

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

**Identificação e seleção de antígenos do *Schistosoma mansoni*
potenciais candidatos a comporem um teste de diagnóstico para
esquistossomose**

por

Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho

**Belo Horizonte
Fevereiro/2012**

DISSERTAÇÃO MBCM – CPqRR

G.B.F CARVALHO 2012

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

**Identificação e seleção de antígenos do *Schistosoma mansoni*
potenciais candidatos a comporem um teste de diagnóstico para
esquistossomose**

por

Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.**

**Orientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca.
Coorientação: Dra. Lucila Grossi Gonçalves
Pacífico.**

**Belo Horizonte
Fevereiro/2012**

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

C331g Carvalho, Gardênia Braz Figueiredo de.
2012

Identificação e seleção de antígenos do *Schistosoma mansoni* potenciais candidatos a comporem um teste de diagnóstico para esquistossomose / Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho. – Belo Horizonte, 2012.

xvi, 73 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 78 - 89

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre 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/diagnóstico 2.
Schistosoma mansoni/imunologia 3.
Antígenos/análise I. Título. II. Fonseca, Cristina
Toscano (Orientação). III. Pacífico, Lucila Grossi
Gonçalves (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**

**Identificação e seleção de antígenos do *Schistosoma mansoni*
potenciais candidatos a comporem um teste de diagnóstico para
esquistossomose**

por

Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristina Toscano Fonseca (Presidente)

Dra. Lucila Grossi Gonçalves Pacífico

Dr. Jerônimo Conceição Ruiz

Dr. Sergio Costa Oliveira

Suplente: Dra. Marina de Moraes Mourão

Dissertação defendida e aprovada em: 29/02/2012

Colaboradores

Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)

- Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

- Dr. Sergio Costa Oliveira

- Dra. Carina da Silva Pinheiro

Suporte Financeiro

- Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)

- Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG)

- Rede Fiocruz-Minas de Identificação e Produção de Antígenos – RIPA_g/FIOCRUZ-MG

- Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)

- Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumo para Saúde – Rede de Plataformas Tecnológicas – Proteômica

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Oscar e Maria das Graças, pelo incentivo e apoio incondicional. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua fidelidade e amor incondicional, que em todos os momentos esteve ao meu lado, me dando sabedoria, discernimento e paciência. A Ele seja todo louvor, toda glória e toda honra.

À Kika, minha querida orientadora, que nos faz ver, a cada dia o quanto somos capazes. Um exemplo de mulher, de pesquisadora, de amiga, de orientadora, muito obrigada por tudo. Você é única!

A Lucila, minha co-orientadora, obrigada pelos ensinamentos e pelos prazerosos momentos de descontração. Com certeza você é inesquecível!

Ao Dr. Paulo, chefe do laboratório, que desde o início me recebeu de braços abertos.

A Simone Fulgêncio, responsável pela minha entrada no Laboratório de Esquistossomose e minha primeira orientadora, ainda na iniciação científica. Obrigada pela oportunidade e pelo incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose: Ana Karine, Aristeu, Áureo, Clarice, Cíntia, Daisy, Flávia, Juliano, Lili, Neusa, Rafa, Tati, Patty, Vanessa, Wander, D. Vera, Babá, Diana, Ana Carolina, Jussara, Dr. Naftale, Vandinha, Marcela, Isabela e Sara. Obrigada pelos momentos agradáveis e pelas inúmeras ajudas. Com certeza, todos vocês, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Vocês são especiais!

A Dra Rosiane, pela disposição, pela enorme ajuda e pelas valiosas sugestões.

Aos meus amados pais, meus irmãos Junior e Bruno (saudade), a Cristina e Laurinha, minha preciosa família, obrigada pelo apoio incondicional, pelo incentivo e por dividirem comigo cada momento.

A minha grande amiga Micilene, que compartilhou comigo vários momentos, dividindo as alegrias e tristezas. Obrigada por sempre me ouvir!

Aos queridos amigos da Igreja, Gil, Malu, Fatinha, Carlinha e tantos outros, que nos momentos de alegria compartilharam comigo e nos momentos difíceis, clamaram a Deus a meu favor. Essa é mais uma vitória nossa!

Ao Lucas, meu amor, que nos últimos tempos foi um grande companheiro, obrigada por compreender minha ausência e por sempre me incentivar. Amo você!

A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação do CPqRR/FIOCRUZ.

À Equipe do Núcleo de Esterilização e do Biotério, pelo apoio e pela colaboração.

Aos coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas René Rachou, que de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

A todos vocês, que fazem parte da minha história, muito obrigada.

AGRADECIMENTO Á AGÊNCIA FINANCIADORA

Agradeço a Rede Fiocruz-Minas de Identificação e Produção de Antígenos – RIPA_g/FIOCRUZ-MG, número de processo 1201.8315.0076.0312, pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho

Agradeço a FAPEMIG pela bolsa de mestrado concedida

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
Carvalho, Gardênia Braz Figueiredo de.	iii
Identificação e seleção de antígenos do <i>Schistosoma mansoni</i> potenciais candidatos a comporem um teste de diagnóstico para esquistossomose / Gardênia Braz Figueiredo de Carvalho. – Belo Horizonte, 2012.	iii
1. Esquistossomose mansoni/diagnóstico 2. <i>Schistosoma mansoni</i>/imunologia 3. Antígenos/análise I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano (Orientação). III. Pacífico, Lucila Grossi Gonçalves (Coorientação).	iii
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Esquistossomose.....	17
1.2 Esquistossomose mansoni	17
1.3 Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	18
1.4 Estratégias de controle da esquistossomose.....	19
1.5 Diagnóstico da esquistossomose.....	21
1.6 Genoma do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
1.7 Bioinformática	26
1.8 Antígenos candidatos ao teste de imunodiagnóstico da esquistossomose	29
1.8.1 Sm200	29
1.8.2 Citocromo oxidase	30
1.8.3 Proteínas expressas e proteína hipotética.....	31
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 Análises <i>in silico</i>	35
4.1.1 SchistoDB.....	35
4.1.2 Predição de localização celular	35
4.1.3 Similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos.....	36

4.1.4	Predição de epítipo de célula B	36
4.1.5	Caracterização das proteínas selecionadas	37
4.2	Animais e protocolo experimental	38
4.3	Obtenção de antígenos brutos.....	39
4.3.1	Preparação de antígeno de esquistossômulo (SAP)	39
4.3.2	Preparação de antígeno de verme adulto (AWP)	40
4.3.3	Obtenção da Sm200(1069-1520) recombinante	41
4.4	Western blot unidimensional	42
4.5	Western blot bidimensional	42
4.6	ELISA.....	43
4.7	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	45
5.1	Artigo 1: Carvalho GBF, Silva-Pereira RA, Pacífico LG, Fonseca CT. Identification of <i>Schistosoma mansoni</i> candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2011; Nov;106(7):837-43.	45
5.2	Artigo 2: Carvalho GBF, Pinheiro CS, Oliveira SC, Pacífico LGG, Fonseca CT. Detection of IgG antibodies against <i>Schistosoma mansoni</i> 200 kDa recombinant protein as a useful tool for the diagnosis of chronic phase of the disease. Manuscrito em preparação	58
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
7	ANEXO	77
7.1	Anexo 1 – MS/FIOCRUZ/VPPLR CEUA LICENÇA LW-25/10	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 2 - Fluxo das análises de bioinformática	39
Figura 3 - Protocolo de experimentação animal para obtenção de soro, infecção, tratamento e perfusão	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: Micrograma

µL: Microlitro

AAC: Antígeno anódico circulante

ACC: Antígeno catódico circulante

AWP: Preparação de antígeno de verme adulto, do inglês: adult worm antigens preparation

BLAST: ferramenta de busca por alinhamento básico local, do inglês: Basic Local Alignment Search Tool

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

Cox1: citocromo oxidase 1

Cox2: citocromo oxidase 2

DALY's: Disability-Adjusted Life Years

DNA: ácido desoxirribonucleico, do inglês: deoxyribonucleic acid

ELAC: Sais de Earl's mais hidrolisado de lactoalbumina, do inglês: Earl's salts plus lactoalbumin hydrolysate)

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

ESTs: etiquetas de sequência expressa, do inglês: Expressed Sequence Tags

FPLC: cromatografia líquida rápida de proteína, do inglês: fast protein liquid chromatography

GPI: glicosilfosfatidilinositol, do inglês: glycosylphosphatidylinositol

HPJ: Hoffman – Pons e Janer

Ig: Imunoglobulina

Kb: kilobases

kDa: kiloDalton

NCBI: Centro Nacional de Informações de Biotecnologia, do inglês: National Center for Biotechnology Information

nM: nanômetro

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORESTES: janela aberta de leitura, do inglês: Open Reading frames ESTs

OXA: oxaminiquina

PBS: Tampão Salina Fosfato, do Inglês: Phosphate-buffered saline

PBST₂₀: Tampão Salina Fosfato mais Tween 20, do Inglês: Phosphate-buffered saline and Tween 20

PCE: Programa de Controle de Esquistossomose

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do inglês: Polymerase Chain Reaction

PZQ: praziquantel

RNA: Ácido ribonucleico, do inglês: Ribonucleic acid

ROC: Curvas de Características de Operação do Receptor, do inglês: Receiver Operating Characteristic

RT-PCR: Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase, do inglês: reverse transcriptase - polymerase chain reaction

SAP: Preparação de antígeno de esquistossômulo, do inglês: schistosomula antigens preparation

SIB: Instituto Suíço de Bioinformática

SmAE: *Schistosoma mansoni* assembled ESTs

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, do inglês: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SVM: support vector machine

TBS: Tampão Tris salinico, do inglês: Tris buffered saline.

TBST: Tampão Tris salinico e tween 20, do inglês: Tris buffered saline and Tween 20

TMB: Tetrametilbenzidina, do inglês: Tetramethylbenzidine

RESUMO

A esquistossomose continua sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo. Para o controle e monitoramento efetivo dessa doença é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais acurados. O exame parasitológico de fezes, utilizando-se a técnica de Kato-Katz, é a principal forma de diagnosticar a esquistossomose mansoni, embora esse método de diagnóstico não seja satisfatório quando a carga parasitária dos indivíduos infectados é baixa. Outras técnicas sorológicas para o diagnóstico estão disponíveis, entretanto estas apresentam limitações. Neste trabalho foram realizadas análises *in silico* utilizando o banco de dados genômico para o parasito *Schistosoma mansoni* - SchistoDB e várias ferramentas de bioinformática para selecionar antígenos candidatos a serem utilizados no imunodiagnóstico da doença. Seis antígenos foram selecionados baseados na evidência de expressão gênica em diferentes fases do ciclo de vida do parasito no hospedeiro definitivo, presença de peptídeo sinal, localização celular, semelhança com proteínas humanas e de outros helmintos e presença de epitopos preditos de célula B. Através da técnica de Western blot utilizando antígenos de extrato de verme adulto e de esquistossômulos foi demonstrado que antígenos com peso molecular semelhante aos selecionados *in silico* foram reconhecidos apenas por soro de camundongos infectados com *S. mansoni*. Dos seis antígenos, um corresponde à proteína Sm200. Uma parte desta proteína, correspondente aos aminoácidos 1069 a 1520, foi expressa em sistema de expressão em procariotos e avaliada por Western blot e ELISA frente a soros de camundongos infectados e não infectados. Nossos resultados demonstram que apesar da proteína recombinante Sm200(1069-1520) ser reconhecida por soro de camundongos infectados pela técnica de Western blot, nos ensaios de ELISA o uso desta proteína como antígeno resultou 97,5% de especificidade e 75% de sensibilidade no diagnóstico de infecções crônicas.

ABSTRACT

Schistosomiasis remains one of the most prevalent parasitic infections worldwide. In order to achieve disease control the availability of a more accurate diagnosis method is necessary. The stool examination using the Kato-Katz method is the major diagnostic test to *Schistosomiasis mansoni*, however this method is not satisfactory when the worm burden of infected individuals is low. Other serological techniques for the diagnosis of schistosomiasis are available, but these techniques present some limitations. In the present work, *in silico* analyses were performed using the genomic database for the parasite *Schistosoma mansoni* - SchistoDB and different bioinformatics tools for selecting antigens candidates to be used in the immunodiagnosis of the disease. Six antigens were selected based on the evidence of gene expression at different phases of the parasite life cycle in the definitive host, presence of signal peptide, cellular location, similarity with human and other helminthic proteins and presence of predict B cell epitopes. Antigens with molecular weight similar to those selected *in silico* were recognized by sera from *S. mansoni* infected mice in a western blot using antigens derived from adult worm and schistosomula extracts. Among the six antigens selected, one corresponded to the protein Sm200. A part of this protein – containing the amino acids 1069 to 1520 – was expressed in bacteria, and its recognition by sera from infected mice was evaluated in Western blot and ELISA. Our results demonstrated that although the recombinant protein Sm200(1069-1520) is recognized by sera from infected mice in Western blot, the use of this antigen in ELISA resulted in 97.5% specificity and 75% sensitivity for the diagnosis of chronic infections.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

As doenças parasitárias podem ser vistas como um reflexo da situação econômica e social dos países em desenvolvimento, afetando de forma considerável suas populações pobres e marginalizadas. Neste contexto, as esquistossomoses aparecem como uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo endêmicas em 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (Engels et al., 2002). As esquistossomoses são causadas por trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*, sendo cinco as espécies que afetam o homem em todo o mundo: *Schistosoma japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. mansoni* (Chitsulo et al., 2000; WHO, 2003). Acredita-se que 207 milhões de pessoas estejam infectadas e 779 milhões expostas ao risco de contrair a doença (Steinmann et al., 2006; WHO, 2011). Além disso, cerca de 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (Van der Werf et al., 2003). A esquistossomose é ainda a principal helmintose em termos de morbidade causando perdas anuais de até 10,4 milhões em DALY (Disability adjusted to life year) (OMS, 2007). É uma doença crônica e insidiosa, sendo pouco comum o diagnóstico em estágios iniciais; sua evolução pode levar ao desenvolvimento de formas clínicas incapacitantes para homens e mulheres em idades produtivas (Engels et al., 2002).

Nos últimos 50 anos houve uma mudança na distribuição geográfica da esquistossomose, no entanto, mesmo com programas de controle implementados, o número de pessoas infectadas ou sob risco de contrair a doença não foi reduzido (Engels et al., 2002).

1.2 Esquistossomose mansoni

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública. Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de intensa transmissão, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, existindo ainda focos isolados nos estados do Piauí, Pará, Rio de Janeiro, São

Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Tocantins (Coura & Amaral, 2004).

Apesar dos sucessivos programas de controle realizados no Brasil, a doença se encontra em expansão adquirindo um novo perfil epidemiológico (Barbosa et al., 2008). Entre os fatores desta expansão da doença destacam-se: carência de saneamento básico possivelmente associado ao ritmo de crescimento populacional e à ocupação desordenada dos espaços urbanos, migração de portadores do parasito para áreas indenes; dispersões dos moluscos transmissores (Paraense e Corrêa, 1987), além de distúrbios provocados pela modificação irracional dos ecossistemas primitivos (Silva, 1997). O aumento considerável do número de pessoas associadas ou vivendo próximas às regiões de intensa irrigação, assim como grandes reservatórios de água, é também um importante fator de risco de transmissão da esquistossomose (Steinmann et al., 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), no Brasil existem aproximadamente 7 milhões de pessoas infectadas e outras 42 milhões vivendo em área de risco.

1.3 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* possui um ciclo evolutivo complexo que envolve uma reprodução assexuada ocorrida no molusco, um caramujo do gênero *Biomphalaria* sp. (hospedeiro intermediário) e uma reprodução sexuada ocorrida no hospedeiro vertebrado. O ciclo de vida do *S. mansoni* tem início quando os ovos são eliminados junto às fezes do hospedeiro vertebrado no meio aquático liberando os miracídios, os quais irão penetrar nos moluscos. Após uma série de transformações, a larva passa a ser chamada esporocisto primário e, posteriormente, esporocisto secundário, nos quais as células germinativas multiplicam-se dando origem às cercárias de cauda bifurcada, após 25 a 30 dias. As cercárias eliminadas pelo molusco nadam ativamente e, ao encontrar o hospedeiro definitivo, penetram na pele ou mucosas e perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulo. Estes alcançam os vasos sanguíneos sendo levados aos pulmões e destes para o sistema porta hepático, onde ocorre a maturação dos vermes. Após o acasalamento, os vermes adultos alcançam as veias mesentéricas inferiores onde realizam a postura dos ovos. Parte desses ovos ganham a circulação e depositam-se em órgãos como o fígado, levando ao desenvolvimento de uma reação granulomatosa que resulta na

formação dos granulomas, enquanto outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais, e parte destes alcançar a luz intestinal sendo eliminados junto às fezes, dando continuidade ao ciclo. (Figura 1) (Coles, 1973).

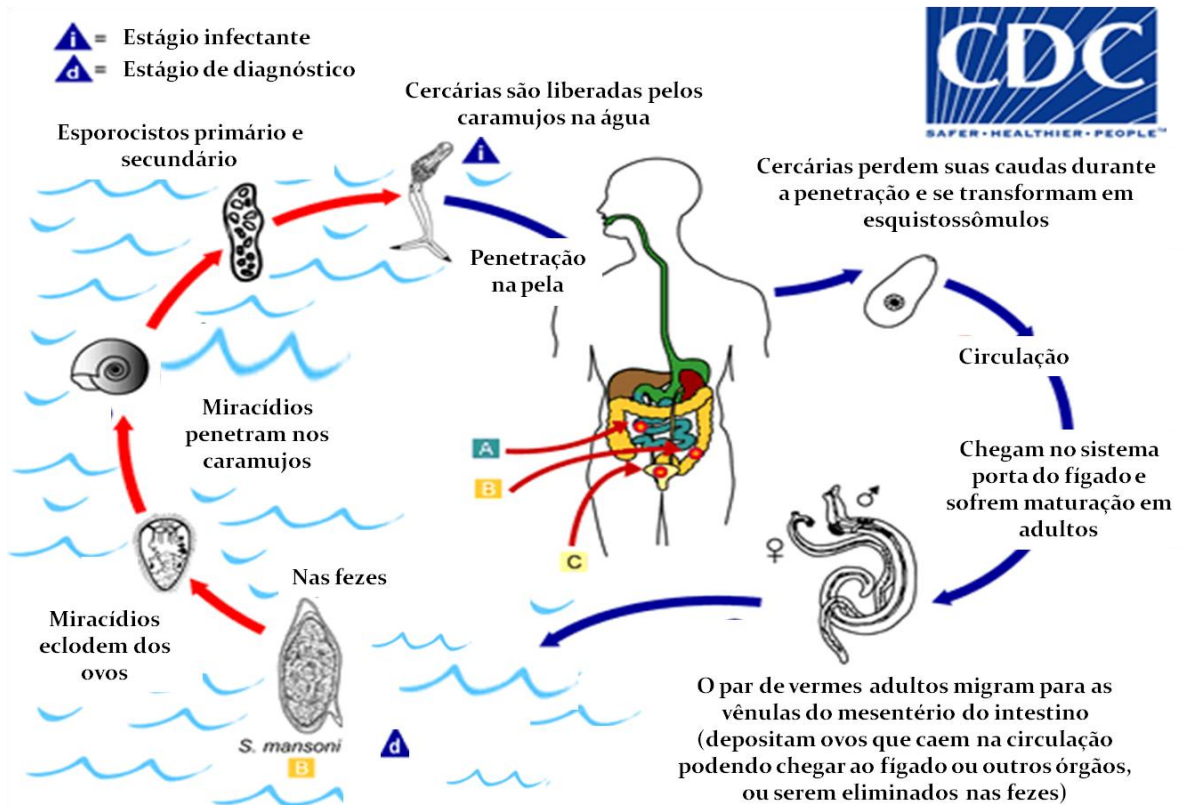


Figura 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O esquema representa o complexo ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, evidenciando a fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e a fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (homem). Fonte: adaptado de CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>.

