although Smtg immunization in the absence of adjuvant induced significant production of specific antibodies it failed to induce protective immune response in mice

\* Corresponding author at: Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 334 978 28.

E-mail address: [ctoscano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:ctoscano@cpqrr.fiocruz.br) (C.T. Fonseca).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.



probably due to IL-10 production and impaired antigen presentation to CD4<sup>+</sup> cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice and parasites

Female C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) Fiocruz. All procedures involving animals were approved by the local Ethics Commission on Animal Use (CEUA) from Fiocruz (no. L-005/08). Cercariae of *S. mansoni* (LE strain) were maintained routinely in *Biomphalaria glabrata* snails at CPqRR and obtained by exposing infected snails to light for 1–2 h to induce cercariae shedding. The number of cercariae and their viability were determined using a light microscope.

### 2.2. Antibodies

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: anti-mouse CD4-Biotin and FITC (clone GK1.5, e-bioscience), anti-mouse CD8-FITC (clone 53-6-7, e-bioscience), anti-mouse IL-10-PE (clone JESS-16E3, e-bioscience), anti-mouse IFN- $\gamma$ -PE (clone XMG1.2, e-bioscience), anti-mouse TNF- $\alpha$ -PE (clone MP6XT22, ebioscience) and anti-mouse IL-4-PE (clone 11B11, BD bioscience), streptavidin-PerCP (e-bioscience), anti-mouse CD25-Biot (clone 7D4, BD bioscience) and anti-mouse Foxp3-PE (clone JFK-16a e-bioscience). The following isotype controls were used: Rat IgG2a-FITC, Rat IgG2b-FITC, Rat IgG2b-biotin, Rat IgM-biotin, Rat IgG1-PE, Rat IgG2a-PE, Rat IgG2b-PE. Anti-mouse CD16/CD32, Fc Block (BD Bioscience) was also used for flow cytometry assays.

### 2.3. Tegument purification (Smtég)

Cercariae from *S. mansoni* were mechanically transformed into schistosomula according to Ramalho-Pinto et al. (1974). Briefly, cercariae were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 1800  $\times$ g for 3 min at 4 °C. The cercariae were resuspended in cold ELAC (Earle's salts plus lactalbumin hydrolysate) containing 0.5% lactalbumin, 1% penicillin/streptomycin and 0.17% glucose. The tails were broken by vortexing in high speed for 2 min and removed through several washing steps with ELAC. The schistosomula were cultured for 90 min at 37 °C in ELAC. The tegument was removed with CaCl<sub>2</sub> 0.3 M by vortex agitation, according to Caldas et al. (2000). The tegument was separated from denuded bodies by centrifugation at 900  $\times$ g for 1 min. The supernatants were pooled and centrifuged at 50,000  $\times$ g for 1 h at 4 °C. The pellet was dialyzed against physiological saline 1.7%. This preparation was termed Smtég.

### 2.4. Mice immunization

Female C57BL/6 mice (10 mice per group) were immunized subcutaneously in the nape of the neck with 25  $\mu$ g Smtég on days 0, 15 and 30. In the control group, saline was administered using the same immunization protocol. Blood samples were collected from retro orbital sinus of each mouse with an interval of 15 days beginning 15 days after the first immunization. Serum samples were collected and stored at -20 °C until use. Three independent experiments were performed to confirm the results observed. In the third trial two additional groups were included in immunization protocol: Saline+CFA/IFA adjuvants and Smtég+CFA/IFA adjuvants, complete Freund adjuvant (CFA) were added to vaccine formulation in the first immunization dose while incomplete Freund adjuvants (IFA) were used in second and third immunization dose.

### 2.5. Challenge infection and worm burden recovery

Thirty days after the last boost, mice were challenged through percutaneous exposure of abdominal skin for 1 h in water containing 100 cercariae (LE strain) as described by Smithers and Terry (1965). Fifty days after challenge, adult worms were perfused from the portal system and mesenteric veins according to Pellegrino and Siqueira (1956). The protection level was calculated comparing the number of worm recovered from the immunization group with the control group.

### 2.6. Measurement of the number of eggs in the intestine and liver of immunized mice

Intestine and liver from each mouse from both control (saline) and Smtég immunized groups were collected 50 days post-infection. These organs were weighed and digested with 10% KOH overnight at 4 °C and for 2 h at 37 °C. The eggs were obtained by centrifugation at 900  $\times$ g for 10 min and resuspended in 1 mL of saline. Egg number was counted using a light microscope.

### 2.7. Measurement of specific antibodies

The measurement of specific anti-Smtég IgG antibodies was performed by ELISA. Maxsorp 96-wells microtiter plates (Nunc) were coated with 1  $\mu$ g/mL of the Smtég in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, for 16 h at 4 °C. The plates were then blocked for 16 h at 4 °C with 300  $\mu$ L/well of PBST (phosphate-buffered saline, pH 7.2 with 0.05% Tween-20) plus 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO, USA). One hundred microliters of each serum diluted 1:100 (IgG and IgG1) or 1:200 (IgG2c) in PBST was added per well and incubated for 1 h at room temperature. Plate-bound antibody was detected by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2c (Southern Biotech, USA), diluted 1:5000, 1:10,000 or 1:4000 respectively. Color reaction was developed by addition of 100  $\mu$ L per well of TMB (Microwell Peroxidase Substrate System) and stopped with 50  $\mu$ L of 5% sulfuric acid per well. Absorbance was measured at 450 nm in ELISA reader.

### 2.8. Intracellular staining

For intracytoplasmic cytokine staining, spleen cells from 8 mice/group (10 days after the last immunization) were adjusted to 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells per well. Spleen cells were maintained in culture at 37 °C in 5% of CO<sub>2</sub> in medium alone or stimulated with Smtég (25  $\mu$ g/mL) or Con A (5  $\mu$ g/mL). After 16 h of culture, 1  $\mu$ g/well of brefeldin A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was added for 4 h to impair cytokine secretion. Cells were then blocked with anti-mouse CD16/CD32 mAbs (Fc-Block), and incubated for 20 min at 4 °C with anti-CD4, anti-CD8, monoclonal antibodies or their respective isotype controls. After a wash step with PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM Na<sub>3</sub> cells were incubated for 20 min with streptavidin-PerCP (1:200) at 4 °C. Then cells were washed, fixed using 2% formaldehyde solution, permeabilized and further stained with PE-labeled anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-4 or anti-IL-10 monoclonal antibodies diluted in PBS with 0.5% saponin (Permeabilization solution). After 30 min at room temperature, cells were washed with permeabilization solution and PBS, resuspended in PBS and the data were acquired using FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data analysis was performed using FlowJO software (Tree Star, Ashland, OR).

### 2.9. Cytokine analysis in spleen cells supernatant

Mice were immunized with three doses of Smtég or saline in a 15 day-interval regimen. Ten days after the last immunization,

spleens were obtained from individual's mice in each group. Spleen cells were washed twice in sterile saline and adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/well. Cells were cultured at  $37^\circ\text{C}$  in  $5\% \text{CO}_2$  in medium alone or stimulated with Smteg (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or concanavalin A (Con A) (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Culture supernatants were collected after 24 h stimulation for IL-4 and TNF- $\alpha$  measurement or 72 h stimulation for IFN- $\gamma$  and IL-10 measurement. IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokine assay was performed using the Douset ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN) or Ready set GO (e-bioscience, San Diego, CA), according to manufacturer's instructions.

## 2.10. Cytokine analysis in BMDC

BMDC (95% MHC II $^+$ , CD11c $^+$  pure) were generated from the bone marrow of C57BL-6 mice using a method adapted from Lutz et al. (1999) as previously described by Durães et al. (2009). After BMDC differentiation, non-adherent DCs were collected and seeded at  $3 \times 10^5$  cells/well in round-bottom 96-well culture plates. Cells were cultured in the presence of media alone, SmTeg (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  InvivoGen). In order to control for low levels of naturally occurring endotoxin in Smteg (0.445 endotoxin units/ $\mu\text{g}$  protein), LPS at the equivalent concentration of endotoxin contamination (0.09 ng/ $\mu\text{g}$  protein) was used to stimulate DCs, but no activation or cytokine production was observed (data not shown).

IL-10 production was measured in BMDC supernatant collected 24 h after stimulation using the Douset ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN) according to manufacturer's instructions.

## 2.11. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with paired and unpaired Student's t-test or ANOVA followed by the Tukey post test using the software package GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Smteg immunization in the absence of adjuvant failed to reduce worm burden, number of eggs trapped in host organs and fecundity

Since Smteg preparation had been demonstrated to activate innate immune response and also to contain protective antigens from the parasite (Durães et al., 2009; Teixeira de Melo et al., 2010), we evaluated the ability of Smteg immunization in the absence of adjuvants to induce protection against challenge *S. mansoni* infection. As shown in Table 1, Smteg immunization did not alter significantly the worm burden in immunized mice and also had no effect in the number of eggs trapped in the liver and intestine or on female fecundity (Fig. 1), as previously reported (Teixeira de Melo et al., 2010) mice immunization with Smteg+CFA/IFA induced partial protection against challenge infection (Table 1).

### 3.2. Humoral immune response induced by Smteg immunization

The kinetics of specific IgG production along the immunization protocol was determined in mice sera by ELISA. Increased production of specific IgG antibodies was observed in sera from mice immunized with Smteg and Smteg+CFA/IFA in comparison to their respectively control group at days 45, 60 and 75 post first immunization to Smteg group and at all time points evaluated for Smteg+CFA/IFA group (Table 2). Regarding IgG1 and IgG2a production, significant production of specific IgG1 and IgG2c were detected in Smteg+CFA/IFA immunized group in comparison to Saline+CFA/IFA group at all time points evaluated for IgG1 and at days 30, 45, 60 and 75 post first immunization (Table 2). In

Table 1

Groups <sup>c</sup>	Worm burden recovered (mean $\pm$ SD)			Protection level
	Female	Male	Total	
Trial 1				
Saline	29 $\pm$ 7	25 $\pm$ 5	54 $\pm$ 2	–
Smteg	23 $\pm$ 8	21 $\pm$ 8	44 $\pm$ 15	18.5% <sup>a</sup> ns
Trial 2				
Saline	28 $\pm$ 9	35 $\pm$ 11	63 $\pm$ 20	–
Smteg	20 $\pm$ 9	39 $\pm$ 15	62 $\pm$ 22	2.3% <sup>a</sup> ns
Trial 3				
Saline	18 $\pm$ 7	20 $\pm$ 7	38 $\pm$ 14	–
Smteg	16 $\pm$ 6	18 $\pm$ 4	33 $\pm$ 10	13.2% <sup>a</sup> ns
Saline+CFA/IFA	17 $\pm$ 4	23 $\pm$ 7	40 $\pm$ 10	–
Smteg+CFA/IFA	9 $\pm$ 7	13 $\pm$ 9	22 $\pm$ 16	45% <sup>b,*</sup>

\* Significant reduction in total worm burden compared to saline+CFA/IFA group  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> Reduction in total worm burden compared to saline group.

<sup>b</sup> Reduction in total worm burden compared to saline+CFA/IFA group.

<sup>c</sup>

10 animals per group/trial.

contrast, in Smteg immunized group significant production of specific IgG1 antibody were detected at days 30, 45, 60 and 75 post first immunization compared to saline group, while significant production of IgG2c was detected only post-infection (Table 2). Significant differences in IgG, IgG1 and IgG2c between Smteg and Smteg+CFA/IFA groups were observed at almost all time points evaluated (Table 2). Antibodies titres evaluated in a pool of sera from each group at day 45 post first immunization demonstrated that Smteg+CFA/IFA immunization induced higher production of specific IgG (1:102,400), IgG1 (1:102,400) and IgG2c (1:25,600) than Smteg immunization, in which Smteg specific antibodies titres

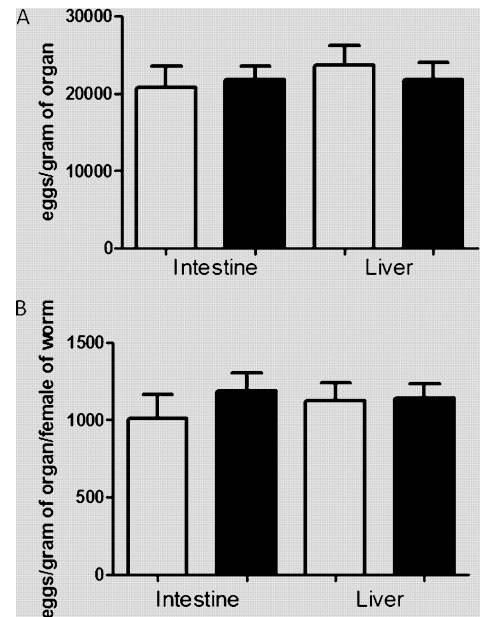


Fig. 1. Egg burden in the liver and intestine of immunized mice. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smteg (25  $\mu\text{g}/\text{mice}$ ) or saline, 30 days after the last immunization mice were challenged with 100 cercariae of *S. mansoni*, 50 days after challenge infection, mice were sacrificed and the liver and intestine were obtained, weighed and digested in KOH10%. The number of eggs was determined by optical microscopy. Bars represent the mean number of eggs/gram of organ  $\pm$  SD (A) or eggs/gram of organ/female worm  $\pm$  SD (B) for mice immunized with Smteg or saline. Results represent mean from two independent experiments.

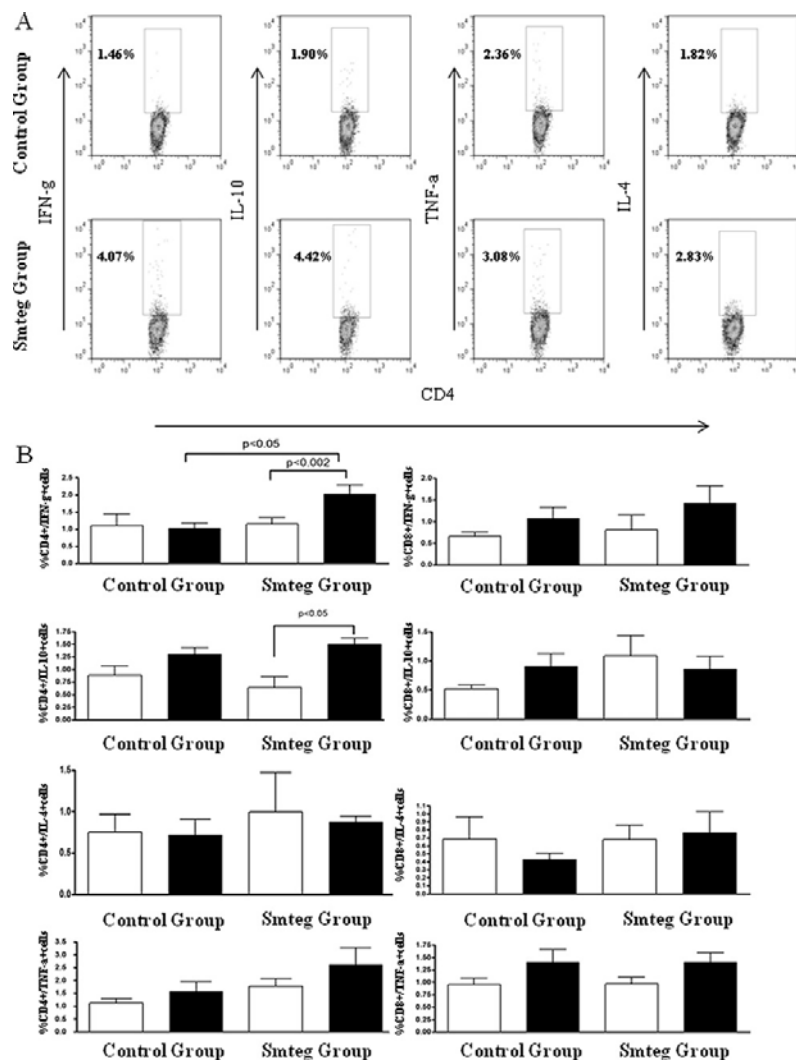


Fig. 2. Intracellular staining in lymphocyte subpopulations. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smtreg (25  $\mu$ g/mice) or saline. Ten days after the last immunization, mice were sacrificed and spleen cells were obtained from each individual mouse. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> production of IFN-g, IL-4, TNF-a, IL-10 in response to Smtreg (25  $\mu$ g/mL) in vitro stimulation were determined. A – Representative Dot-plots of cytokine producing CD4<sup>+</sup> cells in control and Smtreg groups under Smtreg stimulation. B – Bars represent the mean  $\pm$ SD of the percentage of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cytokine<sup>+</sup> cells in non stimulated (white bars) and Smtreg stimulated cells (black bars). Statistically significant differences in the percentage of double positive cells between saline and Smtreg immunized group are pointed in the figure and between non stimulated and stimulated cells are denoted by asterisk (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01). Data represent the mean values of two independent experiments with 4 animals/group each.

were 1:25,600 (IgG), 1:25,600 (IgG1) and 1:6400 (IgG2c) (data not shown).

### 3.3. Cytokine profile induced by immunization

Cytokine production under in vitro stimulation with Smtreg was measured by intracellular staining. Fig. 2 demonstrates a significant increase in the frequency of CD4<sup>+</sup>IFN-g<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells in immunized group after Smtreg stimulation in comparison to non stimulated cells. Also a significant increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>IFN-g<sup>+</sup> cells after Smtreg in vitro stimulation was observed in immunized group in comparison to control group (Fig. 2). No significant differences were observed between non-immunized and

immunized groups concerning IL-4 and TNF-a production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells and IFN-g and TNF-a production by CD8<sup>+</sup> cells (Fig. 2). In addition, significant production of TNF-a, IFN-g and IL-10 was detected in response to Smtreg stimulation in spleen cells supernatant regardless of previous in vivo priming (Fig. 3). However significant differences in IL-10 production was detected in spleen cells supernatant from mice immunized with Smtreg alone in comparison to control group and Smtreg + CFA/IFA group and significant differences in IFN-g production in comparison to control group were detected in Smtreg and Smtreg + CFA/IFA groups (Fig. 3). As previously demonstrated (Teixeira de Melo et al., 2010), mice immunization with Smtreg + CFA/IFA leads to significant production of IFN-g and IL-4 in response to Smtreg stimulation (Fig. 3), Smtreg

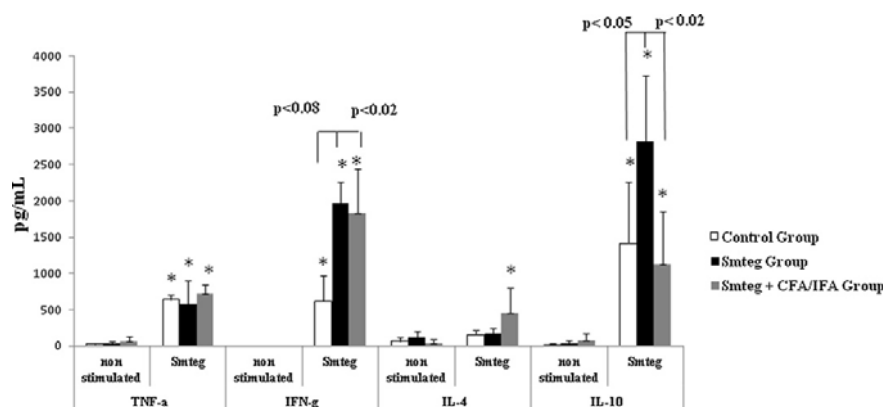


Fig. 3. Type of immune response elicited by Smtreg immunization. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smtreg (25  $\mu$ g/mice) or saline in the absence or presence of Freund adjuvant. Ten days after the last immunization, mice were sacrificed and spleen cells were obtained from each individual mouse. TNF-a, IFN-g, IL-4 and IL-10 production in response to Smtreg (25  $\mu$ g/mL) in vitro stimulation were measured in the culture supernatant of spleen cells by sandwich ELISA. Bars represent the mean  $\pm$  SD of cytokine production from 7 animals/group. Statistically significant difference between non-stimulated and Smtreg-stimulated cells are denoted by an asterisk ( $p < 0.05$ ). Statistically significant difference between groups are pointed in the graphic ( $p < 0.05$ ). Results are representative of one of three independent experiments.

immunization in the absence of adjuvants was also able to induce significant amount of IFN-g (Fig. 3).

#### 3.4. IL-10 production by BMDC

We have previously demonstrated that BMDCs stimulated in vitro with Smtreg were able to up regulate surface expression of CD40 and CD86 and also to produce TNF-a and IL-12 through the interaction of existing PAMPs in Smtreg with TLR4 (Durães et al., 2009). However IL-10 production by BMDCs in response to Smtreg stimulation was not investigated. To evaluate if Smtreg stimulation also induced IL-10 production by BMDC, we measured IL-10 in the supernatant of BMDC culture. Fig. 4 demonstrates that Smtreg and LPS induce significant production of IL-10 by BMDC in comparison to non stimulated cells.

#### 4. Discussion

*S. mansoni* is an important blood fluke parasite that causes schistosomiasis, a significant public health problem in tropical countries which is recognized as the most important human helminth infection in terms of morbidity and mortality (Donald and Alex, 2008). Although the existing antischistosomal drugs are highly effective, they do not prevent against reinfection or granuloma formation. In addition mass chemotherapy has been proved to be ineffective in controlling transmission (Rezende et al., 2011). Therefore, vaccine development is an alternative strategy to control this disease (Rezende et al., 2011; Teixeira de Melo et al., 2010). Recently our group has showed that *S. mansoni* schistosomula tegument (Smtreg) is able to induce dendritic cells up regulation of CD40 and CD86, and also IL-12p40 and TNF-a production. These cytokines play an essential role in the development of protective immune response against schistosomes (Durães et al., 2009; Hewitson et al., 2005; Hogg et al., 2003). Additionally, Smtreg immunization in association with Freund's adjuvant induced a significant reduction in worm burden (43–48%) demonstrating that Smtreg has in its constitution protective antigens as well as immunostimulatory molecules (Teixeira de Melo et al., 2010).

Herein we immunized mice with schistosomula tegument in the absence of adjuvant. Surprisingly no significant reduction in the worm burden (Table 1), neither in the number of eggs trapped in the liver and intestine nor in female fecundity (Fig. 1) was

observed in immunized mice compared to control group. Adjuvants not only promote immune responses but also are molecules that release the antigen slowly in the organism and in that way can increase the half-life of the antigen and improve uptake by professional phagocytes (Amy et al., 2010; Mosca et al., 2008). Although Smtreg stimulates the production of molecules involved in antigen presentation and Th1 polarization, its rapid clearance from the site of injection could explain weak immune response activation and the absence of protective response. Nevertheless, while measuring specific antibody production, an increased level of specific IgG production against Smtreg was observed in immunized group from the beginning of the immunization protocol (Table 2). This result demonstrates that Smtreg immunization activates immune response in mice, and suggests that the absence of protection could be explained by the immune response profile induced by immunization rather than by the absence of immune response activation. Regarding immune response profile, while immunization with Smtreg + CFA/IFA induces a significant production of IgG2c, mice immunization with Smtreg failed to induce production of this isotype (Table 2), also higher titles of specific antibodies were detected in sera from mice immunized with Smtreg + CFA/IFA in comparison to the titles detected in sera from mice immunized with Smtreg in the absence of adjuvants.

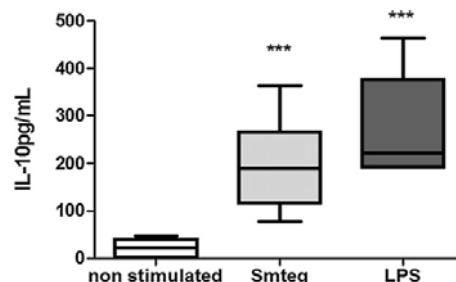


Fig. 4. Smtreg stimulates IL-10 production by BMDC. IL-10 levels were measured by ELISA in culture supernatants of BMDC after 24h stimulation. Cytokine measurement of IL-10 was performed using the DuoSet ELISA kit. Statistically significant differences between Smtreg or LPS stimulated cells and non stimulated cells are denoted by asterisks ( $p < 0.001$ ). Data represents mean values  $\pm$  SD of three independent experiments with 3 mice/group each.

Table 2  
Humoral immune response induced by Smtteg immunization.

	Saline		Saline + CFA/IFA		Smtteg		Smtteg + CFA/IFA		IgG2c <sup>e</sup>
	IgG <sup>d</sup>	IgG1 <sup>d</sup>	IgG2c <sup>d</sup>	IgG <sup>d</sup>	IgG2c <sup>d</sup>	IgG <sup>d</sup>	IgG <sup>d</sup>	IgG <sup>c</sup>	
15 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.36 ± 0.20 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.06
30 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.07	0.13 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.32 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.80 ± 0.23 <sup>c,e</sup>	0.15 ± 0.10 <sup>c</sup>
45 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.12	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.08	0.08 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.03	0.82 ± 0.21 <sup>c,e</sup>	0.21 ± 0.10 <sup>c,e</sup>
60 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.08 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.41 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.02	0.79 ± 0.22 <sup>c,e</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>c,e</sup>
75 <sup>a,b</sup>	0.05 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.02	0.84 ± 0.39 <sup>c,e</sup>	0.27 ± 0.12 <sup>c</sup>
105 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.24 ± 0.12	0.30 ± 0.09	0.03 ± 0.01	0.53 ± 0.65	0.07 ± 0.02	0.74 ± 0.20 <sup>c,e</sup>	0.22 ± 0.08 <sup>a</sup>

\* Statistically significant differences compared to respective control group,  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> Days after first immunization.

<sup>b</sup> 15 days after challenge infection.

<sup>c</sup> Statistically significant differences compared to Smtteg group,  $p < 0.05$ .

<sup>d</sup> Results are expressed as mean ± SD, absorbance in OD450 nm.

IFN- $\gamma$  is a pro-inflammatory cytokine that augments the immune response to infection by promoting leukocyte activation and, its role in protective immunity against schistosomiasis has already been demonstrated (Fonseca et al., 2004; Hoffmann et al., 2000; Jankovic et al., 1999; Yu et al., 2011). A significant increase in the frequency of CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells was observed in stimulated cells from immunized group in comparison to control group and to non-stimulated cells (Fig. 2). Also a significant production of IFN- $\gamma$  was detected in response to Smtteg, in vitro, stimulation in the supernatant of spleen cells from immunized and non-immunized mice (Fig. 3). These results indicate that although Smtteg immunization leads to IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> cells, Smtteg also stimulate other cells to produce IFN- $\gamma$  through an unspecified manner. One possible source of IFN- $\gamma$  production in non-immunized mice could be NK and NKT cells since these cells are the major producers of IFN- $\gamma$  during innate immune response (Mallevaey et al., 2006). However the sources of this cytokine in non-immunized mice still need to be elucidated. Although significant production of IFN- $\gamma$  was detected in spleen cell supernatant from mice immunized with Smtteg as well as from mice immunized with Smtteg + CFA/IFA in comparison to control group, in Smtteg immunized mice significant production of IL-10 in comparison to control and Smtteg + CFA/IFA groups was observed (Fig. 3). Also an increased frequency of CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> cells in Smtteg immunized group (Fig. 2) was observed after Smtteg in vitro stimulation. No significant difference in CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> cells was observed between non-vaccinated and vaccinated mice under Smtteg-stimulated, while a significantly higher concentration of IL-10 was detected in spleen cells supernatant from Smtteg immunized mice compared to control and Smtteg + CFA/IFA groups (Fig. 3), probably because although the percentage of CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> cells do not differ between groups these cells in Smtteg group are producing larger amount of IL-10.

Moreover, BMDC stimulated in vitro with Smtteg showed significant production of IL-10 in comparison to non-stimulated BMDC (Fig. 4). IL-10 detection in Smtteg-stimulated BMDC was specifically produced, since the amount of endotoxin detected in Smtteg was not able to activate BMDC neither to induce any cytokine production (data not shown). IL-10 is a cytokine that regulates immune response by several distinct mechanisms (Fiorentino et al., 1991; Flores-Villanueva et al., 1996; Moore et al., 2001; Sadler et al., 2003; Teixeira-Carvalho et al., 2008). DC secreting IL-10 drives naive T cells into IL-10 secreting Tr1 cells (Gregori et al., 2010; Igyarto et al., 2009; Wakkach et al., 2003). This regulatory status can be reverted by TLR9 stimulation with CpG or TLR4 stimulation with LPS leading DCs to induce Th1 and Th1/Th17 respectively (Zhou et al., 2010).

Our results showed that Smtteg immunization in the absence of adjuvant induces a predominant modulatory response with high IL-10 production that may have resulted in an impaired inflammatory and effector response and in the lack of protection. Smtteg molecules involved in immune response modulation still need to be identified.

#### Acknowledgments

The authors thank the program for technological Development in tools for Health-PDTIS FIOCruz for use of its facilities. This work was supported by CNPq; INCT-DT/CNPq; Ripag/CPqRR-Fiocruz.

Fellowships: CPqRR/Fiocruz (TTM); PIBIC/CNPq (JMA); Capes (FVD) PIBIC/CNPq (ICS); Fapemig (CCA); PQ/CNPq (CTF).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.007>.

