

CIBELE APARECIDA TARARAM

**Investigação de genes diferencialmente expressos
em estágios intra-hospedeiro de *Schistosoma mansoni*
como candidatos vacinais**

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

São Paulo
2011

CIBELE APARECIDA TARARAM

**Investigação de genes diferencialmente expressos
em estágios intra-hospedeiro de *Schistosoma mansoni*
como candidatos vacinais**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Luciana Cezar de Cerqueira Leite

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Tararam, Cibele Aparecida.

Investigação de genes diferencialmente expressos em estágios intra-hospedeiro de *Schistosoma mansoni* como candidatos vacinais. / Cibele Aparecida Tararam. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Prof^ª. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Investigação de proteínas de *Schistosoma mansoni* como candidatos vacinais.

Versão do título para o inglês: Investigation of genes differentially expressed in intra-host stages of *Schistosoma mansoni* as vaccine candidates.

Descritores: 1. *Schistosoma mansoni* 2. Genes diferencialmente expressos 3. Esquistossômulo 4. Vacina 5. Tegumento I. Leite, Prof^ª. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB046/2011

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

Candidato(a): Cibele Aparecida Tararam.

Título da Tese: Investigação de genes diferencialmente expressos em estágios intra-hospedeiro de *Schistosoma mansoni* como candidatos vacinais.

Orientador(a): Prof^a Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Aos meus pais, Cecília Regina e Nivaldo Tararam,
pelo amor, apoio e orações durante todo esse tempo.*

AGRADECIMENTOS

À orientadora Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, além do seu apoio profissional e pessoal durante esses cinco anos. Obrigada pelo crescimento que você me proporcionou!

Ao pós-doc Dr. Leonardo Paiva Farias que me ajudou em todos os momentos, dando idéias ou criticando. Obrigada por tudo!

Ao doutorando e irmão de coração, Bogar Omar Araújo Montoya, por me ouvir todo esse tempo, tanto minhas felicidades, como angústias, indecisões ou reclamações... mesmo sendo um boquinha preta, era ele quem me dava coragem e me incentivava em qualquer problema.

Ao doutorando e bixo eterno, Henrique Krambeck Rofatto, pelo apoio em todos os trabalhos, sejam quais fossem, estava sempre disposto a ajudar. Ele merece!!!

A esses três meninos, por mais que eles me esgotassem a paciência com histórias e papos de futebol durante o bandeijão; por terem me chamado exageradamente de cabeçuda em todos os momentos; e por terem me nomeado Miss Mulamba! Meu obrigado especial. Sei que é carinho deles e por isso eu só ria!!!

Aos outros amigos de laboratório: Ivan, o boca preta, outro amigo que não faltou atenção para comigo; Alex, o japonês gaúcho, que não tem como não rir da sua tranquilidade e respostas para tudo; Dunia, a mãezona do lab, que só reclamava da nossa bagunça...srsrs, mas uma pessoa bacana disposta a tudo; a Tereza, personalidade rara, mas muito trabalhadora; as meninas Cibelly, Gabi, Rafa, Halyka e Virgínia, companheiras animadíssimas para as baladinhas. A todos, obrigada pela ajuda nas questões do lab e por deixar a rotina mais descontraída com suas brincadeiras.

Aos funcionários do laboratório Dona Sebastiana, Solange, Fátima, Marisa, Darlene, Dona Vera (in memoriam), Marlene e aos técnicos que passaram por lá, Ivone, Isabela, Karina e Jefferson por toda ajuda na preparação dos materiais e auxílio em quaisquer questões.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, à tranquilidade e ensinamentos da Prof. Dra. Toshie Kawano (in memoriam); ao mega trabalho da doutoranda Patrícia Aoki de fornecer os parasitas para o grupo, ajudar nos cultivos e nos ensaios com os camundongos. Muito obrigada! Ao técnico do confocal Alexander, pela ajuda e momentos de muitas risadas na sala do microscópio. E ao recente estagiário Renan, seguindo os passos da Pati.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Sérgio Verjovski, agradecimentos às doutoras Kátia e Giuliana.

Ao Prof. Patrick Skelly que me orientou por 6 meses na Universidade de Tufts, Estados Unidos; um exemplo de agilidade e simplicidade.

Aos amigos dos Estados Unidos, Rita, Graice, Jenny, Zahra, Michelle, Ndewa, Yi-Lin, Jacqueline, Ângela, Prof Chuck, Prof. Giovanni e Cordy, pela amizade, apoio e compreensão. Saudades de vocês!

Ao Prof. Alan Wilson da Universidade de York, sempre colaborando com o nosso grupo; um exemplo de paixão na pesquisa em *Schistosoma*.

A todas as pessoas do laboratório do prof. Paulo Hee Lo, por compartilharem reagentes e momentos de descontração, em especial, aos amigos doutores Henrique e Eneas que me ajudaram nos ensaios de difração circular.

À mestrande Isa, do laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, por literalmente doar seu sangue e me ajudar nos experimentos de inibição da agregação plaquetária.

À pequena Tati, do departamento de Imunologia, ICB-USP, pelo trabalho exaustivo com os ensaios de inibição de lise celular mediada pelo sistema complemento.

Ao pessoal do laboratório da raiva e do biotério central por ajudar no cultivo das células BHK e manutenção dos animais.

Às amigas da antiga república Eli, Jaque, Mara, Ju e Fabi, e da atual, Pizza, Rê, Bárbara e Gabi. Foram elas que me suportaram esse tempo todo quando chegava em casa

cansada e desanimada, além de terem sido muitos motivos de alegria, companheirismo e aprendizado.

Aos vários amigos de faculdade e colégio, em especial, Shadia, Frang's, Rebeca, Pereni, Karina e Kékú, que mesmo distantes me apoiaram e ajudaram nos piores momentos e ainda mais nos melhores.

À minha família, meu pai Nivaldo, minha mãe Regina, meu irmão Ronald, minha cunhadinha Milena, minha avó Luiza e meu avô Silvio (in memoriam). Obrigada pelo amor! Qualquer que fosse o problema eles estavam sempre ao meu lado.

Ao Nilo, uma pessoa especial, que sempre me incentivou e acreditou em mim, acho que muito mais do que eu mesma. Obrigada pelo carinho.

E a Deus, por eu ter fé e acreditar que Ele me ajudou nesse trabalho e colocou essas pessoas importantes no meu caminho.

Obrigada!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo
(Doutorado direto - Processo nº: 2005/03781-7)

*O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão
o mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

TARARAM, C.A. **Investigação de genes diferencialmente expressos em estágios intra-hospedeiro de *Schistosoma mansoni* como candidatos vacinais.** 2011. 146 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A esquistossomose é uma doença importante em saúde pública. Dos genes selecionados como diferencialmente expressos em esquistossômulos a partir do transcriptoma do *S. mansoni*, 56% foram confirmados por RT-PCR em tempo real. Entre eles, a proteína Ly6.5, está presente no tegumento de esquistossômulos e vermes adultos por âncoras de GPI. Não foi detectada a função de inibir o sistema complemento, mas pode estar envolvido na manutenção do tegumento. O gene SmVal7 revelou transcritos nas glândulas esofágicas de vermes adultos por hibridização *in situ*, enquanto a localização da proteína não está definida. Anexina está associada ao tegumento de esquistossômulos e vermes adultos, de maneira dependente de cálcio. A supressão do gene por RNAi não resultou em alteração fenotípica significativa em esquistossômulos *in vitro*. Foi observada atividade parcial de inibição de coagulação e potencial atividade de endocitose de anticorpos ligados à superfície. A imunização com rLy6.5, rSmVal7, rAneI-II ou rAneII-III não levou a redução da carga parasitária após desafio.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Genes deferencialmente expressos. Esquistossômulo. Tegumento. Proteínas recombinantes. Caracterização molecular.

ABSTRACT

TARARAM, C.A. **Investigation of genes differentially expressed in intra-host stages of *Schistosoma mansoni* as vaccine candidates.** 2011. 146 p. Ph.D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Schistosomiasis is an important disease in public health. Genes selected from the *S. mansoni* transcriptome, 56% of them were confirmed as differentially expressed in schistosomula by real time RT-PCR. Among them, the protein Ly6.5 is present in the tegument of schistosomula and adult worms by GPI anchors. The function of inhibiting the complement system was not detected, but it may be involved in maintenance of the tegument. The gene SmVal7 revealed transcripts in the esophageal glands of adult worms by *in situ* hybridization, while the localization of the protein is not defined. Annexin is associated with the membranes of the schistosomula and adult worm's tegument in a calcium-dependent manner. The suppression of the gene by RNAi did not result in a significant phenotypic change in schistosomula *in vitro*. Partial inhibition of the coagulation activity and potential function of endocytosis of membrane-bound antibodies were observed. Immunization with the rLy6.5, rSmVal7, rAnel or rAnelII-II-III did not show reduction in worm burden recovery after challenge.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Genes differentially expressed. Schistosomulum. Tegument. Recombinant proteins. Molecular characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose	21
Figura 2. Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>S. haematobium</i>	22
Figura 3. Representação esquemática do tegumento.	29
Figura 4. Mecanismo de silenciamento gênico por RNA de interferência em <i>Caenorhabditis elegans</i>	33
Figura 5. Desenho do plasmídeo pAE-6His usado para clonagem e expressão dos genes em <i>E. coli</i>	40
Figura 6. Desenho do plasmídeo pPICZa usados para a clonagem e expressão do gene Ly6.5 em <i>Pichia pastoris</i>	41
Figura 7. Representação do ensaio de inibição de penetração pela pele.	51
Figura 8. Delineamento experimental do ensaio de imunização com proteína recombinante e desafio com cercária de <i>S. mansoni</i>	58
Figura 9. Análise dos dados do transcriptoma em busca de genes diferencialmente expressos no estágio de esquistossômulo.....	62
Figura 10. Análise da expressão dos genes Dife1 a Dife9 nos estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto	65
Figura 11. Alinhamento múltiplo por ClustalX das seqüências de aminoácidos dos membros da família Ly6 de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação aos ortólogos de <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Rattus norvegicus</i>	68
Figura 12. Análise da expressão dos genes Ly6.1 a Ly6.6 entre os estágios do parasita	69
Figura 13. Expressão e purificação da proteína rLy6.5 em <i>Escherichia coli</i>	71
Figura 14. Expressão e purificação da proteína rLy6.5 em <i>Pichia pastoris</i>	72
Figura 15. Perfil de expressão da proteína Ly6.5 de <i>S. mansoni</i> nos estágios do parasita.....	73
Figura 16. Análise da ligação da proteína Ly6.5 no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI após digestão com piPLC.....	74
Figura 17. Perfil de expressão da proteína Ly6.1 de <i>S. mansoni</i> nos estágios do parasita.....	75
Figura 18. Análise das glicosilações nas proteínas rLy6.1 e rLy6.5.....	75
Figura 19. Análise das proteínas rLy6.1 e rLy6.5 e os extratos de vermes adultos após ou sem o tratamento com a enzima PNGase F.	76
Figura 20. Imunolocalização da proteína Ly6.5 de <i>Schistosoma mansoni</i> em parasitas inteiros.....	77
Figura 21. Imunolocalização das proteínas Ly6.1 e Ly6.5 em secções de vermes adultos	78
Figura 22. Ensaio de inibição da penetração das cercárias pela pele.....	79
Figura 23. Ensaio da morte dos esquistossômulos pelo sistema complemento	80
Figura 24. Western blot das proteínas rLy6.1 e rLy6.5 usando soro anti-CD59.....	81
Figura 25. Reconhecimento da proteína CD59 pelos anticorpos anti-Ly6.1 e anti-Ly6.5.....	82
Figura 26. Ensaio hemolítico da via alternativa do sistema complemento.....	83
Figura 27. Análise da concentração de IgG total anti-Ly6.5 durante o regime de imunização e desafio dos animais.....	84
Figura 28. Análise da resposta imune celular para IFN- γ por ELISPOT e IL-5 por ELISA.	85

Figura 29. Gráfico de dispersão do número de vermes recuperados em camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína recombinante rLy6.5 ou a vacina de DNA pTG-Ly6.5	86
Figura 30. Caracterização do gene Dife9 (SmVal7)	87
Figura 31. Expressão e purificação da proteína rSmVal 7 em <i>Escherichia coli</i>	88
Figura 32. Perfil de expressão da proteína SmVal 7 nos estágios do parasita.....	89
Figura 33. Perfil de expressão da proteína SmVal7 nos estágios do parasita.....	90
Figura 34. Imunolocalização da proteína SmVal7 em estágios do parasita.....	92
Figura 35. Hibridização <i>in situ</i> de parasitas inteiros mostrando a expressão do gene SmVal7 nas glândulas esofágicas	94
Figura 36. Análise da concentração de IgG total anti-SmVal7 durante o regime de imunização e desafio dos animais..	95
Figura 37. Análise da resposta imune celular por ELISPOT da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rSmVal7	96
Figura 38. Gráfico de dispersão do número de vermes recuperados em camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína recombinante rSmVal7.	96
Figura 39. Alinhamento múltiplo por ClustalX da seqüência completa de aminoácidos da Anexina 2 de <i>Schistosoma mansoni</i> (FJ860253) em relação às anexinas humanas A2 (P07355.2) and A13 (P27216.2), os ortólogos de <i>Schistosoma japonicum</i> (AAW24721), <i>Schistosoma bovis</i> (ACC78610.1), <i>Schistosoma mansoni</i> (AAC79802), <i>Microcotyle sebastis</i> (ACD93001), <i>Taenia solium</i> (AF147955_1) and <i>Arabidopsis</i> (NP_174810.1)	99
Figura 40. Expressão dos fragmentos de Anexina 2.....	100
Figura 41. Gel de SDS-PAGE (15%) contendo as frações da purificação da proteína rAneI-II por cromatografia de afinidade.....	101
Figura 42. Perfil da expressão do mRNA e da proteína Anexina 2	103
Figura 43. Imunolocalização da proteína Anexina 2 em estágios do parasita	104
Figura 44. Análise da concentração de IgG total anti-Anexina das sangrias durante o regime de imunização e desafio dos animais com as proteínas rAneI-II, rAneII-III e a combinação	106
Figura 45. Análise da resposta imune celular por ELISPOT para IFN- γ , IL-4 e IL-5 de esplenócitos de camundongos imunizados com rAneI-II, rAneII-II ou a combinação..	107
Figura 46. Gráfico de dispersão do número de vermes recuperados em cada camundongo C57BL/6 imunizados com as proteínas rAneI-II, rAneII-III ou a combinação (rAneI-II + rAneII-III)	108
Figura 47. Mecanismo de RNA de interferência proposto em <i>Schistosoma mansoni</i> ...	110
Figura 48. Supressão da expressão do gene Anexina e validação da técnica de RNAi.	112
Figura 49. Gráfico representando a porcentagem de esquistossômulos vivos durante 7, 15, 21 e 30 dias após o tratamento com siRNA.....	113
Figura 50. Gráfico representativo da área dos parasitas após 7 e 15 dias de tratamento com siRNA para Anexina	114
Figura 51. Microscopia eletrônica de esquistossômulos tratados com siRNA para o gene Anexina 2.....	115
Figura 52. Espectro de difração circular das proteínas rAneI-II e rAneII-III.....	117
Figura 53. Ensaio de inibição de agregação plaquetária	118
Figura 54. Análise da concentração de IgG total das sangrias durante o regime de imunização e desafio dos animais com a proteína AneI-II	119

Figura 55. Análise da concentração de IgG total antiAneI-II durante o regime de imunização com rAneI-II com (grupo 2) e sem (grupo 1) desafio	120
Figura 56. Imagens de microscopia confocal de fluorescência ou em contraste diferencial de fase (DIC) com a fluorescência dos controles para as proteínas Anexina 2, Ly6.5 e TSP-2.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes selecionados com frequência aumentada de transcritos entre a transição de cercária para esquistossômulo a serem investigados como candidatos vacinais.....	63
Tabela 2 - Características dos antígenos Ly6 de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	67
Tabela 3 - Análise da produção de IgG1 e IgG2a anti-Ly6.5 antes e após o desafio.....	84
Tabela 4 - Análise da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-AneI-II, anti-AneII-III e anti)AneI-II + AneII-III) em camundongos imunizados com diferentes combinações das proteínas antes e após o desafio	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácido
BSA	Soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
CpG	Dinecleotídeos citosina-guanina, seqüências CG imunomodulatórias
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EST	Seqüências Expressas Etiquetadas
GO	Gene Ontology
id	identidade
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	“Open Reading Frame” - Quadro Aberto de Leitura
PBS	Solução salina tamponada
RNAi	RNA de interferência
RNA_m	RNA mensageiro
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SCP	Proteína de revestimento espermático
SmAE	<i>Schistosoma mansoni</i> Assembled EST
Th1	Célula T auxiliar tipo 1
Th2	Célula T auxiliar tipo 2

LISTA DE SÍMBOLOS

Alguns aminoácidos

Ácido aspártico.....	D
Ácido glutâmico.....	E
Arginina.....	R
Asparagina.....	N
Glutamina	Q
Histidina	H
Lisina	K
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina	a
Citosina	c
Guanina	g
Timina	t

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE	21
1.2 BASES PARA UMA VACINA	24
1.3 TRANSCRIPTOMA, GENOMA E PROTEOMA	25
1.4 BUSCA DE CANDIDATOS VACINAIS	26
1.5 TEGUMENTO	28
1.6 DESENVOLVIMENTO DE VACINA – QUAL A RESPOSTA IMUNE PROTETORA?	30
1.7 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA INVESTIGAR FUNÇÃO GÊNICA	31
2 OBJETIVOS	34
3 METODOLOGIA.....	35
3.1 ANIMAIS E PARASITAS	35
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS.....	35
3.2.1 Obtenção dos ovos.....	35
3.2.2 Obtenção dos miracídios.....	36
3.2.3 Obtenção das cercárias.....	36
3.2.4 Obtenção dos esquistossômulos	36
3.2.5 Obtenção dos vermes adultos.....	36
3.3 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	37
3.4 VALIDAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR RT-PCR EM TEMPO REAL	37
3.4.1 Extração de RNA.....	37
3.4.2 Síntese da fita simples de cDNA.....	38
3.4.3 Montagem da placa	38
3.4.4 Análise dos dados.....	39
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES	39
3.6 CLONAGEM DOS GENES NOS VETORES DE EXPRESSÃO.....	40
3.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
3.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>PICHIA PASTORIS</i>	42
3.9 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	43
3.9.1 Purificação das proteínas rLy6.5 (Dife 5) de <i>E.coli</i> e rAneI-II renoveladas.....	44
3.9.2 Purificação da proteína rSmVal7 e rAneII-III denaturadas	44
3.9.3 Purificação da proteína rLy6.5 do sobrenadante do cultivo de <i>P. pastoris</i>	45
3.10 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS/ELISA	45
3.11 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS.....	46
3.12 WESTERN BLOTTING.....	47
3.13 IMUNOLocalização	47
3.14 ENSAIO DE DEGLICOSILAÇÃO	48
3.15 COLORAÇÃO DE SCHIFF PARA GLICOPROTEÍNAS.....	49
3.16 MORTE MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO DOS ESQUISTOSSÔMULOS <i>IN VITRO</i>	49
3.17 ENSAIO HEMOLÍTICO	49

3.18. ENSAIO DE INIBIÇÃO DE PENETRAÇÃO DAS CERCÁRIAS PELA PELE.....	50
3.19 ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> (WHOLE MOUNTING <i>IN SITU</i> HIBRIDIZATION – WISH)	51
3.20 ENSAIO DE RNAi	53
3.20.1 <i>Parasitas</i>	53
3.20.2 <i>Preparação do siRNA</i>	54
3.20.3 <i>Eletroporação</i>	54
3.20.4 <i>Análise da expressão gênica</i>	54
3.20.5 <i>Quantificação dos extratos protéicos</i>	54
3.20.6 <i>Viabilidade</i>	55
3.20.7 <i>Medidas do parasita</i>	55
3.20.8 <i>Imunomicroscopia eletrônica</i>	55
3.21 DICROÍSMO CIRCULAR	56
3.22 INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	56
3.23 IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES E DESAFIO	56
3.23.1 <i>Resposta Imune Humoral</i>	58
3.23.2 <i>Resposta Imune Celular</i>	59
4 RESULTADOS	61
4.1 ANÁLISE DOS DADOS DO TRANSCRIPTOMA EM BUSCA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	61
4.2 GENES ESCOLHIDOS	63
4.3 VALIDAÇÃO DOS GENES POR RT-PCR EM TEMPO REAL	64
4.4 DIFE5	66
4.4.1 <i>Família Ly6</i>	66
4.4.2 <i>Análise da expressão do RNA mensageiro</i>	69
4.4.3 <i>Expressão e purificação da proteína rLy6.5 de Escherichia coli e Pichia pastoris</i>	70
4.4.4 <i>Perfil de expressão da proteína Ly6.5 de S. mansoni nos estágios do parasita</i>	72
4.4.5 <i>Presença da proteína Ly6.5 no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI</i>	73
4.4.6 <i>Perfil de expressão da proteína Ly6.1 entre os estágios do parasita</i>	74
4.4.7 <i>Análise das glicosilações nas proteínas rLy6.1 e rLy6.5</i>	75
4.4.8 <i>Imunolocalização da proteína Ly6.1 e Ly6.5</i>	76
4.4.9 <i>Ensaio de inibição de penetração das cercárias pela pele</i>	78
4.4.10 <i>Morte dos esquistossômulos pelo sistema complemento</i>	79
4.4.11 <i>Reconhecimento das proteínas rLy6.1 e rLy6.5 pelo soro anti-CD59</i>	80
4.4.12 <i>Reconhecimento da proteína CD59 pelos anticorpos anti-Ly6.1 e anti-Ly6.5</i>	81
4.4.13 <i>Ensaio hemolítico</i>	82
4.4.14 <i>Imunização com a proteína recombinante rLy6.5</i>	83
4.4.15 <i>Imunização com a proteína rLy6.5</i>	84
4.4.15.1 <i>Resposta imune humoral induzida</i>	84
4.4.15.2 <i>Resposta imune celular</i>	85
4.4.15.3 <i>Proteção</i>	85
4.5 DIFE9 (SMVAL7)	86

4.5.1	Caracterização	86
4.5.2	Expressão e purificação da rSmVal7	87
4.5.3	Análise do perfil de expressão da proteína SmVal7	89
4.5.4	Imunolocalização da proteína SmVal7	90
4.5.5	Ensaio de hibridização <i>in situ</i>	93
4.5.6	Imunização com a proteína recombinante rSmVal7	95
4.5.6.1	Resposta imune humoral	95
4.5.6.2	Resposta imune celular	95
4.5.6.3	Imunização com a proteína rSmVal7	96
4.6.	ANEXINA	97
4.6.1	Caracterização de uma nova Anexina de <i>Schistosoma mansoni</i>	97
4.6.2	Estratégia de clonagem e expressão da Anexina 2	100
4.6.3	Purificação da proteína recombinante rAneI-II	100
4.6.4	Perfil da expressão do mRNA e da proteína Anexina 2	102
4.6.5	Imunolocalização da proteína Anexina 2	103
4.6.6	Imunização com as proteínas rAneI-II e rAneII-III	105
4.6.6.1	Resposta imune humoral	105
4.6.6.2	Resposta imune celular	107
4.6.6.3	Proteção	107
4.7	INVESTIGANDO UMA FUNÇÃO PARA A ANEXINA 2	108
4.7.1	Desenvolvimento do tegumento	108
4.7.1.1	Mecanismo do RNAi	108
4.7.1.2	Supressão da expressão do gene Anexina	110
4.7.1.3	Análise do fenótipo	112
4.7.1.3.1	VIABILIDADE	113
4.7.1.3.2	TAMANHO	114
4.7.1.3.3	ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	114
4.7.2	Inibição da agregação plaquetária	116
4.7.2.1	Análise de dicróismo circular das proteínas rAneI-II e rAneII-III	116
4.7.2.2	Inibição da agregação plaquetária	117
4.7.3	Endocitose de partículas	118
4.7.3.1	ELISA individual dos soros dos animais imunizados com rAneI-II e desafiados com cercárias infectantes	119
4.7.3.2	Novo experimento de ELISA individual dos soros dos animais imunizados com AneI-II e desafiados com cercárias infectantes	119
4.7.3.3	Imunofluorescência da Anexina durante o tempo	120
5	DISCUSSÃO	122
5.1	TRANSCRIPTOMA	122
5.2	FAMÍLIA LY6	123
5.3	DIFE9	126
5.4	ANEXINA	129
6	CONCLUSÕES	133
	REFERÊNCIAS	135
	ANEXO – ARTIGOS PUBLICADOS	147

1.1 INTRODUÇÃO

1.1 SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma das infecções helmínticas mais importantes em termos de morbidade e mortalidade (KING; DICKMAN; TISCH, 2005). É endêmica em 74 países da África, do Oriente Médio, da América do Sul, do Sudeste Asiático e em algumas ilhas do Caribe (Figura 1). Estima-se que 200 milhões de indivíduos estejam infectados, 20 milhões sofram severos sintomas da doença (ROSS et al., 2002) e mais de 600 milhões residam em áreas de risco no mundo (BERGQUIST, 1998).

