

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

Avaliação da imunoproteção induzida pelas proteínas recombinantes Sm29 e Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* em camundongos primoinfectados e tratados

por

Clarice Carvalho Alves

Belo Horizonte
Fevereiro/2015

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

Avaliação da imunoproteção induzida pelas proteínas recombinantes Sm29 e Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* em camundongos primoinfectados e tratados

por

Clarice Carvalho Alves

**Tese apresentada com vistas à obtenção do título de
Doutor (a) em Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.**

Orientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca

Coorientação: Dr. Sérgio Costa Oliveira

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

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

A474 Alves, Clarice Carvalho.
2015

Avaliação da imunoproteção induzida pelas proteínas recombinantes Sm29 e Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* em camundongos primoinfectados e tratados / Clarice Carvalho Alves. – Belo Horizonte, 2015.

XX, 96 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 100 – 116

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) 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/uso terapêutico I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano (Orientação). III. Oliveira, Sérgio Costa (Coorientação)

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 imunoproteção induzida pelas proteínas recombinantes Sm29 e Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* em camundongos primoinfectados e tratados

por

Clarice Carvalho Alves

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca (Presidente)

Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira

Profa. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Profa. Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão Corrêa

Suplente: Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Tese defendida e aprovada em: 09/02/2015

*Aos meus pais, Welerson e Maria Lúcia
e ao meu marido, Kennedy,
por terem sido fundamentais nesta jornada*

AGRADECIMENTOS

À Deus, sou grata por TUDO!!!

À Kika, minha querida orientadora, muito obrigada pela dedicação constante e por acreditar em mim em todos esses anos! Agradeço por me ensinar, nestes seis anos de convivência, como fazer ciência com ética, respeito e paixão! Espero um dia ser uma profissional como você!

Ao Sérgio Costa, meu coorientador, obrigada pelas riquíssimas contribuições e por abrir as portas de seu laboratório para mim!

Ao Dr. Paulo, pelo exemplo de pesquisador e pessoa, obrigada!

À TODOS do LESQ, muito obrigada! Não poderia haver pessoas melhores para a convivência do dia-a-dia! Obrigada pelo incentivo e encorajamento diários! Vocês foram essenciais para mais esta conquista!

À todos do LIDI da UFMG, em especial, à Barbara, à Suellen e ao Natan, pela ajuda e por me receberem tão bem no laboratório, obrigada!

Aos meus amados pais, avós, irmãos, cunhadas e sobrinho, pelo apoio incondicional nos momentos alegres e nos mais difíceis também! Amo vocês!

Ao Kennedy, meu amor, obrigada por estar ao meu lado, sempre, me incentivando e me dando forças para chegar até aqui!

Aos meus familiares e amigos, obrigada pela torcida!

À Coordenação da Pós-Graduação e à todos os colegas de curso, obrigada!

À Equipe do Biotério e à Plataforma de Citometria de Fluxo do CPqRR, obrigada pelo suporte!

À Biblioteca do CPqRR por fornecer acesso à informação técnico-científica, obrigada!

Aos funcionários do CPqRR que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho, obrigada!

AGRADECIMENTOS À AGÊNCIA FINANCIADORA

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais -FAPEMIG- pela bolsa de doutorado concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 A Esquistossomose	21
1.2 O <i>Schistosoma mansoni</i>	22
1.3 Prevenção e controle da Esquistossomose	23
1.4 A Resposta imune na Esquistossomose	24
1.5 Vacinas para a Esquistossomose	28
1.5.1 Sm22.6	32
1.5.2 Sm29	33
1.6 Adjuvantes	34
1.6.1 Hidróxido de Alumínio - ALUM	35
1.6.2 Adjuvante de Freund	37
1.6.3 Monofosfolípídeo A – MPL	38
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Animais	43
4.2 Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i>	43
4.3 Clonagem, expressão recombinante e purificação Sm22.6	43
4.4 Clonagem, expressão recombinante e purificação da proteína Sm29	44
4.5 Infecção dos animais	45
4.6 Tratamento dos animais	45
4.7 Protocolo de imunização com as proteínas Sm22.6r e Sm29r	46
4.7.1 Estabelecimento do protocolo de imunização	46
4.7.2 Protocolo de imunização com os adjuvantes ALUM e MPL	48
4.8 Perfusão animais	48
4.9 Contagem do número de ovos e avaliação histopatológica	49

4.10 Avaliação do perfil de resposta humoral de camundongos imunizados.....	49
4.11 Reconhecimento das proteínas Sm22.6 e Sm29 na superfície do parasito por anticorpos de animais imunizados.....	51
4.12 Avaliação do perfil de resposta celular de camundongos imunizados	52
4.13 Avaliação imunofenotípica de camundongos imunizados	55
4.14 Análise estatística	58
5 RESULTADOS	60
5.1 Avaliação parasitológica: determinação da carga parasitária e do número de ovos presentes no fígado e intestino dos animais imunizados	60
5.1.1 Grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT e PBS IT.....	60
5.1.2 Grupos Sm22.6, Sm29 e PBS	65
5.1.3 Grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL.....	66
5.2 Avaliação da resposta humoral de camundongos imunizados	68
5.2.1 Grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT e PBS IT.....	68
5.2.2 Grupos Sm22.6, Sm29 e PBS	71
5.2.3 Grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL.....	72
5.2 Reconhecimento das proteínas nativas no tegumento do parasito por anticorpos de camundongos imunizados com Sm22.6r e Sm29r.....	75
5.3 Avaliação da produção de citocinas	76
5.4 Avaliação imunofenotípica dos camundongos imunizados.....	83
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÃO.....	95
8 ANEXOS.....	96
8.1 Licença do CEUA.....	96
8.2 Artigo publicado referente ao trabalho de doutorado	97
8.3 Revisões publicadas dentro do assunto do trabalho de doutorado	98
8.4 Artigos publicados com parceiros durante o período de doutorado	99
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégia experimental segundo o número de imunizações: uma dose (a), duas doses (b) ou três doses (c).	47
Figura 2 – Estratégia de análise da marcação das citocinas intracitoplasmáticas	54
Figura 3 - Estratégia de análise da marcação dos linfócitos e macrófagos ativados.....	57
Figura 4 - Estratégia de análise da marcação dos linfócitos de memória.....	58
Figura 5 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm22.6 IT e PBS IT	61
Figura 6 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm29 IT e PBS IT.	62
Figura 7 – Número de vermes recuperados dos grupos Sm29 IT e PBS IT imunizados com três doses	63
Figura 8 – Número de ovos presentes no fígado e intestino de animais infectados/tratados, imunizados com Sm22.6r (a) ou Sm29r (b).	64
Figura 9 – Área do granuloma de animais, previamente infectados e tratados, imunizados com Sm29r.....	64
Figura 10 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm29, Sm22.6 e PBS	65
Figura 11 – Número de ovos presentes no fígado e intestino de animais naïve imunizados com Sm29r (a) ou Sm22.6r (b).....	66
Figura 12 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL.....	67
Figura 13 - Número de ovos presentes no fígado e intestino de animais infectados/tratados, imunizados com Sm29r + ALUM (a) ou Sm29r + MPL (b).....	68
Figura 14 – Dosagem dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE, em camundongos previamente infectados e tratados, imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund.....	70
Figura 15 – Dosagem dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a em camundongos naïve imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund.	72
Figura 16 - Dosagem dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE, em camundongos previamente infectados e tratados, imunizados com Sm29r + ALUM ou MPL.....	74
Figura 17 – Reconhecimento das proteínas nativas Sm22.6 e Sm29 na superfície de esquistossômulos por soro de camundongos imunizados.....	76
Figura 18 – Avaliação do perfil celular de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund.	78
Figura 19 – Avaliação do perfil celular de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + ALUM ou MPL.	80

Figura 20 - Produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por células TCD4 dos grupos Sm29 ALUM, Sm29 MPL e seus controles.	81
Figura 21 – Subpopulações de células TCD4 ⁺ nos grupos Sm29 ALUM, SM29 MPL e seus controles.	82
Figura 22 – Frequência de linfócitos ativados de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund.	84
Figura 23 – Frequência de células de memória em animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund.	86
Figura 24 – Frequência de células de memória em animais imunizados com Sm29r + ALUM ou MPL.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais em protocolo de imunização com as proteínas Sm22.6r ou Sm29r	46
Tabela 2 – Diluição dos soros.....	50
Tabela 3 – Título de anticorpos de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na avaliação imunofenotípica dos grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT, PBS IT, Sm22.6 e Sm29.....	56
Quadro 2 – Anticorpos utilizados na avaliação imunofenotípica dos grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL.....	57
Quadro 3 – Principais resultados encontrados nos grupos imunizados: Sm22.6 IT, Sm22.6, Sm29 IT, Sm29, Sm29 ALUM, Sm29 MPL.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: Micrograma

µL: Microlitro

ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpo, do inglês: Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity

APC: Aloficocianina, do inglês: allophycocyanin

BCA: Ácido bicinconínico, do inglês: Bicinchoninic acid

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

Biot: Biotina

BSA: Albumina Bovina Sérica, do inglês: Bovine Serum Albumin

CBA: Ensaio com beads em citometria, do inglês: Cytometric Bead Array.

CFA: Adjuvante Completo de Freund, do inglês: Complet Freund Adjuvant

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

FACS: Separador de células por fluorescência, do inglês: Fluorescence Activated Cell Sorter

FITC: Isotiocianato de fluorescência, do inglês: Fluorescein isothiocyanate

FSC: Dispersão frontal, do inglês: Forward Scatter

HPJ: Hoffman - Pons e Janer

IFA: Adjuvante Incompleto de Freund, do inglês: Incomplet Freund Adjuvant

IFN-γ: Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

IPTG: Isopropilthiogalactosídeo, do inglês: isopropylthiogalactoside

KOH: Hidróxido de Pótássio

MBP: proteína ligadora de maltose, do inglês: maltose-binding protein.

NaCl: Cloreto de Sódio

PBS: Tampão salina-fosfato, do inglês: Phosphate-buffered saline

PBST₂₀: Tampão salina-fosfato com Tween 20, do inglês: Phosphate-buffered saline and Tween 20

PE: Ficoeritrina, do inglês: Phycoerythrin

RPMI: Roosevelt Park Memorial Institute

SEA: Antígeno solúvel de ovo, do inglês: Soluble Egg Antigen

SSC: Dispersão lateral, do inglês: Side Scatter

SWAP: Antígeno solúvel de verme adulto, do inglês: Soluble Worm Antigen Preparation

Th1: Subpopulação de células T auxiliares do tipo 1, do inglês: T helper cells type 1

Th2: Subpopulação de células T auxiliares do tipo 2, do inglês: T helper cells type 2

TMB: Tetrametilbenzidina, do inglês: Tetramethylbenzidine

TNF- α : Fator de necrose tumoral α , do inglês: tumor necrose factor α

WHO: Organização Mundial de Saúde, do inglês: World Health Organization

RESUMO

O desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose, juntamente com a quimioterapia, seria de grande impacto para o controle e eliminação da doença. Nesse sentido, vários antígenos do parasito já foram testados a fim de avaliar a capacidade dos mesmos em induzirem proteção contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Porém, apesar de alguns antígenos apresentarem bons resultados na proteção contra a infecção, esses nunca foram testados em modelos experimentais previamente expostos a antígenos do parasito. No caso da esquistossomose, isso seria importante já que os moradores de áreas endêmicas, população alvo de uma vacina para a doença, passam por repetidas infecções ao longo de suas vidas. Diante dessa necessidade, duas proteínas de tegumento de *Schistosoma mansoni*, Sm22.6 e Sm29, merecem destaque já que têm sido associadas à resistência à infecção e reinfeção em moradores de áreas endêmicas, e por terem induzido proteção parcial em ensaios envolvendo a imunização de camundongos C57BL/6 naïve. Portanto, este trabalho objetivou avaliar a habilidade das proteínas recombinantes, Sm22.6 e Sm29, em induzirem proteção em animais BALB/c que já tenham sido previamente infectados e tratados. Nós também avaliamos a capacidade das proteínas Sm22.6r e Sm29r em induzirem proteção em camundongos BALB/c naïve, já que nos trabalhos anteriores essas foram testadas em animais da linhagem C57BL/6. Nossos resultados demonstraram que, diferentemente dos trabalhos anteriores, a imunização de animais BALB/c naïve com Sm22.6r ou Sm29r não foi capaz de induzir proteção. Apesar disso, através de um ensaio de imunofluorescência, foi possível observar que os anticorpos produzidos, em resposta à imunização com Sm22.6r ou Sm29r, foram capazes de reconhecer a forma nativa dessas proteínas, na superfície do parasito. A imunização de animais, infectados e tratados, com Sm22.6r+Freund, embora tenha desencadeado uma resposta imune robusta, também não foi capaz de conferir imunidade protetora. Por outro lado, camundongos, infectados/tratados, imunizados com Sm29r+Freund apresentaram significativa redução da carga parasitária (proteção de 26%-48%) após três doses da vacina. Esta formulação vacinal induziu uma produção significativa das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-17 e IL-4; uma resposta humoral vigorosa com produção de IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicos; e um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺ de memória central. Os adjuvantes Alum e MPL também foram formulados juntamente com a Sm29r. Os resultados demonstraram que somente a formulação vacinal Sm29r+Alum foi capaz de conferir proteção (29%-37%), desencadeando uma produção significativa de IL-2, IL-17 e IL-10, e um aumento do percentual de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ . Além disso, esses animais apresentaram

níveis significativos de anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2a e IgE e um aumento significativo no percentual de células B de memória. Nossos resultados confirmam o papel imunoprotetor da proteína Sm29r, reforçando seu potencial como candidata vacinal.

ABSTRACT

The development of a vaccine against schistosomiasis together with chemotherapy would have a great impact in the disease control and elimination. In this sense, several parasite antigens have been tested in order to assess its ability to induce protection against *Schistosoma mansoni* infection. Despite the great results observed after mice immunization with those antigens, they have never been tested in mice previously exposed to the parasite antigens. In the case of schistosomiasis, this is an important assessment to be done, since the residents of endemic areas, target population of a schistosomiasis vaccine, are exposed to several infections through life. In this context, two parasite tegument proteins, Sm22.6 and Sm29, are promising candidates, that have been associated with resistance to infection and reinfection in individuals living in endemic areas, and also induce partial protection against schistosomiasis in immunization trials using C57BL/6 naïve mice. Therefore, this work aimed to evaluate Sm22.6r and Sm29r ability to induce protection in BALB/c mice previously infected with *S. mansoni* and treated with Praziquantel. We also evaluated the Sm22.6r and Sm29r ability to induce protection in BALB/c naïve mice, since, previous studies were performed in C57BL/6 strain. Unlike previous works, our results showed that neither immunization with Sm29r nor immunization with Sm22.6r induced reduction in parasite burden in BALB/c naïve mice. Nevertheless, an immunofluorescence staining assay demonstrated that antibodies produced in response to mice immunization with rSm22.6 or rSm29 were able to recognize the native proteins in the parasite surface. In infected and treated mice, the immunization with Sm22.6r plus Freund failed to induce protection, despite the robust immune response observed. In the other hand, infected and treated mice, immunized with Sm29r+Freund, presented a significant reduction in parasite burden (26%-48% of protection). This immunization trial induced a significant production of IL-2, IFN- γ , IL-17 and IL-4 cytokines; a vigorous humoral response with a production of increased levels of specific IgG, IgG1, IgG2a and IgE antibodies; and a significant increase in the percentage of TCD4⁺ memory cells. Sm29r were also formulated with Alum and MPL adjuvants. The results of trials using these formulations demonstrated that only Sm29r+Alum vaccine formulation was able to confer protection (29%-37%), inducing a significant production of IL-2, IL-17 and IL-10 cytokines, and an increase in the percentage of TCD4⁺ IFN- γ ⁺ cells. Moreover, these animals produced higher levels of specific IgG, IgG1, IgG2a and IgE, and a significant increase in the percentage of B memory cells. Our results demonstrated that Sm29r

retains its ability to induce protection in previously infected/treated mice, reinforcing its potential as a vaccine candidate.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Esquistossomose

A Esquistossomose é uma doença parasitária de grande importância mundial, sendo causada por trematódeos de diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. Dentre as espécies desse gênero, cinco são as principais responsáveis por parasitar o sistema circulatório dos seres humanos e causar diferentes formas de esquistossomose, são elas: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. malayensis* e *S. haematobium* (Gryseels et al., 2006; Latif et al., 2013). A patologia associada às espécies *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* está relacionada à formação de uma fibrose hepato-intestinal crônica que decorre, principalmente, da deposição dos ovos das fêmeas do verme em órgãos como o fígado das pessoas infectadas. A patologia associada à infecção pela espécie *S. haematobium*, que habita nos vasos sanguíneos da bexiga, caracteriza uma doença que afeta o trato urinário dos indivíduos infectados (Gryseels et al., 2006; Burke et al., 2009).

Dentre as doenças tropicais negligenciadas, a esquistossomose se destaca por apresentar um importante grau de morbidade, afetando mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que, somente no ano de 2013, mais de 40 milhões de pessoas necessitaram de tratamento para a doença (WHO, 2015). Hotez e colaboradores (2014) demonstraram que o custo para os indivíduos infectados pelo *Schistosoma* representa 3,31 milhões de DALY (Disability Adjusted Life Years). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a distribuição geográfica da esquistossomose abrange 78 países, distribuídos nos continentes africano, americanos (sul e central) e asiático. Dentre essas regiões, a África é a mais afetada pela doença, compreendendo 90% de todos os casos (WHO, 2015).

No Brasil, a esquistossomose é causada pela única espécie endêmica, o *S. mansoni*. As áreas endêmicas para a doença abrangem territórios do Maranhão até Minas Gerais. Alguns focos isolados da doença se encontram nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Coura e Amaral, 2004).

Nas áreas endêmicas para a esquistossomose intestinal, a transmissão da doença ocorre através da contaminação de coleções hídricas, por fezes de indivíduos doentes, em locais onde se encontra o hospedeiro intermediário do parasito. Nessas áreas, vários fatores econômicos, sociais e ecológicos têm contribuído para a contínua transmissão da mesma ao longo dos anos. As precárias condições de saneamento básico, o baixo poder socioeconômico dos moradores das áreas endêmicas, os hábitos de vida (principalmente associados às atividades

econômicas de pesca e agricultura), a migração populacional, a presença dos hospedeiros intermediários do parasito e o clima, são exemplos de condições que permitem a permanência da transmissão da doença (Loureiro, 1989; Kloos, et al., 2008; Kloos, et al., 2010).

1.2 O *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* possui um ciclo de vida complexo, o qual apresenta uma fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e uma de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (homem ou pequenos mamíferos).

A larva de *Schistosoma mansoni*, denominada cercária, quando presente em coleções hídricas, entra em contato com o hospedeiro vertebrado e, através de uma série de eventos, consegue se fixar, invadir e migrar através da pele do hospedeiro.

A fixação das cercárias na pele é auxiliada pela presença de L-arginina e pelo calor proveniente do hospedeiro (Haas et al., 1976; Haas et al., 1997), permitindo um contato prolongado entre parasita e hospedeiro, e assim, facilitando a penetração das cercárias através da pele. A partir daí, as cercárias iniciam a invasão da pele através da ação vibratória da cauda e da secreção das glândulas pré-acetabulares, as quais possuem proteases (Haas et al., 1997). Esse processo de invasão da pele pelo parasito resulta em perda da cauda e em alterações morfofisiológicas, desencadeadas pelas mudanças de temperatura e osmolaridade, transformando as cercárias em esquistossômulos (Stirewalt, 1974). Os esquistossômulos, então, já transformados, invadem a corrente sanguínea e são levados até os pulmões e daí, chegam até as veias do sistema porta-hepático, local em que sofrerão maturação em vermes adultos (Miller e Wilson, 1980). Estudos avaliando a migração do *S. mansoni*, em camundongos, mostram que os esquistossômulos podem permanecer na pele do hospedeiro até o quarto dia pós-infecção, antes de serem levados aos pulmões. A presença de esquistossômulos nos pulmões e no sistema porta hepático, por sua vez, já é detectada a partir do terceiro e oitavo dia pós-infecção, respectivamente. Estes dados revelam que a migração do parasita, no hospedeiro definitivo, é do tipo assíncronica, se baseando na capacidade individual de cada parasito (Barbosa et al., 1978).

Acredita-se que a maturação dos vermes ocorra no sistema porta-hepático, dentre outros motivos, pela presença de altos níveis de nutrientes no sangue porta-hepático (Wilson et al, 1978; Khammo et al., 2002). O amadurecimento sexual também ocorre nesta fase, sendo

o acasalamento entre os vermes macho e fêmea fundamental para o amadurecimento sexual desta última (Erasmus, 1986).

Os vermes adultos, acasalados, migram, contra a corrente sanguínea, até as vênulas do mesentério do intestino e iniciam a deposição dos ovos 30-40 dias pós-infecção. Esses poderão ser carreados através do fluxo sanguíneo para outros órgãos, ficando retido nestes, promovendo a formação de uma reação inflamatória granulomatosa ao redor dos mesmos, ou poderão atravessar a mucosa do intestino caindo na luz intestinal. Deste modo, os ovos poderão ser eliminados juntamente com as fezes. Quando encontram o meio aquático, os miracídios, larvas presentes em ovos maduros, eclodem devido aos diferentes fatores ambientais, tais como temperatura e luminosidade. Os miracídios livres no meio aquático encontram com o hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, e iniciam a penetração nestes moluscos com o auxílio de secreções glandulares do terebratorium e movimentos rotatórios. Os miracídios, então, iniciam numerosos processos de multiplicação das células germinativas originando os chamados esporocistos primários. Esses, por sua vez, se transformam em esporocistos secundários, na segunda semana após a penetração dos miracídios. Os esporocistos, então, migram até a região das glândulas digestivas, local onde ocorre a liberação das cercárias recém-produzidas pelos esporocistos secundários (Pan, 1965). As cercárias liberadas ganham o meio aquático, podendo infectar o hospedeiro definitivo, fechando, assim, seu ciclo.

1.3 Prevenção e controle da Esquistossomose

A adoção de medidas de saneamento básico é o método profilático ideal para o controle da esquistossomose o qual impede não só a transmissão da esquistossomose, como também daquelas doenças ligadas à água contaminada. Porém, o precário padrão sócio-econômico dos países endêmicos para a doença dificulta a adoção desta medida profilática. Por isso, o método largamente utilizado para controlar a esquistossomose é a quimioterapia, sendo o Praziquantel o medicamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento da doença.

Utilizando o tratamento como principal método de controle, além da adoção de medidas que visam à melhoria das condições sanitárias e da educação em saúde, o Brasil, desde 1975, conta com um Programa de Controle para a Esquistossomose que abrange todo o país. Desde sua implementação, o programa contribuiu de maneira significativa na redução do

percentual de pessoas infectadas, da taxa de hospitalização e mortalidade (Amaral et al., 2006).

Porém, apesar de eficaz, o tratamento apresenta algumas limitações importantes. Trabalhos desenvolvidos por Sabah e colaboradores, em 1986, e Pica-Mattoccia e Cioli em 2004, demonstraram que o Praziquantel tem sua ação somente sobre as cercárias e os vermes adultos. Este fato inviabiliza o uso deste medicamento em indivíduos com infecções recentes. Além disso, o tratamento não impede que os indivíduos moradores das áreas endêmicas sejam reinfectados já que o ambiente onde estes indivíduos residem permite um constante contato com o parasito.

Por isso, acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina traria um grande impacto auxiliando os quimioterápicos no controle da esquistossomose (Oliveira et al., 2008). A presença de indivíduos naturalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni*, em áreas endêmicas (Correa-Oliveira et al., 1989), e a evidência de resistência adquirida, ao longo do tempo, pelas constantes infecções/tratamentos de indivíduos destas regiões (Caldas et al., 2000), além dos altos níveis de proteção induzidos alcançados com a vacina de cercária irradiada, sugerem que o desenvolvimento de uma vacina é possível (Bickle, 2009).

1.4 A Resposta imune na Esquistossomose

A resposta imune contra o *S. mansoni* inicia-se logo após a penetração da cercária através da pele do hospedeiro definitivo, sendo os componentes do sistema imune inato a primeira barreira a ser enfrentada pelos parasitos. Durante a penetração, as cercárias liberam diversas moléculas imunogênicas, através da secreção das glândulas acetabulares, as quais auxiliam neste processo de penetração e na transformação em esquistossômulos (Haas et al., 1997). Tais moléculas podem ser consideradas o primeiro componente do parasito a ser reconhecido pelas células do sistema imune inato. Através de um estudo utilizando a marcação com sonda fluorescente de proteínas presentes nas glândulas acetabulares de cercárias foi possível acompanhar, *in vivo*, a liberação dessas moléculas durante a penetração e o reconhecimento das mesmas pelo sistema imune inato do hospedeiro (Paveley et al., 2009). Os resultados mostram que os neutrófilos são as primeiras células a internalizarem o material marcado, seguido pelos macrófagos e pelas células dendríticas. Os antígenos fagocitados foram capazes de induzir a produção da citocina IL-10 pelos macrófagos e de aumentar a expressão das moléculas MHC-II, e dos marcadores coestimulatórios CD40 e CD86, bem como, estimular a produção das citocinas IL-6, TNF- α e IL-12p40/23 pelas

células dendríticas, auxiliando, assim, na sua capacidade de apresentar antígenos às células do sistema imune adaptativo (Paveley et al., 2009). Outro trabalho, realizado por Jenkins e colaboradores (2005), mostra a importância destas moléculas liberadas pelo parasita, durante a penetração, para a ativação de macrófagos através da via TLR dependente de MyD88, promovendo a produção das citocinas IL-10, IL-6 e IL-12p40. Além disso, o tegumento dos esquistossômulos também é capaz de ativar células dendríticas através da via TLR4, dependente de MyD88, promovendo a expressão das moléculas coestimulatórias CD40 e CD86 e a produção de IL-12p40 e TNF- α (Durães et al., 2009).

Outro importante componente do sistema imune inato são os eosinófilos. Entretanto, seu papel na eliminação do parasito ainda é controverso. Ensaio *in vitro* evidenciaram o papel destas células em causar dano e morte de esquistossômulos (Butterworth et al., 1979; David et al., 1980; Veith e Butterworth, 1983), já que, na presença de anticorpos específicos para o parasito, os eosinófilos podem matar os esquistossômulos através de complemento e/ou por citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) (Ramalho-Pinto, et al., 1978) associada, principalmente, aos isotipos IgG1, IgG3 e IgE. *In vivo*, Swartz e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos, infectados, deficientes na produção de eosinófilos não apresentaram alterações na carga parasitária ou no número de ovos, quando comparado aos animais da linhagem selvagem, evidenciando que os eosinófilos não apresentam um papel fundamental na eliminação do parasito.

À medida que o parasito se desenvolve em verme adulto e inicia a produção de ovos, a resposta imune do tipo 1 (IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6), que é característica do início da infecção, começa a declinar, enquanto a resposta do tipo 2 (IL-4, IL-13 e IL-5) aumenta (Burke, et al., 2009). A presença dos ovos no organismo do hospedeiro induz a formação de uma reação inflamatória focal, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares, dispostos de forma organizada, denominada granuloma (Lenzi et al., 1998). O granuloma, ao mesmo tempo em que é danoso ao indivíduo, já que promove uma importante reação inflamatória, que pode causar grave fibrose hepática, também é benéfico, na medida em que “sequestra” os antígenos liberados pelos ovos, os quais apresentam efeito hepatotóxico (Hams et al., 2013).

A presença desses granulomas resulta, na maioria dos indivíduos infectados (90%), num quadro de fibrose hepática que pode ser caracterizada pela presença de cicatrizes, isoladas, localizadas no espaço periovular dos granulomas do fígado (manifestação leve da doença), ou até por um quadro de fibrose portal sistêmica, com acentuada obstrução vascular, que caracteriza-se como as manifestações mais graves da doença (Andrade, 2009).

Na tentativa de elucidar os fatores responsáveis pela gravidade da doença, diversos trabalhos já demonstraram o papel da resposta imune na formação da fibrose. Silveira-Lemos e colaboradores (2008), demonstraram que os eosinófilos são células importantes para o desenvolvimento da fibrose. Moradores de área endêmica que exibiam uma forma mais grave da doença, apresentando fibrose periportal, apresentaram um aumento de moléculas de ativação recente em eosinófilos (CD69) e maiores níveis de TNF- α , IL-4 e IL-5, produzidos por estas células, sobre estímulo de SEA, em relação aos indivíduos com a forma menos grave da doença (Silveira-Lemos et al., 2008). Estes achados corroboram com outros estudos os quais apontam a importância das citocinas do tipo 2 para a formação da fibrose. Foi demonstrado que pacientes com fibrose grave exibiam altos níveis de TNF- α , IL-5, IL-10 e IL-13, enquanto pacientes que apresentam pouca fibrose produziam maiores níveis de IFN- γ . (Henri, et al., 2002; de Jesus et al, 2004). Também já foi demonstrado o papel dos monócitos em pacientes com quadro grave de fibrose. Nesses indivíduos, os monócitos apresentavam níveis significativos de IL-6, TNF- α e TGF- β , citocinas pro-fibróticas (Fernandes et al., 2014).

No curso da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, indivíduos infectados apresentam duas fases distintas da doença: a fase aguda e a fase crônica, as quais diferem entre si em relação às características clínicas e imunológicas. A fase aguda representa o primeiro estágio da doença que pode ser caracterizada por mal-estar, febre, tosse, emagrecimento, dor abdominal, diarreia, eosinofilia e aumento na produção das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α (de Jesus, et al., 2002), porém, em indivíduos residentes em áreas endêmicas esta fase não se manifesta. Uma das razões para a ausência desta fase pode estar associada ao fato de os indivíduos moradores destas regiões serem sensibilizados pelo *Schistosoma* ainda no útero materno através da transferência materna de antígenos solúveis e de anticorpos específicos anti-idiotípicos, pela placenta. Essa transferência de antígenos pode levar os recém-nascidos à montarem uma resposta contra o parasito antes mesmo de serem infectados com produção de IgE e IgG específicos e de citocinas, tais como, IL-10, IL-5 e IFN- γ (Carlier et al, 1980; Eloi-Santos et al., 1989; Malhotra et al., 1997; King et al., 1998), e por isso, podem se mostrar menos susceptíveis ao desenvolvimento do quadro inflamatório, característico da fase aguda da doença.