## References

- Amy, S.M., Megan, K.L.M., John, W.K., Philpa, M., 2010. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biology* 8, 37.
- Caldas, I.R., Correa-Oliveira, R., Colosimo, E., Carvalho, O.S., Massara, C.L., Colley, D.G., Gazzinelli, G., 2000. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62, 57–64.
- Donald, P.M., Alex, L., 2008. Current Status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1), 225–242.
- Durães, F.V., Carvalho, N.B., Melo, T.T., Oliveira, S.C., Fonseca, C.T., 2009. IL-12 and TNF- $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunology Letters* 125, 72–77.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology* 147, 3815.
- Flores-Villanueva, P.O., Zheng, X.X., Strom, T.B., Stadecker, M.J., 1996. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment downregulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *The Journal of Immunology* 156, 3315–3320.
- Foley, M., Kussel, J.R., Garland, P.B., 1988. Changes in the organization of the surface membrane upon transformation of cercariae to schistosomula of helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 96 (Pt 1), 85–97.
- Fonseca, C.T., Brito, C.F., Alves, J.B., Oliveira, S.C., 2004. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- $\gamma$  (and TNF-dependent) pathway. *Vaccine* 22, 503–511.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., Roncarolo, M.G., 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent IL14/HLA-G pathway. *Blood* 116, 935–944.
- Hewitson, J.P., Hamblin, P.A., Mountford, A.P., 2005. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunology* 27, 271–280.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., Wynn, T.A., 2000. IL10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of Immunology* 164 (12), 6406–6416.
- Hogg, K.G., Kumkate, S., Anderson, S., Mountford, A.P., 2003. Interleukin-12p40 secretion by cutaneous CD11c<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup> cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity* 71, 3563–3571.
- Igyarto, B.Z., Jenison, M.C., Dudda, J.C., Roers, A., Muller, W., Koni, P.A., Campbell, D.J., Shlomchik, M.J., Kaplan, D.H., 2009. Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *Journal of Immunology* 183, 5085–5093.
- Jankovic, D., Wynn, T.A., Kullberg, M.C., Hieny, S., Caspar, P., James, S., Cheever, A.W., Sher, A., 1999. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- $\gamma$  dependent effector mechanisms. *Journal of Immunology* 162, 345–351.
- James, S.L., 1981. In vitro proliferative response to living schistosomula by T lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 83(Pt 1), 147–162.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P., McManus, D.P., 2004. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Bioessays* 26, 752–765.
- Lutz, M.B., Kutschner, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G., 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 223, 77–92.
- Mallevaey, T., Zanetta, J.P., Faveeuw, C., Fontaine, J., Maes, E., Platt, F., Capron, M., de-Moraes, M.L., Trottein, F., 2006. Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* 176, 2476–2485.
- Moore, K.W., de Wall Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19, 683.
- Mosca, F., Tritto, E., Muzzi, A., Monaci, E., Bagnoli, F., Lavarore, C., O'Hagan, D., Rappuoli, A., De Gregorio, E., 2008. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10501–10506.
- Pellegrino, J., Siqueira, A.F., 1956. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Revista Brasileira De Malariologia e Doenças Tropicais* 8, 589–597.
- Ramalho-Pinto, F.J., Gazzinelli, G., Howells, R.E., Mota-Santos, T.A., Figueiredo, E.A., Pellegrino, J., 1974. *Schistosoma mansoni*: de novo system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula in vitro. *Experimental Parasitology* 36 (3), 360–372.
- Rezende, C.M., Silva, M.R., Santos, I.G., Silva, G.A., Gomes, D.A., Goes, A.M., 2011. Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: effects on granuloma down-modulation and cytokine production. *Immunology Letters* 141 (1), 123–133.
- Sadler, C.H., Rutitzky, L.I., Stadecker, M.J., Wilson, R.A., 2003. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Immunology* 33 (4), 880–888.
- Smythies, L.E., Coulson, P.S., Wilson, R.A., 1992. Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modulates pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *Journal of Immunology* 149, 3654–3658.
- Simpson, A.J., James, S.L., Sher, A., 1983. Identification of surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni* recognized by antibodies from mice immunized by chronic infection and by exposure to highly irradiated cercariae. *Infection and Immunity* 41, 591–597.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
- Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Magalhães, V.P., Lemos, D.S., Malaquias, L.C.C., Oliveira, L.F.A., Silveira, A.M.S., Gazzinelli, A., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R., 2008. Cytokines, chemokine receptors, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HIGH<sup>+</sup> T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Tropica* 108, 139–149.
- Teixeira de Melo, T., Michel de Araujo, J., Do Valle Durães, F., Calian, M.V., Oliveira, S.C., Coelho, P.M., Fonseca, C.T., 2010. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. *Parasite Immunology* 32 (11–12), 749–759.
- Van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F., Van Balkom, B.W., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B., Tielens, A.G., 2006. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International Journal for Parasitology* 36, 691–699.
- Vignali, D.A., Crocker, P., Bickle, Q.D., Cobbold, S., Waldmann, H., Taylor, M.G., 1989. A role for CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. *Immunology* 67, 466–472.
- Yu, L., Sun, X., Yang, F., Shen, J., Wu, Z., 2011. Inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 and TNF- $\alpha$  alterations in schistosomiasis: a meta-analysis. *Parasitology Research*, Epub ahead of print.
- Zhou, Y., Kawasaki, H., Hsu, S.C., Lee, R.T., Yao, X., Plunkett, B., Fu, J., Yang, K., Lee, Y.C., Huang, S.K., 2010. Oral tolerance to food-induced systemic anaphylaxis mediated by the C-type lectin SIGNR1. *Nature Medicine* 16, 1128–1133.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.P., Cottrez, F., Groux, H., 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunology* 18, 605–617.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Betis, C., Dowking, M.A., Smythies, L.E., 1996. Impaired immunity and altered pulmonary response in mice with a disrupted interferon- $\gamma$  receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 87, 275–282.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., Jankovic, D., Poindexter, R.W., Caspar, P., Lewis, F.A., Sher, A., 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 376, 594–596.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology* 7, 505–511.



Para avaliar a capacidade de duas formulações vacinais com diferentes adjuvantes (Alum e CPG-ODN) induzirem proteção em camundongos, nós imunizamos camundongos com: Smtteg + alum ou Smtteg + alum + CpG-ODN. Nossos resultados demonstraram que os camundongos imunizados com Alum como adjuvante não apresentaram redução significativa da carga parasitária. Já o grupo imunizado com Smtteg + alum + CpG-ODN apresentou uma significativa redução da carga parasitária (43%) além de redução no número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos. Em relação à resposta humoral, ambas as formulações vacinais induziram níveis significativos de IgG, mas apenas os camundongos imunizados com CpG-ODN apresentavam altos níveis de IgG2c. O aumento dessa imunoglobulina pode estar relacionado à proteção já que quando se imunizou camundongos com Smtteg mais Freund também foram verificados níveis significativos desse isotipo de anticorpo. Em relação à resposta celular, a imunização com Alum como adjuvante induziu um perfil de resposta imune predominantemente do tipo Th2 com alta produção de IL-4, enquanto a imunização com CPG-ODN levou a um perfil misto de resposta com alta produção de IFN- $\gamma$  e IL-4. Nossos resultados também demonstraram que a imunização com CpG-ODN levou a ativação de célula CD4<sup>+</sup>, macrófagos e aumento no percentual de células B (Teixeira de Melo et al., 2012).



## Original article

# Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN

Tatiane Teixeira de Melo <sup>a,1</sup>, Juliano Michel Araujo <sup>a,1</sup>, Isabela Campos de Sena <sup>a</sup>,  
Clarice Carvalho Alves <sup>a</sup>, Neusa Araujo <sup>a</sup>, Cristina Toscano Fonseca <sup>a,b,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil

Received 25 June 2012; accepted 9 October 2012

Available online 23 October 2012

## Abstract

In schistosomiasis, the current control strategy does not prevent reinfection, therefore, vaccine strategies are essential to combat the *Schistosoma mansoni*. The efficacy vaccine depends on parasite stage and effective adjuvant. We have recently demonstrated that *S. mansoni* schistosomula tegument (Smteg) is able to activate dendritic cells up regulate CD40 and CD86 molecules and induce a partial protection in mice (43–48%) when formulated with Freund's adjuvant. In this study we evaluated the ability of Smteg  $\beta$  alum or Smteg  $\beta$  alum  $\beta$  CpG-ODN to induce protection in mice. Our results demonstrate that Smteg  $\beta$  alum  $\beta$  CpG-ODN induced a partial reduction in worm burden (43.1%), reduction in the number of eggs eliminated in the feces. The protective response was associated with a predominant Th1 type of immune response, with increased production of specific IgG2c, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , B cells proliferation and CD4 cells and macrophages activation.

© 2012 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; Vaccine; Alum; CpG-ODN; Parasite

## 1. Introduction

Schistosomiasis is a helminthic infection that affects more than 200 million people worldwide with 779 million people at risk of infection [1]. Actually, the control strategy is mainly based on chemotherapy but, in spite of decades of mass treatment, the number of infected people remains constant. Moreover, chemotherapy cannot prevent re-infection, and there is evidence supporting the development of drug-resistant parasites [2,3]. Therefore alternative control strategies, such as vaccine development, that could be integrated into ongoing control programs are needed [4].

Successful vaccine formulation depends on the use of immunogenic antigens together with an appropriate adjuvant able to induce the desirable immunological response. Adjuvants have empirically been used to enhance the adaptive immune responses elicited by the vaccination, however advances in the study of the innate immune system revealed that many adjuvants act through the innate immune receptors including Toll-Like Receptors, Nod-Like Receptors, RIG-I-Like Receptors, and C-type Lectin Receptors directly activating dendritic cells (DC) antigen presentation and T-cell activation [5,6]. Aluminum salts have been commonly used as an adjuvant for years, however, their mechanisms of action are only partially understood [7,8]. Recently, Flach et al. [9] demonstrated that alum triggers lipid sorting on dendritic cells that leads to phagocytic response and antigen uptake. Regardless the mechanism of action, aluminum hydroxide induces a Th2 response in mice, causing induction of IgG1 and IgE, but has low capacity to stimulate strong cellular immune responses [10,11].

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.10.007>

\* Corresponding author. Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP: 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 33497828.

E-mail address: [ctoscano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:ctoscano@cpqrr.fiocruz.br) (C. Toscano Fonseca).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.



Due to its immunostimulatory activity through TLR9, synthetic unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (ODN) has been used as experimental adjuvant in vaccine formulations [5]. CpG-ODN is able to stimulate NK cells and murine B cells to proliferate and secrete immunoglobulin in vitro and to express activation markers and to secrete pro-inflammatory cytokines in vivo [12,13]. The Th1-like response generally induced by CpG-ODN might be useful in vaccines against intracellular pathogens [14] and against schistosomiasis since protective immunity induced by immunization depends on IFN-g and TNF-a production [15e17]. Indeed, the use of CpG-ODN as adjuvant in a genetic immunization with Sm-p80 resulted in significant reduction in worm burden [18].

Recently, our group demonstrated that *Schistosoma mansoni* schistosomula (Smteg) tegument plays an important role in triggering the immune response against the parasite. Smteg is able to activate DC leading to an increase in the expression of CD40 and CD86 molecules on its surface and in the production of IL-12 and TNF-a [19] and induces partial protection in mice (43e48%) when formulated with Freund's adjuvant [20].

Herein, we showed that immunization of mice with Smteg plus alum and CpG-ODN induced partial reduction in worm burden and also reduction in the number of eggs eliminated within the feces. Smteg/alum/CpG-ODN formulation increased the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in spleen, IgG2c antibodies in sera, IFN-g, IL-4 and TNF-a specific production by spleen cells and macrophage activation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice and parasites

Female C57BL/6 mice aged 6e8 weeks were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) facilities. All procedures involving animals were approved by the local Ethics Commission on Animal Use (CEUA) (L-005/08). Cercariae of *S. mansoni* (LE strain) were routinely maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and obtained by exposing infected snails to light for 1 he2 h to induce cercariae shedding. The number of cercariae and their viability were determined using a light microscope.

### 2.2. Tegument purification (Smteg)

Cercariae from *S. mansoni* were mechanically transformed into skin-stage schistosomula according to Ramalho-Pinto et al. [21]. The tegument was removed with CaCl<sub>2</sub> 0.3 M by vortex agitation [22]. The tegument was separated from denuded bodies by centrifugation at 900 g for 1 min. The supernatants were pooled and centrifuged at 50,000 g for 1 h at 4 °C. The pellet was dialyzed against 1.7% saline for 48 h and physiological saline for 24 h. This preparation was termed Smteg.

### 2.3. Immunization of mice

Female C57BL/6 mice (10 mice per group) were subcutaneously immunized in the nape of the neck with 25 mg Smteg

on days 0, 15 and 30. The antigen was formulated with alum or alum plus 50 mg of CpG-ODN. In the control groups, saline with alum or alum plus CpG-ODN was administered using the same immunization protocol. Blood samples were collected from retro orbital sinus of each mouse with an interval of fifteen days beginning 15 days after the first immunization. Serum samples were collected and stored at -20 °C until use. Three independent experiments were performed to confirm the results observed.

### 2.4. Challenge infection and parasite burden determination

Thirty days after the last boost, mice were challenge through percutaneous exposure of abdominal skin for 1 h in water containing 100 cercariae (LE strain) as described by Smithers and Terry [23]. Fifty days after challenge, adult worms were perfused from the portal system and mesenteric veins according to Pellegrino and Siqueira [24]. On days 48, 49 and 50 after challenge infection, 0.5 g of fecal material from each mouse group were analyzed for egg burden determination by HPJ methods [25]. In HPJ, whole sediment was evaluated to determine egg per gram of feces (epg).

### 2.5. Measurement of specific antibodies

The measurement of specific anti-Smteg IgG, IgG1 and IgG2c antibodies was performed in individual bases by ELISA as previously described [20].

### 2.6. Cytokine analysis

Experiments were performed using spleen cell culture supernatants from five individual mice per group immunized with Smteg/alum; Smteg/alum/CpG and a non immunized group, one week after the last immunization. The cells obtained from mice spleen were washed twice in sterile saline and then adjusted to 1 × 10<sup>6</sup> cells/well. Spleen cells were maintained in culture at 37 °C in 5% of CO<sub>2</sub> in medium alone or stimulated with Smteg (25 mg/mL) or concanavalin A (Con A) (5 mg/mL). Culture supernatants were collected after 24 h stimulation to measure IL-4 and TNF-a or 72 h stimulation to measure IFN-g. Cytokine assay was performed using the DuoSet ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN) or Ready set GO (e-bioscience, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions.

### 2.7. Intracytoplasmatic cytokine staining

For intracytoplasmatic cytokine staining, spleen cells from 4 mice/group/experiment were adjusted to 5 × 10<sup>5</sup> cells per well. Cells were maintained in culture at 37 °C in 5% of CO<sub>2</sub> in medium alone or stimulated with Smteg (25 mg/mL) or Con A (5 mg/mL). After 16 h of culture, 1 mg/well of brefeldin A (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was added to impair cytokine secretion. After 4 h of incubation, these cells were stained for surface markers and intracellular cytokines. Before

staining the cells were generally blocked with anti-mouse CD16/CD32 mAbs (Fc-Block, BD Pharmingen). After that, cells were stained for surface markers using anti-CD4 biotin (clone GK1.5, BD-Pharmingen), anti-CD8 FITC (clone 53-6-7, e-bioscience), anti-CD19 FITC (clone 1D3, BD Pharmingen) and anti-F4/80 biotin (clone BM8, e-bioscience) monoclonal antibodies and their respective isotype controls by incubation for 20 min with antibody solution (PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM NaN<sub>3</sub>) at 4 °C. After a wash step with PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM NaN<sub>3</sub> cells were submitted to a further incubation step of 20 min with streptavidin-Percp labeled diluted 1:200 with antibody solution at 4 °C, washed and submitted to fixation using 2% formaldehyde solution. These cells were permeabilized and further stained with PE-labeled anti-IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2, e-bioscience), anti-TNF- $\alpha$  (clone MPGXT22, e-bioscience), anti-IL-4 (clone 11B11, BD Pharmingen) and anti-IL-10 (clone JES5-16E3, e-bioscience) or APC labeled anti-IL-10 (clone JES5-16E3, BD Pharmingen) monoclonal antibodies in PBS with 0.5% saponin. After 30 min at room temperature, cells were washed with permeabilization solution, resuspended in PBS and read using FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data analysis was performed using a FlowJO interface (Tree Star, Ashland, OR).

### 2.8. Immune cells activation pattern

For ex vivo cellular staining, spleen cells from 4 mice/group/experiment were adjusted to  $5 \times 10^5$  cells per well. Before staining, the cells were generally blocked with anti-mouse CD16/CD32 mAbs (Fc-Block, BD bioscience), after that cells were stained for surface markers using anti-CD4 Biotin (clone GK1.5, e-bioscience), anti-CD8 FITC (clone 53-6-7, e-bioscience), anti-CD19 FITC (clone 1D3, BD Pharmingen), anti-F4/80 FITC (clone BM8, e-bioscience), anti-CD86 Biotin (cloneGL.1, e-bioscience), anti-IaB PE (clone M5/11414.2, e-bioscience), anti-CD25 PE (clone PC61.5, e-bioscience) and anti-CD69 PE (clone H1.2F3, e-bioscience) monoclonal antibodies and their respective isotype controls by incubation for 20 min with antibody solution at 4 °C, after washed with PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM NaN<sub>3</sub>, cells were submitted to a further incubation step of 20 min with streptavidin-Percp (e-bioscience) labeled diluted 1:200 in antibody solution at 4 °C, followed by two washes steps and fixation using 2% formaldehyde solution. The labeled cells data were obtained using FACSCalibur (Becton Dickinson,

San Jose, CA). Data analysis was performed using a FlowJO interface (Tree Star, Ashland, OR).

### 2.9. Statistical analysis

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

## 3. Results

### 3.1. Protective response induced by Smtteg immunization in association with two different adjuvant formulations

Two different adjuvant formulations were evaluated together with Smtteg: Smtteg/alum and Smtteg/alum/CpG-ODN. Immunization with Smtteg/alum did not result in significant reduction in worm burden or in the number of eggs eliminated in the feces compared to saline/alum control group (Table 1) while immunization with Smtteg/alum/CpG-ODN elicited significant reduction in the number of adult parasites (43.1%) and a significant reduction of 55.21% in the numbers of eggs eliminated in the feces (Table 1).

### 3.2. Antibody responses to Smttegealum or Smttegealum e CpG-ODN immunization

Significant increased levels of anti-Smtteg IgG antibodies were detected in the sera of Smtteg immunized mice compared to control groups at all timepoint analyzed (Fig. 1A) regardless adjuvant. Smtteg/alum or Smtteg/alum/CpG-ODN immunization induced a significant increased production of specific anti-Smtteg IgG1 compared to control groups at all timepoint analyzed (Fig. 1B). However, only in the group of mice immunized with Smtteg/alum/CpG-ODN a significant increased production of specific anti-Smtteg IgG2c was observed (Fig. 1C).

### 3.3. Immune cell profile induced by immunization

Both adjuvant formulations induced an increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in comparison to control group and no significant difference in the percentage of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells was observed (Fig. 2). Regarding the CD69 expression, an increase in the percentage of

Table 1  
Protective immune response induced in mice by Smtteg immunization in different adjuvant formulation.

Groups	Worm burden recovered (mean $\pm$ SD from three independent experiments)			Protection level <sup>a</sup>	Eggs/gram of feces (mean SD)		Reduction of egg in feces <sup>b</sup>
	Female	Male	Total				
Saline $\pm$ alum	18	5	40		748	113	
Smtteg $\pm$ alum	17	5	34	8.1%	625	6	16.4%
Saline $\pm$ alum $\pm$ CpG-ODN	21	4	44		824	295	
Smtteg $\pm$ alum $\pm$ CpG-ODN	13	5	25	43.1%*	369	80	55.2%*

\*p < 0.05 compared to respective control group.

<sup>a</sup> Reduction in worm burden in immunized groups compared to their respective control groups (mean of three independent trials).

<sup>b</sup> Reduction in the number of eggs eliminated with the feces from immunized groups compared to their respective controls (mean of three independent trials).

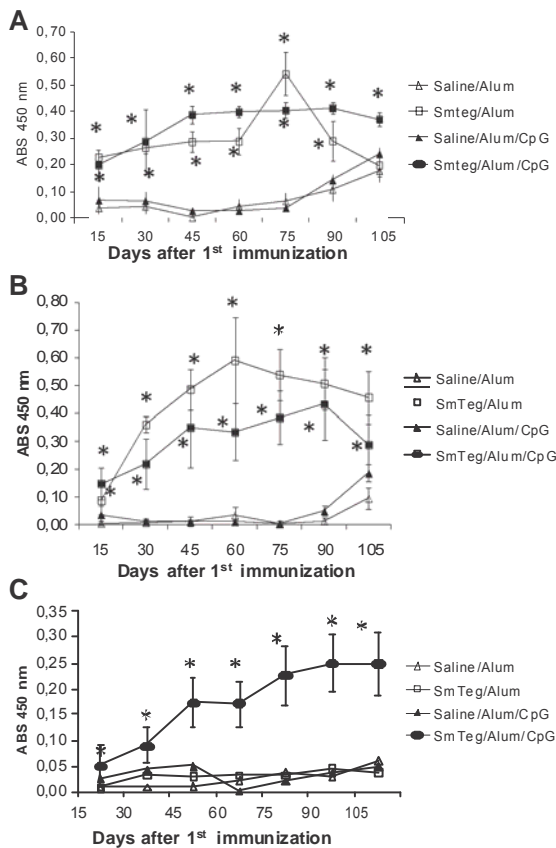


Fig. 1. Kinetics of specific anti-Smteg IgG(A), IgG1(B) and IgG2c(C) production in immunized mice. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smteg (25 mg/mice) or saline. The antigen and saline was formulated with alum or alum CpG-ODN. Sera samples were obtained from 10 individual mice from each group on days 15, 30, 45, 60, 75, 90 and 105 after the first immunization dose and used in ELISA in a Smteg (1 mg/mL) coated plate diluted 1:100 (IgG and IgG1) or 1:200 (IgG2c). Results are presented as mean absorbance  $\pm$  SD measured at 450 nm. Statistically significant differences between Smteg/alum or Smteg/alum CpG and saline immunized groups are denoted by asterisks ( $p < 0.05$ ). Representative result of one from two independent experiments.

CD4 $\beta$ CD69 $\beta$  and CD8 $\beta$ CD69 $\beta$  cells was observed in Smteg/alum formulation (Fig. 2A). An increased percentage in CD19 $\beta$  cells was observed in non-stimulated and Smteg-stimulated spleen cells from mice immunized with Smteg/alum/CpG-ODN in comparison to control group and to Smteg/alum group (Fig. 2B).

### 3.4. Cytokine profile induced by immunization

Significant IL-4 production, a signature of Th2-type of immune response, was detected in the spleen cells supernatant from the animals immunized with Smteg/alum and Smteg/alum/CpG-ODN in comparison to control group (Table 2), however in Smteg/alum group IL-4 levels was 2-fold higher

than the IL-4 level detected in Smteg/alum/CpG-ODN group. Additionally a significant higher production, by spleen cells, of IFN-g and TNF-a were detected in Smteg/alum/CpG-ODN immunized group when compared to control group (Table 2), and also, a significant increased spleen cells production of IFN-g and TNF-a were detected in Smteg/alum/CpG-ODN immunized group when compared to Smteg/alum group (Table 2). Significant increased TNF-a production was also detected in Smteg/alum group in comparison to control group, but the levels of TNF-a detected in this group was 3.5-fold lower than the levels detected in Smteg/alum/CpG-ODN group. To determine the major source of cytokine production, we performed intracellular cytokine staining in CD4 $\beta$  and CD8 $\beta$  cells in spleen from control, Smteg/alum, Smteg/alum/CpG-ODN immunized mice and control group. A significant increase in the percentage of CD4 $\beta$ TNF-a $\beta$  cells were observed in Smteg/alum and Smteg/alum/CpG-ODN under Smteg in vitro stimulation. In comparison to control group, an increase in the percentage of CD4 $\beta$ TNF $\beta$  cells and CD4 $\beta$ IL-4 $\beta$  cells were observed in Smteg/alum group under Smteg in vitro stimulation. Also an increase in the percentage of CD4 $\beta$ TNF-a $\beta$ , CD8 $\beta$ IFN-g, CD8 $\beta$ TNF-a $\beta$  and CD8 $\beta$ IL-4 $\beta$  cells was observed in Smteg/alum/CpG-ODN group compared to control group and in CD4 $\beta$ TNF-a $\beta$  cells compared to Smteg/alum group (Fig. 3).

### 3.5. Immunization effect on macrophages

Activation status and cytokine production by macrophages was accessed by flow cytometry. Smteg/alum and Smteg/alum/CpG-ODN groups presented an increased percentage of F4/80 $\beta$ CD86 $\beta$  cells in comparison to control group. Both groups also showed an increased percentage of F4/80 $\beta$ IFN-g $\beta$  cells compared to control group. Nevertheless, in Smteg/alum group an increase in F4/80 $\beta$ IL-4 $\beta$  cells was observed in comparison to control and Smteg/alum/CpG-ODN groups. Immunization, regardless of vaccine formulation, also induced a decrease in the percentage of F4/80 $\beta$ IL-10 $\beta$  cells compared to control group (Fig. 4).

## 4. Discussion

Due to the inability of chemotherapy to limit reinfection and control transmission, schistosomiasis is still at the top of the list of endemic diseases of public health importance in the world [26]. The development of an effective vaccine against this disease is desirable to be used as an alternative tool in disease control [4]. In this context, both antigen and adjuvant choice represents important steps in vaccine design. Recently our group has demonstrated that *S. mansoni* schistosomula tegument (Smteg) plays an important role in activating host immune response. In vitro, Smteg is recognized by bone marrow dendritic cells (BMDC) inducing up-regulation of CD40 and CD86 expression and the production of IL-12 and TNF-a cytokines [19]. Furthermore, mice immunization with Smteg and Freund's adjuvant, induces partial protection (43%–48%) in mice [20].

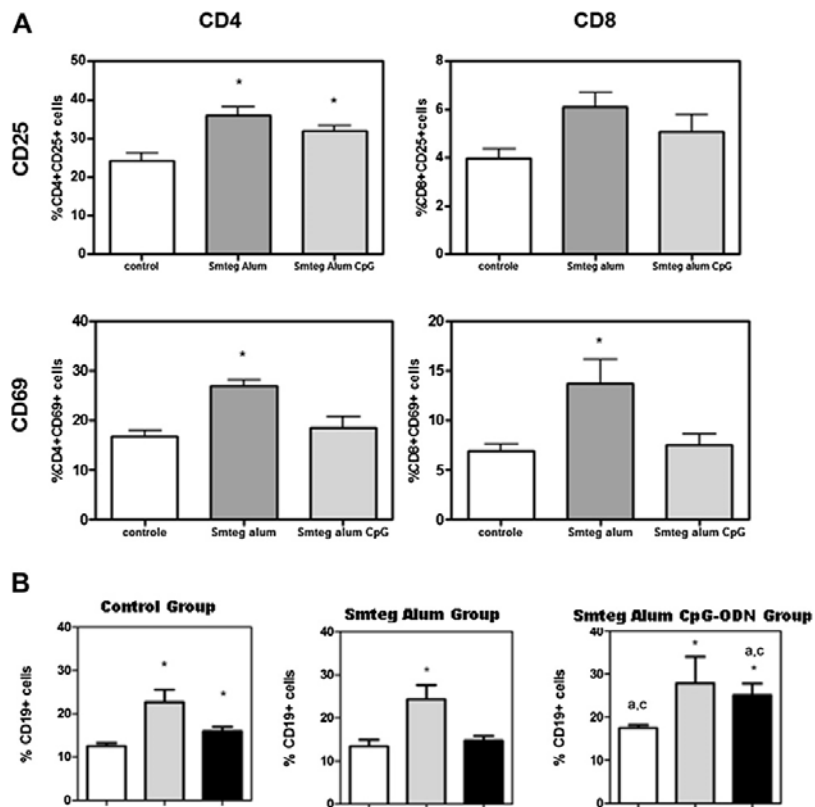


Fig. 2. Immune cells profile. Spleen cells obtained from four mice per group: immunized with Smtreg/alum; Smtreg/alum/CpG-ODN and a non immunized were cultured and adjusted to  $5 \times 10^5$  cells/well, these cells were stained for surface markers using anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, CD69 and anti-CD19 monoclonal antibodies with their respective isotype controls. (A) Bar chart representing the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells or CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells from control, Smtreg/alum and Smtreg/alum/CpG-ODN groups. (B) Bars represent the percentage of CD19<sup>+</sup> cells in control, Smtreg/alum and Smtreg/alum/CpG-ODN groups. The white bars represent the percentage of CD19<sup>+</sup> cells in non-stimulated culture, gray bars represent Con A-stimulated culture and black bars represent Smtreg-stimulated culture. Asterisk denotes differences between non-stimulated cells and Con A or Smtreg in the same group while statistically significant differences to control, Smtreg/alum or Smtreg/alum CpG-ODN groups are indicated to the letter a, b or c respectively ( $p < 0.05$ ). Representative result of one from two independent experiments.

Herein we immunized mice with Smtreg/alum or Smtreg/alum/CpG-ODN in order to evaluate the ability of both formulations to induce protection. Mice immunization with Smtreg/alum elicited no protection while immunization with Smtreg/alum/CpG-ODN led to a significant reduction in worm burden and in the number of eggs eliminated with the feces. Although alum has been safely and successfully used in

several of licensed vaccine, its inability to elicit cell-mediated immune response and [27,28] Th1 response [29,30] has been described. On the other hand, several researchers have shown that CpG-ODN up regulates antigen-presentation molecules expression, induces a Th1 type of immune response and promotes immunoglobulin (Ig) isotype switching [31e33].

Table 2  
Cytokine production by immunized mice.

	Control		Smtreg $\beta$ alum		Smtreg $\beta$ alum $\beta$ CpG-ODN							
	Non-stimulated	Smtreg-stimulated	Non-stimulated	Smtreg-stimulated	Non-stimulated	Smtreg-stimulated						
IFN-g	50.0	28.9	1224.0	522.1	0.4	0.2	1735.0	485.3	86.1	86.1	7834.0	535.9****a
IL-4	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0	5963.0	1506.0**	0.3	0.3	3288.0	789.0*
TNF-a	23.5	23.5	49.6	28.5	0.0	0.0	166.7	71.9*	0.4	0.2	591.0	77.1****a

Significant difference compared to Smtreg  $\beta$  alum group <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>aaa</sup> $p < 0.001$ .  
Significant difference compared to non-stimulated cells \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

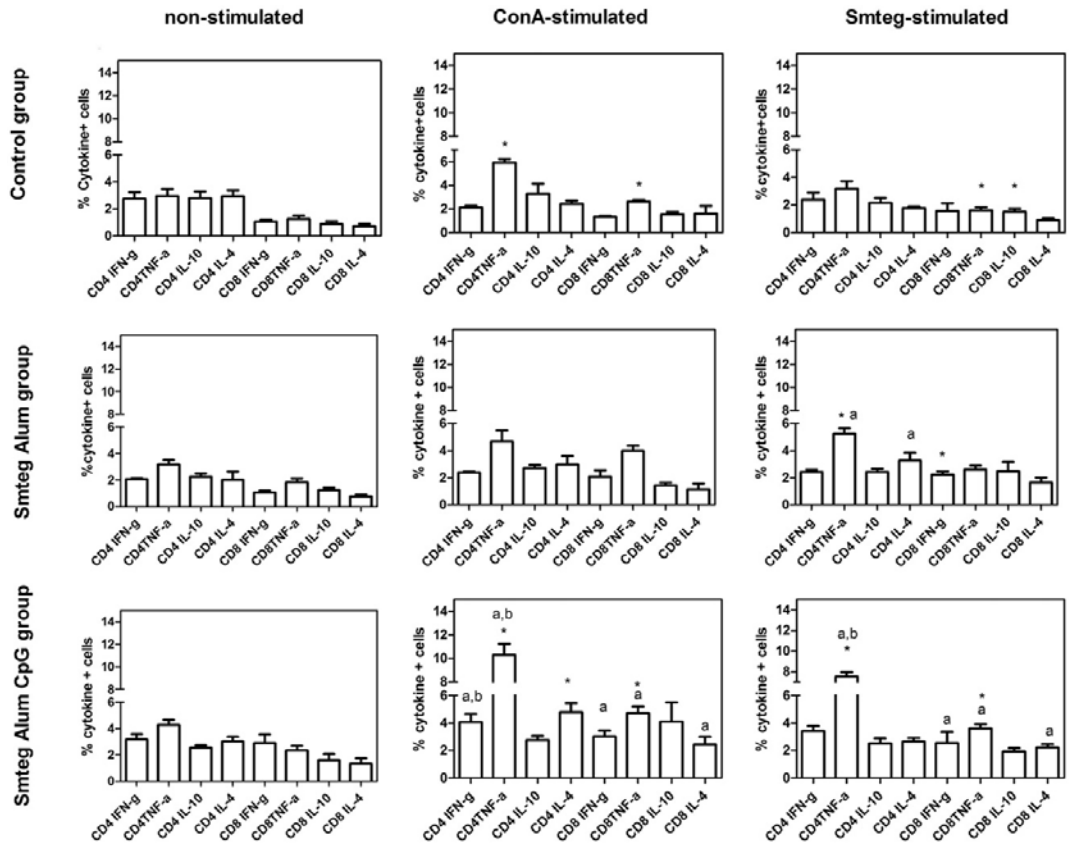


Fig. 3. Intracytoplasmic cytokine staining in lymphocyte subpopulations. Mice were immunized with three doses of a vaccine formulation containing Smtreg/alum, Smtreg/alum/CpG-ODN or saline. Ten days after the last immunization dose, mice were sacrificed and spleen cells were obtained from each individual mouse. CD4 $\beta$  and CD8 $\beta$  production of IFN-g, IL-4, TNF-a, IL-10 in response to Con A (5 mg/mL) or Smtreg (25 mg/mL) in vitro stimulation were determined. Bars represent the mean  $\pm$  SD of the percentage of CD4 $\beta$  or CD8 $\beta$  cytokine $\beta$  cells in non-stimulated, Con A-stimulated and Smtreg-stimulated cells. Statistically significant differences between Con A or Smtreg stimulated cells and non-stimulated cells are denoted by an asterisk. Statistically significant differences to control, Smtreg/alum or Smtreg/alum CpG-ODN groups are indicated to the letter a, b or c respectively ( $p < 0.05$ ). Data represent the mean values of two independent experiments with 4 animals/group each.