No Brasil, admite-se existirem mais de seis milhões de indivíduos afetados, atingindo Estados do Norte (Pará, Rondônia), todos os Estados do Nordeste, do Sudeste, Estados do Sul (Paraná e Santa Catarina) e do Centro-Oeste (Goiás e Distrito Federal) (AMARAL et al., 2006). Em São Paulo, nos últimos dez anos foram notificados mais de duzentos mil casos. A maioria desses casos foi classificada como importados, sendo apenas 10% do total classificados como autóctones (Divisão de Orientação Técnica - DOT – SUCEN, 2002).

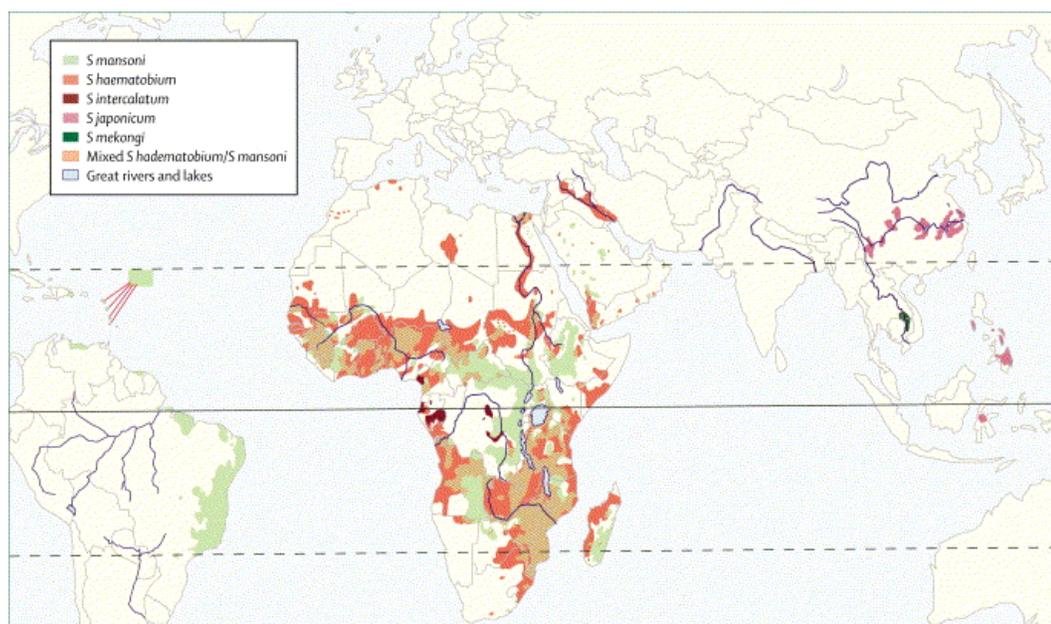


Figura 1. Distribuição global da esquistossomose. Diferentes localizações contendo a infecção por distintos agentes etiológicos da esquistossomose.

Fonte: Gryseels et al. (2006).

Causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, a doença tem como principais agentes etiológicos as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Na América do Sul, apenas o *Schistosoma mansoni* constitui problema de saúde pública (AMARAL et al., 2006).

Esse parasita tem um complexo ciclo de vida (Figura 2), que consiste em uma fase assexuada de crescimento e diferenciação no hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*), e uma fase sexuada de reprodução e oviposição no hospedeiro definitivo, o homem. A infecção ocorre através da água que contém cercárias infectantes liberadas pelo caramujo, as quais penetram na pele do homem. Dentro do hospedeiro, as cercárias se transformam em esquistossômulos que migram para os pulmões pela circulação sanguínea e depois para o fígado, onde ocorre sua maturação sexual. Daí migram acasalados para as veias mesentéricas e fazem a oviposição. Cada fêmea produz cerca de 400 ovos por dia, os quais atingem a luz intestinal e são excretados através das fezes. Quando esses ovos atingem a água recomeçam o ciclo, liberando os miracídeos que penetram no caramujo e se transformam em cercárias. No entanto, muitos ovos não são eliminados pelo hospedeiro e se alojam no seu fígado e intestino, provocando uma reação inflamatória granulomatosa, altamente agressiva, que pode levar ao desenvolvimento de fibrose e calcificação dos tecidos, causando dor e, em caso de infecções severas, até mesmo a morte (KING; DICKMAN; TISCH, 2001).

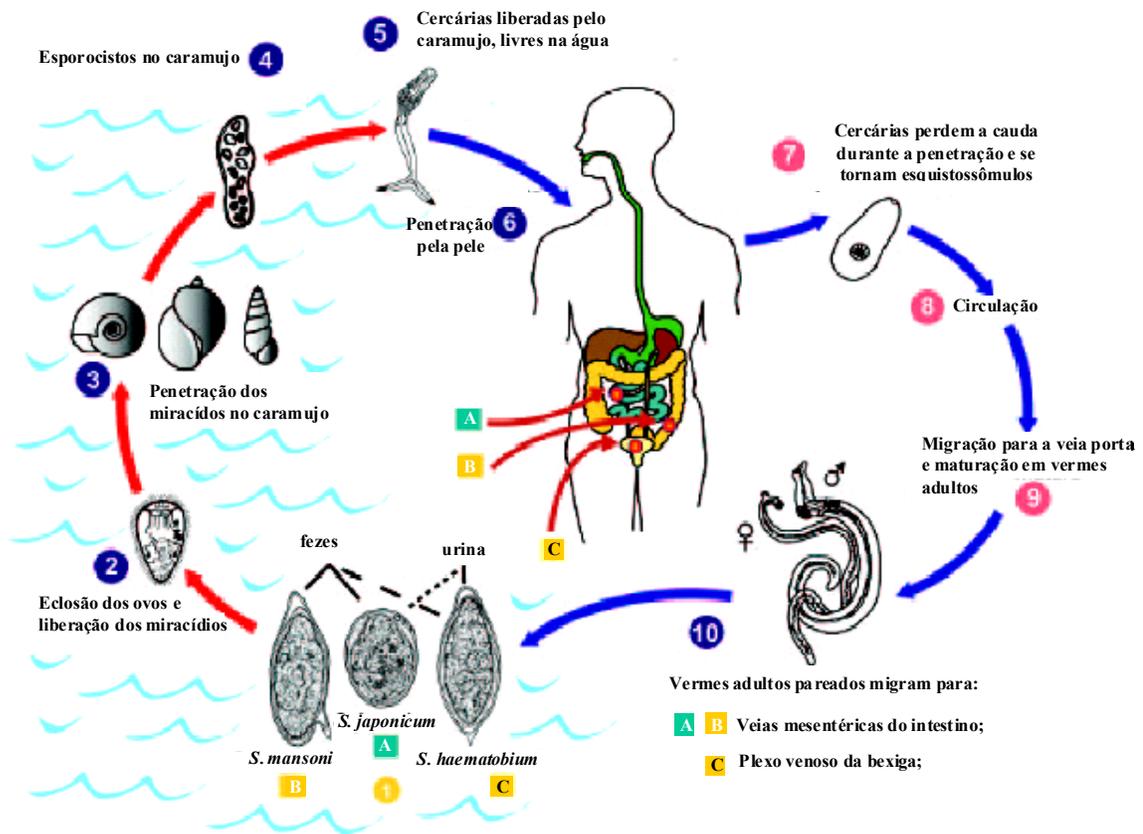


Figura 2. Ciclo de vida do *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*.

Fonte: Modificado de McManus e Loukas (2008).

A esquistossomose mansônica é basicamente uma doença que decorre da resposta inflamatória granulomatosa em torno dos ovos do parasita que ficam presos no fígado e intestinos. Na fase aguda, essa reação é exacerbada e o granuloma atinge dimensão superior a 100 vezes o volume do ovo. Nessa fase, a sintomatologia é variada, desde indivíduos assintomáticos até os que apresentam febre, mal-estar, tosse, dores musculares, quadro de hepatite aguda, enterocolite aguda e hepatoesplenomegalia discreta. Na fase crônica, o granuloma atinge dimensões bem menores e podem surgir os sinais de progressão da doença para diversos órgãos; a circulação colateral do plexo venoso mesentérico se desenvolve e os granulomas hepáticos acabam bloqueando o sistema porta-hepático, gerando hipertensão portal. Em infestações severas, o acúmulo dos granulomas hepáticos e sua fibrose contínua, associada à pressão portal elevada e à intensa resposta imunológica, acarretam o desenvolvimento de hepatoesplenomegalia. Esse quadro evolui em algumas pessoas para um acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (ascite) com o desenvolvimento de varizes esofágicas, as quais podem romper desencadeando hemorragias. Casos graves não tratados podem ser fatais (BOROS, 1989; CAPRON; CAPRON; RIVEAU, 2002) e podem se desenvolver até a formação de granulomas no SNC (REY, 1992).

O principal quimioterápico utilizado é o praziquantel (RIBEIRO-DOS-SANTOS; VERJOVSKI-ALMEIDA; LEITE, 2006), porém o uso desse medicamento não é eficaz contra o estágio de esquistossômulos e não previne as reinfecções que são comuns em áreas endêmicas, tornando esse método terapêutico dispendioso devido à rápida reinfecção seguida de tratamento (BERGQUIST; COLLEY, 1998). Outra desvantagem do uso do medicamento é o tratamento em massa e por um período indefinido, havendo o risco de selecionar parasitas resistentes à droga, como já tem sido relatado no Egito e Senegal (FALLON et al., 1995; ISMAIL et al., 1999). A resistência dos esquistossomídeos foi relatada pela primeira vez no Brasil por Katz et al. (1973).

As altas e rápidas taxas de reinfecção após tratamento por quimioterápico enfatizam a necessidade de uma abordagem mais duradoura (AL-SHERBINY et al., 2003). Afinal, a esquistossomose continua sendo a segunda doença parasitária endêmica mais grave, após a malária, e ao contrário desta, a manifestação imediata da doença é negligenciada ou indeterminada, levando a um progresso do estado patológico antes da condição hepatoesplênica tornar-se aparente. Quando este estado aflora, a quimioterapia pode não reverter a patologia (WILSON; COULSON, 1999).

A expansão e frequência com que o *S. mansoni* ataca os indivíduos de baixas condições socioeconômicas de países em desenvolvimento têm aumentado devido ao

crescimento e migração da população, além da criação de novos habitats para o caramujo através de projetos de irrigação e construções de barragens (AL-SHERBINY et al., 2003). Desta forma, diante das dificuldades políticas e econômicas e da falta de recursos para investimento em saúde pública e em medidas de saneamento básico nos países em desenvolvimento, a estratégia mais eficiente e de menor custo para prevenir doenças severas e mortes seria vacinar os indivíduos susceptíveis à infecção (HOTA-MITCHELL et al., 1999; KATZ, 1999).

1.2 BASES PARA UMA VACINA

Vacinas representam o meio mais eficaz de controlar doenças causadas por agentes infecciosos parasitários (WILSON; COULSON, 1999), mas no caso da esquistossomose é um difícil desafio, em função da complexidade do ciclo de vida do *S. mansoni* dentro de seus hospedeiros, bem como a diversidade de respostas imunes por estes geradas (DUPRE et al., 2001). Considera-se que seja possível obter uma vacinação eficiente contra essa doença, uma vez que a imunização de animais experimentais com cercárias irradiadas foi capaz de induzir até 80% de proteção contra uma infecção subsequente com elevada dose de cercárias (COULSON, 1997), além de estudos demonstrarem uma proteção parcial pela imunização com extrato antigênico de parasita em vários estágios do ciclo de vida (SMITH; CLEGG, 1985; JAMES, 1986; SMITHERS et al., 1989). O problema da vacina em humanos com cercárias irradiadas e extrato do parasita seria a impossibilidade de produzir quantidades suficientes de cercárias e antígenos para o desenvolvimento em larga escala comercial. Mesmo assim, a vacina de cercárias irradiadas não seria aceita em humanos devido à evidência de que seu uso levaria a um significativo nível de patogenicidade associada à própria vacina irradiada (HAGAN; SHARAF, 2003).

Outro fato que levou os pesquisadores a acreditar no desenvolvimento de uma vacina, são os diversos casos de desenvolvimento de proteção natural em indivíduos que vivem em regiões endêmicas (BUTTERWORTH et al., 1985; WILKINS et al., 1987; DESSEIN et al., 1988; HAGAN et al., 1991). Não apenas em humanos, mas diversos modelos animais para a esquistossomose também apresentam autocura baseada na resposta imune, como *Macaca mulata* e *Rattus norvegicus* (WILSON; COULSON, 2009);

Além disto, há um número de vacinas anti-parasitárias de uso veterinário sendo desenvolvido com sucesso, algumas das quais em uso, como vacinas recombinantes contra *Taenia ovis* e *Echinococcus granulosus* (DALTON; MULCAHY, 2001) e contra *Schistosoma*

bovis em gado, no Sudão (MAJID et al., 1978). Recentemente, tem-se discutido o início dos testes em gados com a proteína Sm14 de *S. mansoni* contra a fasciolose (TENDLER; SIMPSON, 2008).

Diante desses fatos, das desvantagens do uso da quimioterapia e da falta de saneamento básico e educação sanitária em áreas endêmicas, justifica-se o desenvolvimento de uma vacina preventiva. No entanto, o principal desafio no desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose é a identificação de antígenos que estimulem uma resposta imune apropriada e leve o indivíduo à resistência contra uma infecção (YANG et al., 2000).

1.3 TRANSCRIPTOMA, GENOMA E PROTEOMA

Em outubro de 2003, houve a publicação simultânea dos transcriptomas do *Schistosoma mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003) e *Schistosoma japonicum* (HU et al., 2003). Um total de 125.000 ESTs foram obtidas a partir dos seis diferentes estágios do ciclo de vida do *S. mansoni* pelo método ORESTES (DIAS NETO et al., 1997), estimando-se que cerca de 92 % dos 14.000 genes preditos para este parasita foram amostrados. Nesse total, 77% representavam novos fragmentos gênicos de *S. mansoni*; sendo 1% novos parálogos; 20% de novos ortólogos e 55% de fragmentos sem função conhecida (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003).

Esses novos dados forneceram um grande número de novos genes de *Schistosoma mansoni*, e conseqüentemente possibilitou novas visões sobre a biologia do parasita na sobrevivência e interação hospedeiro-parasita e abriu a oportunidade de identificar potenciais candidatos vacinais e alvos para drogas esquistossomicidas (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2004; MCMANUS et al., 2004).

Em 2009, foi finalizado o sequenciamento do genoma completo do parasita com 363 megabases que codificam ao menos 11.809 genes. E novamente, possibilitou a descoberta de novos alvos quimioterápicos, revelando o déficit do parasita no metabolismo de lipídios e identificando receptores de membrana, canais iônicos e proteases do verme; também foram identificados os gargalos metabólicos do parasita sobre os quais drogas já aprovadas para outras aplicações poderiam ser eficazes (BERRIMAN et al., 2009).

Outra forma de buscar candidatos vacinais foi com a ajuda das técnicas de microarranjo e proteoma. Microarranjo é uma ferramenta que vem sendo bastante utilizada para comparar o nível de expressão de muitos genes simultaneamente usando RNAm dos diversos estágios do parasita. Os estudos de proteoma, através de diversas estratégias, têm o

potencial de identificar proteínas secretadas ou expostas nos epitélios superficiais do parasita, que entram em contato com o sistema imune do hospedeiro.

Entre os diversos trabalhos que usaram a técnica de microarranjo, Dillon et al. (2006) buscaram genes diferencialmente expressos no estágio de esquistossômulos, que é considerado o principal alvo do sistema imune. Fitzpatrick et al. (2005) buscaram os genes com diferença de expressão entre machos e fêmeas de vermes adultos. Vermeire et al. (2006) buscaram os genes envolvidos no desenvolvimento do miracídio em esporocistos, dentro do hospedeiro intermediário. Verjovski et al. (2007), utilizando um “oligoarray” de 44000 sequências, explorou o transcriptoma dos vermes adultos.

Entre os estudos proteômicos, Knudsen et al. (2005) identificaram uma série de proteínas secretadas que podem estar envolvidas no mecanismo de penetração através da pele e evasão imune. Posteriormente, Curwen et al. (2006) descreveram novas proteases e imunomoduladores que poderiam facilitar a entrada da cercária no hospedeiro. Cass et al. (2007) analisou as secreções dos ovos em busca dos antígenos responsáveis pela patologia da doença. Mais recentemente, Hansell et al. (2008) também buscou proteínas secretadas no momento da infecção no homem. Além dos antígenos secretados, também se buscou estudar a composição do tegumento utilizando diferentes abordagens; assim foram realizados estudos visando caracterizar as proteínas exclusivas de tegumento, aquelas exclusivas de vermes desnudos e as comuns às duas “estruturas” do parasita (VAN BALKOM et al., 2005); analisaram-se as proteínas das membranas do tegumento com respeito a sua solubilidade em diferentes agentes caotrópicos (BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006); e também foram caracterizadas as proteínas de tegumento mais expostas em sua superfície, utilizando para isso ensaios de biotilação (BRASCHI; WILSON, 2006).

Dessa forma, a identificação de uma grande quantidade de seqüências genômicas em combinação com essas novas tecnologias de bioinformática, microarranjo e proteômica, forneceu um grande impulso para a pesquisa de novas proteínas que poderiam desempenhar funções relevantes na interface parasita-hospedeiro e constituir antígenos vacinais promissores. Essa abordagem ficou denominada de Vacinologia Reversa (OLIVEIRA et al., 2008).

1.4 BUSCA DE CANDIDATOS VACINAIS

Em 1995, a OMS (Organização Mundial da Saúde) identificou alguns genes como candidatos vacinais e organizou testes independentes para avaliar o potencial deles, entre eles

a enzima glicolítica triose-fostato-isomerase (SmTPI), a glutationa-S-transferase (Sh28GST), a paramiosina (Sm97), uma proteína homóloga à miosina humana (IrV-5), uma proteína de ligação a ácidos graxos (Sm14) e a proteína integral de membrana (Sm23). Embora alguns destes antígenos tenham demonstrado potencial (não superior a 40%) e progredido para ensaios clínicos, até o momento não existe uma vacina eficiente contra a esquistossomose (BERGQUIST et al., 2002). A Sh28GST avançou para os ensaios clínicos de fase II, apesar dos resultados dos testes de fase I nunca terem sido reportados (CAPRON et al., 2001). O antígeno Sm14 foi recentemente iniciado nos ensaios clínicos tanto em humanos quanto veterinários, devido a uma reatividade cruzada com *Fasciola hepática* (TENDLER; SIMPSON, 2008). Diversos autores concordam que a escolha destas moléculas para os testes iniciais não deve inibir a busca por novos antígenos candidatos (BERGQUIST, 1998; DOENHOFF, 1998).

Novos antígenos foram identificados e mostraram induzir proteção em experimentação animal, entre 35-50%, mas nenhum deles alcançou os altos níveis de proteção como a imunização por cercárias irradiadas (HAGAN; SHARAF, 2003). Mais recentemente, as proteínas recombinantes tetraspanina TSP-2 (TRAN et al., 2006) e Sm29 (CARDOSO et al., 2008) e a vacina de DNA expressando a enzima citosólica superóxido dismutase (CT-SOD) (SHALABY et al., 2003) foram as que alcançaram níveis de proteção mais altos, entre 50-60% (MCMANUS; LOUKAS, 2008).

Trabalhos recentes enfatizam a busca por proteínas de superfície de esquistossômulos por estarem mais acessíveis ao sistema imune (MCMANUS; LOUKAS, 2008). Os potenciais antígenos responsáveis pela indução de proteção estariam presentes no estágio pulmonar de esquistossômulos, uma vez que os parasitas não conseguem progredir além deste estágio, quando os camundongos são imunizados com cercárias irradiadas. Desta forma, as proteínas expressas exclusivamente em adultos também poderiam ser desconsideradas como candidatas vacinais. Adicionalmente, quando esquistossômulos atenuados do estágio pulmonar são administrados intraderme, estes são capazes de elicitar altos níveis de proteção frente ao desafio com cercárias. Assim, os antígenos específicos de cercárias também não seriam necessários para a indução de imunidade protetora (HARROP; COULSON; WILSON, 1999). Além disto, proteínas secretadas por esquistossômulos em cultura são potentes estimuladores da secreção de IFN- γ , quando comparados às proteínas secretadas por outros estágios; e esta citocina certamente está ligada aos mecanismos de proteção (MOUNTFORD; HARROP; WILSON, 1995).

Quando cercárias invadem o hospedeiro humano, elas encontram um ambiente diferente, requerendo uma rápida adaptação para manter-se no hospedeiro. Genes com expressão aumentada nessa transição de cercária a esquistossômulo estão ligados a ativação de fatores de transcrição e tradução no processo de diferenciação, e podem ser genes próprios do parasita e estarem ligados a sobrevivência dele na circulação sanguínea, podendo ser potenciais candidatos vacinais (OLIVEIRA et al., 2008). Existem várias ferramentas de alta tecnologia que geram esses dados em grande quantidade, como microarranjo, SAGE e ESTs. O maior desafio é a análise desses dados, porque essas técnicas possuem diferentes sensibilidades em detectar a variação de expressão específica de um gene entre os estágios. As formas de validação de uma parcela desses dados são por RT-PCR em tempo real e Northern blot (LI et al., 2004).