Na fase crônica, distintas manifestações clínicas podem se desenvolver, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. Na maioria dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas, a doença se apresenta assintomática, sendo esta considerada a forma intestinal da doença. A mesma se caracteriza pelo aparecimento de episódios de fraqueza, fadiga, dor

abdominal e diarreia. Uma pequena percentagem da população, porém, desenvolve formas clínicas mais graves da doença, as quais são denominadas como hepatointestinais ou hepatoesplênicas. Os indivíduos portadores destas formas clínicas mais graves apresentam hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia, variados graus de fibrose periportal, hipertensão portal e consequente desenvolvimento de varizes esofágicas (Prata e Bina, 1968). Porém, devido aos programas de controle para a doença, estas formas estão cada vez mais raras (Coura e Amaral, 2004).

Fatores que determinam o aparecimento das diferentes manifestações clínicas ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que a intensidade da infecção está diretamente relacionada ao aparecimento de formas clínicas mais graves da doença, sendo que uma elevada carga parasitária pode favorecer o desenvolvimento da forma hepatoesplênica da doença (Bina e Prata, 2003). Porém, a intensidade da infecção não é o único fator responsável por determinar a gravidade da doença, já que em áreas hiperendêmicas a percentagem de indivíduos com formas graves é pequena (Bina e Prata, 2003).

As diferentes manifestações clínicas também podem estar relacionadas a um perfil de resposta diversificado. Pacientes com as formas mais graves da doença apresentam um perfil de citocinas diferente do encontrado nos indivíduos com a forma intestinal, sendo a IL-10 uma citocina fundamental na regulação da resposta em indivíduos que apresentam a forma menos grave da doença (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Corrêa-Oliveira et al., 1998; Falcão et al., 1998).

Araújo e colaboradores (1996) demonstraram que em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de moradores de áreas endêmicas infectados, quando adicionada a citocina IL-10, houve supressão da proliferação de linfócitos e da produção de IFN- γ , em resposta ao SWAP, indicando o papel regulador da IL-10. Mais tarde, Malaquias e colaboradores (1997), demonstraram que, em cultura, o bloqueio da ação da IL-10, com anticorpos monoclonais, aumentou a resposta proliferativa de PBMC de pacientes infectados crônicos intestinais, sugerindo a importância dessa citocina em modular a resposta tipo 2 em pacientes crônicos assintomáticos (Malaquias et al., 1997). Em outro estudo, realizado pelo mesmo grupo, foi avaliado o papel da IL-10 na formação do granuloma *in vitro* utilizando PBMC, de pacientes de diferentes formas clínicas, incubadas com *beads* recobertas por SEA. Os resultados demonstraram que a adição de anticorpo monoclonal anti-IL-10 na cultura de PBMC de indivíduos agudos não resultou em alteração significativa do tamanho do granuloma, porém, na cultura de PBMC de indivíduos com a forma crônica intestinal, houve um aumento do tamanho do granuloma, demonstrando que a citocina IL-10 tem importante

papel no controle da morbidade da doença (Falcão et al., 1998). Em 2008, Teixeira-Carvalho e colaboradores, demonstraram a importância das células TCD4⁺ e TCD8⁺ no controle da morbidade da doença, as quais representaram a principal fonte de IL-10 em pacientes com a forma intestinal da doença.

Um fato interessante que pode auxiliar na busca pela compreensão da imunidade protetora contra a esquistossomose é a presença de indivíduos naturalmente resistentes à infecção pelo parasito que, mesmo estando expostos ao *S. mansoni* durante toda a vida, persistem com um diagnóstico negativo para a doença (Corrêa-Oliveira et al., 1989). Esses indivíduos possuem uma significativa resposta proliferativa em resposta a antígenos do ovo e de verme, produzindo altos níveis de IFN- γ , de anticorpos contra paramiosina, e de IgG1 e IgG3 contra tetraspanina 2 (TSP-2), Sm14 e Sm29 (Corrêa-Oliveira et al., 1989; Corrêa-Oliveira et al., 1998; Tran et al., 2006; Brito et al., 2000; Cardoso et al., 2006a).

A resistência contra a infecção por *S. mansoni* também foi relatada em indivíduos após o tratamento. Já foi documentado que o tratamento de indivíduos infectados promove um aumento na produção de citocinas Th2 em resposta de antígenos do verme (Joseph et al., 2004; Walter et al., 2006), mesmo tipo de resposta relacionada à resistência à reinfeção (Roberts et al., 1993; Caldas et al., 2008). Diversos trabalhos demonstram que a resposta imunológica de indivíduos resistentes à reinfeção está relacionada aos altos níveis de IgE, específicos para o verme, principalmente para a proteína Sm22.6, e baixos níveis de IgG4 contra antígenos do ovo e do tegumento de esquistossômulo (Caldas et al., 2008; Pinot de Moira et al., 2010; Dunne et al., 1992).

1.5 Vacinas para a Esquistossomose

Baseado na necessidade de se implementar um método mais efetivo para o controle da esquistossomose, a ideia do desenvolvimento de uma vacina contra a doença é o objeto de estudo de vários grupos no âmbito científico. Quando imunizados, os moradores de áreas endêmicas poderiam adquirir uma proteção parcial contra as frequentes reinfeções, que associado à quimioterapia, provocaria a diminuição da carga parasitária, da patologia e das taxas de transmissão da doença.

Dessa forma, vários antígenos do parasita têm sido estudados como possíveis candidatos para o desenvolvimento de vacinas, porém, a grande habilidade do parasita em evadir o sistema imune do hospedeiro e seu complexo ciclo de vida dificulta este processo. Já que o parasito não se replica dentro do hospedeiro definitivo, uma vacina que possibilitasse a

redução da morbidade da doença se mostra interessante. Segundo o Steering Committee on Vaccine Discovery, da Organização Mundial de Saúde, o desenvolvimento de uma vacina que induzisse, pelo menos, 50% de resistência à reinfecção após o tratamento de populações susceptíveis já seria efetivo para o controle da transmissão (Siddiqui et al., 2008).

Por representarem a interface entre o *S. mansoni* e o sistema imunológico de seu hospedeiro, o tegumento do parasito representa uma importante estrutura a ser explorada na finalidade de encontrar alvos para vacina. Neste contexto, o tegumento do esquistossômulo representa um importante objeto de estudo já que este é considerado o estágio de vida mais susceptível ao ataque do sistema imune do hospedeiro (Gobert et al., 2007). Trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que o tegumento do esquistossômulo (Smteg), utilizado em protocolos vacinais coadministrado com o adjuvante de Freund, induz uma redução de 43 a 48% no número de vermes, 59 a 60% no número de ovos eliminados nas fezes e de 65% no número de ovos no fígado induzindo uma resposta imunoprotetora do tipo 1, com produção de IFN- γ (Teixeira de Melo et al, 2010). A imunização com Smteg também foi testada utilizando ALUM associado ao CPG-ODN como adjuvante o que resultou num percentual de redução na carga parasitária de 43% e de 55% no número de ovos eliminados nas fezes (Teixeira de Melo et al., 2013).

Como exemplo de proteínas de tegumento de *S. mansoni*, as tetraspaninas (TSP) são proteínas integrais de membrana encontradas em abundância no tegumento do verme (Braschi e Wilson, 2006), e que já foram estudadas quanto ao seu potencial imunoprotetor em protocolo experimental. Camundongos imunizados com o plasmídeo pcDNA contendo o gene da tetraspanina Sm23 apresentaram um percentual de proteção de 21 a 44% com altos níveis de produção das imunoglobulinas IgG2a e IgG1 (Da'Dara et al., 2001). Outras duas tetraspaninas, TSP-1 e TSP-2, foram estudadas em protocolos vacinais, em que foram utilizadas na forma recombinante. A média da redução do número de vermes de dois ensaios independentes foi de 34% para TSP-1 e 57% para TSP-2. Além disso, também houve redução significativa no número de ovos presente no fígado (52% TSP-1 e 64% TSP-2) e nas fezes (69% TSP-1 e 65% TSP-2) de animais imunizados (Tran et al., 2006). De modo particular, a TSP-2, por ser reconhecida por anticorpos IgG1 e IgG3 de indivíduos naturalmente resistentes à infecção, se mostra promissora (Tran et al., 2006). A TSP-2 também foi testada em formulações vacinais contendo Alum/CpG como adjuvante e resultou num nível de proteção de 25-27% (Pearson et al., 2012). A imunização de camundongos com a proteína quimérica contendo TSP-2 e a região 5B da protease aspártica dos vermes de *Necator americanus*, Na-APR-1, juntamente com Alum/CpG conferiu uma proteção ainda maior, de 54 a 58% (Pearson

et al., 2012). Recentemente, novos métodos de desenvolvimento da proteína recombinante TSP-2 foram descritos, os quais permitem sua produção em larga escala, a fim de ser utilizada em estudos clínicos de fase 1 (Curti et al., 2013).

Outra importante proteína, localizada no tegumento do parasito, que demonstrou ter um potencial imunoprotetor é a protease da família das calpains. A subunidade da calpaina de 78kDa quando administrada na forma recombinante, em camundongos, promoveu uma redução de 29 a 39% na carga parasitária (Hota-Mitchell et al., 1997). Mais tarde, a Sm-p80 foi testada em protocolo experimental na forma de vacina de DNA apresentando 39% de proteção (Siddiqui et al., 2003). Quando coadministrada com IL-12 ou administrada com plasmídeo carreando o gene da citocina, os níveis de proteção subiam para 45% e 57%, respectivamente (Siddiqui et al., 2003). Mais tarde, um trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2010), demonstrou que a Sm-p80 na forma de vacina de DNA, utilizando um vetor apropriado para humanos (VR1020) conferiu uma redução de 46% na carga parasitária e de 28% no número de ovos em babuínos, com produção significativa de IFN- γ e anticorpos IgG específicos para a proteína. Quando a Smp80 foi utilizada em protocolo de imunização sob a forma de proteína recombinante ou sob regime de imunização de “prime-boost” (no qual os animais são imunizados com vacina de DNA, contendo o gene para Smp80, e posteriormente, recebem reforços da vacina sob a forma de proteína recombinante), os animais apresentaram uma redução de 51% e 49% de redução de vermes, respectivamente (Ahmad et al., 2010). Um estudo realizado por Torben e colaboradores (2012), demonstrou que a ADCC é um mecanismo importante na eliminação de esquistossômulos em camundongos vacinados com a Sm-p80.

Baseado na premissa de que o Praziquantel (PZQ) atua de maneira sinérgica com o sistema imune do hospedeiro para a eliminação do parasito (Brindley e Sher, 1987), uma proteína de membrana ancorada por GPI de 200kDa, também conhecida como ECL ou Sm200 (Sauma e Strand, 1990), a qual já foi associada à eficácia do tratamento com PZQ (já que anticorpos anti-Sm200 puderam restaurar a eficácia do tratamento em camundongos *knockout* para células B) foi estudada em protocolo vacinal. Camundongos imunizados com a Sm200 na forma de vacina de DNA apresentaram um percentual de proteção 38% (Nascimento et al., 2007). Neste mesmo contexto, um estudo realizado por Rofatto e colaboradores (2013), demonstraram que as proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos: fosfatase alcalina (SmAP), fosfodiesterase (SmNPP-5) e difosfohidrolase (SmNTPDase), presentes no tegumento do parasito, em associação com doses subcurativas de PZQ, foram capazes de promover uma redução de 41 a 46% no número de vermes, sendo que a SmAP apresentou um

papel fundamental nesta redução, induzindo, em associação com o fármaco, uma redução de 41% dos vermes.

Reconhecida como uma enzima glutathione S-transferase (Taylor et al., 1988), a Sm28GST foi identificada no tegumento, parênquima e órgãos genitais de esquistossômulos e vermes adultos (Balloul et al., 1987; Liu et al., 1996). Quando utilizada na forma de vacina recombinante foi capaz de induzir uma redução de até 70% da carga parasitária em ratos e camundongos imunizados e infectados, sendo que a produção de IgG2a mostrou uma relação importante para a imunoproteção adquirida (Balloul et al., 1987). Um trabalho realizado por Boulanger e colaboradores (1991) reforçou o potencial imunoprotetor da proteína Sm28GST, demonstrando uma proteção de 38% em baboons vacinados com a proteína recombinante administrada juntamente com ALUM. A proteína, juntamente com adjuvante de Freund ou BCG, também foi testada em primatas e resultou numa redução significativa na fecundidade dos vermes (Boulanger et al., 1999). Quando utilizada na forma de vacina de DNA, a imunização de camundongos com *Sm28GST*, associado a um plasmídeo contendo o gene que codifica a citocina IL-18, induz uma proteção de 23%, com uma significativa produção de IFN- γ (Dupré et al., 2001). Uma importante característica da Sm28GST é a existência de reação cruzada com outras espécies de *Schistosoma*, incluindo *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. bovis* (Capron et al., 1987). Já foi demonstrado que a imunização de primatas com Sm28GST na forma recombinante protegeu os animais de uma infecção heteróloga com *Schistosoma haematobium* (Boulanger et al., 1995). Desde 1998, a proteína recombinante Sh28GST associada ao adjuvante ALUM, vem sendo testada na população humana. Resultados parciais dos testes clínicos de fase I foram publicados por Riveau e colaboradores (2012), os quais demonstraram que a imunização não desencadeou efeitos adversos ou tóxicos relevantes. A resposta humoral induzida pela imunização foi caracterizada por altos níveis de IgG1 e IgG3. O perfil celular foi caracterizado pela produção significativa de citocinas do tipo 2, com altos níveis de IL-5 e IL-13.

A proteína ligadora de ácidos graxos, Sm14, expressa no tegumento e intestino do parasito nas fases de cercária, esquistossômulo, vermes adultos e ovo (Brito et al., 2002), foi testada em protocolos vacinais primeiramente por Tendler e colaboradores em 1996. Nesse trabalho, a Sm14 foi administrada na forma de vacina recombinante sendo capaz de induzir uma proteção em camundongos de até 67,9%, quando administrada sem adjuvante, e de até 64% quando administrada com adjuvante de Freund (Tendler et al., 1996). A imunização com a proteína também foi capaz de proteger os animais contra a infecção por *Fasciola hepatica*, demonstrando que a Sm14 pode ser efetiva no controle de ambas doenças (Tendler et al.,

1996). Num trabalho realizado por Fonseca e colaboradores (2004), foi possível observar que a imunização com a proteína Sm14r administrada com a citocina IL-12, como adjuvante, foi capaz de induzir uma proteção de 42,2%, sendo a resposta imune protetora associada à uma resposta do tipo 1, com produção de IFN- γ e TNF- α (Fonseca et al., 2004). A vacinação de animais utilizando o gene *Sm14* como estratégia de imunização também foi capaz de desencadear um nível de proteção de 41% (Fonseca et al., 2006). Outros diversos trabalhos demonstraram o potencial imunoprotetor da proteína, utilizando a Sm14 como proteína recombinante ou na forma de vacina de DNA, administrada com diferentes adjuvantes (Ramos et al., 2001; Varaldo et al., 2004; Pacheco et al., 2005; Garcia et al., 2008). A Sm14 se encontra na fase de testes clínicos, porém, ainda não foram divulgados resultados oficiais.

Dentre as proteínas do tegumento do *S. mansoni* que merecem destaque como candidatas vacinais também podemos citar a Sm22.6 e a Sm29 pois ambas apresentam uma importante relação com resistência à infecção e/ou reinfecção em residentes de área endêmica.

1.5.1 Sm22.6

Baseado no fato de que após o tratamento, um percentual de indivíduos apresentava resistência às novas infecções, Dunne e colaboradores (1992), realizaram uma investigação sorológica de moradores de área endêmica, antes e após tratamento, a fim de relacionar o perfil sorológico com a resistência à reinfecção. O trabalho demonstrou que havia uma correlação positiva entre níveis de IgE e resistência à reinfecção, sendo que a maioria da imunoglobulina produzida seria específica para uma proteína de 22kDa. Mais tarde, Webster e colaboradores (1996), confirmaram a relação entre os níveis de IgE anti-Sm22 e resistência à reinfecção, utilizando proteína recombinante. Analisando a proteína recombinante produzida, os autores demonstraram ser idêntica à proteína recombinante já descrita por Stein e David (1986) e Jeffs e colaboradores (1991), identificada como rSm22.6. Esses trabalhos também demonstraram que a Sm22.6 seria uma proteína presente na membrana do parasito.

Avaliando o perfil imunológico de indivíduos resistentes e infectados pelo *S. mansoni*, Oliveira e colaboradores (2012) demonstraram que a resistência também está relacionada com baixos níveis de IgG4 anti-Sm22.6 e não somente com a produção de IgE, já que não houve diferença dos níveis de IgE entre indivíduos infectados e resistentes. A importância da correlação IgE/IgG4 num quadro de resistência já foi explicitado em outros trabalhos (Khalife et al., 1989; Caldas et al., 2000).

A Sm22.6 também já foi descrita como sendo uma proteína que apresenta estrutura similar ao grupo de antígenos caracterizados como alérgenos: os alérgenos EF-hand, e por isso, também tem sido denominada como SmTAL-1 (Tegument-Allergen-Like-1) (Santiago et al., 1998; Fitzsimmons et al., 2007; Pinot de Moira et al., 2010; Fitzsimmons et al., 2012; Pinot de Moira et al., 2013a; Pinot de Moira et al., 2013b). Fitzsimmons e colaboradores (2007 e 2012) observaram que indivíduos moradores de áreas endêmicas, apresentavam um aumento dos níveis de anticorpos específicos para Sm22.6 e outras proteínas do parasito também caracterizadas como alérgenos “like”, após o tratamento, o que pode estar relacionado ao aumento da exposição dessas proteínas, após a morte do verme. Além disso, foi possível observar que o mRNA de SmTAL-1 está presente desde a fase de ovo, porém em baixíssimos níveis. O transcrito só aumenta de maneira considerável em esquistossômulos com 24 horas após transformação, sendo que estes níveis permanecem altos nos vermes adultos (Fitzsimmons et al., 2012).

Estudos utilizando a proteína Sm22.6 em protocolos de imunização demonstraram que a vacinação de camundongos com a proteína recombinante, juntamente com o adjuvante de Freund, conferiu uma proteção de 34,5%, induzindo uma resposta mista Th1/Th2 (Pacífico et al., 2006a). Porém, quando a rSm22.6 foi utilizada sem adjuvante ou juntamente com o hidróxido de alumínio (Alum), adjuvante largamente utilizado em vacinas humanas, não houve indução de imunidade protetora (Pacífico et al., 2006b).

1.5.2 Sm29

A proteína Sm29 está associada tanto à resistência à infecção quanto à reinfeção. Através de estudos *in silico* foi possível caracterizar a Sm29 como sendo uma proteína de, aproximadamente, 18 kDa, que contém 192 resíduos de aminoácidos, apresentando um peptídeo sinal (26 aminoácidos), três sítios de glicosilação e uma região transmembrana, sugerindo que a Sm29 seja uma proteína de tegumento (Cardoso et al., 2006a; Cardoso et al., 2006b). Utilizando uma biblioteca de cDNA foi possível identificar que o transcrito da Sm29 está presente nas fases de verme adulto e esquistossômulo de fase pulmonar, porém ausente nas fases de ovo e cercária. Após a produção de Sm29 recombinante, contendo uma cauda de histidina e um fragmento da Sm29 (40-169), foi possível confirmar, através de análises de imunolocalização (utilizando soro de camundongos imunizados com Sm29r) que a Sm29 está expressa no tegumento de verme adulto e esquistossômulos. Estudos de análises proteômicas e de tratamento enzimático do tegumento confirmaram a presença da Sm29 no tegumento do

verme (Braschi et al., 2011; Castro-Borges et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que soro de indivíduos resistentes à infecção e reinfeção pelo parasita, produzem altos níveis de IgG1 e IgG3 em resposta à esta proteína, fato interessante já que estas subclasses estariam relacionadas à eliminação do parasita por citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), e ativação da via clássica do complemento (Cardoso et al., 2006a).

Um estudo realizado por Cardoso e colaboradores (Cardoso et al., 2008) testou o potencial de proteção da proteína Sm29 contra a infecção pelo *S. mansoni* em camundongos. O estudo demonstrou que quando os camundongos eram imunizados com a proteína rSm29 houve uma redução de 51% no número de vermes adultos, 60% de ovos no intestino e de 50% do número de granulomas, quando comparado ao grupo controle. Além disso, a imunização induziu a formação de uma resposta Th1, com produção de altos níveis de IFN- γ .

A proteína Sm29 também foi testada em associação com a SmTSP-2, na forma de proteína recombinante quimérica, com o objetivo de potencializar a eficácia obtida na imunização com os antígenos isolados. A imunização com a proteína quimérica, formulada com o adjuvante Alum/CpG, resultou numa significativa redução da carga parasitária (27,8-34,8%) e da área do granuloma, após a infecção pelo *S. mansoni*. Essa proteção foi associada a elevados níveis de IgG1 e IgG2a específicos e um perfil de resposta Th1, com significativa produção de IFN- γ e TNF- α (Pinheiro et al., 2014). Nesse trabalho também foi avaliada a imunização dos animais com a proteína Sm29r formulada com CpG+Alum, o que resultou numa proteção de 20,36% e numa produção de níveis significativos de IgG, IgG1 e IgG2a, específicos, e da citocina IFN- γ (Pinheiro et al., 2014).

Outra construção de proteína quimérica, combinando os antígenos Sm29 e Sm14, também foi testada em protocolo de imunização juntamente com o adjuvante poly(I:C). A imunização induziu uma redução significativa da carga parasitária (40,3%), do número de ovos presentes no fígado (68,2%) e intestino (57,9%), e no número e tamanho dos granulomas. Níveis significativos de IgG1 foram associados à imunização (Ewaisha et al., 2014).

1.6 Adjuvantes

O termo “adjuvante” vem do latim “*adjuvare*”, que significa “ajudar” (Gupta e Siber, 1995). É nesse sentido que o adjuvante atua quando utilizado em formulações vacinais, aprimorando a resposta imune contra os antígenos vacinais de diversas maneiras. Nesse contexto, o adjuvante pode aumentar a imunogenicidade de antígenos pouco imunogênicos

(vacinas de subunidade), aumentar a velocidade e a duração da resposta imune, aumentar a avidéz e especificidade de anticorpos, promover a indução da imunidade de mucosa, aumentar a resposta imune de indivíduos imunologicamente imaturos ou senescentes, ou reduzir a quantidade de antígeno utilizada (diminuindo custos) (Singh e Srivastava, 2003).

O tipo de antígeno, a via de administração e as possíveis reações adversas (Petrovsk e Aguilar, 2004), são fatores importantes a serem considerados para a escolha correta de um adjuvante, o que é fundamental para o sucesso da imunização. Além disso, outro fator de grande relevância é o tipo de resposta imune que o adjuvante, a ser escolhido, induz, o que pode definir se a vacinação será ou não protetora. Assim, um antígeno considerado protetor, quando administrado com certo tipo de adjuvante, pode deixar de proteger, se associado a outro adjuvante que desencadeie uma resposta imune diferente.

Os adjuvantes vêm sendo utilizados desde a década de 1920, quando Gaston Ramon observou que cavalos que desenvolviam abscesso no local da inoculação da vacina de toxóide diftérico geravam títulos mais altos de anticorpo (Ramon, 1925). Mais tarde, Ramon observou que a resposta imune também foi potencializada pela vacinação com o toxóide associado a outras substâncias, tais como, saponina (Ramon, 1926). Desde então, vários adjuvantes têm sido testados em ensaios pré-clínicos. Porém, uma característica fundamental a ser considerada para um bom adjuvante é o fato de não ser tóxico ou não apresentar reações adversas significativas. Essas, quando presentes, limitam o uso de certos adjuvantes. As reações podem ser consideradas como locais (dor, inflamação, inchaço, necrose, formação de granuloma, úlceras ou abscessos), ou sistêmicas (náusea, febre, alergia, eosinofilia e toxicidade em órgãos específicos) (Petrovsk e Aguilar, 2004). Neste contexto, apesar de vários adjuvantes serem testados em ensaios pré-clínicos, muitos apresentam reações adversas consideráveis e, por isso, poucos são licenciados para o uso em seres humanos.

1.6.1 Hidróxido de Alumínio - ALUM

O Alum, ou Hidróxido de Alumínio, é o adjuvante mais utilizado em vacinas humanas e veterinárias, sendo o primeiro adjuvante a ser liberado para o uso em humanos (Gupta e Siber, 1995; Tagliabue e Rappuoli, 2008), sendo bem conhecido por induzir uma produção significativa de IL-4, desencadeando uma resposta Th2 e contribuindo para uma imunidade humoral (Audibert e Lise, 1993; Ulanova et al., 2001).

Um dos primeiros mecanismos de ação descrito para o Alum seria um efeito resultante da formação de depósitos de Alum+antígeno no local da inoculação permitindo uma lenta

liberação do antígeno, o que prolongaria a interação entre o antígeno e as células do sistema imune (Gupta, 1998). Porém, estudos realizados por Hutchison e colaboradores (2012), demonstraram que a formação deste depósito não estaria relacionada ao efeito adjuvante de Alum, já que, em camundongos, a remoção cirúrgica do depósito de Alum, antes mesmo de duas horas após a inoculação, não afetou a resposta T e B antígeno-específica.

Na tentativa de elucidar os fatores associados à imunoestimulação desencadeada por Alum, Kool e colaboradores (2008a), demonstraram que o adjuvante é capaz de induzir a ativação de inflamassoma NALP3 em macrófagos e células dendríticas, de camundongos, permitindo a produção de IL-1 β . O trabalho ainda demonstrou que camundongos deficientes em NLRP3 houve uma diminuição no recrutamento de células inflamatórias para o local da inoculação, além de haver uma diminuição na secreção de IL-1 β .

Já foi demonstrado que o reconhecimento do Alum por células dendríticas não é mediado por receptores, mas que os lipídios da própria membrana plasmática se ligam ao Alum, o que induz a via de sinalização dependente de Syk e PI3K (Flach et al., 2011). A ativação da via PI3 quinase inibe a secreção de IL-12 por células dendríticas, o que pode explicar a limitada capacidade do Alum em induzir uma resposta Th1 (Mori et al., 2012).

O Alum ainda é capaz de promover a necrose de células no local de sua inoculação, através da ruptura do lisossomo pela catepsina B (Jacobson et al., 2013), promovendo a liberação de ácido úrico e DNA de dupla fita (Kool et al., 2008b; Marichal et al., 2011). A presença de DNA da célula no meio extracelular estimula a produção de IgE e IgG1 (Marichal et al., 2011). Além disso, a presença de DNA é importante para a interação de células T com as células dendríticas, já que a adição de DNase diminui o número de células TCD4 e de IgG1 antígeno específicos (McKee et al., 2013). A liberação de ácido úrico é observada após a injeção de Alum, sendo que a resposta de células T específicas é prevenida pela adição de uricase. Monócitos e células dendríticas, na presença de ácido úrico, têm um importante papel na ativação destas células T específicas (Kool et al., 2008b).

Geralmente, o Alum é um adjuvante bem tolerado, porém, algumas limitações de seu uso já foram descritas. A indução de altos níveis de IgE podem permitir o aparecimento de alergias (Gupta, 1998). Em indivíduos que tenham a função renal comprometida o uso do adjuvante pode promover o acúmulo do metal no organismo, o que é extremamente tóxico (Petrovsk e Aguilar, 2004).

1.6.2 Adjuvante de Freund

O adjuvante completo de Freund (CFA) foi descoberto por Jules Freund, em 1937, quando observou que a imunização de cobaias com uma mistura de óleo mineral e *Mycobacterium tuberculosis* morto foi capaz de induzir a produção de altos níveis de anticorpos (Gupta e Siber, 1995). Uma variação deste adjuvante é o chamado Adjuvante Incompleto de Freund (IFA), o qual não apresenta o *Mycobacterium tuberculosis* em sua composição.

Apesar de representar um potente indutor da resposta imune Th1, o adjuvante de Freund apresenta uma resposta inflamatória intensa, que pode desencadear o aparecimento de vários efeitos colaterais, tais como, formação de granuloma, necrose e ulceração, no local da inoculação, atrofia muscular e até mesmo pneumonia embólica (Broderon, 1989; Shibaki e Katz, 2002). Por esta razão, o CFA não é permitido para o uso em humanos, sendo empregado estritamente na pesquisa científica. O IFA, no entanto, não induz reações adversas tão intensas, e por isso, tem sido utilizado em vacinas veterinárias e humanas (Jensen et al., 1998).

Em relação aos mecanismos de indução da resposta imune, o adjuvante completo de Freund pode promover a ativação do inflamassoma, causando a liberação de IL-1 β através de um processo dependente de NLRP3. (Shenderov et al., 2010). Também já foi demonstrado que o peptídeoglicano, que é derivado de micobactéria, estimula o receptor NOD1 para primar células T antígeno-específicas e induzir produção de anticorpos o que, juntamente com a ativação dos receptores do tipo Toll, pode desencadear uma resposta mista Th1/Th2/Th17 (Fritz et al., 2007).

Ao observar a resposta imune desencadeada por micobactérias, componente fundamental do CFA, vários trabalhos relatam a indução de uma resposta Th1 caracterizada, principalmente, pela produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 por fagócitos mononucleares, células dendríticas, células NK e linfócitos TCD4 (Billiau e Matthys, 2001).

Ainda não estão claros os mecanismos de ativação da resposta relacionados ao adjuvante incompleto de Freund. Sabe-se que seu efeito pode estar associado a uma liberação lenta do antígeno por um longo tempo, visto que, no local da inoculação, o período de meia-vida de um antígeno pode chegar até 90 dias (Herbert, 1968).

1.6.3 Monofosfolipídeo A – MPL

O MPL, monofosforil lipídeo A, é um adjuvante extremamente promissor, o qual é derivado do lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria Gram-negativa *Salmonella minnesota*, R595 (Ulrich e Myers, 1995). Este adjuvante conserva o poder adjuvante do LPS, porém, sem apresentar os efeitos adversos do mesmo.

Em camundongos, o MPL permite que as células B e de macrófagos potencializem a capacidade de apresentarem antígenos, promovendo a proliferação das células T e induzindo a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-5 por essas células, *in vitro* (De Becker et al., 2000). *In vivo*, o MPL, induz a migração e maturação das células dendríticas (De Becker et al., 2000). Um trabalho, utilizando células dendríticas e linfócitos T de humanos, demonstrou que o MPL é capaz de: induzir a via de sinalização das MAP quinases pela ativação ERK1/2 e p38; induzir a ativação do fator de transcrição NF- κ B (via TLR); ativar a maturação de células dendríticas através da indução da expressão das moléculas HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83; e induzir o aumento da expressão de CD40L em células T, através de seus receptores TLR (Ismaili et al., 2002). Corroborando com achados anteriores, um estudo realizado por Martin e colaboradores (2003), demonstrou que o MPL ativa monócitos humanos através de TLR2 e TLR4, estimulando a expressão das moléculas CD80 e CD86 e a produção das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12. Além disso, o MPL induz a via de sinalização das MAP quinases pela ativação de ERK1/2 (via TLR2 e TLR4) e p38 (via TLR4), e permite a ativação do fator de transcrição NF- κ B via TLR2 e TLR4 (Martin et al., 2003).