Protective immunity against *S. mansoni* involves both cellular and humoral immune responses [15]. In our study, both Smtreg/alum and Smtreg/alum/CpG-ODN induced significant production of specific IgG antibodies, but only in Smtreg/alum/CpG-ODN group a significant production of IgG2c against Smtreg was detected. The same immunoglobulin profile was observed in Smtreg/CFA/IFA formulation that also elicited protection against challenge infection in mice [20]. Similar immunoglobulin profile has been associated with protection when other schistosome antigens were tested [17,34,35].

The ability of CpG motifs to induce B cell proliferation has been described by Krieg and co-workers in 1995 [13]. Indeed CpG-ODN (1826) used in our immunization protocol belongs to class B CpG, that is known to induce strong B cell responses [36]. Indeed a higher percentage of CD19 $\beta$  cells were detected in spleen from Smtreg/alum/CpG-ODN immunized mice in comparison to Smtreg/alum and control

groups even under no stimulation. Also, Smtreg in vitro stimulation resulted in significant increase in the percentage of CD19 $\beta$  cells in Smtreg/alum/CpG-ODN immunized mice, indicating that this formulation induce B cell proliferation in spleen.

CD69 and CD25 are early and late activation markers for antigen-specific stimulated T-cells, respectively [37]. Both formulations tested in our study were able to activate CD4 $\beta$  cells, although Smtreg/alum seems to induce a delayed CD4 $\beta$  activation, supported by the high percentage of CD4 $\beta$ CD69 $\beta$  early activated cells observed in this group 10 days after the last immunization dose. CD8 T cell prime has been reported in human immunization with alum as adjuvant [38,39], herein a significant increase in CD8 $\beta$ CD69 $\beta$  cells was observed in Smtreg/alum group.

Cytokine measurement in spleen cells culture supernatant demonstrated that the cytokine profile induced by vaccine

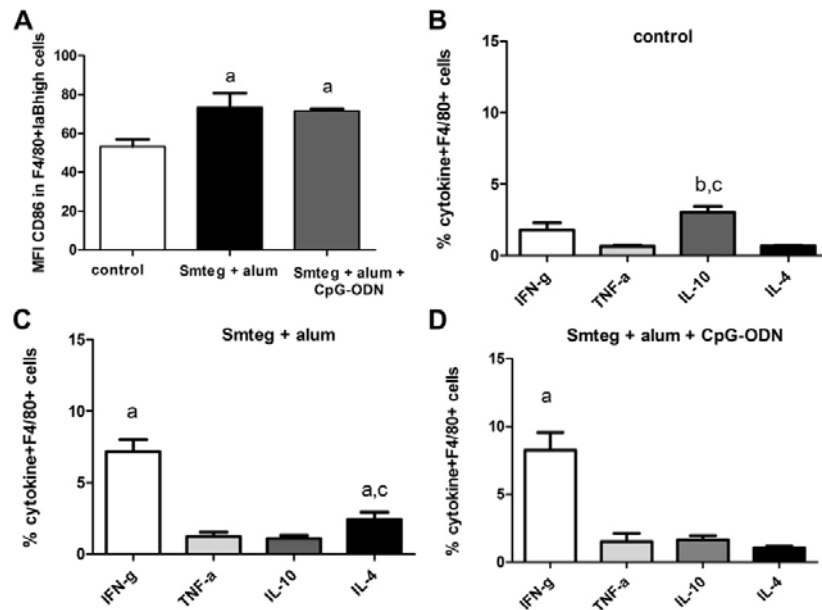


Fig. 4. Smtæg + alum and Smtæg + alum + CpG-ODN induce up-regulation of CD86 expression on macrophages and increased cytokine production. Spleen cells obtained from four mice per group: immunized with Smtæg/alum; Smtæg/alum/CpG-ODN and a non-immunized were cultured and stained for surface markers using anti-F4/80, anti-IaB and anti-CD86 monoclonal antibodies with their respective isotype controls. For cytokine assay, intracellular staining of IFN-g, IL-4, TNF-a, IL-10 of F4/80<sup>+</sup>IaB<sup>+</sup> cells in response to Smtæg (25 mg/mL) or Con A (5 mg/mL) in vitro stimulation. (A) Graphics show the mean fluorescence intensity (MFI) of CD86 in F4/80<sup>+</sup>IaB<sup>+</sup> cells in the control, Smtæg + alum and Smtæg + alum + CpG-ODN groups measured by flow cytometry. (B, C, D): Bars represent the mean ± SD of ex vivo cytokine production in control (B), Smtæg/alum (C) and Smtæg/alum/CpG-ODN (D) groups. Statistically significant differences between Smtæg/alum or Smtæg/alum/CpG group compared to control group are denoted by the letter a ( $p < 0.05$ ). Statistically significant differences in the percentage F4/80<sup>+</sup> cytokine<sup>+</sup> cells between control, Smtæg/alum and Smtæg/alum/CpG groups are denoted by the letters a, b and c respectively ( $*p < 0.05$ ).

formulations differs, while immunization with Smtæg/alum leads to a predominant Th2 type of immune response with significant production of IL-4, immunization with Smtæg/alum/CpG-ODN leads to a mixed type of immune response with significant production of IFN-g and IL-4. Both formulations lead to significant production of TNF-a. The role of IFN-g and TNF-a in protective immunity against schistosomiasis has been described [15,17,40,41]. The protection induced by irradiated cercaria vaccine, an important immunization model to study protection mechanism in schistosomiasis, involves a cell-mediated immune mechanism, dependent on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, IFN-g and TNF-a that correlates with macrophages activation and nitric oxide production [15,16,42e44].

The major source of TNF-a production in Smtæg/alum and Smtæg/alum/CpG-ODN groups seems to be CD4<sup>+</sup> and both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, respectively, since an increased percentage of these double positive cells were detected in the spleen from immunized mice. CD8<sup>+</sup> cells may contribute to IFN-g and IL-4 production in Smtæg/alum/CpG-ODN group, since a significant increase in the percentage of these cytokine producing cells were observed in comparison to control group. Macrophages and Nitric Oxide (NO) production have been described to be important in mediating parasite killing in vaccination-induced protective immunity [44]. Both Smtæg/

alum and Smtæg/alum/CpG-ODN formulations were able to induce macrophage activation as demonstrated by an increased expression of CD86 in F4/80<sup>+</sup> spleen cells from both groups. Nevertheless, different cytokine production in F4/80<sup>+</sup> cells was observed in these groups. While macrophages from Smtæg/alum immunized mice produced significant levels of IFN-g and IL-4 compared to control group, Smtæg/alum/CpG-ODN macrophages produced only significant levels of IFN-g. IL-4 production by macrophage has been described in vivo and in vitro [45e47] and contributes to the Th1/Th2 balance.

Several studies demonstrate that microbial products together with IFN-g activate macrophages to induce microbicidal activity in Th1-dominant response, while Th2 profile alternatively activate macrophages using IL-4 and IL-13 [48e50]. Alternatively, activated macrophages play an important role in resolving the damage caused by parasite infection [48e50]. Our results, demonstrate that CpG-ODN used as adjuvant together with Smtæg in a vaccine formulation against schistosomiasis induces a protective immune response associated with B cell proliferation, CD4 and macrophage activation and a mixed Th1/Th2 response with a predominant type 1 response with high IFN-g and TNF-a production that results in increased IgG2c specific production. Although Smtæg/alum/CpG-ODN did not significantly increase the protection levels induced by Smtæg plus Freund's



formulation, it represents an alternative adjuvant to be used instead of Freund's that is known to induce a strong inflammatory response and therefore is not considered a safe adjuvant to be used in humans.

#### Acknowledgments

The authors thank the program for technological Development in tools for Health-PDTIS FIOCRUZ for use of its facilities. This work was supported by CNPq; INCT-DT/CNPq, Ripag/CPqRR-Fiocruz.

Fellowships: CPqRR/Fiocruz (TTM); PIBIC/CNPq (JMA); PIBIC/CNPq (ICS); Fapemig (CCA); PQ/CNPq (CTF).

#### References

- [1] B. Gryseels, K. Polman, J. Clerinx, L. Kestens, Human schistosomiasis, *Lancet* 368 (2006) 1106e1118.
- [2] P.G. Fallon, M.J. Doenhoff, Drug-resistance schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamiquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (1994) 83e88.
- [3] M. Ismail, A. Metwally, A. Farghaly, J. Bruce, L.F. Tao, J.L. Bennet, Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55 (1996) 214e218.
- [4] P.J. Hotez, M.T. Ferris, The antipoverty vaccines, *Vaccine* 24 (2006) 5787e5799.
- [5] D. Kim, S. Kwon, C.S. Ahn, Y. Lee, S.Y. Choi, J. Park, H.Y. Kwom, Adjuvant effect of liposome-encapsulated natural phosphodiester CpG-DNA, *BMB Rep.* 44 (2011) 758e763.
- [6] D. Van Duin, R. Medzhitov, A.C. Shaw, Triggering TLR signaling in vaccination, *Trends Immunol.* 27 (2006) 49e55.
- [7] P. Marrack, A.S. McKeel, M.W. Munks, Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 287e293.
- [8] R. Spreafico, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Mortellaro, The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 638e642.
- [9] T.L. Flach, G. Ng, A. Hari, M.D. Desrosiers, P. Zhang, S.W. Ward, M.E. Seamone, A. Vilaysane, A.D. Mucsi, Y. Fong, E. Prenner, C.C. Ling, J. Tschopp, D.A. Muruve, M.W. Amrein, Y. Shi, Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity, *Nat. Med.* 17 (2011) 479e487.
- [10] E.M. Agger, J.P. Cassidy, J. Brady, K.S. Korsholm, C. Vingsbo-Lundberg, P. Andersen, Adjuvant modulation of the cytokine balance in *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccines: immunity, pathology and protection, *Immunology* 124 (2008) 175e185.
- [11] T.R. Mosmann, S. Sad, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol. Today* 17 (1996) 138e146.
- [12] T. Sparwasser, E.S. Koch, R.M. Vabulas, K. Heeg, G.B. Lipford, J.W. Ellwart, H. Wagner, Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 2045e2054.
- [13] A.M. Krieg, A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzki, D.M. Klinman, CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374 (1995) 546e549.
- [14] A.M. Krieg, L. Love-Homan, A.K. Yi, J.T. Harty, CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge, *J. Immunol.* 161 (1998) 2428e2434.
- [15] D. Jankovic, T.A. Wynn, M.C. Kullberg, S. Hieny, P. Caspar, S. James, A.W. Cheever, A. Sher, Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN-gamma-dependent effector mechanisms, *J. Immunol.* 162 (1999) 345e351.
- [16] M. Street, P.S. Coulson, C. Sadler, L.J. Warnock, D. McLaughlin, H. Bluethmann, R.A. Wilson, TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine, *J. Immunol.* 163 (1999) 4489e4494.
- [17] C.T. Fonseca, C.F. Brito, J.B. Alves, S.C. Oliveira, IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway, *Vaccine* 22 (2004) 503e510.
- [18] W. Torben, G. Ahmad, W. Zhang, A.A. Siddiqui, Role of antibodies in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni* challenge infection in murine and nonhuman primate models, *Vaccine* 29 (2011) 2262e2271.
- [19] F.V. Durães, N.B. Carvalho, T.T. Melo, S.C. Oliveira, C.T. Fonseca, IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent, *Immunol. Lett.* 125 (2009) 72e77.
- [20] T. Teixeira de Melo, J.M. Araujo, F.V. Durães, M.V. Caliari, S.C. Oliveira, P.M.Z. Coelho, C.T. Fonseca, Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden, *Parasite Immunol.* 32 (2010) 749e759.
- [21] F.J. Ramalho-Pinto, G. Gazzinelli, R.E. Howells, T.A. Mota-Santos, E.A. Figueiredo, J. Pellegrino, *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule in vitro, *Exp. Parasitol.* 36 (1974) 360e372.
- [22] I.R. Caldas, R. Correa-Oliveira, E. Colosimo, O.S. Carvalho, C.L. Massara, D.G. Colley, G. Gazzinelli, Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62 (2000) 57e64.
- [23] S.R. Smithers, R.J. Terry, The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms, *Parasitology* 55 (1965) 695e700.
- [24] J. Pellegrino, A.F. Siqueira, Técnica de perfusão para coelima de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas, *Bras. Malariol. Doenças Trop.* 8 (1956) 589e597.
- [25] W.A. Hoffman, J.A. Pons, J.L. Janer, The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, *Puerto Rico J. Publ. Health* 9 (1934) 281e298.
- [26] A. Fenwick, J.P. Webster, Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19 (2006) 577e582.
- [27] R.K. Gupta, Aluminium compounds as vaccine adjuvants, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32 (1998) 155e172.
- [28] J.C. Cox, A.R. Couter, Adjuvants-a classification and review of their models of action, *Vaccine* 15 (1997) 248e256.
- [29] A.M. Harandi, D. Medagliani, R.J. Shattock, Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research, *Vaccine* 28 (2010) 2363e2366.
- [30] S.G. Reed, S. Bertholet, R.N. Coler, M. Friede, New horizons in adjuvants for vaccine development, *Trends Immunol.* 30 (2009) 23e32.
- [31] D.M. Klinman, D. Currie, L. Gursel, D. Verthelyi, Use of CpG oligonucleotides as immune adjuvants, *Immunol. Rev.* 199 (2004) 201e216.
- [32] R.S. Chu, O.S. Targoni, A.M. Krieg, P.V. Lehmann, C.V. Harding, CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 1623e1631.
- [33] D.A. Carson, E. Raz, Oligonucleotide adjuvants for T helper 1 (Th1)-specific vaccination, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 1621e1622.
- [34] T.C. Garcia, C.T. Fonseca, L.G. Pacifico, F. do V. Durães, F.A. Marinho, M.L. Penido, M.V. Caliari, A.L. de Melo, H.A. Pinto, M.M. Barsante, E. Cunha-Neto, S.C. Oliveira, Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice, *Acta Trop.* 106 (2008) 162e167.
- [35] T.A. Wynn, A.W. Cheever, D. Jankovic, R.W. Poindexter, P. Caspar, F.A. Lewis, A. Sher, An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection, *Nature* 376 (1995) 594e596.
- [36] J. Vollmer, M. Jurk, U. Samulowitz, G. Lipford, A. Forsbach, M. Wüller, S. Thluk, H. Hartmann, A. Kritzler, C. Müller, C. Schetter, A.M. Krieg, CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN-gamma-inducible protein-10 production in human B cells, *J. Endotoxin Res.* 10 (2004) 431e438.

- [37] R. Testi, J.H. Phillips, L.L. Lanier, T cell activation via Leu-23 (CD69), *J. Immunol.* 143 (1989) 1123e1128.
- [38] H. Huhn, C. Neukirch, K. Freitag, A. Necker, W. Hitzler, B. Seliger, M.J. Maucuer, Longitudinal analysis of the T-cell receptor (TCR)-VA and -VB repertoire in CD8 $\beta$  T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis B surface antigen, *Clin. Exp. Immunol.* 129 (2002) 309e317.
- [39] F. Rahman, A. Dahmen, S. Herzog-Hauff, W.O. Böcher, P.R. Galle, H.F. Lühr, Cellular and humoral immune responses induced by intradermal or intramuscular vaccination with the major hepatitis B surface antigen, *Hepatology* 31 (2000) 521e527.
- [40] K.F. Hoffmann, A.W. Cheever, T.A. Wynn, IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine response induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis, *J. Immunol.* 164 (2000) 6406e6416.
- [41] L. Yu, X. Sun, F. Yang, J. Shen, Z. Wu, Inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 and TNF- $\alpha$  alterations in schistosomiasis: a meta-analysis, *Parasitol. Res.* 110 (2012) 1547e1552.
- [42] D.A. Vignali, P. Crocker, Q.D. Bickle, S. Cobbold, H. Waldmann, M.G. Taylor, A role for CD4 $\beta$  but not CD8 $\beta$  T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 Krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections, *Immunology* 67 (1989) 466e472.
- [43] S.L. James, P.C. Natovitz, W.L. Farrar, E.J. Leonard, Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis: macrophage activation in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae, *Infect. Immun.* 44 (1984) 569e575.
- [44] S.L. James, A.W. Cheever, P. Caspar, T.A. Wynn, Inducible nitric oxide synthase-deficient mice develop enhanced Th1 cytokine-associated cellular and humoral immune responses after vaccination with attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae but display partially reduced resistance, *Infect. Immun.* 66 (1998) 3510e3518.
- [45] S. Mukherjee, L.Y. Chen, T.J. Papadimos, S. Huang, B.L. Zuraw, Z.K. Pan, Lipopolysaccharide-driven Th2 cytokine production in macrophages is regulated by both MyD88 and TRAM, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29391e29398.
- [46] P. Pouliot, V. Turmel, E. Gélinas, M. Laviolette, E.Y. Bissonnette, Interleukin-4 production by human alveolar macrophages, *Clin. Exp. Allergy* 35 (2005) 804e810.
- [47] C. Buttner, A. Skupin, T. Reimann, E.P. Rieber, G. Unteregger, P. Geyer, K.H. Frank, Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17 (1997) 315e325.
- [48] F.O. Martinez, L. Helming, S. Gordon, Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2007) 451e483.
- [49] P.J. Murray, T.A. Wynn, Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization, *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011) 557e563.
- [50] L. Barron, T.A. Wynn, Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis, *Eur. J. Immunol.* 41 (2011) 2509e2514.



Uma vez que verificamos que os anticorpos específicos contra o tegumento encontravam-se em níveis mais elevados em camundongos imunizados e protegidos (Teixeira de Melo et al., 2010; Teixeira de Melo et al., 2012), passamos a investigar se estes anticorpos estavam diretamente envolvidos na eliminação do parasito ou simplesmente representavam um marcador de ativação da resposta do hospedeiro. Sendo assim, avaliamos se os anticorpos eram capazes de se ligar à superfície de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni in vitro* por fluorescência. Apenas esquistossômulos que entraram em contato com soro de camundongos vacinados com Smtteg tornaram-se fluorescentes ao serem incubados com o anticorpo secundário. Este resultado confirma que os anticorpos produzidos em resposta a imunização são capazes de reconhecer e se ligar a proteínas da superfície dos parasitos, sugerindo que estes poderiam estar envolvidos na eliminação dos mesmos. Foi avaliado também se a ativação do sistema do complemento pela via clássica seria capaz de promover a morte de esquistossômulos *in vitro*. Para isso, foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* com cultura de esquistossômulos recém transformados e que entraram em contato com soro inativado de camundongos inoculados com salina + CFA/IFA ou Smtteg + CFA/IFA juntamente com o complemento ativo ou inativado. Demonstrou-se que o sistema do complemento é capaz de promover a morte dos parasitos *in vitro* e que a presença de anticorpos específicos, levando a ativação do complemento pela via clássica aumenta ainda mais a capacidade do complemento eliminar os esquistossômulos. Para avaliar, *in vivo*, o papel dos anticorpos na eliminação do parasito em nosso modelo de vacinação, foi realizado um ensaio no qual os anticorpos específicos foram transferidos para um camundongo recipiente “naive”. Soro proveniente de camundongos vacinados com Salina + CFA/IFA ou Smtteg + CFA/IFA foi transferido para camundongos que foram, então, Infectados com 100 cercárias. Observou-se uma redução significativa de 27% da carga parasitária de camundongos que receberam soro contendo anticorpos anti-Smtteg em relação aos camundongos que receberam soro não imune, além de uma redução significativa de 37% e 47% no número de ovos presos no intestino e fígado destes animais, respectivamente (Melo et al., 2014).

Brief Definitive Report

## Antibodies are involved in the protective immunity induced in mice by *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) immunization

T. T. DE MELO,<sup>1</sup> I. C. DE SENA,<sup>1</sup> N. ARAUJO<sup>1</sup> & C. T. FONSECA<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Centro de Pesquisas Rene Rachou, Fiocruz-MG, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Belo Horizonte, Brazil

### SUMMARY

The *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) plays an important role in triggering the host immune response and mice immunization with Smtteg formulated with Freund's adjuvant or alum + CpG induce partial protection against *S. mansoni* infection associated with an increased antibody production. In this study, we investigated the role of these antibodies in parasite killing both in vitro and in vivo. We demonstrated that these antibodies were able to bind to the surface of *S. mansoni* recently transformed schistosomula and that these antibodies significantly increase the percentage of schistosomula killed in vitro by complement activation. Passive transference of immune sera decreased the parasite burden and the number of eggs trapped in the organs of mice that received sera containing anti-Smtteg antibodies. These results demonstrate that antibodies specific to surface tegumental antigens are involved in parasite elimination in mice immunized with Smtteg.

**Keywords** antischistosomula surface proteins antibodies, protection, *Schistosoma mansoni*, schistosomula

### INTRODUCTION

Schistosomiasis remains a serious public health problem in 76 countries and territories of the world with more than

200 million individuals infected and causing annual losses of 10.4 million in DALYs (1, 2). The current control programme is based on chemotherapy with praziquantel that has limited effect in disease transmission and also does not prevent re-infection (3, 4). The control of schistosomiasis would be greatly improved by the development of a vaccine, and to develop an effective vaccine formulation, the choice of a good antigen and the study of the protective immune mechanisms involved in parasite elimination are essential.

Recently, our group demonstrated that *Schistosoma mansoni* schistosomula (Smtteg) tegument plays an important role in triggering the immune response against the parasite. This antigen is able to activate upregulation of CD40 and CD86 expressions in dendritic cells (5) and induce a partial protection in mice when formulated with Freund's adjuvant (43–48%) (6) or alum + CpG-ODN (7). The protective response was associated with a predominant Th1 type of immune response, with increased production of specific antibodies.

Antibodies have previously been reported to be involved in schistosome elimination. In rats, IgG2a isotype against the parasite has been reported as a lethal antibody (8). In the irradiated cercariae vaccine, B cells as well as IFN- $\gamma$  and CD4<sup>+</sup> cells play important roles in parasite elimination (9, 10). Antibodies against Sm-p80, a vaccine candidate, have also been reported to be involved in parasite elimination through an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) mechanism (11). In humans, antibodies against surface parasite antigens have been associated with resistance to re-infection (12).

The mechanisms by which antibodies may mediate parasite death are ADCC and complement activation. Although parasites become resistant to killing by complement activation as they mature in the host (13), some studies

Correspondence: Cristina Toscano Fonseca, Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas Rene Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP: 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. (e-mail: ctoscano@cpqrr.fiocruz.br)

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this study.

Disclosures: None.

Received: 6 September 2013

Accepted for publication: 21 November 2013

demonstrate that complement activation must be an important parasite elimination mechanism in the beginning of the infection (14). Regarding antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) mechanism, many cells have demonstrated to promote parasite killing as eosinophils, macrophages and platelets (15–17).

In this study, we investigated the role of the antibodies produced by Smtg-immunized mice in parasite killing both *in vitro* and *in vivo*. We demonstrated that these antibodies were able to bind to the surface of *S. mansoni* recently transformed schistosomula and that these antibodies significantly increase the percentage of schistosomula killed *in vitro* by complement activation. Passive transference of immune sera significantly decreased the parasite burden and the number of eggs trapped in the organs of mice that received sera containing anti-Smtg antibodies indicating that antibodies play a role in parasite elimination in those mice immunized with Smtg.

## METHODS

### Mice and parasites

Female C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were obtained from Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) facility – FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Cercariae of *Schistosoma mansoni* (LE strain) were maintained routinely on *Biomphalaria glabrata* snails at CPqRR and were obtained by exposing infected snails to light for 1–2 h to induce shedding. Cercarial numbers and its viability were determined using a light microscope. Cercariae from *S. mansoni* were mechanically transformed into skin-stage schistosomula according to Ramalho-Pinto et al. (18) with some modifications. Briefly, cercariae were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 1800 g for 3 min at 4°C. The cercariae were resuspended in cold Glasgow medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 1% penicillin/streptomycin supplemented with 10% foetal bovine sera. The tails were broken by vortexing in high speed for 2 min and removed through several washing steps with Glasgow medium. The schistosomula were cultured for 90 min at 37°C in medium.

### Detection of specific antibodies on the surface of schistosomula

Schistosomula were placed in microtubes of 1.5 mL and washed three times with DMEM without foetal bovine sera by centrifugation at 1800 g/5 min. The schistosomula were fixed in PBS + 1% formaldehyde for 1 h at 4°C. After this period, schistosomula were washed in PBS and incubated in RPMI for 30 min. A second wash step was

performed, and parasites were incubated in PBS + 1% BSA for 30 min. After a third wash step, schistosomula were incubated overnight with sera from mice inoculated with saline + complete/incomplete Freund adjuvant (CFA/IFA) or immunized with Smtg + CFA/IFA as described by Teixeira de Melo et al. (2010) (6) diluted 1:100 in PBS + 1% BSA. After this process, schistosomula were washed with PBS + 1% BSA for three times as described above, incubated in RPMI for 30 min, washed and incubated in PBS + BSA 1% for 30 min. The detection of bound antibodies in schistosomula tegument was observed by incubating the parasite with a FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) fluorescent secondary antisera for 2 h at room temperature, in the dark. Finally, schistosomula were washed three times with PBS by centrifugation at 1800 g/5 min, and three slides were assembled using the antifading Mowiol (Sigma-Aldrich) to preserve fluorescence. Antibody binding to schistosomula tegument was evaluated by fluorescence microscopy, ImageJ program was used to determine fluorescence level in the schistosomula tegument.

### Cytotoxicity assay

Fifty schistosomula per well were placed in 96-well flat bottom with 100  $\mu$ L of Glasgow culture medium supplemented with 10% foetal bovine sera. Inactivated sera from mice inoculated with saline + CFA/IFA or from mice immunized with Smtg + CFA/IFA diluted 1:10 in Glasgow medium were added to plate wells and incubated for 30 min at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. After this period, inactivated or active complement from guinea pigs (Sigma-Aldrich) at 1:10 dilution was added to each well. As controls to the assay, schistosomula were incubated with medium alone, with sera alone or with complement from guinea pigs alone. The plate was then incubated for 16 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and to evaluate parasite viability, schistosomula were stained with 1.5  $\mu$ g/well of acridine orange fluorescent probes (stain viable parasite) and 5  $\mu$ g/well of ethidium bromide (stain dead parasites). The plate was incubated for 20 min at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and washed three times with Glasgow medium at 37°C to remove unbound probes. The percentage of dead/live schistosomula was determined by counting three times 20  $\mu$ L/well in a fluorescence microscope. Two independent assays were performed.

### Passive transfer of antibodies

Sera from mice inoculated with saline + CFA/IFA or Smtg + CFA/IFA as described by Teixeira de Melo et al. (2010) (6) were collected 30 days after the last immunization and inactivated at 56°C/30 min to be used in passive

sera transfer protocols. Forty-five animals were divided randomly in three groups of 15 animals each: a control group that did not received sera transfer; a saline group that received sera from animals inoculated with saline + CFA/IFA and a Smteg group that received sera from animals immunized with Smteg + CFA/IFA. Mice received three intravenously inoculation of sera (200  $\mu$ L) via the tail vein. The inoculation occurred 8 days before infection, the second 3 days before the infection and the third on the day of the percutaneous infection of the animals with 100 cercariae/mouse from de *S. mansoni* LE strain. Fifty days after infection, mice were perfused for the recovery of worms according to Pellegrino and Siqueira, 1956 technique (19). At the same time, the liver and intestine from each mouse were collected, digested in 10% KOH as previously described (6) to determine the number of eggs trapped in these organs. Two independent assays were performed.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using t-student test for parasitological analyses and chi-square test for in vitro cytotoxicity assay analyses using the software package GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### Ethics

All procedures involving animals were approved by the local Ethical Commission of Animal Use (CEUA) from FIOCRUZ under licence number: LW-26/12.

#### RESULTS

To evaluate whether the antibodies produced in response to mice immunization with Smteg + CFA/IFA were able to bind proteins expressed in schistosomula surface, an immunofluorescence staining was performed in newly transformed schistosomula. The Figure 1(a-d) is a representative picture of the results observed in immunofluorescence staining, and fluorescence intensity was determined in schistosomula incubated with sera from saline + CFA/IFA or Smteg + CFA/IFA immunized mice using imageJ program; the results (Figure 1e) demonstrate that antibodies present in the sera from mice immunized with Smteg + CFA/IFA recognized molecules in the parasite surface.