1.5 TEGUMENTO

Outra característica importante de um potencial candidato vacinal é a sua localização no parasita, preferencialmente exposto ao sistema imune, como proteínas de superfície (MCMANUS; LOUKAS, 2008) ou secretadas (EL RIDI; TALLIMA, 2009).

Os vermes adultos podem sobreviver por décadas driblando a resposta imune através do tegumento. A superfície do parasita é recoberta por uma camada sincicial, denominada tegumento, que é a principal interface do parasita com o hospedeiro. Essa camada é ligada por estreitas conexões citoplasmáticas onde está localizada toda a maquinaria de produção e exportação protéica, composta por ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, que produzem e secretam para o sincício dois tipos de vesículas, corpos discóides e vesículas multilaminadas (Figura 3).

O tegumento apresenta uma estrutura “heptalaminada”, considerada uma adaptação para a sobrevivência na corrente sanguínea. Esta estrutura é composta por duas bicamadas lipídicas formando uma membrana plasmática dupla recoberta por uma camada secretada, o membranocálice. O membranocálice é formado quando vesículas multilaminadas, produzidas nos corpos celulares, se fundem com a dupla membrana plasmática do tegumento, liberando seu conteúdo na sua superfície; o membranocálice é continuamente repostado, com tempo de meia vida *in vivo* de cinco dias (VAN HELLEMOND et al., 2006).

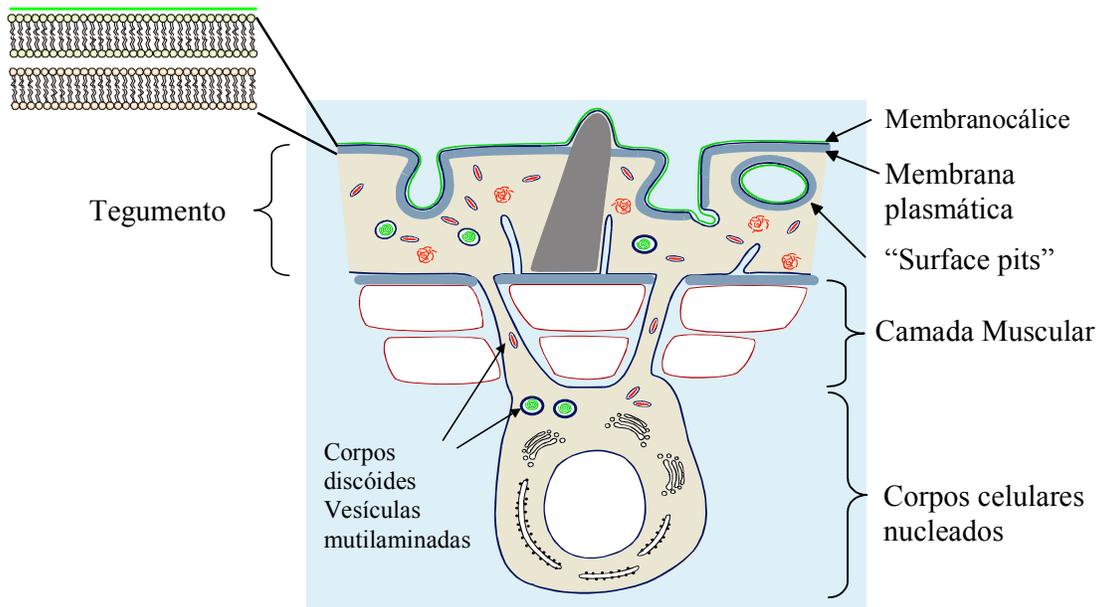


Figura 3. Representação esquemática do tegumento.

Fonte: adaptado de Skelly e Wilson (2006).

O tegumento é a estrutura mais estudada em busca de candidatos vacinais e está relacionado a diversos mecanismos de evasão ao sistema imune, como proteases que digerem os fatores do complemento do hospedeiro (FISHELSON, 1995) e a rápida renovação e a aquisição de antígenos do hospedeiro (SKELLY; WILSON, 2006). Essa estrutura também está envolvida em diversos processos fisiológicos como nutrição, modulação da excreção, osmoregulação, recepção sensorial e transdução de sinais, ficando evidente sua importância para sobrevivência e adaptação do parasita ao hospedeiro definitivo (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007).

Desse modo a composição molecular dessa estrutura tem sido o objeto de estudo de muitos trabalhos. Existe um grande interesse em identificar e caracterizar as moléculas de superfície para se obter uma melhor compreensão bioquímica da interface parasita-hospedeiro. Embora muitas proteínas do tegumento tenham sido identificadas por abordagens de bioquímica clássica, o conhecimento da composição molecular do tegumento até há pouco tempo era muito limitado. O seqüenciamento do genoma e do transcriptoma do parasita, juntamente com o recente desenvolvimento das técnicas de proteoma, permitiu estudos mais detalhados sobre as proteínas tegumentares (VAN BALKOM et al., 2005; BRASCHI; WILSON, 2006; BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006).

1.6 DESENVOLVIMENTO DE VACINA – QUAL A RESPOSTA IMUNE PROTETORA?

Um dos principais obstáculos para a obtenção de uma vacina de sucesso contra a esquistossomose, além da escolha dos antígenos, é a falta de um consenso relativo ao tipo de resposta imune desejada (BERGQUIST et al., 2002).

Enquanto é bem aceito que uma resposta de células T CD4+ antígeno específicas é fundamental para adquirir resistência ao parasita em camundongos, continua incerto qual subtipo de resposta seria mais protetora. Essas células são divididas em dois subtipos, Th1 e Th2. Células Th1 secretam IFN- γ , que é importante para a ativação de macrófagos e da imunidade mediada por células, enquanto que células Th2 ativam os mecanismos de imunidade humoral e produzem uma variedade de citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13.

Resultados de muitos estudos em humanos e ratos sugerem que uma vacina deve explorar melhor os mecanismos da resposta Th2, enquanto que estudos em camundongos indicam que uma imunidade celular Th1 envolvendo IFN- γ e IL-12 seria mais vantajoso. A decisão de explorar uma classe de resposta sobre a outra é complicada pelo fato de que diferentes modelos experimentais e abordagens têm sido usados (WYNN; HOFFMANN, 2000).

No modelo da vacina de cercárias irradiadas quando camundongos receberam uma exposição de cercárias irradiadas foi constatada imunidade parcial com resposta Th1, no entanto com uma segunda exposição, desenvolveram uma mistura de reação Th1 e Th2 e anticorpos específicos contra o parasita. Isto sugere que camundongos vacinados múltiplas vezes podem ter proteção aumentada baseada em respostas Th1 e Th2. Assim, uma estratégia de imunização seria um mecanismo de proteção operando em ambos os pólos da resposta imune (WYNN; HOFFMANN, 2000). No entanto, Wilson & Coulson (1999) discordaram e propuseram a teoria do “*Happy Valley*” (vale da felicidade), onde o parasita parece provocar uma resposta “T helper” ineficiente com um perfil de citocinas mista Th1-Th2 ou Th0. Quanto maior a polarização para um ou outro pólo, maior o nível de proteção atingido, o que presumivelmente reflete o aumento de células T responsivas, ou a concentração de anticorpos efetores. Infelizmente, isto mostra que o tipo de resposta imune que acarrete em proteção ainda não está definida e que pode ser alcançada tanto com resposta Th1, Th2 ou mista, dependendo do hospedeiro (HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005)

Nas primeiras 3-5 semanas da infecção, durante as quais o hospedeiro humano está exposto à migração de parasitas imaturos, a resposta dominante é Th1. Quando os parasitas

maturam, acasalam-se e produzem ovos nas semanas seguintes, Th1 diminui e uma forte resposta Th2 aparece, induzida por antígenos dos ovos. Na fase crônica, a resposta imune é modulada pelo subtipo Th2, essencial para permitir a sobrevivência do hospedeiro através da formação de granulomas, do desenvolvimento de anticorpos contra os antígenos dos ovos e da regulação do processo inflamatório. Além disto, indivíduos resistentes naturalmente à reinfeção apresentam forte resposta Th2 (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Experimentos *in vitro* com eosinófilos e IgE de humanos infectados sugerem que a morte dos esquistossômulos envolve a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC). Esta atividade é mediada pela ação da IgE em conjunto com células efectoras como eosinófilos e plaquetas. Sabendo que IL-4 e IL-5 contribuem para o desenvolvimento de anticorpos IgE e a eosinofilia, induzir uma resposta Th2 parece ser um bom objetivo para desenvolver uma vacina contra *Schistosoma* (WYNN; HOFFMANN, 2000). A resposta Th2 prolongada contribui para o desenvolvimento de fibrose hepática e morbidade crônica, contribuindo para a sobrevivência do hospedeiro, tanto em humanos como em camundongos. A interleucina IL-13 é a principal responsável pela fibrose hepática em camundongos (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A imunização com proteínas recombinantes que geram alta proteção junto com adjuvante de Freund em camundongos parece induzir resposta Th1, com indução de altos níveis de IFN- γ . Além disso, quando soros de pacientes naturalmente resistentes a infecção e resistentes a reinfeção são analisados, o antígeno ideal parece induzir altos níveis de IgG1 e IgG3, anticorpos opsonizantes, e baixos níveis de IgA, IgM e IgE. Esses dados foram descritos para o antígeno Sm29 que atingiu 55% de redução da carga parasitária em camundongos (CARDOSO et al., 2008).

No entanto, várias vacinas recombinantes em camundongos têm conferido vários níveis de proteção com diferentes tipos de resposta imune. Isto pode ser influenciado em parte pelas propriedades dos adjuvantes usados ou pela imunogenicidade específica da proteína, entretanto, um consenso geral ainda não foi estabelecido (MCMANUS; LOUKAS, 2008).

1.7 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA INVESTIGAR FUNÇÃO GÊNICA

Além da importante questão de procurar candidatos vacinais contra a esquistossomose, com as características desejadas descritas anteriormente, o estudo da função desses novos genes e proteína que foram descobertos pelo transcriptoma, genoma e proteoma fica ainda mais interessante. São proteínas que estão na interface-hospedeiro e podem ter alguma função

essencial na sobrevivência e desenvolvimento do parasita dentro do hospedeiro. Dessa forma, inicia-se a fase da pós-genômica que busca a função gênica.

Diante dos métodos e ferramentas de manipulação gênica para *S. mansoni* conhecidos, muitos ainda não estão bem padronizados devido à complexidade do parasita. Entre as técnicas conhecidas estão a transgênesis (integração de genes ou mutagênese no genoma) usando biobalística (DAVIS et al., 1999), eletroporação (YUAN et al., 2005) ou retrovírus (KINES et al., 2006). No entanto, são estudos preliminares porque o maior obstáculo no estudo da transgênesis em *S. mansoni* é a permanência de linhagens celulares dos estágios do parasita *in vitro* e imortalizáveis (BRINDLEY; PEARCE, 2007).

RNA de interferência (RNAi) é outra ferramenta molecular usada para silenciar a expressão de um gene adicionando RNA de fita dupla específica para o gene de interesse (dsRNA) e que está sendo mais utilizada para o estudo de funções gênicas. Essa ferramenta foi originalmente caracterizada em *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998) e tem sido aplicada em uma ampla variedade de organismos para estudar a função do gene. A técnica foi relatada pela primeira vez em *S. mansoni* com a supressão do gene cathepsina B1 em cultura de esquistossômulos por Skelly et al. (2003).

O mecanismo de RNAi têm sido amplamente descrito em *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. Praticamente, o dsRNA é reconhecido por um complexo de proteína, a Rde-4, um cofator que liga o RNA fita dupla a Dicer, uma ribonuclease III, que cliva o dsRNA em pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Esses siRNAs se integram no complexo RISC, composto por uma helicase, Drh-1, e uma endonuclease, Argonata, que cliva os siRNAs. Durante a ativação do complexo, a fita senso do siRNA é degradada e a fita antisense guia o composto RISC a se ligar no RNAm homólogo pelo mecanismo de pareamento de bases. Uma vez ligado, o transcrito alvo é clivado pela proteína Argonata, resultando em um gene silenciado (Figura 4).

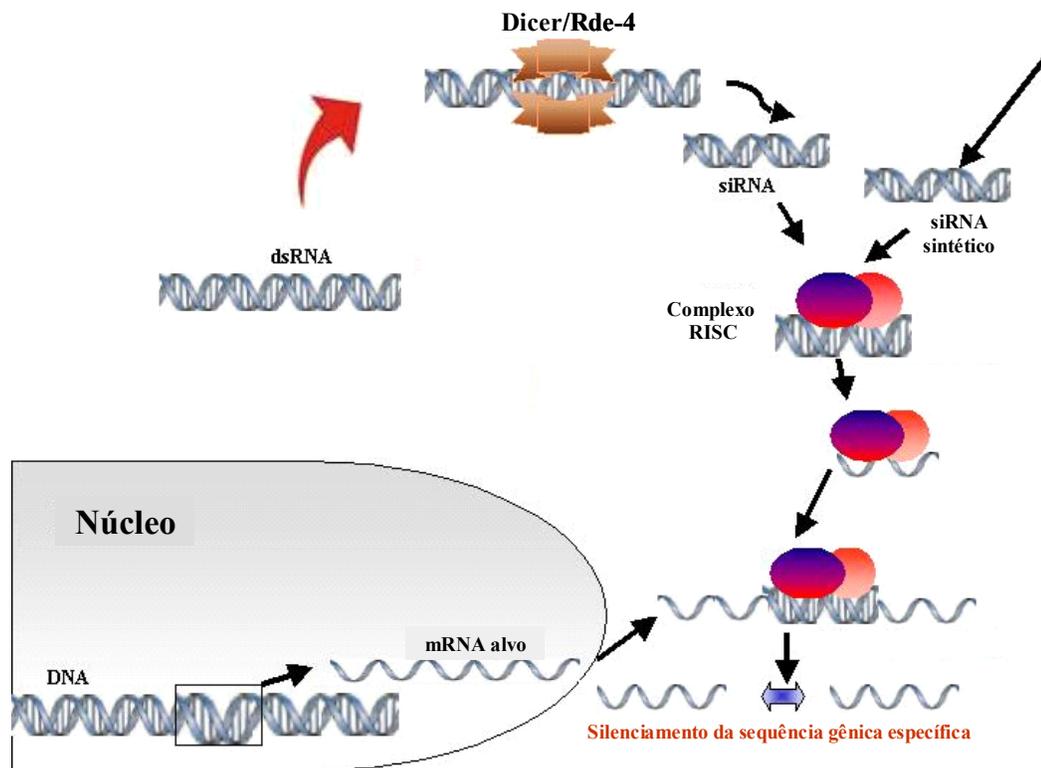


Figura 4. Mecanismo de silenciamento gênico por RNA de interferência em *Caenorhabditis elegans*.

Fonte: modificado de Geldhof (2007).

A partir do transcriptoma foi observada a presença dos ortólogos Dicer e Argonauta indicando a existência de uma via intacta de RNAi em *S. mansoni* (KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2008a) e recentemente esse mecanismo com proteínas similares foi esquematizado (KRAUTZ-PETERSON et al., 2010). Esse mecanismo pode ser observado na prática, uma vez que alguns genes já foram silenciados com sucesso. Entre eles: a catepsina B (SKELLY; DA'DARA; HARN, 2003; CORRENTI; BRINDLEY; PEARCE, 2005) e a aquaporina (FAGHIRI; SKELLY, 2009) em esquistossômulos; a desidrogenase 3-fosfato (BOYLE et al., 2003) e a CD36 (DINGUIRARD; YOSHINO, 2006) em esporocistos; a HGPRtase (PEREIRA et al., 2008) e a asparagil endopeptidase (KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2008b) em vermes adultos. Recentemente, foi realizado um “screening” usando RNAi para vários genes de *S. mansoni* em busca de potenciais alvos vacinais (STEFANIC et al., 2010).

2 OBJETIVOS

Analisar o transcriptoma do *Schistosoma mansoni* em busca de genes com expressão aumentada na transição entre cercária e esquistossômulo através do número de transcritos, caracterizá-los e avaliá-los como potenciais candidatos vacinais.

Os objetivos específicos são:

- Selecionar genes diferencialmente expressos no estágio de esquistossômulos através do número de transcritos derivados de bibliotecas de cDNA de cercária e esquistossômulo;
- Validar a expressão dos genes diferencialmente expressos por RT-PCR em tempo real;
- Clonar, expressar e purificar as proteínas dos genes escolhidos; produzir anticorpos contra as proteínas obtidas.
- Caracterizar os genes selecionados e tentar investigar a função de alguns genes;
- Determinar a imunolocalização no parasita das proteínas com os respectivos antisoros obtidos;
- Realizar a avaliação da resposta imune humoral e celular induzida em camundongos imunizados com as proteínas recombinantes e desafiados com cercárias infectantes;
- Avaliar a proteção induzida pela imunização através da análise da redução da carga parasitária.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E PARASITAS

O ciclo do *Schistosoma mansoni*, linhagem BH foi mantido no laboratório (Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan) da Dra. Toshie Kawano (in memoriam) e Dra. Eliana Nakano, utilizando caramujos *Biomphalaria glabrata* e hamsters.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS

3.2.1 Obtenção dos ovos

Fígados de hamsters infectados com 100 cercárias há aproximadamente 40 dias foram separados três a três e dilacerados com lâminas de bisturi. Os fígados foram colocados em tubos Falcon de 50 mL, adicionando 20 mg de colagenase II, 50 µg/mL de gentamicina, 2 µg/mL de ampicilina e 50 mL de tampão fosfato (PBS). Em seguida, a mistura foi incubada sob agitação por 16 h a 37 °C em um agitador a 250 rpm. Após a mistura ser centrifugada a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 50 mL de PBS; esse procedimento foi repetido mais duas vezes, sendo que na última, o precipitado foi ressuscitado em apenas 25 mL de PBS. A suspensão foi filtrada, primeiro em peneira de 250 µm e em seguida em peneira de 150 µm, com auxílio de uma bomba a vácuo. Após o material peneirado ser centrifugado a 400 g por 5 min e o sobrenadante ser descartado, o precipitado foi ressuscitado em 3 mL de PBS. Em um tubo de 50 mL, foi preparado um gradiente de Percoll (8 mL de Percoll + 32 mL de Sucrose 0,25 M), sobre o qual foram cuidadosamente aplicados os 3 mL do precipitado peneirado. Esse material foi centrifugado a 800 g por 10 min com desaceleração zero; o sobrenadante, que continha as células de fígado, foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em tampão PBS com 2 mM de EDTA, centrifugados e lavados novamente por mais duas vezes, para inativar a enzima colagenase. Na última lavagem, o precipitado foi aplicado sobre uma segunda coluna de Percoll (2 mL de Percoll + 8 mL de Sucrose 0,25 M), montada em um tubo de 15 mL. A coluna foi centrifugada a 800 g por 15 min e o sobrenadante descartado, assegurando a ausência de células do fígado. O precipitado de ovos foi lavado três vezes com PBS e centrifugado novamente (DALTON et al., 1997).

3.2.2 Obtenção dos miracídios

Ovos purificados foram diluídos em água destilada e expostos a uma luz artificial para eclodirem, liberando os miracídios. O sobrenadante, contendo os miracídios, foi coletado, resfriado em gelo para que os parasitas perdessem mobilidade, e centrifugado a 10.000 g por 2 min a 4 °C (DALTON et al., 1997).

3.2.3 Obtenção das cercárias

As cercárias foram obtidas, expondo os caramujos infectados à luz por uma hora em bquer com água destilada. Após a exposição, a água contendo as cercárias foi distribuída em tubos de 50 mL, deixados no gelo por 30 min e centrifugados por 2 min a 2.000 rpm.

3.2.4 Obtenção dos esquistossômulos

As cercárias obtidas como descrito no protocolo acima foram centrifugadas e ressuspendidas em 2 mL de meio ELAC (Meio MEM (Gibco) suplementado com lactalbumina 0,1%, glicose 0,1%, MEM vitaminas 0,5% e Hepes 10 mM) estéril a 37 °C para sofrerem o choque térmico. Em seguida, as cercárias sofreram choque mecânico no vórtex em velocidade máxima por 90 segundos para a ruptura das caudas e transformação das cercárias em esquistossômulos. No fluxo laminar, os tubos foram deixados por 5 min para a sedimentação dos esquistossômulos. O sobrenadante contendo as caudas foi descartado e os esquistossômulos foram ressuspendidos em 5 mL de meio ELAC. Essas lavagens foram feitas até que o número de caudas reduzisse quando vistas ao microscópio óptico. No final, os esquistossômulos foram transferidos para uma garrafa de cultura contendo 20 mL de meio M-169 (Meio ELAC suplementado com hipoxantina 5×10^{-7} M, serotonina 1×10^{-6} M, hidrocortisona 1×10^{-6} M, triiodotironina 2×10^{-7} M, meio Schneider 5%, soro bovino fetal 5%, penicilina/estreptomicina 200 U/mL e gentamicina 50 mg/mL) e deixados na estufa de CO₂ por 7 dias. Decorrido o tempo, eles foram centrifugados por 3 min a 200 g, lavados em 5 mL de PBS e centrifugados novamente.

3.2.5 Obtenção dos vermes adultos

Os vermes adultos foram obtidos por perfusão da veia porta, do fígado e das veias mesentéricas de camundongos ou hamsters infectados com *S. mansoni* utilizando salina e

heparina (2 U/mL) (anticoagulante). Os vermes foram lavados em PBS e deixados para decantar.

3.3 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A maioria das bibliotecas do projeto Transcriptoma do *Schistosoma mansoni* foram obtidas com o método ORESTES. Mini-bibliotecas de cDNA foram geradas, usando oligonucleotídeos não-degenerados selecionados arbitrariamente para a transcrição reversa e subsequente PCR sob condições de baixa estringência. Os amplicons gerados foram clonados e seqüenciados gerando centenas de ESTs para cada mini-biblioteca. Essas mini-bibliotecas foram geradas para os seis diferentes estágios do parasita. Para a seleção dos genes diferencialmente expressos, foram analisadas as seqüências de ESTs obtidas das mini-bibliotecas de cercária e esquistossômulo, usando o mesmo grupo de seis oligonucleotídeos. Como previamente demonstrado, quando o mesmo oligonucleotídeo é usado entre os diferentes estágios do parasita, o número de transcritos obtidos em cada estágio para um dado gene, pode ser usado como uma inferência indireta do nível de expressão daquele gene naquele estágio. Sequências gênicas com um número aumentado de transcritos vindos de esquistossômulos quando comparadas aos de cercária foram identificadas por processamento automático. Sequências contendo um mínimo de 8 transcritos vindos de esquistossômulos foram categorizados quanto à função gênica e selecionados quanto: (i) codifica uma proteína com função desconhecida; (ii) ter transcritos adicionais da biblioteca de cDNA de vermes adultos que foram geradas por transcriptase reversa com oligonucleotídeos poli-dT, assim marcando a cauda de poli-A e revelando a direção da transcrição do RNAm original; (iii) ter um quadro aberto de leitura (ORF) codificando mais de 150 aminoácidos.