Uma característica interessante do MPL é o fato de não induzir ativação da Caspase-1 (Okemoto et al., 2006). A Casase-1 é uma enzima responsável por clivar os precursores das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Apesar de o adjuvante ser capaz de estimular significativamente a produção da precursora pró-IL-1 β em macrófagos, essas células não são capazes de secretar a IL-1 β madura (Okemoto et al., 2006). Essa característica pode justificar a redução na toxicidade do MPL em relação ao LPS. Além disso, a descoberta de que o MPL tem seu mecanismo de ação associado à ativação do receptor TLR4 através do recrutamento do adaptador TRIF, e não de MyD88 (que é responsável por vários efeitos pró-inflamatórios), também pode explicar o efeito menos tóxico do adjuvante (Mata-Haro et al., 2007). Mais tarde, Embry e colaboradores (2011) demonstraram que a ativação de TLR4, mediada por TRIF, não é capaz de ativar a caspase-1, já que o MPL induz fracamente NLRP3, que depende de MyD88, diminuindo a ativação do inflamassoma e, conseqüentemente, da caspase1.

Em humanos, o MPL vem sendo utilizado na composição dos Sistemas Adjuvantes AS02, AS03 e AS04, os quais estão presentes nas vacinas para hepatite, papiloma vírus, herpes, malária, leishmaniose, dentre outras. (Tagliabue e Rappuoli, 2008; O'Hagan e De Gregorio, 2009; McKee, et al., 2010). Além disso, o adjuvante tem sido usado em vacinas para câncer e alergia, com perfil aceitável de efeitos adversos (Singh e Srivastava, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de existirem vários antígenos candidatos a compor uma vacina para a esquistossomose, a capacidade dos mesmos de induzirem proteção tem sido avaliada apenas em camundongos em resposta à infecção, sendo, geralmente, o perfil de resposta Th1 associado à proteção, o que nos leva a questionar se estes antígenos seriam realmente protetores em moradores de áreas endêmicas para a esquistossomose, população alvo da vacina. Pelo fato de sofrerem diversas infecções ao longo da vida e de serem sensibilizados por antígenos do parasita ainda no útero, moradores de áreas endêmicas apresentam um perfil imunológico distinto (Joseph et al., 2004; Walter et. al., 2006; Eloi-Santos et al., 1989). Seria, portanto, interessante realizar estudos destinados ao desenvolvimento de vacinas em modelos experimentais os quais já tenham tido contato com o parasita, através de uma primoinfecção. Um trabalho realizado por Tawfik e Colley (1986) utilizando a imunização com cercárias irradiadas em camundongos previamente infectados e tratados, demonstrou uma boa indução de resistência à reinfecção, fato que demonstra a possibilidade de bons resultados em outros estudos de imunoterapia utilizando camundongos primoinfectados.

Neste sentido, as proteínas Sm22.6 e Sm29, as quais estão relacionadas à resistência à infecção/reinfecção e que já demonstraram serem capazes de promover imunidade protetora contra o *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 naive (sem prévia infecção/tratamento), seriam proteínas interessantes para serem avaliadas em modelos experimentais previamente infectados e tratados. A escolha das duas proteínas para serem avaliadas em ensaios com camundongos primoinfectados se justifica por desencadearem perfis imunológicos distintos em formulações vacinais protetoras. Enquanto a imunidade protetora induzida pelo Sm29r tem sido associada a um perfil Th1, a imunidade induzida pela Sm22.6r tem sido associada a um perfil misto Th1/Th2.

Além disso, testar essas proteínas formuladas com diferentes adjuvantes também seria outro fator importante. Os adjuvantes MPL e Alum além de apresentarem a vantagem de serem licenciados para o uso em humanos, também estão relacionados a perfis imunológicos distintos. Enquanto o Alum induz uma resposta Th2, o MPL desencadeia uma resposta Th1.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Testar a capacidade das proteínas recombinantes, Sm22.6 e Sm29 de *Schistosoma mansoni*, de induzirem imunidade protetora, em ensaios pré-clínicos em camundongos BALB/c naïve e infectados/tratados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da imunização com as proteínas recombinantes Sm22.6 ou Sm29 associadas ao adjuvante de Freund em camundongos da linhagem BALB/c naïve (sem prévia infecção e tratamento), através da determinação do número de vermes recuperados por perfusão e do número de ovos presentes no fígado e intestino dos animais.
2. Estabelecer o protocolo de imunização para os antígenos recombinantes Sm22.6r e Sm29r, associados ao adjuvante de Freund, em camundongos BALB/c infectados/tratados, avaliando o número de doses necessárias para induzir proteção, através da determinação do número de vermes recuperados por perfusão e do número de ovos presentes no fígado e intestino dos animais.
3. Avaliar o efeito do uso dos adjuvantes Hidróxido de Alumínio (ALUM) e Monofosforil Lipídio A (MPL) no protocolo de imunização com a proteína Sm29r em camundongos BALB/c infectados/tratados, através da determinação do número de vermes recuperados por perfusão e do número de ovos presentes no fígado e intestino dos animais.
4. Avaliar o perfil de resposta humoral induzido pela imunização com Sm22.6r ou Sm29r em camundongos BALB/c naïve e previamente infectados e tratados através da detecção das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicas.

5. Avaliar o reconhecimento das proteínas Sm22.6 e Sm29 nativas na superfície de esquistossômulos por anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes nos camundongos imunizados
6. Avaliar o perfil de resposta celular induzido pela imunização com Sm22.6r ou Sm29r em camundongos BALB/c naïve e previamente infectados e tratados, determinando a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 em sobrenadante de cultura de esplenócitos através da técnica de CBA (Cytometric Bead Array), e a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 pelas células TCD4⁺ através da marcação intracitoplasmática (camundongos imunizados com Sm29r+ Alum ou MPL)
7. Caracterizar o perfil celular induzido pela imunização com Sm22.6r ou Sm29r em camundongos BALB/c naïve e previamente infectados e tratados, utilizando os marcadores de ativação: CD25, CD69 e CD86, e de memória imunológica: CD127, CD62L e CD27 em linfócitos B, TCD4⁺ e TCD8⁺.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c provenientes do Biotério de Produção (BIOT) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), com aproximadamente, 6 semanas de idade. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação (BIOTEX) do CPqRR.

Os procedimentos deste trabalho os quais necessitaram o uso de camundongos foram licenciados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, sob a licença nº LW-12/12 (Anexo 1).

4.2 Cepa de *Schistosoma mansoni*

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). A mesma foi fornecida pelo Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), onde é mantida por passagem em caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e camundongos *Swiss* ou BALB/c. As cercárias foram obtidas através da exposição de caramujos infectados à luz por 1 a 2 horas, a fim de permitir a liberação das mesmas.

4.3 Clonagem, expressão recombinante e purificação Sm22.6

A clonagem, purificação do plasmídeo e a expressão da proteína Sm22.6 recombinante foram realizadas segundo os procedimentos descritos por Pacífico e colaboradores (2006a). De maneira resumida, o gene *Sm22.6* obtido de uma biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar foi subclonado no vetor de expressão bacteriano pMALc2 (New England Biolabs, Beverly, MA) e transformado em bactérias *Escherichia coli* DH5 α . Tais bactérias foram fornecidas pelo Prof. Dr. Sérgio Costa do Laboratório de Bioquímica e Imunologia da UFMG. A expressão da proteína de fusão composta pela Sm22.6 e pela proteína ligadora de maltose (MBP) foi induzida por 0,6 mM de IPTG, por 3 horas à 37°C sob 200rpm de agitação. Logo após, as bactérias foram centrifugadas a 4000 x g por 20

minutos. O pellet de bactérias foi ressuspenso em 100 mL de tampão salina fosfato (PBS, pH 8,4) contendo 25mg de lizosima, sendo congelado e descongelado por três vezes (-70°C/37°C) para a lise das bactérias. Em seguida, o lisado foi submetido a três ciclos de sonicação de 30 segundos cada (30% de amplitude) e centrifugado a 4000 x g por 20 minutos. O sobrenadante contendo a proteína foi purificado através de cromatografia de afinidade utilizando resina de amilose (New England BioLabs). A proteína retida na resina de amilose foi eluída através da adição de uma solução de PBS contendo 10mM de maltose. Para a confirmação da expressão da proteína, um gel de poliacrilamida a 12% foi realizado com as frações eluídas. A proteína foi dosada utilizando o Kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA).

4.4 Clonagem, expressão recombinante e purificação da proteína Sm29

A clonagem, purificação do plasmídeo e a expressão recombinante da proteína Sm29 foram realizadas segundo os procedimentos descritos por Cardoso e colaboradores (2006a). Resumidamente, o cDNA que codifica a proteína Sm29 foi subclonado no vetor de expressão pET21a (Novagen, Madison, WI, USA) que codifica seis resíduos N-terminal de histidina. A construção foi utilizada para transformar *Escherichia coli* BL21, a qual foi fornecida pelo Prof. Dr. Sérgio Costa do Laboratório de Bioquímica e Imunologia da UFMG. A expressão da proteína da Sm29 foi induzida por 1mM de IPTG, por 4 horas à 37°C sob 170rpm de agitação. Logo após, as bactérias foram centrifugadas (5000 x g por 20 minutos à 4°C) e ressuspenso em tampão de lise (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl, 10mM imidazol). As bactérias foram lisadas através de 4 pulsos de sonicação de 30 segundos (30% de amplitude) com intervalo de 15 segundos entre os pulsos. O lisado de bactéria foi centrifugado (5000 x g por 20 minutos à 4°C) e ressuspenso em tampão desnaturante (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl, 10mM imidazol e 8M uréia). Foi realizado novamente um ciclo de sonicação, como descrito anteriormente, e centrifugado a 5000 x g por 75 minutos a 4°C. A Sm29r foi purificada por cromatografia de afinidade, em coluna de níquel (GE, Healthcare), sob condições desnaturantes, utilizando o equipamento AKTA (GE, Healthcare). Após purificação, a proteína foi dialisada contra solução de tampão PBS (phosphate-buffered saline) a 4°C, over night, para sua renaturação. Para a confirmação da expressão da proteína, um gel de poliacrilamida a 15% foi realizado. A proteína foi dosada utilizando o Kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA).

4.5 Infecção dos animais

A infecção dos camundongos pelo *S. mansoni* foi realizada através da via percutânea. Para tanto, um dia antes da infecção, os camundongos tiveram os pelos da região abdominal removidos com o auxílio de uma gilete. Após a remoção dos pelos, os camundongos foram mantidos em gaiolas sem maravalha, contendo uma grade que os separava do fundo da gaiola onde ficam depositadas as fezes e urina dos mesmos. No momento da infecção, os animais foram anestesiados com uma mistura dos anestésicos Cloridrato de Xilasina (10mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (115mg/Kg), via intraperitoneal, e imobilizados com as patas presas à mesa, com auxílio de esparadrapo. Em seguida, sobre o abdômen de cada animal, foi colocada uma placa de acrílico perfurada no centro onde foi depositado 200µl de uma solução contendo, aproximadamente, 30 cercárias (para a infecção dos animais anterior à imunização-sensibilização), 50 cercárias (para a infecção dos animais após imunização com Sm22.6r) ou 100 cercárias (para a infecção dos animais após imunização com Sm29r) de *S. mansoni* da cepa LE. O número de cercárias utilizadas na infecção dos animais pós-imunização se baseou nos trabalhos anteriores os quais avaliaram as proteínas Sm22.6r e Sm29r em protocolos de imunização utilizando animais da linhagem C57BL/6 naive (Pacífico et al., 2006a; Cardoso et al., 2008). Após o período de 1 hora, foram retirados o esparadrapo e a placa de acrílico, e os camundongos colocados de volta na gaiola sobre a grade de metal, conforme descrito anteriormente. Apenas no dia seguinte os camundongos foram colocados em gaiolas contendo maravalha.

4.6 Tratamento dos animais

Quarenta e cinco dias após a primeira infecção, os animais foram tratados com duas doses de Praziquantel (PZQ) com um intervalo de cinco dias entre elas, na concentração de 800mg/Kg/dose. Para tanto, comprimidos de PZQ foram pesados, macerados e diluídos em água levando-se em conta o cálculo do fator de correção (considerando-se apenas o princípio ativo, excluindo-se o excipiente). A droga foi administrada com auxílio de uma seringa de insulina acoplada a uma agulha especial para gavagem, em aço inox, com 3 cm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro, permitindo que o líquido fosse injetado diretamente no estômago do animal.

4.7 Protocolo de imunização com as proteínas Sm22.6r e Sm29r

4.7.1 Estabelecimento do protocolo de imunização

A fim de estabelecer o número de doses da vacina necessárias para conferir proteção em animais primoinfectados, camundongos BALB/c foram divididos em nove grupos (para cada proteína recombinante). Os grupos foram submetidos a diferentes números de doses da vacina recebida, conforme mostra a tabela abaixo (**Tabela 1**):

Tabela 1 – Grupos experimentais em protocolo de imunização com as proteínas Sm22.6r ou Sm29r

	1 ^a Infecção	Tratamento	Imunização 1 ^a dose	Imunização 2 ^a dose	Imunização 3 ^a dose	2 ^a Infecção
Grupo PBS IT uma dose	+	+	+	-	-	+
Grupo PBS IT duas doses	+	+	+	+	-	+
Grupo PBS IT três doses	+	+	+	+	+	+
Grupo Sm22.6 IT ou Sm29 IT uma dose	+	+	+	-	-	+
Grupo Sm22.6 IT ou Sm29 IT duas doses	+	+	+	+	-	+
Grupo Sm22.6 IT ou Sm29 IT três doses	+	+	+	+	+	+
Grupo controle 1 ^a infecção	+	-	-	-	-	-
Grupo controle tratamento	+	+	-	-	-	-
Grupo controle 2 ^a infecção	-	-	-	-	-	+

IT – infectado/tratado

Quinze dias após o tratamento, os animais receberam a primeira dose da vacina. Os grupos imunizados com Sm22.6r ou Sm29r, receberam 25µg da proteína/animal/dose, sendo o intervalo entre as imunizações, nos grupos que receberam reforço, de quinze dias entre as doses. Na primeira dose, os camundongos foram imunizados juntamente com Adjuvante Completo de Freund (CFA), já nas doses subsequentes, foi utilizado o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA).

A fim de avaliar a eficácia das infecções, dois grupos controles foram utilizados neste protocolo. O primeiro foi infectado juntamente com a primeira infecção dos grupos experimentais e o segundo foi infectado juntamente com a segunda infecção dos grupos experimentais, após as imunizações. Além disso, um grupo controle do tratamento, infectado

e tratado juntamente com os grupos experimentais, foi utilizado para avaliar a eficácia do tratamento realizado.

O esquema a seguir ilustra a estratégia experimental utilizada (Figura 1).

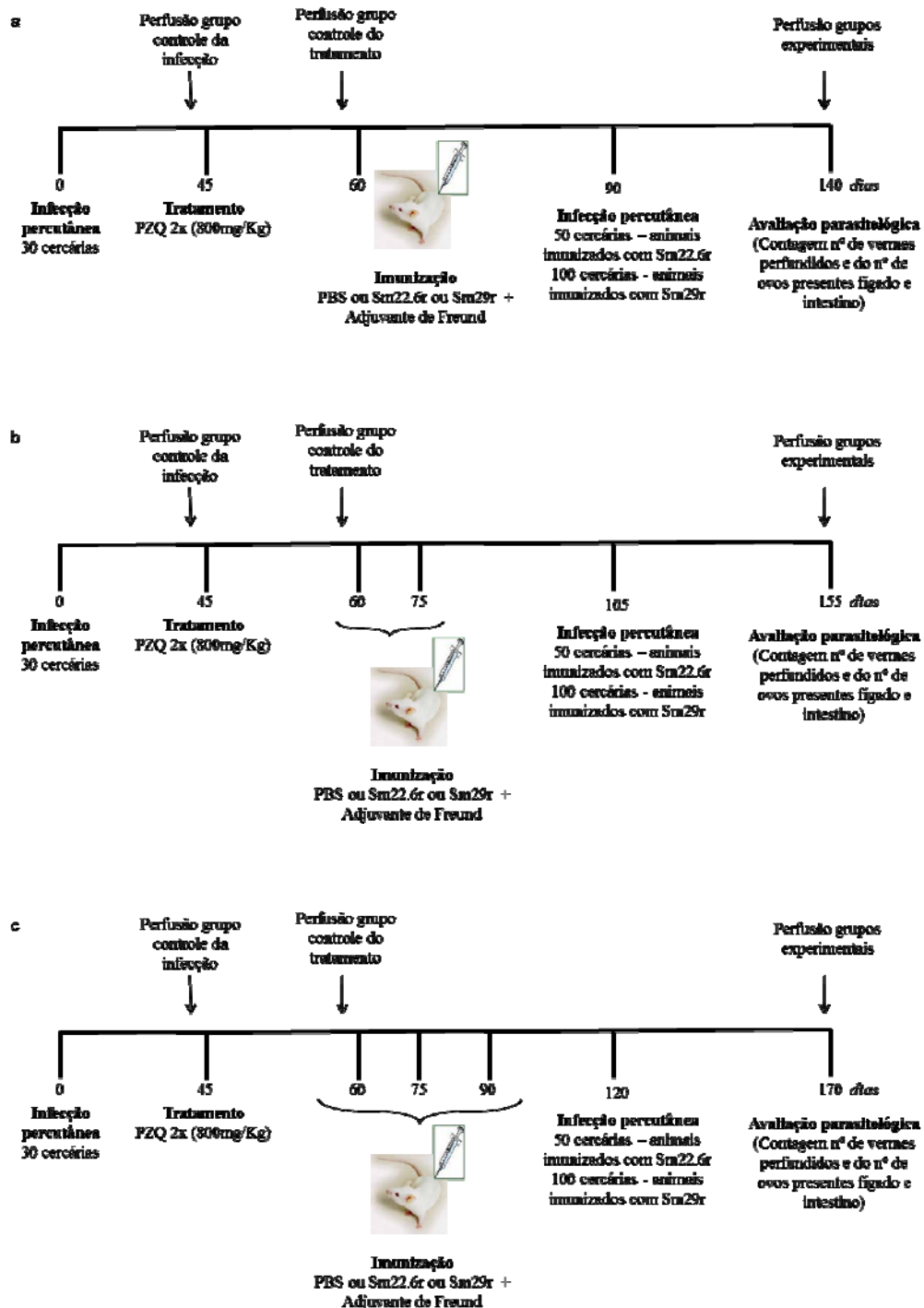


Figura 1 – Estratégia experimental segundo o número de imunizações: uma dose (a), duas doses (b) ou três doses (c).

Pelo fato das proteínas Sm22.6r e Sm29r nunca terem sido testadas em protocolos vacinais utilizando camundongos BALB/c naïve, este trabalho também objetivou avaliar o efeito protetor da imunização nesta linhagem, a fim de comparar com os resultados encontrados nos animais infectados/tratados e imunizados. Para tanto, camundongos BALB/c naïve foram divididos em três grupos: Sm22.6, Sm29 e PBS, os quais receberam três doses da formulação vacinal contendo as proteínas Sm22.6r, Sm29r e PBS, respectivamente, em associação ao adjuvante de Freund. Na primeira dose, os camundongos foram imunizados juntamente com Adjuvante Completo de Freund (CFA), já nas doses subsequentes, foi utilizado o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA).

4.7.2 Protocolo de imunização com os adjuvantes ALUM e MPL

O potencial imunoprotetor da Sm29r também foi avaliado utilizando outros dois adjuvantes: o Hidróxido de Alumínio (ALUM) e o Monofosforil Lipídeo A (MPL) de *Salmonella minnesota* R595 (InvivoGen), os quais são aprovados para o uso em seres humanos. Para isso, camundongos BALB/c previamente infectados e tratados, foram divididos em quatro grupos: PBS ALUM, Sm29 ALUM, PBS MPL e Sm29 MPL, os quais receberam três doses da formulação vacinal contendo, respectivamente, PBS + ALUM (1,3mg/animal); Sm29r (25µg/animal) + ALUM (1,3mg/animal); PBS + MPL (10µg/animal) e Sm29r (25µg/animal) + MPL (10µg/animal).

4.8 Perfusão animais

Cinquenta dias após a infecção dos grupos imunizados e controle da infecção, ou 15 dias após o tratamento no grupo controle do tratamento, foi realizada a perfusão dos animais para a avaliação da carga parasitária. Os camundongos foram eutanasiados por descolamento cervical, e os vermes recuperados do sistema porta hepático por perfusão das veias mesentéricas, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes recuperados foram contados com auxílio de uma lupa, separando-os em machos e fêmeas. Nos grupos experimentais, o nível de proteção foi calculado comparando o número de vermes recuperados nos grupos imunizados com as proteínas recombinantes: Sm22.6 IT, Sm29 IT, Sm22.6, Sm29, Sm29 ALUM ou Sm29 MPL, com o número de vermes obtidos nos seus respectivos grupos controles: PBS IT, PBS, PBS ALUM ou PBS MPL, através da formulação descrita:

$$NP = \frac{VRGC - VRGE}{VRGC} \times 100$$

onde: NP = nível de proteção;

VRGC = vermes recuperados no grupo controle (PBS);

VRGE = vermes recuperados nos grupos experimentais.

4.9 Contagem do número de ovos e avaliação histopatológica

Durante a perfusão foram retirados o fígado e o intestino de cada camundongo dos grupos imunizados, a fim de determinar o número de ovos presentes nestes. Os órgãos foram pesados e acondicionados em tubos cônicos contendo solução de KOH 10% por 16 horas, a 4°C. No dia seguinte, os mesmos foram incubados à 37°C durante trinta minutos em banho-maria. Então, os órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 900 x g, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em salina 0,85%. Esta etapa foi repetida por três vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de salina 0,85% e o número de ovos foi contado com o auxílio de um microscópio de luz. Foram realizadas três contagens de 10 µL da solução de cada órgão a fim de se determinar o número de ovos por grama de órgão.

Partes do fígado dos animais do grupo Sm29 IT e de seu controle também foram coletados após perfusão para avaliação histopatológica. Esses foram fixados com formalina 10%, desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados com xilol, impregnados em parafina e seccionados por micrótomo em cortes, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para observação dos granulomas. Para determinar a área dos granulomas foram escolhidos, de maneira aleatória, 100 granulomas, aproximadamente, de cada grupo (10 granulomas/animal) no estágio exsudativo. Os granulomas foram medidos utilizando o software de análise de imagens AxionVision 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany), sendo a área total de cada granuloma expressa em micrômetros quadrados (μm^2).

4.10 Avaliação do perfil de resposta humoral de camundongos imunizados

Para determinar o perfil de resposta humoral de camundongos imunizados, foram coletadas amostras de sangue dos animais após infecção, tratamento e imunizações (para os animais infectados, tratados e imunizados com as proteínas Sm22.6r ou Sm29r + Freund), ou após as imunizações (para os camundongos naïve imunizados com Sm22.6r ou Sm29r + Freund, e para os animais infectados, tratados e imunizados com Sm29r + ALUM ou MPL). Foram retirados, aproximadamente, 200 µL de sangue através do plexo retro orbital, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. Tais amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente (TA) e, então, centrifugadas (3220 x g/5min.) para a obtenção do soro. Os soros foram congelados em freezer (-20°C) e, em seguida, utilizados em ensaios de ELISA para a dosagem dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicos para Sm22.6r e Sm29r.

Para a realização do ELISA, placas de microensaio de 96 poços (Nunc- Maxsorp) foram sensibilizadas com Sm22.6r ou Sm29r na concentração de 5 µg/mL (para IgG, IgG1 e IgG2a) ou 1 µg/mL (para IgE), em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 por 12 a 16 horas à 4°C. As placas, então, foram lavadas (300 µL/poço) com PBST₂₀ (phosphate-buffered saline e Tween 20) por três vezes e bloqueadas, com 300 µL/poço de PBST₂₀ acrescentado por 3% de Soro Fetal Bovino (FBS, GIBCO, USA), por 2 horas à temperatura ambiente (IgG, IgG1 e IgG2a) ou com PBST₂₀ acrescido de 3% de leite em pó desnatado por 16 horas à 4° (IgE). Depois do bloqueio, as placas foram novamente lavadas e foram adicionadas amostras de soros, em duplicata, diluídas em PBST₂₀ nas seguintes proporções (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Diluição dos soros

	Diluição do soro de camundongos infectados/ tratados e imunizados com Sm29r, Sm22.6r ou PBS + Freund	Diluição do soro de camundongos naïve imunizados com Sm29r, Sm22.6r ou PBS + Freund	Diluição do soro de camundongos infectados/ tratados e imunizados com Sm29r ou PBS + ALUM ou MPL
IgG	1:1.000 (ensaio Sm29 e controle PBS) 1:600 (ensaio Sm22.6 e controle PBS)	1:200 (ensaios Sm22.6, Sm29 e controles PBS)	1:1.000 (ensaios Sm29 e controles PBS)
IgG1	1:1.000 (ensaios Sm22.6, Sm29 e controles PBS)	1:200 (ensaios Sm22.6, Sm29 e controles PBS)	1:1.000 (ensaios Sm29 e controles PBS)
IgG2a	1:100 (ensaio Sm29 e controle PBS) 1:400 (ensaio Sm22.6 e controle PBS)	1:200 (ensaios Sm22.6, Sm29 e controles PBS)	1:1.000 (ensaios Sm29 e controles PBS)
IgE	1:40 (ensaios Sm29, Sm22.6 e controles PBS)	não foi realizado ensaio para avaliação de IgE nestes animais	1:40 (ensaios Sm29 e controles PBS)

As diluições dos soros foram padronizadas através da realização de ensaios utilizando diluições seriadas de um pool de soro para cada grupo imunizado. Cem microlitros dos soros diluídos foram pipetados em cada poço e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura

ambiente. Após nova etapa de lavagem, 100 μ L por poço dos anticorpos anti-IgG (Southern Biotech), anti-IgG1 (Southern Biotech), anti-IgG2a (Southern Biotech) de camundongo, conjugados à peroxidase, diluídos em PBST₂₀, respectivamente, a 1:10.000, 1:10.000 e 1:8.000 foram adicionados às placas por 1h à temperatura ambiente. Para IgE, as placas foram incubadas com um anticorpo anti-IgE de camundongo, conjugado à biotina, na diluição de 1:250 (por 1h à TA). Depois de as placas serem lavadas, foi adicionado avidina conjugada à peroxidase (1:250) por trinta minutos. A reação de revelação das placas foi iniciada com a adição de 100 μ L/ poço do substrato tetrametilbenzidina-TMB (Invitrogen), e parada com 50 μ L/ poço de ácido sulfúrico a 5%. As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA.

4.11 Reconhecimento das proteínas Sm22.6 e Sm29 na superfície do parasito por anticorpos de animais imunizados

Para avaliar a expressão das proteínas Sm22.6 e Sm29 na superfície do parasito, esquistossômulos recém-transformados foram incubados com soro de camundongos BALB/c naíve imunizados com três doses de Sm22.6r ou Sm29r associados ao adjuvante de Freund. Cercárias foram mecanicamente transformadas em esquistossômulos como descrito anteriormente (Ramalho-Pinto et al., 1974), com algumas modificações. Em resumo, as cercárias foram incubadas em gelo por 30 min., centrifugadas (1800 x g/3 min./4°C), e ressuspendidas em meio Glasgow (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelado com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. As caudas das cercárias foram quebradas após serem vortexadas por 2 min. na velocidade máxima e foram removidas através de vários ciclos de lavagem com meio Glasgow. Os esquistossômulos foram cultivados por 3 horas a 37°C em meio. Logo após, os esquistossômulos foram incubados com o soro de camundongos imunizados e anti-IgG de camundongo conjugado à FITC, como descrito anteriormente (Melo et al., 2014). Resumidamente, os esquistossômulos (20/poço) foram lavados três vezes com meio DMEM após serem centrifugados a 1800 x g por 5 min. Logo após, os parasitas foram fixados com PBS + 1% de formaldeído por 1h/4°C. Os esquistossômulos foram lavados três vezes com PBS e incubados com RPMI por 30 min. e com PSB + 1% de BSA por mais 30 min. Após três ciclos de lavagem, os esquistossômulos foram incubados (overnight a 4°) com soro de camundongos imunizados com Sm22.6r+CFA/IFA ou Sm29r+CFA/IFA ou inoculados com PBS+CFA/IFA, diluídos em PBS (1:50). Os esquistossômulos, então, foram lavados por três vezes com PBS + 1% de BSA, incubados com RPMI por 30 min., lavados com PBS (3x) e incubados novamente com

PBS + 1% de BSA por 30 min. Finalmente, os parasitos foram incubados com um anti-IgG de camundongo conjugado à FITC por 2 horas ao abrigo de luz e lavados novamente com PBS (3x). A ligação dos anticorpos na superfície dos esquistossômulos foi avaliada por microscópio de fluorescência. A intensidade de fluorescência detectada no tegumento dos esquistossômulos foi medida utilizando o software ImageJ e a análise da fluorescência foi determinada como descrito anteriormente (Burgess et al., 2010).

4.12 Avaliação do perfil de resposta celular de camundongos imunizados

Baço dos camundongos dos grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT, PBS IT, Sm22.6, Sm29, Sm29 ALUM, Sm29 MPL, PBS ALUM e PBS MPL, bem como, de camundongos infectados e tratados (controle do experimento) foram obtidos após eutanásia dos animais, sete dias após a terceira imunização ou cinquenta dias pós tratamento. O baço de cada camundongo foi retirado em capela de fluxo laminar e depositado em salina estéril gelada. Os órgãos, então, foram macerados, centrifugados (4°C, 10 min., 394 x g) e as hemácias lisadas com ACK por 5 minutos. Os esplenócitos foram lavados com salina estéril, novamente centrifugados e ressuspendidos com 1 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 3% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina). Os esplenócitos de cada camundongo foram contados em Câmara de Neubauer, sendo a viabilidade das células observadas pelo uso do corante Azul de Tripán (0,4%). As células obtidas foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços com fundo em “U” na concentração de 1×10^6 células e mantidas em cultura a 37°C a 5% de CO₂ na presença de estímulos (ConA (5µg/mL) ou anti-CD3 (1µg/mL) como controles positivos e Sm22.6r (25µg/mL) ou Sm29r (25µg/mL)) ou não estimuladas (meio RPMI). Após 24 e 72 horas, o sobrenadante das células foi coletado e armazenado em freezer -70°C para serem utilizados posteriormente. Foram quantificados os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF-α produzidas em cultura através da técnica Cytometric Bead Array, CBA (BD Pharmingen, E.U.A.), utilizando o Kit CBA Th1/Th2/Th17 específico para camundongos.