Furthermore, we evaluated whether complement activation could promote schistosomula death in vitro. For this, a cytotoxicity assay was performed using newly transformed schistosomula that came into contact with inacti-

vated sera from mice inoculated with saline + CFA/IFA or Smteg + CFA/IFA together with an active or inactivated complement source from guinea pigs. Figure 1f represents the results obtained in two independent assays and demonstrates that alternative complement activation can promote schistosomula death in vitro, but the percentage of dead schistosomula significantly increase when the classical complement pathway is activated by Smteg-specific antibodies.

In order to evaluate the role of Smteg-specific antibodies in parasite elimination in vivo, sera from mice immunized with Saline + CFA/IFA or Smteg + CFA/IFA were transferred to naïve recipients. Analyses of the parasite burden and of the number of eggs trapped in host organs, performed fifty days after challenge infection with 100 cercariae, demonstrate a significant decrease of 27% in the parasite burden in mice that received sera containing anti-Smteg antibodies compared with mice that received non-immune sera (Figure 1g). Also a significant reduction of 37% and 47% in number of eggs trapped in the intestine and liver of these animals, respectively (Figure 1h and i), was observed in mice that received immune sera.

#### DISCUSSION

Recently, studies performed by our group have demonstrated that mice immunization with Smteg in different vaccine formulations induced a significant production of specific antibodies (6, 7). Whether these antibodies were directly involved in parasite elimination or only represent a hallmark of host immune response activation still undetermined. The results on immunofluorescence staining of schistosomula using sera from mice immunized with Smteg or saline demonstrated that the antibodies produced after immunization recognize and bind to parasite surface antigens. Demonstrating that surface schistosomula proteins are constituents of the Smteg preparation and suggest that these antibodies could be involved in parasite elimination either by classical complement activation or by ADCC.

Classical and alternative complement activation has been previously demonstrated to promote the death of the young schistosomula in vitro and in vivo (13, 14). Our results demonstrate that either alternative or classical complement activation is able to promote schistosomula death in vitro; however, the presence of anti-Smteg-specific antibodies binds to parasite surface increased significantly the percentage of killed parasite. If these classical activation are involved in the elimination of skin-stage schistosomula in vivo still to be determined, nevertheless passive transfer of sera from mice immunized with Smteg or Saline to a naïve recipient demonstrated that anti-Smteg antibodies are involved in parasite elimination in vivo,

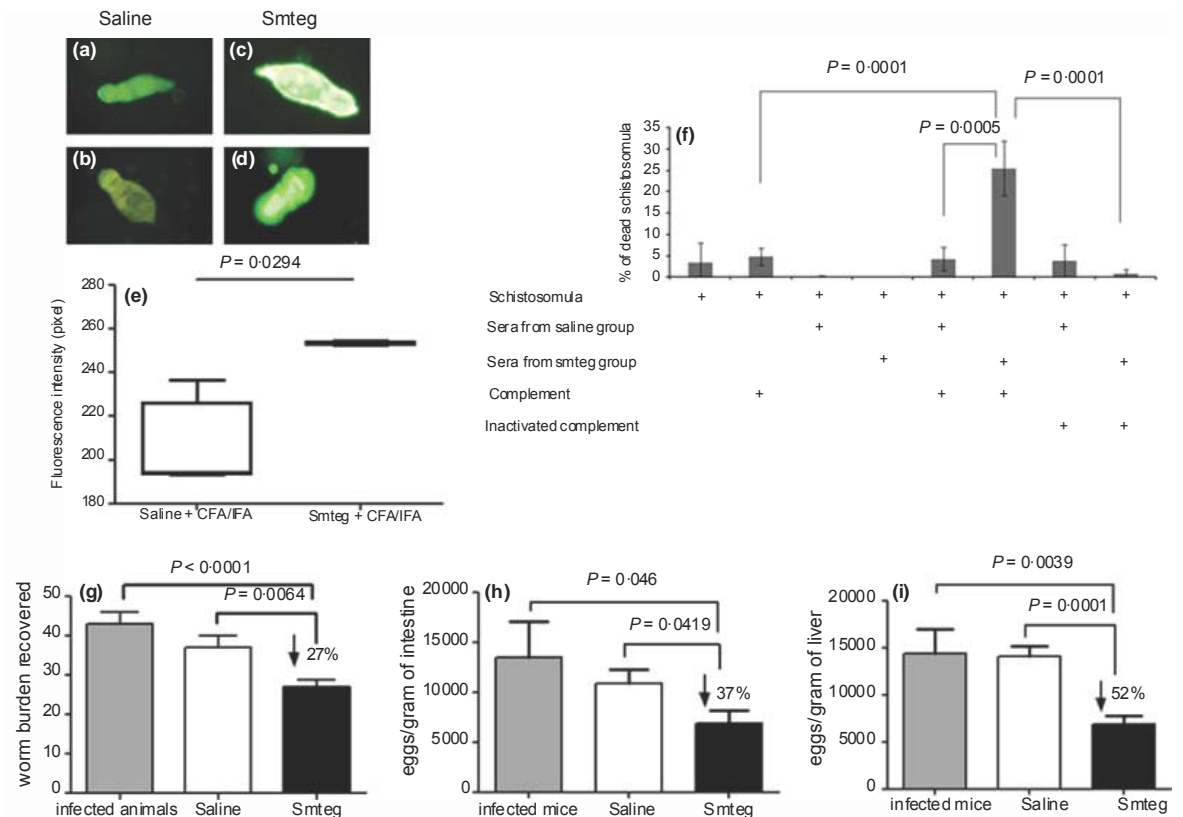


Figure 1 The role of anti-Smteg antibodies in *S. mansoni* elimination. Newly transformed schistosomula were incubated with sera from mice inoculated with saline + CFA/IFA (a–b) or immunized with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) + CFA/IFA (c–d). Antibody reactivity to surface schistosomula proteins were detected by a secondary anti-mouse IgG-FITC-conjugated antibody, the mean fluorescence intensity in the schistosomula tegument after incubation with sera from mice immunized with saline or with Smteg and anti-IgG-FITC-conjugated antibody was determined using ImageJ in four schistosomula per treatment (e). Significant differences between treatments determined by Mann–Whitney test are pointed in the graphic (e). Complement activation and cytotoxicity in schistosomula were assessed in vitro (f). The viability of schistosomula was observed by fluorescence microscopy. Bars represent the percentage of dead schistosomula of two independent experiments + SD. Three wells per treatment were analysed in each experiment. Significant differences in the percentage of dead parasite in comparison with wells that contain schistosomula with medium are denoted by an asterisk ( $P < 0.05$ ). Other statistically significant differences are pointed in the graphic. Post-challenge infection determination of worm burden (g), eggs number in the intestine (h) or liver (i) from mice that received intravenous transference of sera from saline inoculated animals (white bars) and Smteg-immunized animals (black bars). Grey bars represent the results from challenge infection control group. Bars represent the mean values + SD of two independent assays with 15 animals for group in each assay. Statistically significant differences between groups are pointed in the graphic.

because a significant reduction in parasite burden and in the number of eggs trapped in the liver and intestine were observed in challenged mice, which received immune sera. The reduction in the number of eggs trapped in these organs reflects the reduction in the worm burden and does not represent a reduction in worm fecundity (data not shown).

The role of B cells and antibodies has been demonstrated in mice immunization protocols using formulation with irradiated cercariae and Sm-p80. Passive transfer of

sera from mice that had been exposed to two or three immunizations with 50-kilorad gamma-irradiated cercariae, a vaccine formulation that induces high levels of protection reduced significantly (20–50%) the parasite burden in challenged recipients (20). Passive transfer of sera from mice or IgG purified from baboons immunized with Sm-p80 conferred a 31–45% protection in the challenged recipients (11).

The mechanism involved in in vivo parasite elimination mediated by anti-Smteg antibodies still to be elucidated.

Both classical complement activation and ADCC may be involved. Classical complement activation could be acting at skin level promoting newly transformed schistosomula death, because the parasite develops evasion strategies and became refractory to complement activation (21) while ADCC could be taking place in both skin and lung levels. This hypothesis is still to be investigated. Nevertheless, our results demonstrate that antibodies can be used in the

identification of protective antigens in the schistosomula tegument, to be used in a subunit vaccine formulation.

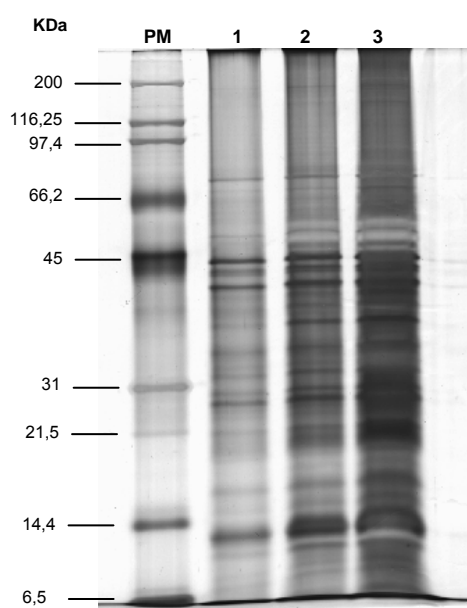
#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq; INCT-DT/CNPq, Ripag/CPqRR-Fiocruz, Fapemig. Fellowships: PIBIC/CNPq (ICS); PQ/CNPq (CTF).

#### REFERENCES

- Engels D, Chitsulo L, Montresos A & Savio-li L. The Global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop* 2002; 82: 139–146.
- PAHO/WHO-Panamerican Health Organization/World Health Organization. Preparatory Meeting on Epidemiological Data Needed to Plan Elimination of Schistosomiasis in the Caribbean. St. George: 13–14, 2007.
- World Health Organization WHO. TDR Strategic Direction for Research: Schistosomiasis Geneva, World Health Organization WHO, 2002.
- Loukas A, Tian M & Pearson MS. Schistosome membrane proteins as vaccine. *Int J Parasitol* 2007; 37: 257–263.
- Duraes FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC & Fonseca CT. IL-12 and TNF- $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunol Lett* 2009; 31: 432–439.
- Teixeira de Melo T, Michel de Araujo J, Do Valle Duraes F, et al. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. *Parasite Immunol* 2010; 32: 749–759.
- Teixeira de Melo T, Araujo JM, Campos de Sena I, Carvalho Alves C, Araujo N & Toscano Fonseca C. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN. *Microbes Infect* 2013; 15: 28–36.
- Horta MFM & Ramalho-Pinto FJ. Levels of lethal antibody during the course of infection with *Schistosoma mansoni* in rats and mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82(Suppl. 4): 283–284.
- Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, et al. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN- $\gamma$ -dependent effector mechanisms. *J Immunol* 1999; 162: 345–351.
- Vignali DA, Crocker P, Bickle QD, Cobbold S, Waldmann H & Taylor MG. A role for CD4 $^{+}$  but not CD8 $^{+}$  T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. *Immunology* 1989; 67: 466–472.
- Torben W, Ahmad G, Zhang W & Siddiqui AA. Role of antibodies in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni* challenge infection in murine and nonhuman primate models. *Vaccine* 2011; 29: 2262–2271.
- Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJC, et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1483–1494.
- Santoro F, Lachmann PJ, Capron A & Capron M. Activation of complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula: killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. *J Immunol* 1979; 123: 1551–1557.
- Correa-Oliveira R, Mota-Santos TA & Gazzinelli G. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo killing of antibody-coated schistosomula. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 991–998.
- David JR, Butterworth AE & Vadas MA. Mechanism of the interaction mediating killing of *Schistosoma mansoni* by human eosinophils. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 842–848.
- James L. In vitro proliferative response to living schistosomula by T lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1981; 1: 147–162.
- Joseph M, Aurault C, Capron A, Vomg H & Viens P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 1983; 303: 810–812.
- Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueredo EA & Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol* 1974; 36: 360–372.
- Pellegrino J & Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 1956; 8: 589–597.
- Mangold BL & Dean DA. Passive transfer with sera and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J Immunol* 1986; 136: 2644–2648.
- Ruppel A, Rother U & Diesfeld HJ. *Schistosoma mansoni*: loss of the ability of schistosomula to bind mouse complement following intravenous injection into mice. *Tropenmed Parasitol* 1984; 35: 23–28.

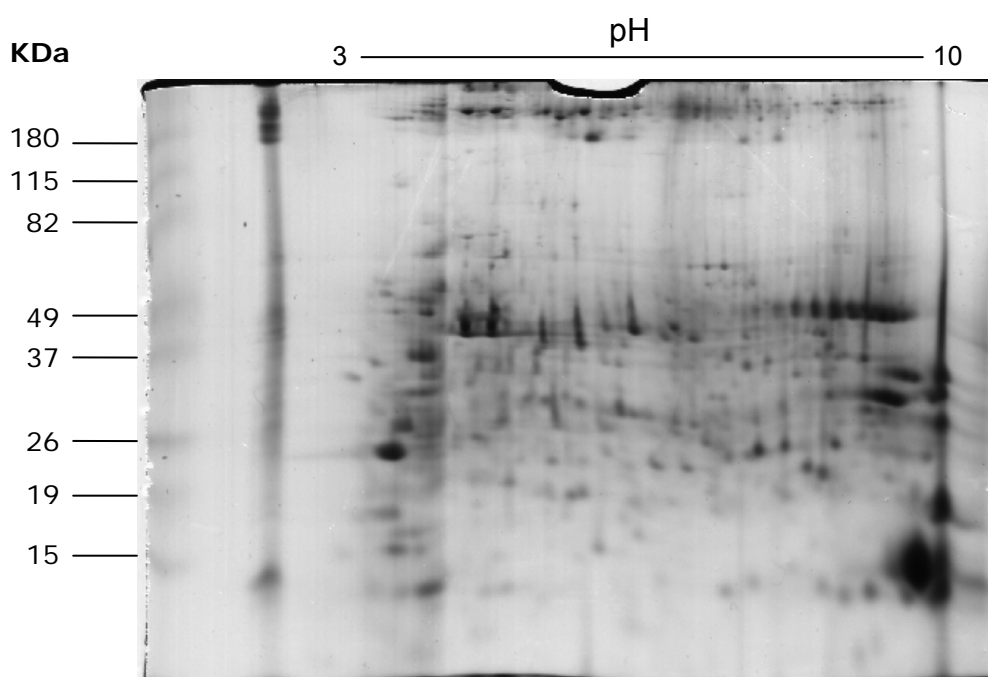
Uma vez observada a importância dos anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados com Smtteg na eliminação do parasito, foi realizada uma combinação de análises proteômicas e sorológicas através do *Western-blotting* bidimensional (2D-WB) para identificar as proteínas presentes no tegumento de esquistossômulos que são reconhecidas por anticorpos presentes neste soro. Antes de iniciarmos a eletroforese bidimensional das proteínas presentes no tegumento, a amostra do Smtteg foi submetida à eletroforese unidimensional para observarmos a qualidade do extrato protéico. Foram aplicadas nas canaletas do gel de poliacrilamida 1 $\mu$ g (canaleta 1), 3 $\mu$ g (canaleta 2) e 5 $\mu$ g (canaleta 3) de proteínas do Smtteg e este gel foi corado por Nitrato de Prata. Como observado na figura 11, as proteínas encontravam-se íntegras, não degradadas, uma vez que foram observadas bandas bem definidas tanto de alta quanto de baixa massa molecular.



**Figura 11: Perfil eletroforético unidimensional de extrato proteico do tegumento (Smtteg) de esquistossômulos de *S. mansoni*.** 1 $\mu$ g (canaleta 1), 3 $\mu$ g (canaleta 2) e 5 $\mu$ g (canaleta 3) de proteínas do Smtteg foram separadas por eletroforese unidimensional e corado por nitrato de prata. PM: Padrão de peso molecular Broad Range (Bio-Rad).



Após esta etapa, realizou-se a separação das proteínas do tegumento de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* através da eletroforese bidimensional (2-DE). Foram aplicados 100µg de extrato proteico sobre as fitas de IPG de 7 cm, pH 3-10NL, para separação das proteínas na primeira dimensão e, na segunda dimensão, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12%. A coloração do gel foi realizada por Azul de Coomassie Coloidal. Foi observado um grande número de *spots* bem definidos e com poucos arrastes ao longo de toda faixa de pH e massa molecular (Fig. 12).

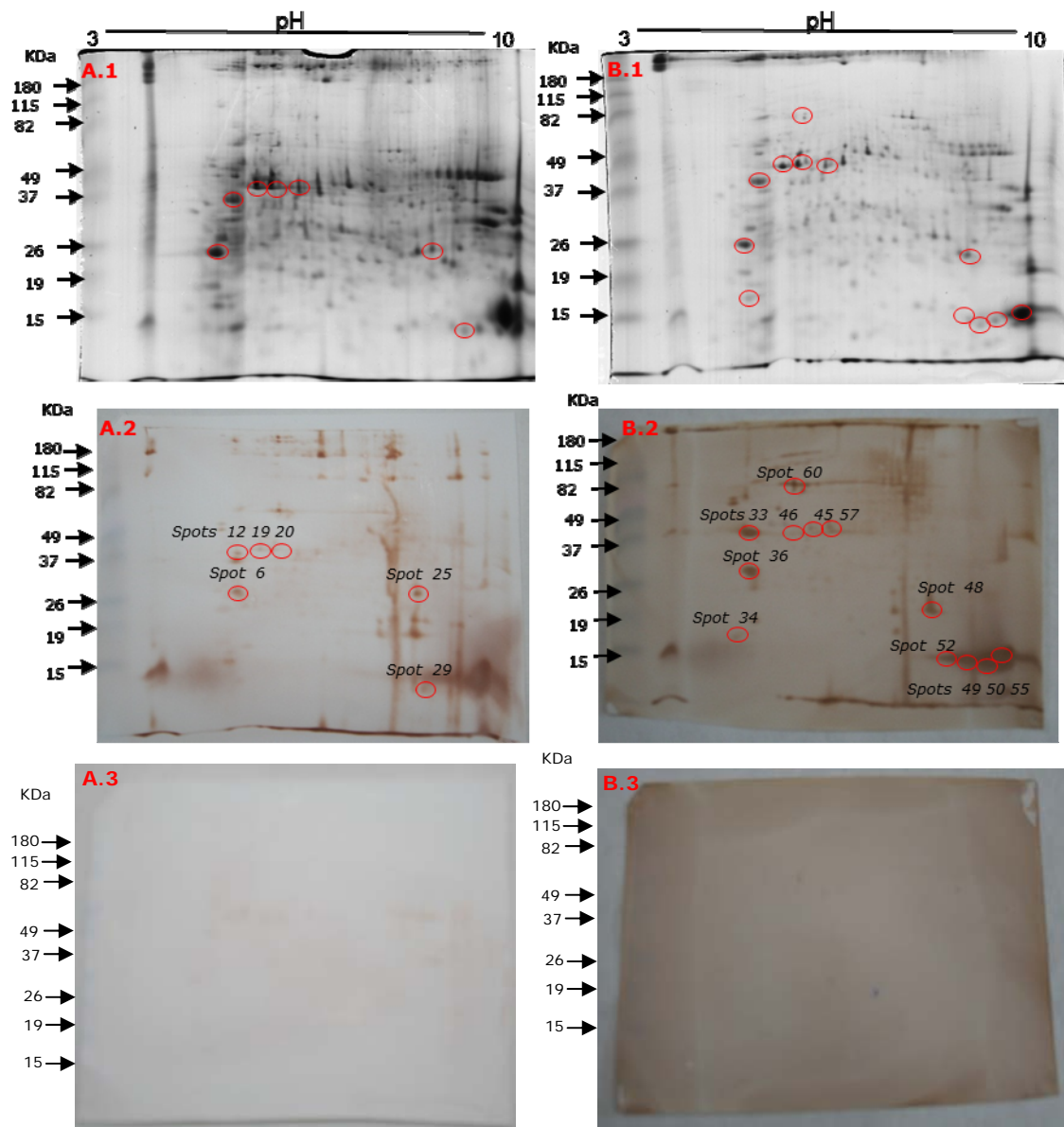


**Figura 12: Perfil eletroforético bidimensional do extrato proteico do tegumento de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* (Smteg).** 100 µg de proteína total foi separada por eletroforese bidimensional utilizando fitas de IPG de 7cm, pH 3-10NL e SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com Azul de Coomassie Coloidal. Utilizou-se 7µL do padrão de peso molecular Benchmark (Invitrogen).

Uma vez estabelecidas as condições de separação das proteínas de Smteg por eletroforese bidimensional foram realizados os experimentos de *Western-blotting* bidimensional (2D-WB) utilizando *pool* de soro de camundongos inoculados com PBS ou imunizados com Smteg. Foram realizados dois experimentos independentes. Vários *spots*



imunorreativos foram observados quando foi utilizado o soro de camundongos imunizados com Smtg (Fig. 13 A2 e B2), enquanto nenhum *spot* foi visualizado com soro dos camundongos inoculados com PBS (Fig 13 A3 e B3). Alguns *spots* imunorreativos foram localizados no gel correspondente corado por Azul de Coomassie Coloidal (Fig. 13 A1 e B1), sendo excisados destes géis um total de 63 *spots*. Os mesmos foram digeridos com tripsina e submetidos à identificação por espectrometria de massas. Alguns destes *spots* estão representados por círculos na figura 13.



**Figura 13: 2D-PAGE e respectivos 2D-WB de extrato proteico do tegumento de esquistossômulos do *Schistosoma mansoni*.** (A) e (B) representam dois experimentos independentes. (A.1) e (B.1) indicam 2D-PAGE de 100 $\mu$ g do extrato protéico de Smtég e os géis foram corados por Azul de Coomassie Coloidal. Padrão de peso molecular Benchmark (Invitrogen). Foram utilizadas fitas de IPG de 7cm, pH 3-10NL e SDS-PAGE 12%. (A.2) e (B.2) representam seus respectivos 2D-WB, nos quais, após transferência das proteínas para membranas de PVDF, estas foram incubadas com soro de camundongos imunizados com Smtég e, posteriormente incubadas com anti-IgG total de camundongo conjugado a peroxidase. Círculos indicam as proteínas reconhecidas pelos anticorpos no 2D-WB e que

foram excisadas do gel correspondente corado por Azul de Coomassie Coloidal. A.3 e B.3 representam os controles negativos do 2D-WB, nos quais as membranas foram primeiramente incubadas com soro de camundongos inoculados com PBS e, posteriormente, incubadas com anti-IgG total de camundongo conjugado a peroxidase.

Dos 63 *spots* excisados, 42 foram identificados por espectrometria de massas. Uma vez que tais *spots* foram excisados de dois géis independentes correspondentes aos dois experimentos de 2D-WB realizados, alguns foram identificados como sendo a mesma proteína. Além disso, *spots* com pequena variação de pI foram identificados como sendo a mesma proteína, possivelmente com diferentes modificações pós-traducionais.

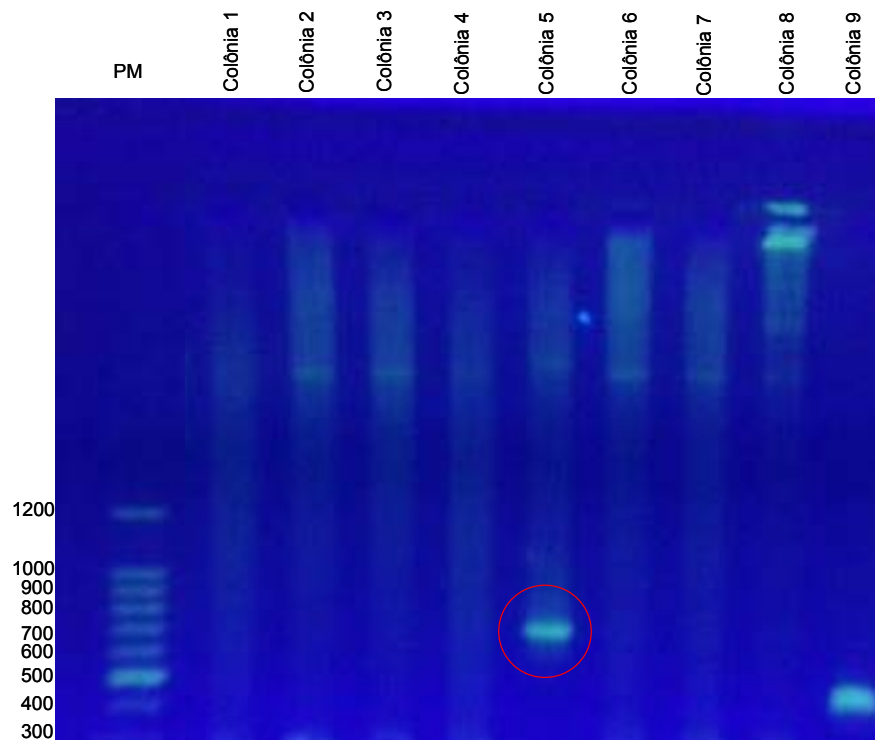
Dos 42 *spots* identificados, 22 apresentaram identificação com proteínas do *S. mansoni*, sendo 18 deles com pelo menos 1 peptídeo que possui *score* indicativo de identidade ou extensiva homologia. Estes correspondem às proteínas listadas na tabela 4. Por outro lado, outros 20 *spots* não apresentaram *hit* de identificação com nenhuma proteína de *S. mansoni*, sendo que 10 destes possuíam pelo menos 1 peptídeo com *score* indicativo de identidade ou extensiva homologia com proteínas de outras espécies. Entretanto, ao se realizar um BLAST contra apenas proteínas de espécies de *Schistosomas* com a sequência de proteína correspondente a estes spots com *score* significativo, todos apresentaram identidade acima de 80% com actina do *Schistosoma mansoni*.

Para dar continuidade às análises *in silico*, foram selecionados 18 *spots* identificados como sendo proteínas do *Schistosoma mansoni* e que apresentaram pelo menos 1 peptídeo com *score* significativo. Após a avaliação da localização celular, solubilidade, similaridade com proteínas de outras espécies (1. Humana, 2. Outros *Schistosomas*. 3. outros helmintos), predição para epitopos de células B e T, sítios de glicosilação e adição de âncoras de GPI foi elaborada uma tabela que mostra tais resultados (Tabela 3).

**Tabela 3: Análise *in silico* das proteínas do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* identificadas por espectrometria de massas.**

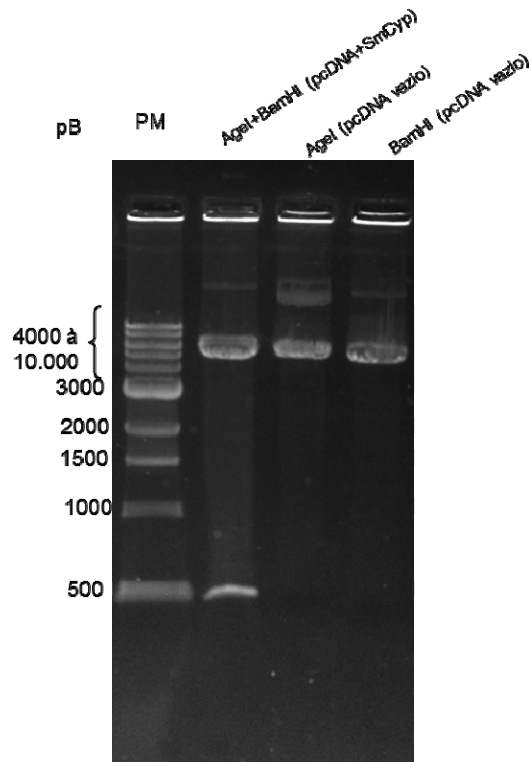
<i>Spots</i>	Massa Molecular Teórica (Da)	Ponto Isoelétrico (teórico)	Localização celular	Solubilidade	Similaridade com proteínas de outras espécies: 1.Humana 2. Outros <i>Schistosomas</i> 3. outros helmintos	Epitopos de Células B	Epitopos de Células T	Sítios de glicosilação	Sítio de adição de âncora de GPI
6 (36)	28736	4.85	Citoplasmática	Solúvel	1. 95% 14.3.3 epsilon; 2. 100% <i>S. japonicum</i> ; 3. Não	-	-	Não glicosilada	Não encontrado nenhum potencial sítio
12, 19 (20, 33,46)	41705	5.3	Citoplasmática	Solúvel	1. Não; 2.98% <i>S. japonicum</i> ; 3. Não	Em 7 sítios; score entre 0,783 e 0,996	Presente	Em 1 aminoácidos da sequência	Não encontrado nenhum potencial sítio
25	28104	7.64	Mitocondrial	Solúvel	1. 99% TPI 2. 99% <i>Haematobium japonicum</i> 3. Não	-	-	Não Glicosilada	Não encontrado nenhum potencial sítio
29 (52)	17660	8.26	Extracelular	Solúvel	1. Não 2. 98% <i>S. japonicum</i> 3. Taenia 99%	Em 2 sítios; score entre 0,863 e 0,999	Presente	Em 2 aminoácidos da sequência	Não encontrado nenhum potencial sítio
34	8680	5.31	Extracelular	Solúvel	1. 89% isoform CRA 90% calpain 90% unnamed protein 2. 100% <i>Hematobium</i> 87%, 99%-100% <i>S. japonicum</i> ; 3. Não	-	-	Não Glicosilada	Não encontrado nenhum potencial sítio
45 (57)	42060	5.56	Citoplasmática	Solúvel	1. 96% Actina; 2. Não; 3. Não	Em 5 sítios; score entre 0,902 e 0,999	Presente	Em 1 aminoácidos da sequência	Não encontrado nenhum potencial sítio
48	24045	6.54	Citoplasmática	Solúvel	1. Não ; 2. 89%-87% ,100 % <i>S. japonicum</i> , 88% bovis 88% <i>Haematobium</i> 3. Taenia 24%	Em 3 sítios; score entre 0, 762 e 0,998	Presente	Em 4 aminoácidos da sequência	Não encontrado nenhum potencial sítio
49 (50, 55)	13642	9.02	Citoplasmática	Solúvel	1. Não 2. 82%-100% <i>S. japonicum</i> 3. Não	Em 2 sítios; score entre 0,968 e 0,973	Presente	Em 4 aminoácidos da sequência	Não encontrado nenhum potencial sítio
60	55763	5.21	Mitocondrial	Solúvel	1. Atp syntetase. 93% 2. 100% <i>S. japonicum</i> - 3. Não	-	-	Não Glicosilada	Não encontrado nenhum potencial sítio

Escolhemos, inicialmente, testar o potencial da proteína identificada no *spot* 29, a qual denominamos SmCyp, como antígeno vacinal contra esquistossomose. A região codificadora do seu respectivo gene possui 483 nucleotídeos correspondentes a 161 aminoácidos, número de acesso: XP\_002575376.1, gi/256078182, sequência de aminoácidos: MAAKAFFDIKAGDERLGRIIFELFNDVDPDTRNFRELCTHKNNFGYKGSV FHRIIPGF MCQGGDFTNGDGTGGKSIYGNKFKDENFNHKHEAFSLSMANAGPNTNGSQFFITTVPCSWLDGKHHVVFVKVSGIDVVKKME SLGSTSGKPSKKIII EDCGEC. Esta proteína foi denominada de SmCyp por ser caracterizada como uma ciclofilina do *Schistosoma mansoni*. As ciclofilinas (Cyps) ou peptidilprolil cis-trans isomerases são proteínas ubiquinonas citosólicas altamente conservadas. Na esquistossomose as ciclofilinas são capazes de catalisar a interconversão de ligações peptídicas no lado amino-terminal dos resíduos de prolina de conformações Cis para Trans (Fischer et al., 1989). Além disso, as ciclofilinas são proteínas ligadoras específicas de uma droga imunossupressora: ciclosporina A (CsA). Estudos sugerem que tal droga reduz a carga parasitária, fecundidade das fêmeas e atividade de hemoglobina do *S. mansoni* na esquistossomose murina (Bueding, 1981). Sendo assim, infere-se que as ciclofilinas possuem importante papel nos danos causados no parasito e, conseqüentemente na sua eliminação (Kiang et al., 1996; Handschumacher et al., 1984). Após a compra do gene sintético, a região codificadora do gene que codifica a proteína SmCyp foi inserida em vetor pcDNA3.1/V5-His A (Invitrogen) para o ensaio de imunização gênica. Após a transformação, houve crescimento de 9 colônias de bactérias da cepa DH5 $\alpha$  no meio seletivo LB-ágar contendo ampicilina. Realizou-se mini-prep de todas as colônias e, para confirmar a presença do inserto, foi feita uma PCR utilizando os iniciadores BGH e T7. Apenas a colônia 5 apresentou um fragmento amplificado de massa molecular esperada, sendo então a escolhida para os próximos passos deste trabalho (Fig.14).