A categorização por função gênica foi avaliada baseada nos “hits” do BLASTx (cut off $E \leq 10^{-9}$) originados do banco de dados local construídos de seqüências públicas. “Hits” com um $E \text{ value} > 10^{-9}$ foram nomeados como proteínas com funções desconhecidas.

3.4 VALIDAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR RT-PCR EM TEMPO REAL

3.4.1 Extração de RNA

Esquistossômulos cultivados *in vitro* e vermes adultos mantidos em RNA later (Ambion) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram submetidos à extração de RNA total, seguindo o protocolo do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) e as cercárias foram submetidas à extração de RNA total usando

RNeasy Protect Kit (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. Nos experimentos de quantificação do RNAm por RT-PCR em tempo real dos genes da família Ly6, todos os estágios do parasita foram submetidos à extração de RNA total usando o Kit RNAspin mini (GE Healthcare) e tratados com DNase própria do kit.

Após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas e analisadas quanto à pureza no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) em comprimentos de onda de 220 nm e 750 nm. A qualidade foi avaliada através da eletroforese por capilaridade das amostras de RNA aplicadas no RNA LABChip do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), resultando num gel virtual representativo.

3.4.2 Síntese da fita simples de cDNA

O RNA extraído (3 µg) de cada estágio foi tratado com DNase livre de RNase RQ1 (Promega) por 1 h à 37 °C para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. O volume da reação foi dividido em duas frações. Em uma fração não foi adicionada a enzima transcriptase reversa, como controle, para observar a presença ou ausência de amplificação de DNA genômico. Na outra fração, a enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) foi usada na reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar aos RNAm de cada estágio (cDNAs). A reação seguiu as indicações do fabricante, utilizando oligonucleotídeos randômicos ou oligoDT (no caso do estudo dos genes da família Ly6) para a síntese de cDNA.

3.4.3 Montagem da placa

Em placas de 96 células revestidas por tiras de tampas ópticas ou adesivo (Antiga Applied Biosystems) foram arranjadas as reações para os genes e os controles. Foram realizadas três reações para um mesmo gene de cada estágio, a fim de comparar os resultados e verificar a existência de erros de pipetagem. Os controles foram a amplificação dos genes a partir das amostras de RNA não transcrito para cada estágio e outro controle foi a amplificação a partir de amostra sem cDNA, ou seja, com água DPEC (dietilpirocarbonato), a fim de observar a amplificação de contaminantes ou a dimerização dos oligonucleotídeos. Em cada poço foram adicionados 6 µL de “template”, contendo 0,15 µL do cDNA e 5,85 µL de água, para facilitar a pipetagem, 2 µL (10 mM) de cada oligonucleotídeo específico do gene e 10 µL SYBR Green (Applied Biosystems). As quantidades de cDNA e oligonucleotídeos foram avaliadas a fim de não serem limitantes para a reação de amplificação. Os

oligonucleotídeos “forward” e “reverse” foram desenhados pelo software do aparelho (Primer Express), a fim de parearem entre regiões de éxons e evitar a amplificação de material genômico. A placa montada conforme descrito acima, foi colocada no termociclador GeneAmp® PCR System 9600 e seguiu 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 10 s a 95 °C, seguido de 1 min a 60 °C. O detector GeneAmp® 5700 Sequence Detection System monitorou a amplificação do produto em tempo real com a emissão de fluorescência do SYBR Green quando intercalado em fita dupla de DNA apenas. Recentemente, o laboratório adquiriu o aparelho 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems) e vem sendo usado para amplificação e quantificação dos genes, seguindo o mesmo ciclo do termociclador anterior.

3.4.4 Análise dos dados

O método de análise empregado foi o de quantificação relativa, onde foram comparados os valores Ct do gene de interesse com o controle, os genes actina (“housekeeping gene” – Número de acesso: U19945) ou α -tubulina (Número de acesso: M80214) entre os estágios estudados, usando a seguinte fórmula: “Fold change” = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Lembrando-se que Ct é número de ciclos que atravessaram o limiar “threshold” na curva de amplificação. Os resultados foram apresentados em gráficos de “Fold Change” Relativo vs Estágios, para mostrar quantas vezes um gene foi mais expresso em um estágio em relação ao outro estágio, sendo o calibrador o estágio com menor expressão. Essas diferenças foram analisadas estatisticamente por ANOVA e, posteriormente, pelo Teste de Tukey.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES

Softwares de bionformática disponíveis em páginas da internet foram utilizados para a predição de domínios protéicos, peptídeos sinal, hélices transmembranas e âncoras de GPI (Glicosil fosfatidil inositol), como SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) e DGPI (http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html), respectivamente. As seqüências de aminoácidos foram submetidas à ferramenta Compute pI/Mw (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) para analisar o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular da proteína. O alinhamento de algumas proteínas foi analisado através do programa de CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

3.6 CLONAGEM DOS GENES NOS VETORES DE EXPRESSÃO

Os genes foram amplificados por PCR, utilizando as bibliotecas de cDNA do projeto Transcriptoma ou a partir do RNA total de verme adulto. As reações foram realizadas com a polimerase de alta fidelidade Platinum *Pfx* (Invitrogen) e os oligonucleotídeos desenhados de modo a conter os sítios das enzimas de restrição específicas para o plasmídeo utilizado. Após a amplificação, os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% e purificados com o kit "GFX PCR DNA and Gel Band purification kit" (Amersham Pharmacia Biotech).

O produto de PCR purificado foi clonado de modo direcionado no vetor pAE-6His (desenvolvido no Laboratório do Dr. Paulo Lee Ho – Instituto Butantan), para expressão em *Escherichia coli*. O vetor pAE-6His é um plasmídeo pequeno (2.8 Kb), de alta cópia (200-500) e que expressa a proteína em fusão com uma cauda de 6 His (histidinas) na porção N-terminal (Figura 5).

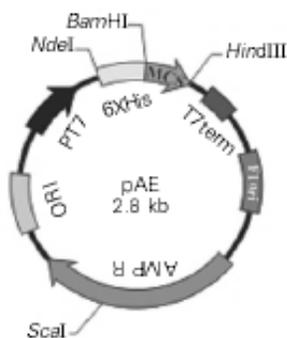


Figura 5. Desenho do plasmídeo pAE-6His usado para clonagem e expressão dos genes em *E. coli*. O plasmídeo possui gene de resistência à ampicilina e promotor T7 para expressão em *E. coli*.

Posteriormente, células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com os plasmídeos contendo os insertos, cultivadas e submetidas à purificação dos plasmídeos com o Kit "Wizard[®] Plus Minipreps" (Promega). Esses plasmídeos foram triados quanto à presença dos insertos por digestão com as enzimas de restrição específicas e quanto à orientação da seqüência por seqüenciamento automático.

O gene Ly6.5, sintetizado com códons otimizados para expressão em levedura (pela empresa DNA2.0), foi inserido no plasmídeo pPICZ α , que utiliza o sistema de expressão da levedura *Pichia pastoris* e apresenta seqüência para o sistema secretório para a proteína recombinante ao meio de cultura. O sistema de expressão eucariótico possibilita a formação de pontes dissulfeto, maiores níveis de expressão da proteína recombinante e de forma solúvel e enovelada. As características desse plasmídeo podem ser vistas na Figura 6.

anticorpo primário específico, depois com o anticorpo secundário e revelado com ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham) em filmes de radiograma ou, mais recentemente, pelo fotodocumentador ImageQuant LAS4000 (GE).

Os clones de *E. coli* que expressaram a proteína recombinante foram sonicados com pulsos de 60 Hz para a ruptura das células e a amostra foi centrifugada, coletando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado em solução (Tris 20 mM com pH apropriado, NaCl 50 mM e SDS 2%) para serem analisados em gel de SDS-PAGE e verificar onde a proteína está se concentrando, no sobrenadante ou nos corpúsculos de inclusão.

3.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *PICCHIA PASTORIS*

As leveduras (*Pichia pastoris* cepa GS115) foram transformadas por eletroporação com o vetor pPICZ α contendo o gene Ly6.5 otimizado e plaqueadas em meio YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1 M, ágar 2%) acrescido de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina. Em seguida, foram selecionados 30 clones, os quais foram testados quanto ao fenótipo Mut⁺ ou Mut^s, isto é, capacidade de metabolizar metanol normalmente ou de modo lento em placas de meio MDH (YNB (Base nitrogenada de levedura) 1,34%, Biotina 4x10⁻⁵%, dextrose 2%, Histidina 100X 10%, ágar 2%) e MMH (YNB 1,34%, Biotina 4x10⁻⁵%, metanol 0,5%, Histidina 100X 10%, ágar 2%). Os clones com o fenótipo Mut⁺ foram então selecionados pela possível presença de múltiplas cópias integradas no genoma da levedura; para tanto foram plaqueados em concentrações crescentes de zeocina (200, 500, e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A presença do gene de interesse integrada ao genoma da levedura foi confirmada por PCR, utilizando como molde para reação um lisado das colônias de leveduras. Os clones que apresentaram melhor crescimento nas maiores concentrações de zeocina foram então testados quanto à capacidade de expressar a proteína recombinante.

Para avaliar a capacidade dos clones selecionados em expressar a proteína Ly6.5 recombinante, uma colônia isolada de cada clone (16 no total) foi lançada em 10 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6, Biotina 4x10⁻⁵%, glicerol 1%) em tubos de 50 mL. Após 20 h de cultivo a 28°C e agitação a 300 rpm, as culturas foram centrifugadas (3000 rpm) por 5 min e ressuspendidas em 10 mL de meio de indução BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6, Biotina 4x10⁻⁵%, metanol 0,5%). A indução foi mantida através da adição de metanol 100% para uma concentração final de 0,5% a cada 24 h. Aliquotas de 1 mL da cultura foram retiradas a cada 24 h, centrifugadas 3 min a 10.000 rpm e o sobrenadante e os corpúsculos de

inclusão foram mantidos em freezer à -80 °C para posteriores estudos. Esses estudos de expressão da proteína recombinante iniciaram-se com clones de 72 h de indução. O sobrenadante das alíquotas foi concentrado através do protocolo de precipitação de proteína por TCA (ácido tricloroacético) e analisado por Western blot.

3.9 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os clones de *E. coli* que expressaram as proteínas recombinantes Ly6.5 (Dife5), SmVal7 (Dife9), AneI-II ou AneII-III foram cultivados em volumes maiores de meio de cultura (300 mL) sob as mesmas condições de temperatura e concentração do indutor. As bactérias foram centrifugadas, ressuspensas em 30 mL de tampão de lise e lisadas no aparelho French Press (1500 psi – 2 passagens). Em seguida, o lisado foi centrifugado por 30 min a 10.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e o precipitado sofreu lavagens com diferentes concentrações de uréia (1 M, 2 M e 8 M) ou guanidina 6 M. Posteriormente, todas as amostras coletadas foram analisadas em géis de SDS-PAGE.

A solução contendo os corpúsculos de inclusão solubilizados em concentração previamente determinada de uréia foi submetida diretamente à purificação em cromatografia em resina de Sepharose quelante de metais, carregada com Níquel (Ni-Sepharose HiTrap - Amersham Biosciences) ou renovada em tampão de “refolding”, filtrada e depois submetida à cromatografia. Esta purificação se baseia na afinidade do metal a cauda de histidina N-terminal inserida à proteína pelo plasmídeo. Por competição, as proteínas desligam da resina numa determinada concentração de imidazol. As amostras do “flowthrough” e as da eluição correspondentes ao pico de absorvância foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE.

Para a purificação da proteína recombinante Ly6.5 produzida na levedura *Pichia pastoris*, o clone selecionado foi cultivado em 1 L de meio BMGY por 20 h a 28°C e agitação 300 rpm para o crescimento da levedura. Após atingir D.O. 2.0, a cultura foi centrifugada (3000 x g) por 5 min e ressuspensa em 1 L de meio de indução BMMY, deixando-a com uma D.O de 1.0 e cultivada a 26 °C sob agitação de 300 rpm. A indução foi mantida através da adição de metanol 100% para uma concentração final de 0,5% a cada 24 h. Após 96 h, a cultura foi centrifugada por 5 min a 3.000 g e o sobrenadante foi inserido no aparelho Äkta Prime (Amersham Pharmacia, atual GE) para purificação da proteína.

3.9.1 Purificação das proteínas rLy6.5 (Dife 5) de *E.coli* e rAneI-II renoveladas

As proteínas rLy6.5 e rAneI-II seguiram o mesmo protocolo de purificação, mudando apenas o pH das soluções. Na purificação da proteína Ly6.5, foi utilizado pH 8.0 e para a proteína AneI-II foi utilizado pH 8.8.

Assim, os corpúsculos de inclusão contendo a proteína recombinante foram lavados primeiramente com 10 mL de uma solução (Tris 50mM, NaCl 300mM, Triton 2%, uréia 1 M), centrifugados (10.000 rpm, 30 min, 4°C), em seguida, lavados duas vezes com 10 mL de uma solução (Tris 50mM, NaCl 300mM, Triton 2%, uréia 2 M) e finalmente, lavados com 10 mL de uma solução (Tris 50mM, NaCl 300mM, Triton 2%, uréia 8 M) e deixados durante a noite sob um agitador de placas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 rpm, 30 min, a 4°C e submetidos ao renovelamento da proteína, gotejando lentamente os 10 mL em 2 L de tampão (Tris 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM) a 4 °C. A solução de “refolding” foi filtrada e submetida diretamente à cromatografia de afinidade em resina “Chelating-Sepharose” com Ni⁺² imobilizado. O processo foi realizado com auxílio do aparelho Äkta Prime (Amersham Pharmacia, atual GE), usou coluna HisTrap HP 5 mL (Amersham Pharmacia), tampão de equilíbrio (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM), tampão de eluição (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM) e fluxo à coluna de 2,5 mL/min. As frações da eluição da cromatografia foram submetidas ao gel de SDS-PAGE e as frações que continham a proteína foram reunidas e dialisadas em uma membrana de diálise (Snake skin PIERCE) de “cutoff” 3 kDa em meio contendo Tris 20 mM e NaCl 150 mM por 12 h.

3.9.2 Purificação da proteína rSmVal7 e rAneII-III denaturadas

Os corpúsculos de inclusão contendo as proteínas recombinantes foram lavados primeiramente com 10 mL de uma solução (Tris 50 mM p.H.8.0, NaCl 300 mM, Triton 2%, uréia 1 M), centrifugados (10.000 rpm, 30 min, 4 °C), em seguida, lavados duas vezes com 10 mL de uma solução (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, Triton 2%, uréia 2 M) e finalmente, lavados com 10 mL de uma solução (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, Triton 2%, uréia 8 M) para a proteína rAneII-II e uma solução (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, Triton 2%, guanidina 6 M) para a proteína rSmVal7 e deixados durante a noite sob um agitador de placas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram centrifugados 10.000 rpm, 30 min, 4 °C e submetidos diretamente à cromatografia de afinidade em resina “Chelating-Sepharose” com Ni⁺² imobilizado. O processo foi realizado com auxílio do aparelho Äkta Prime (Amersham

Pharmacia, atual GE), usou coluna HisTrap HP 5 mL (Amersham Pharmacia), tampão de equilíbrio (rAneII-III => Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM e uréia 8 M; rSmVal7 => Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM e guanidina 6 M; tampão de eluição (rAneII-III => Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM e uréia 8 M; rSmVal7 => Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM e guanidina 6 M; e fluxo à coluna de 2,5 mL/min.

Após a cromatografia, as frações da eluição correspondentes ao pico de absorbância foram analisadas em gel de SDS-PAGE e as que apresentaram a banda da proteína recombinante expressa foram reunidas. Essa amostra combinada foi renovelada em uma membrana de diálise (SnakeSkin PIERCE) de “cutoff” 3 kDa por diluição na proporção 20 mL de amostra para 2 L de tampão. Para a proteína SmVal7, o tampão inicial era Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, DTT 2,5 mM, Glicerol 3% e 5 M guanidina e a cada 12h o tampão foi substituído, diminuindo em 1 M guanidina a concentração do tampão até diluir completamente a guanidina para a obtenção da proteína renaturada. Para a proteína rAneII-III, seguiu-se o mesmo procedimento, começando com o tampão Tris 20mM pH 8.8, NaCl 150 mM, Glicerol 5% e uréia 6 M.

3.9.3 Purificação da proteína rLy6.5 do sobrenadante do cultivo de *P. pastoris*

O sobrenadante do cultivo do clone de *P. pastoris* expressando a proteína recombinante rLy6.5 foi centrifugado 5.000 rpm, 2 min, a 4 °C, filtrado em membranas de 0,45 µm e submetido diretamente à cromatografia de afinidade em resina “Chelating-Sepharose” com Ni⁺² imobilizado. O processo foi realizado com auxílio do aparelho Äkta Prime (Amersham Pharmacia, atual GE), usou coluna HisTrap HP 5 mL (Amersham Pharmacia); tampão de equilíbrio (tampão fosfato de sódio 20 mM p.H. 8.0, NaCl 300 mM e Imidazol 10mM); tampão de eluição (Tampão fosfato de sódio 20 mM p.H. 8.0, NaCl 300 mM e Imidazol 500mM); e fluxo à coluna de 2,5 mL/min.

As frações da eluição da cromatografia foram submetidas ao gel de SDS-PAGE e as frações que continham a proteína foram reunidas e dialisadas em uma membrana de diálise (Snake skin PIERCE) de “cutoff” 3 kDa em meio contendo Tampão fosfato de sódio 20 mM p.H. 8.0 e NaCl 150 mM por 12 h.

3.10 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS/ELISA

Ratas Wistar com seis semanas de idade foram utilizadas para produção de anticorpos policlonais. Foram realizadas quatro imunizações por animal em intervalos de 15 dias,

subcutaneamente, contendo 100 µg de proteína mais o adjuvante. Os adjuvantes utilizados para algumas ratas foram Titermax (CytRx Corporation) na primeira imunização e apenas proteína nas outras; também foi utilizado Adjuvante Completo de Freund na primeira imunização e Adjuvante Incompleto de Freund nas outras três imunizações; e para algumas ratas foi utilizado Al(OH)₃ nas quatro imunizações.

Depois das imunizações, o sangue foi coletado por punção cardíaca e acondicionado a 4 °C por 16 h para formar um coágulo, o qual foi descartado. Este foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min para separar o soro.

Para titular a quantidade de anticorpos específicos contra as proteínas, foram realizados ensaios de ELISA. Utilizando a mesma proteína das imunizações, placas de fundo chato foram revestidas com 0,1 µg/poço de proteína recombinante em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9.6) por 16 h a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (PBS, Tween 0,05%) e bloqueadas com 200 µL de uma solução 1% de leite em pó em PBS-T, por 1 h a 37 °C. Depois de serem novamente lavadas com PBS-T, 100 µL de uma diluição seriada do soro dos animais imunizados ou controles foram adicionados em cada poço, sendo a diluição inicial 1:20. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 h e depois lavadas três vezes com PBS-T. A seguir, 100 µL de anticorpos contra IgG de rato conjugado com peroxidase foram adicionados em uma diluição 1:5000 e incubados por 1 h a 37 °C. As placas foram então lavadas três vezes com PBS-T, após as lavagens, 100 µL do tampão citrato (pH 5.0), contendo o substrato OPD (0,5 mg/mL) e 5 µL de peróxido de hidrogênio (a cada 10 mL) foi adicionado em cada poço. Após aproximadamente 15 min, a reação colorimétrica com OPD foi encerrada, utilizando uma solução de H₂SO₄ 4 N, e a placa foi lida a 492 nm em um leitor de ELISA (Labsystem).

3.11 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS

Ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos e vermes adultos foram ressuspensos em 1 mL de Tris 40 mM acrescido de inibidor de proteases 5X (PIC-Sigma), SDS 2% e congelados a -20 °C até o uso. Essas frações foram sonicadas (5 vezes durante 2 min, a 40 Hz e com pulsos de 0,75 s), sendo resfriadas em gelo para evitar a degradação das proteínas. As soluções foram centrifugadas a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C, sendo os sobrenadantes coletados e denominados extratos protéicos totais enquanto os precipitados foram descartados. Os extratos denominados tegumento e vermes desnudos são as duas frações obtidas quando o verme adulto é descongelado, adicionado em meio RPMI e sonificado para o desprendimento

do tegumento do parasita. Deixa os vermes decantarem e o sobrenadante é retirado e nomeado de extrato total de tegumento. O precipitado é lavado duas vezes em meio RPMI e depois sonificado conforme o protocolo descrito acima. Depois de centrifugado, o sobrenadante é nomeado de extrato total de vermes desnudos. O tegumento também é separado em frações de membrana (precipitado) e do sincício (sobrenadante) centrifugando-o a 100 g por 30 min a 4 °C. Para quantificar as proteínas de cada extrato, utilizou-se o kit “DC Protein Assay” (BioRad), baseado no método de Lowry, seguindo o protocolo do fabricante.

3.12 WESTERN BLOTTING

Foram aplicados 20 µg de cada extrato protéico total fervidos por 5 min com 5 µL de tampão de eletroforese (5X), contendo SDS 4%, glicerol 10%, Tris-HCl 0,1 M (pH 6.8) e 50 mg/mL de azul de bromofenol em um gel de SDS-PAGE 12% ou 15%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham). Para verificar o sucesso da transferência, a membrana foi corada com Ponceau. Após descorar a membrana com diversas lavagens com PBS, ela foi incubada em solução de leite em pó 5%, Tris 50 mM (pH 7,5), Tween 20 0,05% para bloqueio, por 16 h a 4 °C. No dia seguinte, incubou-se a membrana em solução de leite desnatado 5%, Tris 50 mM (pH 7,5), Tween 20 0,05%, NaCl 150 mM (solução de incubação) com o anticorpo específico contra a proteína a ser analisada em diluição de acordo com o título do soro para cada proteína (especificado nos resultados), por 4 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, a membrana foi incubada em solução de incubação com anticorpos anti-IgG de rato conjugado com peroxidase, diluído geralmente na proporção 1:5.000 por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, a detecção da proteína foi realizada, utilizando o kit quimioluminescente ECL (Amersham) em filmes de radiograma.