O CBA foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante, porém, com algumas modificações. Alíquotas de 25µL de cada amostra, bem como, 25µL do controle negativo do kit, foram incubadas com 21µL da mistura das sete *beads* (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF-α) e 17µL do reagente de detecção marcado com PE, por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Assim como as amostras, também foram incubadas alíquotas do padrão de citocinas do kit, diluídas previamente, por diluição seriada, partindo de uma

concentração de 5000 pg/mL até 20 pg/mL. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados ($340 \times g/7 \text{ min.}/18^\circ\text{C}$), o sobrenadante foi descartado e as amostras adquiridas em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, E.U.A). De acordo com o kit, o limite de detecção de cada citocina é de: IL-2 (0,1 pg/mL), IL-4 (0,03 pg/mL), IL-6 (1,4 pg/mL), IL-10 (16,8 pg/mL), IL-17 (0,8 pg/mL), IFN- γ (0,5 pg/mL) e TNF- α (0,9 pg/mL). Os dados foram analisados através do Software FCAP Array (Becton Dickinson).

Os esplenócitos obtidos dos animais dos grupos Sm29 ALUM, Sm29 MPL, PBS ALUM e PBS MPL também foram utilizados para marcação intracitoplasmática das citocinas IL-4, IFN- γ e IL-10. Para tanto, as células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços com fundo em “U” na concentração de $0,5 \times 10^6$ células e mantidas em cultura a 37°C e 5% CO_2 em Meio (RPMI), na presença do estímulo anti-CD3 - controle positivo (1 $\mu\text{g/mL}$), Sm29r (25 $\mu\text{g/mL}$) por 18 horas. A secreção de citocinas foi impedida pela adição de Brefeldina A (1 $\mu\text{g/mL}$) à cultura por 4h. Posteriormente, as células foram centrifugadas ($387 \times g/ 7 \text{ min.}$), retirado o sobrenadante, e os receptores para FC γ , CD16/CD32, foram bloqueados pela adição de anticorpos anti-CD16/CD32 de camundongo (BD Pharmingen). Então, as células foram lavadas com PBS (Sigma), centrifugadas ($387 \times g/ 7 \text{ min.}$) e incubadas, por 15 minutos a 4°C , com anticorpo anti-CD4 de camundongo conjugado à FITC (BD-Pharmingen, clone GK1.5), anti-CD3 conjugado à Biotina (BD-Pharmingen, clone 500A2), anti-CD44 conjugado à Alexa 700 (eBioscience, clone IM7). As células, então, foram lavadas e foi adicionado a estreptavidina CF594 (diluição 1:800) por 15 min. à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS (Sigma), e depois, fixadas e permeabilizadas com uma solução Fixation/Permeabilization do Kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD), por 20 min. a 4°C . Logo após, as células foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, com anticorpos monoclonais anti-IL-4 conjugado à PE (BD-Pharmingen, clone 11B11), anti-IFN- γ conjugado à eFluor450 (eBioscience, clone XMG1.2) e anti-IL-10 conjugado à APC (BD-Pharmingen, clone JES5-16E3). Os esplenócitos foram lavados com a solução Perm/Wash buffer do Kit Cytotfix/Cytoperm (BD) e, então, adquiridos no citômetro de fluxo BD LSRFortessa (Becton Dickinson, San José, CA). Os dados foram analisados usando o software FlowJo 7.6.3 (Tree Star, Ashland). A **Figura 2** ilustra a estratégia de análise utilizada.

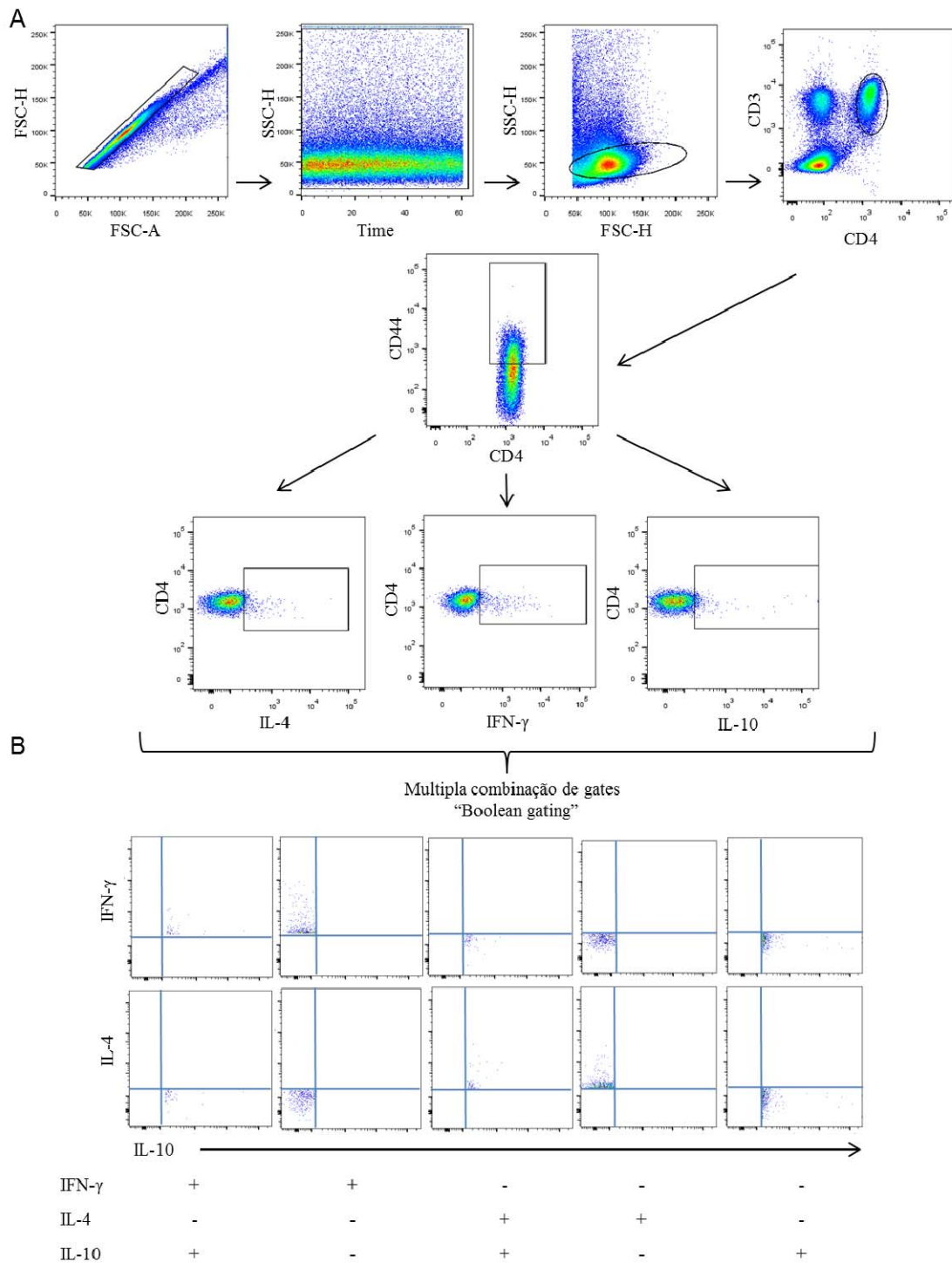


Figura 2 – Estratégia de análise da marcação das citocinas intracitoplasmáticas. Na análise, os *doblets* (células em dupla) foram eliminados através da criação de um *gate* dentro do dot-plot FSC-A x FSC-H. A seguir, as eventuais bolhas detectadas durante a aquisição foram eliminadas através da criação de um *gate* dentro do *dot-plot* time x SSC-H. Então, a população de linfócitos foi selecionada dentro do *dot-plot* SSC-A (complexidade citoplasmática) X FSC-A (tamanho). Dentro da população de linfócitos, as células CD3⁺CD4⁺ foram selecionadas e dentro desta região as células CD4⁺CD44^{hi} foram escolhidas. O percentual de células duplo positivas para CD4 e IL-10, CD4 e IL-4 ou CD4 e IFN- γ foi determinado dentro do *gate* das células CD4⁺CD44^{hi} (A). Dentro da população CD4⁺CD44^{hi} também foi realizada uma análise de "boolean gating" para as citocinas, o que permite a combinação dos *gates*, a fim de avaliar a produção de diferentes citocinas pela mesma célula. Na análise foram consideradas as populações Th1 (IFN- γ ⁺/IL-4⁻/IL-10⁻), Th1/IL-10 (IFN- γ ⁺/IL-4⁻/IL-10⁺), Th2 (IFN- γ ⁻/IL-4⁺/IL-10⁻), Th2/IL-10 (IFN- γ ⁻/IL-4⁺/IL-10⁺) e Tr1 (IFN- γ ⁻/IL-4⁻/IL-10⁺) (B).

4.13 Avaliação imunofenotípica de camundongos imunizados

Além da avaliação dos níveis de citocinas produzidos em camundongos imunizados, também foi avaliado o fenótipo das células TCD4, TCD8, células B e macrófagos quanto a alguns marcadores de ativação e memória, para os animais dos grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT, PBS IT, Sm22.6 e Sm29; e quanto à marcadores de células B e TCD4 de memória para os grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL. Para tanto, os esplenócitos obtidos dos camundongos de cada grupo, foram processados como descrito anteriormente para o ensaio de marcação de citocinas intracitoplasmáticas. As células foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ e seus receptores para FC γ foram bloqueados pela adição de anticorpos anti-CD16/CD32 de camundongo (BD Pharmingen). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS (Sigma), centrifugadas ($387 \times g/ 7 \text{ min.}$) e incubadas, por 15 minutos a 4°C, com os seguintes anticorpos: anti-CD4 (BD-Pharmingen, clone GK1.5), anti-CD8 (BD-Pharmingen, clone 53-6.7), anti-F4/80 (eBioscience, clone BM8) conjugados à FITC; anti-CD69 (eBioscience, clone H1.2F3), anti-CD86 (Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY, USA) e anti-CD4 (BD-Pharmingen, clone GK1.5) conjugados à PE; anti-CD27 (eBioscience, clone LG.7F9), anti-CD3 ((BD-Pharmingen, clone 500A2) e anti-CD25 (BD-Pharmingen, clone 7D4) conjugados a Biotina; anti-CD19 (BD-Pharmingen, clone 1D3) e anti-CD127 (BD-Pharmingen, clone A7R34) conjugados a PECy7; anti-CD44 (BioLegend, clone IM7) conjugado à Pacific Blue; anti-CD62L (BioLegend, clone MEL-14) conjugado à APC/Cy 7; anti-CD44 (e-Bioscience, clone IM7) e anti-CD62L (BD-Pharmingen, clone MEL-14) conjugado à Alexa 700.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS (0,15M), BSA (0,5%) e NaN₃ (2mM) e foi adicionado a estreptavidina APC (diluição de 1:200), APC/Cy 7 (diluição 1:1000) ou CF584 (diluição 1:800), nos poços onde os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados à biotina, de acordo com cada combinação. Após 20 minutos, as células foram lavadas e fixadas com formaldeído 2%. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa (Becton Dickinson, San José, CA) e os dados foram analisados usando o software FlowJo 7.6.3 ou FlowJo vX.0.7 (Tree Star, Ashland).

Os quadros abaixo mostram as combinações dos anticorpos utilizados para a marcação das células (**Quadro 1** e **Quadro 2**) e figuras seguintes representam as estratégias de análise empregadas na avaliação dos fenótipos de ativação (**Figura 3**) memória (**Figura 4**).

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na avaliação imunofenotípica dos grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT, PBS IT, Sm22.6 e Sm29.

	<i>Anticorpo Monoclonal</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Principais células que expressam</i>	<i>Função</i>
Marcação linfócitos TCD4 ativados	Anti- CD4	FITC	Linfócitos T auxiliares, monócitos e macrófagos	Co-receptor de MHC de classe II;
	Anti-CD25	Biotina/ Estreptavidina APC	Células T e B ativadas, macrófagos ativados	Forma complexo com receptor de IL-2 de alta afinidade IL-2R $\beta\gamma$; Crescimento de células T
	Anti-CD69	PE	Células T e B ativadas, macrófagos e células NK	Molécula de ativação de leucócitos. Está relacionada à ativação recente
Marcação linfócitos TCD8 ativados	Anti-CD8	FITC	Linfócitos T citotóxicos	Co-receptor de MHC de classe I
	Anti-CD25	Biotina/ Estreptavidina APC	Células T e B ativadas, macrófagos ativados	Forma complexo com receptor de IL-2 de alta afinidade IL-2R $\beta\gamma$; Crescimento de células T
	Anti-CD69	PE	Células T e B ativadas, macrófagos e células NK	Molécula de ativação de leucócitos. Está relacionada à ativação recente.
Marcação linfócitos B ativados	Anti-CD19	PE-Cy7	Linfócitos B	Papel na ativação de células B
	Anti-CD86	PE	Células B e monócitos	Co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante de CD28 e CTLA-4
Marcação macrófagos ativados	Anti-F4/80	FITC	Macrófagos	Sua função ainda não está totalmente elucidada. Estudos recentes demonstram que a molécula tem papel no desenvolvimento de tolerância imunológica
	Anti-CD86	PE	Células B e monócitos	Co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante de CD28 e CTLA-4
Marcação de linfócitos T de memória	Anti- CD4	PE	Linfócitos	Adesão (se liga ao MHC II); transdução de sinal.
	Anti-CD8	FITC	Linfócitos	Adesão (se liga ao MHC I); transdução de sinal.
	Anti-CD44	Pacific Blue	Leucócitos e eritrócitos	Principal função como receptor de “homing” celular; Receptor para componentes da matriz (ex. ac. Hialurônico); impede ativação de Fas/Fas ligante.
	Anti-CD127	PE-Cy7	Linfócitos T e B	Receptor de IL-7
	Anti-CD62L	Alexa 700	Linfócitos T e outros leucócitos	Adesão leucócito-endotélio; “homing” de células para os linfonodos periféricos.
Marcação linfócitos B de memória	Anti-CD19	Pe-Cy7	Linfócitos B	Papel na ativação de células B
	Anti-CD27	Biotina/ Estreptavidina APC	Células T maduras e células B de memória	Receptor de célula B

Quadro 2 – Anticorpos utilizados na avaliação imunofenotípica dos grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL.

	<i>Anticorpo Monoclonal</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Principais células que expressam</i>	<i>Função</i>
Marcação de linfócitos T de memória	Anti- CD4	FITC	Linfócitos	Adesão (se liga ao MHC II); transdução de sinal
	Anti-CD44	Alexa700	Leucócitos e eritrócitos	Principal função como receptor de “homing” celular; Receptor para componentes da matriz (ex. ac. Hialurônico); impede ativação de Fas/Fas ligante
	Anti-CD127	PE-Cy7	Linfócitos T e B	Receptor de IL-7
	Anti-CD62L	APC/Cy7	Linfócitos T e outros leucócitos	Adesão leucócito-endotélio; “homing” de células para os linfonodos periféricos
	Anti-CD3	Biotina/ Estreptavidina CF584	Linfócitos T	Co-receptor de células T que interage com a molécula TCR para ativação dos linfócitos
Marcação linfócitos B de memória	Anti-CD19	Pe-Cy7	Linfócitos B	Papel na ativação de células B
	Anti-CD27	Biotina/ Estreptavidina APC	Células T maduras e células B de memória	Receptor de célula B
	Anti-CD3	FITC	Linfócitos T	Co-receptor de células T que interage com a molécula TCR para ativação dos linfócitos

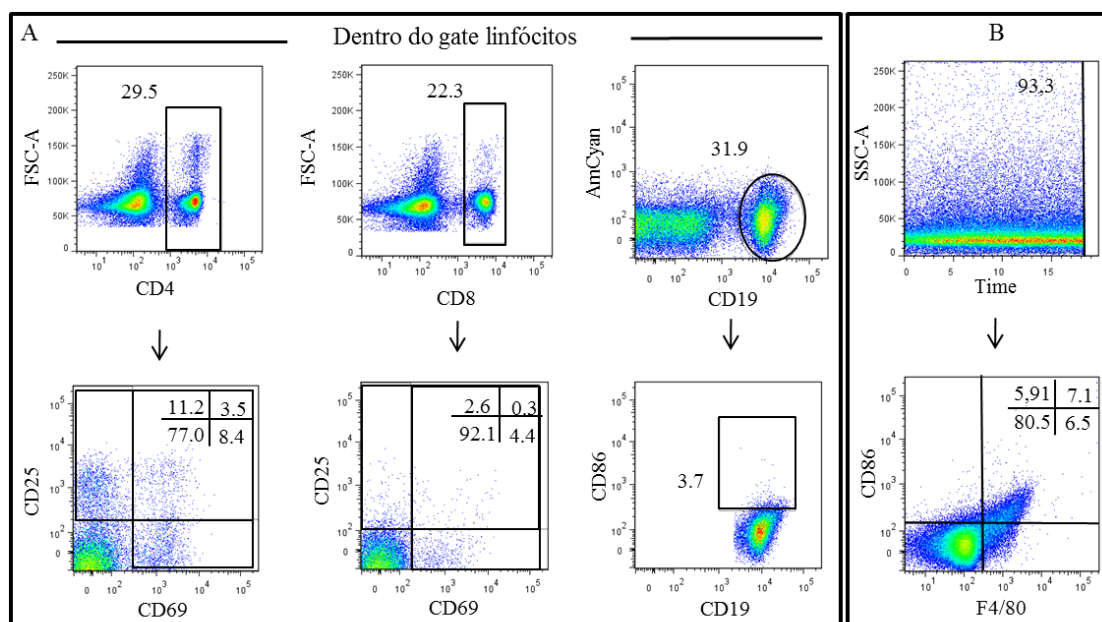


Figura 3 - Estratégia de análise da marcação dos linfócitos e macrófagos ativados. Na análise dos linfócitos ativados (A), os *doblets* (células em dupla) foram eliminados através da criação de um *gate* dentro do dot-plot FSC-A x FSC-H. A seguir, as eventuais bolhas detectadas durante a aquisição foram eliminadas através da criação de um *gate* dentro do *dot-plot* time x SSC-A. Então, a população de linfócitos foi selecionada dentro do *dot-plot* SSC-A (complexidade citoplasmática) X FSC-A (tamanho). A partir daí, três populações de linfócitos foram selecionadas: linfócitos T citotóxicos - CD8⁺, linfócitos T auxiliares - CD4⁺ e linfócitos B - CD19⁺. Dentro das populações de células CD4⁺ e CD8⁺ foram selecionadas as populações positivas para CD25 ou CD69 (soma dos quadrantes Q1+Q2 ou Q2+Q4). Dentro do *gate* de linfócitos CD19⁺, foi selecionada a população duplo positiva para CD19 e CD86 (A). Para a análise de macrófagos ativados (B), após a eliminação das eventuais bolhas detectadas durante a aquisição (dentro do *dot-plot* time x SSC-A), foi selecionada a população duplo positiva para F4/80 e CD86 (B).

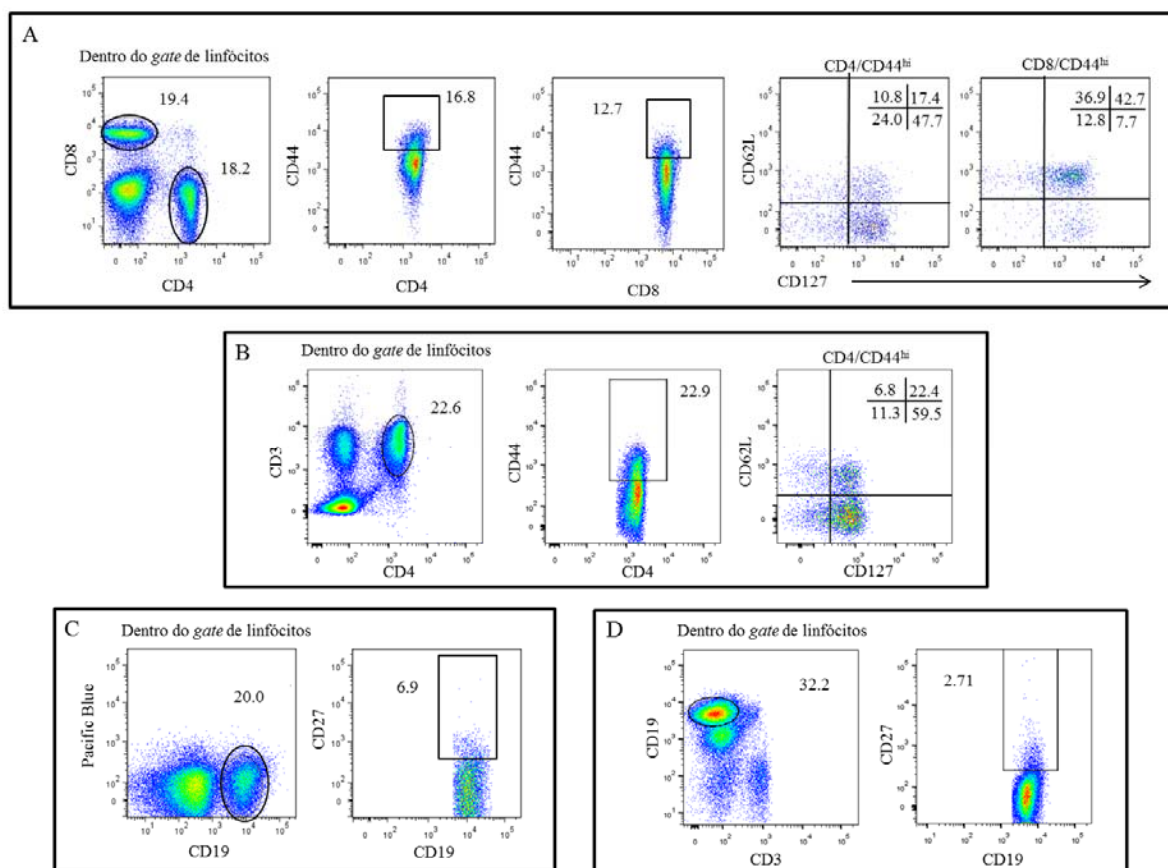


Figura 4 - Estratégia de análise da marcação dos linfócitos de memória. Para a análise da marcação dos linfócitos T de memória (A e B), os *doblets* (células em dupla) foram eliminados através da criação de um *gate* dentro do dot-plot FSC-A x FSC-H. A seguir, as eventuais bolhas detectadas durante a aquisição foram eliminadas através da criação de um *gate* dentro do dot-plot time x SSC-A. Então, a população de linfócitos foi selecionada dentro do dot-plot SSC-A (complexidade citoplasmática) X FSC-A (tamanho). Na população dos linfócitos foram selecionadas as células CD4⁺ e CD8⁺ (A) ou as células duplo positivas para CD4 e CD3 (B). As células duplo positivas para CD4 ou CD8 e CD44^{hi} foram selecionadas, sendo que dentro dessa população as células CD127⁺ e CD62^{low} representaram as células CD4 ou CD8 de memória efetora, e a população CD127⁺ e CD62^{hi} representaram as células CD4 ou CD8 de memória central (A e B). Dentro da população dos linfócitos também foram selecionadas as células positiva para CD19 (C) ou CD19⁺CD3⁻ (D), sendo que dentro destas populações, foram considerados os linfócitos CD19⁺ e CD27⁺ (C e D). As análises descritas em (A) e (C) foram realizadas para os grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT, PBS IT, Sm22.6 e Sm29, e as análises descritas em (B) e (D) para os grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL.

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Ca, USA). Antes de realizar as análises, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando: análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey, quando as comparações envolverem mais de duas variáveis. O teste T de student foi empregado quando comparadas somente duas variáveis, sendo consideradas significativas as diferenças com o valor de $p < 0,05$.

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. Para tais testes foi considerado significativa as diferenças com o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação parasitológica: determinação da carga parasitária e do número de ovos presentes no fígado e intestino dos animais imunizados

5.1.1 Grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT e PBS IT

Camundongos infectados, tratados e imunizados com uma, duas ou três doses da proteína Sm22.6r ou Sm29r + adjuvante de Freund, após reinfecção, foram perfundidos, juntamente com os grupos controle, para determinação do número de vermes recuperados.

Independente do número de doses recebidas, em nenhum dos grupos houve redução da média do número de vermes recuperados no grupo imunizado com Sm22.6 em relação grupo inoculados com PBS. Entre os grupos controle da infecção e do tratamento foi observada uma redução significativa no número de vermes no grupo tratado, demonstrando a ação do tratamento (**Figura 5** a,b,c).

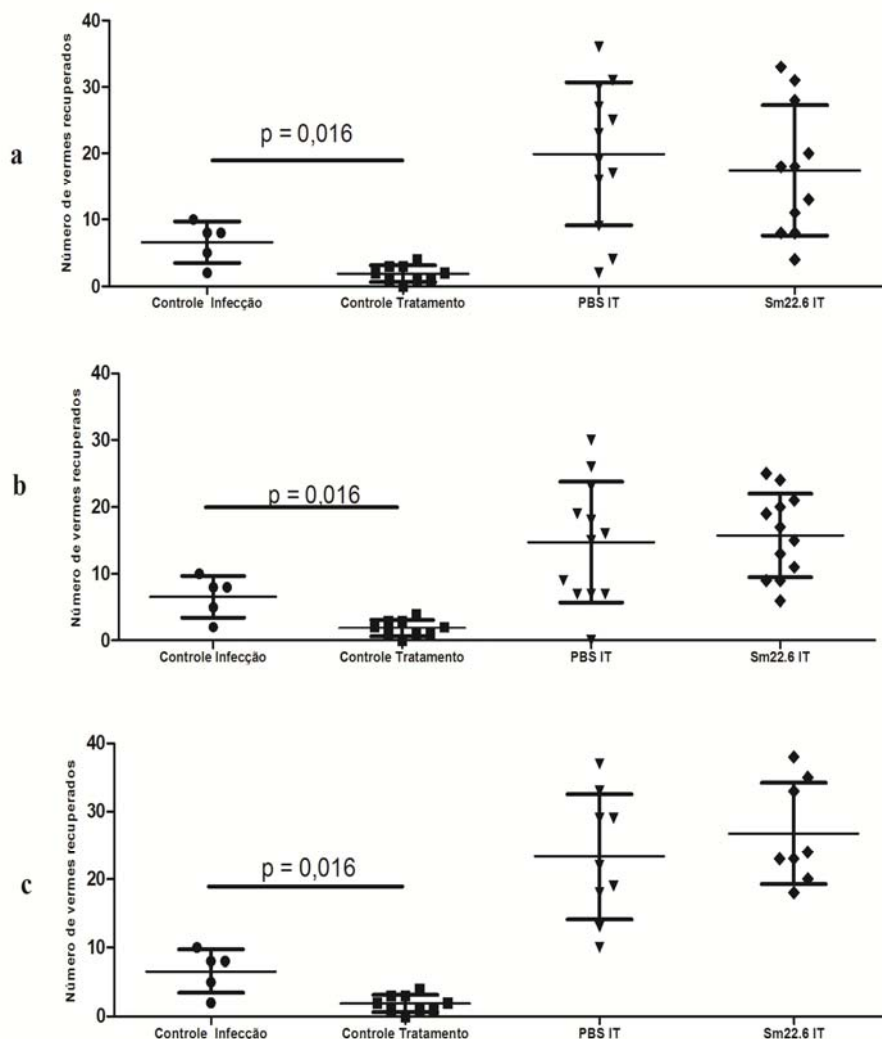


Figura 5- Número de vermes recuperados dos grupos Sm22.6 IT e PBS IT. Camundongos infectados e tratados (2x PZQ – 800mg/Kg) foram imunizados com uma (a), duas (b) ou três (c) doses da vacina contendo Sm22.6r+CFA/IFA. Este resultado é representativo de dois experimentos independentes. Os gráficos representam a distribuição do número de vermes recuperados em cada grupo. A média e o desvio padrão de cada grupo estão representados no gráfico. PBS IT = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + adj. de Freund. Sm22.6 IT = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm22.6 + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student. As diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

Quanto aos animais imunizados com Sm29r, os mesmos não apresentaram diferença no número de vermes recuperados em relação ao grupo inoculado com PBS, quando imunizados com uma ou duas doses (**Figura 6 a e b**). Porém, os animais imunizados com três doses, apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo controle, apresentando um nível de proteção entre 31% (**Figura 6 c**). Para confirmar o resultado observado nos grupos imunizados com três doses de Sm29r, outros dois experimentos foram realizados (**Figura 7**). Os resultados de ambos os ensaios confirmaram a redução do número de vermes no grupo Sm29 IT em relação ao PBS IT, apresentando um nível de proteção de 48 e 26%, respectivamente (**Figura 7 a e b**).