**Figura 14: Amplificação da região codificadora do gene correspondente a SmCyp.** Foi utilizado DNA plasmidiano de 9 colônias da bactéria *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) como DNA molde em reações de PCR utilizando os iniciadores BGH (*Reverse*) e T7 (*Forward*). PM: Padrão de peso molecular (100bp- BioLabs). Está circulada de vermelho a banda que apresentou o tamanho esperado (colônia 5).

A colônia 5 foi crescida em 5mL de meio LB contendo ampicilina e, posteriormente, repicada para 2,5L do mesmo meio de cultura para a extração do DNA plasmidiano livre de endotoxinas em grande escala. Ainda para confirmar a presença do inserto no clone selecionado, o DNA plasmidiano extraído foi submetido a uma digestão com as enzimas de restrição *BamHI* (Promega) e *AgeI* (Promega). Como observado na figura 15 houve liberação do inserto de tamanho esperado.



**Figura 15: Digestão do DNA plasmidiano pcDNA3.1/V5-His A vazio e contendo o gene codificador da proteína SmCyp.** 2µg de DNA plasmidiano foram digeridos com as enzimas de restrição *AgeI* e *BamHI* e analisados em gel de agarose 1% corado com *Sybr gold*. PM: Padrão de peso molecular 1Kb (BioLabs)

Este clone foi também sequenciado parcialmente e após a confirmação da correta janela aberta de leitura entre a região codificadora de SmCyp e o epitopo V5 e 6xHis do vetor, o DNA foi dosado por espectrofotometria para dar início às imunizações gênicas e ao experimento de transfecção de células de mamífero em cultura para avaliar a expressão da proteína pelo plasmídeo utilizado. Pela análise do Western blotting com extratos protéicos provenientes das células transfectadas usando anticorpos contra a cauda de Histidina (anti-6-HIS) foi possível observar a expressão da proteína recombinante rSmCyp e seu esperado peso molecular 17.7kDa.

Observou-se que a imunização com o DNA plasmidiano não alterou de forma estatisticamente significativa a carga parasitária dos camundongos imunizados e desafiados. Além disso, ao se avaliar o número de ovos presentes nas fezes, não foi observado diminuição

de forma significativa do número de ovos presentes no *pool* de fezes dos camundongos imunizados com o plasmídeo contendo o inserto (pcDNA 3.1/V5-His A/*SmCyp*) em relação ao grupo inoculado com o plasmídeo vazio (pcDNA 3.1/V5-His A). Observou-se, além disso, que não houve diminuição estatisticamente significativa do número de ovos retidos no fígado e intestino dos animais imunizados com o DNA plasmidiano contendo o inserto (pcDNA 3.1/V5-His A/*SmCyp*) em relação ao DNA plasmidiano vazio (pcDNA 3.1/V5-His A). Conseqüentemente, ao se analisar a interferência da imunização na fecundidade da fêmea, não houve alteração estatisticamente significativa. A fim de avaliar a produção de anticorpos induzida pela imunização com DNA plasmidiano contendo o inserto que codifica o gene de *SmCyp*, foi realizado o teste de ELISA sensibilizando as placas com dois peptídeos sintéticos correspondentes a epitopos preditos de células T e B na sequência da proteína: *SmCyp* (94-108) e *SmCyp*(107-121). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis dos anticorpos obtidos em camundongos imunizados com o plasmídeo contendo o inserto e o plasmídeo vazio. Ao se avaliar a patologia da doença observou-se que a imunização gênica com *SmCyp* foi capaz de induzir uma modulação da área do granuloma de forma significativa o que, conseqüentemente diminuiu a morbidade nos camundongos imunizados com o plasmídeo contendo o inserto. Ao se avaliar o perfil de citocinas produzido pelos esplenócitos, observou-se que a imunização com *SmCyp* induz um aumento significativo na produção IFN- $\gamma$ , quando estimuladas com *SmCyp* (94-108). Por outro lado houve uma redução da produção de IL-10 por estas células quando estimuladas com *SmCyp* (94-108) ou *SmCyp* (107-121). Houve também produção estatisticamente significativa de IL-17 quando estas células foram estimuladas com *Smteg*. Em relação às células de memória, a imunização com pcDNA 3.1/V5-His A/*SmCyp* não induziu aumento significativo de células TCD4 de memória efetora ou central apesar de tais células terem sido estimuladas por esta imunização uma vez que se observou aumento significativo da porcentagem de CD4+CD25+ quando comparado ao grupo inoculado com DNA plasmidiano vazio (pcDNA 3.1/V5-His A). Já em relação aos linfócitos TCD8, a imunização com pcDNA 3.1/V5-His A/*SmCyp* não induziu ativação de tais células, mas diminuiu de forma estatisticamente significativa a porcentagem de células de memória central TCD8+.. Além disso, a imunização com pcDNA 3.1/V5-His A/*SmCyp* não induziu aumento significativo de célula B de memória (artigo não publicado).



**A DNA vaccine containing the *Schistosoma mansoni* Cyclophilin A (*SmCyp*) gene induce modulation of liver granuloma in mice.**

Tatiane Teixeira de Melo<sup>1</sup>, Paola Rezende Patrocínio<sup>1</sup>, Clarice Carvalho Alves<sup>1</sup>, Gardênia Braz Carvalho<sup>1</sup>, Neusa Araujo<sup>1</sup>, Marcelo Vidigal Caliarí<sup>4</sup>, Rosiane Aparecida da Silva Pereira<sup>1</sup> and Cristina Toscano Fonseca<sup>1,2,\*</sup>.

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

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil.

<sup>3</sup>Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

\* Corresponding author: Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP: 30190-002.

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: +55 31 33497828.

E-mail address: [ctoscano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:ctoscano@cpqrr.fiocruz.br)

## 1 Introduction

Schistosomiasis is a debilitating disease caused by flatworm parasites of the *Schistosoma* genus which affects over 200 million individuals worldwide causing more than 200.000 deaths per year, with almost 800 million people at risk of infection (Bergquist et al., 2002; Engels et al., 2002; Steinmann et al., 2006). Due to limitations of the control strategy based on chemotherapy with praziquantel (PZQ), on limiting disease transmission alternative strategies as vaccination are necessary (Bergquist et al., 2002).

The *Schistosoma* tegument plays an important role in nutrient uptake and immune evasion (Loukas et al., 2007) and has currently become targets of vaccine studies. However, most of these studies aimed to identify antigens in adult worm tegument (Von Balkom et al., 2005; Braschi & Wilson, 2006) although schistosomula is the parasite stage most susceptible to the host immune system attack. In recent vaccinations studies, the *S. mansoni* schistosomula tegument (Smteg) was able to induce a protective immune response against parasite challenge infection (Teixeira de Melo et al., 2010; Teixeira de Melo et al., 2012), being the antibodies produced against tegument proteins able to transfer protection to naïve recipients (Melo et al., 2014).

Cyclophilins (Cyps) or peptidyl-prolyl cis-trans isomerases are highly conserved ubiquitous cytosolic proteins that carry out a wide range of functions as protein folding, trafficking, assembly and chaperoning (Fischer et al., 1989; Gothel et al., 1999; Schonbrunner et al., 1991). These proteins are classified into isoforms according to their cellular localization and amino acid sequence conservation (Mi H et al, 1996). Cyps cloned from a wide range of species and from parasites, as well as schistosomes, have shown a high degree of sequence conservation (Trandinh et al., 1992). The Cyps are able to catalyze the interconversion of peptide bonds on the amino side of proline residues that are in cis conformation to the trans conformation (Fischer et al, 1989).Kiang et al. (1996) showed that cyclophilin is located in the tegument, muscle layers, intestine epithelium and in the interior of the worm, and therefore, it is in contact with the host immune system. The cyclophilins are specific proteins receptors for the immunosuppressive drug: cyclosporine A (CsA). This drug is able to induce the complete elimination of a wide range of parasites, including

schistosomes, even if administered once during the experimental IFN $\gamma$  infection (Chappell et al., 1987; Chappell et al., 1988, Bueding et al., 1981). The complex Cyclosporine/Cyclophilin inhibits the translocation to the nucleus of the parasite nuclear factor homolog to the human NFAT (nuclear factor of activated T-cells), therefore inhibiting parasite development (Serra et al., 1999). Besides its role in parasite development and its accessibility to the host immune system, *S. mansoni* cyclophilin has never been used in vaccine formulation against schistosomiasis. However, recently Han et al. (2012) demonstrated that the *S. japonicum* cyclophilin A induces a protective immune response in immunized mice (Han et al., 2012).

Herein, the gene encoding the *S. mansoni* cyclophilin A was cloned into a mammalian expression vector and its ability to induce protective immunity in mice was evaluated using a DNA immunization strategy. This immunization protocol induced a type 1 immune profile that regulated the granuloma area and, consequently, the disease morbidity.

## **2 Methodology**

### **2.1 Mice and parasites**

Female C57BL/6 mice aged 6-8 weeks were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) facilities. All procedures involving animals were approved by the local Ethics Commission on Animal Use (CEUA) (LW26/12). Cercariae of *S. mansoni* (LE strain) were routinely maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and obtained by exposing IFN $\gamma$ -infected snails to light for 1h to 2h to induce cercariae shedding. The number of cercariae and their viability were determined using a light microscope.

### **2.2 Schistosomula tegument (Smt $\gamma$ ) purification**

Cercariae from *S. mansoni* were mechanically transformed into skin-stage schistosomula according to Ramalho-Pinto et al. (1974). Briefly, cercariae were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 1800 x g for 3 min at 4°C. The cercariae were resuspended in cold ELAC (Earle's salts plus lactalbumin hydrolysate) containing 0.5% lactalbumin, 1% penicillin/streptomycin and 0.17% glucose. The tails were broken by vortexing in high speed for 2 minutes. After this, the tails were removed through several wash

steps with ELAC. The schistosomula were cultured for 90 min at 37°C in ELAC. The tegument was removed with CaCl<sub>2</sub> 0.3M by vortex agitation. The tegument was separated from denuded bodies by centrifugation at 200 xg for 1 min. The supernatants were pooled and centrifuged at 50000 x g for 1h at 4°C. The pellet, resuspended in saline, was dialyzed against physiological saline. This preparation was termed Smtteg and used to stimulate spleen cells in *in vitro* culture assays.

### 2.3 *In silico* analysis of SmCyp

A protein spot of the schistosomula tegument preparation, which was recognized by sera from mice immunized with Smtteg + CFA/IFA (Teixeira de Melo et al., 2010) in a bidimensional Western blotting (2D-WB), was submitted to mass spectrometry analyses and was identified as a *S. mansoni* cyclophilin A (access number: XP\_002575376.1). *In silico* analysis of the protein sequence was performed using SOSUI Engine version 1.11 ([bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/)) to transmembrane domain and solubility prediction and SherLoc software ([bs.IFNormatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/](http://bs.IFNormatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/)) to cellular location prediction. To assess the similarity between human or helminthic proteins, the amino acid sequences were compared with the National Center for Biotechnology Information protein database using the BlastP (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool) algorithm ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) (using the default parameters of this algorithm).

The amino acid sequence of our identified protein spot and other *S. mansoni* cyclophilins (XP\_002575376.1; AAC47317.1; Q26551.1) were aligned using ClustalW2 multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). T cell and B cell epitope prediction were performed using Rankpep (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>) and BCPred (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/>), respectively. In Rankpep, T cell prediction was performed using default parameters and selecting IaB to predict C57BL-6 T cell epitopes in the protein sequence. In BCPred, B cell epitope predictions were performed using Flexible Length Prediction (FLP) and 75% specificity.

## 2.4 Plasmid construction

*SmCyp* synthetic gene was designed using ApE software ([www.apesoftware.com](http://www.apesoftware.com)) and the coding region sequence of *SmCyp* (access number:XP\_002575376.1). The mini-gene was designed with restriction sites for the enzymes *Bam*HI (GGATCC) at 5'end and *Age*I (ACCGGT) at 3'end. The *SmCyp* coding region was inserted into the mammalian expression vector pcDNA 3.1 V5/His A (Invitrogen). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was transformed with the pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* construct. Clones containing the insert were selected by the resistance to ampicillin. The presence of *SmCyp* gene in the pcDNA 3.1/*SmCyp* construct was confirmed by restriction enzymes digestion using *Bam*HI and *Age*I and DNA sequencing. Plasmid DNA purification was performed using end toxin free Giga-prep kit according to manufacturer's instructions (Siegen, Valencia, CA).

## 2.5 SmCyP expression in mammalian cells

The construct pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* was transfected into mammalian cells HEK293T maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- GIBCO-Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Transfection was performed by lipofection technique using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The plasmid pcDNA 3.1 V5/His B, containing a non-correlated gene with C-terminal 6xHis-tag was used as positive control, and the empty plasmid pcDNA3.1/V5-His A and non-transfected cells were used as negative controls. The protocol below was optimized for transfection in 24-well plate format. In each well, 2.0 x 10<sup>5</sup> cells were seeded in 500 $\mu$ L of DMEM with 10% FBS. This plate was maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Each plasmid DNA sample and lipofectamine was diluted separately in DMEM (0.8 $\mu$ g of plasmid DNA and 2 $\mu$ L of lipofectamine in 50 $\mu$ L of culture medium). After 5 min at room temperature, the diluted lipofectamine was mixed with each DNA sample. This mixture was incubated for 20 min at room temperature, allowing formation of DNA-liposome complexes. Each mixture was added to the cells in a DMEM pre-washed culture plate, which was maintained for approximately 5hr at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and washed again in DMEM containing 10% FBS. After a 48 hr at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubation step, the transfected cell cultures were subjected to lysis for total protein extraction in 150 $\mu$ L of 2X Laemmli buffer (BioRad) plus  $\beta$ -

mercaptoethanol (950 $\mu$ L of 2X Laemmli buffer + 50 $\mu$ L of  $\beta$ -mercaptoethanol). The samples were boiled at 100°C for 5 min and stored at -70°C until the use. The quality of the protein extracts was assessed by 12% denaturing polyacrylamide gel by electrophoresis (Laemmli 1970) and the SmCyp protein expression was verified by Western blotting using anti-6xHis antibody conjugated to HRP (Invitrogen). The proteins were transferred to Immun-Blot PVDF membrane (Amersham Biosciences) as previously described by Towbin et al. (1979). The membrane was blocked in Tris-buffered saline (TBS)/ 0.1% Tween 20 (TBS-T)/3% BSA at room temperature for 16 hr and incubated with anti-6xHis antibody diluted 1:5.000 in TBS-T/1% BSA for 1h. After two washes in TBS-T and one wash in TBS the reaction was revealed using ECL Plus Western Blotting Detection System (GE-Healthcare) and the image was captured in ImageQuant LAS 4000 (GE-Healthcare) by chemiluminescence method.

## **2.6 Immunization of mice**

Female C57BL/6 mice (10 mice per group) received four doses of 100 $\mu$ g of purified plasmid DNA in the quadriceps muscle with an interval of 15 days between each dose. Five days before the first immunization the mice received 100  $\mu$ L/animal of cardiotoxin (0,06mg/mL). Two groups were included in this study: one group received 100 $\mu$ g of empty pcDNA 3.1 V5/His A, another received 100 $\mu$ g of pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp*. Blood samples were collected from retro-orbital sinus of each mouse with an interval of 15 days beginning 15 days after the first immunization. Serum samples were collected and stored at -20°C until use. Fifteen days after the last boost, mice were challenge through percutaneous exposure of abdominal skin for 1h in water containing 100 cercariae (LE strain) as described by Smithers and Terry (1965). Fifty days after challenge, adult worms were perfused from the portal system and mesenteric veins according to Pellegrino and Siqueira (1956). On days 48, 49 and 50 after challenge IFN $\gamma$  secretion, 0.5g of fecal material from each mouse group were analyzed for egg burden determination by HPJ methods (Hoffman et al., 1934). In HPJ, whole sediment was evaluated to determine egg per gram of feces (epg). Two independent experiments were performed to confirm the results observed.

## **2.7 Measurement of eggs in the intestine and the liver of immunized mice**

Intestine and liver from each mouse group were collected 50 days post-IFN $\alpha$  injection. These organs were weighed and digested with 10% KOH for 16hr at 4°C and for 2 hours at 37°C. The eggs were obtained by centrifugation at 900 x g for 10 min and resuspended in 1mL of saline. Egg number was counted using a light microscope.

## **2.8 Measurement of specific anti-SmCyp antibodies**

The measurement of specific anti-SmCypIgG was performed by ELISA. Maxsorp 96-wells microtiter plates (Nunc) were coated with 1 $\mu$ g/mL of the SmCyp(94-108) SLSMANAGPNTNGSQ or SmCyp(107-212) SQFFITTVPCSWLDG synthetic peptides in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, for 16hr at 4°C. The plates were then blocked for 2hr at 4°C with 300 $\mu$ L/well of PBST (phosphate-buffered saline, pH 7.2 with 0.05% Tween-20) plus 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO, USA). One hundred microliters of each serum diluted 1:50 in PBST was added per well and incubated for 1hr at room temperature. Plate-bound antibody was detected by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotech, USA) at dilution 1:10.000. Color reaction was developed by addition of 100 $\mu$ L per well of TMB (Microwell Peroxidase Substrate System) and stopped with 50 $\mu$ L of 5% sulfuric acid per well. Absorbance was measured at 450nm in microplate reader (BIO-RAD).

## **2.9 Measurement of number and area of the hepatic granuloma**

Liver sections from control mice group immunized with empty pcDNA 3.1 V5/His A and from the group immunized with with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* were collected 50 days post-IFN $\alpha$  injection to evaluate the effect of immunization on granuloma formation. The liver sections removed from the central part of the left lateral lobe were fixed in 10% buffered formaldehyde in PBS. Histological sections were performed using microtome and the slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). To perform the measurement of granuloma area, 100 granulomas from each group with a single well-defined egg and at the exsudative-productive stage were randomly obtained at 10x objective lens through a JVC TK-1270/RGB microcamera. Using a digital pad, the total area of the granulomas was measured and the results were expressed in square micrometers ( $\mu$ m<sup>2</sup>). To determine the number of granulomas,

all section from the same slides mentioned above were counted using a microscope with 10x objective lens and the total area of the liver histological section was calculated using the same software. The results were expressed as the number of granuloma per area of liver (mm<sup>2</sup>).

## **2.10 Cytokine analysis**

Experiments were performed using spleen cell culture supernatants from five individual mice per group immunized with empty pcDNA 3.1 V5/His A or pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp*, one week after the last immunization. The cells obtained from mice spleen were washed twice in sterile saline and then, adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/well. Spleen cells were maintained in culture at 37°C in 5% of CO<sub>2</sub> in medium alone or stimulated with *SmCyp* 94-108 (10µg/well), *SmCyp*107-121 (10µg/well), *Smtcg* (5µg/well) or concanavalin A (Con A) (1µg/well). The supernatant was collected 24h after stimulation for quantification of IL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF-α and IFN-γ production using mouse Th1/Th2/Th17 Kilometric Bead Array (CBA) Kit (BD Biosciences, USA). The cytokines were evaluated as recommended by the manufacturer. Data were acquired in a Facscan flow cytometer (Becton Dickinson) and the analyses were performed using BD CBA software (Becton Dickinson).

## **2.11 Immune cells activation pattern**

For *ex vivo* cellular staining, spleen cells from 4 mice/group/experiment were adjusted to  $5 \times 10^5$  cells per well. Before staining, the cells were generally blocked with anti-mouse CD16/CD32 mAbs (Fc-Block), after that cells were stained for surface markers using anti-CD4 FITC labeled (clone GK1.5, BD-Pharmingen), anti-CD8Percp labeled (clone 53-6-7, e-bioscience), anti-CD44 pacific blue labeled (clone IM7, BioLegend), anti-CD62 alexa-700 labeled (clone MEL-14, e-bioscience), anti-CD25 Biotin-labeled (clone 7D4, BD-Pharmingen), anti-CD27 Biotin labeled (clone LG.7F9, e-bioscience), anti-CD19PE-Cy7 labeled (clone 1D3, BD-Pharmingen), and anti-CD127 PE-CY7 labeled (clone A7R34, e-bioscience) monoclonal antibodies and their respective isotype controls by incubation for 20 min with antibody solution (PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM NaN<sub>3</sub>) at 4°C. After a washed step with PBS 0.15 M, 0.5% BSA, 2 mM NaN<sub>3</sub>, cells were submitted to a further incubation step of 20 minutes with streptavidin-APC-CY7 labeled diluted 1:200 in PBS 0.15 M, 0.25%



BSA, 1mM NaN<sub>3</sub> at 4°C, followed by washes and fixation using 2% formaldehyde solution. The labeled cells data were obtained using LSR fortessa cytometer. Data analysis was performed using a FlowJO interface (Tree Star, Ashland, OR).

## 2.12 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software package GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA). Data normality was tested using D'Agostino e Pearson omnibus normality test. Statistical analyses were performed using paired student T test or Wilcoxon matched pair test, depending on data distribution, for cytokine measurement (Intracellular staining). Student T test was applied for parasitological, histological, CBA and ELISA analyses.

## 3. Results

### 3.1 SmCyp identification and *in silico* characterization

A spot of approximately 17.1 kDa and 8.26 Pi was recognized by sera from mice immunized with Smtg + CFA/IFA (Teixeira de Melo et al., 2010) in a bidimensional Western blotting of the schistosomula tegument preparation. Peptides obtained from this spot were analyzed by mass spectrometry and the corresponding protein was identified as a *S. mansoni* cyclophilin (SmCyp) using Mascot software (Matrix Science, Boston, MA) and NCBI database. The predicted protein localization performed by SherLoc algorithm indicates that SmCyp is an extracellular protein, with predicted molecular weight and pI of 17660 Ad and 8.26, respectively. By aminoacid sequences alignment with other described isoforms of *S. mansoni* cyclophilin, the sequence of the protein identified in this study by bidimensional Western blotting followed by mass spectrometry correspond to Smp17.7 cyclophilin described by Kiang et al., 1996 (Fig. 1).

B and T cells epitopes predicted by RankPep and BCpred with the highest scores are described in Table 1. Two synthetic peptides SmCyp 94-108 (SLSMANAGPNTNGSQ) and SmCyp 107-121 (SQFFITTVPCSWLDG) containing B and T cell predicted epitopes from

SmCyp were purchased from Genescript (NJ, USA) with <95% purity to be used as antigen in ELISA and spleen cell culture assays.

### **3.2 SmCyp expression in mammalian cells**

Before beginning the DNA immunization protocol, we evaluated the SmCyp expression in mammalian cell cultures. *Western blotting* analysis of transient transfected cells HEK293T, using antibody against the 6xHis tag, demonstrated the successful expression of the rSmCyp in the expected molecular weight of 17.1kDa(Fig. 2).

### **3.3 Protective response induced by pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp immunization**

In order to assess the ability of DNA vaccination with pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp to induce protection in marine model, 15 days after the last immunization mice were challenge and the protection level was determined. Mice immunization with pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp did not result in significant reduction in worm burden nor in the number of eggs eliminated in the feces or trapped in intestine and liver when compared to empty pcDNA 3.1 V5/His A (Table 2).

### **3.4 Liver pathology**

To assess the effect of DNA immunization with pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp in liver pathology, the mice were euthanized 50 days post-challenge and the liver pathology analyzed by digital morphometry of H&E sections. Granuloma modulation, with a significant reduction in granuloma area, was observed in pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp immunized group comparing to the control group (Figs 4a and b). Nevertheless, any significant reduction in the number of liver granuloma was observed between pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp immunized group and the control group immunized with empty plasmid (Fig. 4B).

### **3.5 Antibody responses to pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp immunization**

Specific antibody production were measured in the sera samples from immunized and control groups, using synthetic peptides (SmCyp 94-108 and SmCyp107-121) containing T and B cells SmCyp predicted epitopes as antigen. Any significant production of IgG

antibodies were detected in the sera of pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* immunized mice compared to control group at all time point analyzed (Fig 3).

### **3.6 Cytokine profile induced by immunization**

A significant increase in IFN- $\gamma$  production was detected in the spleen cells supernatant from the mice immunized with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* when stimulated with SmCyp (94-108) in comparison to the group of mice immunized with empty pcDNA 3.1 V5/His A. In contrast, a significant reduction in IL-10 production by SmCyp (94-108) or SmCyp (107-121) stimulated spleen cells was observed in immunized animals compared to control group (Fig 5). Smteg stimulation induced increased production of IL-17 in pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* immunized group in comparison to control group (Fig 5).

### **3.7 Immune cell profile induced by immunization**

Mice immunization with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* did not induce any significant increase in the percentage of CD4 central or effector memory cells although immunization was able to activate CD4<sup>+</sup> cells, once a significant increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in comparison to the group immunized with pcDNA 3.1 V5/His A was observed (Fig 6). In contrast, CD8<sup>+</sup> cells were not activated, and immunization induced a significant reduction in percentage of CD8<sup>+</sup> central memory cell (Fig 6). pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* immunization also failed to increase the number of memory B cells (Fig. 6).

## **4 Discussion**

Schistosomiasis is a serious public health problem in Brazil and worldwide. The current control programs, based in PZQ chemotherapy, have reduced morbidity and mortality but have failed to reduce disease transmission. And also, due to constant reInfection and PZQ treatment, a risk of drug resistance development exists (Kalinna, 1997). Therefore, one major goal in the research on the immune response to *Schistosoma mansoni* is to develop a vaccine (Kojima et al., 2004). Proteins from the *S. mansoni* tegument as Tetraspanin, Sm22.6, Sm200 and Sm29 have shown to be good vaccine targets (Tran et al., 2006; Santiago et al., 1998; Sauma & Strand, 1990; Cardoso et al., 2006). Other important molecule present in

the tegument of *Schistosoma* is the cyclophilin (Cyp). Its ability to interact with the immunosuppressive drug cyclosporine A (CsA) made this protein become an interesting candidate to vaccine (Kiang et al, 1996). The CsA have been shown to promote parasite death in *S. mansoni* IFNected mice. This effect of CsA is believe to be mediated by CyP-CsA complex, which inhibit phosphatase calcineurin and blocks signal transduction (Klinkert et al, 1996; Serra et al, 1999).

In this study, we evaluated the ability of *SmCyp* gene to induce protective immunity against *S. mansoni* in mice using DNA immunization strategy. *SmCyp* was identified as one of the immunogenic proteins of the schistosomula tegument. The similarity analysis of amino acid sequence with other *S. mansoni* cyclophilins demonstrated that *SmCyp* is identical to the *Smp17.7* protein identified and characterized by Kiang et al. (1996). In their study, Kiang et al used the purified antibodies against tegumental components of schistosomula to screen a *S. mansoni* adult worm cDNA library and one of reactive clones was determined by sequence analysis to encode a protein homologous to cyclophilin A. Our *in silico* analysis of *SmCyp* predicted an extracellular localization to this protein. However Kiang et al (1996) have demonstrated by immune fluorescence that this protein is located in the tegument and gut epithelium and thus, even if the protein is secreted by parasite cells, it remains attached to the epithelium. Due to the contact to the host immune system, the predicted immunogenicity (Table1) and the role on parasite development, *SmCyp* represent an interesting target to vaccine development. Indeed mice immunization with a recombinant form of the *S. japonicum* cyclophilin (*SjCypA*) induced significant reduction in worm burden (Han et al., 2012). Our immunization strategy, however, failed to induce a significant reduction in worm burden, in the number of eggs eliminated with the feces and in the number of eggs trapped in the liver or intestine (Table2). In addition, *SmCyp* DNA immunization, did not induced significant levels of specific antibodies (Fig3). The absence of protection and specific antibody production cannot be attributed to an absence of protein expression in the cells of immunized animals, since *SmCyp* expression in fusion with a 6xHis tag was detected in HEK293T transfected cells (Fig2) by Western blotting assay using anti-6xHis antibody that presented molecular weight of 17.1kDa as predict by *in silico* analysis. Also, in mice immunized with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* an increase on the percentage of CD4+CD25+

activated cells was observed, indicating that the cellular immune response has been activated (Fig 6).

Several studies have demonstrated that in a successful vaccine formulation against schistosomiasis both humoral and cell-mediated immunity are essential (Jankovic et al., 1999; Torben et al., 2012). In the mouse model, it has been showed that B cell-deficient mice singly vaccinated with radiation cercariae-attenuated *S. mansoni* cercariae are significantly less protected against challenge infection than wild type mice (Jankovic et al, 1999). Moreover serum transference in rabbits, mice and rats showed that sera from vaccinated animals can protect them against infection with *S. mansoni* when transferred to non-immunized animals (Ford et al, 1984; Melo et al., 2014; Bickle et al, 1985). This demonstrated the crucial importance of antibodies in protection against *S. mansoni*. Herein we observed a weak activation of humoral response with low titers of specific IgG antibodies in sera from mice immunized with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp*. This poor activation of humoral response may have contributed to the absence of protection in our immunization strategy.