3.13 IMUNOLocalização

Vermes adultos recém perfundidos em meio RPMI ou ovos recém purificados de fígados foram emblocados em líquido de inclusão O.C.T. (Tissue-Tek Sakura), com o auxílio de tubos plásticos (3 mm de diâmetro e 7 mm de comprimento), e congelamento em isopentano arrefecido em nitrogênio líquido. Os blocos foram armazenados a – 80 °C até o momento de fazer as secções. Os cortes histológicos (7 µm) foram realizados em um criostato Leica CM1900 e as secções foram aderidas em lâminas silanizadas e fixadas com acetona a - 20 °C por 30 min. As secções foram bloqueadas com PBS, Tween 20 0,1% e o agente

bloqueador, soro de coelho 10%, por 16 h a 4 °C. Posteriormente, as secções foram incubadas em solução de bloqueio com anticorpos específicos contra a proteína a ser analisada em diferentes diluições (1:40 – 1:100), por 4 h à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,1% (tampão de lavagem), as secções foram incubadas em solução de bloqueio com anticorpos anti-IgG de rato conjugados com o fluorescente Alexa-fluor 488 geralmente na diluição 1:200, por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, as lâminas foram montadas utilizando uma solução “antifading” (Dako) e analisadas em microscópio confocal LSM-510 META (Zeiss). Soros de ratos pré-ímmunes foram utilizados como controle.

Para os animais ínteiros, como miracídios, cercárias e esquistossômulos *in vitro* de 3 h, 7 e 21 dias, primeiramente, os parasitas vivos foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 h a 4 °C; em seguida, foram lavados em PBS por três vezes e mantidos a 4 °C até serem utilizados. A marcação seguiu o mesmo protocolo descrito acima com exceção da forma de manipulação. Os parasitas mantiveram-se em eppendorfs durante todo o processo e foram incubados com os anticorpos em um volume de 300 µL e com o tampão de lavagem em 1 mL. No microscópio, um pequeno volume foi analisado sob lâminulas.

Para o ensaio de imunolocalização *in vivo*, esquistossômulos de 7 dias vivos foram incubados com anticorpos anti-AneI-II, anti-Ly6.5, anti-TSP2 ou soro pré-ímmune na proporção 1:100 por 4 h em meio M-169. Após, o período foram lavados 5 vezes com o mesmo meio e deixados em cultivo. Após o período desejado (4, 24, 48 ou 72 h) foi adicionado anticorpo secundário (anti-IgG de rato ou camundongo conjugado com o fluorescente Alexa-fluor 488) por 1 h. Eles foram lavados e fixados em paraformaldeído 4% como anteriormente descrito para posterior análise no microscópio confocal, fixando o mesmo ganho de fluorescência para todos a fim de compará-los.

3.14 ENSAIO DE DEGLICOSILAÇÃO

As proteínas rLy6.1 e rLy6.5 expressas em *P. pastoris* ou o extrato total de vermes adultos foram tratadas com a enzima PNGase F, que cliva as N-glicosilações segundo o protocolo previamente descrito por Plummer e Tarentino (1991). Dessa forma, 20 µg de cada proteína ou os extratos foram incubados com 1 µL de tampão de denaturação 10X (New England Bio labs) a 100 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 2 µL do tampão de reação G7 10X, 2 µL de NP40 10% e 2 µL de enzima PNGaseF nos grupos tratados, e estes

incubados por 6 h a 37 °C. Nos controles, não foi adicionada a enzima. Todas as amostras foram submetidas a Western blotting.

3.15 COLORAÇÃO DE SCHIFF PARA GLICOPROTEÍNAS

Gel de poliacrilamida contendo as proteínas rLy6.1, rLy6.5 purificadas de *E.coli* e *P. pastoris*, BSA (controle negativo) e rSmVal4 (controle positivo) foi submetido à coloração de Schiff. Inicialmente, o gel foi fixado em tampão etanol 40% e ácido acético 7% por 16 h. No dia seguinte, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 min cada com tampão de lavagem (ácido acético 3%) e posteriormente, incubado em solução de oxidação (ácido periódico 1% e ácido acético 3%) a 37 °C por 30 min. Após dez lavagens de 10 min cada em água, foi adicionado o reagente de Schiff no escuro por 30 min. Posteriormente, o corante de Comassie foi adicionado ao gel para certificar a presença das bandas de proteína.

3.16 MORTE MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO DOS ESQUISTOSSÔMULOS *IN VITRO*

Duzentos esquistossômulos *in vitro* de 3 h foram adicionados a cada poço em meio ELAC e incubados com 100 uL de soro anti-Ly6.5 inativado pelo calor nos poços, 100 uL de soro de rato com infecção crônica ou 100 uL de soro pré-imune à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foram adicionados 200 uL de soro humano normal em cada poço e estes incubados à noite inteira na estufa de CO₂ a 37 °C. Como controle, foi usado soro humano inativado a 56 °C e foram realizadas triplicatas em cada grupo. A mortalidade dos parasitas foi analisada no microscópio, baseada na falta de motilidade e aparência granular e opaca do parasita. A porcentagem de mortalidade foi calculada a partir da fórmula abaixo e foi usado ANOVA e test T de Student como testes estatísticos.

$$\text{Porcentagem de mortalidade} = [(E-C) \times 1000] / (100 - C)$$

onde C representa a porcentagem de esquistossômulos mortos nas culturas controle e E, nas culturas experimentais.

3.17 ENSAIO HEMOLÍTICO

Para avaliar o efeito inibitório das proteínas rLy6.1, rLy6.5 de *E. coli* e *P. pastoris* na atividade da Via Alternativa do Sistema Complemento, 3,0 mL de suspensão de hemácias de

coelho foram lavados 3 vezes em 10,0 mL de AP-CFTD (NaCl 144 mM, sódio barbital 0,96 mM, ácido barbitúrico 2,48 mM, MgCl₂ 1,4 mM, EGTA 10 mM), ressuspendido em 2,0 mL e diluído 100 vezes no mesmo tampão. Para avaliar a atividade da via alternativa, 100 µL das hemácias diluídas foram adicionados a diferentes diluições de SHN (soro humano normal) (1:4 a 1:256). Seguiu-se uma incubação a 37 °C por 30 min, sendo a reação interrompida com 900 µL de VBS-EDTA (NaCl 144 mM, sódio barbital 0,96 mM, ácido barbitúrico 2,48 mM, EDTA 20 mM). Após centrifugação a 8.000 g por 10 min a 4 °C foram coletados 350 µL de cada tubo em duplicata. Para obtenção do ponto de 100% de lise foram adicionados 900 µL de água ao tubo de diluição 1:256, após remoção prévia do sobrenadante. A leitura das absorbâncias foi efetuada a 405 nm. Uma vez avaliada a atividade da via alternativa do SHN, foi determinado o volume de SHN correspondente a 50% de lise das hemácias. Este volume de SHN foi utilizado no ensaio de inibição descrito a seguir.

As hemácias foram lavadas e diluídas ($3,5 \times 10^6$ eritrócitos), incubadas com SHN como fonte de complemento na presença de diferentes quantidades das proteínas (0, 2, 5 e 10 µg, pré-incubados com SHN por 15 min a 37 °C), por 30 min a 37 °C em tampão AP-CFTD. A reação foi interrompida com 900 µL de VBS-EDTA, e após centrifugação a 8.000 g por 10 min a 4 °C foram coletados 350 µL de cada tubo em duplicata. A leitura das absorbâncias foi efetuada a 405 nm. A porcentagem de lise foi calculada em relação às hemácias completamente lisadas pela água.

3.18. ENSAIO DE INIBIÇÃO DE PENETRAÇÃO DAS CERCÁRIAS PELA PELE

O ensaio de inibição de penetração foi adaptado de Gould et al. (2005). Resumidamente, 110 cercárias (em 100 µL) foram incubadas com 50 µL de soro inativado de camundongos imunizados com a proteína rLy6.5, ou 50 µL de soro inativado de rato pré-imune. Após 1 h de incubação a 37 °C, as cercárias juntamente com o anti-soro foram aplicadas em 850 µL de água declorada para penetração pelo método do anel em camundongos anestesiados que tiveram seus abdomens previamente depilados. As cercárias foram deixadas penetrar durante 30 min à temperatura ambiente, após este período as larvas que não penetraram foram removidas da superfície dos animais e contadas. Após 45 dias, os animais foram perfundidos pelo sistema porta hepático e contados (Figura 7).

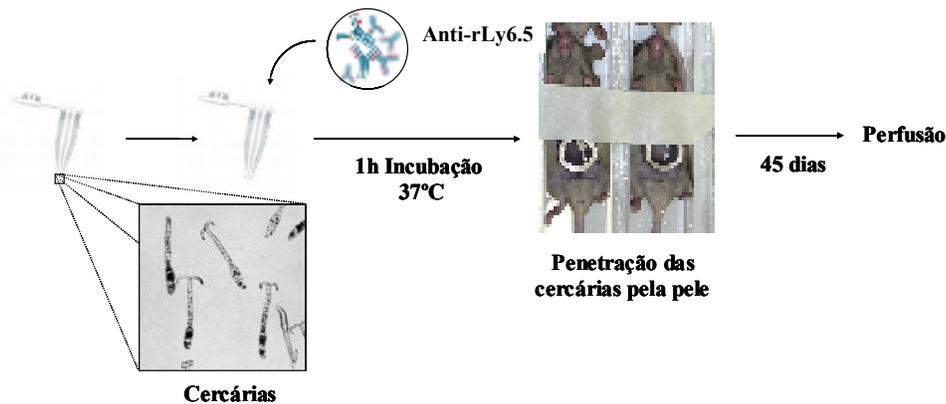


Figura 7. Representação do ensaio de inibição de penetração pela pele.

A análise da porcentagem de inibição de penetração das cercárias pela pele e a porcentagem de cercárias penetradas que conseguiram se desenvolver a vermes adultos foi calculada através das fórmulas:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{\text{Número de cercárias que não penetraram}}{\text{Número de cercárias total utilizadas}} \times 100$$

$$\text{Porcentagem de desenvolvimento (\%)} = \frac{\text{Número de vermes que se desenvolveram (tratado)}}{\text{Número de vermes que se desenvolveram (controle)}} \times 100$$

Para determinar se houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos foi realizado o teste T de Student.

3.19 ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* (WHOLE MOUNTING *IN SITU* HIBRIDIZATION – WISH)

Os experimentos de hibridização *in situ* foram realizados conforme descrito por Dillon et al., (2007). Inicialmente, os parasitas foram incubados em fixador de Carnoy no gelo por 2 h, lavados em etanol 100% e posteriormente, incubados por 1 h em MEMFA (MOPS 0,1 M, EGTA 2 mM pH 7.4, MgSO₄ 1 mM, formaldeído 3,7%). Em seguida, foram novamente lavados em etanol 100% por 5 min e armazenados a -20 °C. Foram produzidas sondas marcadas com digoxigenina (DIG) para o gene SmVal7 e como controle negativo foi usado sonda “sense” contra o gene Chorion (KOSTER et al., 1988). A sequência do gene SmVal7 foi clonada no vetor pGEM-T easy (Promega), utilizando oligonucleotídeos específicos e usada como DNA molde para a síntese da sonda marcada com DIG. A reação de marcação foi

feita contendo 10 μL de tampão de transcrição 5X; 2,5 μL de mix de marcação de RNA-DIG 10X (Roche); 5 μL de DTT 100 mM; 2 μL de inibidor de RNase (50 U); 3 μL de SP6/T7/T3 polimerase (50 U/ μL); 2,5 μg de DNA e 21,5 μL de água livre de RNase, para um volume total de reação de 50 μL . A reação foi incubada a 37 °C por 2 h, adicionado 1 μL de polimerase e novamente, incubação por 2 h. Em seguida, 1 μL de DNase livre de atividade de RNase (Promega) foi adicionada e incubada por 20 min a 37°C. A sonda foi precipitada pela adição de 50 μL de água e 50 μL de LiCl 7,5 M e EDTA 50 mM, incubando por 16 h a -20°C. Em seguida, as sondas foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 15 min, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com etanol 70%. O precipitado foi lavado mais uma vez por 5 min e seco ao ar antes de ser ressuspenso em 50 μL de água livre de RNase e armazenado a -80°C. Para as hibridizações *in situ*, os parasitas foram aquecidos a 22-24 °C e reidratados por 5 min em etanol 75% e PBSAT (PBS pH 7,4 e 25% contendo Tween 20 0,1%) e na segunda lavagem em etanol 50% e PBSAT. Os parasitas foram transferidos para PBSAT 100% e lavados 3 vezes de 5 min cada, sendo parcialmente digeridos à temperatura ambiente com Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Roche) nas lavagens em PBSAT. A digestão foi parada com 2 lavagens de 5 min em solução aquosa de trietanolamina. Em seguida, os parasitas foram lavados por 5 min em solução de trietanolamina adicionada de 12,5 mL de anidrido acético. Em seguida, mais 2 lavagens em PBSAT, re-fixação dos parasitas em 4% formaldeído-PBSAT por 20 min, seguida de 5 lavagens em PBSAT. Os parasitas permeabilizados foram depois incubados a 60 °C por 2 h em tampão de hibridização (formamida 50%, SSC 5X, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina, solução de Denhardt 1X, Tween 20 0,1%, CHAPS 0,1% e EDTA 5 mM) com 1 mg/mL de RNA total de levedura para bloquear hibridizações não específicas. Após 2 h a solução foi substituída por tampão de hibridização de RNA (pré-aquecido e recém preparado) contendo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da sonda sintetizada marcada com DIG. A hibridização foi realizada a 60 °C durante a noite. No outro dia, os parasitas foram lavados na seguinte ordem: tampão de hibridização a 60 °C, 2 lavagens de 10 min em SSC 2X e Tween 20 0,1% a 60 °C, 3 lavagens de 20 min em SSC 0,2X e 0,1% Tween a 60 °C e finalmente, 2 lavagens de 15 min em tampão de ácido maléico MAB (ácido maléico 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,1%, pH 7,8) à temperatura ambiente. O bloqueio foi realizado antes da adição do anticorpo anti-DIG em solução de bloqueio (MAB+2% de Reagente de Bloqueio (Roche) + 20% de soro de carneiro tratado com calor) por 2 h à temperatura ambiente. As sondas hibridizadas foram detectadas utilizando o anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (Roche). Esse anticorpo foi diluído 1/2000 em solução de bloqueio e incubado a 4 °C durante a noite. O excesso de anticorpo foi depois removido por lavagens

extensivas com MAB à temperatura ambiente (3 vezes de 5 min, seguida por 3 vezes de 1 h), e uma lavagem final com 1 mM de levamisole (Sigma) em tampão de fosfatase alcalina (Tris 100 mM, MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0.1%, pH 9.5). As sondas hibridizadas foram detectadas pela adição do substrato BM Purple (Roche), utilizado com 1 mM de levamisole de acordo com as recomendações do fabricante; a atividade da fosfatase alcalina resulta na deposição de um precipitado azul insolúvel. A revelação foi acompanhada visualmente levando de 30 min até alguns dias, dependendo da abundância do transcrito. A revelação foi interrompida pela lavagem dos parasitas 2 vezes em PBSAT por 15 min, seguida de re-fixação e armazenagem em tampão formalina 10%. As imagens foram capturadas com uma câmera 18.2 Color Mosaic (Diagnostic Instruments Inc.).

3.20 ENSAIO DE RNAi

Essa técnica foi realizada nos Estados Unidos, no laboratório do professor Patrick Skelly e todos os itens descritos abaixo se referem a metodologias de rotina realizadas lá.

3.20.1 Parasitas

O ciclo de *Schistosoma mansoni*, linhagem Porto Rico, foi mantido no laboratório do pesquisador Dr. Patrick J. Skelly, Massachusetts, EUA, utilizando caramujos *Biomphalaria glabrata* que eram fornecidos infectados pelo Dr. Fred Lewis, do Instituto de Pesquisa Biomédica, Maryland, EUA. Cercárias foram obtidas dos caramujos infectados pela exposição à luz e filtradas em malhas de 20 micron. Em seguida, foram lavadas com solução de penicilina/estreptomicina 2X, coletadas em 10 mL de solução, mantidas no gelo por 30 min, centrifugadas e ressuspensas em 3 mL de meio RPMI a 37 °C para o choque térmico e posterior vortexagem por 90 s. Os corpos dos parasitas foram separados das caudas por centrifugação em um gradiente de 35% de Percoll em água/penicilina/estreptomicina a 1100 g por 30 min. Em seguida, foram lavados com solução de penicilina/estreptomicina 2X, centrifugados e mantidos em cultura em meio M-169, como descrito em Lazdins et al. (1982).

Os vermes adultos foram obtidos por perfusão da veia porta, do fígado e das veias mesentéricas de camundongos infectados com *S. mansoni*, lavados com solução penicilina/estreptomicina 2X e mantidos em cultura em meio M-169.

3.20.2 Preparação do siRNA

Dois siRNA (small interference RNAs), um para o gene Anexina; e outro, designado irrelevante, para a seqüência codificando a proteína 4 transportadora de açúcar (SGTP4) de *S. mansoni* (Número de acesso no GeneBank: L25067) foram sintetizados comercialmente pela Integrated DNA Technologies (IDT, Coraville, IA) com a ajuda da ferramenta on-line de desenhar RNAi da IDT.

3.20.3 Eletroporação

Para a entrega dos siRNAs, esquistossômulos de 1 dia (aproximadamente 1000 por grupo) em 100 µL de tampão de eletroporação (Ambion) contendo 5 µg de siRNA foram eletroporados em uma cubeta de 4 mm, aplicando “square wave” com um pulso único de 20 ms, a 125 V e temperatura ambiente. Após a eletroporação, os parasitas foram transferidos para placas contendo 500 µL de meio M-169. Após 24h, o meio foi substituído por 1 mL de meio M-169 fresco e mantidos em cultura por 7, 15, 21 ou 30 dias, trocando o meio a cada dois dias.

3.20.4 Análise da expressão gênica

Para monitorar a expressão do gene Anexina durante os diferentes tempos de tratamento com siRNA, RNAs totais dos esquistossômulos foram extraídos usando Trizol (Invitrogen) ou o kit PARIS (Protein and RNA Isolation System – Ambion) quando RNA total e extrato protéico eram necessários a partir de uma mesma amostra. Após a extração, DNA residual foi removido pela digestão com a DNase do Kit TurboDNase (Ambion); e cDNA foi sintetizado usando 1 µg de RNA total, iniciadores oligo dT e a enzima transcriptase reversa Superscript (Invitrogen). RT-PCR em tempo real foi realizada usando sondas TaqMan marcadas com fluoresceína (FAM) e iniciadores específicos obtidos da Applied Biosystems. As reações foram realizadas em triplicata por 40 ciclos no aparelho StepOnePlus™ System (Applied Biosystems). Para quantificação relativa, o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi empregado, comparando com o controle endógeno, tubulina.

3.20.5 Quantificação dos extratos protéicos

Esquistossômulos foram lisados em 30 µL de tampão de ruptura celular (Kit PARIS, Ambion) e mantidos em gelo por 30 min. Em seguida, foram feitas curvas padrões

usando albumina e a concentração dos extratos foi estimada usando o kit BCA Protein Assay (Pierce) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.20.6 Viabilidade

Para cada poço contendo 1 mL de meio de cultura foram adicionados 0,4 µL de corante Hoetch que marca células mortas. Em seguida, a placa foi agitada manualmente e após 15 min foi visualizada no microscópio de fluorescência sob luz UV e contados os parasitas vivos e mortos. Teste T de Student foi usado para avaliar diferenças estatísticas.

3.20.7 Medidas do parasita

Os parasitas tratados foram fotografados usando um microscópio Leica DMIRB e câmera DC500 (Leica, Wetzlar, Germany) e, posteriormente, as áreas de parasitas individuais foram medidas usando o software Image J versão 1.41. Teste T de Student foi usado para avaliar diferença estatística.

3.20.8 Imunomicroscopia eletrônica

Esquistossômulos tratados ou não com siRNA foram retirados do meio de cultura, lavados com PBS 1X e fixados em solução de aldeído glutárico 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 durante a noite inteira, girando em rotor de eppendorfs à temperatura ambiente. No outro dia, os parasitas foram lavados em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 3 vezes durante 15 min cada lavagem e armazenados para serem trazidos ao Brasil. Aqui, eles foram fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato 0,1M girando durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados 3 vezes durante 15 min cada em tampão cacodilato 0,1M. Posteriormente, foram fixados em solução de acetato de uranila 0,5% com sacarose 13,3% durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, eles foram lavados em cacodilato de sódio 0,1M por 15 min. Em seguinte, foram desidratados em álcool etílico 70% (2 lavagens de 10 min); álcool etílico 95% (2 lavagens de 15 min); álcool etílico absoluto (3 lavagens de 20 min); óxido de propileno e álcool etílico absoluto na proporção 1:1 (1 lavagem de 15 min); óxido de propileno (2 lavagens de 10 min) e por último, os parasitas foram incubados em óxido de propileno e resina durante a noite a temperatura ambiente. No dia seguinte, eles foram embebidos em resina pura por 4 h e secados em estufa a 60 °C durante 3 dias. Após esse tempo, os blocos foram cortados e fixados em redinhas de ouro para serem analisadas no microscópio eletrônico (Instituto Butantan).

3.21 DICROÍSMO CIRCULAR

As medidas de dicroísmo circular das proteínas rAneI-II e rAneII-III foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-810 a 20 °C equipado com uma unidade Peltier para controle da temperatura. Espectros de dicroísmo circular foram adquiridos usando uma cubeta de 1 mm de comprimento por onde a luz passa entre os comprimentos de onda 190-260 nm. Cinco varreduras foram obtidas de cada amostra e subtraídas do espectro médio branco (somente o tampão onde a proteína foi ressuspensa). Foram usados 50 µL de proteína rAneI-II (5 µg/µL) e rAneII-III (3µg/µL) em tampão Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.8 e o resultado foi apresentado em gráfico da elipticidade vs comprimento de onda.

3.22 INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Aproximadamente 40 mL de sangue humano foi coletado de diferentes doadores saudáveis em solução de 3,8% do anticoagulante citrato de sódio. O sangue foi centrifugado a 125 g por 20 min a 25 °C para recuperar o plasma rico em plaquetas (PRP). Um mL desse plasma foi centrifugado novamente para conseguir o plasma pobre em plaquetas (PPP) e ser o branco do ensaio no agregômetro. O tampão da proteína foi usado como controle e o ADP (10 µM) (Sigma) foi usado como iniciador da agregação plaquetária. O ensaio seguiu-se da adição de 500 µL de PPP na cubeta do agregômetro (Chrono-log) para que absorvância de outras substâncias do plasma com exceção das plaquetas fosse subtraída quando comparada com o PRP. Em seguida, 400 µL de PRP e 90 µL de tampão onde a proteína foi ressuspensa foram adicionados a outra cubeta, e logo após 3 min, 10 µL de ADP foi adicionado para iniciar a reação de agregação plaquetária. Dessa forma, em uma cubeta paralela, 400 µL de PRP e 90 µL do tampão contendo as proteínas rAneI-II e rAneII-III foram adicionados, assim como o ADP após 3 min. Durante o ensaio, a transmissão de luz foi monitorada através do agregômetro, calibrado para 100% da transmitância com PPP e para 0% de transmitância com PRP.