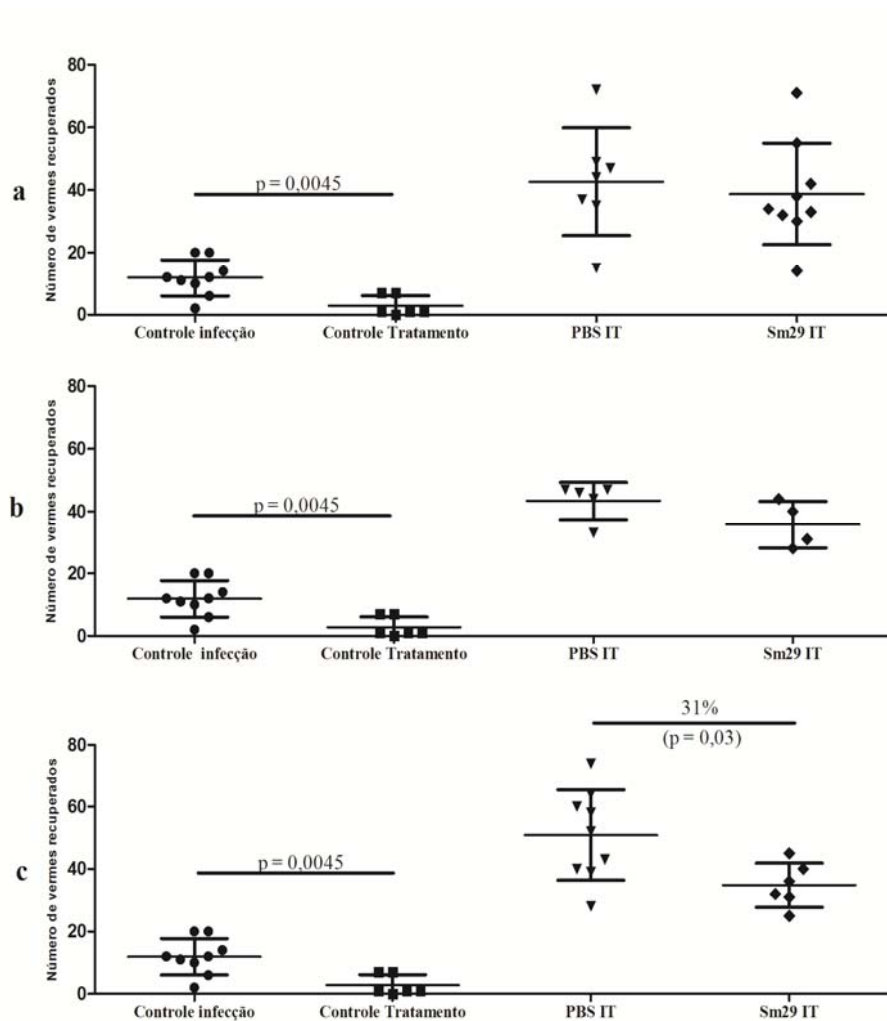


Figura 6 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm29 IT e PBS IT. Camundongos infectados e tratados (2x PZQ – 800mg/Kg) foram imunizados com uma (a), duas (b) ou três (c) doses da vacina contendo Sm29r+CFA/IFA. Os gráficos representam a distribuição do número de vermes recuperados em cada grupo. A média e o desvio padrão de cada grupo estão representados no gráfico. PBS IT = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + adj. de Freund. Sm29 IT = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm29 + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student. As diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

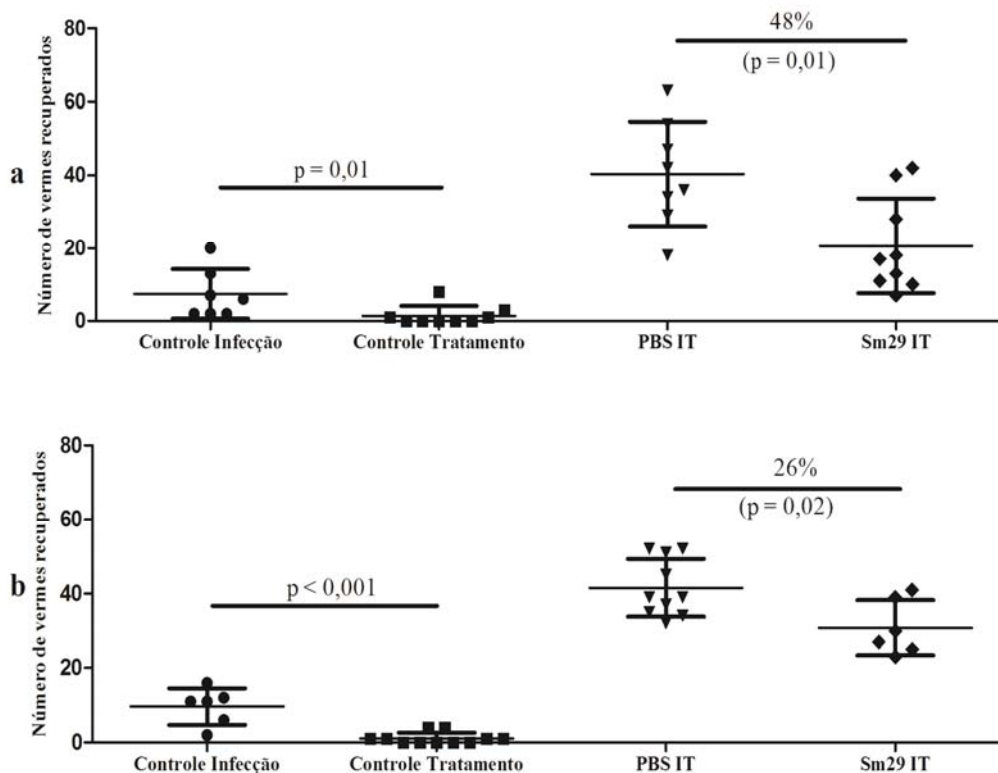


Figura 7 – Número de vermes recuperados dos grupos Sm29 IT e PBS IT imunizados com três doses. Camundongos BALB/c infectados e tratados foram imunizados com três doses da vacina contendo Sm29+CFA/IFA. Os gráficos representam dois experimentos independentes (a e b). Os gráficos demonstram a distribuição do número de vermes recuperados em cada grupo. A média e o desvio padrão de cada grupo estão representados no gráfico. PBS IT = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + adj. de Freund. Sm29 IT = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm29 + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student. As diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

A fim de determinar o efeito da imunização sobre o número de ovos presentes no intestino e fígado dos animais, os camundongos dos grupos Sm22.6 IT e Sm29 IT foram avaliados. Nos animais imunizados com a proteína Sm22.6r e adj. de Freund, formulação vacinal que não foi protetora, não houve diferença significativa em relação ao número de ovos presentes em ambos os órgãos (**Figura 8 a**).

Nos animais imunizados com a proteína Sm29r, também não foi observada diferença significativa no número de ovos presos no fígado em relação ao grupo PBS IT (**Figura 8 b**). Em relação aos ovos presentes no intestino dos animais do grupo Sm29 IT, porém, foi observada uma redução significativa em relação ao grupo PBS IT (**Figura 8 b**), refletindo a redução do número de vermes observada nestes animais. Nos animais imunizados com Sm29r associado ao adj. de Freund, formulação vacinal que se mostrou protetora, também foi avaliado o efeito da vacinação sobre a patologia da doença (área do granuloma). Apesar da proteção observada, os camundongos do grupo Sm29 IT não apresentaram redução na área do granuloma (**Figura 9**).

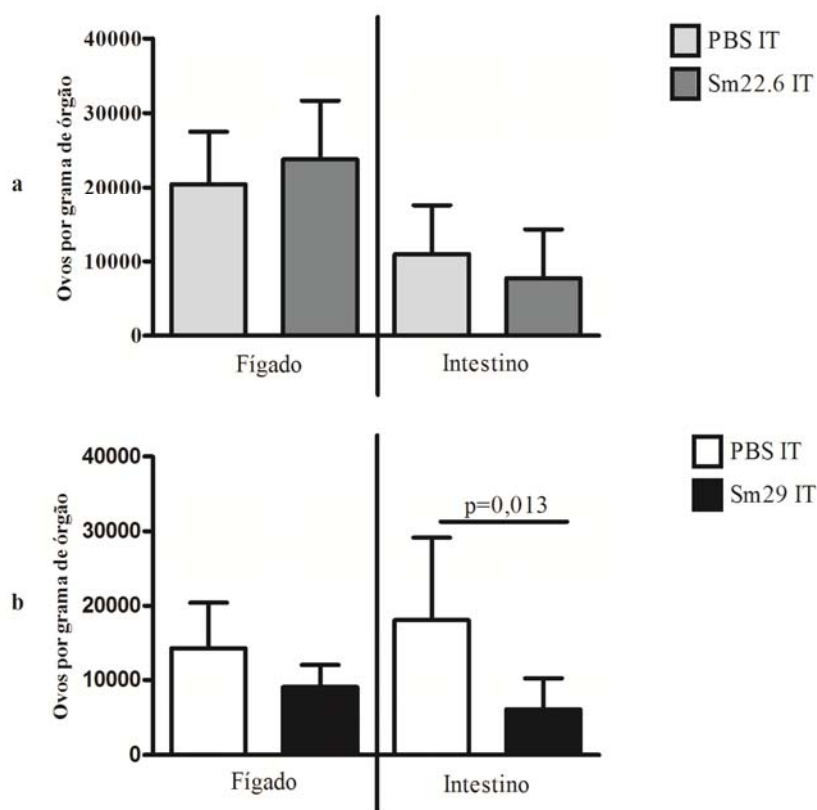


Figura 8 – Número de ovos presentes no fígado e intestino de animais infectados/tratados, imunizados com Sm22.6r (a) ou Sm29r (b). Camundongos infectados, tratados e imunizados, cinquenta dias após serem reinfetados, foram eutanasiados para determinar o número de ovos/grama de fígado ou intestino. Barras representam a média + desvio padrão do número de ovos/grama de órgão. PBS IT = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + adj. de Freund; Sm29 IT = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm29r + adj. de Freund; Sm22.6 IT = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm22.6r + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student. Diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

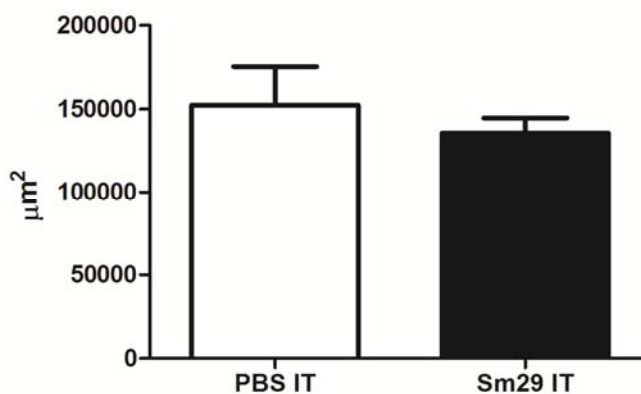


Figura 9 – Área do granuloma de animais, previamente infectados e tratados, imunizados com Sm29r. Camundongos infectados, tratados e imunizados, cinquenta dias após serem reinfetados, foram eutanasiados para determinação da área dos granulomas. Barras representam a média + desvio padrão da área dos granulomas. PBS IT = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + adj. de Freund; Sm29 IT = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm29r + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student.

5.1.2 Grupos Sm22.6, Sm29 e PBS

Com o objetivo de avaliar a eficácia da vacinação, com as proteínas Sm22.6r e Sm29r, em camundongos naïve da linhagem BALB/c, os animais foram imunizados com três doses da formulação vacinal contendo Sm22.6r/adjuvante Freund, Sm29r/adjuvante Freund e PBS/adjuvante Freund, respectivamente. Esta avaliação se mostrou de grande relevância já que os estudos prévios de imunização com tais proteínas, desenvolvidos por Cardoso e colaboradores (2008) e Pacífico e colaboradores (2006a), foram realizados em camundongos da linhagem C57BL/6. Nossos resultados demonstram que, diferentemente dos animais da linhagem C57BL/6, a imunização de camundongos BALB/c naïve com Sm22.6r ou Sm29r, não foi capaz de conferir proteção contra a infecção por *S. mansoni* (Figura 10). A imunização também não teve efeito sobre número de ovos presentes no fígado e intestino destes animais (Figura 11).

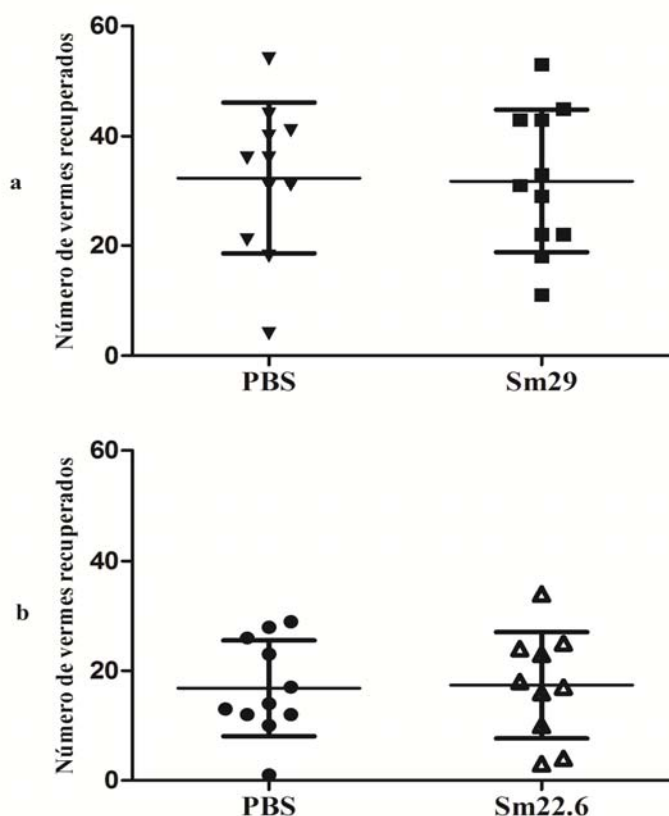


Figura 10 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm29, Sm22.6 e PBS. Camundongos BALB/c naïve foram imunizados com três doses de Sm29r+CFA/IFA (a) ou Sm22.6+CFA/IFA (b), bem como, seus controles negativos foram inoculados com PBS+CFA/IFA, e o número de vermes recuperados após perfusão foi determinado. Os gráficos representam a distribuição do número de vermes recuperados em cada grupo. A média e o desvio padrão de cada grupo estão representados no gráfico. PBS = inoculado com PBS + adj. de Freund; Sm22.6 = grupo imunizado com Sm22.6r + adj. de Freund; Sm29 = grupo com Sm29r + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student.

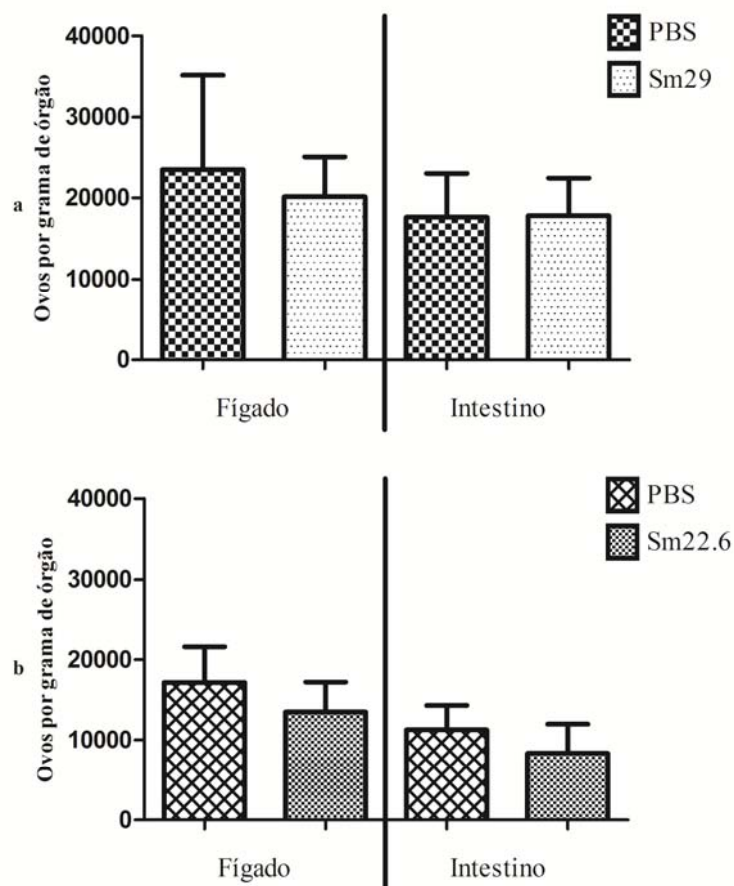


Figura 11 – Número de ovos presentes no fígado e intestino de animais naïve imunizados com Sm29r (a) ou Sm22.6r (b). Camundongos imunizados, cinquenta dias após serem reinfectados, foram eutanasiados para determinar o número de ovos/grama de fígado ou intestino. Barras representam média + desvio padrão do número de ovos/grama de órgão. PBS = grupo inoculado com PBS + adj. de Freund; Sm29 = imunizado com Sm29r + adj. de Freund. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student.

5.1.3 Grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL

Após comprovação da eficácia da imunização com Sm29r em associação ao adj. de Freund nos animais BALB/c, previamente infectados/tratados, foram avaliadas outras duas formulações vacinais contendo diferentes adjuvantes. Esta avaliação é de extrema relevância, já que o adjuvante de Freund não é permitido para o uso em seres humanos. Assim, animais BALB/c infectados/tratados foram imunizados com Sm29r associado ao adjuvante ALUM ou MPL, os quais são seguros para o uso em humanos.

Nossos resultados demonstram que a formulação vacinal contendo o adjuvante ALUM foi capaz de conferir proteção em camundongos desafiados com cercárias do *S. mansoni*. A imunização foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária em 29%, em relação ao grupo PBS Alum (**Figura 12 a**). A imunização dos animais com Sm29r/MPL, porém, não induziu proteção (**Figura 12 a**). Esses resultados foram confirmados por outro experimento, o

qual demonstrou uma proteção de 37% no grupo Sm29 ALUM em relação ao grupo PBS ALUM (**Figura 12 b**).

Em relação ao número de ovos presentes no fígado e intestino de camundongos imunizados com Sm29r/MPL, não houve redução significativa, quando comparado ao grupo PBS MPL (**Figura 13 b**). Nos animais imunizados com Sm29r/ALUM, porém, o número de ovos presos no intestino destes animais foi significativamente menor em relação ao grupo PBS ALUM, refletindo a redução do número de vermes observada neste grupo (**Figura 13 a**). No entanto, não houve diferença em relação ao número de ovos presentes no fígado dos animais do grupo Sm29 ALUM quando comparado aos animais do grupo PBS ALUM (**Figura 13 a**).

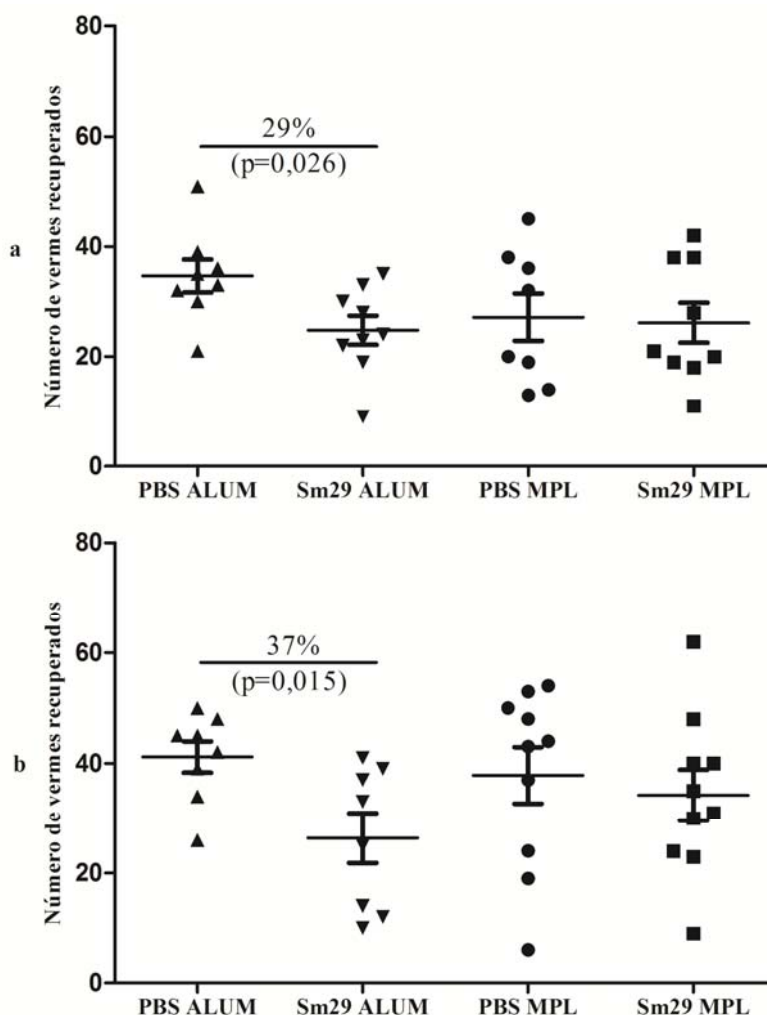


Figura 12 - Número de vermes recuperados dos grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL. Camundongos BALB/c, previamente infectados e tratados, imunizados com três doses de Sm29r + ALUM ou MPL foram avaliados quanto à proteção desencadeada pela imunização em dois experimentos independentes (a e b). Os gráficos representam a distribuição do número de vermes recuperados em cada grupo. A média e o desvio padrão de cada grupo estão representados no gráfico. PBS ALUM= inoculado com PBS + ALUM; Sm29 ALUM = grupo imunizado com Sm29r + ALUM; PBS MPL= inoculado com PBS + MPL; Sm29 MPL = grupo imunizado com Sm29r + MPL. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student. Diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

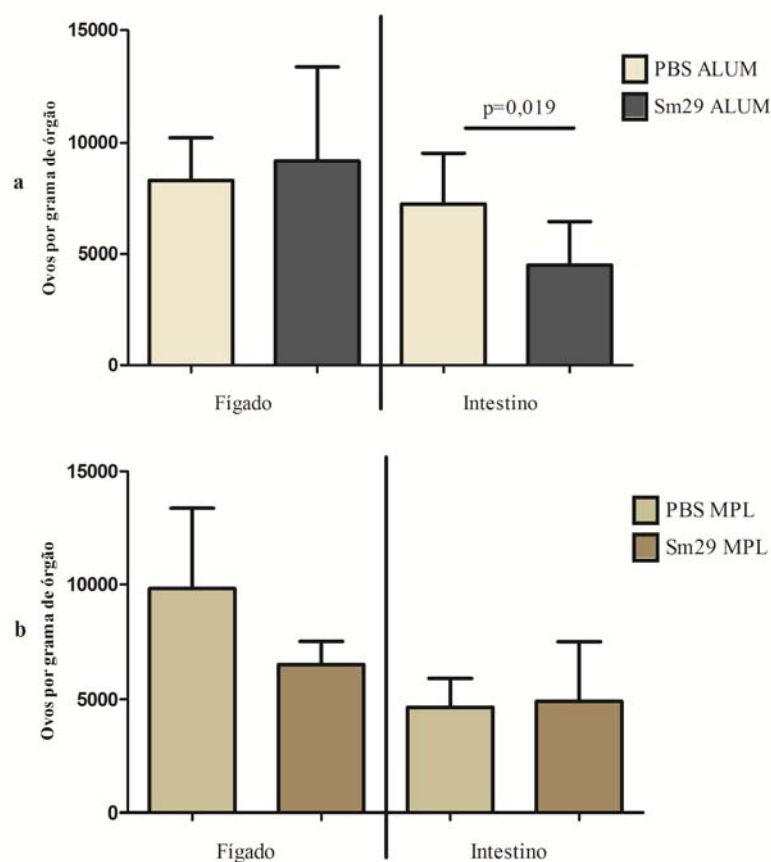


Figura 13 - Número de ovos presentes no fígado e intestino de animais infectados/tratados, imunizados com Sm29r + ALUM (a) ou Sm29r + MPL (b). Camundongos infectados, tratados e imunizados, cinquenta dias após serem reinfetados, foram eutanasiados para determinar o número de ovos/grama de fígado ou intestino. Barras representam a média + desvio padrão do número de ovos/grama de órgão. PBS ALUM = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + ALUM; Sm29 ALUM = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm29r + ALUM; PBS MPL = grupo infectado e tratado que foi inoculado com PBS + MPL; Sm29 MPL = grupo infectado e tratado que foi imunizado com Sm29r + MPL. Análise estatística foi realizada pelo teste T de student. Diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

5.2 Avaliação da resposta humoral de camundongos imunizados

5.2.1 Grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT e PBS IT

A produção de anticorpos específicos para as proteínas Sm22.6r e Sm29r foi avaliada 45 dias após a primeira infecção, 15 dias após tratamento e 15 dias após cada imunização. Um aumento significativo de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE, específicos para Sm22.6r, foi observado nos animais do grupo imunizado com a proteína após as três doses da imunização em relação ao grupo PBS IT, bem como, em relação aos animais infectados e

infectados/tratados (**Figura 14**). Além disso, no grupo Sm22.6 IT, os níveis de IgG, IgG1 e IgG2a aumentaram significativamente após a segunda e terceira doses (**Figura 14**).

Nos animais do grupo Sm29 IT, houve produção significativa de anticorpos IgG e IgG1 específicos para Sm29r, quando comparado com o grupo PBS IT, após cada dose da vacinação. Níveis significativos de IgG2a e IgE, no entanto, só foram detectados a partir da segunda imunização (**Figura 14**). Quando comparada a produção de anticorpos entre as doses, no grupo Sm29 IT, foi observado um aumento significativo de IgG e IgG1 após cada dose, enquanto um aumento significativo de IgG2a só foi observado após terceira dose em relação às primeira e segunda doses (**Figura 14**). Os níveis de IgE, por sua vez, aumentaram somente após a terceira imunização, em relação à primeira (**Figura 14**). Além disso, um aumento significativo nos níveis de IgG1 e IgE foi observado nos camundongos infectados/tratados em relação aos animais infectados. A imunização com Sm29r aumentou significativamente a produção de IgG, IgG1, IgG2a e IgE em comparação com os níveis observados nos animais infectados ou infectados/tratados (**Figura 14**).

Em relação aos títulos dos anticorpos, avaliados após terceira dose da vacinação, foi observado que a imunização com Sm22.6r/CFA/IFA induz maiores títulos de IgG, IgG1, IgG2a e IgE, em relação aos animais imunizados com Sm29r/CFA/IFA (**Tabela 3**).

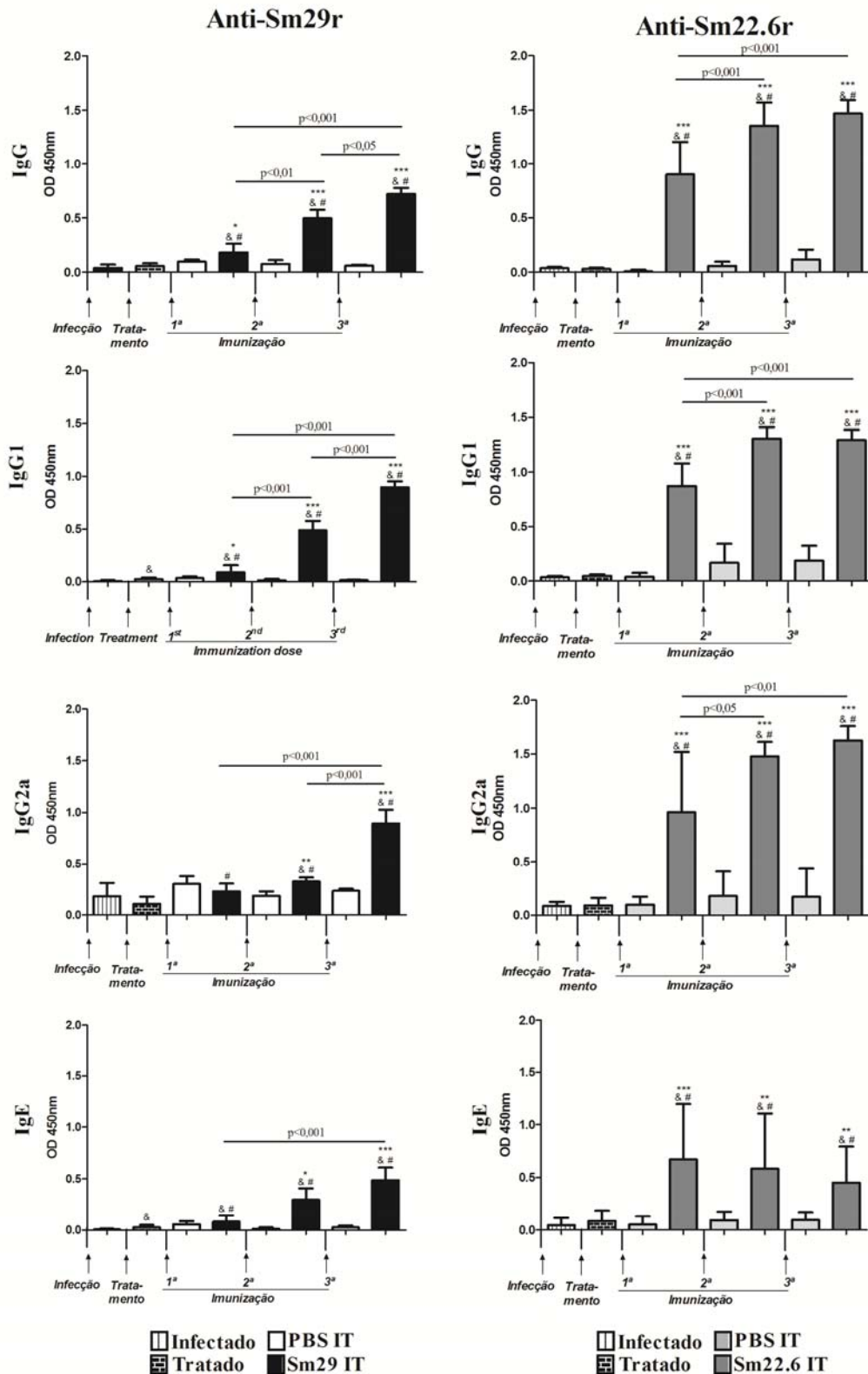


Figura 14 – Dosagem dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE, em camundongos previamente infectados e tratados, imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund. Os níveis de IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicos para Sm22.6r e Sm29r, foram determinados por ELISA. Barras representam a média dos valores de absorbância (450nm) \pm desvio padrão. As setas indicam o tempo de infecção, tratamento e imunização. A análise estatística foi realizada pelos testes T de student (entre PBSIT e Sm29 IT ou Sm22.6 IT) e Anova (entre as imunizações). As diferenças significativas entre os grupos Sm22.6 IT ou Sm29 IT e seus controles estão indicadas no gráfico por * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) ou *** ($P < 0,001$). &: representa diferença em relação aos animais infectados; #: representa diferença em relação aos animais tratados.

5.2.2 Grupos Sm22.6, Sm29 e PBS

Os camundongos naïve imunizados com as proteínas Sm22.6r ou Sm29r, associadas ao adjuvante de Freund, foram avaliados quanto à produção específica de anticorpos dos isotipos IgG, IgG1 e IgG2a, quinze dias após cada imunização (**Figura 15**).

Camundongos imunizados com Sm22.6r apresentaram níveis significativos de todos os isotipos analisados após cada dose de imunização, em relação aos animais do grupo PBS/CFA/IFA (**Figura 15**). Houve um aumento significativo de IgG e IgG1 entre a primeira e segunda dose e entre a primeira e terceira dose, já para o isotipo IgG2a, este aumento foi observado somente entre a primeira e segunda dose (**Figura 15**).

Os animais imunizados com Sm29r também apresentaram níveis significativos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos em relação aos animais do grupo PBS/CFA/IFA (**Figura 15**). Somente os isotipos IgG e IgG2a apresentaram aumento significativo entre a terceira e a primeira dose da vacina (**Figura 15**).