1.4 Estratégias de controle da esquistossomose

Em relação ao controle da esquistossomose, a adoção de medidas de saneamento básico é o método profilático ideal, o qual impede, não só a transmissão da esquistossomose mansoni, mas também outras doenças relacionadas à água contaminada por fezes. Porém, o precário padrão sócio-econômico dos países endêmicos para a doença dificulta a adoção desta medida profilática. O principal método de controle da esquistossomose atualmente baseia-se na quimioterapia (El-Ansary et al., 2006) e os dois fármacos utilizados no

tratamento são a oxamniquina (OXA) (Mansil – Pfizer S.A) e o praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ). O praziquantel é, atualmente, o medicamento de escolha, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* que infectam o homem (Doenhoff et al., 2002).

O grande número de indivíduos infectados somados às constantes reinfecções e às frequentes migrações de indivíduos infectados, associadas a um saneamento básico precário resultam em constantes reinfecções em moradores de áreas endêmica e no aparecimento de novos focos da doença, demonstrando assim a ineficácia do tratamento no controle da transmissão da esquistossomose (Barbosa et al., 2008; Bergquist and Colley, 1998). Além disso, a eficácia do praziquantel na cura da doença também é questionável. De acordo com Cunha (1992) foi demonstrado um percentual de cura de 92% em pacientes tratados com praziquantel quando a cura foi diagnosticada por exame de fezes (Kato-Katz), enquanto apenas 29% de cura, quando a mesma foi diagnosticada pela biopsia retal. Isso demonstra, portanto, que o monitoramento de cura dos indivíduos infectados apresenta limitações. Outro problema gerado pelo elevado número de infecções e reinfecções em moradores de áreas endêmicas associado à pressão seletiva exercida no parasito pelo constante tratamento da população é o aparecimento de cepas do parasito resistentes às drogas que estão disponíveis no mercado (Fallon e Doenhoff, 1994).

No Brasil, atualmente a estratégia de controle da doença tem sido o tratamento de indivíduos infectados, buscando reduzir a morbidade (Barbosa e Coimbra, 1992; Magnussen, 2003). O Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), implantado no Brasil entre 1976 e 1993, resultou em significativa redução da prevalência da doença e também da incidência de formas graves, no entanto, foi observado o surgimento de novos focos (Katz, 1998). Resultados recentes sugerem que a prevalência da esquistossomose no Brasil esta sendo subestimada devido à dificuldade de se diagnosticar indivíduos com baixa carga parasitária (Enk et al., 2008).

Neste contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis para monitorar o impacto das estratégias de controle da doença na prevalência e transmissão da mesma.

1.5 Diagnóstico da esquistossomose

O diagnóstico de alta sensibilidade para a esquistossomose é um instrumento vital para se conhecer a real prevalência da doença, avaliar com precisão a cura após intervenções terapêuticas, e para avaliar o sucesso das estratégias de controle, sendo este conhecimento uma ferramenta fundamental no controle da transmissão da doença (Berhe et al., 2004).

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis dividem-se em dois grupos, os métodos diretos e os métodos indiretos. No primeiro, tem-se a detecção do parasito ou suas partes, como ovos, substâncias antigênicas ou fragmentos moleculares. Já no segundo, têm-se evidências indiretas da infecção pelo *S. mansoni* pela demonstração de reatividade celular a antígenos do parasito ou pela detecção dos anticorpos específicos no soro do hospedeiro (Rabello, 1990). A demonstração direta do ovo ou do miracídio constitui método de diagnóstico de certeza. Porém, exames parasitológicos negativos não significam necessariamente que os indivíduos não estejam infectados (Chieffi et al., 1978). Este tem sido ainda hoje um dilema encontrado no diagnóstico da doença, pois quando se avalia a prevalência por meio de técnicas parasitológicas, pode-se ter uma idéia falsa da real prevalência da doença, principalmente em áreas com indivíduos que apresentam baixa intensidade de infecção, o que impacta diretamente no controle da doença (De Vlas et al., 1992; Enk et al., 2008).

Os métodos parasitológicos de fezes são divididos em qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos detectam somente a presença dos ovos do parasito. O Método da Sedimentação Espontânea (HPJ) que foi descrito por Lutz (1919) e padronizado por Hoffmann, Pons e Janer (1934) consiste basicamente na mistura das fezes com água que será filtrada e mantida em repouso. Essa sedimentação é inserida em lâmina, feito um esfregaço e observado em microscópio. É um método bastante utilizado em laboratórios de análises clínicas ou inquéritos coproparasitológicos, por possibilitar diagnóstico simultâneo de outras parasitoses. O método de flutuação (Willis, 1921) e o método de centrifugação em éter sulfúrico (Blagg et al., 1955) também são métodos qualitativos, mas pouco utilizados em estudos populacionais.

Os métodos quantitativos além de detectar a presença do parasito, determinam o número de ovos ou miracídios presentes por grama de fezes. O método de Kato-Katz (Katz et al., 1972) consiste na demonstração microscópica de

ovos nas fezes e é recomendado pela OMS. Ele é um método amplamente utilizado, principalmente por seu baixo custo operacional e pela praticidade em situações de infra-estrutura laboratorial precária (WHO, 1993). Entretanto, as reduções da carga parasitária de indivíduos tratados através dos programas de controle indicam a necessidade de examinar um número maior de lâminas, o que não é feito em levantamentos epidemiológicos (Enk et al., 2008). Os métodos de Eclosão de miracídeos (Zicker et al., 1977; Jurberg et al., 2008), Gradiente salínico (Coelho et al., 2009) e Helmintex (Teixeira et al., 2007) também são métodos quantitativos e estão em processo de validação. É possível ainda realizar análises por biópsia retal para percepção de ovos no tecido, no entanto, este é um método bastante invasivo e pouco utilizado na prática clínica, a não ser em alguns casos onde a patologia atingiu pontos críticos para a saúde do paciente, e a confirmação dos resultados obtidos por outras técnicas, precisam ser realizadas (Ferrari et al., 2003). Por esse motivo, a associação de técnicas moleculares e imunológicas vem se mostrando sensíveis e promissoras na identificação do parasito em amostras com resultados croscópicos negativos.

Outras metodologias utilizadas para o diagnóstico da esquistossomose envolvem os testes sorológicos como a imunofluorescência, imunoaglutinação e o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay). A imunofluorescência é uma técnica que permite visualizar a reatividade de anticorpos presentes no soro dos indivíduos em suspensões celulares utilizando corantes fluorescentes, entretanto, a necessidade do microscópio de fluorescência limita a utilização do método em áreas endêmicas com pouca estrutura (Deelder et al., 1989; Schlsio et al., 1989). A imunoaglutinação (Wang et al., 2006) possui baixa sensibilidade e uma complexa obtenção de fases do parasito (Coelho et al., 1991). O ELISA pode ser utilizado tanto para detecção de antígenos do parasito quanto para detecção de anticorpos específicos no soro dos indivíduos. O imunodiagnóstico da esquistossomose por detecção de antígenos circulantes específicos baseia-se na presença de antígenos do parasito na circulação sanguínea humana (De Jonge et al., 1991). As abordagens para a detecção de antígenos circulantes geralmente envolvem captura do antígeno por anticorpos monoclonais. Dois dos antígenos circulantes mais comumente utilizados são as glicoproteínas AAC (Antígeno Anódico Circulante) e ACC (Antígeno Catódico Circulante), derivadas do epitélio intestinal dos parasitos (Deelder et al., 1980) e, sendo a presença destes antígenos indicativa de infecção ativa. A

desvantagem da detecção de antígenos circulantes se deve ao fato de ser baixa a sensibilidade desse tipo de ensaio nos casos em que a prevalência e intensidade de infecção são baixas, podendo até mesmo ser inferior aos testes parasitológicos (De Jonge et al., 1991).

Apesar de ambos os tipos de detecções serem considerados promissores, a detecção de anticorpos tem apresentado baixa especificidade, além de não diagnosticarem a cura após tratamento (Bdul-Fattah et al., 2000; Derouin et al., 1980; Da silva et al., 2000). Uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento de testes sorológicos é a escolha dos antígenos apropriados. Existem diversos fatores que influenciam a escolha de um antígeno para ser utilizado no diagnóstico como: produtividade e facilidade de obtenção, elevada estabilidade em condições simples de estocagem, imunogenicidade, especificidade e compatibilidade com técnicas sorológicas baratas e simples (Doenhoff et al., 2004). A ocorrência de reações cruzadas, principalmente observadas com o uso de antígenos brutos que contêm frações antigênicas compartilhadas com diversos parasitos, também é um dos grandes problemas do uso destes antígenos. O desenvolvimento da biologia molecular somado à disponibilidade de sequências genômicas completas dos parasitos, proporciona a busca por antígenos potencialmente imunogênicos e específicos do *S. mansoni* que possam ser produzidos como antígenos recombinantes ou na forma de peptídeos sintéticos para serem incorporados a testes sorológicos.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), um teste molecular de diagnóstico para detecção de DNA do parasito nas fezes, pode apresentar alta especificidade e sensibilidade, porém, possui alto custo e alta complexidade quanto ao manuseio de equipamentos (Obeng et al., 2008; Kjetland et al., 2009), sendo de difícil implementação em áreas endêmicas. Esta técnica com modificações, como a PCR-ELISA, está em fase de validação, apesar do custo relativamente alto tem apresentado bons resultados preliminares, principalmente levando em consideração a quantidade de amostras que podem ser analisadas simultaneamente (Gomes et al., 2010).

1.6 Genoma do *Schistosoma mansoni*

Atualmente a abordagem mais promissora para a identificação de novos alvos de vacinas, drogas e antígenos para diagnóstico, assim como para a compreensão da resistência à drogas, diversidade antigênica, infectibilidade e patologia, consiste em compreender e decifrar as informações nos genomas dos parasitos (TDR/WHO, 2005)

O genoma haplóide do *S. mansoni* com 270 Mb apresenta 34% de conteúdo G+C e aproximadamente 15000 a 25000 genes (Franco et al., 2000; LoVerde et al., 2004), distribuídos em 8 pares de cromossomos. O *S. mansoni* encontra-se entre os primeiros animais que desenvolveram dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heterogaméticos (Verjovski-Almeida et al., 2003). A fêmea é heterogamética, possuindo um par de cromossomos ZW, e o macho um par ZZ.

O estudo do transcriptoma de *S. mansoni* foi uma iniciativa brasileira, financiada por agências locais que, teve início em 1992 por meio de um projeto colaborativo entre instituições brasileiras, financiado por agências nacionais (Franco et al., 2000). A partir de 1994, a Organização Mundial de Saúde iniciou o financiamento da Rede Genoma de *Schistosoma* para a descoberta de novos genes com o objetivo final de identificar novos alvos para o desenvolvimento de drogas, vacinas e ferramentas diagnósticas. Durante este período a comunidade científica mundial produziu aproximadamente 16.000 ESTs. Recentemente, foram realizados dois grandes projetos brasileiros de sequenciamento do transcriptoma do *S. mansoni* (Oliveira et al., 2001). O primeiro projeto foi financiado pela FAPESP/MCT/CNPq e utilizou uma biblioteca de verme adulto e minibibliotecas de ORESTES de seis estágios do ciclo de vida do parasito (Verjovski-Almeida et al., 2003).

O projeto gerou 124.681 ORESTES e ESTs úteis de *S. mansoni* que foram agrupadas resultando em 30.988 SmAE (*Schistosoma mansoni* assembled ESTs) correspondendo a aproximadamente 92% do transcriptoma. Dentre as SmAEs anotadas, 23% encontraram relação com outras seqüências de *S. mansoni* já depositadas, tendo 2% delas identidade com genes conhecidos e 21% com ESTs depositadas no dbEST. Os outros 73% não encontraram relação com seqüências de *S. mansoni*, sendo descritas como novos genes relatados de *S. mansoni*. A comparação das ESTs de *S. mansoni* com seqüências dos bancos de dados permitiu identificar um grande número de genes de interesse (Verjovski-Almeida et al., 2003). O segundo projeto, financiado pela FAPEMIG/MCT/CNPq, consistiu de

uma rede genômica formada por instituições do Estado de Minas Gerais que caracterizou o transcriptoma de diferentes estágios de desenvolvimento do parasito, a partir da geração de aproximadamente 42.500 ESTs convencionais (Oliveira et al., 2007).

A iniciativa internacional para o seqüenciamento do genoma completo do organismo foi conduzida pelo Instituto *The Institute for Genomic Research* - TIGR em associação com o *Welcome Trust Sanger Institute* - WTSI, por meio de financiamento do *National Institute of Health* - NIH e da *Welcome Trust*, respectivamente (LoVerde et al., 2004). As últimas versões do sequenciamento genômico e todas as análises efetuadas estão disponíveis nos bancos de dados *on line* GeneDB produzido pelo WTSI, e no SchistoDB, banco de dados genômicos desenvolvido para incorporar todos os dados disponíveis sobre o *S. mansoni*.

A sequência do genoma nuclear de *S. mansoni* foi obtida por meio da metodologia WGS (*Whole Genome Shotgun*). Essa técnica consiste na quebra de DNA genômico em pequenos fragmentos para sequenciamento, e a posterior organização da sequência desses fragmentos, para recompor a sequência original. Este processo é realizado *in silico*. Em sua última versão, os fragmentos foram agrupados em 5.745 *scaffolds* com tamanho superior a 2kb, totalizando 363mbp. Além disso, foram identificados 11.812 genes que codificam 13.162 transcritos. Apesar de 45% do genoma ser composto de elementos repetitivos, 50% das bases estão presentes em contigs de tamanho maior que 16,3 kbp e em *scaffolds* maiores que 824,5kbp. Ainda, a localização cromossomal de 43% da montagem genômica utilizando-se hibridização *in situ* foi identificada (Berriman et al., 2009).

A disponibilidade de sequências genômicas completas em combinação com novas tecnologias avançadas, como a bioinformática, microarranjos e proteômica, revolucionaram a abordagem para o desenvolvimento de vacinas e proporcionaram um novo impulso à pesquisas. Esta nova abordagem, baseada no genoma, chamada de Vacinologia Reversa, tem sido aplicada com êxito para *Neisseria meningitidis* soro grupo B, no qual as estratégias convencionais falharam em fornecer uma vacina eficaz. O conceito de Vacinologia Reversa pode ser facilmente aplicado a todos os os agentes patogênicos para os quais ainda não existem vacinas e podem ser estendidos aos parasitas e vírus (Capecchi et al., 2004). Para se determinar a posição provável das proteínas dentro do organismo, é feito o sequenciamento do genoma do agente e a análise de suas proteínas, preditas

através da bioinformática e com base nas características hidrofóbicas ou hidrofílicas. Depois é avaliada sua capacidade teórica de produzir resposta imune. Os peptídeos selecionados podem, então, ser sintetizados ou expressos em vetores para a comprovação de sua real capacidade de induzir imunidade em animais (Adu-Bobie et al., 2003).

Neste contexto, seguindo o mesmo raciocínio da Vacinologia Reversa e adaptando a mesma às particularidades da busca de antígenos para o diagnóstico de doenças, seria possível, através das ferramentas de bioinformática, realizar análises *in silico* para selecionar antígenos promissores para serem utilizados como antígenos no diagnóstico de parasitoses cujo genoma já tenha sido sequenciado.

1.7 Bioinformática

A Bioinformática é o campo da ciência que está em crescimento e envolve o uso de técnicas de matemática aplicada, criação e aperfeiçoamento de algoritmos, técnicas computacionais e estatísticas, e teoria da computação para resolver problemas ligados ao gerenciamento e análise de dados biológicos (Baldi and Brunak, 2001; Baxevanis and Ouellette, 2005; Lesk, 2002).

Com o auxílio de programas computacionais é possível extrair informações relevantes a partir das sequências depositadas em banco de dados, desvendando detalhes acerca da estrutura e função dos genes e proteínas de interesse. Avanços nesse campo implicam na imensa quantidade de dados disponíveis de sequências genômicas e estrutura de proteínas e na disponibilidade de recursos computacionais.

Para proporcionar um melhor entendimento das ferramentas computacionais, utilizadas ao longo deste trabalho, uma breve descrição será feita.

O banco de dados genômico para o parasita *S. mansoni* - SchistoDB (www.schistodb.net) possui uma série de dados e os resultados de diferentes análises computacionais, fornecendo atualmente cerca de 30 possibilidades de consultas diferentes e diversas ferramentas para analisar, recuperar ou exibir os dados. Uma vez que a seleção desejada tenha sido alcançada, pode-se integrar diferentes resultados de pesquisa utilizando a página "Histórico de Consultas" e refinar até que uma lista limitada de genes de interesse seja obtida, fornecendo um número razoável de alvos para se trabalhar (Zerlotini et al., 2009.) A versão do

banco de dados SchistoDB 2.0 fornece o acesso ao mais recente seqüenciamento do genoma do *S. mansoni* da anotação obtida no Wellcome Trust Sanger Institute e do genoma mitocondrial.

Uma das condições para que uma proteína seja considerada um bom antígeno tanto para o desenvolvimento de vacinas quanto para serem utilizadas no diagnóstico da doença é a sua localização celular. Proteínas restritas ao compartimento citosólico não são bons alvos imunológicos, enquanto as proteínas associadas à superfície ou proteínas secretadas são mais acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro podendo levar á produção de anticorpos específicos. O programa SherLoc (Applied Bioinformatics Group) é um dos algoritmos disponíveis para fazer a predição de localização subcelular de proteínas (<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/>) baseando-se na predição de quatro diferentes sequências classificadoras (peptídeos alvo N-terminal, sinais internos de âncora, composição global de aminoácidos e classificação de sequências-motivo) e de um classificador baseado em texto (Shatkay et al., 2007).

Quatro desses classificadores (peptídeos alvo N-terminal, sinais internos de âncora, composição global de aminoácidos e classificação texto) utilizam o classificador de parâmetros SVM (support vector machine) para realizarem suas análises. O SVM é um conceito em estatística e ciência da computação para um conjunto de métodos de aprendizagem que analisam dados e reconhecem padrões usando análises de classificação e regressão (Vapnik, 1998). A classificação de sequências-motivo utiliza uma busca por motivos que produz um vetor de características binárias indicando a presença ou não de 43 sequências-motivo na sequência de consulta. Os dados das 4 sequências classificadoras e da sequência baseada em texto são integrados e analisados por SVM e resultam em uma melhor predição de localização celular da proteína

O programa SOSUI do Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) é dedicado à análise de sequências de proteínas e estruturas (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html). É uma ferramenta que faz a predição de uma parte da estrutura secundária de uma proteína a partir da sequência de aminoácidos para determinar se a proteína em análise é solúvel ou transmembrana. O SOSUI faz a busca por α hélices e diferencia essas hélices como sendo de proteínas solúveis ou transmembrana baseando-se em 4 parâmetros físico-químicos: índice de hidropatia

Kyte e Doolittle (Kyte e Doolittle, 1982), presença de anfifílicos e sua localização, carga e extensão dos aminoácidos (Hirokawa et al 1998).