3.23 IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES E DESAFIO

As proteínas recombinantes foram formuladas com Adjuvante Completo de Freund (Sigma) e administradas subcutaneamente na primeira dose e com Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma) nas outras duas imunizações com intervalo de 15 dias, segundo o cronograma da Figura 8. Foram utilizados 25 µg de proteína para cada camundongo em 100 µL de

formulação (sendo 1:1 de volume de proteína para volume de adjuvante). No controle foram administrados 100 µL de adjuvante e salina, na proporção 1:1 de volume. Os animais usados nos experimentos foram camundongos fêmeas C57BL/6 de cinco a seis semanas, em número de 10 por grupo. Quinze dias após o último reforço, os animais foram desafiados com 110 cercárias através de penetração pela pele durante 30 min com a ajuda de anéis de metal presos com fita adesiva na barriga dos animais. Quarenta e cinco dias após a infecção, os animais foram anestesiados com uretano (150 mg/mL) e perfundidos com salina contendo heparina. Os vermes adultos foram removidos das veias do mesentério por perfusão através do sistema porta hepático. A contagem dos vermes foi feita com o auxílio de uma lupa. A porcentagem de redução do número de vermes em animais imunizados versus o controle foi calculada pela fórmula:

$$\text{Proteção (\%)} = \frac{\text{Vermes recuperados do grupo controle} - \text{Vermes recuperados do grupo tratado}}{\text{Vermes recuperados do grupo controle}} \times 100$$

Outra abordagem adotada para o gene Ly6.5 foi a avaliação da proteção com vacina de DNA. Para isso, o gene foi inserido no vetor pTARGET e camundongos fêmeas C57BL/6 com 5-6 semanas de idade, receberam 50 µL em cada músculo tibial anterior, de uma solução 10 µM de cardiotoxina (Latoxan). Decorridos cinco dias da injeção de cardiotoxina, o DNA plasmidial (50 µg) foi injetado intramuscularmente com uma seringa de 1 mL e agulha com calibre de 29 g. O volume total injetado foi de 100 µL, com 50 µL sendo injetado em cada músculo tibial anterior. Os animais receberam um reforço 21 dias após a primeira dose; 20 dias depois foram infectados e 45 dias depois foram perfundidos.

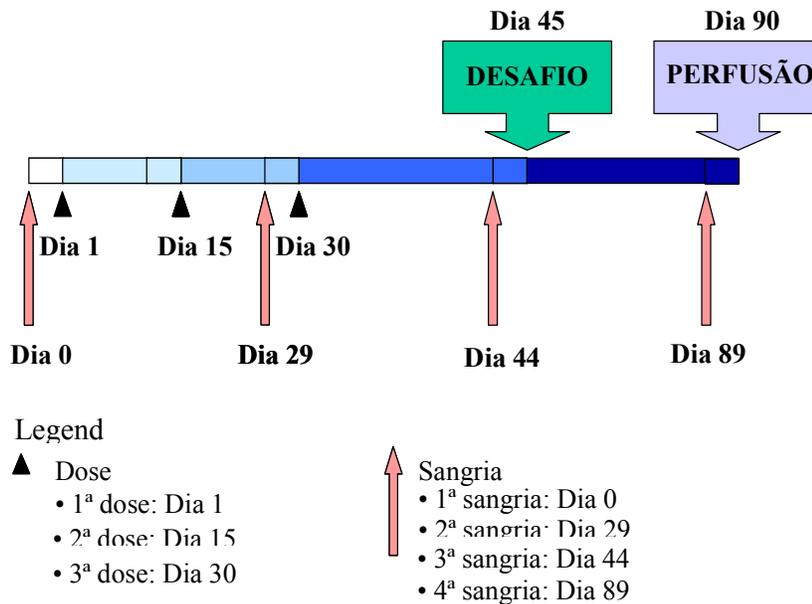


Figura 8. Delineamento experimental do ensaio de imunização com proteína recombinante e desafio com cercária de *S. mansoni*

Os dados do número de vermes recuperados pela perfusão foram analisados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância, e comparados através do teste T de Student.

3.23.1 Resposta Imune Humoral

Um dia antes da administração da 1ª e 3ª dose, do desafio e da perfusão foram realizadas sangrias por via retro-orbital para obtenção do soro individualizado dos animais imunizados. Os soros dos animais do mesmo grupo foram reunidos em “pool” e usados no ensaio de ELISA para verificar a concentração de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos para cada proteína. Placas de 96 poços foram incubadas com 0,1 µg/poço de proteína recombinante e com a curva de concentração para IgG, IgG1 ou IgG2a recombinantes em tampão carbonato - bicarbonato 0,05 M (pH 9.6), durante 16 h a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20, e em seguida, bloqueadas com 100 µL de uma solução de SFB 10% (Soro fetal bovino) em PBS, por 1 h a 37 °C. Depois de lavadas com PBS Tween 20 0,05%, 100 µL de uma diluição seriada do soro dos animais imunizados ou controles em tampão PBS contendo SFB 5% foram adicionados em cada poço, sendo a diluição inicial 1:20. Na curva de concentração, foi adicionado apenas tampão PBS contendo SFB 5%. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 h e depois lavadas. A seguir, 100 µL de anticorpos monoclonais anti-IgG, anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Sigma) na diluição 1:10.000, 1:2.000 e 1:1.000 respectivamente foram adicionados a todos os poços das placas. Depois de lavadas,

100 μ L de anticorpos conjugado com peroxidase foram adicionados às placas. As placas foram então lavadas seis vezes com PBS Tween 20 0,05% e em seguida, 100 μ L do tampão citrato (pH 5.0) contendo o substrato OPD (0,5mg/ml) e 5 μ L de peróxido de hidrogênio (a cada 10 mL) foram adicionados em cada poço. Após aproximadamente 15 min, a reação colorimétrica com OPD foi encerrada, utilizando uma solução de H₂SO₄ 4 N, e a placa foi lida a 492 nm em um leitor de ELISA (Labsystem).

3.23.2 Resposta Imune Celular

No dia da perfusão dos animais que foram imunizados e desafiados, quatro baços dos animais do grupo tratado e controle foram removidos. As células foram maceradas com o auxílio de uma peneira e suspensas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com SFB 10%, L-glutamina 2 mM (Merck, Darmstad, Germany), 50 μ g/mL de sulfato de gentamicina (Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil), polimixina B 10 μ g/mL e tampão HEPES 10 mM (Sigma).

Para os ensaios de ELISPOT, as placas com membranas de nitrocelulose (BD) foram incubadas com anticorpos de captura contra as citocinas de interesse (IFN- γ , IL-4 ou IL-5) por 16 h a 4 °C. No outro dia, os sítios não ocupados pelos anticorpos foram bloqueados com meio RPMI contendo SFB 10%. Após o bloqueio, os linfócitos (2 ou 5×10^5 células/poço) foram adicionados à placa e estimulados com meio contendo 10 μ g/mL da proteína recombinante. As células T estimuladas sobre as membranas foram incubadas por 20 h, secretando as citocinas que se ligam aos anticorpos de captura. Posteriormente, as células foram lisadas com 200 μ L de água por duas vezes e em seguida, lavadas três vezes com PBS 0,05% Tween 20. Posteriormente, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção biotilado anti-IFN- γ , anti-IL-4 ou anti-IL-5, na proporção 1:250, por 2 h à temperatura ambiente. Depois das placas serem lavadas com tampão de lavagem, foi adicionado estreptoavidina conjugada com HRP, na proporção 1:100 por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e em seguida, duas vezes com PBS somente. Finalmente, 100 μ L do substrato final foi adicionado para revelação. Depois de um período de incubação variável (5-40 min), a reação foi interrompida com água, ficando o complexo citocinas-anticorpos pigmentado. Em seguida as manchas ou pontos foram contados no microscópio estereoscópico.

Para a determinação da concentração das citocinas no sobrenadante, as mesmas células (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em placas de cultura com 24 poços em volume total de

500 μ L. As proteínas recombinantes foram utilizadas em uma concentração de 10 μ g/mL como antígeno de estímulo e concavalina A (5 μ g/mL; Sigma) como controle positivo para reatividade celular. Células controle foram incubadas em meio completo, sem antígeno. A cultura foi incubada em estufa humidificada, 37 °C e atmosfera saturada a 5% de CO₂ e o sobrenadante foi recolhido 24 e 72 h após o estímulo com o antígeno para quantificação das citocinas liberadas no meio e estocado a – 20 °C para posterior quantificação de IL-5 por ELISA, utilizando-se o Kit para a detecção desta citocina da BD.

Para o ensaio de ELISA do sobrenadante, anticorpos monoclonais purificados anti-IL-5 de camundongo (6 μ g/mL) foram utilizados como anticorpos de captura na proporção 1:250, aplicados na placa e incubados por 16 h a 4 °C em um volume de 100 μ L de NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,2. As lavagens em cada etapa (3 a 6 vezes) foram feitas com tampão PBS-T (PBS-Tween 20 0,05%). As placas foram bloqueadas com PBS contendo SFB 10% e incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Após as lavagens das placas, o sobrenadante da cultura de linfócitos e a curva padrão da IL-5 recombinante foram adicionados e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Após três lavagens das placas, anticorpos monoclonais biotinizados anti-IL-5 de camundongo (1 μ g/mL) e streptoavidina conjugada à peroxidase, ambos na proporção 1:250 foram misturados em PBS-SFB 10% e incubados por 1 h à temperatura ambiente. Depois de sete lavagens, foi adicionado 100 μ L do tampão citrato (pH 5.0) contendo o substrato OPD (0,5mg/ml) e 5 μ L de peróxido de hidrogênio (a cada 10 mL). A reação ocorreu por 15-30 min e foi bloqueada com H₂SO₄ 4 N. A medida de absorbância a 492 nm foi feita em leitor de ELISA e a concentração das amostras foi obtida através da regressão linear da curva padrão.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS DADOS DO TRANSCRIPTOMA EM BUSCA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A busca por genes diferencialmente expressos no estágio de esquistossômulo foi realizada através da análise da frequência de ESTs que formam os “clusters” obtidos do transcriptoma do parasita. Para isso, um mesmo conjunto de oligonucleotídeos foi utilizado para gerar as bibliotecas de cDNA e fazer a comparação entre o número de transcritos em que um “cluster” era formado no estágio de cercária e esquistossômulo. Essa abordagem identificou 5052 SmAEs com frequência de transcritos aumentada no estágio de esquistossômulo em relação ao de cercária (Figura 9). Na tentativa de otimizar a escolha de genes diferencialmente expressos, foram selecionadas sequências com no mínimo 8 transcritos em esquistossômulo, gerando um grupo de 400 SmAEs.

Essas 400 sequências foram categorizadas quanto à função gênica em busca de informações interessantes que pudessem caracterizar a fase de esquistossômulo. As características funcionais mais abundantes foram: metabolismo de ácidos nucleicos (20,6%), como fatores de transcrição e enzimas nucleares; organização celular (13,5%), como as proteínas caderinas, alfa-espectrina e dineína de cadeia pesada que são proteínas estruturais de citoesqueleto; biossíntese de proteínas (7,2%), como as proteínas ribossomais; catabolismo de proteínas (6%), como catepsinas e proteínas de proteasoma; chaperonas (5%), como a HSP70, uma proteína de estresse oxidativo. Em menores porcentagens, encontram-se as proteínas ligadas a transporte, transdução de sinais e metabolismo de carboidratos. E em destaque, 20,0% das proteínas não apresentaram funções conhecidas (sem similaridade com proteínas de outros organismos).

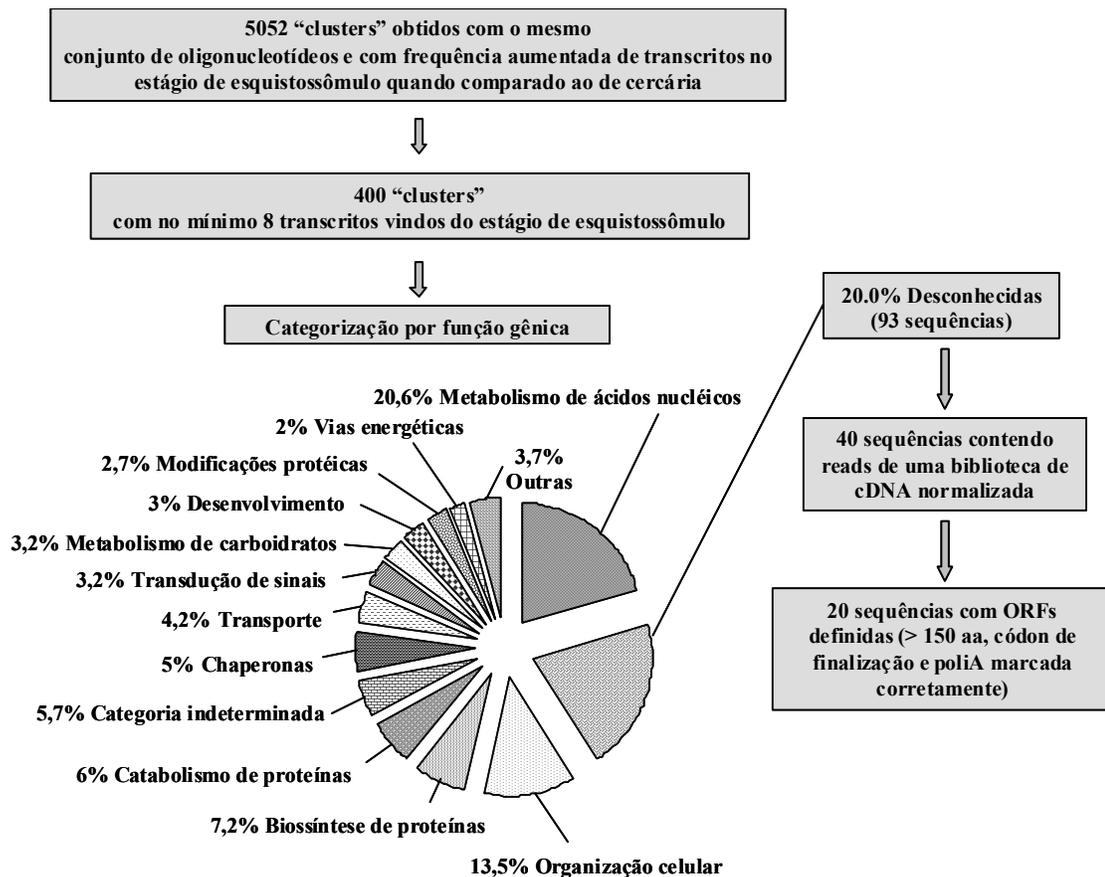


Figura 9. Análise dos dados do transcriptoma em busca de genes diferencialmente expressos no estágio de esquistossômulo. Representação esquemática do procedimento geral utilizado para identificar genes diferencialmente expressos na transição do estágio de cercária para o de esquistossômulo usando os dados do transcriptoma do *Schistosoma mansoni*.

Dentre esses 400 genes com frequência aumentada de transcritos em esquistossômulo, encontramos vários candidatos vacinais de *Schistosoma mansoni*, como a paramiosina Sm97, (PEARCE et al., 1988), Sm28 (BOULANGER et al., 1995), Sm23 (REYNOLDS; SHOEMAKER; HARN, 1992), Sm14 (TENDLER et al., 1996), TSP-1 (TRAN et al., 2006), proteína 14-3-3 (SCHECHTMAN; TARRAB-HAZDAI; ARNON, 2001), Isomerase 3-fosfato (HARN et al., 1992), GAPDH (ARGIRO et al., 2000) e aldolase bifosfato 1,6 frutose (MARQUES et al., 2008).

Essa abordagem de buscar genes diferencialmente expressos em esquistossômulo a partir dos dados do transcriptoma foi comparada com a do trabalho de Dillon et al. (2006), que analisou uma microplaca contendo 3088 sequências de cDNA de esquistossômulo; entre

os genes encontrados, 32% deles eram idênticos a alguns dos 400 “clusters” obtidos pela nossa abordagem.

Genes com funções desconhecidas foram investigados porque poderiam ser importantes pelo potencial de codificar proteínas exclusivas do parasita, as quais poderiam estar envolvidas na sua adaptação e sobrevivência. Um total de 93 sequências foi encontrado nessa categoria. Posteriormente, foram selecionados os “clusters” que continham transcritos vindos da biblioteca de cDNA normalizada para que o “cluster” apresentasse a posição correta da cauda poli-A, uma vez que muitos dos transcritos encontrados pelo método de RT-PCR de baixa estringência não apresentavam a direção correta da transcrição do mRNA. Um total de 40 SmAEs preencheu esse critério. Dessas sequências, 20 foram selecionadas por possuírem um mínimo de 150 aminoácidos e a marcação de um STOP códon no final 3’.

4.2 GENES ESCOLHIDOS

Entre as 20 sequências, nove genes foram escolhidos aleatoriamente para serem estudados como candidatos vacinais (Tabela 1). Consequentemente, eles foram novamente reanotados usando uma nova versão do GeneBank e analisados quanto à similaridade com proteínas de outros organismos e a presença de domínios protéicos, transmembranas, peptídeos sinais e sítios de clivagem para âncoras de GPI.

Tabela 1 - Genes selecionados com freqüência aumentada de transcritos entre a transição de cercária para esquistossômulo a serem investigados como candidatos vacinais.

Gene ^a	SmAE ^b	Contig no GeneDB ^c	Número de transcritos ^d		Informação adicional sobre o gene	
			CER	ESQ	Domínio ^e	Estrutura primária ^f
Dife1	C604371.1	Smp_174490	0	8	-	Transmembrana
Dife2	C60413.1	Smp_030830.2	0	15	-	-
Dife3	C605704.1	Smp_076040.3	0	16	-	-
Dife4	C606856.1	Sm01732	0	8	SPFH	-
Dife5	C611133.1	Smp_105220	0	57	LY-6	Peptídeo sinal/ Âncora GPI
Dife6	C602523.1	Smp_034420.2	2	77	Cistatina	Peptídeo sinal
Dife7	C609023.1	Smp_002740.2	5	74	-	Transmembrana
Dife8	C609541.1	Sm01331	3	125	-	Transmembrana
Dife9	C604241.1	Smp_070240	0	17	SCP	Peptídeo sinal

(a) Nome adotado; (b) Número de acesso do banco ORESTES *Schistosoma mansoni* (<http://bioinfo.iq.usp.br/schisto6/>); (c) Identificação do contig no bando de dados GeneDB de *Schistosoma mansoni* (<http://www.genedb.org/genedb/smanson/>); (d) Número de transcritos obtidos das bibliotecas de cDNA de cercária (CER) e esquistossômulo (ESQ) usando o mesmo conjunto de oligonucleotídeos; (e) Presença de motivos ou domínios nas seqüências de aminoácidos através da predição do SMART e Pfam; (f) Análise da estrutura primária das sequências de aminoácidos em busca de peptídeo sinal, hélice transmembrana e sítio de clivagem para âncora de GPI, usando SignalP, TMHMM e DGPI, respectivamente.

O gene Dife1 codifica uma proteína que apresenta um domínio transmembrana. O gene Dife2 não apresenta nenhum domínio na proteína codificada. O gene Dife3 também não apresenta nenhum domínio na proteína codificada, mas apresenta 32% de identidade com o antígeno protetor 4D8, uma endopeptidase, do carrapato *Ixodes scapularis*. O gene Dife4 possui um domínio de SPFH (Stomatin Like-2) (E value = 1.7×10^{-47}). O gene Dife5 codifica uma proteína com o domínio LY-6 (antígeno 6 de linfócito) (E value = 1.80×10^{-02}) e um sítio de clivagem para âncora de GPI, além de 30% de identidade com a proteína CD59 humana. O gene Dife6 codifica uma proteína que apresenta um domínio de cistatina (E value = 2.59×10^{-03}), um peptídeo sinal e 32% de identidade com a nipocistatina de *Nippostrongylus brasiliensis*. Essa proteína tem sido proposta com atividades imunomodulatórias e o papel de facilitar a evasão do parasita da resposta imune do hospedeiro (DAINICHI et al., 2001). Os genes Dife7 e Dife8 codificam proteínas que apresentam apenas um domínio transmembrana. O gene Dife9 codifica uma proteína com o domínio SCP (Sperm coating protein) (E value = 2.4×10^{-19}), um peptídeo sinal e 25% de identidade com o candidato vacinal NaASP-2 de *Necator americanus*.

4.3 VALIDAÇÃO DOS GENES POR RT-PCR EM TEMPO REAL

Esses nove genes foram validados quanto à diferença de expressão por RT-PCR em tempo real entre os estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto. Na Figura 10 pode ser visto o perfil de expressão gênica entre os estágios e estes separados em alguns grupos: (i) a expressão do gene Dife5 é maior no estágio de esquistossômulo em relação a cercária e continua a aumentar no estágio de verme adulto quando comparado ao de esquistossômulo; (ii) os genes Dife3 e Dife8 apresentam expressão aumentada em esquistossômulo em relação a cercária e mantém o nível de expressão em verme adulto; (iii) os genes Dife4 e Dife9 apresentam expressão aumentada no estágio de esquistossômulo em relação a cercária e redução de expressão no estágio de verme adulto quando comparado ao de esquistossômulo. Os genes Dife1, Dife2, Dife6 e Dife7 apresentam o mesmo perfil de expressão: sem diferença

estatística entre os estágios de cercária e esquistossômulo, mas aumento de expressão no estágio de verme adulto quando comparado a esses estágios.

Do total de genes analisados, cinco deles (Dife3, Dife4, Dife5, Dife8 e Dife9) confirmaram a diferença de expressão no estágio de esquistossômulo quando comparado ao de cercária (Figura 10). Portanto, 56% dos genes selecionados pela frequência de transcritos são de fato diferencialmente expressos na transição de cercária para esquistossômulo.

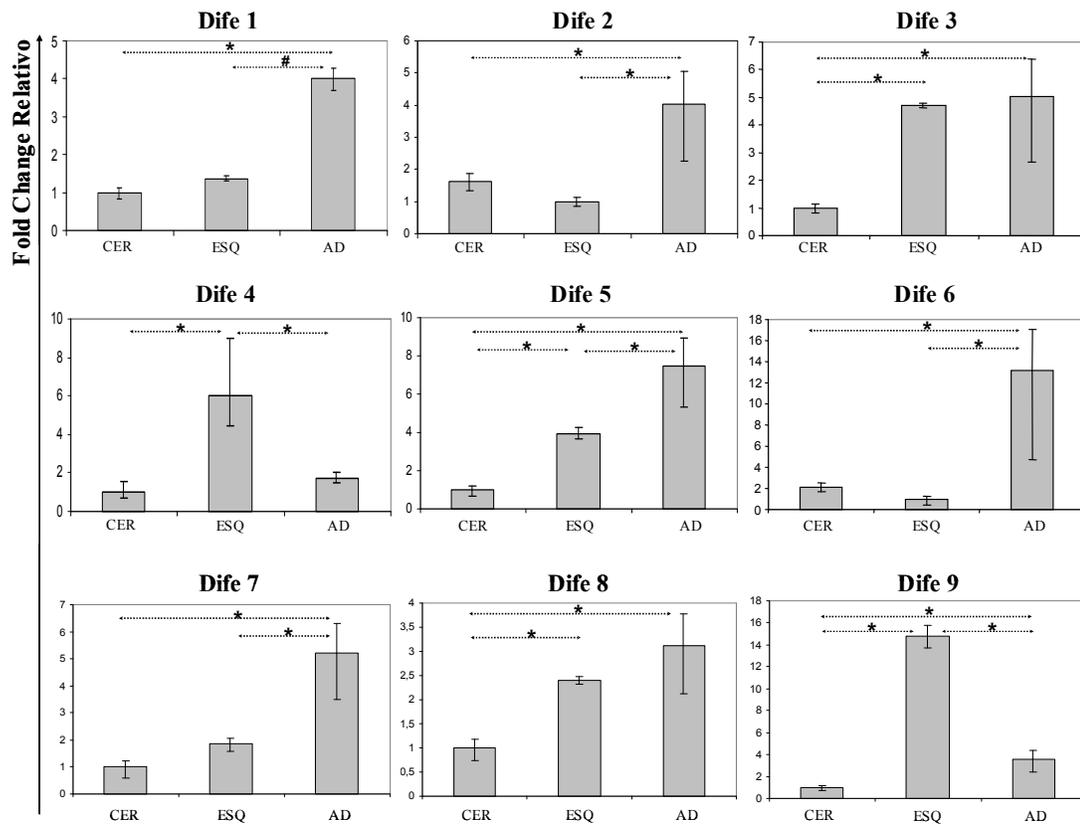


Figura 10. Análise da expressão dos genes Dife1 a Dife9 nos estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto. RNA total desses estágios foram transcritos em cDNA e analisados por RT-PCR em tempo real para quantificar as diferenças do nível de expressão dos genes entre os estágios, usando a actina como gene normalizador. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Legenda: CER: cercária; ESQ: esquistossômulo; AD: verme adulto; * Diferença estatística por ANOVA e Tukey; # Diferença estatística por Teste T de Student.