Immunological memory is the basis for vaccination. Memory cells have the ability to produce a fast immune response upon exposure to the same pathogen (Crotty et al, 2004). Immunization with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* was not able to increase the percentage of CD4, CD8 or B memory cells (Fig6), which also might have contributed to the absence of protective immune response.

Although our immunization strategy failed to reduce worm burden, a significant reduction in granuloma size was observed in immunized mice (Fig. 4). The granulomatous reaction represents the major pathology consequence associated with schistosomiasis, and also the intensity of these reaction correlates with host morbidity (Stadecker et al., 1999; Wynn & Cheever, 1995; Abath et al., 2006). Although egg-induced granulomas detrimental to the infected host, the absence of granulomatous reaction has also detrimental effect (Hoffman et al., 2000). Therefore the modulation of the granulomatous reaction leading to reduced granuloma area represents the best scenario in the host-parasite interaction.

While it has been known that the granulomatous response is largely CD4<sup>+</sup> cell-dependent, cytokine roles in granuloma orchestration remain unclear (Matthew et al., 1986, Pearce et al., 1996; Phillips & Lammie, 1986; Hsu et al., 1976). IL-4 was proposed to play a major role in granuloma formation, indeed IL-4 neutralization in IFN- $\gamma$  infected mice results in reduced lesion size (Yamashita et al., 1992) and collagen deposition (Cheever et al. 1994). On the other hand, Pearce et al. (1996) showed that there are no differences in granuloma size between IL-4 knockout (KO) and wild type mice. Some contradictory results have been described in IFN- $\gamma$  role in granuloma formation. Some studies report that IFN- $\gamma$  stimulates granuloma formation (Rezende et al. 1997) while others describe a role for IFN- $\gamma$  in granuloma modulation (Wynn & Cheever, 1995; Rutitzky & Stadecker, 2011). Besides Th1/Th2 balance in granuloma modulation, other immunological mechanisms, such as alternatively activated macrophages (aaM $\Phi$ ) (Herbert et al., 2004), regulatory T cell activation (Singh et al., 2005) or increased production of IL-10 (Wynn et al., 1998), have also been described in granuloma modulation. Cytokine measurement in spleen cell culture supernatant demonstrated that immunization with pcDNA 3.1/V5-His/A-*Smcyp* induced a significant increase in IFN- $\gamma$  production and a significant decrease in IL-10 production (Fig. 5). Therefore IL-10 and aaM $\Phi$  seem not to be involved, and IFN- $\gamma$  role in these modulations still to be determined.

## 5 References

1. Abath FG, Morais CN, Montenegro CE, Wynn TA, Montenegro SM. Immunopathogenic mechanism in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol*, 2006; 22: 85-91.
2. Bergquist NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol*. 2002 Jul;18(7):309-14.
3. Bickle QD, Andrews BJ, Doenhoff MJ, Ford MJ, Taylor MG. Resistance against *Schistosoma mansoni* induced by highly irradiated IFN- $\gamma$  infections: studies on species specificity of immunization and attempts to transfer resistance. *Parasitology*. 1985;90 (Pt 2):301-12.

4. Braschi S, Borges WC, Wilson RA. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; 101 (Suppl 1): 205-12.
5. Bueding E, Hawkins J, Cha YN. Anti *Schistosomal* effect of cycloporine A. *Agents Actions*, 1981; 4: 380-383.
6. Cardoso FC, Pacifico RN, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic áreas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol*, 2006<sup>a</sup>; 144: 382-391.
7. Chappell LH, Thomson AW, Barker GC, Smith SWG. Dosage, timing and oute of administration of cyclosporin A and no immunosuppressive derivatives of dihydrocyclosporin A and cyclosporin C. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31: 1567-77
8. Chappell LH, Thomson AW. Studies on the action of cyclosporin A against *Schistosoma mansoni* and other parasitic IFNectons. *Transplant Proc.*, 1988; 20: 291-97.
9. Cheever AW, williamn ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox T, Hieny S, Caspar P, Sher A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-IFNected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol*. 1994;153(2):753-9.
10. Crotty S., Aubert R. D., Glidewell J., Ahmed R. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J. Immunol. Methods*, . (2004); 286: 111–122
11. Göthel SF, Marahiel MA. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*, 1999;55(3):423-36.
12. Engels D, Chitsulo L, Montresos A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta trop*. 2002; 139-146.
13. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 1989; 337: 476-78.

14. Ford MJ, Bickle QD, Taylor MG, Andrews BJ. Passive transfer of resistance and the site of immune-dependent elimination of the challenge infection in rats vaccinated with highly irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1984;89 ( Pt 3):461-82.
15. Han H, Peng J, Hong Y, Fu Z, Xu J, Lin J, Tao J. Molecular cloning and characterization of a cyclophilin A homologue from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res*. 2012 Aug;111(2):807-17.
16. Herbert D. R., Holscher C., Mohrs M., Arendse B., Schwegmann A., Radwanska M., et al. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20, 623–635.
17. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Publ Hlth*1934; 9: 281-298
18. Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*, 2000;164 (12): 6406-16.
19. Hsu CK, Hsu SH, Whitney RA, Hansen CT. Immunopathology of schistosomiasis in athymic mice. *Nature*, 1976; 262: 397-99.
20. Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Caspar R, James S, Cheever AW, et al.. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- $\gamma$  dependent effector mechanisms. *J Immunol* 1999; 162 (1): 345-351
21. Kalinna BH. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol*. 1997;75(4):370-5. Review.
22. Kiang D, El Ghazalie NE, Medhat AM, Abdel-Fattah M, Karim AM, LoVerde PT. Identification and characterization of *Schistosoma mansoni* p17.7, a cyclophilin. *Mole Bioch Parasitol*. 1996; 76 (1-2): 73-82.



23. Klinkert MQ, Bugli F, Cruz J, Engels B, , Cioli D. Sequence conservation of schistosome cyclophilins. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 81: 239-42.
24. Kojima S. Overview: from the horse experimentation by Prof. Akira Fujinami to paramyosin. *Parasitol Int.* 2004; 53(2):151-62.
25. Loukas A, Tran M, Pearson MS. Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int J Parasitol.* 2007; 37(3-4):257-63.
26. Mathew Arc, Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin2 production in *Schistosoma mansoni* IFNectin. *IFNect Immun*, 1986; 54: 820-26.
27. Melo TT, Sena IC, Araújo N, Fonseca CT. Antibodies are involved in the protective immunity induced in mice by *Schisosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtcg) immunization. *Parasite immunology*, 2014; 36: 107-111.
28. Mi H, Kops O, Zimmermann E, Jäschke A, Tropschug M. A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett.* 1996; 398(2-3):201-5
29. Pearce EJ, Cheever A, Leonard S, Covalsky M, Fernandez-Botran R, Kohler G, Kopf M. *Schistosoma mansoni* in IL-4-deficient mice. *Int Immunol.* 1996; 8(4):435-44.
30. Phillips SM, Lammie PJ. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. *Parasitol Today.* 1986 Nov;2(11):296-302.
31. Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pelegrino. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule *in vitro*. *Exp Parasitol*, 1974; 36 (3):360-72.
32. Rezende SA, Oliveira VR, Silva AM, Alves JB, Goes AM, Reis LF. Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to *Schistosoma mansoni* IFNectin. *IFNect Immunol*, 1997; 65: 3457-61.

33. Rutitzky L. I., Stadecker M. J. (2011). Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* IFN $\alpha$  infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- $\gamma$ . Eur. J. Immunol. 41, 2677–2687
34. Santiago ML, Hafalla JCR, Kurtis JD, et al. Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides. International archives of Allergy and Immunology, 1998; 117 (2): 94-104.
35. Sauma SY, Strand M. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. Molecular and Biochemical Parasitology, 1990; 38: 199-210.
36. Schönbrunner ER, Mayer S, Tropschug M, Fischer G, Takahashi N, Schmid FX. Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. J Biol Chem, 1991; 266(6):3630-5.
37. Serra EC, Lardans V, Dissous C. Identification of NF-AT-like transcription factor in *Schistosoma mansoni*: its possible involvement in the antiparasitic action of cyclosporin A. Mol Biochem Parasitol. 1999 Jun 25;101(1-2):33-41.
38. Singh K. P., Gerard H. C., Hudson A. P., Reddy T. R., Boros D. L. (2005). Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* IFN $\alpha$  infected mice. Immunology 114, 410–417
39. Stadecker MJ. The development of granulomas in schistosomiasis: genetic backgrounds, regulatory pathways, and specific egg antigen responses that IFN $\alpha$  influence the magnitude of disease. Microbes and IFN $\alpha$ , 1999; 505-510.
40. Steinmann P, Keiser J, Bos J, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet IFN $\alpha$  Dis 2006; 6 (7): 411-25.
41. Teixeira de Melo T, Araujo JM, Do Valle Durães F, Caliani MV, Oliveira SC, Coelho PM, Fonseca CT. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula

tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. *Parasite Immunol*, 2010; 32 (11-12): 749-59.

42. Teixeira de Melo T, Araujo JM, Campos de Sena I, Carvalho Alves C, Araújo N, Toscano Fonseca C. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) in association with CpG-ODN. *Microbes and Infect*, 2012; 15 (2013): 28-36.

43. Torben W, Ahmad G, Zhang W, Nash S, Le L, Karmakar S, Siddiqui AA. Role of antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni*. *Vaccine*. 2012 Nov 6;30(48):6753-8

44. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, *et al.* Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*, 2006; 12 (7): 835-40.

45. Trandinh CC, Pao GM, Saier MH. Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl cis trans isomerases. *FASEB J*, 1992; 6: 3410-20

46. Van Balkom BW, Van Gestel RA, Brouwers JF, Krijgsveld J, Tielens AG, Heck AJ, Van Hellemond JJ. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental subproteome. *J. Proteome Res*, 2005; 4: 958-66.

47. Wynn TA, Cheever AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol* 1995; 7 (4): 505-511.

48. Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kühn R, Müller W, Sher A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J Immunol*. 1998;160(9):4473-80.

## Figures

```

Spot          -----MAAK-----AFFDIKAGDERLGRIIFELFND-VPDI 30
Smp17.7      -----MAAK-----AFFDIKAGDERLGRIIFELFND-VPDI 30
SmCyp-A      -----MRTKKQ-KRNLFVFFDIRIGNGDAGRIVMELRSDIVPRI 39
SmCyp-B      MAVLKPLCPLLLLSIIICFGLIRSEANGPKVTDKVFDFDIEVDGKPLARIIIIGLFGKTVPKI 60
              : ::                .****. .. .**:: * .. ** *

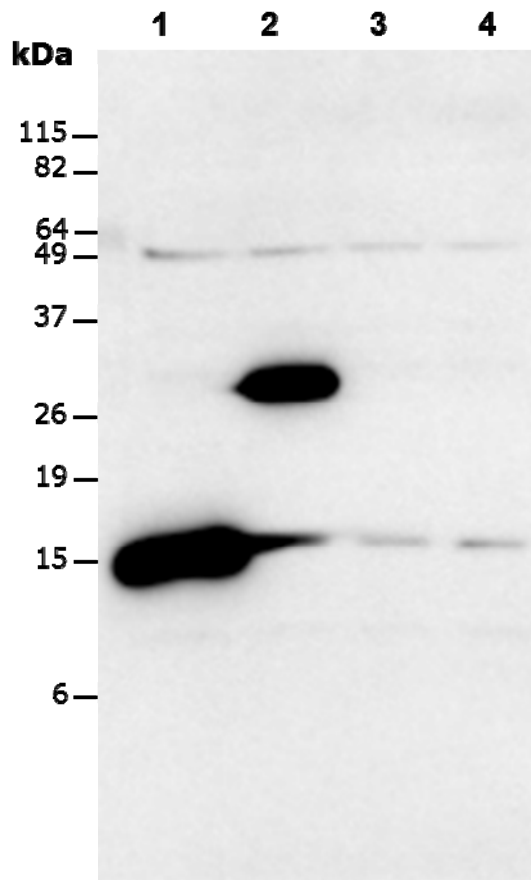
Spot          TRNFRELCTH----KNNFGYKGSVFHRIIPGFMCQGGDFINGDGTGGKSIYGNKFKDEN 85
Smp17.7      TRNFRELCTH----KNNFGYKGSVFHRIIPGFMCQGGDFINGDGTGGKSIYGNKFKDEN 85
SmCyp-A      AENFRALGTG----ERGFYHNCCFHRVLPQFMCQGGDFVKGDTGGKSIYGRKFDEN 94
SmCyp-B      VENFKQLSIGTQLKDGRTASYKGFHRVKSFMIQGGDFTNHDGTGGFSIYGRDFDEN 120
              ..** : *                .*:.. ***:* ** *****.: ***** ***: * ***

Spot          FNHKHEAF-SLSMANAGPNTNGSQFFIT-TVPCSWLDGKHVVFGKVVSGIDVVKMESLG 143
Smp17.7      FNHKHEAF-SLSMANAGPNTNGSQFFIT-TVPCSWLDGKEVVFGKVVSGIDVVKMESLG 143
SmCyp-A      IQLRHGEGFVLSMANSGPNTNGSQFFITCTIKCDWLDGKHVVFGRVVDGQNVVKMESVG 154
SmCyp-B      FKLRVGAGWLSMANAGPDTNGSQFFIT-TVKTSWLDGKHVVFGKVVVEGMNIVRQIESET 179
              :: : * . *****:***** ** . *****:*****:*** * :*:***

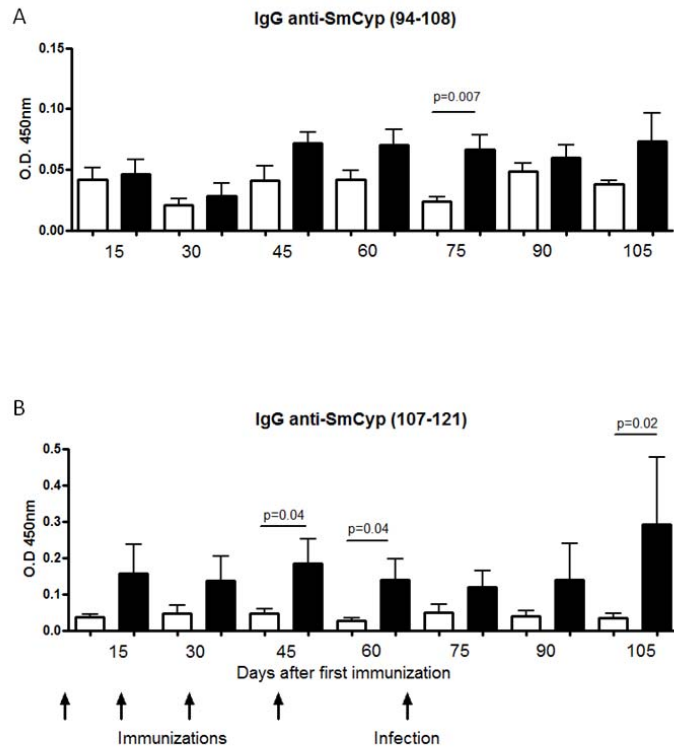
Spot          STS-GKPSKKIIIEDCGEC----- 161
Smp17.7      STS-GKPSKKIIIEDCGEC----- 161
SmCyp-A      SKS-GKKKEPVIIISRCGELI----- 173
SmCyp-B      TDSRDRPVKSIKIASCGHIPVEIPFSVINSDAVE 213
              : * .: : : * **.

```

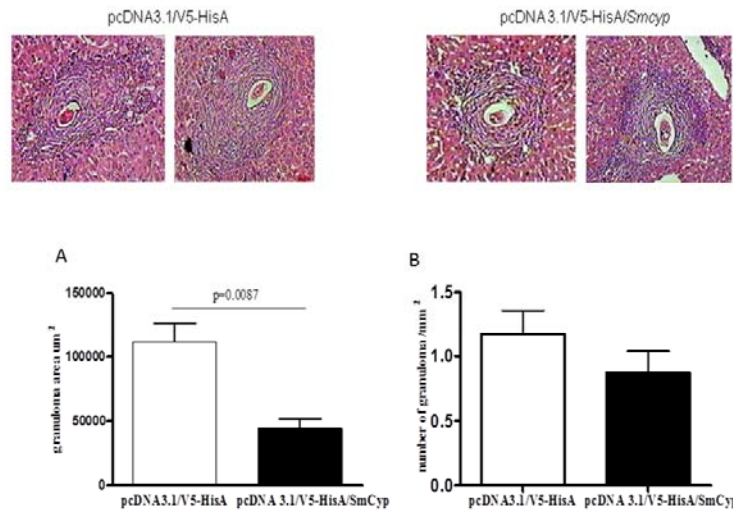
**Figure 1: Alignment of schistosome cyclophilins protein sequences.** Common amino acid residues from all cyclophilins protein sequences were aligned using ClustalW2 multiple sequence alignment. Identical residues are indicated by an asterisk, similar and less similar residues are indicated by double and single dots, respectively. T and B cell predicted epitope is highlight by a dashed square. A T cell predicted epitope is underlined in the protein sequence.



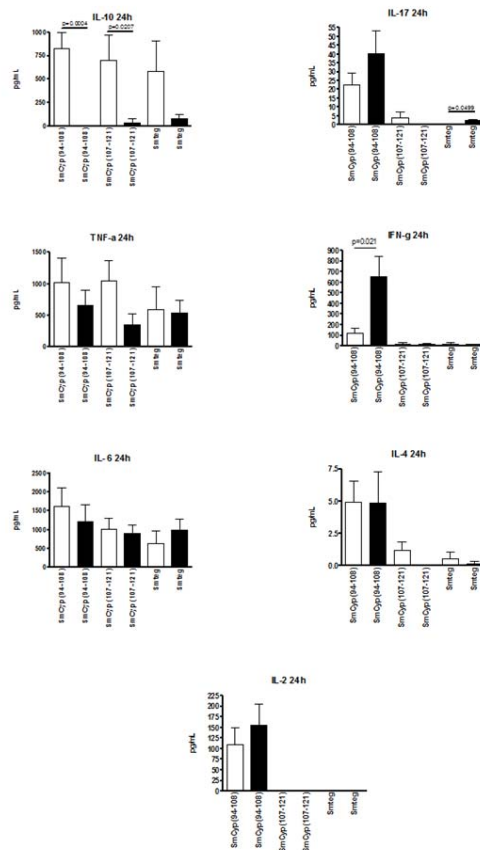
**Figure 2: Western blotting analysis of SmCyp expression by transient transfected HEK293T cells.** HEK293T culture cells were transiently transfected by lipofection technique with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The protein extracts of cells transfected with pcDNA3.1/V5-His A plasmid containing the coding region of *SmCyp* gene of *S. mansoni* fused to V5 epitope and 6xHis codons (line 1); pcDNA3.1/V5-His B plasmid containing the coding region of a non-correlated gene of *S. mansoni* also fused to V5 epitope and 6xHis codons (line 2); empty pcDNA3.1/V5-His A (line 3) and the protein extract of non-transfected cells (line 4) were used in a Western blotting assay with anti-His (Cterm)-HRP antibody (Invitrogen) (1:5.000). The reaction was revealed using ECL Plus Western Blotting Detection System (GE-Healthcare) and the image was captured in ImageQuant LAS 4000 (GE-Healthcare) by chemiluminescence method. The *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen) was used as the molecular weight marker (kDa).



**Figure 3: Kinetics of specific anti-SmCyp IgG.** Mice were immunized with four doses of a vaccine formulation containing pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp (Black bars) or empty pcDNA 3.1 V5/His A (White bars). Five days before the first immunization, mice received 100  $\mu$ L/animal of cardiotoxin (0.06mg/mL). Sera samples, diluted 1:50, were obtained from 10 individual mice from each group on days 15, 30, 45, 60, 75, 90, and 105 after the first immunization dose and used in ELISA against SmCyp (94-108) or SmCyp (107-121) ( $1\mu$ g/mL) coated plate. Specific IgG antibodies were detected by an anti-mouse IgG-HRP (1:10000) conjugate. Results represent the mean absorbance  $\pm$  SD measured at 450nm. Arrows indicate the timing of each immunization dose and challenge infection. Statistically significant differences between groups are pointed in the graphic.

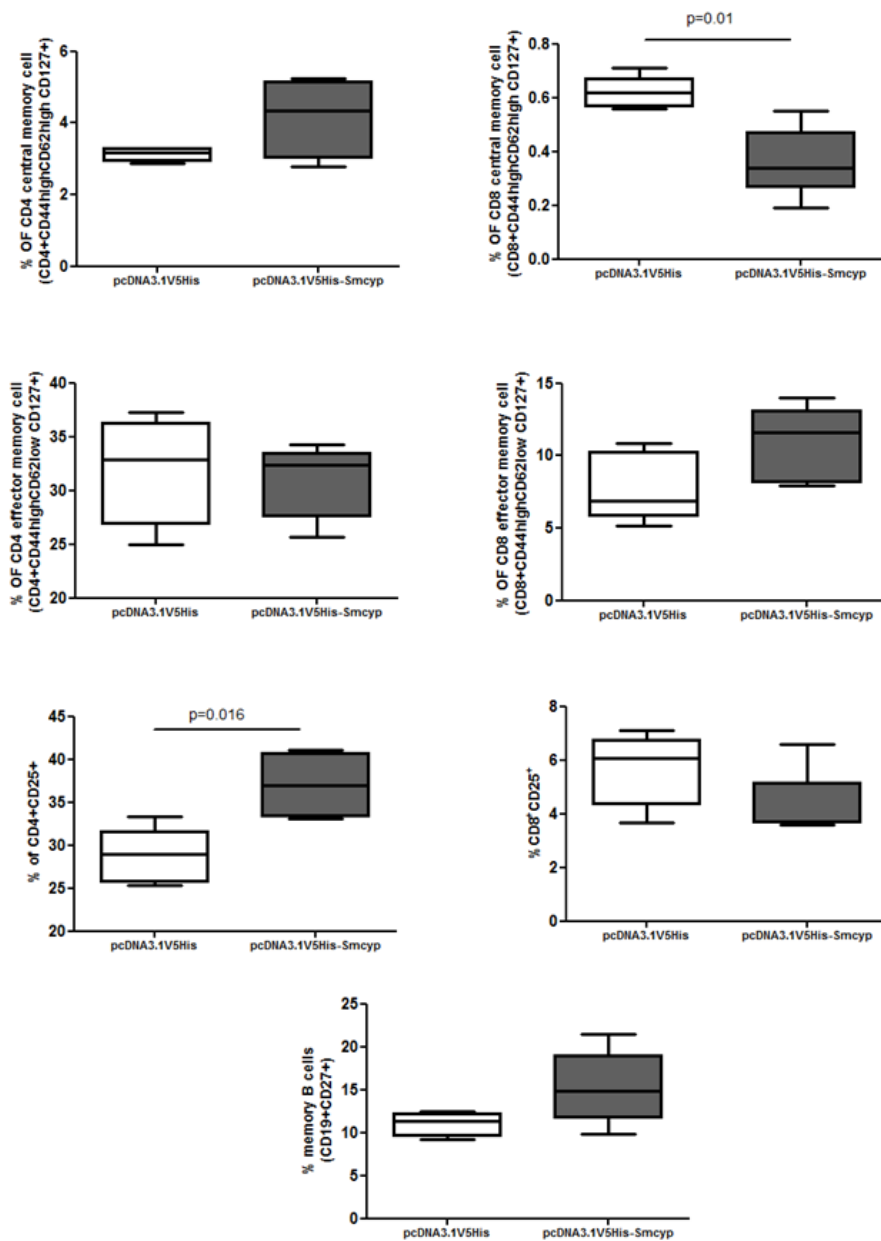


**Figure 4: Hepatic granuloma number and area in SmCyp immunized mice.** (A) Granuloma area/mm<sup>2</sup> measured on 100 granulomas from each group with a single well-defined egg, using a digital pad. (B) Number of granulomas measured on slide of liver histological sections. The total diameter of granulomas was measured, and the results were expressed as mean square micrometers ( $\mu\text{m}^2$ ). White bars represent empty pcDNA 3.1 V5/His A group and black bars represent pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* group. Statistically significant difference compared to empty pcDNA 3.1 V5/His A group is denoted in the graphic.



**Figure 5: Type of immune response elicited by pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp and empty pcDNA 3.1 V5/His immunization.** Spleen cell culture supernatants from eight individual mice per group immunized with empty pcDNA 3.1 V5/His A or pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp, one week after the last immunization was performed. IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 and IL-2 production in response to SmCyp(94-108); SmCyp (107-121) and Smtg in vitro stimulation were measured in the supernatant of splenocytes culture using mouse Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (CBA) Kit (BD Biosciences, USA). Bars represent the mean  $\pm$  SD of the difference on cytokine production in response the SmCyp(94-108); SmCyp (107-121) or Smtg stimulation and basal cytokine production observed in nonstimulated splenocytes. White bars represent empty pcDNA 3.1 V5/His A group and black bars represent pcDNA 3.1 V5/His A/SmCyp group. Statistically significant difference between group are pointed in the graphic.





**Figure 6: Immune cells profile.** Spleen cells obtained from five mice per group: immunized with empty pcDNA 3.1 V5/His A or pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp* were cultured and adjusted to  $5 \times 10^5$  cells/well, the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> activated, central and effector memory cells and memory B cells were determined. White bars represent the the cells from the group immunized with empty pcDNA 3.1 V5/His A. Black bars represent the cells from the group immunized with pcDNA 3.1 V5/His A/*SmCyp*. Statistically significant difference between groups are pointed in the graphic.

**Table 1: Predicted B and T cells epitopes in SmCyp amino acids sequence.**

B cell epitopes	Position	Score
GGDFTNGDGTGGKS	62	1
NDVPDTRNFRELC	25	0.999
SMANAGPNTNGSQF	96	0.999
T cell epitopes	Position	Score
(Iab restricted)		
MANAGPNTN	97	16077
FFITTVPCS	109	13364
ITTVPCSWL	111	10183

**Table 2: Protective immune response induced in mice with *SmCyp*.**

Groups	Worm burden recovered			Protection level	Reduction of egg of feces <sup>a</sup>	Reduction of egg in tissues <sup>b</sup>	
	Female	Male	Total			Intestine	Liver
pcDNA3.1/V5-HisA	18 ± 4	18 ± 3	36 ± 5				
pcDNA 3.1/V5-HisA/SmCyP	17 ± 5	19 ± 4	36 ± 8	0%	20%	12.7%	0%
pcDNA3.1/V5-HisA	22 ± 5	25 ± 4	47 ± 8				
pcDNA 3.1V5-HisA/SmCyP	20 ± 7	24 ± 5	44 ± 10	6.3%	0 %	23.9%	0.0%

<sup>a</sup> reduction of eggs eliminated with the feces of immunized groups compared to control groups

<sup>b</sup>reduction of eggs in tissues (intestine and liver) of immunized groups compared to control groups

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vacinas estão entre as estratégias menos dispendiosas e mais poderosas para a prevenção de doenças e óbitos decorrentes das mesmas. O desenvolvimento de vacinas contra doenças Infecciosas e parasitárias se torna particularmente importante dado que estas doenças permanecem sendo importantes causas de óbitos no mundo (WHO, 2002). As vacinas desenvolvidas e licenciadas mais bem sucedidas até hoje são as que agem contra Infecções agudas bacterianas e viróticas. Para algumas doenças Infecciosas, vacinas eficazes foram desenvolvidas de maneira empírica e com base em um conhecimento mínimo dos mecanismos imunológicos envolvidos (Elevam et al., 1998). Entretanto, no caso das doenças causadas por patógenos que exibem variação antigênica extensa ou causam Infecções crônicas e persistentes, como é o caso das doenças parasitárias, as dificuldades e fracassos sugerem que um entendimento muito claro da biologia dos organismos envolvidos e da natureza da resposta imune estimulada seja necessário antes que se consiga uma vacina protetora. O sucesso no desenvolvimento de vacinas está no conhecimento dos mecanismos efetores e protetores e no uso de antígenos e estratégias capazes de desencadear resposta protetora. No caso do *S. mansoni* a dificuldade em se desenvolver uma vacina efetiva contra este parasito esbarra na complexidade do mesmo, que apresenta diferentes estágios evolutivos e uma série de mecanismos de escape contra a imunidade do hospedeiro.

Recentemente, bastante atenção tem sido dada ao tegumento do parasito para identificação de antígenos vacinais, já que este representa a interface entre hospedeiro-parasito (Tran et al., 2006) estando envolvido com a nutrição, evasão e modulação da resposta imune, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais (Jones et al., 2004; Van Hellemond et al., 2007). Em um trabalho realizado por nosso grupo estudando a ativação de células dendríticas pelo tegumento do esquistossômulo (Smteg), foram observados um aumento na expressão de CD40 e CD86 e uma elevada produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  pelas células dendríticas estimuladas (Durães et al., 2009). A IL-12 é uma importante citocina envolvida na diferenciação da resposta adaptativa para um perfil Th1 (Abbas et al., 1996) que tem sido descrito como o perfil protetor no caso de Infecção parasitária no modelo murino (Fonseca et al., 2004). Já o TNF- $\alpha$  tem sido descrito como uma importante citocina envolvida na eliminação do parasito (Fonseca et al., 2004).

O objetivo central da tese foi avaliar o potencial protetor do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* (Smteg) sozinho ou associado a diferentes adjuvantes em um protocolo de imunização em modelo murino a fim de se identificar perfis imunológicos associados à imunidade protetora contra o parasito. Além disso, como o tegumento do parasito é composto de várias proteínas, e é dificilmente obtido em grandes quantidades, neste trabalho utilizamos técnicas de imunoproteômica utilizando anticorpos específicos para identificar as proteínas imunogênicas do tegumento. A utilização de anticorpos para seleção de candidatos vacinais em nosso estudo foi de extrema importância uma vez que demonstramos que anticorpos contra as proteínas do tegumento estão envolvidos na eliminação do parasito in vivo. Testamos ainda, por meio de imunização na forma de DNA, o potencial antigênico da *SmCyp*, uma das proteínas do Smteg reconhecida por soro de camundongos imunizados e protegidos e identificada por espectrometria de massas.

Foi observado aqui que a imunização com Smteg na falta de adjuvante não elicitou proteção, o mesmo perfil de resposta foi observado ao se imunizar camundongos adicionando alum como adjuvante. Por outro lado, a imunização de camundongos utilizando CpG-ODN como adjuvante elicitou uma proteção parcial de 43% da carga parasitária. Esses resultados corroboram com o trabalho realizado por nosso grupo no qual a utilização de Smteg mais adjuvante de Freund em protocolos vacinais foi capaz de reduzir de 43% a 48% a carga parasitária induzindo, assim, uma proteção parcial (Teixeira de Melo, 2010).