Um dos programas de busca por similaridade mais utilizado pela comunidade científica é o BLAST (*Basic Local Alingment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), que é um algoritmo otimizado para fazer alinhamentos locais entre sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, procurando o maior grau de identidade ou similaridade respectivamente, entre a sequência em estudo e sequências depositadas em um determinado banco de dados. Os resultados dos alinhamentos gerados pelo BLAST são avaliados por dois valores resposta: o “Score” e o “E-value” (valor esperado). O “Score” é um número constituído pela soma dos pesos atribuídos ao pareamento entre aminoácidos idênticos (maior peso), similares (peso intermediário) e diferentes (peso negativo). Logo, quanto maior o “Score”, maior a similaridade entre as sequências. Na versão atualizada do BLAST ainda considera-se na contabilização do “Score” a presença de “gaps” que são espaços introduzidos no alinhamento para compensar inserções e deleções de uma sequência relativa à outra. O “E-value” é um valor calculado a partir do “Score”, que fornece a noção de qual é a chance de se encontrar um “Score” maior ou igual ao do alinhamento considerado dentro do banco de dados pesquisado. Desta forma pode-se verificar que quanto maior o “Score” menor o “E-value”.

A identificação e caracterização de epítomos de células B desempenham um papel importante na concepção de vacina, de testes de imunodiagnóstico, e na produção de anticorpos. Portanto, ferramentas computacionais para prever epítomos de célula B linear em sequências de proteínas são fundamentais. O servidor BCPREDS (ailab.cs.iastate.edu/bcpreds) permite ao usuário escolher o método para prever epítomos de célula B: BCPred e AAP e o comprimento dos epítomos preditos variando de 12 a 22. Ambos utilizam o classificador de parâmetros SVM (support vector machine) e o método AAP (Amino acid pair) difere-se do primeiro por usar uma escala de antigenicidade com epítomos de célula B em pares obtidos por decomposição contínua associada ao parâmetro SVM (Chen et al., 2007).

O servidor SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) permite obter a predição de peptídeos sinais e a localização do sítio de clivagem em sequências de aminoácidos de diferentes microrganismos: Gram positivos procariotos, Gram-

negativos procariotos e eucariotos. As predições são feitas através da combinação de redes neurais artificiais e de modelos escondidos de Markov (Bendtsen et al., 2004).

1.8 Antígenos candidatos ao teste de imunodiagnóstico da esquistossomose

Utilizando as ferramentas de bioinformática, foram selecionados 6 potenciais antígenos para serem testados no imunodiagnóstico da esquistossomose. Essas proteínas foram anotadas como: Glicoproteína de superfície âncora GPI 200-kDa (Sm200) (Smp_017730), duas proteínas expressas com peso molecular predito de 12.8 (Smp_034420.1) e 43.5 kDa (Smp_042910) denominadas por nosso grupo de Sm12.8 e Sm43.5 respectivamente, uma proteína hipotética com peso molecular predito de 127.9 kDa (Smp_171300) e denominada por nosso grupo de Sm127.9 e duas proteínas anotadas como provável subunidade citocromo c oxidase e que possuíam peso molecular predito de 18.9 (Smp_184440) e 16.5 kDa (Smp_184550) e que foram denominadas pelo nosso grupo de Sm18.9 e Sm16.5 respectivamente.

1.8.1 Sm200

A Sm200 é uma glicoproteína, com função desconhecida, ancorada a membrana de vermes adultos do *S. mansoni* através de uma ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI). Inicialmente foi identificada no tegumento do parasito (Sauma and Strand, 1990; Sauma et al., 1991) e mais tarde chamada de 200kDa (Hall et al., 1995), Sm200 (Racoosin et al., 1999) ou ECL (Nascimento et al., 2007). A sua localização na superfície do tegumento do verme adulto de *S. mansoni* foi confirmada por uma raspagem enzimática superficial que detectou sua presença no tegumento (Castro-Borges et al., 2011).

Antígenos presentes na superfície de vermes adultos de *S. mansoni* são normalmente camuflados e inacessíveis para ligação antígeno-anticorpo. Entretanto, quando ocorre o tratamento dos vermes com praziquantel, muitos antígenos tornam-se expostos na superfície do verme adulto, sendo a proteína 200kDa uma delas (Sauma and Strand 1990). Foi demonstrado que o antígeno 200kDa serve como alvo de anticorpos agindo em sinergia com o praziquantel e outras observações sugerem que quando os vermes são expostos ao praziquantel e a fosfatidilinositol

fosfolipase C específica (PIPLC), a quantidade de antígeno 200kDa clivada dos vermes é aumentada 5 vezes, contribuindo assim para ação terapêutica da droga (Sauma et al., 1991).

Brindley et al. (1989) sugere que o uso da proteína 200kDa como imunógeno desencadeia resposta imune contra *S. mansoni*. A eficácia do praziquantel é prejudicada por um sistema imune deficiente de camundongo. Entretanto transferindo anticorpo monoclonal (mAb 305), que reconhecem a glicoproteína 200kDa do *S. mansoni*, no momento do tratamento com o praziquantel para camundongos que não possuem célula B, restaura-se a eficácia do praziquantel. Para demonstrar que os anticorpos contra a glicoproteína 200 kDa estão presentes em camundongos imunologicamente intactos, o desenvolvimento de respostas de anticorpos para esse antígeno foi monitorada ao longo do tempo por um radioimunoensaio competitivo. Anticorpos que especificamente competiam com mAb 305A4/1 para a ligação com esta glicoproteína foram detectados em pequenas quantidades em 5 semanas após a infecção, atingindo níveis substanciais em 7 semanas, e continuaram a aumentar até a 26ª semana de infecção. Estes resultados reforçam os achados anteriores que mostram que a máxima imunorreatividade para glicoproteínas de schistosoma ocorre em cerca de 20 semanas após a infecção (Norden and Strand, 1985). A resposta imune e protetora induzida por imunização gênica com ECL foi avaliada e a proteção encontrada foi de 38% com produção de IgG1 e IgG2a específica (Nascimento et al., 2007).

1.8.2 Citocromo oxidase

As citocromo oxidases são enzimas presentes nas mitocôndrias envolvidas no metabolismo oxidativo da glicose cujo transcrito é detectado em cercárias, esquistossômulos e vermes adultos (Skelly et al., 1993) . O gene que codifica a citocromo oxidase é composto por duas subunidades denominadas citocromo oxidase 1 (*Cox1*) e citocromo oxidase 2 (*Cox2*). Uma característica marcante destes genes é o poliformismo encontrado no gene da *Cox1* o que o torna uma ferramenta em estudos de identificação de espécie (Lopatkin et al., 2010; Weyher et al., 2010), filogenia (Agatsuma et al., 2004), genética populacional (Zhao et al., 2009), epidemiologia molecular (Norton et al., 2008). Recentemente, a *Cox1* foi utilizada para o diagnóstico molecular da infecção pelo *S. mansoni* e *S. haematobium* por

PCR em tempo real a partir de amostras de fezes (ten Hove et al., 2008). Os resultados deste trabalho demonstram que o PCR em tempo real para detecção de *Cox1* é espécie específico, podendo diferenciar infecção causada por *S. mansoni* e *S. haematobium* e apresentam boa correlação com os resultados do diagnóstico da doença por análises microscópicas quando os indivíduos apresentavam cargas moderadas ou altas de infecção (ten Hove et al., 2008). A detecção de *Cox1* do *S. haematobium* e do *S. bovis* em todas as fases larvais destas duas espécies por um teste rápido de PCR multiplex também foi descrito recentemente (Webster et al., 2010), demonstrando o potencial do gene que codifica esta enzima como alvo do diagnóstico molecular espécie específico. Porém, não existe na literatura nenhum estudo utilizando esta proteína em ensaios sorológicos para o diagnóstico da esquistossomose.

1.8.3 Proteínas expressas e proteína hipotética

As proteínas expressas Sm12.8 e Sm43.5 e a proteína hipotética Sm127.9 ainda não possuem função conhecida descrita, podendo ser consideradas boas candidatas para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, uma vez que passaram por todos os filtros de seleção e atenderam aos critérios estabelecidos para serem potenciais antígenos para o diagnóstico da doença.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma doença crônica e endêmica em 76 países em desenvolvimento, afetando mais de 207 milhões de pessoas e causando 280 mil mortes/ano (Engels et al., 2002, Steinmann et al., 2006, Van der Werf et al., 2003). No Brasil, essa parasitose, que possui uma elevada prevalência e incidência, merece esforços para sua detecção, uma vez que, a sensibilidade e correta identificação da infecção é importante para o controle em longo prazo da doença. Para isso é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais acurados.

Situações caracterizadas por indivíduos com baixa intensidade de infecção ou com infecção unissexuada limitam o diagnóstico por métodos parasitológicos de fezes e embora os métodos imunológicos só forneçam evidências indiretas da presença do parasito, estes podem ser ferramentas valiosas na triagem de indivíduos infectados em inquéritos epidemiológicos (Chieffi & Kanamura, 1978). Existe uma ampla variedade de testes imunológicos, sendo o método de ELISA, o de escolha para o diagnóstico em massa por apresentar baixo custo, reprodutibilidade e facilidade de execução (Oliveira et al., 2003). Uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento do teste de ELISA é a escolha de antígenos apropriados. Existem diversas dificuldades que influenciam a escolha de um antígeno ideal, como: produtividade e facilidade de obtenção, elevada estabilidade em condições simples de estocagem, capacidade antigênica, especificidade e compatibilidade com técnicas sorológicas baratas e simples. A ocorrência de reações cruzadas, principalmente observadas com o uso de antígenos brutos, que contêm frações antigênicas compartilhadas com diversos parasitos, e o fato de não diferenciarem infecção passada e ativa, podendo permanecer positivos durante anos após a cura quimioterápica (Smithers & Doenhoff, 1982; Mott & Dixon, 1982; Montenegro, 1992), também são um dos grandes problemas da pesquisa por anticorpos. Para transpor estes obstáculos, faz-se necessário o uso de um antígeno imunogênico, que não apresente reação cruzada com outros parasitos e cuja reatividade frente a soro de indivíduos infectados e tratados caia progressivamente após o tratamento.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido a partir da necessidade de um antígeno para o diagnóstico da esquistossomose que possua alta especificidade e sensibilidade. Aproveitando os avanços na área de bioinformática e genômica do

S. mansoni, propusemos identificar antígenos candidatos para serem utilizados como antígenos no teste de ELISA por análises *in silico* e produzi-los de forma recombinante para serem avaliados no diagnóstico sorológico da esquistossomose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Selecionar antígenos do *S. mansoni* e expressar a proteína recombinante Sm200(1609-1520) para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar, *in silico*, antígenos do *S. mansoni* candidatos a compor um kit de imunodiagnóstico da esquistossomose utilizando ferramentas de bioinformática disponíveis na *Web* e o banco de dados SchistoDB.
- Obter a Sm200(1609-1520) recombinante.
- Avaliar a reatividade do soro de camundongos com esquistossomose frente à proteína Sm200(1609-1520) recombinante por Western blot.
- Padronizar o ensaio sorológico utilizando a Sm200(1609-1520) recombinante como antígeno e soro de camundongos infectados pelo *S. mansoni* em ensaios de ELISA.

4 METODOLOGIA

4.1 Análises *in silico*

4.1.1 SchistoDB

Para seleção dos antígenos de *S. mansoni* utilizou-se primeiramente o banco de dados genômico SchistoDB (www.schistodb.net) versão 2 acessado em julho de 2010. Em uma primeira análise utilizou-se a ferramenta de busca de genes que alinhavam com ESTs de diferentes estágios de desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo: esquistossômulo, esquistossômulo pulmonar, verme adulto e ovo. Cada um desses estágios foi selecionado individualmente e combinados de forma que o resultado apontou apenas os genes que alinhavam com ESTs de todos os estágios selecionados.

Utilizando novamente o banco de dados do SchistoDB, foi feita a busca por sequências com predição de peptídeo sinal. Os resultados dessa análise foram combinados com o resultado da predição de proteínas comuns aos 4 estágios selecionados.

Como resultado final, obteve-se a predição de sequências de proteínas comuns aos estágios de desenvolvimento do parasito: esquistossômulo, esquistossômulo pulmonar, verme adulto e ovo; com predição de presença de peptídeo sinal.

4.1.2 Predição de localização celular

Os antígenos resultantes da seleção final no programa SchistoDB foram submetidos a predição de domínio transmembrana e predição de localização celular.

Para predição de região transmembrana usou-se o programa SOSUI (SOSUI engine ver. 1.11) (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) acessado em agosto de 2010. As sequências de aminoácidos das proteínas foram inseridas individualmente em um campo específico e o resultado foi gerado. Sequências de proteínas preditas com mais de 5 domínios transmembrana foram excluídas, uma vez que proteínas que possuem muitos domínios transmembrana podem ser

proteínas formadoras de canais iônicos e muito hidrofóbicas, o que dificulta a sua expressão heteróloga.

A predição de localização celular foi realizada utilizando-se o programa SherLoc (<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/>) acessado em agosto de 2010. Primeiramente escolheu-se o método de predição de localização para células de organismo animal, em seguida as sequências de aminoácidos das proteínas foram inseridas individualmente em um campo e o valor do *e-value* do blast de 0.1, parâmetro padrão do algoritmo, foi utilizado. Para a saída dos resultados foi selecionado o formato avançado, onde 3 localizações juntamente com seus *scores* foram mostradas.

Para se ter maior confiabilidade da predição de localização celular, foi feita outra predição utilizando-se o programa TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) acessado em agosto de 2010.

4.1.3 Similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos

Os antígenos selecionados no banco de dados - SchistoDB foram submetidos a um alinhamento utilizando a ferramenta BLAST (Basic local alignment search tool) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) acessado em setembro de 2010. A busca foi feita utilizando os bancos de dados de sequências de proteínas não redundante do NCBI. Selecionou-se a ferramenta BLAST para proteínas e especificamente o blastp, que faz a busca através de um banco de dados de sequências de aminoácidos para comparar se estas proteínas selecionadas possuíam similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos. Os resultados foram analisados individualmente e as proteínas que apresentaram acima de 60% de similaridade com proteínas humanas foram excluídas.

4.1.4 Predição de epítipo de célula B

As sequências de proteínas selecionadas com as três análises anteriores (predição de localização celular, predição de domínios transmembrana e similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos) foram submetidas à predição de epítopos de células B no programa BCPRED: B-cell epitope prediction

Server (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>) acessado em outubro de 2010 e a um alinhamento da sequência proteica com o epítipo predito frente às proteínas humanas e de outros helmintos para avaliar se os epítipos de células B estavam presentes em regiões de similaridades entre elas.

A predição de epítipo de célula B foi realizada utilizando o método BCpred com seleção de busca por epítipos com comprimento de 22 aminoácidos. A especificidade padrão de 75% também foi utilizada, e para a saída dos resultados selecionou-se a opção de apresentação de epítipos que não apresentassem sobreposição de sequências.

Para o alinhamento, utilizou-se um BLAST especializado que alinha duas ou mais sequências (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq) do NCBI acessado em outubro de 2010 e especificamente o blastp. O parâmetro padrão para aperfeiçoar sequências altamente similares (Megablast) foi utilizado.

4.1.5 Caracterização das proteínas selecionadas

Por fim, de posse das proteínas selecionadas, suas sequências de aminoácidos foram submetidas à análise para determinar o peso molecular e ponto isoelétrico preditos usando o programa de computador Pi/Mw tool (http://expasy.org/tools/pi_tool.html). Também foi predita a presença de peptídeo sinal usando o SignalP 3.0 para determinar a localização dos sítios de clivagem (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) nas sequências inserindo a sequência de aminoácidos e determinando o grupo do organismo.

A predição de sítio de glicosilação foi realizada inserindo as sequências de aminoácidos no programa Ogpert v 1 (<http://ogpet.utep.edu/OGPET/>). Ambos os programas descritos acima foram acessados em novembro de 2010.

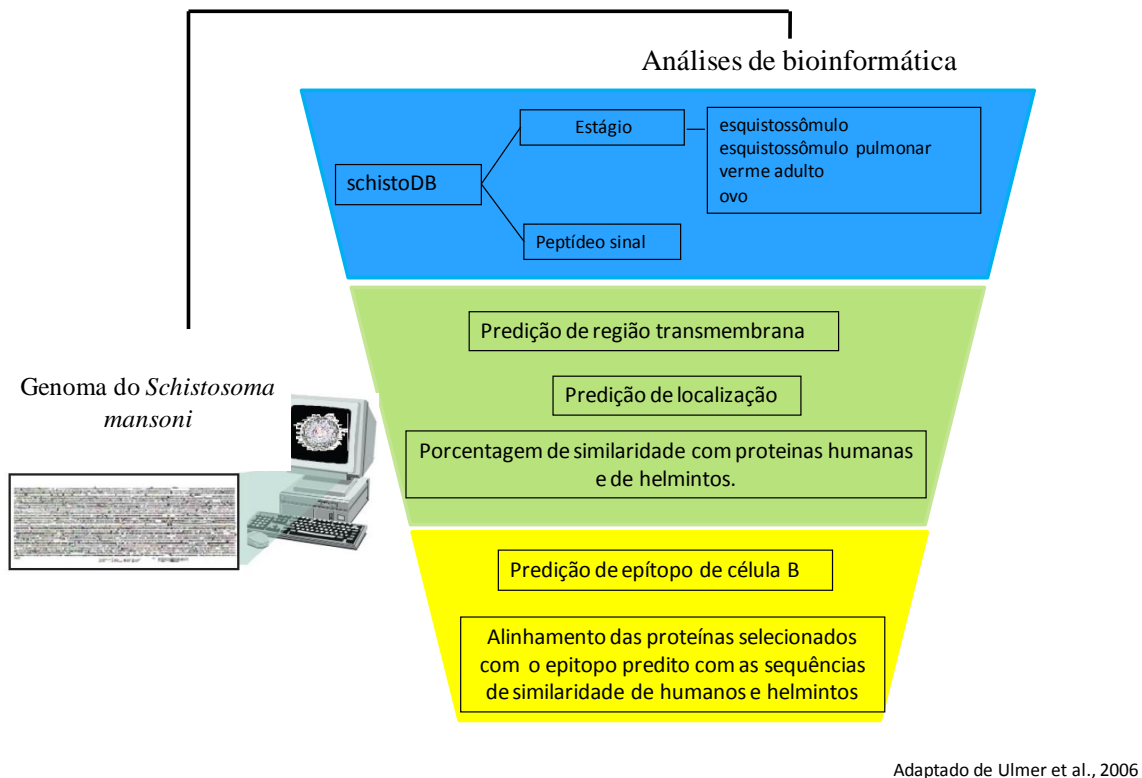


Figura 2 - Fluxo das análises de bioinformática

4.2 Animais e protocolo experimental

Camundongos swiss foram divididos em dois grupos (G1 e G2). O grupo 1 foi composto de 50 camundongos e o grupo 2 de 80 camundongos, devido ao maior tempo de infecção e maior probabilidade de morte dos animais. Todos os camundongos foram infectados individualmente, por via subcutânea, com aproximadamente 25 cercárias da cepa LE. Antes da infecção, foi realizada a obtenção de amostras de sangue destes camundongos através de sangria pelo plexo retro-orbital, configurando assim amostras de sangue de animais não infectados (NI). No grupo 1, o sangue foi retirado através de sangria pelo plexo retro-orbital em tempos diferentes após infecção (dias 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 140). No Grupo 2 - cura pós tratamento - no dia 120 após infecção, os camundongos foram pesados e tratados com o fármaco oxaminiquina em dose única de 400 mg/kg por gavagem sendo o peso dos animais considerado individualmente. Foi realizada coleta de sangue pelo plexo retro orbital desses animais nos dias 90, 119, 150, 180 e 210 após infecção. O sangue coletado foi incubado por 3 horas à temperatura ambiente e centrifugados à 20817 g por 5 minutos. Os soros obtidos foram armazenados em

microtubos identificados e congelados à -20° C até sua utilização. No fim do experimento, os camundongos de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical para perfusão do sistema porta. A perfusão dos camundongos foi realizada individualmente, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Os parasitos foram coletados em becker de 200 mL, lavados em solução salina e contados com auxílio de lupa.