Apesar de alguns genes não mostrarem diferença de expressão entre o estágio de cercária e esquistossômulo, todos eles apresentam expressão aumentada em verme adulto em relação à cercária, indicando que a proteína é importante para o parasita manter-se no hospedeiro humano. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi clonar esses genes em vetor de expressão em *Escherichia coli*, induzir a expressão das proteínas recombinantes e purificá-las.

A proteína purificada seria administrada em ratos para a obtenção do anticorpo policlonal. O anticorpo específico seria usado para analisar o perfil de expressão e a localização da proteína nativa no parasita por Western blot e imunolocalização. Quando resultados obtidos indicassem um interessante candidato vacinal, camundongos seriam imunizados com a proteína recombinante e seria analisado o perfil da resposta imune e potencial protetor induzido contra desafio com o parasita.

A seguir estão as descrições mais detalhadas de dois genes escolhidos a partir dessa seleção, Dife5 e Dife9 e a caracterização de um novo gene, a Anexina 2, também diferencialmente expresso, mas selecionado a partir dos dados de expressão do microarranjo analisada por Dillon (2006). São genes interessantes inclusos dentro de famílias que chamam nossa atenção como candidatos vacinais.

4.4 DIFE5

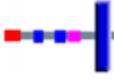
4.4.1 Família Ly6

O gene diferencialmente expresso Dife5 apresenta 30% de identidade com um importante membro da família do antígeno 6 de linfócitos (Ly6) em *Homo sapiens*, a proteína CD59 humana. A superfamília Ly6 é composta por proteínas de 15 - 20 kDa que possuem o domínio UPAR/Ly-6, que estão associadas à membrana por uma âncora de GPI (glicosil fosfatidil inositol) e que estão relacionadas à inibição da formação do complexo de ataque à membrana mediada pelo sistema complemento como a proteína humana CD59, ou à transdução de sinais e maturação dos linfócitos, como os antígenos de camundongo *Ag E48*, *RIG-E* e *TSA-1*.

Em *Schistosoma mansoni* foram encontrados outros seis membros que possuem similaridade com os membros da família Ly-6. Esse achado foi realizado pelo professor Alan Wilson, da Universidade de York e em colaboração, foi iniciado a caracterização da família.

Os genes foram nomeados de Ly6.1 a Ly6.6, sendo que o gene Dife5 é agora chamado de Ly6.5 e que o gene Ly6.6 possui duas isorfomas (Ly6.6.1 e Ly6.6.2). Todos os genes apresentam o domínio UPAR/Ly-6 com exceção do gene Ly6.3, que apesar de não apresentar o domínio característico da família, apresenta similaridade com a proteína CD59 de *Cannis familiaris*. Os valores dos pesos moleculares e pontos isoelétricos das proteínas e a presença de ortólogos também podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Características dos antígenos Ly6 de *Schistosoma mansoni*.

Nome ^a	Número de Acesso ^b	Domínio ^c	pI/P.M. ^d	Ortólogo [Organismo] Identidade (%) ^e
Ly6.1	Smp_105220		8.37 / 14.12 kDa	Similar to Ly6/neurotoxin-1 [<i>Ornithorhynchus anatinus</i>] 36 % id
Ly6.2	Smp_166340		8.57 / 14.1 kDa	Similar to CD59 protein [<i>Gallus gallus</i>] 24 % id
Ly6.3	Smp_166350		9.00 / 13.2 kDa	Similar to CD59 antigen [<i>Canis familiaris</i>] 27 % id
Ly6.4	Smp_081920		8.64 / 14.6 kDa	Similar to CD59 protein [<i>Ornithorhynchus anatinus</i>] 28 % id
Ly6.5	Smp_019350		8.43 / 14.2 kDa	Similar to lymphocyte antigen 6 complex [<i>Canis familiaris</i>] 30 % id
Ly6.6.1	Smp_081900.1		8.45 / 12.6 kDa	Similar to CD59 protein [<i>Gallus gallus</i>] 27 % id
Ly6.6.2	Smp_081900.2		8.57 / 14.1 kDa	Similar to CD59 protein [<i>Gallus gallus</i>] 24 % id

(a) Nome adotado; (b) Identificação do contig no bando de dados GeneDB de *Schistosoma mansoni* (<http://www.genedb.org/genedb/smansoni/>); (c) Representação esquemática da análise das sequências de aminoácidos em busca de peptídeo sinal, hélice transmembrana e domínio UPAR/Ly-6 usando SignalP, TMHMN e SMART, respectivamente. (d) Valores do ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular (P.M) preditos usando o programa Compute pI/Mw. (e) Presença dos ortólogos em diferentes organismos e a porcentagem de identidade entre eles.

As sequências desses antígenos Ly6 de *S. mansoni* foram alinhadas com as proteínas CD59 de *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* usando o clustalX, a fim de mostrar a similaridade entre as sequências (Figura 11). Todas as sequências com exceção da Ly6.3 apresentam o domínio protéico UPAR/Ly6, sendo que nas sequências de mamíferos, o domínio correspondente é um pouco maior. Todas elas possuem um peptídeo sinal na porção N-terminal e somente as sequências Ly6.2, Ly6.3, Ly6.4 e Ly6.6 possuem um domínio transmembrana na porção C-terminal. As sequências possuem as cisteínas bem conservadas e

o motivo CCXXXCN que caracteriza os membros da família Ly6. Quanto aos sítios para a âncora de GPI, comum a essa família de proteínas, estes foram encontrados, embora não alinhados com os sítios das sequências de mamíferos. As sequências, com exceção de Ly6.1 e Ly6.5, também apresentam vários sítios de N-glicosilação, analisados pelo software NetNGlyc, além dos sítios de O-β-GlcNAc analisados pelo software YinOYang, com exceção da Ly6.5 que não possui nenhum sítio de glicosilação predita. Todas essas características estão apresentadas na Figura 11 e descritas na respectiva legenda.

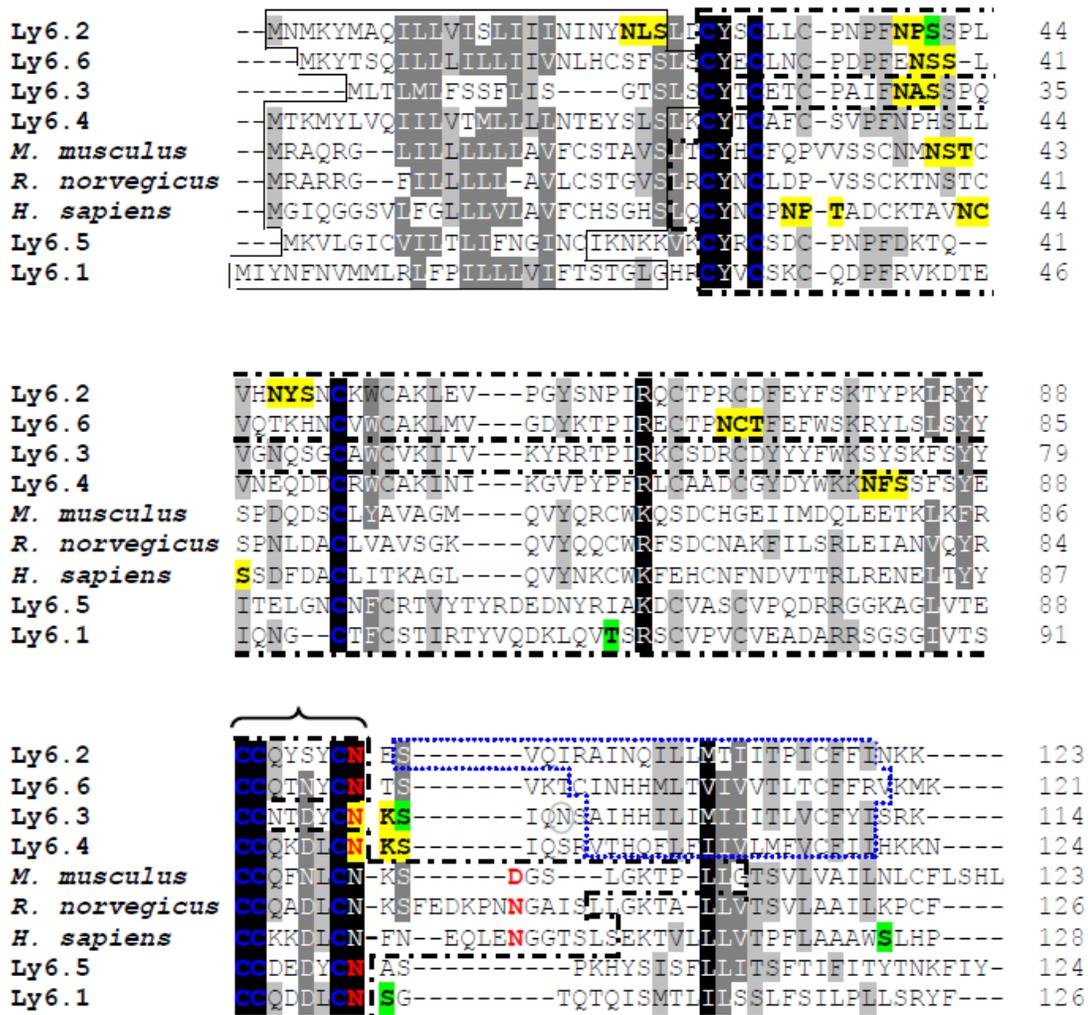


Figura 11. Alinhamento múltiplo por ClustalX das seqüências de aminoácidos dos membros da família Ly6 de *Schistosoma mansoni* em relação aos ortólogos de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*. As regiões com alta identidade e similaridade entre as seqüências estão apresentadas em colunas pretas e cinzas, de acordo com o algoritmo do Clustal X. Legenda: corresponde ao domínio UPAR/Ly6, ao peptídeo sinal, ao domínio transmembrana, representa a seqüência consenso que caracteriza antígenos da família Ly6, **letras azuis** indicam as cisteínas (C), **letras vermelhas** representam o sítio da âncora de GPI, **letras pretas preenchidas de amarelo**

representam os sítios de N-glicosilação e **preenchidas de verde** os sítios de O-glicosilação.

4.4.2 Análise da expressão do RNA mensageiro

As sequências foram analisadas quanto ao nível de expressão gênica entre os estágios do parasita a fim de tentar caracterizar os membros e buscar potenciais candidatos vacinais. A Figura 12 apresenta os valores relativos de “fold change” dos genes Ly6 analisados por RT-PCR em tempo real entre os estágios do parasita. Pode-se observar que a maioria dos genes apresenta expressão aumentada no estágio de esquistossômulos, com exceção do gene Ly6.3, que apresenta expressão mais elevada em ovo e o gene Ly6.4, cuja maior expressão é em adulto.

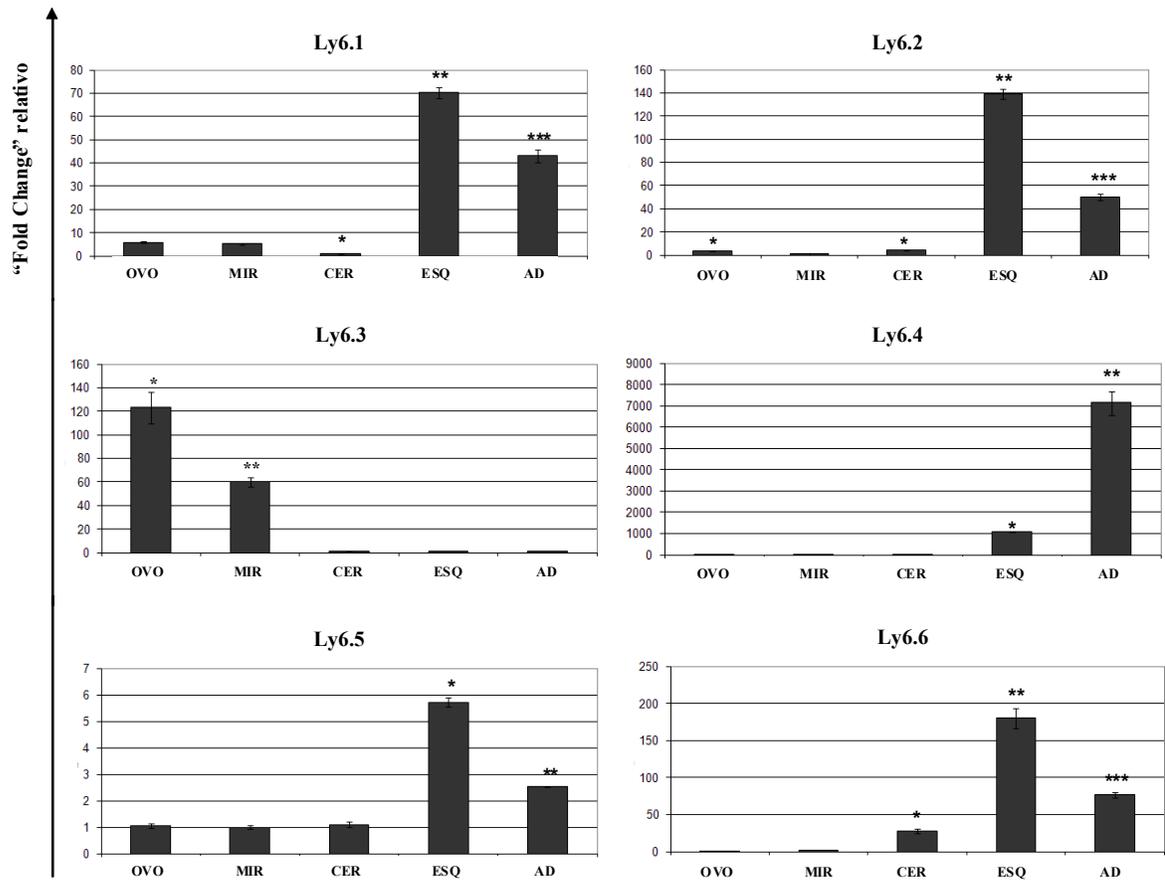


Figura 12. Análise da expressão dos genes Ly6.1 a Ly6.6 entre os estágios do parasita. RNA total desses estágios foram transcritos em cDNA e analisados por RT-PCR em tempo real para quantificar as diferenças do nível de expressão dos genes entre os estágios, usando a tubulina como gene normalizador. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Diferença estatística por ANOVA e Tukey está representada por asteriscos.

4.4.3 Expressão e purificação da proteína rLy6.5 de *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*

O gene Ly6.5 foi inicialmente amplificado da biblioteca do transcriptoma e inserido no vetor de expressão pAE-6His, com exceção das porções do gene que correspondem ao peptídeo sinal e à porção transmembrana. Após a orientação do inserto ser confirmada por sequenciamento automático, bactérias da cepa de *E.coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo pAE-Ly6.5 e esta induzida com IPTG. A proteína recombinante rLy6.5 de 13.2 kDa expressa está representada na Figura 13A.

O clone de *E. coli* transformado com pAE-Ly6.5 foi cultivado em volumes maiores (300 ml) de meio de cultura e induzido com IPTG. As bactérias do cultivo foram lisadas no aparelho French Press e centrifugadas para posterior análise em gel de SDS-PAGE. Como pode ser visualizada na Figura 13B, a proteína está sendo expressa e armazenada em corpúsculos de inclusão. Esses corpúsculos foram lavados em diferentes concentrações de uréia e a proteína se solubilizou a uma concentração de 8 M uréia.

Dessa forma, a proteína foi purificada a partir dos corpúsculos solubilizados em uréia 8M. Um volume de 10 mL da solução uréia 8M contendo a proteína desnaturada foi aplicada a uma coluna de Ni-Sepharose e a eluição foi feita em 30 mL de um gradiente de concentração com imidazol de 0-500 mM. O cromatograma gerado da purificação da proteína no aparelho ÄKTA Prime apresenta um pico de absorbância que corresponde com a eluição da proteína entre 40-80% de imidazol 500 mM (dados não mostrados). As amostras correspondentes ao pico de eluição da proteína foram coletadas e analisadas em gel de SDS-PAGE (Figura 13C). O volume das amostras foi reunido e dialisado em membranas de diálise de 3 kDa até abaixar a concentração da uréia. Não houve precipitação da proteína durante o renovelamento por diálise. No final, foram recuperados 20 mL da proteína com concentração igual a 500 ng/ μ L.

Em seguida, a proteína purificada foi administrada subcutaneamente em ratas Wistar para a obtenção de anticorpos policlonais. Foi utilizado 100 μ g da proteína em cada aplicação e o adjuvante Titer Max na primeira inoculação. Depois de quatro imunizações, o soro foi coletado e analisado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), verificando títulos de 1:80.000.

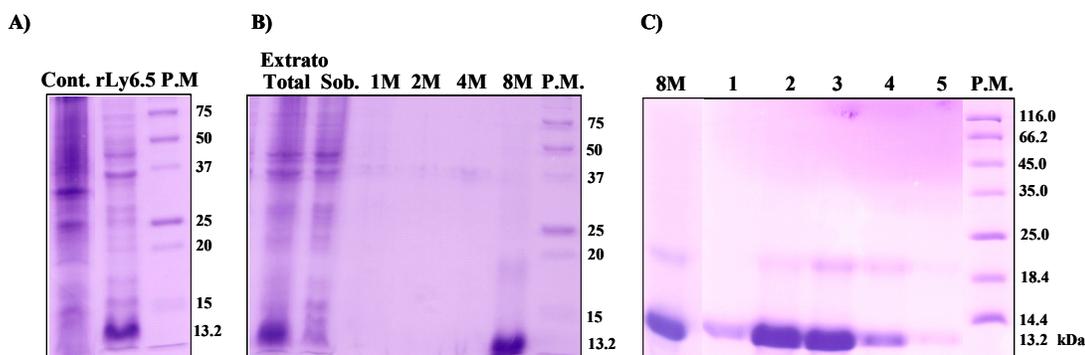


Figura 13. Expressão e purificação da proteína rLy6.5 em *Escherichia coli*. A) Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% dos extratos totais das cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o vetor pAE vazio (controle) ou o vetor pAE-Ly6.5 e induzidas com IPTG. B) Frações de solubilização dos corpúsculos de inclusão do lisado da bactéria lavados em diferentes concentrações de uréia (1 M, 2 M, 4 M e 8 M). C) Frações de eluição obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose da amostra solubilizada em uréia 8 M.

A expressão da proteína recombinante Ly6.5 também foi obtida em *Pichia pastoris*. Para isso, foi sintetizado o gene com códons otimizados para expressão em *P. pastoris*, o qual foi clonado no plasmídeo pPICZ α e este eletroporado na levedura. Clones multicópias foram selecionados quanto à resistência a zeocina e avaliados quanto à expressão da proteína após a indução com metanol. Somente o sobrenadante dos clones foram avaliados, e entre os analisados a maioria apresentou a expressão da proteína recombinante por Western blot usando o anticorpo anti-Ly6.5 (Figura 14A). O clone que apresentou maior expressão da proteína foi selecionado para a obtenção da mesma em grandes quantidades. Assim, um litro de meio de cultura foi usado para o crescimento da levedura e o sobrenadante após 72 horas foi utilizado na purificação da proteína por cromatografia de afinidade a Ni-Sepharose. Após a eluição, as frações foram reunidas e dialisadas em tampão fosfato (Figura 14B).

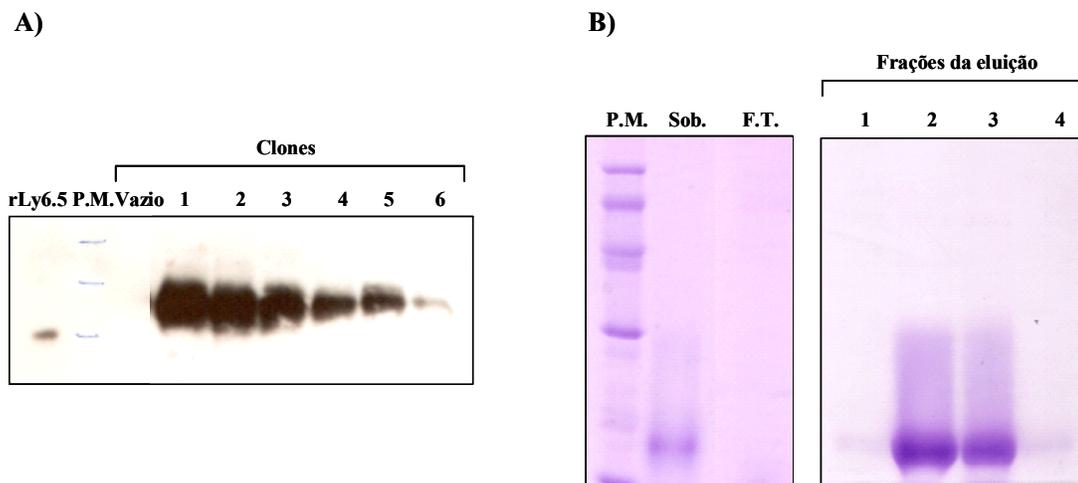


Figura 14. Expressão e purificação da proteína rLy6.5 em *Pichia pastoris*. A) Western blot do sobrenadante do cultivo de clones de *Pichia pastoris* eletroporados com o plasmídeo pPICZa contendo ou não o gene otimizado Ly6.5. B) Gel de SDS-PAGE 15% do sobrenadante do meio de cultura do clone de *P. pastoris* expressando a proteína rLy6.5 e das frações de eluição obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.