Proteínas do tegumento como as tetraspaninas e a Sm29 foram capazes de induzir proteção de 57% (TSP 2) e de 34% (TSP 1)(Tran et al.2006) e 56,7 % (Sm29)(Cardoso et al.2008). Os níveis de proteção encontrados induzidos por estas proteínas–(TSP-2 e Sm29) foram maiores do que o nível de proteção da nossa formulação, entretanto o Smteg é um composto contendo várias proteínas que podem ou não serem imunogênicas, sendo ainda capazes de modular a resposta imune interferindo na habilidade do mesmo induzir proteção como visto nos estudos de imunização com o tegumento na ausência de adjuvante (Araujo et al., 2012). Um exemplo claro da interferência de epitopos não imunogênicos foi observado por Garcia et al. (2008) no estudo que demonstrou que, quando camundongos eram imunizados com epitopos imuNODominantes da Sm14 observava-se uma redução na patologia da doença que não era observada quando utilizava-se a proteína recombinante em protocolo de imunização. Outra

explicação para o percentual menor de redução do número de vermes em nossos experimentos comparados aos estudos com a TSP e a Sm29 é a concentração do antígeno vacinal. Nós vacinamos com a mesma concentração vacinal da Sm29 purificada, ou seja, nosso antígeno tinha uma concentração de Sm29 muito menor, o que justifica também uma menor porcentagem de proteção.

A fim de ampliar nossos conhecimentos a respeito do papel individual das proteínas presentes no tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* (Smteg), nós realizamos análises proteômicas e sorológicas através do *Western-blotting* bidimensional (2D- WB) para identificação das proteínas reconhecidas por soro de camundongos previamente imunizados com Smteg. Dos 63 spots submetidos à espectrometria de massas, 42 foram identificados: 22 spots apresentaram identificação com proteínas do *S. mansoni* sendo que, 18 deles apresentaram pelo menos um peptídeo que possui score indicativo de identidade ou extensiva homologia com *Schistosoma mansoni*. Outros 20 spots não apresentaram hit de identificação com *S. mansoni*, sendo que 10 possuíam pelo menos um peptídeo que possui *score* indicativo de identidade ou extensiva homologia com outras espécies, mas que ao ser realizado BLAST com o *Schistosoma*, todos apresentaram identidade acima de 80% com este helminto. Uma possível explicação para falha na identificação das proteínas presentes em 21 spots poderia ser a ausência de ionização dos peptídeos de tais proteínas impossibilitando o reconhecimento da massa dos mesmos ou a ausência de proteínas homólogas depositadas no banco de dados analisado. Tais justificativas, entretanto, necessitam serem melhores elucidadas.

Escolhemos primeiramente trabalhar com a proteína presente no spot 29 a qual denominamos de SmCyp por ser caracterizada como uma ciclofilina de *S. mansoni*. Já foi demonstrado em um experimento de imunização com camundongos no qual utilizou-se como antígeno vacinal a ciclofilina recombinante de *Schistosoma japonico* (rSJCyPA) uma diminuição estatisticamente significativa da carga parasitária (17,2%) e no número de ovos presos no fígado (52,7%) (Hongxiao et al., 2012). Uma vez que ainda não há nenhum trabalho de imunização com a ciclofilina do *S. mansoni* resolvemos testá-la sob a forma de vacina de DNA. Em relação à carga parasitária não houve redução estatisticamente significativa do número de vermes presentes nos camundongos imunizados com pcDNA3.1V5/His.A/SmCyp quando comparado ao grupo controle.

Dentre as formulações vacinais, apenas os camundongos imunizados com o Smtteg associado ao adjuvante CpG-ODN apresentaram redução significativa no número de ovos eliminados nas fezes. Esse resultado demonstra a importância da escolha de um bom adjuvante em uma formulação vacinal.

Estudos indicam que o CpG-ODN é capaz de aumentar a apresentação do antígeno pelas Após, induzindo uma resposta IFNamatória do tipo Th1 com alta produção de anticorpos (Klinman et al., 2004; Chu et al., 1997; Carson & Raz, 1997). Ao analisarmos o perfil de imunoglobulinas presentes nos soros de camundongos imunizados com Smtteg, Smtteg + alum, Smtteg + alum +CpG-ODN e pcDNA3.1V5/His.A/SmCyp, observamos um aumento estatisticamente significativo dos níveis de: IgG (45, 60 e 75 dias após a primeira dose de imunização) IgG2c (75 dias após a primeira dose de imunização) no grupo imunizado com Smtteg sem adição de adjuvante; IgG (em todos os dias de coleta) e IgG 1 (em todos os dias de coleta) no grupo imunizado com Smtteg/alum; IgG (em todos os dias de coleta) e IgG 1 (em todos os dias de coleta) e IgG 2c (em todos os dias de coleta) no grupo imunizado com Smtteg/alum/CpG. Percebe-se que somente o grupo que recebeu como adjuvante o CpG-ODN apresentou durante todo o curso do experimento níveis significativos de IgG2c. O mesmo perfil foi apresentado pelo estudo de Teixeira de Melo et al. (2010) o qual utilizou Smtteg mais adjuvante de Freund em protocolo de imunização e que também verificou o aumento no nível de IgG2c correlacionando esta imunoglobulina a um perfil protetor. Além disso, outros trabalhos que observaram níveis de proteção significativos diante de diferentes formulações vacinais contendo antígenos do *S. mansoni* apresentaram o mesmo perfil de imunoglobulinas aqui demonstrado (Fonseca et al., 2004; Garcia et al., 2008; Wynn & Cheever, 1995). Não houve aumento estatisticamente significativo de nenhuma das imunoglobulinas avaliadas no soro de camundongos imunizados com pcDNA3.1V5His.A/SmCyp. *S. mansoni*.

Uma resposta imune protetora contra a esquistossomose envolve ambas as respostas celular e humoral (Jankovic et al., 1999). Como observamos anteriormente, as formulações vacinais que foram capazes de induzir níveis significativos de IgG2c específicos ao Smtteg durante todo protocolo experimental apresentaram diminuição estatisticamente significativa na carga parasitária presente nos camundongos imunizados. Diante disso, nós resolvemos investigar qual seria a função dos anticorpos na eliminação do parasito.

O papel dos anticorpos na resposta imune contra o *S. mansoni* pode ser regulatório ou efetor dependendo do isotipo de anticorpo produzido. Tem sido sugerido que os mecanismos efetores de eliminação do parasito em uma Infecção pelo *S. mansoni* ou no caso da imunidade protetora induzida por vacinação tem como principal alvo os esquistossômulos. Em humanos, IgG1, IgG3 e IgE são anticorpos capazes de mediar a destruição de esquistossômulos *in vitro* na presença de eosinófilos, macrófagos e plaquetas por um mecanismo de citotoxicidade mediada por anticorpo – ADCC e fixação de complemento (Capron & Capron, 1994; Khalife et al., 1986; Joseph et al., 1983). Assim, em camundongos, após a realização do ensaio de citotoxicidade em experimento *in vitro* utilizando esquistossômulos recém-transformados, observamos que os anticorpos foram capazes de se ligar à superfície do parasito sendo capazes de reconhecer e se ligar às proteínas de superfície. Além disso, observamos o importante papel do complemento na eliminação do parasito por via clássica e que a presença de anticorpos específicos aumentou a capacidade do complemento em matar o esquistossômulo. Estudos demonstram que a ativação do complemento tem papel fundamental na eliminação do parasito principalmente no começo da Infecção (Corre-Oliveira et al., 1982). Muitas células tais como eosinófilos e macrófagos promovem a morte do parasito através do mecanismo de citotoxicidade celular depende de anticorpos (ADCC) (David et al., 1980; James et al., 1981). Além disso, em experimento *in vivo* por meio da transferência passiva de soros de camundongos imunizados com Smteg + CFA/IFA nós verificamos uma redução significativa de 27% da carga parasitária de camundongos que receberam soro contendo anticorpos anti-Smteg além de uma redução significativa de 37% e 47% no número de ovos presos no intestino e fígado destes animais, respectivamente (Melo TT, 2014). Este trabalho corrobora com o estudo de Torben et al. (2011), o qual também observou significativa diminuição da carga parasitária de 31-45% de camundongos receberam soro anti-Sm-p80.

Tem-se descrito na literatura alguns tipos de linfócitos com perfis de respostas distintos. Entre eles, há aqueles que possuem um perfil Th1, produtores de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ . Há o tipo Th2 que são produtores das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Hilleman et al., 1998). Um modelo de resistência bastante estudado na esquistossomose é o que utiliza cercária irradiada em imunizações. Uma única exposição à cercária atenuada é



capaz de induzir altos níveis de proteção em camundongos desafiados com a cercária não atenuada, e essa imunoproteção está relacionada à produção de IFN- $\gamma$  e à imunidade mediada por células (Vignali et al., 1989; Wilson et al., 1996). Esses autores sugerem que a proteção nesse modelo está relacionada a um perfil de resposta imune do tipo Th1. Em humanos, a resposta do tipo Th1 também tem sido associada à resistência contra Infecção pelo *S. mansoni*, já que PBMC de indivíduos naturalmente resistentes à Infecção por este parasito produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  in vitro quando estimulados com antígenos das diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni* (Viana et al., 1995). Para ativar esses mecanismos efetores é importante a ativação de células CD4<sup>+</sup> secretando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  além de induzir a produção de anticorpos capazes de ativar o complemento e de promover a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Dessa forma, a imunidade protetora contra a Infecção pelo *S. mansoni* em camundongos está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta celular e humoral, sendo a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  importantes para a eliminação do parasito (Wilson et al., 1996; Jankovic et al., 1999).

Em relação às respostas celulares observadas nos trabalhos aqui apresentados, na imunização de camundongos com Smtg na ausência de adjuvante, observamos um aumento da porcentagem de células esplênicas CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> com aumento estatisticamente significativo na produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10. Além disso, observou-se ainda que o Smtg foi capaz de induzir células dendríticas derivadas da medula óssea a produzir níveis estatisticamente significativos de IL-10. Estes resultados sugerem que a IL-10 produzida em resposta a imunização estaria envolvida na modulação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, na perda da proteção. Na imunização utilizando como adjuvantes alum e alum+ CpG-ODN, o perfil de citocinas foi diferente entre as formulações, enquanto a imunização com Smtg/alum levou a um predomínio da resposta imune do tipo Th2 com alta produção de IL-4, a imunização com Smtg/alum/CpG-ODN induziu um perfil misto de resposta com significativa produção de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Em ambas as formulações observou-se aumento significativo na produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de esplenócitos. A imunização com adjuvante CpG-ODN também levou a ativação de células CD4<sup>+</sup>, macrófagos e aumento no percentual de células B.

A imunização na forma de DNA com o plasmídeo pcDNA3.1V5His.A contendo o gene *SmCyp* induziu um aumento significativo na produção de IFN-  $\gamma$  por esplenócitos e diminuição significativa na produção de IL-10.

Em camundongos imunizados com o gene *SmCyp* foi observada uma modulação do granuloma, medida pela redução da área dos mesmos. Vale ressaltar que, analisamos especificamente um estágio do granuloma: exsudativo-produtivo. Segundo Lenzi et al. (1998) é de fundamental importância em estudos histopatológicos utilizar granulomas centrados por ovos viáveis e de mesma fase evolutiva, para tal sugere-se que sejam analisados granulomas exsudativo-produtivo. Infelizmente, a maioria dos trabalhos sobre modulação dos granulomas não discrimina esses aspectos topográficos e os dados são heterogêneos, variáveis e até contraditórios de modelo para modelo que dificultam uma análise integral (Lenzi et al. (1998). A regulação do granuloma parece seguir mecanismos diferentes conforme a fase de Infecção. Além disso, a regulação negativa do tamanho dos granulomas em Infecções agudas (oito semanas) difere da regulação da fase crônica (Flores-Villanueva et al., 1996). Assim, para uma melhor compreensão da patogênese da doença é importante sempre levar em consideração os mecanismos imunes envolvidos.

Além do equilíbrio Th1/Th2 na modulação de granuloma, outros mecanismos imunológicos poderiam ser citados como alternativa, por exemplo, a ativação de macrófagos (aaM $\Phi$ ) (Herbert et al., 2004), ativação de células T reguladoras (Singh et al., 2005) ou o aumento da produção de IL-10 (Wynn et al., 1998), também foram descritos na modulação granuloma. Em nosso, estudo a IL-10 parece não estar envolvida nesta regulação uma vez que os níveis desta citocina estão diminuídos nos camundongos imunizados. No entanto, os mecanismos imunológicos envolvidos nesta regulação precisam ser melhor investigados.

A imunização de camundongos com *SmCyp* na forma de DNA, como demonstrado anteriormente, não elicitou proteção nos camundongos, mas ativou células do sistema imune induzindo modulação do granuloma. Sendo assim, a *SmCyp* é um bom candidato vacinal. Entretanto, a escolha da estratégia vacinal não favoreceu a indução de resposta protetora. Novas formulações terão que ser avaliadas para investigar, de forma mais consistente, a habilidade da proteína *SmCyp* induzir proteção.

As análises proteômicas foram extremamente importantes para a identificação das proteínas do tegumento do esquistossômulo do *S. mansoni* (Smteg) responsáveis pela ativação do sistema imune, o que torna possível a identificação de futuros candidatos vacinais. A constante atualização das ferramentas utilizadas na proteômica juntamente com a genômica e análise de bioinformática, têm ajudado no aprimoramento do conhecimento da biologia do parasito e na busca de novos alvos vacinais, terapêuticos e de diagnósticos (Fonseca et al., 2012).

## 6 ANEXOS

### 6.1 Aceite CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

### LICENÇA

LW-26/12

Certificamos que o protocolo (P-26/11-3), intitulado "Identificação de proteínas imunogênicas presentes no tegumento de esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* e avaliação da imunoproteção desses antígenos através de um protocolo de imunização em modelo murino.", sob a responsabilidade de CRISTINA TOSCANO FONSECA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 12/04/2016 e inclui o uso total de :

***Mus musculus***

- 1800 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s).

Rio de Janeiro, 12 de abril de 2012

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Mangulhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

## 6.2 Artigo Revisão “*Schistosoma* tegument protein in vaccine and Diagnosis development: an Update”

### Review Article

## Schistosoma Tegument Proteins in Vaccine and Diagnosis Development: An Update

Cristina Toscano Fonseca,<sup>1,2</sup> Gardênia Braz Figueiredo Carvalho,<sup>1</sup>  
Clarice Carvalho Alves,<sup>1</sup> and Tatiane Teixeira de Melo<sup>1</sup>

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

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

Correspondence should be addressed to Cristina Toscano Fonseca, [ctoscano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:ctoscano@cpqrr.fiocruz.br)

Received 27 July 2012; Accepted 24 September 2012

Academic Editor: Andrea Teixeira-Carvalho

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

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

### 1. Introduction

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

In this context, the recent availability of schistosome genomes information represents an important toll to be used in the discovery of new targets for vaccine and diagnosis. *Schistosoma mansoni* genome, published in 2009 [3] described 11.809 genes while *Schistosoma japonicum* genome [4] has been described to be composed of 13.469 genes. Their assemblies were generated by conventional capillary sequencing resulting in 19.022 sca? olds (*S. mansoni*) and 25.048 sca? olds (*S. japonicum*). More recently an improved version of the *S. mansoni* genome was published [5], utilizing

a combination of traditional Sanger capillary sequencing and deep-coverage Illumina sequencing that refined gene prediction resulting in a reduction in the number of predicted genes from 11.809 to 10.852. Illumina-based technology was also used in *Schistosoma haematobium* genome sequencing, which described 13.073 genes [6].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 3. The Tegument as Antigen Source for Vaccine Development

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

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

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

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

ND: not determined.

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

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

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

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

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

#### 4. Antigens to Be Used in Schistosomiasis Diagnostic Test

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

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



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

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

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

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

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

Proteomics analysis has also been used in the identification of candidates to the immunodiagnosis of schistosomiasis. Western Blot with sera from *S. japonicum* infected rabbit in a two-dimensional gel loaded with adult worm preparation identified 10 spots that were demonstrated by LC/MS-MS to correspond to four different proteins: SjLAP (Leucine aminopeptidases), SjFBPA (fructose-1,6-bisphosphate aldolase), SjGST (Glutathione-S-transferase) and SJ22.6 [75]. Recombinant SjLAP and SjFBPA were tested in ELISA assay and presented high efficiency for the diagnosis of *S. japonicum* infection, with 96.7% specificity for both proteins and 98.1% or 87.8% sensitivity to detect acute and chronically infected individuals, respectively, when SjLAP was used as antigen or a sensitivity of 100% (acute) and 84.7% (chronic infection) when SjFBPA was used as antigen [75].

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

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

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

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

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

## 6. Conclusion

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



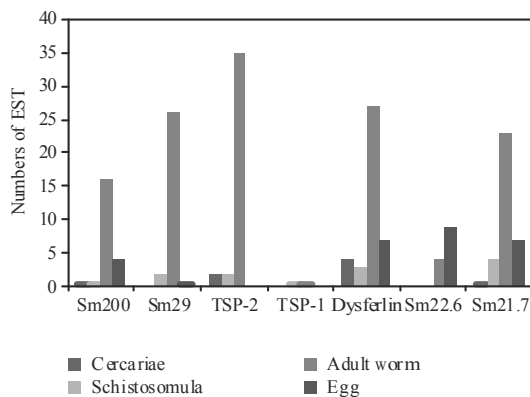


Figure 1: Predicted expression of schistosome tegument proteins in the different parasite life stages in the definitive host. Schistosome tegument protein identified by proteomics analysis of the adult worm tegument was analyzed in SchistoDB database (<http://www.schistodb.net/>). Bars represent the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

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

## Acknowledgments

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

## References

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

- [8] A. R. C. Harris, R. J. Russell, and A. D. Charters, "A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 78, no. 3, pp. 385–388, 1984.
- [9] S. J. Davies, J. L. Grogan, R. B. Blank, K. C. Lim, R. M. Locksley, and J. H. McKerrow, "Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4<sup>+</sup> lymphocytes," *Science*, vol. 294, no. 5545, pp. 1358–1361, 2001.
- [10] R. L. De Mendonça, H. Escrivá, D. Bouton, V. Laudet, and R. J. Pierce, "Hormones and nuclear receptors in schistosome development," *Parasitology Today*, vol. 16, no. 6, pp. 233–240, 2000.
- [11] P. Saule, E. Adriaenssens, M. Delacre et al., "Early variations of host thyroxine and interleukin-7 favor *Schistosoma mansoni* development," *Journal of Parasitology*, vol. 88, no. 5, pp. 849–855, 2002.
- [12] P. Amiri, R. M. Locksley, T. G. Parslow et al., "Tumour necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice," *Nature*, vol. 356, no. 6370, pp. 604–607, 1992.
- [13] P. T. LoVerde, A. Osman, and A. Hinck, "*Schistosoma mansoni*: TGF- $\beta$  signaling pathways," *Experimental Parasitology*, vol. 117, no. 3, pp. 304–317, 2007.
- [14] I. Wolowczuk, S. Nutten, O. Roye et al., "Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*," *Infection and Immunity*, vol. 67, no. 8, pp. 4183–4190, 1999.
- [15] R. B. Blank, E. W. Lamb, A. S. Tocheva et al., "The common  $\gamma$  chain cytokines interleukin (IL)-2 and IL-7 indirectly modulate blood fluke development via effects on CD4<sup>+</sup> T cells," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 11, pp. 1609–1616, 2006.
- [16] D. A. A. Vignali, P. Crocker, Q. D. Bickle, S. Cobbold, H. Waldmann, and M. G. Taylor, "A role for CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections," *Immunology*, vol. 67, no. 4, pp. 466–472, 1989.
- [17] D. Jankovic, T. A. Wynn, M. C. Kullberg et al., "Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN- $\gamma$ -dependent effector mechanisms," *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 1, pp. 345–351, 1999.
- [18] M. Street, P. S. Coulson, C. Sadler et al., "TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine," *Journal of Immunology*, vol. 163, no. 8, pp. 4489–4494, 1999.
- [19] F. G. C. Abath and R. C. Werkhauser, "The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features," *Parasite Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 15–20, 1996.
- [20] Z. G. Han, P. J. Brindley, S. Y. Wang, and C. Zhu, "Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction," *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol. 10, pp. 211–240, 2009.
- [21] M. K. Jones, G. N. Gobert, L. Zhang, P. Sunderland, and D. P. McManus, "The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions," *BioEssays*, vol. 26, no. 7, pp. 752–765, 2004.
- [22] D. J. Hockley and D. J. McLaren, "*Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm," *International Journal for Parasitology*, vol. 3, no. 1, pp. 13–20, 1973.
- [23] M. Salzet, A. Capron, and G. B. Stefano, "Molecular crosstalk in host-parasite relationships: Schistosome- and leech-host

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

- [54] L. G. G. Pacifico, C. T. Fonseca, M. M. Barsante, L. S. Cardoso, M. I. Araújo, and S. C. Oliveira, "Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter interleukin-10 production," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, supplement 1, pp. 365–368, 2006.
- [55] L. S. Cardoso, S. C. Oliveira, A. M. Gôes et al., "Schistosoma mansoni antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 160, no. 2, pp. 266–274, 2010.
- [56] D. Smyth, D. P. McManus, M. J. Smout, T. Laha, W. Zhang, and A. Loukas, "Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 5, pp. 2548–2554, 2003.
- [57] M. H. Tran, M. S. Pearson, J. M. Bethony et al., "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 7, pp. 835–840, 2006.
- [58] W. Zhang, J. Li, M. Duke et al., "Inconsistent protective efficacy and marked polymorphism limits the value of *Schistosoma japonicum* tetraspanin-2 as a vaccine target," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 5, Article ID e1166, 2011.
- [59] S. Y. Sauma and M. Strand, "Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 38, no. 2, pp. 199–210, 1990.
- [60] P. J. Brindley, M. Strand, A. P. Norden, and A. Sher, "Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 34, no. 2, pp. 99–108, 1989.
- [61] E. J. M. Nascimento, R. V. Amorim, A. Cavalcanti et al., "Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, no. 1, pp. 21–27, 2007.
- [62] V. P. Martins, C. S. Pinheiro, B. C. P. Figueiredo et al., "Vaccination with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from schistosoma mansoni induces protection against challenge infection," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 962538, 11 pages, 2012.
- [63] H. M. Ahmed and M. H. Romeih, "Protection against *Schistosoma mansoni* infection with recombinant schistosomula 21.7 kDa protein," *Arab Journal of Biotechnology*, vol. 24, pp. 229–249, 2001.
- [64] H. M. Ahmed, M. H. Romeih, and T. S. Abou-Shousha, "DNA immunization with the gene encoding Sm21.7 protects mice against *S. mansoni* infections," *American Journal of Science*, vol. 2, pp. 59–69, 2006.
- [65] K. A. Shalaby, L. Yin, A. Thakur, L. Christen, E. G. Niles, and P. T. LoVerde, "Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes," *Vaccine*, vol. 22, no. 1, pp. 130–136, 2003.
- [66] Z. Hong, D. J. Kosman, A. Thakur, D. Rekosh, and P. T. LoVerde, "Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*," *Infection and Immunity*, vol. 60, no. 9, pp. 3641–3651, 1992.
- [67] H. Mei and P. T. LoVerde, "Schistosoma mansoni: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes," *Experimental Parasitology*, vol. 86, no. 1, pp. 69–78, 1997.
- [68] H. Mei, A. Thakur, J. Schwartz, and P. T. Lo Verde, "Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 10, pp. 4299–4306, 1996.
- [69] M. D. M. Mourão, N. Dinguirard, G. R. Franco, and T. P. Yoshino, "Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 11, article e550, 2009.
- [70] J. V. Hamilton, M. Klinkert, and M. J. Doenho?, "Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods," *Parasitology*, vol. 117, pp. S41–S57, 1998.
- [71] M. J. Doenho?, P. L. Chiodini, and J. V. Hamilton, "Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?" *Trends in Parasitology*, vol. 20, no. 1, pp. 35–39, 2004.
- [72] G. B. F. Carvalho, R. A. da Silva-Pereira, L. G. G. Pacifico, and C. T. Fonseca, "Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 7, pp. 837–843, 2011.
- [73] C. M. Xia, R. Rong, Z. X. Lu et al., "Schistosoma japonicum: a PCR assay for the early detection and evaluation of treatment in a rabbit model," *Experimental Parasitology*, vol. 121, no. 2, pp. 175–179, 2009.
- [74] J.-J. Guo, H.-J. Zheng, J. Xu, X.-Q. Zhu, S.-Y. Wang, and C.-M. Xia, "Sensitive and specific target sequences selected from retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the diagnosis of schistosomiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 3, Article ID e1579, 2012.
- [75] Z. R. Zhong, H. B. Zhou, X. Y. Li et al., "Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of *Schistosomiasis japonica*," *Acta Tropica*, vol. 116, no. 1, pp. 1–8, 2010.
- [76] A. S. Verkman, "Physiological importance of aquaporin water channels," *Annals of Medicine*, vol. 34, no. 3, pp. 192–200, 2002.
- [77] J. Song and Q.-F. He, "Bioinformatics analysis of the structure and linear B-cell epitopes of aquaporin-3 from *Schistosoma japonicum*," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 107–109, 2012.
- [78] E. G. Vasconcelos, P. S. Nascimento, M. N. L. Meirelles, S. Verjovski-Almeida, and S. T. Ferreira, "Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 58, no. 2, pp. 205–214, 1993.
- [79] R. Bhardwaj and P. J. Skelly, "Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?" *Trends in Parasitology*, vol. 25, no. 6, pp. 256–260, 2009.
- [80] R. DeMarco, A. T. Kowaltowski, R. A. Mortara, and S. Verjovski-Almeida, "Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 307, no. 4, pp. 831–838, 2003.
- [81] J. Levano-Garcia, R. A. Mortara, S. Verjovski-Almeida, and R. DeMarco, "Characterization of *Schistosoma mansoni* ATP-Dase2 gene, a novel apyrase family member," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 352, no. 2, pp. 384–389, 2007.
- [82] R. G. P. R. Mendes, M. A. N. Gusmão, A. C. R. G. Maia et al., "Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform

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

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

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abath FGC, Werkhauser RC. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunology*, 1996; 18: 15-20.

Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207.

Ahmad G, Torbem W, Zhang W, Wyatt M, Siddiqui AA. Sm-p80-based DNA vaccine formulation induces potent protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, 2009; 31 (3): 156-61.

Ahmad G, Zhang W, Torben W, Damian RT, Wolf RF, White GL, Chavez-Suarez M, Kennedy RC, Siddiqui AA. Protective and antifecundity effects of Sm-p80-based DNA vaccine formulation against *Schistosoma mansoni* in a nonhuman primate model. *Vaccine*. 2009; 27(21):2830-7

Ahmed HM, Romeiih MH. Protection against *Schistosoma mansoni* IFNecton with recombinant schistosomula 21.7 kDa protein. *Arab Journal of biotechnology*, 2001; 24: 229-49.

Ahmed HM, Romeiih MH, Abou Shousha TS et al.. DNA immunization with encoding Sm21.7 protects mice against *S. mansoni* IFNectons. *American Journal of Science*, 2006; 2: 59-69.

Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, Sadick M, Rector E, Ritter D, McKerrow JH. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome IFNected SCID mice. *Nature*, 1992; 356:604-7.

Andre FE. *Schistosomal* and liver hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004; 99: 51-57.

Araújo NP, Souza SP, Passos LKJ, Simpson AJG, Dias Neto E, Pereira TR, Cerutti JRC, Alencar FEC, Dietze R, Katz N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. Rev Soc Bras Med Trop, 1996; 29: 467 – 76.

Araujo JM, Melo TT, Sena IC, Alves CC, Araujo N, Durães FV, Oliveira SC, Fonseca CT. *Schistosoma mansoni* tegument (Smteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells failed to protect mice against challenge infection. Acta Tropica, 2012; 124: 140-46.

Atanasiu P, Orth G; Dragonas P. Delayed specific antitumoral resistance in the hamster immunized shortly after birth with the polyoma virus. C R Hebd Seances Acad Sci, 1962; 254:2250-2.

Azevedo V, Oliveira S.C. Vacinas de DNA in Borém, Almeida e Santos: Biotecnologia de A a Z. 2003. Universidade Federal de Viçosa, MG.

Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligonucleotides and bacterial DNA. J Immunol, 1996; 157 (5): 1840-45.

Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, Capron M, Grzych JM, Pierce RJ, *et al.*. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. Nature, 1987; 326(6109):149-53.

Barrie JA, Grant AR, McManus DP. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. Trends in Parasitol, 2012; 28: 572-79.

Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally occurring Cd4+Foxp3+regulatory T cells are an essential, Il-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. J Immunol, 2006; 176: 5374-87.

Becker PD; Noerder M; Guzmán CA. Genetic Immunization: Bacteria as DNA vaccine delivery vehicle. Capítulo 6 (71-97), 1998; In Sleator, R. e Hill, C. Patho-biotechnology: Biotechnology intelligence unit. Landes Bioscience, 216 p.

- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 2005; 6(4):353-60.
- Berriman M, Hass BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 2009; 460: 352-8.
- Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's Adjuvant in experimental models of autoimmune disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 2001; 70: 846-860.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 1986; 321: 209-13.
- Bloch EH. In vivo microscopy of schistosomiasis, II-migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver and intestine. *Am J Trop Med Hyg*, 1980; 29:62-70.
- Bloom BR. New approaches to vaccine development. *Reviews of Infectious Disease*, 1989; 11: 460-66.
- Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbes Rev*, 1989; 2:250-69.
- Boulanger D, Reid GD, Sturrock RF, Wolowczuk I, Balloul JM, Grezel D, et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, 1991; 13(5):473-90.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72:248-254.
- Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol cell Proteomics*, 2006; 5: 347-56.
- Braschi S, Borges WC, Wilson RA. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; 101 (Suppl 1): 205-12.

Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*, 2006b; 6: (1471-82).

Brindley PJ, Strand M, Norden AP, Sher A. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Molecular and biochemical Parasitology*, 1989; 34: 99-108.

Brito CF, Oliveira SC, Street M, Riengrojpitak S, Wilson RA, Simpson A J, *et al.* Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. *Braz J Med Biol Rev*, 2002; 35 (3): 377-81.

Broderson, JR. Uma análise retrospectiva das lesões associadas com o uso de Adjuvante de Freund. *Laboratório. Anim. Sci*, 1989; 39:400-405.

Brophy PM, Barrett J. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology*, 1990;100 (2):345-9.

Bueding E, Hawkins J, Cha YN. Anti*Schistosomal* effect of cycloporine A. *Agents Actions*, 1981; 4: 380-383

Cantú MD, Carrilho E, Wulff NA, Palma MS. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim. Nova*, 2008; 31: 669-75.

Capron, A. Immunity to Schistosomiasis: progress toward vaccine. *Science*, 1987; 238: 1065-1072.