Os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) sob o número de licença LW-25/10 (Anexo 1).

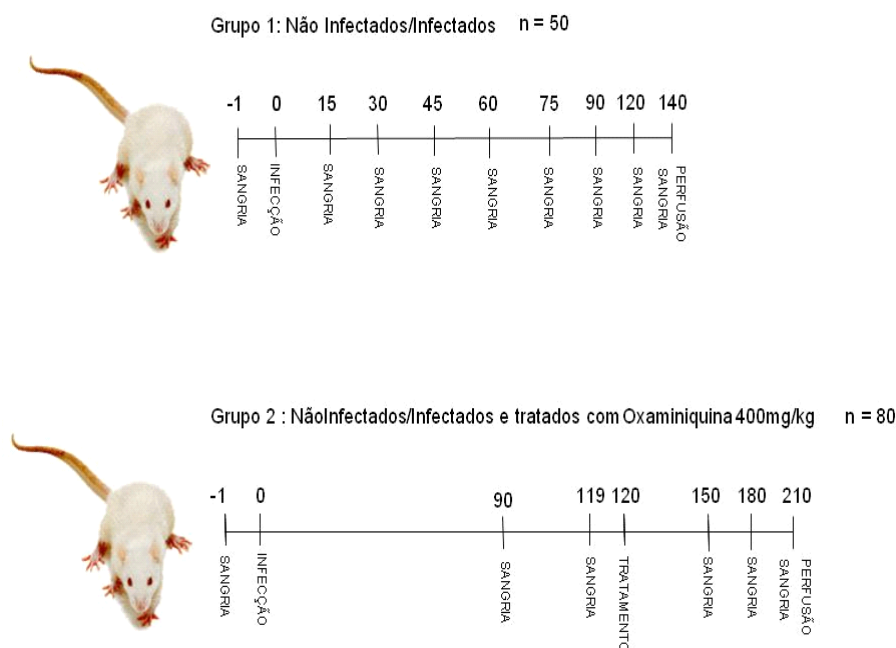


Figura 3 - Protocolo de experimentação animal para obtenção de soro, infecção, tratamento e perfusão.

4.3 Obtenção de antígenos brutos

4.3.1 Preparação de antígeno de esquistossômulo (SAP)

As cercárias do *S. mansoni* de cepa LE foram obtidas através da exposição de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados à luz artificial por 1-2 horas. As

cercárias foram transformadas mecanicamente em esquistossômulos conforme descrito por Ramalho-Pinto e colaboradores (1974). Resumidamente, as cercárias foram deixadas no gelo durante 30 minutos, acondicionadas em tubos cônicos, para reduzir a sua movimentação. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 200 g por 3 minutos. O “pellet” foi ressuspenso em 1mL de Earl’s salts plus lactoalbumin hydrolysate (ELAC) gelado contendo 0,5% lacto albumina, 1% penicilina/estreptomicina e 0,17% glicose. As caudas foram quebradas utilizando-se o vórtex na velocidade máxima por um período de dois minutos. Posteriormente as caudas foram retiradas do meio através de repetidas lavagens com ELAC restando, então, os esquistossômulos. Estes foram incubados por 90 minutos em banho-maria à 37° C com ELAC e após este período de incubação foram lavados com salina apirogênica e centrifugados a 200 g por 1 minuto. Para a obtenção da preparação do antígeno de esquistossômulo (SAP), os esquistossômulos obtidos por transformação mecânica de cercárias, foram triturados com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Virtiz) por trinta e seis vezes, ciclos de trinta segundos cada, alternando com descanso no gelo por sessenta segundos. A suspensão foi centrifugada (4°C/1h/340g) e o sobrenadante dialisado (salina 0,9%, por 48h/4°C). Após a diálise o material foi novamente centrifugado (4°C/15 min./1258g) e o sobrenadante, contendo as proteínas, foi dosado pelo método de Bradford (1976).

4.3.2 Preparação de antígeno de verme adulto (AWP)

Foram utilizados 300 camundongos swiss fêmeas de 8 semanas, as quais foram infectadas com aproximadamente 100 cercárias do *S. mansoni*, por via subcutânea. Para essa infecção, as cercárias foram obtidas através da exposição de caramujos *B. glabrata* infectados à luz por 1 – 2 horas. Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados por descolamento cervical, e foi realizada a perfusão do sistema porta hepático, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes adultos recuperados na perfusão foram processados para a obtenção dos antígenos de verme adulto conforme descrito para obtenção de antígeno de esquistossômulos no item 4.2.1.

4.3.3 Obtenção da Sm200(1069-1520) recombinante

O RNA total foi extraído de vermes adultos do *S. mansoni* e o RNA mensageiro purificado segundo manual do fabricante utilizando-se o kit Qiagen RNeasy (Qiagen). A partir do mRNA foi obtido o DNA complementar (cDNA) através de RT-PCR. De posse do cDNA foi realizado a amplificação do fragmento que codifica uma porção do gene da *Sm200* compreendida entre os nucleotídeos 3224 a 4557. Para a realização da PCR foram utilizados os seguintes iniciadores: 5'-CCGGGATCCGTTATTTACACAGAAGATTTTC-3' e 5'CCCGTCGACTGGTATGCTATCGTTAGTTG-3'. Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit de extração de gel Quiaex II (Qiagen) e clonados no vetor pGEM usando o kit pGEM-T easy (Promega). Posteriormente, a construção foi digerida utilizando as endonucleases de restrição BamHI e Sall (Biolabs) e o inserto subclonado no vetor de expressão bacteriano pET28 (Novagen) nos sítios de clonagem BamHI e Sall. As novas construções foram utilizadas para transformar quimicamente *Escherichia coli* BL21(DE3) e os clones contendo inserto foram selecionados. A presença do gene e a sua correta inserção no plasmídeo foram confirmadas por sequenciamento.

Para obtenção da Sm200(1069-1520) recombinante, um litro de cultura de *Escherichia coli* contendo a construção foi crescido à 37° C até obtenção, na DO₆₀₀, de absorbância de 0,5 e 0,8. Esta cultura foi então induzida por 4 horas à 37°C com 1 mM de IPTG para expressão da proteína recombinante Sm200(1069-1520). Após este período, as células provenientes de 1 litro de cultura foram centrifugadas à 4000 g e ressuspensas em 50 ml de solução de lise (12,5 mM Na₂HPO₄, 12,5 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol). Estas células foram lisadas por três ciclos de sonicação (pulsos de 30 segundos cada) a uma amplitude de 30% e centrifugadas novamente por 20 minutos, 4° C, à 4000 g. A Sm200(1069-1520) recombinantes foi recuperada como corpos de inclusão que foram ressuspensos em 50 ml de tampão (12,5 mM Na₂HPO₄, 12,5 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol, 8M uréia). Em seguida, a purificação foi feita em coluna de níquel através de cromatógrafo FPLC (fast protein liquid chromatography) multidimensional ÄKTA Prime® (GE Healthcare), em condições desnaturantes. A renaturação foi realizada por diálise contra 10 litros de tampão PBS, utilizando membrana porosa de 3 kDa (Spectrum Medical Industries). A proteína recombinante purificada foi dosada pelo método de Bradford (1976).

4.4 Western blot unidimensional

As proteínas SAP (5µg), AWP (5µg) e Sm200(1069-1520) recombinante (3,6µg) foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida 10 % e 12% por eletroforese (Laemmli, 1970). A partir do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) como previamente descrito (Towbin et al., 1979). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com 5 % de leite em pó desnatado à 4°C por 16 horas, e posteriormente incubadas com uma mistura de soro de diferentes camundongos com 15, 30, 45 e 90 dias pós-infecção, na diluição 1:40 durante 1h à temperatura ambiente. Após a reação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBST (0.5M NaCl-0.02M Tris [pH 7.5], 0.05 % Tween 20) e incubadas por 1h à temperatura ambiente com anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Southern Biotech) na diluição 1:5.000 (SAP e AWP) ou 1:4.000 (Sm200(1069-1520) recombinante). Ambos diluídos em TBST contendo 3% de leite em pó desnatado. Após três lavagens com TBST, a membrana foi revelada com o kit revelador BioRad (AP Conjugate Substrate).

4.5 Western blot bidimensional

Para a realização da focalização isoeétrica, 100µg de AWP foram imobilizados em uma fita de gradiente de pH com separação linear nas faixas de 3 a 10 (Biorad). A fita foi submetida à reidratação e focalização isoeétrica à 20°C e 50mA/fita no equipamento "PROTEAN IEF Cell" (Bio-Rad). A reidratação da fita foi feita de forma passiva durante 4 horas, sem corrente, seguida de reidratação ativa, durante 12 horas, a 50 V (Volts). A focalização isoeétrica foi gradualmente aumentada para 4.000V e correu até 16.000 v-h. A fita foi equilibrada em tampão de equilíbrio (6M Uréia; glicerol 30%; SDS 2%; 50mM Tris-HCl pH8,8; 0,001% solução de azul de bromofenol 0,5%) contendo 10mg/ml de ditioneitol, por 10 minutos, sob leve agitação. O tampão foi trocado por outro contendo 25mg/ml de iodoacetamida e a amostra incubada por 10 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente. A fita foi lavada com tampão de corrida SDS-PAGE, colocada sobre o gel de poliacrilamida 15%, e selada com solução de agarose 0,5%.

A eletroforese foi realizada sob 100V – voltagem constante. Após a corrida, a amostra protéica foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (PVDF) (Amersham Biosciences), como previamente descrito (Towbin et al., 1979). A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 3 % de leite em pó desnatado a 4°C por 16 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por 2 vezes de 30 minutos com TBST (0.5M NaCl-0.02M Tris [pH 7.5], 0.05 % Tween 20) e incubada com uma mistura de soro de diferentes camundongos com 15, 30, 45 e 90 dias pós-infecção, na diluição 1:40 por 16 horas. Após lavagem com TBST - 2 vezes de 30 minutos, a membrana foi incubada com anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase na diluição (1:5.000) (Promega) por 2 horas a temperatura ambiente. Para detecção, a membrana foi incubada com solução de substrato DAB (diaminobenzidine trahydrochloride peroxidase) (Sigma Aldrich) e a reação foi interrompida com água.

4.6 ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado em placas de fundo chato (maxisorp NUNC®), utilizando-se o antígeno recombinante Sm200(1069-1520). As placas foram sensibilizadas com 100ul/poço de tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6 contendo o antígeno na concentração 5µg/mL, e incubadas por aproximadamente 16 horas à 4°C. Para remover as proteínas não ligadas, as placas foram lavadas com PBS 150mM contendo 0.05% de Tween 20 (PBS Tween) e bloqueadas com PBST e 3% de leite em pó desnatado por aproximadamente 16 horas à 4°C. Os soros obtidos dos animais foram diluídos (1:40) em PBS Tween, adicionados (100L/poço) às placas e incubados por uma hora, à temperatura ambiente. Como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SouthernBiotec) na diluição 1:10.000. Após novas lavagens, a reação foi revelada por 15 minutos com 100µL TMB. A reação foi interrompida com 50µl de ácido sulfúrico. A densidade ótica foi então determinada em leitor automático de ELISA (Biorad), utilizando-se filtro de comprimento de onda de 450 nm.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 4.0 (San Diego, Ca, USA). Os resultados, que apresentaram distribuição

normal, foram analisados utilizando: análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey quando as comparações envolveram mais de duas variáveis. O teste t de student foi empregado quando comparadas somente duas variáveis.

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

O ponto de corte entre os resultados positivos e negativos foram determinados utilizando o Software GraphPad Prism 4.0 (San Diego, Ca, USA) através das Curvas de Características de Operação do Receptor (Curvas ROC - *Receiver Operating Characteristic*) que permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Carvalho GBF, Silva-Pereira RA, Pacífico LG, Fonseca CT. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2011; Nov;106(7):837-43.

O artigo científico apresentado a seguir corresponde ao primeiro objetivo específico

Titulo: Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis

Autores: Carvalho G B F, Silva-Pereira R A, Pacífico L G G, Fonseca C T.

Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2011 Nov;106(7):837-843.

Este artigo baseou-se na utilização do banco de dados genômico para o parasito *S. mansoni* - SchistoDB e de várias ferramentas de bioinformática para selecionar antígenos candidatos para serem testados no imunodiagnóstico da esquistossomose mansoni. Evidências de que os antígenos selecionados representavam antígenos promissores para serem utilizados no diagnóstico sorológico da esquistossomose foram fornecidas pelo reconhecimento, por soro de camundongos infectados, de antígenos dos extratos antigênicos do parasito com tamanho e ponto isoelétricos semelhantes aos antígenos selecionados pela estratégia de análise *in silico*.

Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis

Gardênia Braz Figueiredo Carvalho¹, Rosiane Aparecida da Silva-Pereira²,
Lucila Grossi Gonçalves Pacífico¹, Cristina Toscano Fonseca^{1,3/+}

¹Laboratório de Esquistossomose ²Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular,
Instituto de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil
³Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais

The development of a more sensitive diagnostic test for schistosomiasis is needed to overcome the limitations of the use of stool examination in low endemic areas. Using parasite antigens in enzyme linked immunosorbent assay is a promising strategy, however a more rational selection of parasite antigens is necessary. In this study we performed in silico analysis of the Schistosoma mansoni genome, using SchistoDB database and bioinformatic tools for screening immunogenic antigens. Based on evidence of expression in all parasite life stage within the definitive host, extra-cellular or plasmatic membrane localization, low similarity to human and other helminthic proteins and presence of predicted B cell epitopes, six candidates were selected: a glycosylphosphatidylinositol-anchored 200 kDa protein, two putative cytochrome oxidase subunits, two expressed proteins and one hypothetical protein. The recognition in unidimensional and bidimensional Western blot of protein with similar molecular weight and isoelectric point to the selected antigens by sera from S. mansoni infected mice indicate a good correlation between these two approaches in selecting immunogenic proteins.

Key words: *Schistosoma mansoni* - diagnosis - antigen candidate - bioinformatics analysis

Recently, in Brazil an increased number of low schistosome endemic areas, expanded geographical extension of the disease, appearance of new foci and acute outbreaks of the disease have been observed, indicating that although control programs succeeded on reducing morbidity and mortality they failed to control the disease transmission (Katz 1998, Barbosa et al. 2001, Enk et al. 2003). The lack of effective diagnostic assays to identify individuals with low parasite burden is one factor that contributes to transmission (Enk et al. 2008).

Currently, the common used method in the diagnostic of schistosomiasis is stool examination, using the Kato-Katz method. However, this method presents limitation in the detection of positive individuals, when the intensity of infection is low and it is less effective in determining the prevalence in low endemic areas (Feldmeier & Poggensee 1993, Kongs et al. 2001).

The detection of antibodies specific to parasite antigens is more sensitive to detect light infections and can be applicable to large scale examination (Sorgho et al. 2005, Alarcón de Noya et al. 2007). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) is a serological test useful for epidemiological studies, due to its high sensitivity for the diagnosis of schistosomiasis, de-

pending on the *Schistosoma mansoni* antigen used in the test (Ishida et al. 2003, Sorgho et al. 2005, Alarcón de Noya et al. 2007, Luo et al. 2009), and the possibility for automating the process. However, until now the utilization of the ELISA for diagnosis of schistosomiasis does not discriminate ongoing and previous infection (Kato-Hayashi et al. 2010). In addition, some antigens used in ELISA present cross reaction with antigens from other helminths as ancylostomides and *Ascaris lumbricoides* (Correa-Oliveira et al. 1988, Ishida et al. 2003, Luo et al. 2009). A rational selection of antigens to be used in the serological diagnosis of schistosomiasis may overcome this ELISA limitation use.

The availability of complete genome sequences in combination with novel advanced technologies have contributed to vaccinology field, leading to vaccine development starting from the prediction of all antigens in silico, independently of their abundance and without the need to grow the pathogen in vitro, a strategy known as reverse vaccinology (Capecchi et al. 2004, Bai & Borrow 2010, Zhao et al. 2011).

In this context, following the same principles of the reverse vaccinology, it would be possible using bioinformatics tools and performing in silico analysis to select promising antigens to be used for diagnosis of the schistosomiasis mansoni, since the *S. mansoni* genome had already been sequenced (Berriman et al. 2009).

The important features to identify promising antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis must be based on: expression of the gene encoding the protein in all the three different stages of the parasite's life cycle within the definitive host, the localization of antigens in the parasite (secreted or on the parasite surface), low similarity to human and other helminthic proteins and presence of predicted B cell epitopes.

Financial support: RIPAG/FIOCRUZ-MG, PAPES V/FIOCRUZ, CPqRR/FIOCRUZ-MS, FAPEMIG
Fellowships: FAPEMIG (to GBFC), PV/CNPq (to LGGP), PQ/CNPq (to CTF).

+ Corresponding author: ctoscano@cpqrr.fiocruz.br

Received 20 April 2011

Accepted 26 July 2011

In the present study we have proposed a new strategy to identify antigen candidates to be used in the schistosomiasis diagnosis based on the detection of specific antibodies against these antigens by ELISA.

MATERIALS AND METHODS

In silico analysis - Evidence of gene expression - To select schistosome proteins with evidence of expression in the three parasite life cycle stages on the definitive host (schistosomulum or lung schistosomulum, adult worm and egg) the SchistoDB database (schistodb.net/schistodb20/) was accessed. The SchistoDB contains several different *S. mansoni* data sets and the results of different computational analyses are integrated in a relational database that has permitted us to apply a technique known as genomic filtering. The current 2.0 database version provides access to the latest draft of *S. mansoni* genome sequence and annotation obtained from the Wellcome Trust Sanger Institute and the mitochondrial genome.

Cellular localization - To select proteins that are expressed on the parasite surface or secreted by the parasite we performed *in silico* analysis for the presence of signal peptide, transmembrane domain and topology and also the prediction of cellular localization. The genes encoding proteins with evidence for gene expression in the three stages of the parasite life cycle on the definitive host were first submitted to signal peptide prediction using the software Server SignalP 3.0 (cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Expasy Proteomics Server). The prediction of transmembrane domain was performed using the software SOSUI Engine version 1.11 (bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/) (Expasy Proteomics Server) that predicts a part of the secondary structure of proteins from a given amino acid sequence. The cellular localization was predicted using the SherLoc software (bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc/) (Applied Bioinformatics Group) that is a new comprehensive system for predicting the localization of eukaryotic proteins.

Human and helminths similarity - To access the similarity between selected proteins in the previous *in silico* analysis with human or helminthic proteins, the amino acid sequences were compared with the National Center for Biotechnology Information protein database using the BlastP algorithm (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool) using the default parameters of this algorithm.

B cell epitope prediction - The B cell epitope prediction was performed using the program BCPREDS B-cell epitope prediction Server (ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/) (Artificial Intelligence Research Laboratory) available online. The software for the detection of linear B cell epitopes is based on the Support Vector Machines (SVM) – machine learning method using subsequence kernel (SSK) in building SVM classifiers.

Characterization of the selected proteins - To characterize the selected proteins we performed the prediction of molecular weight and isoelectric point using the software Compute pI/Mw tool (expasy.org/tools/pi_tool.

html) (Expasy Proteomics Server) and the prediction of potential O-glycosylation sites using the OGPET v 1.0 (ogpet.utep.edu/OGPET/) (Biological Sciences).