Os animais do grupo Sm22.6, imunizados com três doses, apresentaram maiores títulos de IgG, IgG1 e IgG2a em relação aos animais do grupo Sm29, no entanto, o título de IgE foi maior no grupo Sm29 (**Tabela 3**).

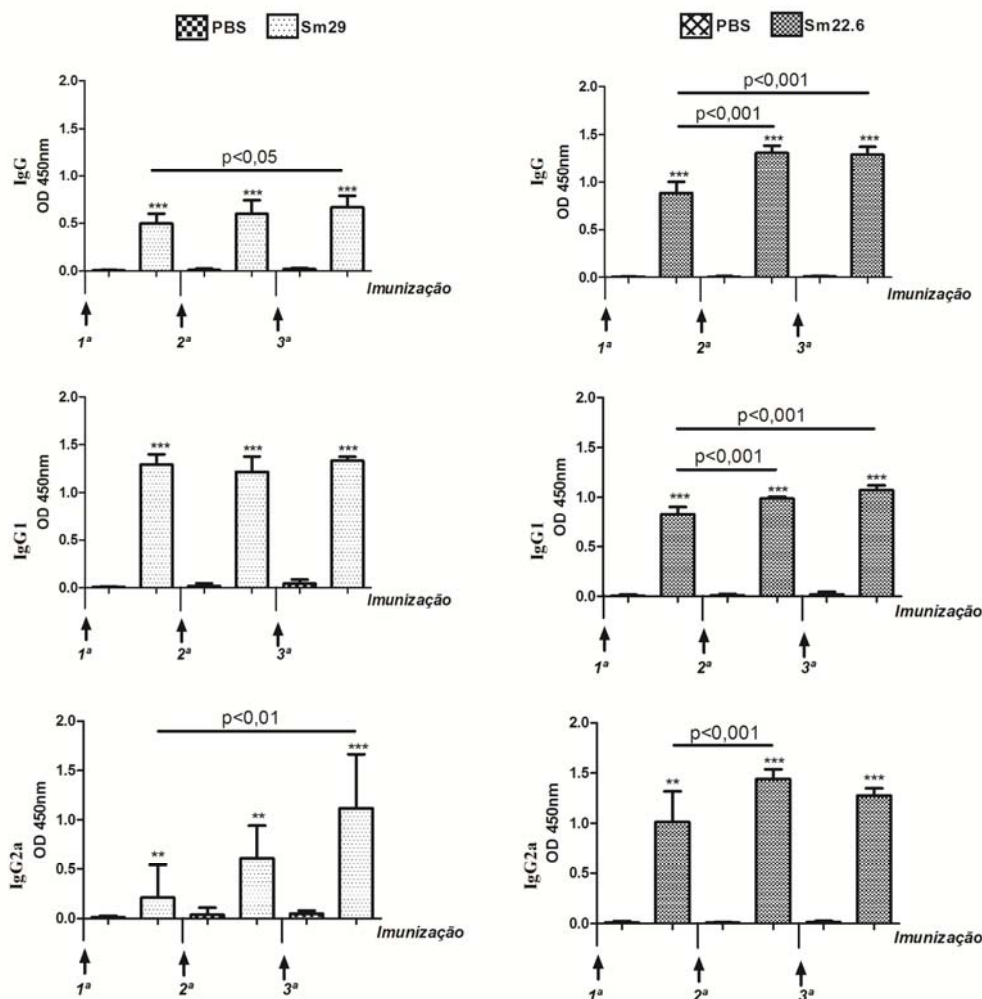


Figura 15 – Dosagem dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a em camundongos naïve imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund. Os níveis de IgG, IgG1 e IgG2a específicos para Sm22.6r e Sm29r, foram determinados por ELISA. Barras representam a média dos valores de absorvância (450nm) \pm desvio padrão. As setas indicam o tempo de imunização. A análise estatística foi realizada pelos testes T de student (entre PBS e Sm29 ou Sm22.6) e Anova (entre as imunizações). As diferenças significativas entre os grupos Sm22.6 ou Sm29 e seus controles estão indicadas no gráfico por: ** ($p < 0,01$) ou *** ($P < 0,001$).

5.2.3 Grupos Sm29 ALUM, PBS ALUM, Sm29 MPL e PBS MPL

Os grupos imunizados com três doses da proteína Sm29r associada aos adjuvantes ALUM e MPL também foram avaliados quanto a produção de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicos.

Animais imunizados com a proteína associada ao ALUM apresentaram produção significativa de IgG, IgG1 e IgE após todas as três imunizações, quando comparado ao grupo PBS ALUM. Os níveis de IgG2a, porém, só foram significativos após a segunda dose (Figura 16). A produção de IgG e IgG1 foi significativamente maior na segunda e terceira

dose em relação à primeira, já para IgG2a e IgE, os níveis dos anticorpos foi maior na terceira dose se comparada à primeira dose (**Figura 16**).

Os camundongos imunizados com Sm29r e MPL apresentaram produção significativa dos isotipos IgG, IgG1, IgG2a e IgE após todas as três doses da vacina, em relação ao grupo PBS MPL (). Houve um aumento significativo de IgG da primeira para a segunda dose, da segunda para terceira dose e, conseqüentemente, da primeira para a terceira dose (**Figura 16**). Em relação à IgG1 e IgE, no entanto, o aumento dos níveis dos anticorpos foi observado na segunda e terceira dose quando comparado à primeira dose, enquanto que, para IgG2a, esse aumento foi observado somente na terceira dose em relação à primeira (**Figura 16**).

Após terceira dose da vacinação, foi observado que animais do grupo Sm29 ALUM apresentaram maiores títulos de IgG, IgG1, IgG2a e IgE, em relação aos animais do grupo Sm29 MPL (**Tabela 3**).

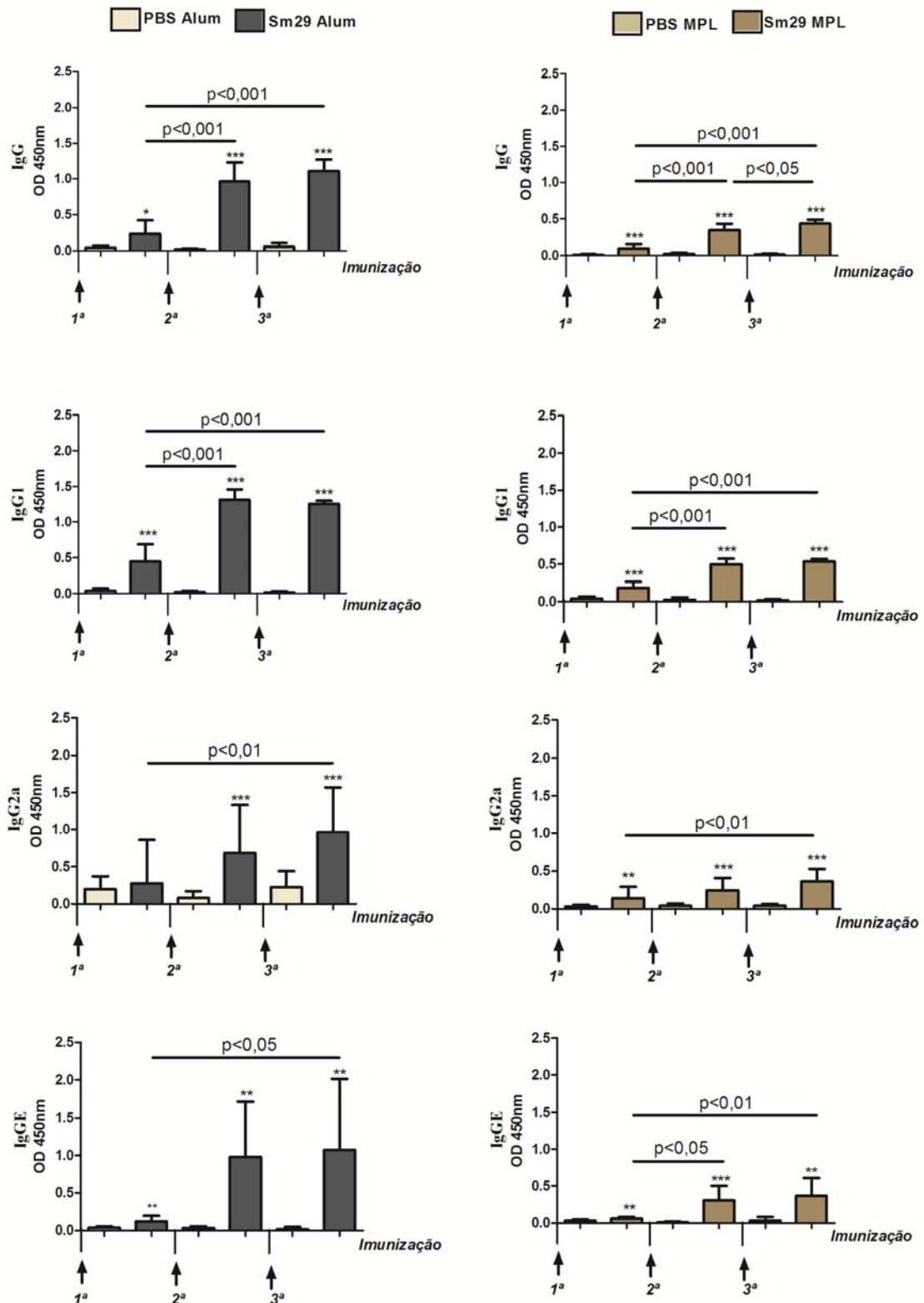


Figura 16 - Dosagem dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE, em camundongos previamente infectados e tratados, imunizados com Sm29r + ALUM ou MPL. Os níveis de IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicos para Sm29r, foram determinados por ELISA. Barras representam a média dos valores de absorbância (450nm) \pm desvio padrão. As setas indicam o tempo de imunização. A análise estatística foi realizada pelos testes T de student (entre PBS ALUM e Sm29 ALUM ou PBS MPL e Sm29 MPL) e Anova (entre as imunizações). As diferenças significativas entre os grupos imunizados com Sm29r e seus controles estão indicadas no gráfico por * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$) ou *** ($P<0,001$).

Tabela 3 – Título de anticorpos de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r

	IgG	IgG1	IgG2a	IgE
Sm22.6 IT	1: 1.310.720	1: 1.310.720	1: 163.840	1: 5.120
PBS IT (controle Sm22.6 IT)	1: 10.240	1: 10.240	1: 2.560	1: 320
Sm29 IT	1: 655.360	1: 655.360	1: 40.960	1: 320
PBS IT (controle Sm29 IT)	1: 10.240	1: 5.120	1: 2.560	1: 20
Sm22.6	1:1.310.720	1:2.621.440	1: 653.360	1: 1.280
PBS (controle Sm22.6)	1:2.560	1:160	1:2.560	1:20
Sm29	1:163.840	1:1.310.720	1:40.960	>1: 1.280
PBS (controle Sm29)	1:160	1:320	1:5.120	1:20
Sm29 ALUM	1:655.360	1: 2.621.440	1: 40.960	1: 1.280
PBS ALUM	1: 20.480	1: 10.240	1: 40.960	1: 20
Sm29 MPL	1: 327.680	1: 327.680	1:20.480	1: 640
PBS MPL	1: 10.240	1: 10.240	1:20.480	1: 80

5.2 Reconhecimento das proteínas nativas no tegumento do parasito por anticorpos de camundongos imunizados com Sm22.6r e Sm29r

Para avaliar se os anticorpos produzidos em resposta à imunização com as proteínas recombinantes Sm22.6 e Sm29 seriam capazes de reconhecer a forma nativa dessas proteínas, na superfície dos parasitos, um ensaio de imunofluorescência foi realizado utilizando esquistossômulos recém-transformados. Foi observado que os anticorpos produzidos por animais imunizados com as proteínas recombinantes foram capazes de reconhecerem e se ligarem às proteínas nativas expressas nas superfícies dos esquistossômulos (**Figura 17 a**). Análises da fluorescência observada mostraram que os esquistossômulos incubados com soros de animais imunizados com Sm29r ou Sm22.6r apresentaram uma fluorescência significativa quando comparado aos esquistossômulos que foram incubados com soros de camundongos inoculados com PBS (**Figura 17 b**). Nenhum reconhecimento inespecífico foi observado na superfície dos parasitos incubados com anti-IgG conjugado à FITC (**Figura 17 b**).

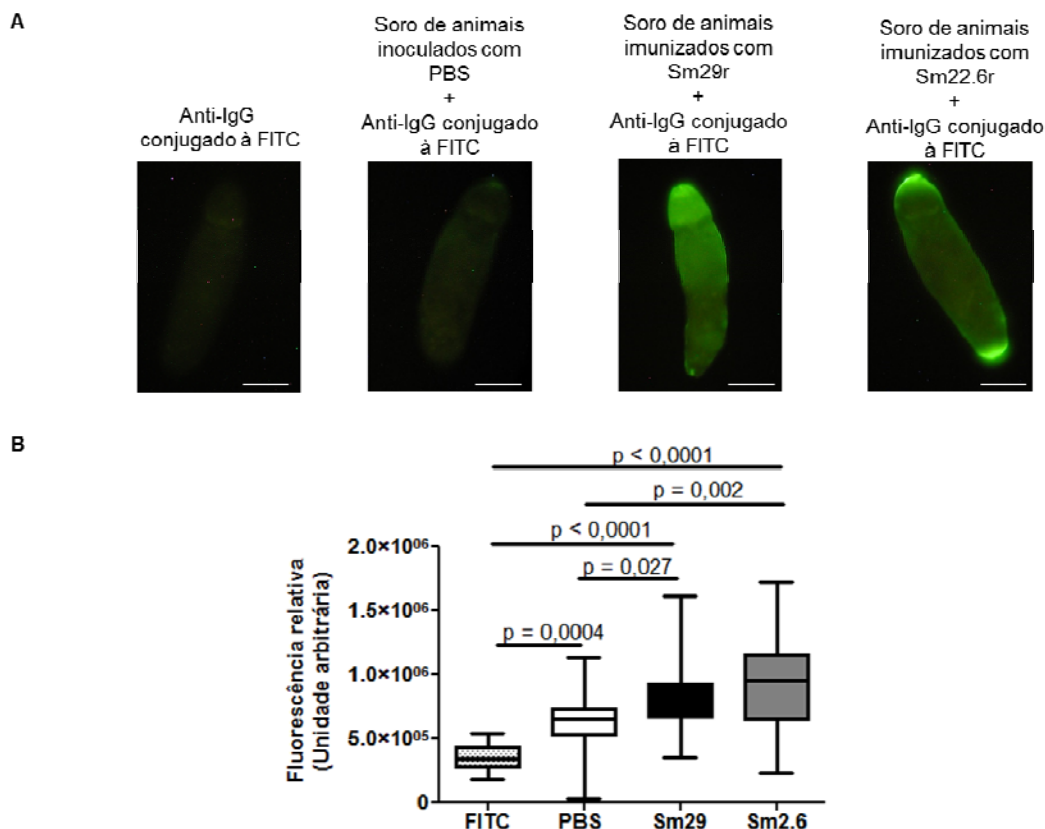


Figura 17 – Reconhecimento das proteínas nativas Sm22.6 e Sm29 na superfície de esquistossômulos por soro de camundongos imunizados. Esquistossômulos recém-transformados (a) foram incubados com soro de camundongos inoculados com PBS+CFA/IFA, imunizados com Sm29r+CFA/IFA ou imunizados com Sm22.6r+CFA/IFA. A reatividade dos anticorpos com as proteínas Sm29 e Sm22.6, nativas, presentes na superfície do parasito, foi detectada por anticorpos secundário anti-IgG conjugado à FITC. Como controle experimental, esquistossômulos foram incubados somente com anti-IgG conjugado à FITC. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência. Barra de escala: 25µg (400x). A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando o software ImageJ. O gráfico representa box plot com whiskers do mínimo e o máximo dos valores de fluorescência relativa (b). Diferenças significativas estão apontadas no gráfico.

5.3 Avaliação da produção de citocinas

Para avaliação da resposta imune celular dos animais imunizados dos grupos Sm22.6 IT, Sm29 IT e PBS IT, níveis de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram determinados em sobrenadante de cultura de esplenócitos. Esplenócitos de animais infectados e tratados, bem como, de animais naïve imunizados com três doses das proteínas (Sm29r e Sm22.6r), também foram utilizados para fins de comparação entre os grupos (**Figura 18**).

Camundongos, previamente infectados/tratados, imunizados com Sm22.6r apresentaram níveis significativos de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-17, após três doses da vacina, em comparação ao grupo PBS IT (**Figura 18**). Os animais do grupo Sm22.6 IT também apresentaram produção significativa de IL-2, TNF- α e IL-4 em relação aos animais infectados e tratados (**Figura 18**). Animais imunizados com Sm29r, previamente infectados e

tratados, apresentaram níveis significativos de IL-2, IFN- γ , IL-17 e IL-4, em relação aos animais do grupo PBS IT, sendo que, a produção de IL-4 também foi significativa em comparação com os animais infectados e tratados (**Figura 18**). O perfil de produção das citocinas aqui avaliadas foi semelhante entre animais, previamente infectados/tratados, imunizados com Sm22.6r ou Sm29r, e os animais naïve imunizados, exceto para os níveis de IL-10, os quais foram maiores nos animais naïve imunizados com Sm29r em relação aos animais Sm29 IT (**Figura 18**).

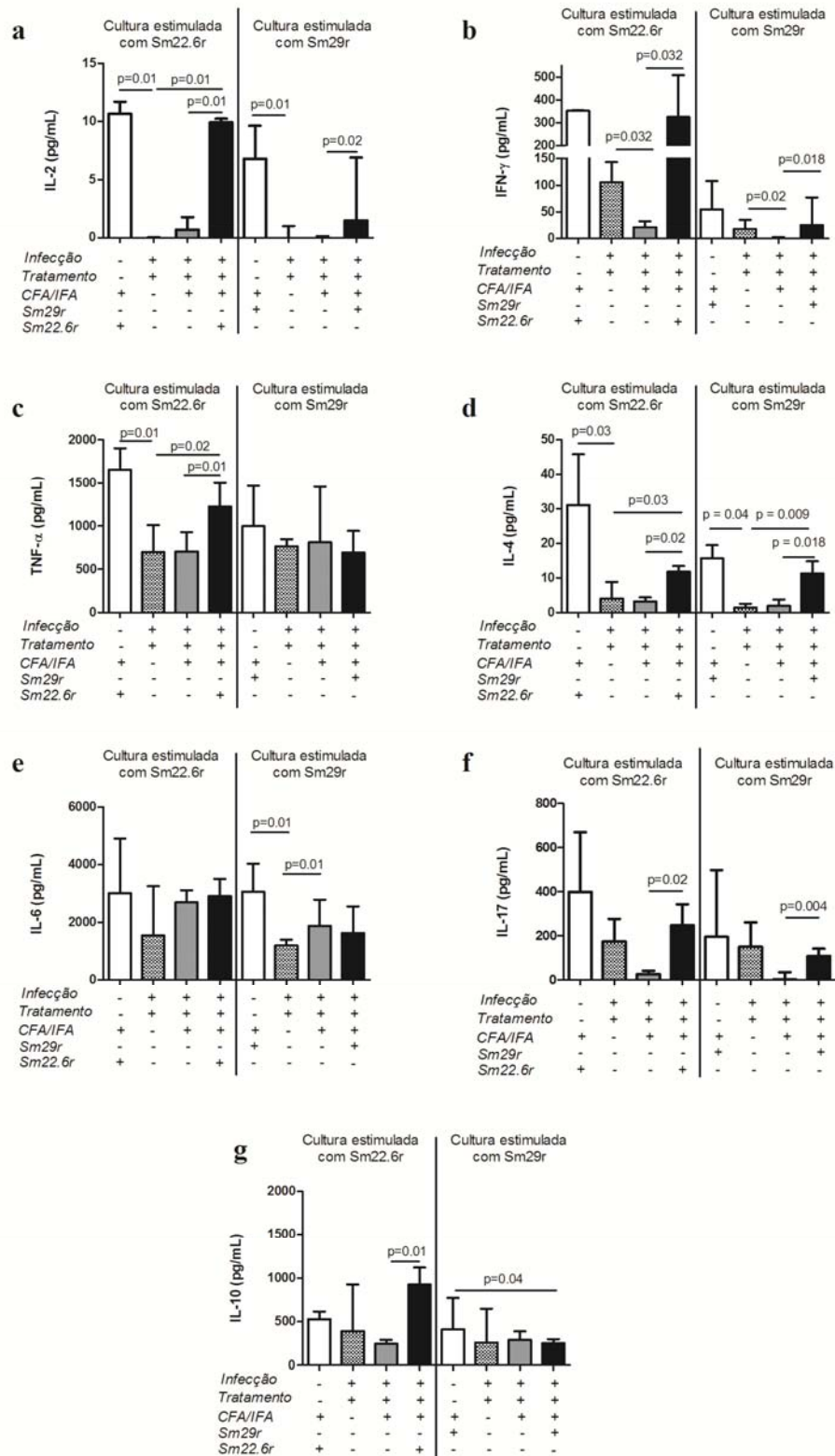


Figura 18 – Avaliação do perfil celular de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund. Sobrenadante de cultura dos esplenócitos de animais naïve ou previamente infectados/tratados, imunizados com Sm22.6r ou Sm29r, bem como, de animais infectados e tratados, foram utilizados para avaliação da produção das citocinas IL-2 (a), IFN- γ (b), TNF- α (c), IL-4 (d), IL-6 (e), IL-17 (f) e IL-10 (g) através da técnica de CBA. As barras representam a mediana com intervalo interquartil da diferença da produção das citocinas em resposta à Sm22.6r ou Sm29r e a produção basal das citocinas (observada nos esplenócitos não estimulados). A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas estão indicadas nos gráficos.

O perfil de resposta celular também foi avaliado em animais imunizados com formulações vacinais contendo a proteína Sm29r associada aos adjuvantes ALUM ou MPL (**Figura 19** e **Figura 20**). O sobrenadante de cultura de esplenócitos foi utilizado para avaliar a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 (**Figura 19**). Além disso, o percentual de linfócitos TCD4 produtores de IL-4, IFN- γ e IL-10 também foi determinado nesses grupos (**Figura 20**).

Nossos resultados mostram que a produção de IL-2, IL-17 e IL-10 foi maior no grupo Sm29 ALUM em relação ao grupo PBS ALUM. Já nos animais imunizados com Sm29r/MPL, foram observados níveis significativos de IL-2, IL-6 e IL-10 em relação ao grupo PBS MPL (**Figura 19**). Quando comparado os animais imunizados com as duas diferentes formulações adjuvantes, foram observados níveis significativos de IL-2 no grupo Sm29 ALUM em relação ao grupo Sm29 MPL. Esse, por sua vez, apresentou uma maior produção de TNF- α e IL-6 em relação aos animais imunizados com Sm29r/ALUM (**Figura 19**).

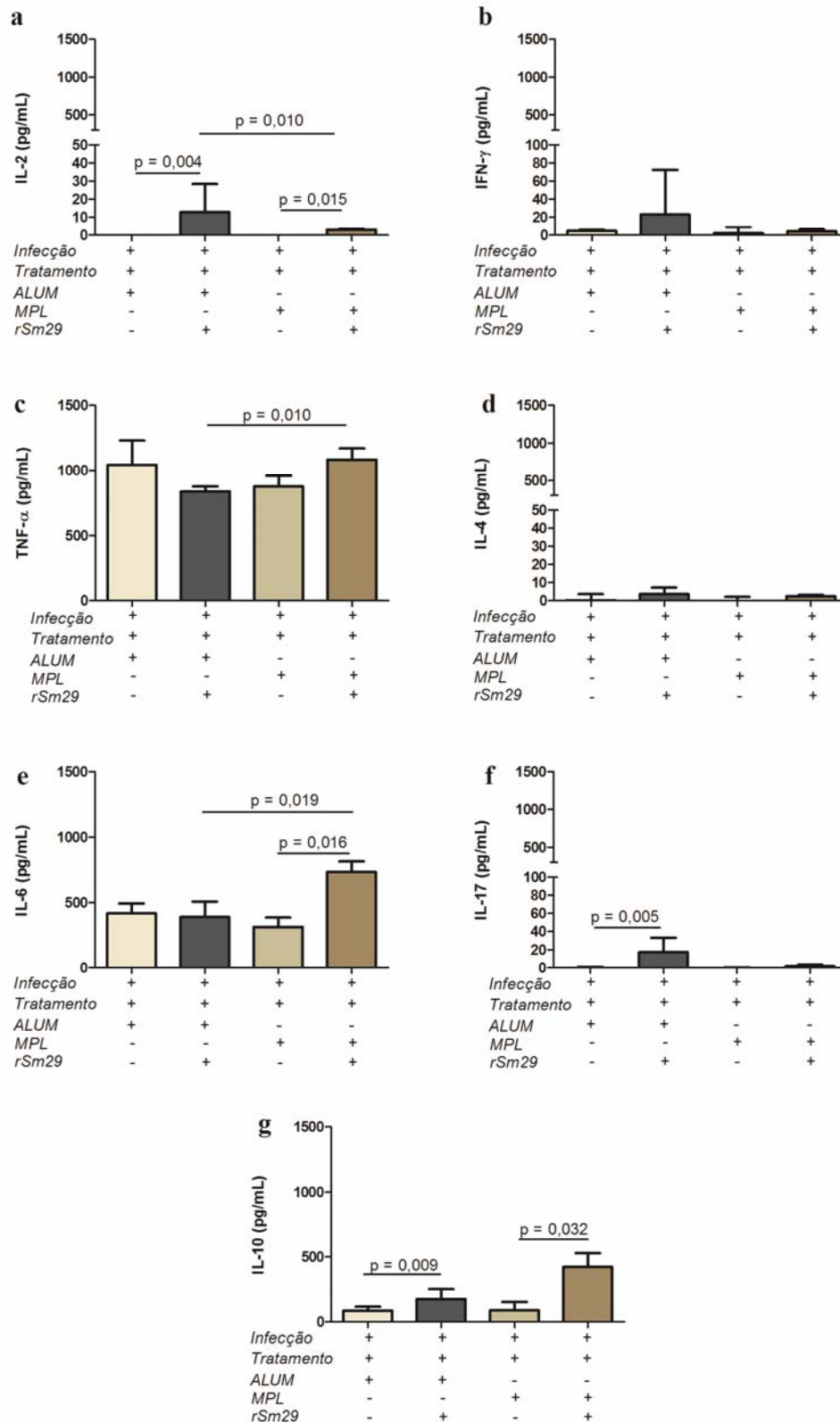


Figura 19 – Avaliação do perfil celular de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + ALUM ou MPL. Sobrenadante de cultura dos esplenócitos de animais imunizados com Sm29r +ALUM ou MPL foram utilizados para avaliação da produção das citocinas IL-2 (a), IFN- γ (b), TNF- α (c), IL-4 (d), IL-6 (e), IL-17 (f) e IL-10 (g) através da técnica de CBA. As barras representam a mediana com intervalo interquartil da diferença da produção das citocinas em resposta à Sm29r e a produção basal das citocinas (observada nos esplenócitos não estimulados). A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas estão indicadas nos gráficos.

Através da marcação intracitoplasmática de células TCD4, pudemos determinar o percentual de células TCD4⁺ produtoras de IL-4, IFN- γ e IL-10 (**Figura 20**). Não foi observado percentual significativo de células produtoras de IL-4 ou IL-10 em nenhum dos grupos imunizados. No grupo Sm29 ALUM foi identificado um percentual significativo de células produtoras de IFN- γ quando comparado aos animais PBS ALUM e aos camundongos imunizados com Sm29r/MPL (**Figura 20**).

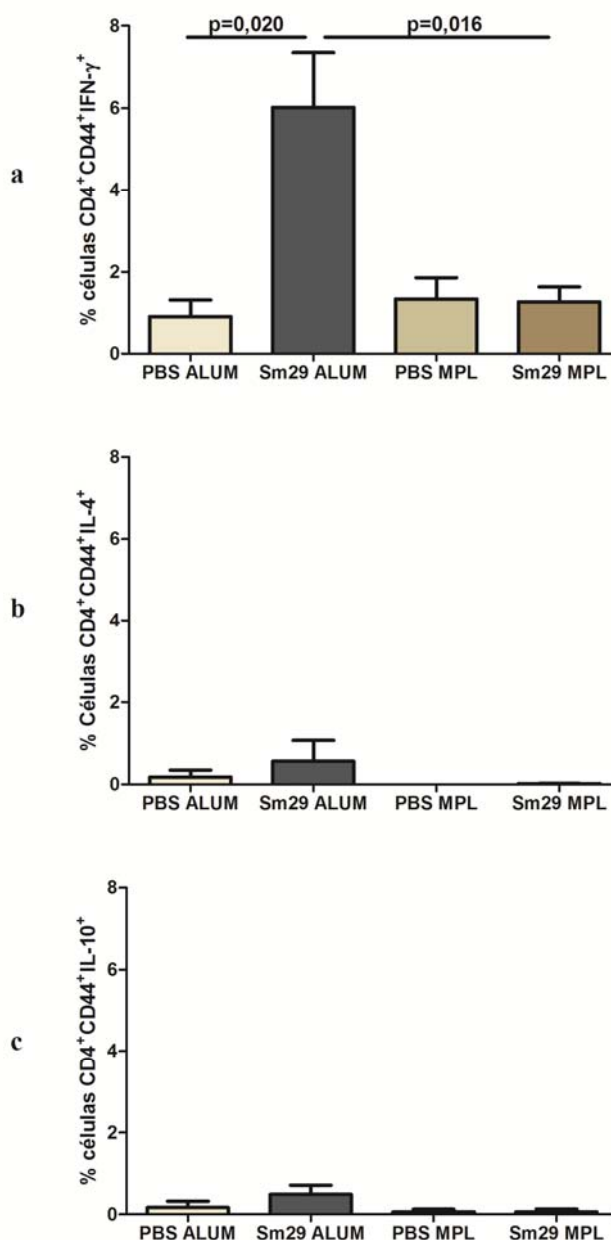


Figura 20 - Produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por células TCD4 dos grupos Sm29 ALUM, Sm29 MPL e seus controles. As células TCD4⁺ foram marcadas com anticorpos contra as citocinas IFN- γ (a), IL-4 (b) e IL-10 (c). As barras representam a média \pm erro padrão da diferença do percentual de células produtoras das citocinas, após estímulo com Sm29r, e o percentual de células produtoras das citocinas quando não estimuladas (produção basal). A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas estão indicadas nos gráficos.

A produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 também foi avaliada no contexto de subpopulações celulares, através da análise de combinação múltipla, as células TCD4⁺CD44⁺ foram caracterizadas em:

- Th1: positivas para IFN- γ e negativas para IL-4 e IL-10;
- Th2: positivas para IL-4 e negativas para IFN- γ e IL-10;
- Tr1: positivas para IL-10 e negativas para IFN- γ e IL-4;
- Th1/IL-10: positivas para IFN- γ e IL-10 e negativas para IL-4;
- Th2/IL-10: positivas para IL-4 e IL-10 e negativas para IFN- γ .

Nossos resultados demonstram um maior percentual de células Th1 no grupo imunizado com Sm29r/Alum em relação aos grupos PBS ALUM e Sm29 MPL. Um maior percentual de células Th1/IL-10 também foi observado no grupo Sm29 ALUM em relação ao grupo Sm29 MPL. A imunização com Sm29r/MPL diminui o percentual de células Th1/IL-10 e Tr1 em relação ao grupo PBS MPL (**Figura 21**).

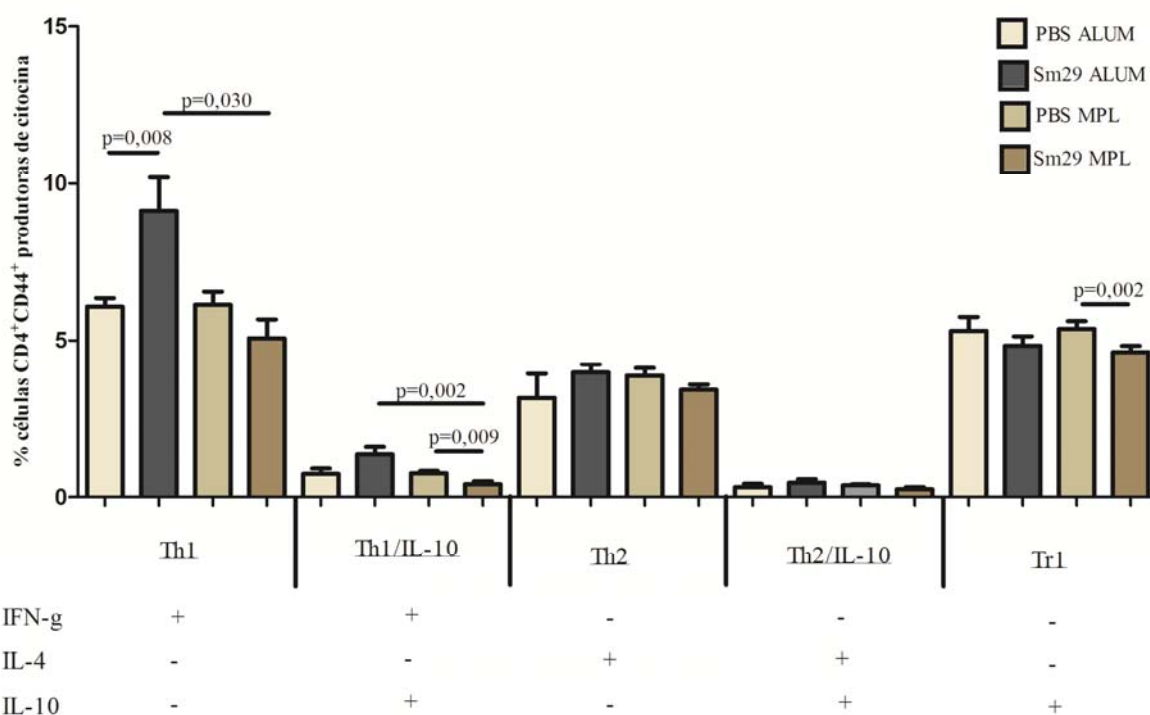


Figura 21 – Subpopulações de células TCD4⁺ nos grupos Sm29 ALUM, SM29 MPL e seus controles. A produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por células TCD4⁺CD44⁺ foi determinada através da análise de combinação de gates (“boolean gating”), a qual permite avaliar a produção de diferentes citocinas pela mesma célula. Foram consideradas as populações: Th1 (IFN- γ ⁺/IL-4⁻/IL-10⁻), Th1/IL-10 (IFN- γ ⁺/IL-4⁻/IL-10⁺), Th2 (IFN- γ ⁻/IL-4⁺/IL-10⁻), Th2/IL-10 (IFN- γ ⁻/IL-4⁺/IL-10⁺) e Tr1 (IFN- γ ⁻/IL-4⁻/IL-10⁺). As barras representam a média \pm erro padrão do percentual de células produtoras de citocinas, quando estimuladas por Sm29r. A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas entre os grupos estão indicadas nos gráficos.

5.4 Avaliação imunofenotípica dos camundongos imunizados

O perfil imunofenotípico dos animais, previamente infectados e tratados, imunizados com Sm22.6r ou Sm29r associado ao adjuvante de Freund, bem como, de animais naïve imunizados com mesma formulação vacinal foi determinado através de marcadores de ativação e memória imunológica.

A expressão dos marcadores de ativação CD25, CD69 e CD86 foi avaliada na superfície de linfócitos T e B, respectivamente. Um maior percentual de células B ativadas, CD19⁺CD86⁺, foi observado no grupo Sm22.6 IT quando comparado aos animais do grupo PBS IT. Com relação ao percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ ativadas, entretanto, não foi observado diferença significativa entre os animais do grupo Sm22.6 IT ou Sm29 IT e os animais PBS IT (**Figura 22**). Quando comparado animais BALB/c naïve com infectados/tratados, ambos imunizados com Sm29r, foi observado um maior percentual de células CD4⁺CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ nos animais previamente infectados e tratados (**Figura 22**). Camundongos previamente infectados e tratados, imunizados com Sm22.6r também apresentaram um maior percentual de CD4⁺CD69⁺ em relação aos animais naïve imunizados com a proteína (**Figura 22**). Em relação aos macrófagos ativados, não houve diferença entre os grupos (dados não mostrados).

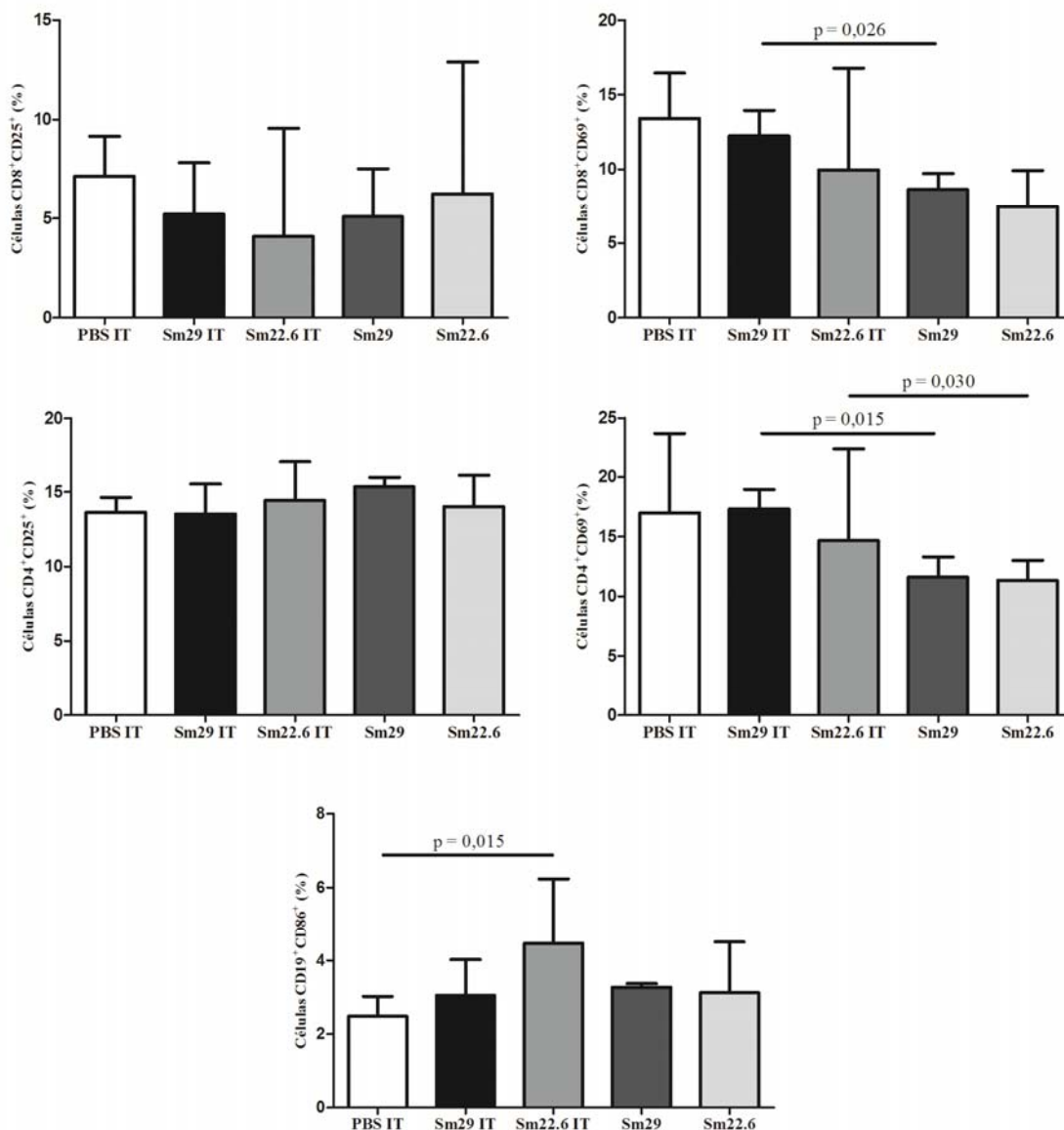


Figura 22 – Frequência de linfócitos ativados de animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund. Camundongos dos grupos PBS IT, Sm29 IT, Sm22.6 IT, Sm29 e Sm22.6 foram avaliados quanto a frequência de linfócitos ativados. As células foram marcadas com anticorpos, específicos para as moléculas de ativação CD25, CD69 e CD86, conjugados a diferentes fluorocromos. As células marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo. As barras representam mediana com intervalo interquartil do percentual de células expressando moléculas de ativação. A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas estão indicadas nos gráficos.

Em relação às células de memória, animais, previamente infectados/tratados, imunizados com Sm29r, apresentaram um maior percentual de células CD4⁺ de memória central em relação aos animais do grupo PBS IT (**Figura 23**). No entanto, não foram observadas diferenças significativas no percentual de células CD8⁺ de memória central, CD8⁺ e CD4⁺ de memória efetora ou de células B de memória, quando comparado animais, previamente infectados e tratados, imunizado com Sm22.6r ou Sm29r + adjuvante de Freund

com os animais do grupo PBS IT (**Figura 23**). Em relação aos animais BALB/c naïve imunizados, a vacinação de camundongos infectados/tratados com a proteína Sm29r induziu um maior percentual de células CD4⁺ de memória efetora que a imunização com Sm29r em camundongos naïve (**Figura 23**). A imunização de camundongos BALB/c naïve com Sm22.6r induziu um maior percentual de células CD8⁺ de memória central e células B de memória se comparado ao grupo Sm22.6 IT (**Figura 23**).

Os linfócitos TCD4 e B de memória também foram avaliados nos animais, infectados/tratados, imunizados com a proteína Sm29r/ALUM ou MPL. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à frequência de células TCD4 de memória (**Figura 24**). Quanto às células B de memória, os animais imunizados com Sm29r/ALUM apresentaram um maior percentual em relação aos animais do grupo controle (**Figura 24**).

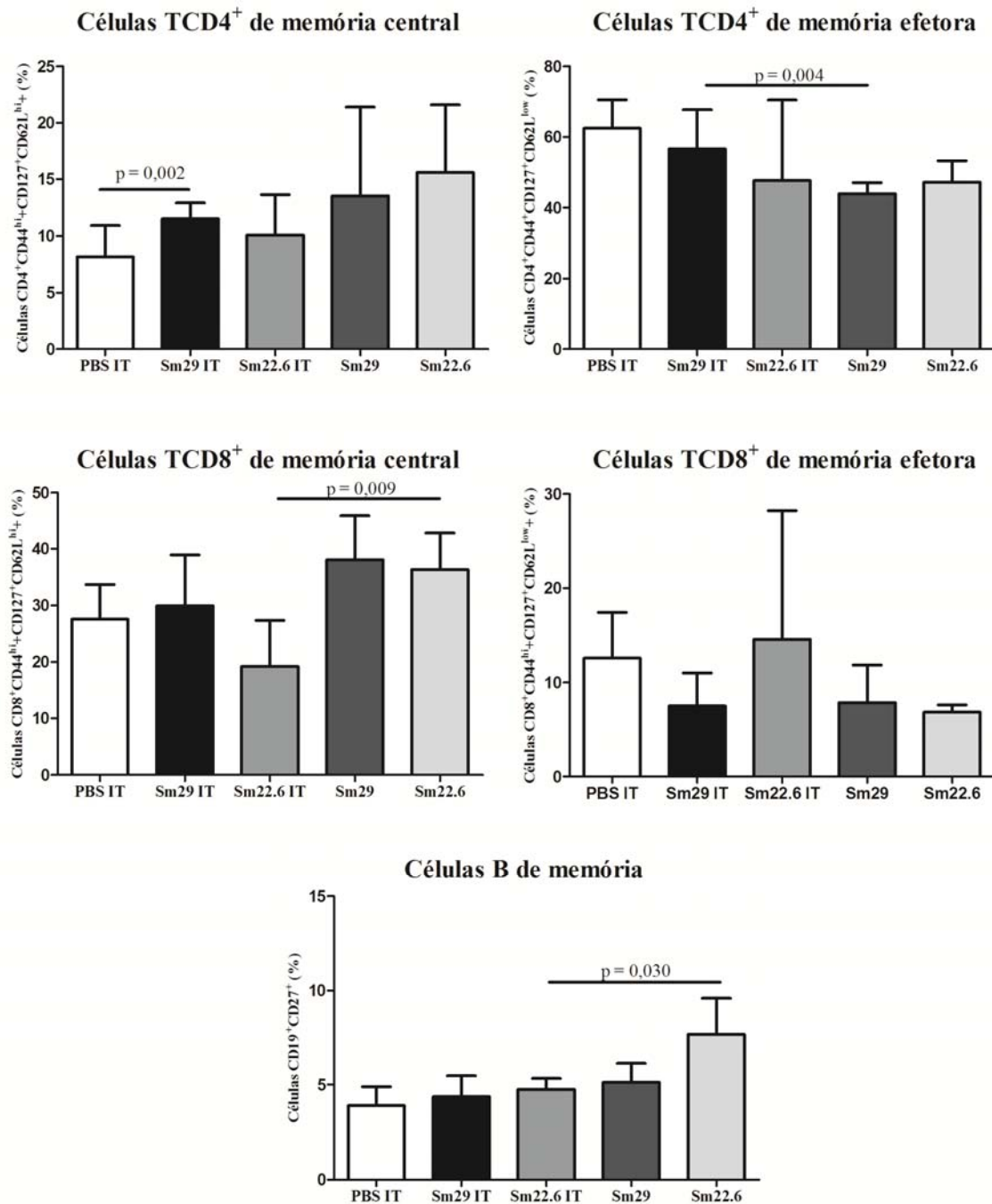


Figura 23 – Frequência de células de memória em animais imunizados com Sm22.6r e Sm29r + adjuvante de Freund. Camundongos dos grupos PBS IT, Sm29 IT, Sm22.6 IT, Sm29 e Sm22.6 foram avaliados quanto a frequência de células T e B de memória. As células foram marcadas com anticorpos, específicos para os marcadores de memória, conjugados a diferentes fluorocromos. As células marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo. As barras representam mediana com intervalo interquartil do percentual de células de memória. A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas estão indicadas nos gráficos.

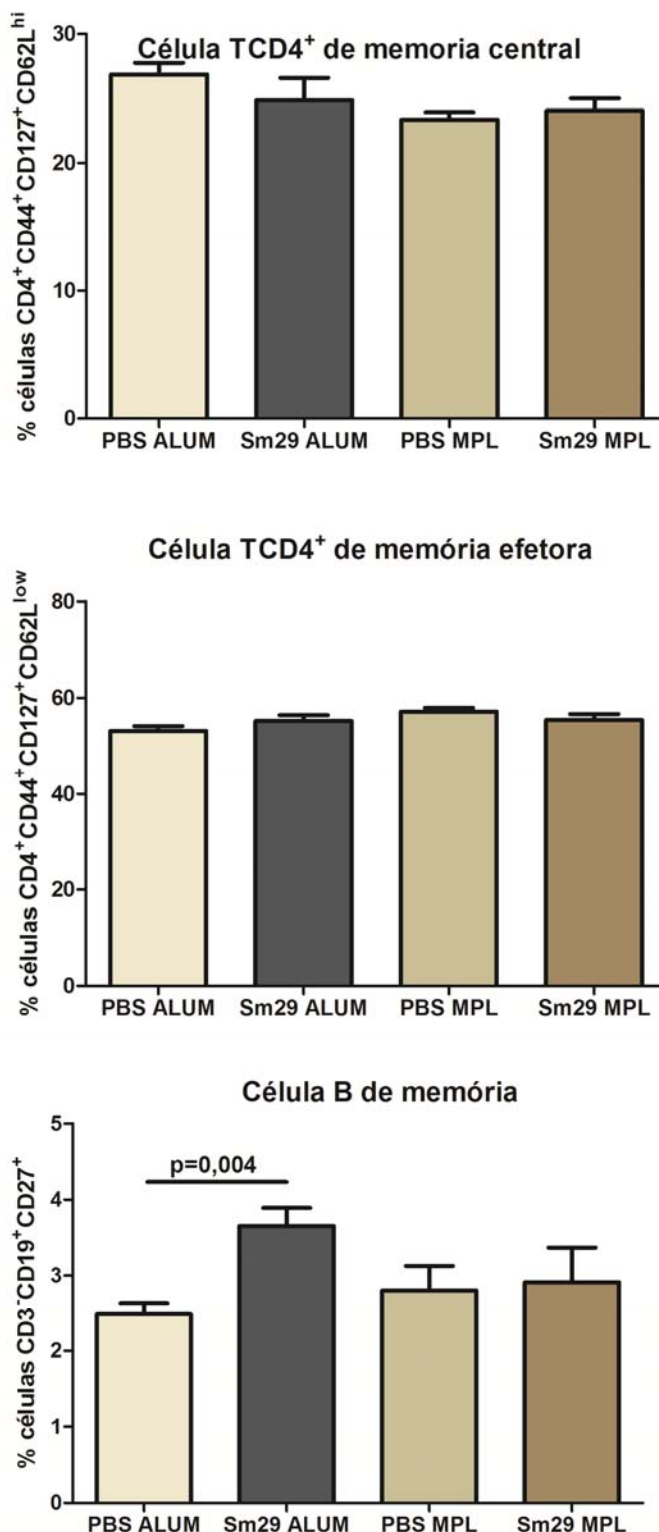


Figura 24 – Frequência de células de memória em animais imunizados com Sm29r + ALUM ou MPL. Camundongos dos grupos PBS ALUM, Sm29 ALUM, PBS MPL e Sm29 MPL foram avaliados quanto a frequência de células T e B de memória. As células foram marcadas com anticorpos, específicos para os marcadores de memória, conjugados a diferentes fluorocromos. As células marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo. As barras representam mediana com intervalo interquartil do percentual de células de memória. A análise estatística foi realizada através dos testes de Mann-Whitney. As diferenças significativas estão indicadas nos gráficos.

O quadro a seguir resume os principais resultados encontrados neste trabalho.

Quadro 3 – Principais resultados encontrados nos grupos imunizados: Sm22.6 IT, Sm22.6, Sm29 IT, Sm29, Sm29 ALUM, Sm29 MPL

	Sm22.6 IT	Sm22.6	Sm29 IT	Sm29	Sm29 ALUM	Sm29 MPL
Proteção	Não	Não	Sim (26%-48%)	Não	Sim (29%-37%)	Não
Redução no número de ovos no intestino	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não
Resposta humoral	IgG (1:1.310.720) IgG1 (1:1.310.720) IgG2a (1:163.840) IgE (1:5.120)	IgG (1:1.310.720) IgG1 (1:2.621.440) IgG2a (1:653.360) IgE (1:1.280)	IgG (1:655.360) IgG1 (1:655.360) IgG2a (1:40.960) IgE (1:320)	IgG (1:163.840) IgG1 (1:1.310.720) IgG2a (1:40.960) IgE (>1:1.280)	IgG (1:655.360) IgG1 (1:2.621.440) IgG2a (1:40.960) IgE (1:1.280)	IgG (1:327.680) IgG1 (1:327.680) IgG2a (1:20.480) IgE (1:640)
Resposta celular	IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17, IL-10	IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17, IL-10	IL-2, IFN-γ , IL-4, IL-17	IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-17	IL-2, IL-17 , IL-10 TCD4⁺IFN⁺	IL-2, IL-6, IL-10
Perfil imuno-fenotípico	Células B ativas		TCD4 de memória		Células B memória	

6 DISCUSSÃO

Atualmente, muitos são os esforços na busca por uma vacina para a esquistossomose, o que contribuiria de maneira efetiva para o controle da doença. Muitos candidatos vacinais já foram identificados e testados em ensaios pré-clínicos, os quais apresentaram bons resultados. Dentre essas candidatas, as proteínas recombinantes Sm22.6 e Sm29 induziram uma proteção parcial contra a infecção por *S. mansoni* em camundongos da linhagem C57BL/6 (Pacífico et al., 2006a; Cardoso et al., 2008).

No caso da esquistossomose, a população mais afetada pela doença, e por isso, a população alvo para uma vacina, é representada pelos moradores das áreas endêmicas, os quais estão em constante contato com o parasita através de diversas infecções ao longo do tempo. Essa situação permite que os indivíduos moradores de áreas endêmicas respondam de maneira diferente à estimulação antigênica quando comparado aos indivíduos que não tenham sido sensibilizados previamente por antígenos do parasito (moradores de áreas não endêmicas). Dessa forma, seria conveniente que, antes que os estudos com promissores candidatos vacinais seguissem para os testes clínicos, esses antígenos pudessem ser avaliados em modelos experimentais os quais já tenham sido sensibilizados pelo parasito, fato que aproximaria esses estudos à realidade das áreas endêmicas.

Neste trabalho, animais BALB/c, previamente infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel, foram submetidos a protocolos de imunização com duas promissoras candidatas vacinais a Sm22.6r e a Sm29r. A escolha pela linhagem BALB/c se deu em razão de o background genético desta linhagem ser Th2 (Watanabe et al., 2004), perfil imunológico semelhante ao identificado em indivíduos moradores de áreas endêmicas (Eloi-Santos et al., 1989; Joseph et al., 2004; Water et al., 2006).

Nossos resultados demonstraram que três doses da vacina, contendo Sm29r associada ao adjuvante de Freund, foram necessárias para induzir proteção em camundongos, previamente infectados e tratados, com redução significativa de vermes adultos recuperados. Essa redução, por sua vez, refletiu na diminuição significativa do número de ovos presentes no intestino desses animais. No entanto, não houve diferença no número de ovos presentes no fígado. Esse resultado pode ser explicado pela infecção prévia dos camundongos imunizados. Os ovos produzidos pelos vermes da primeira infecção, acumulados no fígado dos animais, pode ter sido um fator que mascarou a redução dos ovos, nestes animais, após imunização e nova infecção. Apesar de reduzir o número de vermes, a imunização não teve efeito sobre a patologia no fígado, já que não houve redução da área dos granulomas hepáticos. Assim, a

imunização com Sm29r/adjuvante de Freund não teria impacto sobre a patologia do indivíduo infectado, mas sim, sobre a transmissão da doença. A imunização com Sm22.6r/adjuvante de Freund, por sua vez, não foi capaz de induzir proteção, nem mesmo após três doses da vacina.

Uma vez que as proteínas Sm22.6r e Sm29r nunca tinham sido avaliadas em protocolos vacinais utilizando camundongos BALB/c naïve, nós também analisamos a habilidade dessas proteínas, quando formuladas com adjuvante de Freund, em conferir proteção nesta linhagem murina, porém, nenhuma das duas proteínas foi capaz de reduzir a carga parasitária. Nossos resultados diferem dos resultados encontrados por Pacífico e colaboradores (2006a) e Cardoso e colaboradores (2008) os quais demonstraram uma proteção de 34,5% e 51% na carga parasitárias de animais C57BL/6 naïve imunizados com três doses da proteína Sm22.6r e Sm29r, respectivamente.

Diante dos resultados promissores observados com a Sm29r, em camundongos infectados e tratados, nós avaliamos essa proteína em outras duas formulações vacinais, utilizando os adjuvantes Alum e MPL. Por serem licenciados para o uso em seres humanos (Tagliabue e Rappuoli, 2008), essa avaliação se mostra importante, já que o adjuvante de Freund tem sérias limitações acerca de seu uso. Nossos resultados demonstraram que somente a formulação vacinal contendo Sm29r associada ao Alum foi capaz de conferir proteção nos animais imunizados, através da redução significativa da carga parasitária, o que refletiu na diminuição do número de ovos presentes no intestino.

Alguns estudos têm demonstrado a importância dos anticorpos na proteção induzida pela imunização. Esses estudos demonstram que os anticorpos estão envolvidos na eliminação do parasito (Torben et al., 2011; Torben et al., 2012; Melo et al., 2014). Baseado nisso é necessário que seja avaliada a habilidade dos anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes, após imunização, em reconhecerem as proteínas nas formas nativas. Nossos resultados demonstram que a imunização com Sm22.6 e Sm29 recombinantes induziu a produção de anticorpos capazes de reconhecer e se ligarem às proteínas nativas encontradas na superfície do parasito.

Nossos resultados mostram uma resposta humoral vigorosa, com níveis significativos de IgG, IgG1, IgG2a e IgE nos animais infectados e tratados, imunizados com Sm29r ou Sm22.6r/adjuvante de Freund. A resposta humoral induzida pela imunização com Sm22.6r foi observada desde a primeira dose da vacina. Nossos resultados corroboram com os estudos realizados em camundongos C57BL/6 naïve, imunizados com Sm22.6r juntamente com os adjuvantes de Freund ou Alum, os quais demonstraram uma produção significativa de IgG a partir da primeira dose (Pacífico et al., 2006a; Pacífico et al., 2006b). Porém, assim como nos

camundongos C57BL/6 imunizados com Sm22.6r/Alum (Pacífico et al., 2006b), nós não observamos uma redução significativa na carga parasitária, sugerindo que a imunoglobulina IgG não apresenta um papel importante na eliminação dos vermes nesses animais.

Muitos estudos já demonstraram a importância da imunoglobulina IgE na eliminação do parasito e na resistência à reinfecção de indivíduos moradores de áreas endêmicas (Dunne et al., 1992; Capron e Capron, 1994; King et al., 1997; Caldas et al., 2000; Walter et al., 2006; Pinot de Moira et al., 2010). Um importante mecanismo envolvido na eliminação do parasito é mediado por IgE e eosinófilos, no qual, na presença de IgE, os eosinófilos podem matar os esquistossômulos através de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) (Capron e Capron, 1994; Nutten et al., 1997). Nesse contexto, alguns estudos demonstraram que indivíduos que apresentam resistência à reinfecção exibem elevados níveis de IgE, associado à baixa produção de IgG4 contra antígenos do parasito (Caldas et al., 2000; Pinot de Moira et al., 2010). Muitos desses estudos demonstram que essa resistência está relacionada, principalmente, a uma resposta contra a proteína Sm22.6 (SmTAL1) (Webster et al., 1996; Walter et al., 2006; Fitzsimmons et al., 2007; Fitzsimmons et al., 2012; Pinot de Moira et al., 2013a; Pinot de Moira et al., 2013b). Esses estudos apontam que, após o tratamento, os indivíduos apresentam altos níveis de IgE específicos para Sm22.6, provavelmente devido ao aumento da exposição da proteína, em decorrência da morte dos parasitos, o que facilita o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. De fato, camundongos previamente infectados e tratados, imunizados com Sm22.6r, exibiram títulos mais altos de IgE anti-Sm22.6r quando comparado aos animais naïve, imunizados com a proteína. Porém, as doses de reforço administradas nos camundongos do grupo Sm22.6 IT não foram capazes de aumentar os níveis de IgE específicos. Considerando que o anticorpo IgE, anti-Sm22.6r, seja um fator crucial para o aparecimento da resistência, a ausência de proteção observada nos animais imunizados com Sm22.6r pode estar associada à carência da expressão dos receptores Fc-ε em eosinófilos murinos (de Andres et al., 1997). Por isso, o uso de outros modelos experimentais se faz necessário para confirmar a incapacidade da Sm22.6 em induzir proteção nos animais previamente sensibilizados com antígenos do parasito.

Em camundongos BALB/c imunizados com Sm29r/adjuvante de Freund, observamos que a produção de IgG, IgG1, IgG2a e IgE alcança os maiores níveis após as três doses da vacina, o que coincide com o número de doses necessárias para conferir proteção nos camundongos, previamente infectados e tratados.

Nos animais, infectados e tratados, imunizados com Sm29r/Alum, assim como nos camundongos Sm29/CFA/IFA, formulações vacinais protetoras, foi observado maiores níveis

de IgG, IgG1, IgG2a e IgE após três doses da vacina, sendo que desde a primeira dose, a produção de IgG, IgG1 e IgE foi significativa em relação ao controle. Esses animais apresentaram títulos mais altos de todos os anticorpos avaliados em relação aos animais imunizados com Sm29r/MPL, formulação vacinal que não conferiu proteção, sugerindo que a resposta humoral mais fraca tem impacto na ausência de proteção nestes animais.

Em relação ao perfil celular, os camundongos BALB/c, previamente infectados e tratados, imunizados com Sm22.6r apresentaram um aumento significativo de IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17, demonstrando que a formulação vacinal induziu um perfil celular misto, similar ao encontrado nos animais BALB/c naïve imunizados ou nos camundongos C57BL/6 naïve imunizados (Pacífico et al., 2006a). Apesar da produção significativa de citocinas pró-inflamatórias, altos níveis de IL-10 também foram produzidos. A IL-10 é uma importante citocina reguladora que modula a resposta imune desencadeada pela infecção por *S. mansoni* (Mahanty e Nutman, 1995; Malaquias et al., 1997; Sadler et al., 2003; Araújo et al., 1996). Quantidades significativas de IL-10 também foram observadas em camundongos C57BL/6 naïve, imunizados com Sm22.6/Alum ou sem adjuvante, formulações vacinas que também não conferiram proteção contra a infecção pelo parasito (Pacífico et al., 2006b). Altos níveis de IL-10 também foram associados à ausência de proteção observada em animais imunizados com o tegumento de esquistossômulo sem adjuvante (Araujo et al., 2012). Porém, se a produção de IL-10 é responsável pela ausência de proteção observada em animais imunizados com Sm22.6 ainda é um fato que precisa ser investigado.