Capron M, Capron A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science*. 1994; 264 (5167): 1876-7.

Capron A, Riveau G, Capron M, Trottein F. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends Parasitol*, 2005; 21(3):143-9.



Cardoso FC, Pacifico RN, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol*, 2006<sup>a</sup>; 144: 382-391.

Cardoso FC, Oliveira SC. Caracterização molecular e imunológica da proteína da membrana Sm29 do *Schistosoma mansoni*. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Número de chamada: T2764 577.1 C268c; 2006b.

Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, Melo AL, *et al.* *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *Plos Negl Trop dis*, 2008; 2(10): e308.

Carson DA, Raz E. Oligonucleotide adjuvants for T helper 1 (Th1)-specific vaccination. *J Exp Med*, 1997; 186 (10): 1621-2.

Carvalho AT, Martins Filho AO, Oliveira RC. A resposta imune na forma crônica da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, (editores). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Fiocruz 2008. p. 670-716.

Chace JH, Hooker NA, Middlestein KL, Krieg AM, Cowdery JS. Bacterial DNA-induced NK cell IFN- $\gamma$  production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997; 84 (2):185-93.

Cheever AW. Pipe-stem fibrosis of the liver. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1972; 66(6): 947-8.

Cheever AW, Macedonia JG, Mosimann JE, Cheever EA. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair worms. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 50:281-295.

Cheever AW, Hoffman KF, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis in mice and men. *Immunol Today*, 2001; 465-6.

Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, Gu ZQ, Jin YM, Yuan CX, Zhou YC, Cai YM. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics*, 2005; 5: 511-21.

Chitsulo L, Engels D, Monstrea A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta trop*, 2000; 77: 41-51.

Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J exp Med*, 1997; 186: 1623-31.

Clarck TG, Cassidy-Hanley D. Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. *Dev Biol (Basel)*, 2005;121:153-63.

Clerinx J, Van Gompel A. Schistosomiasis in travelers and migrants. *Travel Med Infect Dis*, 2011; 9: 6-24.

Coles GC, Bruce JL, Kinoti GK, Mutahi WT, Dias EP, Katz N. Drug resistance in schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1986; 80:347-351.

Colley DG, Savage AM, Lewis FA. Host response induced and elicited by cercariae, schistosomula, and cercarial antigenic preparations. *Am J Trop Med Hyg*, 1977; 26(6): 88-95.

Comunicação/Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?IFNoid=1492&sid=32>. Acesso em 20/12/2013.

Correa- Oliveira R, Mota-Sanos TA, Gazzineli G. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo killing of antibody-coated schistosomula. *Am J Trop Med Hyg*, 1982; 31:991-998.

Correa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcão PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM *et al.*. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31(1):171-7.

Correentei, JM, Brindley, PJ, Pearce, EJ. Long- term supression of cathepsin B levels by RNA interference retards *Schistosoma* growth. Mol. Biochem. Parasitol, 2005; 143: 209-215.

Coura JR, Coura LC, Kalache A, et al. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. Rev Soc Bras Med Trop 1970;6:387-96.

Cox GJ, Zamb TJ, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1; immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 1993; **67**: 5664–7.

Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, et al. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17 producing CD4T cells during mycobacterial IFNectin. *J Immunol*, 2006; 177: 1416-20.

Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA, Wilson RA. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. Mol Biochem Parasitol, 2004; 138: 57-66.

Curwen RS, Ashton PD, Sundaralingam S, Wilson RA. Identification of a novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. Mol Cell Proteomics, 2006; 5: 835-44.

Cutts L, Wilson RA. Elimination of a primary schistosome IFNectin from rats coincides with elevated IgE titres and mast cell degranulation. *Parasite Immunol* 1997; 19: 91-102.

Da’Dara AA, Skelly PJ, Walker CM, Harn DA. A DNA prime/ protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* IFNectin. *Parasite Immunol*, 2003; 25 (8-9): 429-37.

Damonneville M, Wietzerbin J, Pancre V, Joseph M, Delanoye A, Capron A, et al.. Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J Immunol*, 1988; 140(11): 3962-5.

David JR, Butterworth AE, Vadas MA. Mechanism of the interaction mediating killing of *Schistosoma mansoni* by human eosinophils. *Am J Trop Med Hyg*; 1980;29: 842-848.

Davies SJ, Shoemaker CB, Pearce EJ. A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J Biol Chem*, 1998; 273:11234-40.

Davies SJ, Grogan JL, Blank RB, Lim KC, Locksley RM, McKerrow JH. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Science*, 2001; 294:1358-61.

Davis AH. Schistosomiasis. In: Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. *Epidemiology and Community Control of disease in Warm Climate countries*. Churchill Livingstone, London; 1985. p. 389-412.

Den JMM, Bevan MJ. Antigen presentation to CD8<sup>+</sup>T cells: cross-priming in infectious diseases. *Current Opinion in Immunol*, 2001; 13(4): 47-441.

Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATA SUS). [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1551](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551), acesso em 2013).

Domingo EO, Warren KS. Pathology and pathophysiology of the small intestine in murine schistosomiasis mansoni, including a review of the literature. *Gastroenterology*, 1969; 56(2): 231-40.

Dorsey CH. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercária. *Micron*, 2002; 33:279323.

Dunne DW, Richardson BA, Jones FM, et al.. The use of mouse/human chimaeric antibodies to investigate the roles of different antibody isotypes, including IgA2, in the killing of *Schistosoma mansoni* by eosinophils. *Parasite Immunol*, 1993; 15 (3):181-5.

Durães FV, Carvalho NB, Melo TT, Oliveira SC, Fonseca CT. IL-12 and TNF- $\alpha$  production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent. *Immunol Lett*, 2009; 31: 432-439.

El Ridi R, Tallima H. *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as a vaccine candidates against schistosomiasis. *Vaccine*, 2009; 27: 666-73.

Falcão PL, Malaquias LCC, Martins-Filho OA, Silveira AMS, Passos M, Prata A, *et al.*. Human schistosomiasis mansoni:IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol*, 1998; 20:447-454.

Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 1989; 337: 476-78.

Flores-Villanueva P. O. *et al.* Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment dowregulate egg antigen-especific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *The Journal of immunology* 1996; 156:3315-3320.

Fonseca CT, Brito CF, Alves JB., Oliveira SC. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  dependent pathway. *Vaccine*, 2004; 22:503-510.

Fonseca CT, Carvalho FGB, Alves CC, Melo TT. *Schistosoma* tegument proteins n vaccine and diagnosis development: an update. *J Parasitol Res*, 2012:541268. doi: 10.1155/2012/541268. Epub 2012 Oct 18.

Galat A. Peptidylproline cis-trans isomerases: immunophilins. *Eu J Biochem*, 1993; 216: 689-707.

Garcia TC, Fonseca CT, Pacífico LG, Durães FV, Marinho FA, Penido ML, *et al.* Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* IFN $\alpha$  infection in mice. *Acta Trop* 2008; 106 (3): 162-67.

Gazzinelli G, Montesano MA, Correa-Oliveira R, Lima MS, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1987; 4:95-100.

- Gordon RM, Griffiths RB. Observations of means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological exchanges in the newly penetrate larvae. *Ann Trop Med Parasitol*, 1951; 45: 4577-85.
- Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1988; 9: 531-46.
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*, 2009; 30 (suppl 1): 122-32.
- Goto N; Kato H; Maeyama J, YOSHIHARA S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*, 1993; 11:914-8.
- Grant EP, Rock KL. MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *Journal of Immunol*, 1992; 148 (1): 13-18.
- Gryssels B, Mbaye A, de Vlas SJ, et al..Are poor response to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health*, 2001; 6: 864-73.
- Gryssels B, Polman K, Clerinx J, et al..Human schistosomiasis. *Lancet*, 2006; 368: 1106-18.
- Gryssels B, 2012. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin N Am*, 2012; 383-97.
- Gurunathan, S.; Wu, C.Y.; Freidag, B.L.; Seder, R.A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol*, 2000a. 12(4):442-7.
- Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, 1991; 349: 243-5.
- Hagan P. Reinfection and immunity in human schistosomiasis. *Parasitol Today*, 1992; 8: 12-6.

Halper MD, Kurlander RJ, Pisetsky DS. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol*, 1996; 167: 72-78.

Han ZG, Brindley PJ, Wang SY, Zhu C. *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual Review of Genomic and Human Genetics*, 2009; 10: 211-240.

Handschumacher RF, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic protein for cyclosporine A. *Science*, 1984; 266: 544-547

Hilleman M. R. Six decades of vaccine development- a personal history. *Nature Medicine* 1998; 4:507-514

Hockley DJ. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Adv Parasitol*, 1973; 11: 233-305.

Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*, 2000;164 (12): 6406-16.

Hogg KG, Kumkate S, Anderson S, Mountford AP. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11+ and F4/80 cells is a major feature of the innate response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *IFNect Immun*. 2003 a; 71 (6): 3563-71.

Hongxiao H, Peng J, Hong Y, Fu Z, Xu J, Lin J, Tao J. Molecular cloning and characterization of a cyclophilin A homologue from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res*, 2012; 111: 807-817.

Hota-Mitchell S, Siddiqui AA, Dekaban GA, Smith J, Tognon C, Podesta RB. Protection against *Schistosoma mansoni* IFNect infection with a recombinant baculovirus-expressed subunit of calpain. *Vaccine*, 1997; 15: 1631-40.

Hotez PJ, Bundy DAP, Beegle K, Brooker S, Drake LSN, et al.. Helminth IFNectons: Soil-Transmitted Helminth IFNectons and Schistosomiasis, 2006, 2<sup>nd</sup>ed.

Hotez PJ, Engels D, Fenwick A, Saviolki L. África is desperate for praziquantel. Lancet, 2010; 376: 496-8.

Ingolotti, M.; Kawalekar, O.; Shedlock, D.J.; Muthumani, K.; Weiner, D.B. DNA vaccines for targeting bacterial IFNectons. Expert Rev Vaccines, 2010; 9(7):747-63.

Ito Y. A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. Virology, 1960 ; 12:596-601.

James SL. In vitro proliferative response to living schistosomula by T lymphocytes from mice IFNected with *Schistosoma mansoni*. Parasitology 1981; 83 (pt1): 147-162

James CE, Hudson AL, Davey MW. An update on P-glycoprotein and drug resistance in *Schistosoma mansoni*. Trends Parasitol, 2009; 25: 538-9.

114. Jankovic D, Aslund L, Oswald LP, Caspar P, Champion C, Pearce E, Coligan JE, Strand M, Sher A, James SL. Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against *Schistosoma mansoni*. J Immunol, 1996; 157:806-14.

Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Caspar R, James S, Cheever AW, et al.. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- $\gamma$  dependent effector mechanisms. J Immunol 1999; 162 (1): 345-351

Jassim A, Hassan K, Catty D. Antibody isotype in human schistosomiasis mansoni. Parasite immunol, 1987; 9(6):627-50.

Jelinek T, Nothdurf HD, Loscher T. Schistosomiasis in travelers and expatriates. J Travel Med, 1996; 13: 160-4.



Jones MK, Gobert GN, Zhang L, Sunderland P, McManus DP. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *bioEssays*, 2004, 26: 752-65.

Jordan P, Webbe G, Sturrock FS. Human schistosomiasis. Wallingford (CT): CAB international; 1993.

Jordan P. From Katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzias. *Acta Trop*, 2000; 77: 9-40.

Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P. A new function for platelets independent killing of schistosomes. *Nature*, 1983; 303: 810-5.

Juberg AD, Gonçalves T, Costa TA, de Mattos AC, Pascarelli BM, de Manso PP, Ribeiro-Alves M, Pelajo-Machado M, Peralta JM, Coelho PM, Lenzi HL. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol*. 2009; 219(5): 219-34.

Khalife J, Capron M, Grzych JM, Butterworth AE, Dunne DW, Ouma JH. Immunity in human schistosomiasis mansoni: regulation of protective immune mechanism by IgM blocking antibodies. *J Exp Med*. 1986; 142(12):4422-7.

Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, Villar CP, Glenn GM. Dose sparing with intradermal injection of IFN $\alpha$  vaccine. *N Engl J Med*, 2004; 351: 2295-2301.

Kiang D, El Ghazalie NE, Medhat AM, Abdel-Fattah M, Karim AM, LoVerde PT. Identification and characterization of *Schistosoma mansoni* p17.7, a cyclophilin. *Mole Bioch Parasitol*. 1996; 76 (1-2): 73-82.

Kim D, Know S, Rhee J, Kim KD, Park CS, Choi MJ, Suh JG, Kim DS, Lee Y, Kwon HJ. Production of antibodies with peptide-CpG- DNA -Liposome complex without carriers. *BCM Immunol*, 2011; 12:29.

King CH, Dickman K, Tisch DJ. Regauging the cost of chronic helminthic infection: meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*, 2005; 365: 1561-9.

Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev*, 2004; 199:201-06.

Knudsen GM, Medzihradzky KF, Lim KC, Hansell E, McKerrow JH. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol Cell Proteomics*, 2005; 4: 1862-75.

Kourilová P, Hogg KG, Kolárová L, et al. Cercarial dermatitis caused by bird Schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *J Immunol* 2004;172(6):3766-74.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs present in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature*, 1995; 374: 546-49.

Kutzler, M.A. Weiner, D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, 2008; 9:776–88.

Lambertucci JR, Barata CH, Rayes AAM. Unusual manifestations of acute schistosomiasis. *Arq Bras Med* 1996;70:445-9.

Lenzi LH, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, Mariano M, Lenzi JA. Histoarchitecture of *Schistosoma* granuloma development and involution: morphogenetic and biochanical approaches. *Mem Ins. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*.1998; 1:141-151.

Levy S, Shohan T. Protein-protein interaction in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, 2005; 20: 218-24.

Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activates caspase-1 and induce IL-1B and IL-18 release. *J Immunol*, 2007; 178: 5271-76.

Lichtenbergova L, Kolbekova P, Kourilova P, et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. *Parasite Immunol*, 2008;30(11-12):585-95.

Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*. 2002; (1):97-130

Loukas A, Gaze S, Mulvenna JP et al. Vaccinomics for the major blood feeding helminthes of humans. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 2011; 9: 567-77.

Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, Van Den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1697-1710.

Mahmoud AAF. Esquistossomose e outras Infecções por trematódeos. In: Braunwald E, Kasper DL, Fauci AS, et al. (editores). *Harrison medicina interna*. 17ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2009.p. 1330-5.

Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1996, 60: 512–538.

Malaquias LCC, Falcão PL, Silveira AMS, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL *et al.*. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand J Immunol*, 1997; 121:41-50.

Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1985; 57:357-417.

Marrack P, Mckee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*, 1996; 9: 287-93.

Martins VP, Pinheiro CS Figueiredo BCP et al. Vaccination with enzymatically cleaved GPI-anchored proteins from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge IFNectin. *Clinical and develop immunol*, 2012; 962538.

McKee AS, MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biol*, 2010; 12: 8-37.

MacLaren DJ, Hockley DJ. Blood flukes have a double outer membrane. *Nature*.1977; 269:147-149.

Manfras BJ, Reuter S, Wendland T, Kern P. Increased activation and oligoclonality of peripheral CD8(+) T cells in the chronic human helminth IFNectin alveolar echinococcosis. *IFNect Immun*, 2002; 70(3):1168-74.

Martins-Filho OA, Cunha-Melo JR, Lambertucci JR et al. Clinica forms of human *Schistosoma mansoni* IFNectin are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. *Dig Dis Sci* 1999;44:570–7

McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: the parasite surface in relation to host immunity. Letchworth: Research Studies Press. 1980.

McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21 (1): 225-42.

Mei H, Lo Verde PT. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Experimental Parasitology*, 1997; 86: 69-78.

Melo TT, Sena IC, Araújo N, Fonseca CT. Antibodies are involved in the protective immunity induced in mice by *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) immunization. *Parasite immunology*, 2014; 36: 107-111.

Milan EP, Keim LS. Esquistossomíase mansônica. In: Tavares W, Marinho LAC, (editores). *Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças Infecciosas e parasitárias*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 345-50.

- Miller P, Wilson RA. Migration of the schistosome of *Schistosoma mansoni* from skin to the lungs. *Parasitology*, 1980; 77:281-302.
- Minai M, Hosaka Y, Ohta N. Historical view of schistosomiasis japonica in Japan: implementation and evaluation of disease-control strategies in Yamanashi prefecture. *Parasitol Int*, 2003; 52: 321-6.
- Mir L. *Genômica: do DNA à transgênese*. 2004; 1 ed. Rio de Janeiro.
- Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. "Rapid- impact interventions": how a policy of integrated control for Africa's neglected tropical diseases could benefit the poor. *PLoS Med*, 2005; 2: e336.
- Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM *et al.*. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis*, 1999; 179(6):1502-14.
- Moore DL, Grove DI, Warren KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J Pathol*, 1977; 121(1): 41-50.
- Moser D, Tendler M, Griffiths G, Klinkert MQ. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *Bio Chem*, 1991; 266 (13): 8454.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol*, 1996; 17: 138-46.
- Mourão MM, Grunau C, LoVerde PT, Jones MK, Oliveira G. Recent advances in *Schistosoma* genomics. *Parasite Immunology*, 2012; 34: 151-62.
- Mukai T, Nagaki M, Imose M, Kimura K, Stake S, Takai S *et al.* Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon-gamma. *Liver Int*. 2006; 26: 1006-14.

Nabel GJ. Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med*, 2013 7;368(6):551-60.

Nascimento EJ, Amorim RV, Cavalcante A et al. Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem Insti, Oswaldo Cruz*, 2007; 102 (1): 21-27.

Nesvizhskii AI. A survey of computational methods and error rate estimation procedure for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *Journal of proteomics*, 2010; 2092-2123.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988; 9(6):255-62.

O'Farrell PH. High resolution two-dimension electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*, 1975; 250: 4007-21.

Pacífico LG, Fonseca CT, Chiari L, Oliveira SC. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against IFN $\gamma$  infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology*, 2006; 211 (1-2): 97-104.

Palatnick-de-Souza LB. Vaccine for leishmania for coming 25 years. 2008; *Vaccine* 26: 1709-24.

Pancre V, Monte D, Delanoye A, Capron A, Auriault C. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur Cytokine Netw*, 1990; 1(1):15-9.

Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*, 2002; 2: 499-511.

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

Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Hernandez A, Siles-Lucas M, Ramajo-Martin V, Oleaga A. A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male e female *Schistosoma bovis* worm. *Proteomic*, 2006; 6 (suppl 1): 226-36.

Phillips SM, Lammie PJ. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. *Parasitol Today*, 1986; 2(11):296-302.

Porchet E, McNair A, Caron A, Kusnierz JP, Zemzoumi K, Capron A. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology*, 1994; 109 ( Pt 5):565-72.

Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pelegrino. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule *in vitro*. *Exp Parasitol*, 1974; 36 (3):360-72.

Raz E, Tighe H, Sato Y, Dudler JÁ, Romam M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci*, 1996; 93: 5141-45.

Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons for vaccine development. *Trends Immunol*, 2009; 30 (1): 23-32.

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

Reynolds SR, Shoemaker CB, Harn DA. T and B cell epitope mapping of Sm23 an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, 1992; 149 (12):3995-4001.

Ribeiro F, Vieira CS, Fernandes A, Araujo N, Katz N. The effects of immunization with recombinant Sm14 (rSm14) in reducing worm burden and mortality of mice IFNected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2002; 35(1):11-7.

- Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, Sauzeat E, Fournier JG, Clayette P, Siegrist CA, Dormont D. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophages differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine*, 2004; 22: 3127-35.
- Rock KL, Gamble S, Rothstein L, Gramm C, Benacerraf B. Dissociation of B2-microglobulin leads to the accumulation of substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell*, 1991; 64 (4): 611-620.
- Rock KL, Fleischacker C, Gamble S. Peptide-priming of cytolytic T cell immunity in vivo using B2-microglobulin as an adjuvant. *Journal of Immunology*, 1993; 150 (4): 1244-52.
- Rollinson D, Simptom AJ. *The biology of Schistosomes- from genes to latrines*, Harcourt Brace Jovanovich, London 1987.
- Romeih MH, Hassan HM, Shousha TS, Saber MA. Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* IFN $\gamma$  secretion by multivalent DNA vaccine. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008; 40 (4): 327-38.
- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, et al..Schistosomiasis. *N Engl J Med*, 2002; 346: 1212-20.
- Ross AG, Vickers D, Olds GR, et al..Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol*, 2007; 85: 148-54.
- Rush BR; Flaminio M.J. Immunomodulation in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2000;16: 183-97.
- Rutitzky LI, Hernandez HJ, Stadecker MJ. Th1- polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in Schistosome IFN $\gamma$  secretion. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001; 98: 13243-13248.
- Rutitzky LI, Lopes JR, Stadecker MJ. Severe CD4 T Cell-Mediated Immunopathology in Murine Schistosomiasis Is Dependent on IL-12p40 and Correlates with High Levels of IL-17. *Journal Immunol*, 2005; 175: 3920-26.



Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during IFN $\gamma$  infection of mice with *Schistosoma mansoni*. Eur J Immunol, 2003; 15 (4): 880-8.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori H, Fehervari Z et al. Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev, 2006; 212:8-27.

Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science, 1996; 273: 352-54.

Sauma SY, Strand M. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. Molecular and Biochemical Parasitology, 1990; 38: 199-210.

Segatori L, Murphy L, Arredondo S, Kadokura H, Gilbert H, Beckwith J, Georgiou G. Conserved role of the linker alpha-helix of the bacterial disulfide isomerase DsbC in the avoidance of misoxidation by DsbB. J Biol Chem. 2006 Feb 24; 281(8):4911-9. Epub 2005 Nov 9.

Shalaby KA, Yin L, Thakur A, Christen L, Niles EG, LoVerde PT. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. Vaccine, 2003; 22: 130-136.

Skelly PJ, Shoemaker CB. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. Int J Parasitol, 2000; 30: 625-631.

Siddiqui AA, Zhou Y, Podesta RB, Karez SR, Tognon CE, Strejan GH, Dekaban GA, Clarke MW. Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. Biochim Biophys. Acta, 1993; 1181: 37-44.

Siddiqui AA, Phillips T, Charest RB, Podesta ML, Quilin JR, Pinkston JR, Hoyd JD, Pompa J, Villalovos RM, Paz M. Enhancement of Sm-p80 (large subunit of calpain) induced protective immunity against *Schistosoma mansoni* through co-delivery of interleukin-2 and interleukin-12 in a DNA vaccine formulation. *Vaccine*, 2003; 21: 2882-89.

Siddiqui AA, Schistosomiasis vaccines. *Human Vaccines*, 2011, 7:11, 1192-1197.

Silva JR, Neves RH, Gomes DC. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases do desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: Carvalho, OS (Org.); Coelho, PMZ (Org.); Lenzi, HL (Org.). *Schistosoma mansoni* esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. P. 43-84. Capa dura, 26 cm. ISBN 978-857541-150-6.

Silva-Teixeira DN, Doughty BL, Goes AM. Human schistosomiasis: modulation of in vitro granulomatous hypersensitivity and lymphocyte proliferative response by macrophages undergoing differentiation. *Scand J Immunol*, 1996; 44:522-9.

Singh M; O'hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol*. 1999;17:1075-8.

Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Reddy TR, Boros DL. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* IFN $\gamma$  infected mice. *Immunology*, 2005; 114: 410-417.

Smythies LE, Betts C, Coulson OS, Dowling MA, Wilson RA. Kinetics and mechanism of effector focus formation in the lungs of mice vaccinated with cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, 1996; 18: 359-69.

Souza FPC, Vitorino RR, Costa AP, Faria FC, Santana LA, Gomes AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Bras Med*, 2011; 9(4): 300-7.

Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol*, 1998; 28: 2045-54.

- Spreafico R, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. *Eur. J. Immunol*, 2010; 40: 638-42.
- Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol*, 1996; 157: 2116-22.
- Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev*. 2004; 201: 168-79.
- Stanworth DR, Smith AK. Inhibition of reagin mediated PCA reactions in baboons by the human IgG4 subclass. *Clin Allerg*, 1973; 3:37-41.
- Steinmann P, Keiser J, Bos J, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 2006; 6 (7): 411-25.
- Stirewalt MA, Cousin CE, Dorsey CH. *Schistosoma mansoni* stimulus and transformation of cercariae into schistosomules. *Exp. Parasitol*, 1983; 56: 358-68.
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galán JE, Askenase PW, Flavell RA. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 2006; 24: 317-27
- Swartz JR. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 2001 Apr;12(2):195-201.
- Tang, D.C.; DeVit, M.; Johnston, S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* , 1992; 356: 152–154.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell response develop in parallel to th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. J Immunol, 2006; 176: 5839-47.

Teixeira- Carvalho A, Martins Filho OA, Peruhype-Magalhães V, Silveira-Lemos D, Malaquias LCC, Alves Oliveira LF, Silveira MAS *et al.*. Cytokine, chemokine receptors CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup><sup>+</sup> T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. Acta Trop, 2008; 108:139-149.

Teixeira de Melo T, Araujo JM, Do Valle Durães F, Caliari MV, Oliveira SC, Coelho PM, Fonseca CT. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. Parasite Immunol, 2010; 32 (11-12): 749-59.

Teixeira de Melo T, Araujo JM, Campos de Sena I, Carvalho Alves C, Araújo N, Toscano Fonseca C. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN. Microbes and Infect, 2012; 15 (2013): 28-36.

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra- Freire N, Diogo CM, Almeida MS, *et al.*. *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc Natl Acad Sci, 1996;93 (1): 269-73.

Torben W, Ahmad G, Zhang W, Siddiqui AA. Role of antibodies in Sm-p80-mediated protection against *Schistosoma mansoni* challenge IFN $\gamma$  in murine and nonhuman primate models. Vaccine, 2011; 29: 2262-2271.

Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, *et al.*. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. Nat Med, 2006; 12 (7): 835-40.

Tran MH, Tori CF, Leanne C, Gaze S, Gatton M, Jons M, Lovas E, Pearce EJ, Loukas A. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. Plos pathogens, 2010; 6(4): e1000840

Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Friedman, A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, 1993; Mar 19;259(5102), 1745–1749.

Valadares E, Coelho PMZ, Pelegrino J, Sampaio IBM. *Schistosoma mansoni*: comparação da oviposição entre as cepas LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) e ST (Libéria) em camundongos. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1981; 23: 1-5.

Van Balkom BW, Van Gestel RA, Brouwers JF, Krijgsveld J, Tielens AG, Heck AJ, Van Hellemond JJ. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental subproteome. J. Proteome Res, 2005; 4: 958-66.

Van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC. Triggering TLR signaling in vaccination. Trends Immunol, 2006; 27: 49-59.

Van Hellemond JJ, Van Balkon BW, Tielens AG. Schistosome biology and proteomics: progress and challenges. Exp Parasitol. 2007; 117 (3):267-74.

Vaughan EE, DeGiulio JV, Dean DA. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. Curr Gene Ther, 2006 Dec;6(6):671-81.

Vicogne J, Cailliau K, Evans RJ. Molecular properties of ATP-gated P2x receptor ion channels. Trends Pharmacol Sci, 2004; 25:487-93.

Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odo, Massara CL, Colosimo E, Colley DG et al. Comparison of antibody isotype response to *Schistosoma mansoni* antigens by IFN $\gamma$ -producing and putative resistant individuals living in an endemic area. Parasite Immunol 1995; 17 (6):297-304.

- Vignali DA, Crocker P, Bickle QD, Cobbold S, Waldmann H, Taylor MG. A role for CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated IFN $\gamma$  injections. *Immunology* 1989; 67 (4): 466-72.
- Von Lichtenberg F. Studies on granuloma formation. III. Antigen sequestration and destruction in the schistosome pseudotubercle. *Am J Pathol*, 1964; 45: 75-93.
- Xiang, Z.Q.; Spitalnik, S.; Tran, M.; Wunner, W.H.; Cheng, J.; Ertl, H.C. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*, 1994; 199:132-40.
- Xu CB, Verwaerde C, Grzych JM, Fontaine J, Capron A. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur J Immunol*, 1991; 21(8):1801-7.
- Xu, Z.L.; Mizuguchi, H.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Mayumi, T.; Hayakawa, T. Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J Control Release*, 2002; 81:155-63.
- Zhou Y, Zhang H, Sun XJ, Zheng D, Liang YJ, Luo J, Wang Y, Zhang ZS. Murine CD8(+)T cell cytotoxicity against schistosomula induced by inoculation of *Schistosoma* 22.6/26GST coupled Sepharose 4B beads. *Vaccine*, 2012; 30(14):2440-7
- Wack A, Rappuoli R. Vaccinology at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *Current Opinion in Immunology*, 2005; 17:411-418.
- Walsh CT, Zygdowsky LD, McKeon F. Cyclosporin A, the cyclophilin class signal transduction. *J Immunol Chem* 1992; 267: 13115-118.
- Wang, B.; Ugen, K.E.; Srikantan, V.; Agadjanyan, M.G.; Dang, K.; Refaeli, Y.; Sato, A.I.; Boyer, J.; Williams, W.V.; Weiner, D.B. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:4156-60.

Warren KS. Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology? *J IFNec Dis*, 1973; 127(5):595-609.

Williams, J.A.; Carnes, A.E.; Hodgson, C.P. Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.*, 2009; 27(4): 353–370.

Wilson RA, Barnes PE. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observation on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. *Parasitology*, 1974; 68: 239-58.

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

Wilson RA, Coulson PS, Betis C, Dowking MA, Smythies LE. Impaired immunity and altered pulmonary response in mice with a disrupted interferon- $\gamma$  receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 1996; 87 (2): 275-282.

Wilson RA, Langermans JA, Van Dam GJ, Vervenne RA, Hall SL, Borges WC, *et al.* Elimination of *Schistosoma mansoni* adult worms by rhesus macaques: basis for therapeutic vaccine? *Plos Megl Trop Dis*, 2008 2:e290.

Wynn TA, Cheever AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol* 1995; 7 (4): 505-511.

Wolowczuk I, Nutten S, Roye O, Delacre M, capron M, Murray RM, trottein F, Auriault C. IFN $\gamma$  of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. *IFNect Immun*. 1989; 67:4183-4190.

World Health Organization. Proceedings of the second Global Vaccine Research Fórum. Montreux, Switzerland, Geneve: 2001.

World Health Organization. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Geneve: WHO, 2002.

World Health Organization. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Geneve: WHO, 2013.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>, Acesso em 01 de março de 2013.

Yamamoto S, Yamamoto T, Schimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferon, activates natural killers cells and inhibits tumor growth. *Microbiomol Immunol*, 1992; 36: 983-97.

Yang DC, Jackson DC, Zeng Q, McManus DP. Multiepitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine*, 2000; 19 (1): 103-13.