Antigens preparation - Cercariae obtained from *Biomphalaria glabrata* snails exposed to light for 2 h were mechanically transformed in skin-stage schistosomula according to Ramalho-Pinto et al. (1974). Briefly, cercariae were incubated on ice for 30 min and centrifuged for 3 min, 1.800 g, 4°C. The cercariae were resuspended in 1 mL of cold Earle's salts plus Earle's lactalbumin hydrolysate (ELAC) containing 0.5% lacto albumin, 1% penicillin/streptomycin and 0.17% glucose. The tails were detached by vortex in high speed for 2 min. Afterwards the tails were removed by washing with ELAC for six times. The schistosomula were incubated for 1 h and 30 min at 37°C in ELAC and washed with apyrogenic physiologic saline. The adult worms (male and female LE strain *S. mansoni*) were obtained from infected mice. The schistosomula antigens preparation (SAP) and adult worm antigens preparation (AWP) were obtained by homogenization of recently transformed schistosomula and adult worms, respectively, in 37 cycles of 30 s on ice using virtz, with 1 min interval on ice between each cycle. After homogenization, antigen preparations were submitted to centrifugation at 340 g for 1 h at 4°C. Antigen preparations were dialysed against physiologic saline 0.85%. The total protein concentration content of each preparation was determined according to Bradford (1976).

Western blot unidimensional (1D) - AWP and SAP proteins were separated on a 10% or 12% denaturing polyacrylamide gel by electrophoresis (Laemmli 1970). From the gel, the protein was transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) as previously described by Towbin et al. (1979). The nitrocellulose membranes were blocked with 5% dry milk at 4°C overnight and reacted with pool of serum from infected mice diluted 1:40 for 1 h at room temperature (RT). After three washes with 0.5 M NaCl-0.02M Tris-buffered saline (pH 7.5), 0.05% Tween 20 (TBST), the membranes were incubated for 1 h at RT with anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate 1:5.000 (SouthernBiotec) in TBST plus 3% dry milk. After three washes with TBST, the membranes were treated with alkaline phosphatase reaction developing buffer together with the BioRad revelator kit.

Western blot bidimensional (2D) - A hundred micrograms of AWP were loaded on immobilized pH gradient strip with linear gradient separation of pH ranging from three-10 (Bio-Rad). The strip was submitted to rehydration and isoelectric focalization at 20°C and 50 mA/strip in Protean IEF Cell (Bio-Rad). Passive rehydration was performed for 4 h followed by an active rehydration at 50 V for 12 h. Isoelectric focusing was gradually increased to 4.000 V and run for 16.000 V-h. The strip was equilibrated in a buffer containing dithiothreitol and after iodoacetamide. The molecular weight standard (Pre-stained BenchMark, Invitrogen) and the strip were placed on 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and sealed with 0.5% agarose solution. The electrophoresis was carried out

under 100 V constant voltage. From the gel, the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences) as previously described by Towbin et al. (1979). The PVDF membranes were blocked with 3% dry milk, then washed twice for 30 min with TBST and incubated with serum pool from infected mice (1:40) overnight. After washes with TBST, the second antibody, an anti-mouse IgG conjugated to peroxidase diluted 1:5.000, was added to the membrane and incubated at RT for 2 h. For detection, the membrane was incubated with diaminobenzidinetetrahydrochloride peroxidase substrate solution (Sigma Aldrich).

Ethics - All procedures involving animals were approved by the local Ethical Commission on Animal Use from Fiocruz (LW25-10).

RESULTS

In silico analysis - In order to select *S. mansoni* antigen candidates for the immunodiagnosis of schistosomiasis, in silico analyses were performed using a variety of bioinformatics tools. In the first analysis in SchistoDB database, based on evidence of gene expression at different stages of the parasite's life cycle (lung schistosomula or schistosomula, adult worms and eggs) or based on the presence of signal peptide, 21.168 sequences were found and many were redundant sequences, since the genome has nearly 13.000 transcripts (Berriman et al. 2009). By crossing these data and select only those sequences that were common to all life stages of the parasite on the definitive host and also presented a predicted signal peptide, this number was reduced to 72 sequences (Fig. 1).

Subsequently, these 72 sequences were submitted to three more in silico analyses. We first performed the prediction of transmembrane domain using the software SOSUI, where 59 out of the 72 protein sequences had at least one predicted transmembrane domain (data not shown). Next, we performed the prediction of cellular

localization in SherLoc in order to see if the sequences were secreted or exposed. From the 72 sequences analyzed, 20 were predicted as transmembrane proteins and 16 were predicted as secreted proteins. The other proteins were predicted to be peroxisomal, golgi apparatus, endoplasmic reticulous and lysosomal proteins (data not shown). We also performed a search for similarity in a protein database using the BlastP algorithm to determine the percentage of similarity of the 72 selected sequences with human proteins and with proteins from other helminths. None of them had similarity with any helminthic proteins. Regarding human proteins, 55 sequences had similarity with human proteins ranging from 9-99% of similarity (data not shown). The proteins that presented at least 60% similarity with human proteins were excluded from our analysis as well as those proteins predicted to be peroxisomal, golgi apparatus, endoplasmic reticulous and lysosomal proteins. After these analysis, only 10 sequences were selected and submitted to the prediction of B cell epitope using BCpred tool (Fig. 1). Based on the presence of predicted B cell epitopes and also on the presence of this B cells epitopes, only in *S. mansoni* protein or in *S. mansoni* protein region without identity with-human proteins, six candidates were selected (Table): a 200 kDa glycoposphatidylinositol (GPI)-anchored surface glycoprotein (Smp_017730), an expressed protein of 12.8 kDa (Smp_034420.1), a cytochrome oxidase subunit, putative of 16.5 kDa (Smp_184550), a cytochrome oxidase subunit, putative of 18.9 kDa (Smp_184440), a hypothetical protein of 127.8 kDa (Smp_171300) and an expressed protein of 43.5 kDa (Smp_042910). Predicted B cell epitopes with scores higher than 0.9 are demonstrated in the protein sequence (Fig. 2). In order to characterize these six selected proteins we performed in silico analysis to predict molecular weight, isoelectric point and glycosylation site. Fig. 3 shows the signal peptide position in the protein sequence as well as predicted O-glycosylation sites.

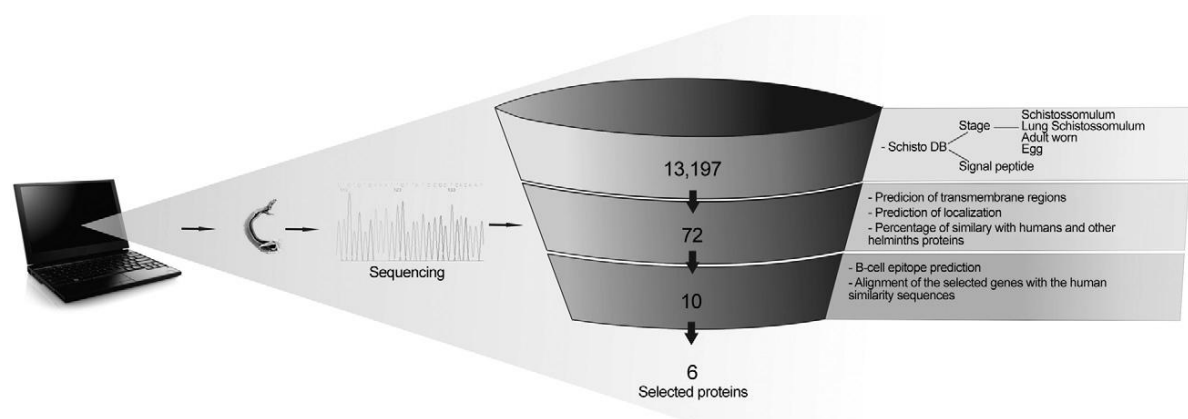


Fig. 1: computational analysis for selection of potential antigens for immunodiagnosis. From genome sequence information, potential antigens were identified using bioinformatics tools. The first analysis was performed in 13.197 schistosome transcripts using SchistoDB (schistodb.net/schistodb20/) database. Based on evidence of gene expression at different stages of the life cycle of the parasite on the definitive host and prediction of signal peptide, this number was reduced to 72 sequences. The prediction of transmembrane domain, cellular localization and percentage of similarity with human and helminthic proteins led to the selection of 10 proteins. B-cell epitope prediction analysis resulted in selection of six candidates to be used in serological diagnosis of the disease. Adapted from Ulmer et al. (2006).

840 *S. mansoni* candidates for diagnosis • Gardênia Braz Figueiredo Carvalho et al.

TABLE
Candidate proteins to be used in serological diagnosis of schistosomiasis mansoni selected by in silico analysis of the parasite genome

Protein	SchistoDB number	Annotation	Amino acid (n)	Base pairs	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point	Predicted location	B epitopes (n)	Similarity with human proteins (%)	Similarity with helminths proteins
Sm200	Smp_017730	200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	1.656	4.971	186.5	4.97	Plasma membrane	37	12	-
Sm12.8	Smp_034420.1	Expressed protein	117	354	12.8	6.88	Extracellular	3	59	-
Sm43.5	Smp_042910	Expressed protein	382	1.149	43.5	8.43	Extracellular	6	-	-
Sm127.9	Smp_171300	Hypothetical protein	1.143	3.432	127.9	6.63	Extracellular	28	10	-
Sm18.9	Smp_184440	Cytochrome oxidase subunit, putative	171	516	18.9	9.30	Extracellular	1	-	-
Sm16.5	Smp_184550	Cytochrome oxidase subunit, putative	146	441	16.5	9.14	Extracellular	1	-	-

GPI: glycosphosphatidylinositol.

Western blot 1D - In order to evaluate the immunogenicity of the proteins selected based on our filter criteria, a 1D Western blot was performed using adult worm and schistosomula preparation and sera from mice infected with *S. mansoni*. In Fig. 4A, line 3, a recognition of proteins with approximately 200 kDa, 100 kDa, 43 kDa and 18 kDa by sera from infected mice in AWP was observed. Also in Fig. 4A, line 5, a similar recognition pattern of proteins from SAP with approximately molecular weight of 100 kDa, 43 kDa and 18 kDa by sera of infected mice could be observed. The recognition observed in lines 3 and 5 is due to *S. mansoni* infection since sera from non-infected mice were unable to recognize these proteins (lines 4, 6). In order to evaluate if sera from infected mice are able to recognize proteins with lower molecular weight, a Western blot was performed in 12% SDS-PAGE using SAP. In Fig. 4B, line 2, the recognition of a protein with approximately 14.4 kDa could be observed. Also in this Western blot the recognition of proteins with approximately molecular weight of 18 kDa and 43 kDa could be observed.

Western blot 2D - To further characterize the proteins from AWP recognized by sera from infected mice, a Western blot in a 2D gel was performed. As shown in Fig. 5, many spots from AWP were recognized by sera from infected mice. The spots inside the circles may correspond to the antigens selected by the in silico selection strategy, since they have an isoelectric point and molecular weight similar to the ones predicted to each protein. Spots corresponding to proteins of molecular weight higher than 82 kDa could not be observed in this 2D Western blot (Fig. 5).

DISCUSSION

Due to decades of control program based on chemotherapy, the schistosomiasis epidemiological profile in Brazil has changed, with an increase in the number of low schistosome endemic areas (Katz 1998). The low excretion of eggs in faeces makes the diagnosis difficult when the Kato-Katz method is used, there is thus a need for a more sensitive test. Immunodiagnosis based on the presence of antibodies increases the detection of positive cases and constitutes especially a useful method for schistosomiasis diagnosis (Sorgho et al. 2005, Alarcón de Noya et al. 2007). Parasite antigens preparations are examples of antigens used for schistosomiasis diagnosis based on ELISA. A sensitivity of 94-100% (Ishida et al. 2003, Sorgho et al. 2005) or 96-100% (Sorgho et al. 2005, Alarcón de Noya et al. 2007) can be observed when adult worm or egg antigens are used in this serological assay, respectively. However, cross reactivity between schistosomiasis and other helminthoses has been reported (Ishida et al. 2003).

A more rational strategy to select candidates for schistosomiasis serological diagnosis can be now performed using bioinformatic tools and the genome information available for *S. mansoni* (Berriman et al. 2009). Herein, we performed bioinformatics analysis of *S. mansoni* genome in order to identify promising antigens to be used in a diagnostic assay for schistosomiasis. The first analysis was based on the evidence of gene expres-

sion in all life cycle forms inside the definitive host and also in the presence of signal peptides. These two inclusion criteria reduced the 13.197 transcript described for *S. mansoni* (Berriman et al. 2009) to 72 protein sequences, representing 0.54% of the parasite transcriptome. These proteins have a potential to induce an antibody response during infection since they were predicted to be expressed and also may be exposed to host immune system. Signal peptides can drive proteins to a secretion pathway, to membrane and also to intracellular compartment (Blobel 1980). In order to verify if these 72 proteins are secreted or localized in the parasite membrane, we performed a transmembrane domain and cellular localization predictions. The result demonstrates that

59 sequences had at least one transmembrane domain. Cellular localization prediction indicated that only 20 sequences corresponded to transmembrane proteins and 16 sequences corresponded to secreted proteins. The difference in transmembrane domain and cellular localization predictions could be explained by the way these algorithms analyze amino acid sequences. SOSUI identifies transmembrane region based on hydrophobicity of the sequence (Hirokawa et al. 1998) whereas Sherloc

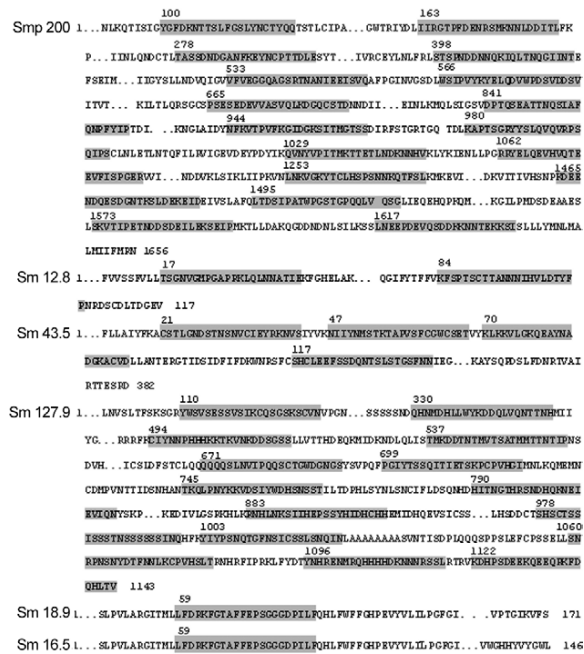


Fig. 2: B-cell epitope in the selected proteins. The highlighted amino acids within the protein sequence represent B-cell epitopes predicted using BCPreds and its amino acid position in the protein sequence.

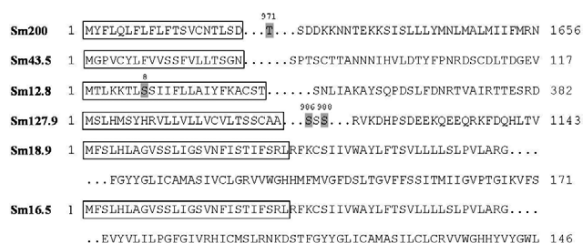


Fig. 3: signal peptide and glycosylation site in selected proteins. The square represents the predicted peptide signal using SignalP and the highlighted amino acid represents the site for predicted glycosylation using OGPET v 1.0 algorithm. The amino acid position for glycosylation sites are pointed in the protein sequence.

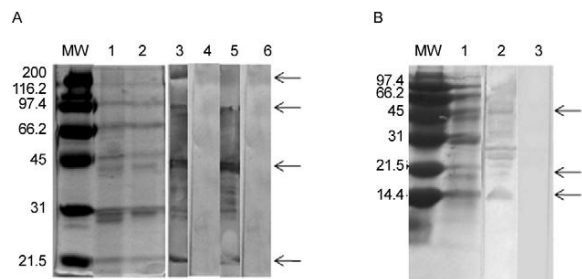


Fig. 4: recognition of schistosomula and adult worm proteins by sera from mice infected with *Schistosoma mansoni*. Ten micrograms of schistosomula (Lines 1, 3, 4 from A, 1-3 from B) and adult worm proteins (Lines 2, 5, 6 from A) were separated in a 10% (A) or 12% (B) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane by Western blot. Afterwards, the membranes were probed with sera from mice infected with *S. mansoni* (in A, Lines 3, 5, in B, 2) or with sera from non-infected mice as a negative control (in A, Lines 4, 6, in B, 3). Molecular weight (MW), Lines 1, 2 (A) and 1 (B) were stained with comassie blue.

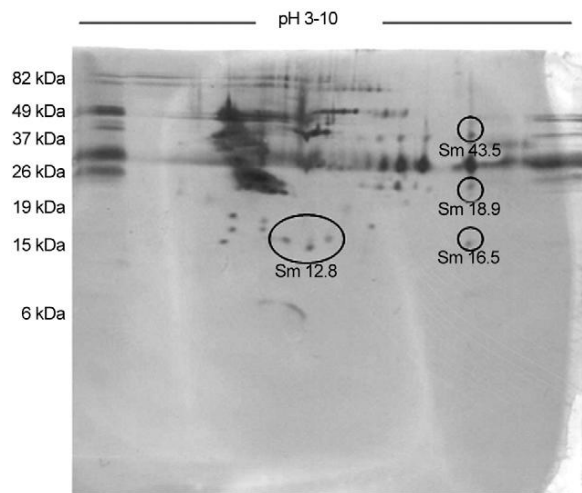


Fig. 5: molecular weight and isoelectric profile from proteins recognized by *Schistosoma mansoni* infected mice sera. One hundred micrograms of adult worm antigens were separated in a bidimensional gel using immobilized pH gradient strip pH 3-10 and 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane and probed with sera from mice infected with *S. mansoni*. The circles demonstrate the spots that probably represent the antigens selected by our in silico analyzes.

predicts subcellular location based on a set of features that correlate with location (Shatkay et al. 2007).

Another important characteristic to be considered while analysing genome search for candidates to be used in diagnostic assays is its similarity to human proteins, since auto reactive clones are eliminated or regulated by the immune system (Abbas et al. 1997) leading to poor immunogenic antigens. Our results demonstrated that in the 72 amino acids sequences, 59 had similarity with human proteins ranging from 9-99%. High similarity with human proteins was also an exclusion criterion. Proteins with similarity with human proteins higher than 60% were excluded from our screening.

Cross reactivity of schistosoma antigens with other helminthic antigens is also a concern while screening candidates for immunodiagnosis. *S. mansoni* and soil transmitted helminths distribution usually coincides (Raso et al. 2006, Brooker & Clements 2009, Clements et al. 2010). Even the use of a protein from the parasite as antigens in ELISA instead of parasite extract may result in cross recognition. Recently, the recombinant forms of Sj14-3-3 and Sj26-GST were used for *Schistosoma japonicum* diagnosis with 94.4% and 80.7% sensibility, respectively, but with cross-reaction with *Clonorchis sinensis* and hookworms (Luo et al. 2009). In our screening selection, similarity with other helminthic proteins was one of the exclusion criteria. Nevertheless, none of the 72 sequences selected in the first analysis had any similarity with other helminthic protein besides schistosome. Considering the cellular location and similarity to human protein, 10 proteins out of the 72 sequences analysed were selected. In order to predict immunogenicity, B cell epitope prediction was performed. All proteins had B cell epitopes predicted in their sequences, the ones that presented B cell epitopes predicted in the region of similarity between *S. mansoni* and human proteins were excluded from our screening. At the end of all analysis we selected six candidates to be used in serological diagnosis for schistosomiasis with predicted molecular weight ranging from 12.8-186.5, and predicted isoelectric point ranging from 4.97-9.3. One of this protein sequence corresponded to Sm200, a GPI-anchored protein present in *S. mansoni* tegument (Braschi et al. 2006, Castro-Borges et al. 2011) that serves as a target for antibodies and seems to contribute to praziquantel therapeutic action (Sauma et al. 1991). Sm12.8 and Sm43.5 were annotated as expressed proteins; Sm127.9 is a hypothetical protein. Two others selected proteins, Sm16.5 and Sm18.9, are putative cytochrome oxidase subunits, a protein involved in glucose metabolism that is expressed in cercaria tail and male and female adult worm (Skelly et al. 1993). Although Sm16.5 and Sm18.9 were selected in our screening strategy, they may not represent good candidates to be used on schistosomiasis diagnosis, since cytochrome oxidase probably will not be available to host immune system recognition thus not inducing antibodies production in an infected individual.