Diferentemente do que foi observado por Cardoso e colaboradores (2008), os quais demonstraram uma significativa produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 em camundongos C57BL/6 naïve imunizados com Sm29/Freund, nossos resultados demonstram que a imunização de animais BALB/c com Sm29r, independentemente de serem naïve, ou sensibilizados previamente, induziu uma produção significativa de IL-2, IFN- γ , IL-17 e IL-4. Diferenças entre camundongos BALB/c naïve e infectados/tratados quanto ao perfil de citocinas produzidas foi observada somente em relação aos níveis de IL-10, os quais foram maiores nos camundongos naïve (animais que não apresentaram proteção).

No grupo imunizado com Sm29/Alum, foi possível observar uma produção significativa de IL-2, IL-17 e IL-10. Os animais imunizados com Sm29/MPL, por sua vez, apresentaram níveis significativos de IL-2, IL-6 e IL-10. A citocina IL-2, porém, apresentou maiores níveis nos animais Sm29 ALUM, grupo que apresentou redução na carga parasitária, em relação aos animais imunizados com Sm29r/MPL, formulação vacinal que não foi protetora. A IL-2 é uma citocina que está relacionada à proliferação de células T, promovendo

também sua diferenciação em células Th1 e Th2, além de induzir a atividade citolítica de células NK e TCD8⁺ (Liao et al., 2013). De fato, os animais imunizados com Sm29/Alum apresentaram um percentual maior de células TCD4 produtoras de IFN- γ quando comparado aos animais do grupo Sm29 MPL, em culturas estimuladas com a proteína Sm29r. Nos animais do grupo Sm29 MPL, no entanto, não foi observado percentual significativo de células TCD4 produtoras das citocinas aqui avaliadas. Diante desses resultados podemos inferir que esteja havendo uma modulação da resposta imune nos animais do grupo Sm29 MPL, modulação esta que também pode ser notada pelo baixo título de anticorpos, específicos para a proteína Sm29r, encontrado nesses animais. Assim, a produção significativa das citocinas IL-2, IL-6 e IL-10, observada nesses animais, pode estar relacionada à uma maior participação de células do sistema imune inato. A participação de células do sistema imune inato é de muita importância para o início da resposta desencadeada por uma vacina, processo no qual os adjuvantes são essenciais (Coffman et al., 2010). Porém, para uma vacina, a resposta imune deve ter uma fundamental participação dos componentes do sistema imune adaptativo os quais induzirão memória imunológica, importante para desencadear uma resposta protetora (Lees e Farber, 2010).

Diante da importância das células de memória para a proteção, nós também avaliamos o percentual de células T e B de memória nos animais imunizados. Nossos resultados demonstraram que os animais, previamente infectados, imunizados com Sm29r/Freund apresentaram um aumento significativo no percentual de células TCD4 de memória central quando comparado aos animais de seu grupo controle. Além disso, os animais do grupo Sm29 IT também apresentaram um aumento significativo no percentual de células TCD4 de memória efetora quando comparado aos animais naïve imunizados com a proteína. Os camundongos imunizados com Sm29r/Alum, por sua vez, apresentaram um maior percentual de células B de memória em relação aos animais do grupo PBS ALUM. Considerando que a proteção foi observada somente nos grupos de animais, infectados/tratados, imunizados com Sm29r associada à Freund ou Alum, podemos sugerir que as células de memória possam ter um importante papel na eliminação do parasito.

Embora a infecção por helmintos esteja associada à falha na imunidade protetora desencadeada por vacinas contra outras doenças/patógenos, tais como, tétano, cólera, tuberculose e malária (Sabin et al., 1996; Cooper et al., 2001; Su et al., 2006; Elias et al., 2006; Borkow e Bentwich, 2008), a partir dos resultados obtidos neste trabalho pudemos observar que uma infecção previa contribuiu para a construção de uma imunidade protetora contra a infecção por *S. mansoni*, após a imunização dos animais BALB/c. O tratamento dos

animais antes da imunização pode ter contribuído para o sucesso da vacina, aumentando a frequência de células de memória ou diminuindo a produção de IL-10 nos animais infectados e tratados, imunizados com Sm29r em comparação aos animais naïve imunizados. Porém, para uma melhor compreensão dos mecanismos essenciais para o estabelecimento da resposta protetora desencadeada pela vacina, seria importante entender o papel central da Sm29 no desenvolvimento e na sobrevivência do parasito. Atualmente, ainda não há informação acerca da função da Sm29, porém, análises funcionais utilizando técnicas de RNA de interferência (RNAi) podem trazer valiosas informações, as quais irão contribuir para o aprimoramento das estratégias vacinais, colaborando efetivamente para a eliminação do parasito e controle da doença. Além disso, também seria importante esclarecer o papel das células de memória, dos anticorpos e de citocinas como IFN- γ e IL-17 na proteção desencadeada pela imunização de camundongos, previamente infectados e tratados, com Sm29r/CFA/IFA ou ALUM, através da transferência desses componentes para camundongos naïve e uso de camundongos *knockout* para as citocinas.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmam o papel imunoprotetor da proteína Sm29r, reforçando seu potencial como candidata a compor uma vacina para a esquistossomose. Apesar da proteína não ter sido capaz de induzir proteção em animais BALB/c naïve, o fato da imunização de animais, previamente infectados e tratados, ter desencadeado proteção, sugere que a vacinação de indivíduos moradores de áreas endêmicas possa ser efetiva contra o *Schistosoma mansoni*, já que é uma população sensibilizada por antígenos do parasito.

8 ANEXOS

8.1 Licença do CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



CEUA
Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-12/12

Certificamos que o protocolo (P-38/11-4), intitulado "Avaliação da imunoproteção induzida pelas proteínas Sm29 e Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* em camundongos primoinfectados e tratados", 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 19/03/2016 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 840 Fêmeas de BALB/c, Idade: 6 Semana(s).

Rio de Janeiro, 19 de março de 2012

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

8.2 Artigo publicado referente ao trabalho de doutorado



RESEARCH ARTICLE

Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection

Clarice Carvalho Alves¹, Neusa Araujo¹, Viviane Cristina Fernandes dos Santos¹, Flávia Bubula Couto¹, Natan R. G. Assis², Suellen B. Morais², Sérgio Costa Oliveira^{2,3}, Cristina Toscano Fonseca^{1,3*}

1 Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **2** Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **3** Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), CNPq, MCT, Salvador, Bahia, Brasil

* ctoscano@cpqrr.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Alves CC, Araujo N, dos Santos VCF, Couto FB, Assis NRG, Morais SB, et al. (2015) Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 9(2): e0003537. doi:10.1371/journal.pntd.0003537

Editor: David Joseph Diemert, The George Washington University Medical Center, UNITED STATES

Received: September 3, 2014

Accepted: January 14, 2015

Published: February 27, 2015

Copyright: © 2015 Alves et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by CNPq/Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde—Papes VVFiocruz—grant number: 407702/2012-1 (PI: CTF); CNPq/Programa de Excelência em Pesquisa—Proep/CPqRR grant number:402010/2012-4(PI:CTF) and Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz—grant number: 006.8315.108.06490 (PI:CTF). The funders had no role in study design,

Abstract

Background

A vaccine against schistosomiasis would have a great impact in disease elimination. Sm29 and Sm22.6 are two parasite tegument proteins which represent promising antigens to compose a vaccine. These antigens have been associated with resistance to infection and reinfection in individuals living in endemic area for the disease and induced partial protection when evaluated in immunization trials using naïve mice.

Methodology/principals findings

In this study we evaluated rSm29 and rSm22.6 ability to induce protection in Balb/c mice that had been previously infected with *S. mansoni* and further treated with Praziquantel. Our results demonstrate that three doses of the vaccine containing rSm29 were necessary to elicit significant protection (26%–48%). Immunization of mice with rSm29 induced a significant production of IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-4; significant production of specific antibodies; increased percentage of CD4+ central memory cells in comparison with infected and treated saline group and increased percentage of CD4+ effector memory cells in comparison with naïve Balb/c mice immunized with rSm29. On the other hand, although immunization with Sm22.6 induced a robust immune response, it failed to induce protection.

Conclusion/significance

Our results demonstrate that rSm29 retains its ability to induce protection in previously infected animals, reinforcing its potential as a vaccine candidate.

8.3 Revisões publicadas dentro do assunto do trabalho de doutorado

Review Article

Schistosoma Tegument Proteins in Vaccine and Diagnosis Development: An Update

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

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

² 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

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 schistosomula 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.

frontiers in
IMMUNOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 09 March 2015
doi: 10.3389/fimmu.2015.00095



Eliminating schistosomes through vaccination: what are the best immune weapons?

Cristina Toscano Fonseca^{1,2*}, Sergio Costa Oliveira^{2,3} and Clarice Carvalho Alves¹

¹ Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³ Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Edited by:

Ahmad Ali Othman, Tanta Faculty of Medicine, Egypt

Reviewed by:

Peter Timmerman, Pepsican Therapeutics B.V., Netherlands
Afzal A. Siddiqui, Texas Tech University Health Sciences Center, USA

*Correspondence:

Cristina Toscano Fonseca, Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715 Sala 212, Belo Horizonte, Minas Gerais 30190-002, Brazil
e-mail: ctoscano@cpqrr.fiocruz.br

The successful development of vaccines depends on the knowledge of the immunological mechanisms associated with the elimination of the pathogen. In the case of schistosomes, its complex life cycle and the mechanisms developed to evade host immune system, turns the development of a vaccine against the disease into a very difficult task. Identifying the immunological effector mechanisms involved in parasite attrition and the major targets for its response is a key step to formulate an effective vaccine. Recent studies have described some promising antigens to compose a subunit vaccine and have pointed to some immune factors that play a role in parasite elimination. Here, we review the immune components and effector mechanisms associated with the protective immunity induced by those vaccine candidates and the lessons we have learned from the studies of the acquired resistance to infection in humans. We will also discuss the immune factors that correlate with protection and therefore could help to evaluate those vaccine formulations in clinical trials.

Keywords: schistosome vaccine, protective immunity, schistosomiasis, effector mechanisms, immune response

8.4 Artigos publicados com parceiros durante o período de doutorado

Acta Tropica 124 (2012) 140–146



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

Juliano Michel Araujo^{a,1}, Tatiane Teixeira de Melo^{a,1}, Isabela Campos de Sena^a, Clarice Carvalho Alves^a, Neusa Araujo^a, Fernanda do Valle Durães^b, Sergio Costa Oliveira^b, Cristina Toscano Fonseca^{a,c,*}

^a Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Biotecnologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil



www.elsevier.com/locate/micinf

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^{a,1}, Juliano Michel Araujo^{a,1}, Isabela Campos de Sena^a, Clarice Carvalho Alves^a, Neusa Araujo^a, Cristina Toscano Fonseca^{a,b,*}

^a Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b 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

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad G, Zhang W, Torben W, Noor Z, Siddiqui AA. Protective effects of Sm-p80 in the presence of resiquimod as an adjuvant against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mice. *Int J Infect Dis* 2010 14:e781-7.

Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 101:79-85.

Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol*. 2009 31:656-663.

Araujo JM, de Melo TT, de Sena IC, Alves CC, Araujo N, Durães Fdo V, Oliveira SC, Fonseca CT. *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4⁺ cells and failed to protect mice against challenge infection. *Acta Trop*. 2012 124:140-146.

Araújo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol*. 1996 26:1399-13403.

Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*. 1993 14:281-284.

Balloul JM, Grzych JM, Pierce RJ, Capron A. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J Immunol*. 1987 138:3448-3453.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PM, Sampaio IB. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1978 20:121-132.

Bickle QD. Radiation-attenuated schistosome vaccination--a brief historical perspective. *Parasitology*. 2009 136:1621-1632.

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001 70:849-860.

Bina JC, Prata A. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 36:211-216.

Borkow G, Bentwich Z. Chronic parasite infections cause immune changes that could affect successful vaccination. *Trends Parasitol* 2008 24:243-245.

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 13:473-490.

Boulanger D, Warter A, Sellin B, Lindner V, Pierce RJ, Chippaux JP, Capron A. Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. *Vaccine*. 1999 17:319-326.

Boulanger D, Warter A, Trottein F, Mauny F, Brémond P, Audibert F, et al. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immunol* 1995 17:361-369.

Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics*. 2006 5:347-356.

Brindley, PJ, Sher, A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol*. 1987 139:215-220.

Brito CF, Fonseca CT, Goes AM, Azevedo V, Simpson AJ, Oliveira SC. Human IgG1 and IgG3 recognition of *Schistosoma mansoni* 14kDa fatty acid-binding recombinant protein. *Parasite Immunol*. 2000 22:41-48.

Brito CF, Oliveira GC, Oliveira SC, Street M, Riengrojpitak S, Wilson RA, 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 Res* 2002 35:377-381.

Broderson JR. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci*. 1989 39:400-405.

Burgess A, Vigneron S, Brioude E, Labbé JC, Lorca T, Castro A. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 107:12564-12569.

Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2009 31:163-176.

Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA, David JR. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J Immunol*. 1979 122:221-229.

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop*. 2008 108:109-117.

Caldas IR, Correia-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massara CL, et al. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg* 2000 62:57-64.

Capron M, Capron A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science* 1994 264:1876-1877.

Capron A, Dessaint JP, Capron M, Ouma JH, Butterworth AE. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science* 1987 238:1065-1072.

Cardoso FC, Macedo GC, Gaya E, Kitten GT, Mati VL, de Melo AL, Caliari MV, Almeida GT, Venancio TM, Verjovski-Almeida S, Oliveira SC. *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:e308.

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*. 2006a 144:382-391.

Cardoso FC, Pinho JM, Azevedo V, Oliveira SC. Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. *Genet Mol Res*. 2006b 5:609-618.

Carlier Y, Nzeyimana H, Bout D, Capron A. Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni*-infected African parturients and their newborn children. *Am J Trop Med Hyg*. 1980 29:74-81.

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

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010 33:492-503.

Cooper PJ, Chico M, Sandoval C, Espinel I, Guevara A, Levine MM, Griffin GE, Nutman TB. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect Immun* 2001 69:1574-1580.

Corrêa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcão PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-Filho OA, Wilson RA, Gazzinelli G. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998 31:171-7.

Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, Golgher DB, Katz N, Bahia LG, et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989 83:798-804.

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

Curti E, Kwityn C, Zhan B, Gillespie P, Brelsford J, Deumic V, Plieskatt J, Rezende WC, Tsao E, Kalampanayil B, Hotez PJ, Bottazzi ME. Expression at a 20L scale and purification of the extracellular domain of the *Schistosoma mansoni* TSP-2 recombinant protein: a vaccine candidate for human intestinal schistosomiasis. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 9:2342-2350.

Da'dara AA, Skelly PJ, Wang MM, Harn DA. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine*. 2001 20:359-369.

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.

de Andres B, Rakasz E, Hagen M, McCormik ML, Mueller AL, et al. Lack of Fc-epsilon receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections. *Blood* 1997 89:3826-3386.

De Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, Thiriart C, Urbain J, Moser M. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol*. 2000 12:807-815.

de Jesus AR, Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, de Jesus AA, et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun*. 2004 72:3391-3397.

de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, de Almeida RP, et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis.* 2002 185:98-105.

Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Ouma JH, Sturrock RF. Human IgE responses to *Schistosoma mansoni* and resistance to reinfection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992 87:99-103.

Dupré L, Kremer L, Wolowczuk I, Riveau G, Capron A, Loch C. Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. *Vaccine* 2001 19:1373-80.

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 125:72-7.

Elias D, Akuffo H, Britton S. Helminthes could influence the outcome of vaccines against TB in the tropics. *Parasite Immunol* 2006 28:507-513.

Eloi-Santos SM, Novato-Silva E, Maselli VM, Gazzinelli G, Colley DG, Correa-Oliveira R. Idiotypic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J Clin Invest.* 1989 84:1028-1031.

Embry CA, Franchi L, Nuñez G, Mitchell TC. Mechanism of impaired NLRP3 inflammasome priming by monophosphoryl lipid A. *Sci Signal.* 2011 4:ra28.

Erasmus, DA. Structural and metabolic changes in female *Schistosoma mansoni* following male stimulation. *Journal of Chemical Ecology*, 1986 12:1755-1764.

Ewaisha RE, Bahey-El-Din M, Mossallam SF, Amer EI, Aboushleib HM, Khalil AM. Combination of the two schistosomal antigens Sm14 and Sm29 elicits significant protection against experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Exp Parasitol* 2014 145:51-60.

Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, et al. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol.* 1998 20:447-454.

Fernandes JS, Araujo MI, Lopes DM, de Souza Rda P, Carvalho EM, Cardoso LS. Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. *Mediators Inflamm.* 2014 2014:703653.

Fitzsimmons CM, Jones FM, Stearn A, Chalmers IW, Hoffmann KF, et al. The *Schistosoma mansoni* tegumental-allergen-like (TAL) protein family: influence of developmental expression on human IgE responses. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 6: e1593.

Fitzsimmons CM, McBeath R, Joseph S, Jones FM, Walter K, et al. Factors affecting human IgE and IgG responses to allergen-like *Schistosoma mansoni* antigens: Molecular structure and patterns of in vivo exposure. *Int Arch Allergy Immunol* 2007 142:40-50.

Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, Seamone ME, Vilaysane A, Mucsi AD, Fong Y, Prenner E, Ling CC, Tschopp J, Muruve DA, Amrein MW, Shi Y. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med*. 2011 17:479-487.

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, Pacífico LG, Barsante MM, Rassi T, Cassali GD, Oliveira SC. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. *Microbes Infect*. 2006 8:2509-2516.

Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, Collins C, Viala J, Ferrero RL, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007 26:445-459.

Garcia TC, Fonseca CT, Pacifico LG, Durães Fdo V, Marinho FA, Penido ML, Caliari MV, de Melo AL, Pinto HA, Barsante MM, Cunha-Neto E, Oliveira SC. 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*. 2008 106:162-167.

Gobert GN, Chai M, McManus DP. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. *Parasitology*. 2007 134:453-460.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006 368:1106-1118.

Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 32:155-172.

Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995 13:1263-1276.

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

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

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

Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J Immunol*. 2002 169:929-936.

Herbert WJ. The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice. *Immunology*. 1968 14:301-318.

Hota-Mitchell S, Siddiqui AA, Dekaban GA, Smith J, Tognon C, Podesta RB. Protection against *Schistosoma mansoni* infection with a recombinant baculovirus-expressed subunit of calpain. *Vaccine*. 1997 15:1631-1640.

Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, Brooker SJ, Brown AS, Buckle G, Budke CM, Carabin H, Coffeng LE, Fèvre EM, Fürst T, Halasa YA, Jasrasaria R, Johns NE, Keiser J, King CH, Lozano R, Murdoch ME, O'Hanlon S, Pion SD, Pullan RL, Ramaiah KD, Roberts T, Shepard DS, Smith JL, Stolk WA, Undurraga EA, Utzinger J, Wang M, Murray CJ, Naghavi M. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 24;8(7):e2865.

Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J*. 2012 26:1272-1279.

Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, Van Laethem F, Goldman M, Dubois PM. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol*. 2002 168:926-932.

Jacobson LS, Lima H Jr, Goldberg MF, Gocheva V, Tsiperson V, Sutterwala FS, Joyce JA, Gapp BV, Blomen VA, Chandran K, Brummelkamp TR, Diaz-Griffero F, Brojatsch J. Cathepsin-mediated necrosis controls the adaptive immune response by Th2 (T helper type 2)-associated adjuvants. *J Biol Chem*. 2013 288:7481-7491.

Jeffs SA, Hagan P, Allen R, Correa-Oliveira R, Smithers SR, Simpson AJ. Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 46:159-167.

Jenkins SJ, Hewitson JP, Ferret-Bernard S, Mountford AP. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. *Int Immunol*. 2005 17:1409-1418.

Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 32:173-186.

Joseph S, Jones FM, Walter K, Fulford AJ, Kimani G, Mwatha JK, et al. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *J Infect Dis*. 2004 190:835-842.

Khalife J, Dunne DW, Richardson BA, Mazza G, Thorne KJ, Capron A, et al. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*. 1989 142:4422-4427.

Khammo N, Bartlett A, Clothier RH, Whitfield PJ. The attachment of *Schistosoma mansoni* cercariae to human skin cells. *Parasitology*. 2002 124:25-30.

King CL, Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *J Immunol*. 1998 160:3578-3584.

King CL, Xianli J, Malhotra I, Liu S, Mahmoud AA, et al. Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1997 158:294-300.

Kloos H, Correa-Oliveira R, Oliveira Quites HF, Caetano Souza MC, Gazzinelli A. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. *Acta Trop*. 2008 108:194-201.

- Kloos H, Correa-Oliveira R, dos Reis DC, Rodrigues EW, Monteiro LA, Gazzinelli A. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 105:578-586.
- Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*. 2008a 181:3755-3759.
- Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2008b 205:869-882.
- Latif B, Heo CC, Razuin R, Shamalaa DV, Tappe D. Autochthonous human schistosomiasis, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 2013 19:1340-1341.
- Lees JR, Farber DL. Generation, persistence and plasticity of CD4 T-cell memories. *Immunology*. 2010 130:463-470.
- Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998 93:141-151.
- Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 2013 38:13-25.
- Liu JL, Fontaine J, Capron A, Grzych JM. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology*. 1996 113:377-391.
- Loureiro, S. A questão do social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 1989 84:124-133.
- Mahanty S, Nutman TB. Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10. *Parasite Immunol* 1995 17:385-392.
- Malaquias LC, Falcão PL, Silveira AM, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, et al. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand J Immunol*. 1997 46:393-398.

Malhotra I, Ouma J, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Omollo A, Elson L, Koech D, Kazura JW, King CL. In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. *J Clin Invest.* 1997 99:1759-1766.

Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 2011 17:996-1002.

Martin M, Michalek SM, Katz J. Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun.* 2003 71:2498-2507.

Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science.* 2007 316:1628-1632.

McKee AS, Burchill MA, Munks MW, Jin L, Kappler JW, Friedman RS, Jacobelli J, Marrack P. Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 110:E1122-31.

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

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

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

Moore DL, Grove DI, Warren KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J Pathol.* 1977 121:41-50.

Mori A, Oleszycka E, Sharp FA, Coleman M, Ozasa Y, Singh M, O'Hagan DT, Tajber L, Corrigan OI, McNeela EA, Lavelle EC. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol.* 2012 42:2709-2719.

Nascimento EJ, Amorim RV, Cavalcanti A, Alves VF, Nakazawa M, Pereira VR, Lucena-Silva N. Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol

tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 102:21-27.

Nutten S, Trottein F, Gounni AS, Papin JP, Capron A, et al. From allergy to schistosomes: role of Fc receptors and adhesion molecules in eosinophil effector function. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997 92:9-14.

O'Hagan DT, De Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. Drug Discov Today. 2009 14:541-551.

Okemoto K, Kawasaki K, Hanada K, Miura M, Nishijima M. A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1. J Immunol. 2006 176:1203-1208.

Oliveira RR, Figueiredo JP, Cardoso LS, Jabar RL, Souza RP, Wells MT, Carvalho EM, Fitzgerald DW, Barnes KC, Araújo MI, Glesby MJ. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2012 86:296-305.

Oliveira SC, Fonseca CT, Cardoso FC, Farias LP, Leite LC. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. Acta Trop. 2008 108:256-262.

Pacífico, L.G.; Fonseca, C.T.; Chiari, L.; Oliveira, S.C. 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 2006a 211:97-104.

Pacífico, L.G.; Fonseca, C.T.; Barsante, M.M.; Cardoso, L.S.; Araújo, M.I.; Oliveira, S.C. Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter interleukin-10 production. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006b 101:365-368.

Pacheco LG, Zucconi E, Mati VL, Garcia RM, Miyoshi A, Oliveira SC, de Melo AL, Azevedo V. Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. Acta Trop. 2005 95:132-142.

Pan, CT. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am J Trop Med Hyg. 1965 14:931-976.

Paveley RA, Aynsley SA, Cook PC, Turner JD, Mountford AP. Fluorescent imaging of antigen released by a skin-invading helminth reveals differential uptake and activation profiles by antigen presenting cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 3:e528.

Pearson MS, Pickering DA, McSorley HJ, Bethony JM, Tribolet L, Dougall AM, et al. Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 6:e1564.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Ver. Bras. Malariol Doenças Trop*. 1956.

Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004 82:488-496.

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

Pinheiro CS, Ribeiro AP, Cardoso FC, Martins VP, Figueiredo BC, Assis NR, et al. A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunol* 2014 36:303-312.

Pinot de Moira A, Fulford AJ, Kabatereine NB, Ouma JH, Booth M, Dunne DW. Analysis of complex patterns of human exposure and immunity to *Schistosomiasis mansoni*: the influence of age, sex, ethnicity and IgE. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 4: e820.

Pinot de Moira A, Jones FM, Wilson S, Tukahebwa E, Fitzsimmons CM, et al. Effects of treatment on IgE responses against parasite allergen-like proteins and immunity to reinfection in childhood schistosome and hookworm coinfections. *Infect Immun* 2013a 81:23-32.

Pinot de Moira A, Sousa-Figueiredo JC, Jones FM, Fitzsimmons CM, Betson M, et al. *Schistosoma mansoni* infection in preschool-aged children: development of immunoglobulin E and immunoglobulin G4 responses to parasite allergen-like proteins. *J Infect Dis* 2013b 207:362-366.

Prata A, Bina JC. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (A study of 20 patients observed during a 5 years period). *Gaz. Med. Bahia* 1968.

Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol*. 1974 36:360-372.

Ramalho-Pinto FJ, McLaren DJ, Smithers SR. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. *J Exp Med*. 1978 147:147-156.

Ramon, G. Procédres pour acroitre la production des antitoxines. *Ann. Institut Pasteur* 1926 40: 1-10.

Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull. Soc. Centr.Med. Vet* 1925 101:227–234.

Ramos CR, Vilar MM, Nascimento AL, Ho PL, Thaumaturgo N, Edelenyi R, Almeida M, Dias WO, Diogo CM, Tandler M. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 96:131-135.

Riveau G, Deplanque D, Remoué F, Schacht AM, Vodougnon H, Capron M, et al. Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 6:e1704.

Roberts M, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJ, Dunne DW, Ouma JH, Sturrock RF. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun*. 1993 61:4984-4993.

Rofatto HK, Araujo-Montoya BO, Miyasato PA, Levano-Garcia J, Rodriguez D, Nakano E, Verjovski-Almeida S, Farias LP, Leite LC. Immunization with tegument nucleotidases associated with a subcurative praziquantel treatment reduces worm burden following *Schistosoma mansoni* challenge. *PeerJ*. 2013 1:e58.

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol*. 1986 61:294-303.

Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis* 1996 173:269-272.

Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* 2003 33:880-888.

Santiago ML, Hafalla JC, Kurtis JD, Aligui GL, Wiest PM, Olveda RM, Olds GR, Dunne DW, Ramirez BL. 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. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998 117:94-104.

Sauma SY, Strand M. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 38:199-209.

Shenderov K, Barber D, Mayer K, Jankovic D, White S, Caspar P, Hieny S, Trinchieri G, Besra G, Cerundolo V, Sher A. Inflammasome-dependent IL-1 β production is critical for complete Freund's adjuvant-induced helper T cell polarization. *J Immunol.* 2010 184:136-144

Shibaki A, Katz SI. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol.* 2002 11:126-134.

Siddiqui AA, Ahmad G, Damian RT, Kennedy RC. Experimental vaccines in animal models for schistosomiasis. *Parasitol Res.* 2008 102:825-833.

Siddiqui AA, Phillips T, Charest H, Podesta RB, Quinlin ML, Pinkston JR, Lloyd 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 21:2882-2889.

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Alves Oliveira LF, Costa-Silva MF, Matoso LF, de Souza LJ, Gazzinelli A, Corrêa-Oliveira R. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop.* 2008 108:150-159.

Singh M, Srivastava I. Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases. *Curr HIV Res.* 2003 1:309-320.

Stein LD, David JR. Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 1986 20:253-264.

Stirewalt MA. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. *Adv Parasitol.* 1974 12:115-82.

Su Z, Segura M, Stevenson MM. Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. *Infect Immun* 2006 74:2138-2144.

Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*. 2006 108:2420-2427.

Tagliabue A, Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. *Hum Vaccin*. 2008 4:347-349.

Tawfik AF, Colley DG. Effects of anti-schistosomal chemotherapy on immune responses, protection and immunity. II. Concomitant immunity and immunization with irradiated cercariae. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 35:110-117.

Taylor JB, Vidal A, Torpier G, Meyer DJ, Roitsch C, Balloul JM, Southan C, Sondermeyer P, Pemble S, Lecocq JP, et al. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J*. 1988 7:465-472.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Peruhype-Magalhães V, Silveira-Lemos D, Malaquias LC, Oliveira LF, et al. Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Trop*. 2008 108:139-149.

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 (Smtg) in association with CpG-ODN. *Microbes Infect*. 2013 15:28-36.

Teixeira de Melo T, Michel de Araujo J, Do Valle Durães F, Caliarri 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 32:749-759.

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem AC, Da Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N, Simpson AS. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 93:269-273.

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 30:6753-6758.

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.

Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus DP, Correa-Oliveira R, Loukas A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*. 2006 12:835-840.

Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun*. 2001 69:1151-1159.

Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol*. 1995 6:495-524.

Varaldo PB, Leite LC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FI, Gebara VC, Armôa GR, Campos AS, Matos DC, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tandler M, McIntosh D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infect Immun*. 2004 72:3336-3343.

Veith MC, Butterworth AE. Enhancement of human eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* larvae by mononuclear cell products in vitro. *J Exp Med*. 1983 157:1828-1843.

Walter K, Fulford AJ, McBeath R, Joseph S, Jones FM, Kariuki HC, et al. Increased human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens. *J Immunol*. 2006 177:5490-5498.

Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004 22:460-466.

Webster M, Fulfor AJ, Braun G, Ouma JH, Kariuki HC, Havercroft JC, Gachuhi K, Sturrock RF, Butterworth AE, Dunne DW. Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. *Infect Immun*. 1996 64:4042-4046.

Wilson RA, Draskau T, Miller P, Lawson JR. *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. *Parasitology*. 1978 77:57-73.

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

Zhang W, Ahmad G, Torben W, Noor Z, Le L, Damian RT, Wolf RF, White GL, Chavez-Suarez M, Podesta RB, Kennedy RC, Siddiqui AA. Sm-p80-based DNA vaccine provides baboons with levels of protection against *Schistosoma mansoni* infection comparable to those achieved by the irradiated cercarial vaccine. *J Infect Dis.* 2010 201:1105-1112.