The immunogenicity of schistosome proteins were accessed in a 1D and 2D Western blot, using schistosoma antigen preparation, adult worm preparation

and sera from infected mice. Antibodies from the sera of infected mice recognize many proteins in the parasite preparation, some of the recognized proteins have molecular weight and isoelectric point similar to those predicted or documented for the proteins. An exception could be observed in Sm12.8 and Sm127.9 that may have had a different migration pattern due to post-translational modification. Although the identification of protein spots recognized by sera from infected mice through mass spectrometry is necessary, the Western blot 1D and 2D results indicate a good correlation between these two approaches and our in silico screening strategy in selecting immunogenic proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

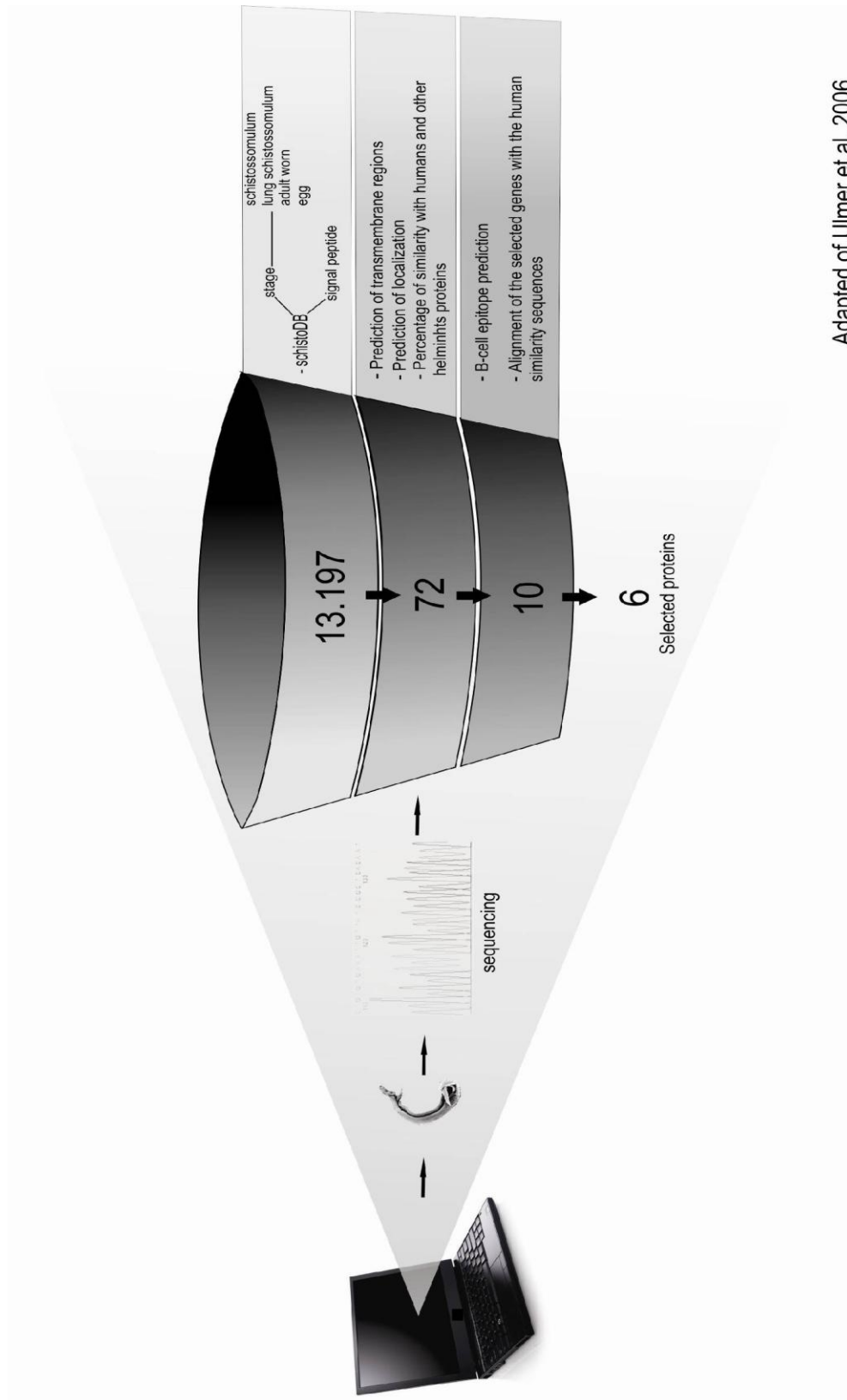
To the Program for Technological Development in Tools for Health-Fiocruz, for use of its facilities.

REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS 1997. Self-tolerance and autoimmunity. In AK Abbas, AH Lichtman, JS Pober, *Cellular and molecular immunology*, chapter 19, WB Saunders Company, Philadelphia, p. 406-422.
- Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari IM, Noya O 2007. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria the Venezuelan experience. *Acta Trop* 103: 41-49.
- Bai X, Borrow R 2010. Genetic shifts of *Neisseria meningitidis* serogroup B antigens and the quest for a broadly cross-protective vaccine. *Expert Rev Vaccines* 9: 1203-1217.
- Barbosa CS, Montenegro SML, Abat FGC, Domingues ALC 2001. Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 (Suppl.): 169-172.
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivans A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail M A, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett C M, Barrell BG, El-Sayed NM 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460: 352-358.
- Blobel G 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1496-1500.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braschi S, Borges WC, Wilson RA 2006. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I): 205-212.
- Brooker S, Clements AC 2009. Spatial heterogeneity of parasite coinfection: determinants and geostatistical prediction at regional scales. *Int J Parasitol* 39: 591-597.
- Capecchi B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M 2004. The genome revolution in vaccine research. *Curr Issues Mol Biol* 6: 17-28.
- Castro-Borges W, Dowle A, Curwen RS, Thomas-Oates J, Wilson RA 2011. Enzymatic shaving of the tegument surface of live

- schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e993.
- Clements AC, Deville MA, Ndayishimiye O, Brooker S, Fenwick A 2010. Spatial co-distribution of neglected tropical diseases in the east African great lakes region: revisiting the justification for integrated control. *Trop Med Int Health* 15: 198-207.
- Correa-Oliveira R, Dusse LM, Viana IR, Colley DG, Santos Carvalho O, Gazzinelli G 1988. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am J Trop Med Hyg* 38: 348-355.
- Enk MJ, Amorim A, Schall VT 2003. Acute schistosomiasis outbreak in the metropolitan area of Belo Horizonte, Minas Gerais: alert about the risk of unnoticed transmission increased by growing rural tourism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 745-750.
- Enk MJ, Lima AC, Massara CL, Coelho PM, Schall VT 2008. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 78: 140-146.
- Feldmeier H, Poggensee G 1993. Diagnostic techniques in schisto- somiasis control. A review. *Acta Trop* 52: 205-220.
- Hirokawa T, Boon-Chiang S, Mitaku S 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane pro- teins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S, Vaz A J 2003. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop* 89: 73-84.
- Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, Chigusa Y 2010. Identification and differentiation of human schistosomes by chain reaction. *Experimental Parasitology* 124: 325-329.
- Katz N 1998. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. I): 33-35.
- Kongs A, Marks G, Verle P, Van det Stuyft P 2001. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluation of *S. mansoni* infections. *Trop Med Int Health* 6: 163-169.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Luo QL, Qiao ZP, Zhou YD, Li XY, Zhong ZR, Yu YJ, Zhang SH, Liu M, Zheng MJ, Bian MH, Shen JL 2009. Application of signaling protein 14-3-3 and 26 kDa glutathione-S-transferase to serological diagnosis of schistosomiasis japonica. *Acta Trop* 112: 91-96.
- Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Exp Parasitol* 36: 360-372.
- Raso G, Vounatsou P, Singer BH, N'Goran EK, Tanner M, Utzinger J 2006. An integrated approach for risk profiling and spatial prediction of *Schistosoma mansoni*-hookworm coinfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6934-6939.
- Sauma SY, Tanaka TM, Strand 1991. Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 46: 73-80.
- Shatkay H, Höglund A, Brady S, Blum T, Dönnies P, Kohlbacher O 2007. SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data. *Bioinformatics* 23: 1410-1417.
- Skelly PJ, Stein LD, Shoemaker CB 1993. Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation. *Mol Bio- chem Parasitol* 60: 93-104.
- Sorgho H, Bahgat M, Poda JN, Song W, Kirsten C, Doenhoff MJ, Zongo I, Ouédraogo J B, Ruppel A 2005. Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. *Acta Trop* 93: 169-180.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Ulmer JB, Wahren B, Liu MA 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med* 12: 216-222.
- Zhao BP, Chen L, Zhang YL, Yang JM, Jia K, Sui CY, Yuan CX, Lin JJ, Feng XG 2011. *In silico* prediction of binding of promiscuous peptides to multiple MHC class-II molecules identifies the Th1 cell epitopes from secreted and transmembrane proteins of *Schistosoma japonicum* in BALB/c mice. *Microbes Infect* 13: 709-719.

Figure 1



Adapted of Ulmer et al. 2006

Figure 2

Smp200 1...NLKQITISIGYGFDKNTTSLFGSLYNCTYQQTSTLCIPA...GWTRIYDLIIRGTFDENRSMKNNLDDITLFPK
 100 163
 278 398
 P...IINLQNDCTLTASSDNDGANFKEYNCPTTDLESYT...IVRCEYLNLFRLSTSPNDNNQKIQLTNQGIINTE
 533 566
 FSEIM...IIGYSLNDVQIGVVFVEGGQAGSRTNANIEEISVQAFPGINVGSDLWSIPVYKYELQDVWPDSDVDDSV
 665 841
 ITVT...KILTLQRSGCSPSESEDEVVASVOLKDGQCSTDNMDII...EINLKMQLSIGSYDPTQSEATTNQSIAP
 944 980
 QMPFYIPTDI...KNGLAIDYMFKVTPVFKGIDGKSITMGTSSDIRFSTGRTGQ TDLKAPTSGRYYSLOVQVRPS
 1029 1062
 QIPSCLNLETLNTQFILRVIGEVDEYPDYIKQVNVVPIITMKTETLMDKNNHVKL YKIENLLP GRRYELQEVHVQTE
 1253 1465
 EVFISPGERVVI...MDDVKLSIKLIIPKVNLNKVGKYTCLHSPSNKQTFSLKMKKEVI...DKVITIVHSNPKDEE
 1495
 MDQESDGNTKSLDEKEIDEIVSLAFQLTDSIPATWPGSTGPGQLV QSGLEIQEHQPKQM...KGLFPMDSDEAAES
 1573 1617
 LSKVTIPETNDDSDILEKSEIPMKLLDAKQGGDDNMLSIKSSLMEEPDEVQSDDKKNWTEKKSISLLLYMMLMA
 LMIIFMRN 1656

Sm12.8 1...FVVSSEVLLTSGNVGMPGAPRKLQLNMATIEKFGHELAK...QGIFYTFFVKFSPTSCTTANNNIHVLDTYF
 17 84
 ENRDSCDLTDGEV 117

Sm43.5 1...FLLAIFYKACSTLGNDS TNSNVCI EYRKNVSIYVKN I IYNMSTKTAPVSFCGWCSETV YKLLKVLGKQBAYNA
 21 47 70
 117
 DGKACVDLLANTERTIDSIDFIPDKWNRSFCSHCLEEFSSDQNTSLS TGSFNMIEG...KAYSQPDLSLFDNRVAI
 RTTESRD 382

Sm127.9 1...LNVSLTFSKSGRYWSVSESSVS IKCQSGSKSCVNVPGN...SSSSNDQHNMDHLLWYKDDQLVQNTTNHMI I
 494 537
 YG...RRRFKCIYNNPHHHKTKVNKDDSGSSLVTTTHDEQFMIDKNDLQLISIMKDDTNTMVTATMTTNTTIPNS
 671 699
 DVH...ICSLDFSTCLQQQQSLNVIPQQSCTGMDGNGSYVPPFPFIYTSSQIT IETS KPCPVHGI MNLQMEMN
 745 790
 CDMPVNTTIDSNHAN TKQLPNYKKVDSIYWDHSNSSTILTDPHLSYML SNCIFLDS QMHDHITNGTHRSNDHQKNEI
 883 978
 EVIQNYSKP...KEDIVLGSRKHLKRNHLNKSIIHEPSSYHIDHCHHEMIDHQEVS ICSS...LHSDDCTSHSCTSS
 1003 1060
 ISSSTNSSSSSSINQHFKYIYPSNQTGFNSICSSLSNQINLAAAAAAAASVNTISDPLQQQSPPSLEFCPSSELLSN
 1096 1122
 RPNSNYDTFNMLKCPVHSLTRNHRFIPRKLFDYTYNHRENMRQH HHHD KNNNRSSLRTRVKDHPDDEEKQEBQKQKFD
 QHLT V 1143

Sm18.9 1...SLPVLARGITMLLFDKRFGTAFPEPSGGGDPILFQHLFWFFGHPEVYVLILPGFGI...VPTGIKVF 171
 59

Sm16.5 1...SLPVLARGITMLLFDKRFGTAFPEPSGGGDPILFQHLFWFFGHPEVYVLILPGFGI...VWGHYVYVYVWL 146
 59

Figure 3

Sm200 1 MYFLQLFLFLFTSVCNTLSD...⁹⁷¹T...SDDKKNTEKKSISLLEYMNLMALMIIFMRN 1656

Sm43.5 1 MGPVVCYLFVVSSFVLLTSGN.....SPTSCTTANNNIHVLDTYFPNRDSCDLTDGEV 117

Sm12.8 1 MTLKKTLS⁸SIIFLLAIYFKACST.....SNLIAKAYSQPDSLFDNRTVAIRTTESRD 382

Sm127.9 1 MSLHMSYHRVLLVLLVCVLTSSCAA...^{986 988}SSS...RVKDHPSEDEEKQEEQRKFDQHLTV 1143

Sm18.9 1 MFSLHLAGVSSLIGSVNFISTIFSRLRFKCSIIVWAYLFTSVLLLLSLPVLARG....
 ...FGYYGLICAMASIVCLGRVWGHMFMVGFDSLTVGFSSITMIIGVPTGIKVFES 171

Sm16.5 1 MFSLHLAGVSSLIGSVNFISTIFSRLRFKCSIIVWAYLFTSVLLLLSLPVLARG....
 ..EYVVLILPGFGIVRHICMSLRNKDSTFGYYGLICAMASILCLCRVWGHYVYGWL 146

Figure 4

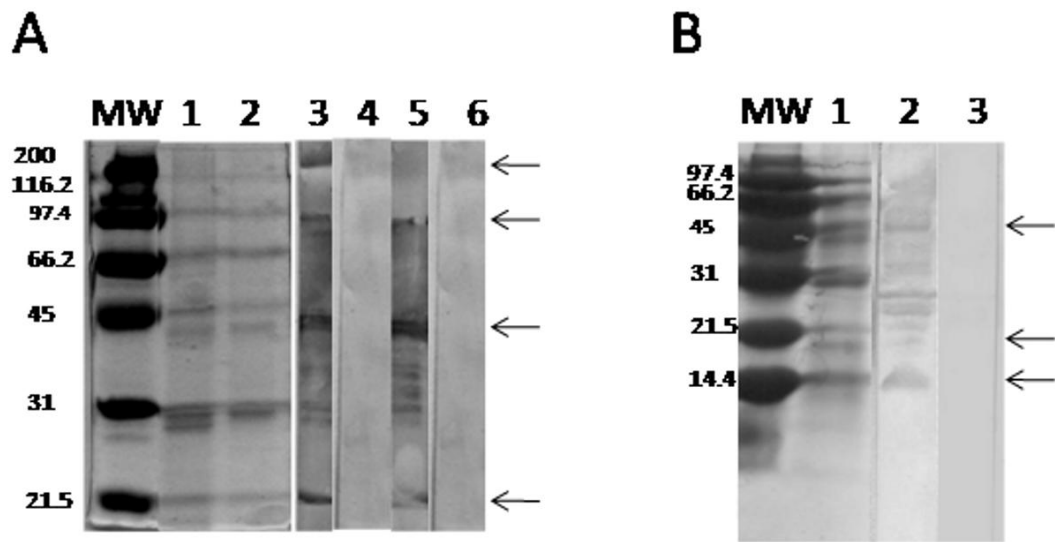
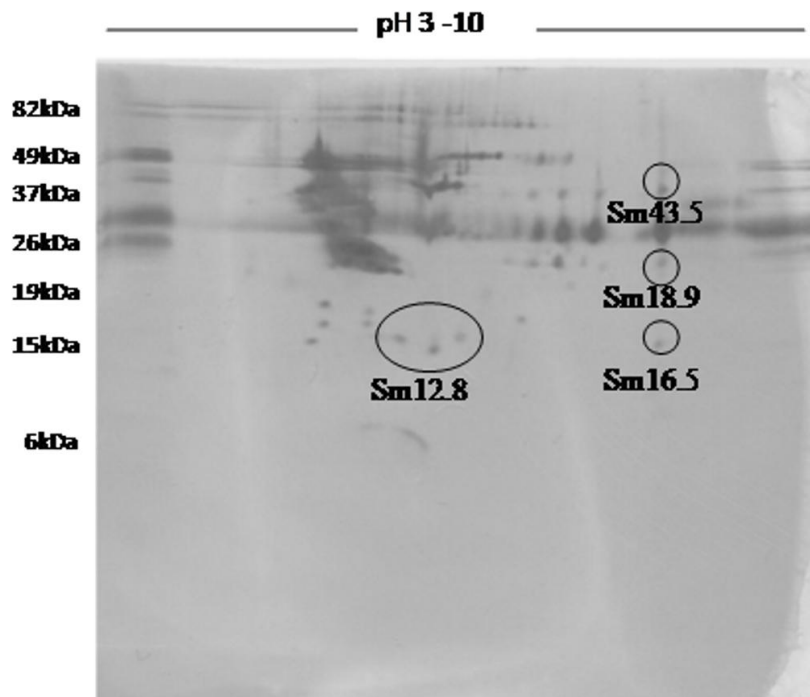


Figure 5



5.2 Artigo 2: Carvalho GBF, Pinheiro CS, Oliveira SC, Pacífico LGG, Fonseca CT. Detection of IgG antibodies against *Schistosoma mansoni* 200 kDa recombinant protein as a useful tool for the diagnosis of chronic phase of the disease. Manuscrito em preparação

O artigo científico apresentado a seguir corresponde ao segundo, terceiro e quarto objetivos específicos.

Titulo: Detection of IgG antibodies against *Schistosoma mansoni* 200 kDa recombinant protein as a useful tool for the diagnosis of chronic phase of the disease.

Autores: Carvalho GBF, Pinheiro CS, Oliveira SC, Pacífico LGG, Fonseca CT
Manuscrito em preparação.

Com a predição, *in silico*, de potenciais antígenos para serem testados no imunodiagnóstico da esquistossomose, 6 candidatos foram selecionados (artigo 1), sendo um desses antígenos a proteína Sm200. Uma parte desta proteína foi expressa e avaliada por Western blot e ELISA, frente a soros de camundongos infectados e não infectados para avaliar a antigenicidade, a especificidade e a sensibilidade.

Detection of specific IgG response against *Schistosoma mansoni* Sm200 kDa protein as a useful tool for the diagnosis of chronic phase of the disease.

Gardênia B. F. Carvalho¹⁺, Lucila G. G. Pacífico¹⁺⁺, Carina da Silva Pinheiro², Sergio Costa Oliveira²⁺⁺⁺, Cristina T. Fonseca^{1,3,+++,*}

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

²Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

³Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais-INCT-DT. Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil

* Corresponding author: Mailing Address: Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz. Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, 30190-002, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55-31-33497828. Fax: 55-31-32953115. E-mail: ctoscano@cpqrr.fiocruz.br

Abstract

Background: Sm200, a glycoprotein present at the tegument of adults worms of *Schistosoma mansoni*, is a candidate antigen to be used in ELISA based diagnosis of schistosomiasis due to its predicted in silico antigenicity. C-terminal part of this protein, containing 1659 amino acids, was expressed - rSm200(1069-1520) and evaluated by Western blot and ELISA with sera of infected and uninfected mice to confirm its antigenicity and to determine ELISA specificity and sensibility using the recombinant antigen.

Results: Immunoblotting analysis showed a specific recognition of rSm200 (1069-1520) by sera from *S. mansoni* infected mice. The ELISA assay demonstrated that this test presented 97.5% of specificity and 75% of sensibility when used in the diagnosis of chronically infected mice and was not efficient to diagnosis cure after treatment.

Conclusion: Our findings suggest that rSm(1069-1520) is antigenic and recommended to diagnosis use of chronically infected mice.

Sponsorships: Ripag/Fiocruz-MG; CPqRR/FIOCRUZ-MS, FAPEMIG. Fellowships: *Fapemig; **PV/CNPq; *** PQ/CNPq

Key words: *Schistosoma mansoni*, immunodiagnosis, Sm200

Introduction

Schistosomiasis remains a serious public health problem in 76 countries and territories of the world with more than 200 million individuals infected and causing annual losses of 10.4 million in DALYs (Engels et al. 2002 and PAH/WHO 2007). Although effective drugs against schistosomes are used in disease control programs, the prevalence of the disease remains unaltered and new disease foci and acute outbreaks are observed worldwide (Coura & Amaral 2004, Van der Werf et al. 2003)

It is well known that in low endemic areas and in individuals with low parasite burden the conventional parasitological methods used in the diagnosis of the disease are ineffective resulting in underestimated disease prevalence (Enk et al. 2008) and in failures on the disease control programs (De Vlas et al. 1992).

Due to the need for a more sensitive diagnostic method to detect infection in low endemic areas, our group recently proposed a new screening strategy to identify in the parasite genome antigens candidates to be used in a schistosomiasis diagnosis based on the detection of specific antibodies by ELISA (Carvalho et al. 2011).

One major concern while developing a serological test to diagnosis schistosomiasis is the choice of an appropriate antigen. Some antigens used in ELISA present similarities to antigens from other helminthes, and sera from non *S. mansoni* infected individuals cross react with these antigens providing a false-positive result. (Correa-Oliveira et al. 1988, Ishida et al. 2003, Luo et al. 2009). Also the majority of the diagnostic test based in the detection of specific antibodies do not discriminate ongoing and previous infection. (Kato-Hayashi et al. 2010) since specific antibodies remains in the sera after disease cure. However, depending on the antigen, ELISA can be highly sensitivity for the diagnosis of schistosomiasis (Ishida et al. 2003, Sorgho et al. 2005, Alarcón de Noya et al. 2007, Luo et al. 2009). Therefore, selection of antigens based on rational criteria, should be able to increase the efficiency of the ELISA test for the diagnosis of the disease

Sm200, a glycoprotein with unknown function, linked to *S. mansoni* adult worm membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is one of the antigens described as candidate to compose a ELISA diagnostic test to schistosomiasis (Carvalho et al. 2011). This protein was initially identified in the

tegument of the parasite (Sauma and Strand 1990, Sauma et al. 1991) and later termed 200kDa (Hall et al. 1995), Sm200 (Racoosin et al. 1999) or ECL (Nascimento et al. 2007). Its location on the tegument surface from *S. mansoni* adult worms was recently confirmed by a proteomic analyze of the surface proteins obtained by enzymatic shave (Castro-Borges et al. 2011). Sm200 has been associated with praziquantel efficacy, since antibodies against this protein can restore praziquantel efficacy in B cells depleted mice (Bridley et al. 1989). Furthermore, gene immunization with Sm200 induces 38% protection in mice and increased production of IgG1 and IgG2a (Nascimento et al. 2007). Besides its involvement on praziquantel efficacy and its ability to induce protective immunity, this protein has never been tested as antigen in serological diagnosis assays.

In the present study, the recombinant form of Sm200(1069-1520) amino acid fragment containing the C-terminal part of the protein was obtained and used in immunological assays to evaluate its antigenicity, and its recognition from *S. mansoni* infected mice sera.

Materials and methods

Antigens preparation

Cloning, expression and purification of recombinant Sm200 (1069-1520)

Total RNA was extracted by *S. mansoni* adult worms and messenger RNA (mRNA) was purified using RNeasy Kit (Qiagen) according to manufacture. The complementary DNA (cDNA) was obtained from mRNA through RT-PCR amplification using specific primers designed for the *Sm200* fragment of 3224 to 4557pb, (sense 5' CCGGGATCCGTTATTTACACAGAAGATTTTC 3' and antisense 5' CCCGTCGAC TGGTATGCTATCAGTTAGTTG 3'). The amplified product was purified, digested with *Bam*HI and *Sall* and linked to the bacterial expression vector pET28 (Novagen) digested with the same enzymes. The presence and correct orientation of the *Sm200* gene were confirmed using the "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" kit and the MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Biosciences). Sm200(1069-1520) was expressed in *E. coli* with an in-frame six-histidine C-terminal tag using the pET28 expression vector. For

protein expression, transformed BL21(DE3) cells were grown in 1L LB medium plus ampicillin (1mg/mL) until achieving absorbance of 0.6 in 600nm. One millimolar of Isopropylthio- β -galactoside (IPTG, Invitrogen) was added to the culture and cells were incubated for 4 h at 37 °C. After that, cells were harvested by centrifugation and resuspended in 50ml of 10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl and 10mM imidazole. Subsequently, the cells were submitted to three 30seconds-cycles of sonication and centrifuged at 5400 g for 20 min. The rSm200 was recovered as inclusion bodies and solubilized in 50ml of 8M urea, 10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl, and 10mM imidazole. The protein was purified by affinity chromatography on a Ni-Sepharose column (Hitrap FF crude 5 mL) under denaturing conditions using an AKTAexplorer chromatograph (GE Healthcare), according to the manufacturer's protocol. The buffer was exchanged to PBS (pH 7.4) using a desalting column (GE Healthcare) before the use of this antigen.

Mice and Experimental protocol

One hundred thirty swiss female mice were obtained from Rene Rachou Research Center (Fiocruz) facility and they were used to obtain sera. The animals were divided in two groups of 50 mice for group 1 (G1) and 80 mice for group 2 (G2). All animals were infected individually by subcutaneous route with approximately 25 cercariae of *S. mansoni* (LE strain). The blood samples were collected by retro-orbital plexus from all mice before the infection (day 0) and after infection, for G1 at days 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 140 and for G2 at days 90, 119, 150, 180, 210. In addition, at the 120 day, the animals from G2 were treated individually with oxaminiquine 400mg/weight by gavage. At the end of the experiment mice from both groups were sacrificed by cervical fracture and perfusion was performed in order to verify the adult worm burden. All procedures involving animals were approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA) from Fiocruz (nº LW-25/10).

Western Blot 1D

Recombinant Sm200(1069-1520) was loaded on a 10% denaturing polyacrylamide gel by electrophoresis (Laemmli 1970). From the gel, the protein was transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) as previously

described (Towbin et al. 1979) and the nitrocellulose membranes were blocked with 5% dry milk at 4 °C overnight and reacted with a pool of serum from infected mice (1:20) for 1 h at room temperature. After three washes with TBST (0.5M NaCl-0.02M Tris [pH 7.5], 0.05% Tween 20), the membrane was incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate (1:4000) (Southern Biotech) in TBST plus 3% dry milk. Finally the membranes were washed three times with TBST and treated with Alkaline Phosphatase reaction developing buffer together with the Biorad revelator kit (AP Conjugate Substrate Kit).

ELISA

The ELISA assay was performed in flat-bottomed plate (Maxisorp), using the recombinant antigen. The plate were coated with 100µl/well of 0.05M bicarbonate carbonate buffer, pH 9.6 containing 5ug/ml of the rSm200(1069-1520) (5µg/ml) and incubated for approximately 16 hours at 4° C. In order to remove the unbound proteins, the plates were washed three times with 300µl PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) and blocked with PBST and 3% dry milk and incubated for approximately 16 hours at 4°C. The sera obtained from animals were diluted 1:40 in PBS Tween, added (100µL/well) to the plates and incubate for one hour at room temperature. Plates were then washed and incubated for one hour with 100µL of anti mouse-IgG conjugated to peroxidase (SouthernBiotec) diluted 1:10.000 in PBST. After further washes, the reaction was revealed for 15 min with 100µl of TMB and stoped with 50µl of 5% sulfuric acid. The optical density was measured with automated ELISA reader (Biorad), using a filter of 450nm.

Statistical analysis

The statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 4.0 (San Diego, Ca, USA). The results, which show normal distribution, were analyzed using analysis of variance followed by Tukey multiple comparison test when comparisons involved more than two variables. The Student t test was used when comparing only two variables. The results that showed no normal distribution were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison when comparisons involved more than two variables. The Mann-Whitney test was used

when comparing only two variables. The results with $p < 0.05$ were considered statistically significant. The cutoff points between positive and negative results were determined using the curves of the Receptor Operating Characteristics (ROC curves - Receptor Operating Characteristic).

Results and discussion

SDS-PAGE and Western blot 1D

Recombinant Sm200(1069-1520) was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using mouse antiserum from infected mice. The molecular mass of the recombinant protein (Fig 1) was in agreement with the estimated molecular mass predicted by Pi/Mw tool (http://expasy.org/tools/pi_tool.html). Immunoblotting analysis showed a specific recognition of rSm200 (1069-1520) by sera from *S. mansoni* infected mice (Fig 1) demonstrating that the recombinant protein preserves the antigenicity previously predicted by *in silico* analysis (Carvalho et al. 2011). B cell epitope prediction by BCpred algorithm (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>) in whole Sm200 protein sequence identified 37 epitopes from those 12 epitopes were predicted to be in the rSm200(1069-1520).

Measurement of total IgG

Recombinant Sm200(1069-1520) was expressed in prokaryote system and it was used in ELISA assay. To evaluate the performance of rSm200 (1069-1520) as antigen in ELISA tests for the diagnosis of schistosomiasis, the reactivity of sera from *S. mansoni* infected mice (in acute and chronic phase of the disease) was assessed. For this purpose we divided sera in five groups: negative (non infected mice), acute (sera from infected mice collected between 15 to 90 days after infection), chronic (sera from infected mice collected between 120 to 140 days post-infection), infected (sera from *S. mansoni* infected mice from both acute and chronic phases) and treated (sera from mice treated 120 days post-infection and obtained 30, 50 and 80 days post-treatment). In order to determine rSm200(1069-1520)-ELISA cut-off 40 sera from non-infected mice and 90 sera from infected mice was evaluated and the absorbances observed was analysed in the ROC curve test. A cut-off of 0.3

Abs was determined and used to evaluate rSm200(1069-1520)-ELISA sensitivity and specificity. Comparing the absorbances values, significant differences to negative group were observed in chronic, infected and treated groups (Fig 2). And no significant differences were observed between negative and acute groups (Fig 2). Taking the cutoff into account, rSm200(1069-1520)-ELISA test presented 97.5% of specificity and 42% of sensibility when used in the diagnosis of schistosomiasis regardless disease phase. However this test presented 97.5% of specificity and 75% of sensibility when used in the diagnosis of chronically infected mice. The reactivity of sera from infected mice to rSm200(1069-1520) increases as the parasite develop inside the definitive host, any significant differences in the reactivity to rSm200(1069-1520) was observed between sera from non-infected mice and sera from mice at days 15, 30, 45, 60 and 90 post-infection (Fig 3). An increase in sera reactivity to rSm200(1069-1520) was observed 120 days post infection (Fig 3). These observation are in agreement with Norden and Strand study in 1985 who showed that antibodies against Sm200 achieves the highest titles 140 days post infection (Norden and Strand 1985). Based in these results we propose the rSm200 as a good antigen to be used in the immunodiagnosis of chronically infected mice.

Kinectics of IgG anti-rSm200(1069-1520) in post-treated individuals

Mice were submitted to treatment with oxaminiquine (400mg/kg) 120 days post-infection with *S. mansoni* cercarie. The oxaminiquine was chosen as a drug for treatment due to its ability to cure mice when used at 400mg/kg. In order to evaluate sera reactivity to rSm200(1069-1520) after effective treatment, we measured specific anti-rSm200(1069-1520) IgG in sera from treated mice, 30, 60 and 90 days post-treatment. Worm burden determination after treatment confirmed that oxaminiquine was able to cure mice, since no parasite was detected in these animals (data not shown). Any differences between absorbances in non-treated and treated mice were observed (Fig 4) indicating that rSm200(1069-1520)-ELISA was not efficient to diagnosis cure after treatment.

References

- Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari I M, Noya O 2007. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. *Acta Trop.*, 103: 41-49.
- Brindley PJ, Strand M, Norden AP, Sher A 1989. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 34 (2): 99-108.
- Carvalho GBF, Silva-Pereira RA, Pacífico LGG, Fonseca CT 2011. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106 (7): 837-843.
- Castro-Borges W, Dowle A, Curwen RS, J Thomas-Oates, and Wilson R A 2011. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl Trop Dis*, 5 (3): e993.
- Correa-Oliveira R, Dusse LM, Viana IR, Colley DG, Santos Carvalho O, Gazzinelli G 1988. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38: 348-355.
- Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99 (Supl 1): 13-19.
- De Vlas SJ & Gryseels B 1992. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol. Today*, 8: 274-277.
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.*, 82 :139-146.

Enk MJ, Lima AC, Massara CL, Coelho PM, Schall VT 2008. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78: 140-146.

Hall TM, Joseph GT., and Strand M 1995. *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen. *Exp. Parasitol.*, 80(2): 242-249.

Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S, Vaz AJ 2003. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop.*, 89: 73-84.

Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, Chigusa Y 2010. Identification and differentiation of human schistosomes by chain reaction. *Exp. Parasitol.*, 124: 325-329.

Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Luo QL, Qiao ZP, Zhou YD, Li XY, Zhong ZR, Yu YJ, Zhang SH, Liu M, Zheng MJ, Bian MH, Shen JL 2009. Application of signaling protein 14-3-3 and 26 kDa glutathione-S-transferase to serological diagnosis of *Schistosomiasis japonica*. *Acta Trop.*, 112: 91-96.

Nascimento EJ, Amorim RV, Cavalcanti A, Alves VF, Nakazawa M, Pereira VR, Lucena-Silva N, 2007. Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamina sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102(1): 21-27.

PAHO/WHO Preparatory Meeting on Epidemiological Data Needed to Plan Elimination of Schistosomiasis in the Caribbean, 2007 Dec. 13-14; St. George, Grenada.

Racoosin EL, Davies SJ, Pearce and EJ 1999. Caveolae-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 104(2): 285-297.

Sauma SY and Strand M 1990. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Mol. Biochem. Parasitol*, 38(2): 199-210.

Sauma SY, Tanaka TM, Strand 1991. Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *MMol Biochem Parasitol*, 46: 73-80.

Sorgho H, Bahgat M, Poda JN, Song W, Kirsten C, Doenhoff MJ, Zongo I, Ouédraogo JB, Ruppel A 2005. Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. *Acta Trop.*, 93: 169-180.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema J D, Engels D 2003. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.*; 86(2-3): 125-139.

Legend

Figure 1: SDS-PAGE and Western blot analysis of rSm200(1069-1520). rSm200 (1069-1520) was loaded into a 10% SDS-Page and stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (column P), broad range protein marker (BioRad) (column MW) was used to evaluate rSm200 molecular weight Immunoblotted samples was probed with sera from non-infected (column 1) or *S. mansoni* infected mice (column 2).

Figure 2: Levels of total IgG against rSm200(1069-1520) in sera from mice of different groups: negative (sera from mice not infected), acute (sera from infected mice collected 15 to 90 days post-infection), chronic (sera from infected mice collected 120 to 140 post-infection), infected (sera from infected mice in both acute and chronic phase of disease) and treated (sera from infected mice treated 120 days collected 30, 50 and 80 days post-treatment). Statistically significant differences on IgG levels compared to negative group denoted by an asterisk ($p < 0.05$).

Figure 3: Kinetics of specific IgG production after *S. mansoni* infection. Mice were bleed one day before infection (-1, negative control sera) and 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 140 days post-infection as shown in graphic. The line represents mean of absorbencies in each time point and the differences in relation to negative sera are denoted by asterisks (*).

Figure 4: Kinetics of IgG specific for rSm200(1069-1520) in swiss mice after treatment. The dots represent the mean absorbance for imunoglulilins IgG produced by each mice swiss with 120 days post-infection (120 PI), and mice treated 120 days post-infection and 30 (30 PT), 60 (60 PT) and 90 (90 PT) days post-treatment. There is no statistically a difference among different times.

Figure 1

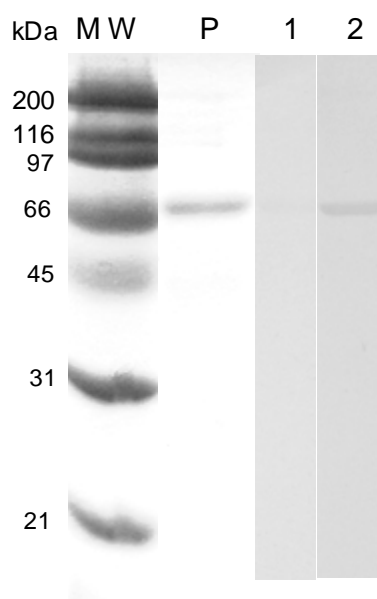


Figure 2

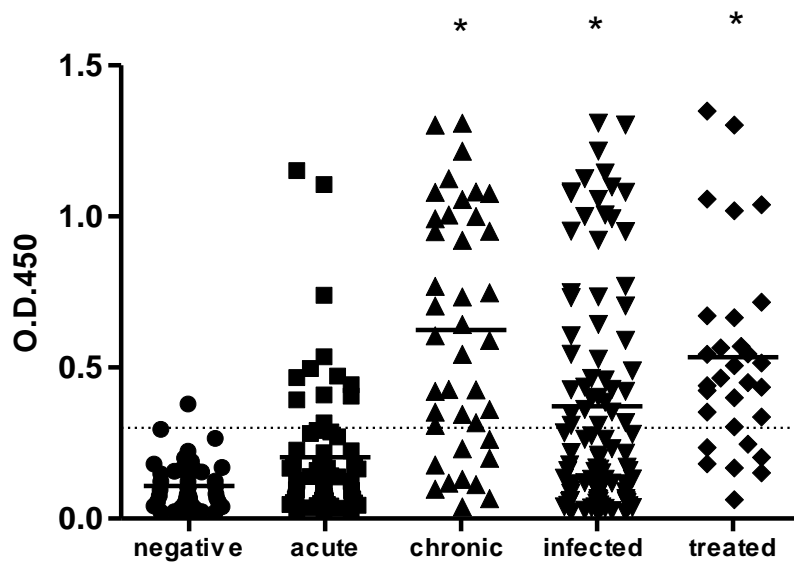


Figure 3

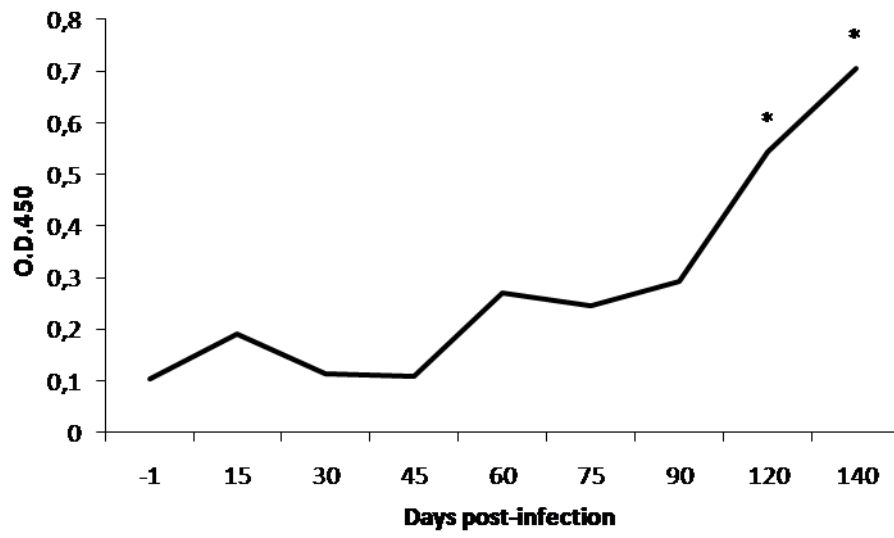
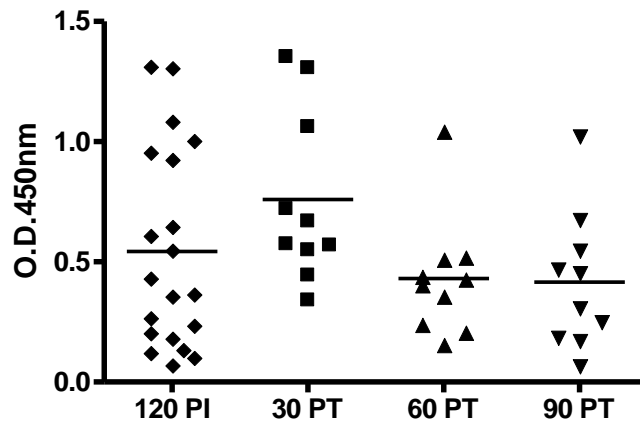


Figure 4



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Bioinformática é uma área de conhecimento que se encontra em expansão. O seu desenvolvimento e o seu uso têm alcançado um público cada vez maior, principalmente com o surgimento de novas ferramentas que permitem que pessoas que não possuem domínio da linguagem de programação possam utilizá-las. Além disso, as ferramentas de bioinformática disponíveis permitem a análise de um grande número de informações possibilitando a identificação de alvos para serem mais bem estudados em ensaios biológicos e assim reduzindo o tempo de experimentação necessário para responder os questionamentos da comunidade científica (Baldi and Brunak, 2001; Baxevanis and Ouellette, 2005; Lesk, 2002). Associando a bioinformática e suas ferramentas com a disponibilidade do genoma do parasito sequenciado, é possível fazer previsões e identificar novos alvos de vacinas, drogas e antígenos para diagnóstico, sendo possível também compreender melhor a interação parasito-hospedeiro.

O objetivo deste projeto foi identificar no genoma do *Schistosoma mansoni* antígenos promissores, através de análises *in silico*, para serem testados no diagnóstico sorológico da doença. A estratégia *in silico* utilizada por nosso grupo baseou-se em critérios racionais para identificação de antígenos que possuíssem características essenciais para serem considerados eficientes: presença no hospedeiro definitivo, presença de peptídeo sinal, localização celular favorável e baixa similaridade com proteínas humanas e de outros helmintos. Com os resultados obtidos pelas análises feitas pelos preditores computacionais e baseando-se nos critérios de seleção, seis potenciais antígenos foram selecionados (Carvalho et al., 2011). Dois deles correspondem a proteínas expressas e um corresponde a uma proteína hipotética, isto é, não se conhece a função biológica destas proteínas. Como estas proteínas atenderam a todos os critérios de seleção, elas podem ser consideradas candidatas promissoras para serem usadas no diagnóstico da doença. Outras duas proteínas selecionadas foram as citocromo oxidases, que apesar de serem preditas com localização extracelular, são sabidamente proteínas mitocondriais envolvidas no metabolismo da glicose e que possuem regiões polimórficas (Skelly et al., 1993; Lopatkin et al., 2010; Weyher et al., 2010). A presença de polimorfismos pode resultar em perda de epitopos importantes para o diagnóstico da doença através da detecção de anticorpos específicos, o que dificulta o uso deste antígeno em testes de diagnóstico sorológico. Aparentemente a seleção

das citocromos oxidase colocou em dúvida os preditores utilizados para seleção dos antígenos. Entretanto a Sm14 descrita como proteína citoplasmática e outras proteínas citosólicas foram recentemente identificadas no tegumento de verme adulto de *S. mansoni* (Braschi et al., 2006). Assim, é possível que o mesmo ocorra com as citocromos, o que não inviabiliza nossa estratégia de seleção. Outra proteína selecionada, a Sm200, foi expressa na forma recombinante – rSm(1069-1520) e testada em ensaios de ELISA mostrando-se eficiente no diagnóstico da doença em fase crônica no modelo experimental. Acreditamos que com a utilização da proteína rSm200(1069-1520) pode-se ter perdido epitopos que seriam importantes para aumentar a sensibilidade do teste diagnóstico.

7 ANEXO

7.1 Anexo 1 – MS/FIOCRUZ/VPPLR CEUA LICENÇA LW-25/10



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-25/10

Certificamos que o protocolo (P-22/10-3), intitulado "A utilização de modelo murino para o desenvolvimento de novo método diagnóstico da esquistossomose mansoni", sob a responsabilidade de LUCILA GROSSI GONÇALVES PACIFICO, 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 exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/08/2012 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 130 Machos de Swiss webster, Idade: 6 Semana(s).

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2010

Dr^o Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adu-Bobie, Janette et al. Two years in reverse vaccinology. 2003 *Vaccine*, vol. 21, pp. 605-610.

Agatsuma Takeshi, Rajapakse RPVJ, Kuruwita VY, Iwagami Moritoshi, Rajapakse RC. Molecular taxonomic position of the elephant schistosome, *Bivitellobilharzia nairi*, newly discovered in Sri Lanka. *Parasitol Int*, 2004; 53: 69–75.

Baldi P and Brunak S. *Bioinformatics: The Machine Learning Approach*, 2nd edition. MIT Press, 2001.

Barbosa CS, Frave TC, Amaral RS, Piere OS. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HF, organizadores. *Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni: Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. P. 965-1008.

Barbosa FS and Coimbra CEA. Alternative approaches in Schistosomiasis control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1992; v. 87 (supl. IV): 215-220.

Baxevanis AD and Ouellette BFF, eds. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, third edition. Wiley, 2005.

Bdul-Fattah MM, A E el-Gindy, MH Hegab, M F el, Y A Kadry MI, el-Dessouky and F el-Gohary. Diagnosis of early pre-patent schistosomiasis by cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Egypt Soc Parasitol*, 2000; 30: 621-630.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 2004; 340: 783-795.

Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitol. Today*, 1998; 14: 99-104.

Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, Moore R, Habte E, Redda A, Gebre-Michael T, Gundersen SG. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.*, 2004; 92: 205-212.

Berriman M, Haas B, Lo Verde P, Wilson A, Dillon, G, Cerqueira G. et al. The Genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 2009; 460 (7253): 352-8.

Blagg W, Schoegel EL, Mansour NS, Khalat GI. A new concentration tecnic for the demonstration of protozoa and helmint eggs in faces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995; 4: 23-28.

Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254.

Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. , 2006; 6(5): 1471-82.

Brindley PJ, Strand M, Norden AP, and A Sher. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Mol. Biochem.Parasitol.*, 1989; vol. 34, no. 2: 99-108.

Capecchhi B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M. The Genome Revolution in Vaccine Research. *Curr Issues Mol Biol*, 2004; 6: 17-28.

Carvalho GBF, Silva-Pereira RA, Pacífico LGG, Fonseca CT. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2011; 106: 837-843.

Castro-Borges W, Dowle A, Curwen R S, J Thomas-Oates, and Wilson R A. 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 (3): e993.

Chen J, Liu H, Yang J, Chou K. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 2007; 33: 423-428.

Chieffi P P, Kanamura H. Diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 1978; 30: 77-97.

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

Coelho PMZ & Tavares, CAP. Diagnóstico imunológico. In: Castro, L P; Rocha, P R S & Cunha, A. S, editores. *Tópicos em Gastroenterologia 2*. Rio de Janeiro: Medsi; 1991. P. 27-36.

Coelho PMZ, Jurberg AD, Oliveira AA, Katz N. Use of saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2009; Vol. 104 (5): 720-723.

Coles CG. The metabolism of Schistosomes: a review. *Int. J. Bichem.*, 1973; 4: 319-337.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2004; 99 Suppl 1: 13-19.

Cunha A S. Schistosomiasis mansoni – Drug therapeutic. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1992; Vol. 87 (Suppl. IV): 341-351.

Da silva R M, Kanamura HY, Camargo ED, Chiodelli SG, Nakamura PM, Gargioni C, Velloso SA and Antunes JL. A comparative study on IgG-ELISA, IgM-IFT and Kato-Katz methods for epidemiological purposes in a low endemic area of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1998; 93 (Suppl 1): 279-282.

De Jonge N, Rabello A L, Krijger F W, Kremsner P G, Rocha R S, Katz N, Deelder A M. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1991; 85: 756-759.

De Vlas, S J. & Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol. Today*, 1992; 8: 274-277.

Deelder AM, Duchenne W., Polderman, A M. Serodiagnosis of schistosoma infections. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 1989; 133: 154-156.

Derouin FF, Heyer M, Lariviere and J Petithory. ELISA in schistosomiasis. Limits. Possibility of application (author's transl). *Pathol. Biol.*, 1980; 28: 465-468.

Doenhoff MJ, Chiodini PL & Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of *Schistosoma* infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol.*, 2004; 20: 35-39.

Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 96: 465-469.

El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. *Med. Sci. Monit.*, 2006; 12(12): 282-292.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.*, 2002; 82 :139-146.

Enk MJ, Katz N, Coelho PMZ. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2008; 5: 112-115.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1994; 51 (1): 83-88.

Ferrari MLA, Coelho PM, Antunes CM, Tavares CA, da Cunha AS. Efficacy of oxaminiquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. Bull. World Health Organ., 2003; 81:190-196.

Ferreira LF, Coutinho SG, Argento CA, Andrade CM, Rubens J, Valente P, Silva JR. O diagnóstico parasitológico na esquistossomose mansoni – Estudo comparativo entre o exame de fezes, a biópsia retal e a biópsia hepática. O hospital, 1966; 69:1.

Franco GR, Valadão AF, Azevedo V, Rabelo EM. The schistosoma gene discovery program: state of the art. Int. J. Parasitol., 2000; 30 (4): 453-463.

Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Oliveira MC, Coelho PMZ, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. PLoS Negl Trop Dis, 2010; 4 (4): e664.

Hall T M, Joseph G T, and Strand M. *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen. Expe. Parasitol., 1995; 80: 242–249.

Hirokawa, Boon-Chieng, Mitaku, SOSUI: Classification and secondary structure prediction for membrane proteins. Bioinformatics, 1998; 14: 378-379.

Hoffman VA, Pons JS, Janer JL. Sedimentation concentration method in the schistosomiasis mansoni. P. R. J. Public Health Trop. Med, 1934; 9: 283-298.

Jurberg AD, Oliveira AA, Lenzi HL, Coelho PMZ. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2008; 103: 112-114.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 1972; 14(6): 397-400.

Katz, N.. Schistosomiasis control in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1998; 93 (Suppl 1): 33-35.

Kjetland EF, Hove RJ, Gomo E, Midzi N, Gwanzura L, Mason P, Friis H, Verweij JJ, Gundersen SG, Ndhlovu PD, Mduluza T, Van Lieshout L. Shistosomiasis PCR in vaginal lavage as an indicator of genital *Schistosoma haematobium* infection in rural Zimbabwean women. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2009; 81 (6): 1050-1055.

Kyte J and Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol., 1982; 157: 105–132.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685.

Lesk AM. Introduction to Bioinformatics, Oxford University Press, 2002.

Lopatkin AA, Khrisanfova GG, Voronin MV, Zazornova OP, Beér SA, Semenova SK. Polymorphism of the *cox1* gene in bird schistosome cercaria isolates (Trematoda, Schistosomatidae) from ponds of Moscow and Moscow oblast. Genetika, 2010; 46(7): 981-989.

LoVerde PT, Hirai H, Merrick JM, Lee NH and EL-sayed N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. Parasitol. Int., 2004; 53: 183–192.

Lutz A. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, 1919; 11: 121-155.

Magnussen P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years experience. *Acta Trop.*, 2003; 86: 243-254.

Montenegro S M L. Immunodiagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1992; 87: 333-335,.

Mott DE & Dixon H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of Schistosomiasis. *Bull. World Health Organ.*, 1982; 60: 729-753.

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 protamina sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2007; 102: 21–27.

Norden AP and Strand M. Identification of antigenic *Schistosoma mansoni* glycoproteins during the course of infection in mice and humans. *Am. J. Trop. Med.*, 1985; 34(3): 495-507.

Norton A, Rollinson D, Richards L and Webster J. Simultaneous infection of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini* in *Biomphalaria glabrata*: impact on chronobiology and cercarial behavior. *Parasit Vectors*, 2008; 1:43.

Obeng BB, Aryeetey YA, de Dood CJ, Amoah AS, Larbi AI, Deelder AM, Yazdanbakhsh M, Hartgers FC, Boakye DA, Verweij JJ, van Dam GJ, van Lieshout L. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine sample from Ghana. *Ann Trop Med parasitol.*, 2008; 102 (7): 625-633.

Oliveira EJ, Kanamura HY, Dias LCS, Soares LCB, Lima DMC, Ciaravolho RMC. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade. *Cad Saude Publica*, 2003; 19: 255-261.

Oliveira G, Johnston D A. Mining the schistosome DNA sequence database. *Trends Parasitol.*, 2001; 17: 501–503.

Oliveira G. The *schistosoma mansoni* transcriptase: an update. *Exp. Parasitol.*, 2007; 117 (3): 229-239.

Panamerican Health Organization/World Health Organization. Preparatory Meeting on Epidemiological Data Needed to Plan Elimination of Schistosomiasis in the Caribbean. St. George: PAHO/WHO, 2007 Dec. 13-14;

Paraense WL, Corrêa LR. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southern most Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1987; 82 (4): 577.

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

Rabello ALT. O exame parasitológico de fezes, a biópsia retal e o teste imunoenzimático no diagnóstico da esquistossomose mansoni humana. Thesis, Faculdade de Medicina, 1990.UFMG, 155 pp.

Racoosin EL, Davies SJ, Pearce EJ. Caveolae-like structures in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1999; 104: 285–297.

Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pelegrino J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistossomule in vitro. *Exp. Parasitol.*, 1974; 36(3):360-372.

Sauma SY and Strand M. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1990; 38: 199–210.

Sauma SY, Tanaka TM and Strand M. Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol., 1991; 46: 73-80.

Schlsio W, Moller FW, Ziegler K. Immunofluorescence serologic findings in schistosomiasis. Methodologic aspects. Z. Gesamte Inn. Med., 1989; 44: 149-152.

Shatkay H, Höglund A, Brady S, Blum T, Dönnnes P, Kohlbacher O. SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data. Bioinformatics, 2007; 23: 1410-1417.

Silva, JS. O conceito de espaço na epidemiologia das doenças infecciosas. Cad. Saude Publ., 1997; 13 (4): 585-593.

Skelly PJ, Stein LD, Shoemaker CB. Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation. Mol Biochem Parasitol 1993; 60: 93-104.

Smithers SR & Doenhoff MJ. Shistosomiasis. In: Cohen S & Warren KS, editores. Immunology of parasitic infections. 2nd ed. Londres: Years Book Medical Pub; 1982. P. 527-607.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resource development: systematic review, meta analysis, and estimates of people risk. Lancet Inf Dis 2006; 6(7): 411-425.

Teixeira CF, Neuhauss E, Bem R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. Plos Negl Trop Dis, 2007; Vol 1 (2): e73.

ten Hove Robert J, Verweij Jaco J, Vereecken Kim, Polman Katja, Dieye Lamin, Lieshout Lisette van. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of

Schistosoma mansoni and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008; 102: 179-185.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76: 4350-4354.

Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med*, 2006; 12:216-222.

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman W, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.*, 2003; 86(2-3): 125-139.

Vapnik VN. *Statistical Learning Theory*. John Wiley and Sons, 1998.

Verjosvski- Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola A C, Piazza JP, Nishiyama MY, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregório SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento LA, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sá RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menk CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.*, 2003; 35 (2):148-157.

Wang HY, Zhang B, Yan L, Liu S, Wang G, Shen and R Yu. 2006. Rapid, Simple, and Sensitive Immunoagglutination Assay with SiO₂ Particles and Quartz Crystal Microbalance for Quantitative *Schistosoma japonicum* Antibodies. *Clin Chem.*, 2006; 52(11):2065-2071.

Webster BL, Rollinson D, Stothard JR and Huyse T. Rapid diagnostic multiplex PCR (RD-PCR) to discriminate *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*. J. Helminthol., 2010; 84: 107-114.

Weyher Anna H, Phillips-Conroy Jane E, Fischer Kerstin, Weil Gary J, Chansa Wilbroad, and Fischer Peter U. Molecular identification of *schistosoma mattheei* from feces of kindia (*papio cynocephalus kindae*) and grayfoot baboons (*papio ursinus griseipes*) in zambia. J. Parasitol., 96(1), 2010, pp. 184-190.

Willis H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. Med. J. Aust., 1921; 29: 375-376.

World Health Organization. Schistosomiasis: number of people treated in 2009. Weekly epidemiological record (WER) [serial online] 2011 Feb; 86(9): [7 screens]. Available from URL: <http://www.who.int/wer/2011/wer8609.pdf>.

World Health Organization. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Geneve:WHO,2003.

World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. Geneva, 14-16, 2005.

World Health Organization. Schistosomiasis: Countries X Indicators: This table shows countries in rows and indicators in columns for a particular year. Geneva: WHO, 2010. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimal®ion=all&country=bra&countries=bra&year=2009. Acesso em: 26 nov. 2011.

World Health Organization. The control of schistosomiasis. Geneva, 1993, p.1-85. Technical Report Series, nº 830.

Zerlotini A, Heiges M, Wang H, Moraes R, Dominitini A, Ruiz J, Kissinger J, Oliveira G. SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 579-582

Zhao GH, Mo XH, Zou FC, Li J, Weng YB, Lin RQ, Xi CM, Zhu XQ. Genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different endemic regions in China revealed by sequences of three mitochondrial DNA genes. *Vet. Parasitol.*, 2009; 162: 67-74.

Zicker F, Katz N, Wolf J. Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 1997; 19: 202-207.