4.4.4 Perfil de expressão da proteína Ly6.5 de *S. mansoni* nos estágios do parasita

A expressão da proteína nativa Ly6.5 foi analisada por Western blot, utilizando quantidades equivalentes de extratos protéicos de ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo *in vitro* de 7 dias e vermes adultos macho e fêmea. O soro anti-Ly6.5 gerado reconheceu a proteína recombinante e as respectivas bandas nos extratos de miracídio, cercária, esquistossômulo e vermes adultos macho e fêmea, como mostra a Figura 15. A expressão bastante significativa nos estágios de miracídio e cercária é maior do que o esperado pelos resultados de expressão gênica obtidos por RT-PCR em tempo real. Por outro lado, a proteína Ly6.5 apresentou-se expressa em maior quantidade no estágio de esquistossômulo, confirmando que o gene seria diferencialmente expresso na transição do estágio de cercária para esquistossômulo. Nenhuma expressão foi vista na fração dos ovos.

O tegumento de vermes adultos e o extrato dos vermes adultos desnudos também foram analisados por Western blot. O anticorpo anti-Ly6.5 reconhece a proteína Ly6.5 fortemente no extrato dos vermes desnudos e fracamente no tegumento. Estes resultados indicam que a proteína está distribuída pelos tecidos internos do parasita, mas também se apresenta na superfície.

Incubando os mesmos extratos protéicos com soro pré-imune de rato nas mesmas proporções, não houve marcação, demonstrando que a marcação obtida no experimento anterior era específica. Adicionalmente, também foi testado se o soro imune de ratos com infecção crônica reconhecia a proteína recombinante rLy6.5 por Western blot. No entanto, não houve marcação alguma quando realizado esse ensaio (dados não apresentados).

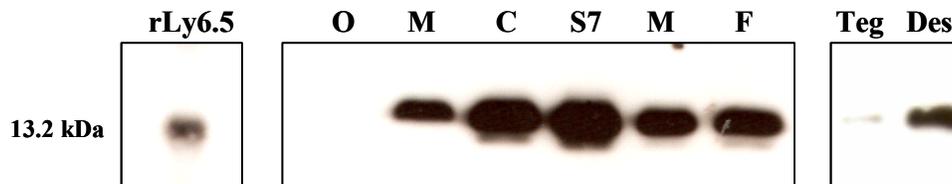


Figura 15. Perfil de expressão da proteína Ly6.5 de *S. mansoni* nos estágios do parasita. Western blot contendo a proteína rLy6.5, extratos protéicos totais de ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo *in vitro* de 7 dia, macho, fêmea, tegumento de verme adulto e extrato de verme adulto desnudo incubados com soro anti-Ly6.5. O anticorpo primário (anti-Ly6.5) foi usado na proporção de 1:10.000 e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase) na proporção de 1:5.000. Legenda dos extratos protéicos totais: O: ovo; M: miracídio; C: cercária; S7: esquistossômulo *in vitro* de 7 dias; M: macho; F: fêmea; Teg: tegumento; Des: verme adulto desnudo.

4.4.5 Presença da proteína Ly6.5 no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI

A proteína Ly6.5 também foi visualizada por Western blot em frações de tegumento de vermes adultos digeridas com fosfolipase C (piPLC), confirmando a presença da proteína no tegumento. Essa enzima digere as âncoras de GPI liberando as proteínas presas à superfície por essa âncora. A

Figura 16 mostra o Western blot contendo as frações dos meios de cultura concentrados onde os parasitas foram tratados ou não com a enzima piPLC. Uma leve banda é observada no meio de cultura onde os parasitas foram incubados com a enzima, confirmando a presença da proteína no tegumento por âncora de GPI. As bandas de maior massa molecular da proteína rLy6.5 observadas na primeira linha do Western blot, possivelmente são devidos à agregação das proteínas.

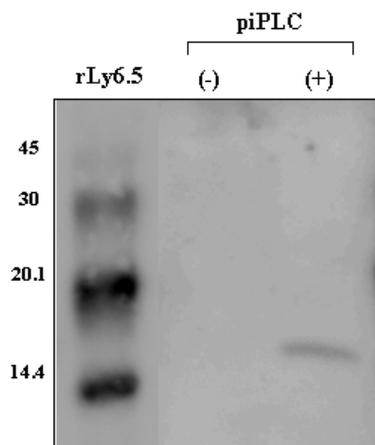


Figura 16. Análise da ligação da proteína Ly6.5 no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI após digestão com piPLC. Western blot contendo as frações dos meios de cultura concentrados onde os vermes adultos foram tratados com piPLC (+) ou não tratados (-) por 1 h à 37°C e a proteína rLy6.5. A membrana foi incubada com o soro anti-Ly6.5, na proporção de 1:10.000 e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase) na proporção de 1:5.000.

4.4.6 Perfil de expressão da proteína Ly6.1 entre os estágios do parasita

Foi caracterizado em colaboração com os professores Alan Wilson, da Universidade de York, e Willian Castro Borges, da Universidade Federal de Ouro Preto, outro membro da família Ly6 de *S. mansoni*, a proteína Ly6.1. A proteína recombinante obtida de *Pichia pastoris* e o soro anti-Ly6.1 gerado em rato foram gentilmente cedidos (dados não apresentados).

Dessa forma foi possível analisar o nível de expressão da proteína nos estágios do parasita. Na Figura 17, pode-se observar uma forte banda do tamanho esperado no estágio de verme adulto macho, e em menor quantidade em esquistossômulo e verme adulto fêmea. A banda da proteína recombinante apresenta um tamanho pouco maior, possivelmente devido às glicosilações vindas do sistema de expressão de *P. pastoris*. No estágio de cercária, é encontrada uma banda muito fraca, confirmando a expressão diferencial da proteína na transição de cercária para esquistossômulo, sendo possivelmente uma proteína importante para a manutenção do parasita no hospedeiro definitivo.

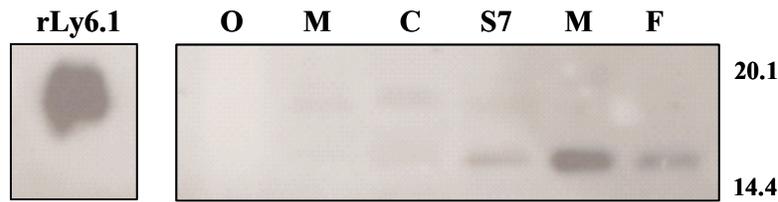


Figura 17. Perfil de expressão da proteína Ly6.1 de *S. mansoni* nos estágios do parasita. Western blot contendo a proteína rLy6.1, extratos protéicos totais de ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo *in vitro* de 7 dia, vermes adultos macho e fêmea incubados com soro anti-Ly6.1. O anticorpo primário (anti-Ly6.1) foi usado na proporção de 1:1.000 e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase) na proporção de 1:5000. Legenda dos extratos protéicos totais: O: ovo; M: miracídio; C: cercária; S7: esquistossômulo *in vitro* de 7 dias; M: macho; F: fêmea.

4.4.7 Análise das glicosilações nas proteínas rLy6.1 e rLy6.5

Como as proteínas rLy6.1 e rLy6.5 obtidas em *P. pastoris* apresentavam no gel um tamanho superior ao esperado, indicando ser as glicosilações feitas pela levedura. Um gel contendo essas proteínas foi corado com a solução de Schiff que marca açúcares para certificar da presença ou não das glicoproteínas. É possível observar que ambas as proteínas rLy6.1 e rLy6.2 apresentam marcação de glicoproteínas, assim como o controle positivo rSmVal4 (uma proteína de *S. mansoni*, também obtida em *P. pastoris*), enquanto que não houve marcação no controle negativo BSA (Figura 18A). O mesmo gel foi corado em Comassie blue para certificar da presença das proteínas (Figura 18B).

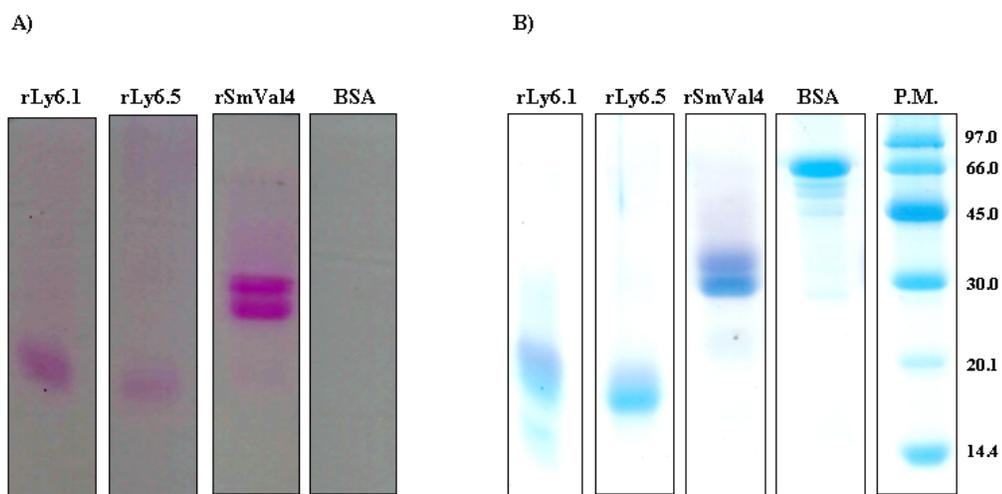


Figura 18. Análise das glicosilações nas proteínas rLy6.1 e rLy6.5. A) Gel de SDS-PAGE contendo 10 µg das proteínas rLy6.1, rLy6.5 e rSmVal4 obtidas de *Pichia pastoris* e do controle negativo BSA, corado com reagente de Schiff que marca os açúcares. B) Mesmo gel corado com corante Comassie após coloração com o reagente de Schiff.

Diante do fato que essas proteínas rLy6.1 e rLy6.5 possuem açúcares, elas e o extrato total de verme adulto foram tratados com PNGase F, uma enzima que cliva as N-glicosilações na estrutura das proteínas. Não foi observada diferença no tamanho das proteínas recombinantes e nativas tratadas com a enzima daquelas não tratadas (Figura 19A e B).

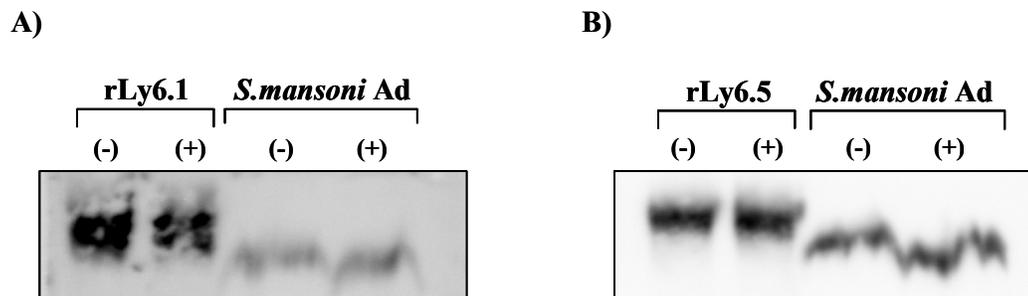


Figura 19. Análise das proteínas rLy6.1 e rLy6.5 e os extratos de vermes adultos após ou sem o tratamento com a enzima PNGase F. **A)** Western blot contendo a proteína recombinante rLy6.1 e o extrato protéico total de verme adulto tratado (+) ou não (-) com a enzima PNGase F que cliva N-glicosilações. Membrana incubada com soro anti-Ly6.1 (1:1.000) e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase, 1:5000). **B)** Western blot contendo a proteína recombinante rLy6.5 e o extrato protéico total de verme adulto tratado (+) ou não (-) com a enzima PNGase. Membrana incubada com soro anti-Ly6.5 (1:10.000) e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase, 1:5.000).

A não alteração no tamanho das proteínas tratadas com PNGase pode sugerir a presença de O-glicosilações que ainda precisam ser investigadas.

4.4.8 Imunolocalização da proteína Ly6.1 e Ly6.5

Cercárias, esquistossômulos *in vitro* de 3 horas, 7 e 21 dias fixados em paraformaldeído foram incubados com anticorpos policlonais anti-Ly6.5 e revelados com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente Alexa fluor 488 para análise no microscópio confocal (Figura 20). Algumas amostras também foram incubadas com rodoamina/faloidina para marcação de estruturas musculares internas para demonstrar que o parasita foi bem permeabilizado. A proteína Ly6.5 foi localizada majoritariamente no tegumento de esquistossômulos *in vitro* de 3h, 7 e 21 dias. Em cercárias, pouca fluorescência foi vista.

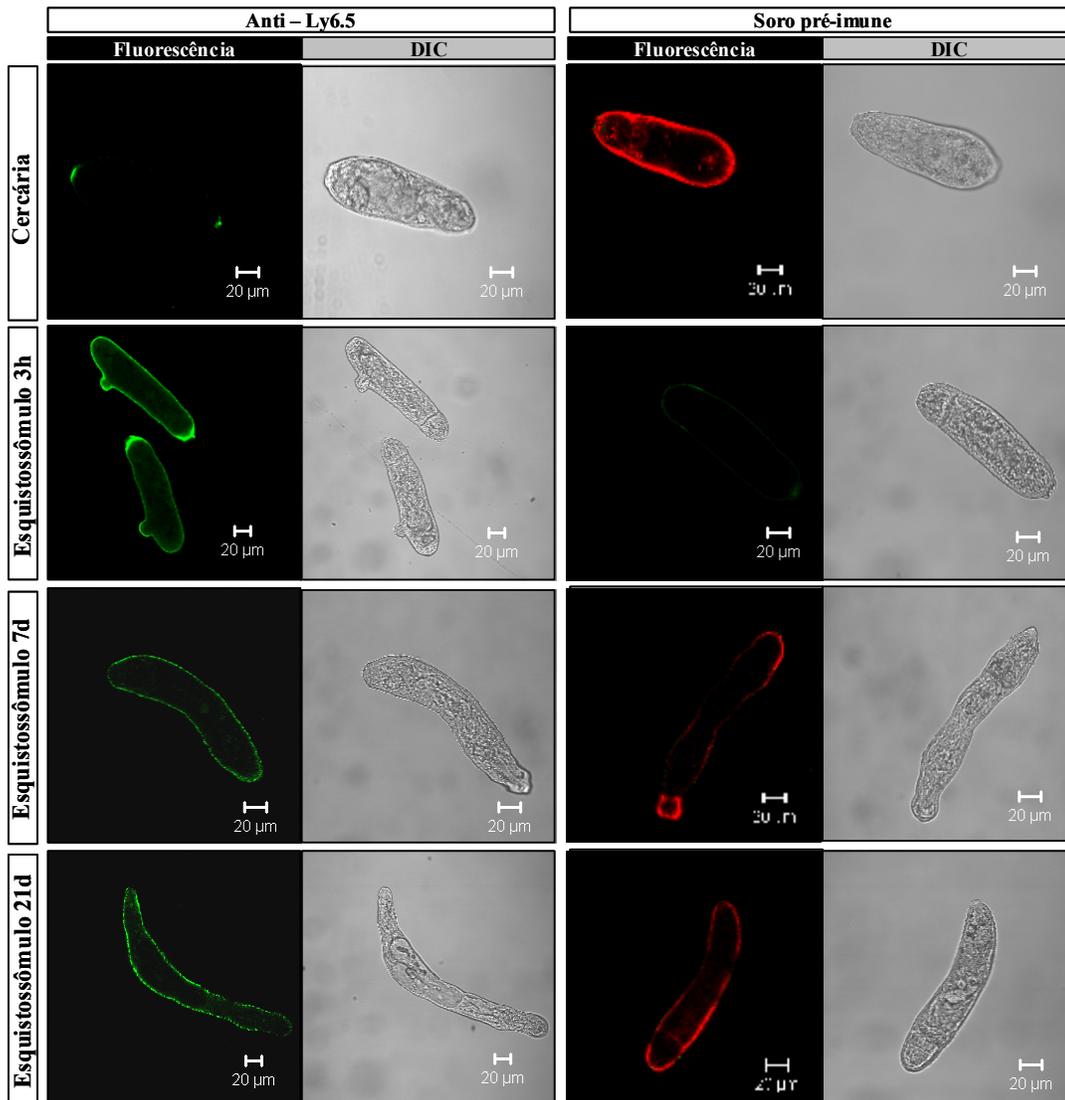


Figura 20. Imunolocalização da proteína Ly6.5 de *Schistosoma mansoni* em parasitas inteiros. Imagens de microscopia confocal de fluorescência e suas correspondentes imagens em contraste diferencial de fase (DIC) de parasitas inteiros fixados em paraformaldeído (cercárias e esquistossômulos *in vitro* de 3 h, 7 e 21 dias) para análise da localização da proteína Ly6.5. Os parasitas foram permeabilizados e bloqueados em tampão (Tris-NaCl 40 mM, Tween 20 0,1% e soro de coelho 10 %), incubados com soro anti-Ly6.5 (1:200) e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com o fluorescente Alexa fluor 488) na proporção 1:200.

Seções de vermes adultos (7 μ m) incubados em OCT também foram analisadas e comparadas com as imagens de seções de vermes adultos incubados com soro anti-Ly6.1, cedidas pelo professor Alan Wilson (Figura 21). Nesses cortes, a proteína Ly6.5 apresentou-se em grande quantidade no tegumento e também nos tecidos internos do parasita, enquanto a proteína Ly6.1 encontra-se majoritariamente na superfície do tegumento de verme adulto.

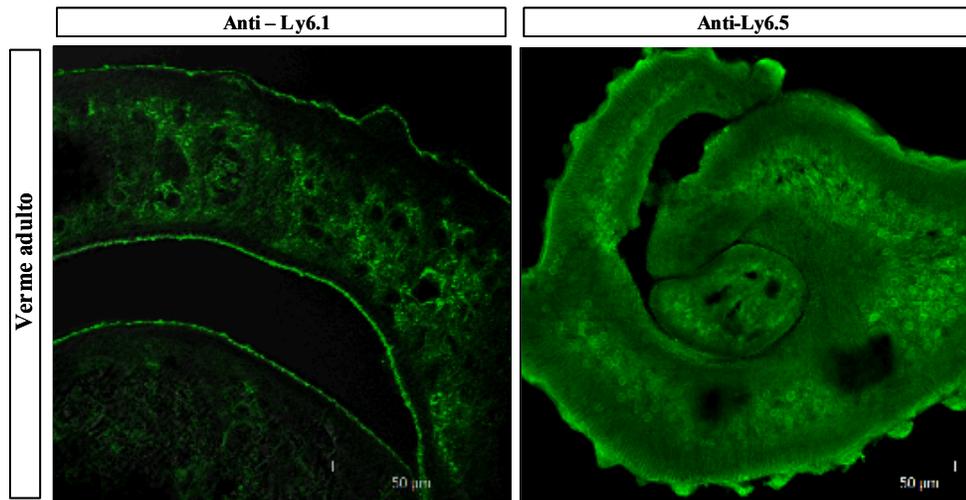


Figura 21. Imunolocalização das proteínas Ly6.1 e Ly6.5 em seções de vermes adultos. Imagens de microscopia confocal de fluorescência de seções de vermes adultos (7 µm) incubados em OCT para análise da localização das proteínas Ly6.1 e Ly6.5. Os parasitas foram seccionados e fixados em lâminas com acetona, bloqueados em tampão (Tris-NaCl 40 mM, Tween 20 0,1% e soro de coelho 10 %), incubados com soro anti-Ly6.5 ou anti-Ly6.1 (1:200) e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado o fluorescente Alexa fluor 488) na proporção 1:200.

4.4.9 Ensaio de inibição de penetração das cercárias pela pele

Os anticorpos anti-Ly6.5 também foram utilizados no ensaio de inibição da penetração das cercárias pela pele dos camundongos, uma vez que a proteína Ly6.5 encontra-se no estágio de cercária e em maior quantidade no estágio seguinte de esquistossômulo, como visto por Western blot. O objetivo foi verificar se a proteína tem alguma importância para o desenvolvimento do parasita dentro do hospedeiro. Como visto pela Figura 22, os anticorpos anti-Ly6.5 conseguiram inibir quase 60% a penetração das cercárias. Das cercárias que penetraram, apenas 58% conseguiram se desenvolver em vermes adultos e serem recuperados na perfusão. Esses dados apresentam diferença estatística com os controles e foram realizados duas vezes. Estes experimentos indicam que a proteína está na superfície, acessível ao anticorpo, e que ela é importante para facilitar a penetração. A ligação dos anticorpos na superfície também comprometem a viabilidade do parasita dentro do hospedeiro.

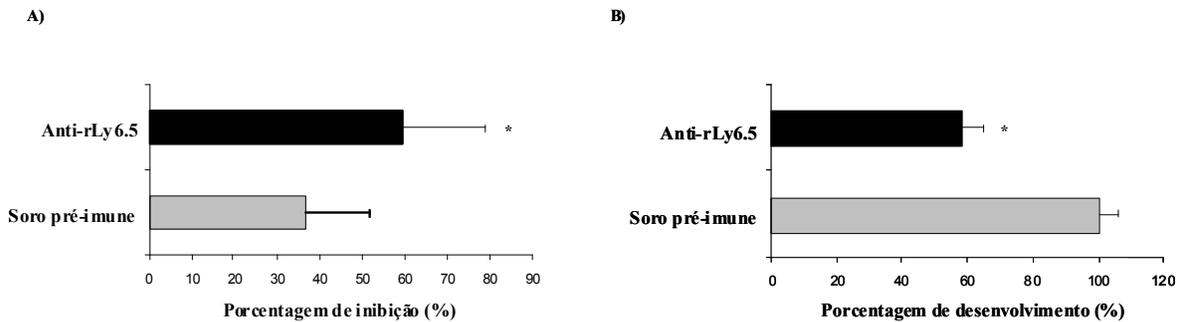


Figura 22. Ensaio de inibição da penetração das cercárias pela pele. Cercárias foram incubadas com anti-Ly6.5 por 1h a 37 °C e submetidas à penetração na pele dos camundongos. **A)** Porcentagem de cercárias inibidas durante a penetração em relação ao total de 110 cercárias. **B)** Média dos vermes recuperados após 45 dias de infecção com as cercárias tratadas. Os resultados são apresentados em média \pm desvio padrão. Legenda: * Diferença estatística entre os grupos.

4.4.10 Morte dos esquistossômulos pelo sistema complemento

Uma vez que a proteína Ly6.5 possui similaridade com a proteína CD59 humana, a qual inibe o complexo de ataque à membrana (MAC), um ensaio preliminar de morte dos esquistossômulos pelo sistema complemento foi realizado a fim de observar se esta função estava ativa. O experimento consistiu da incubação de esquistossômulos *in vitro* de 3 h com anti-Ly6.5 por 30 minutos e em seguida com uma fonte de complemento (soro humano). Após 24 horas, os esquistossômulos mortos foram contados e comparados com o controle (incubado com soro de rato com infecção crônica). No entanto, não foi obtido um aumento na morte dos esquistossômulos incubados com soro anti-Ly6.5 em relação ao controle (Figura 23). Esse experimento foi realizado apenas uma vez e não foi usado complemento humano com o fator C4 depletado para evitar a cascata da via clássica do complemento.

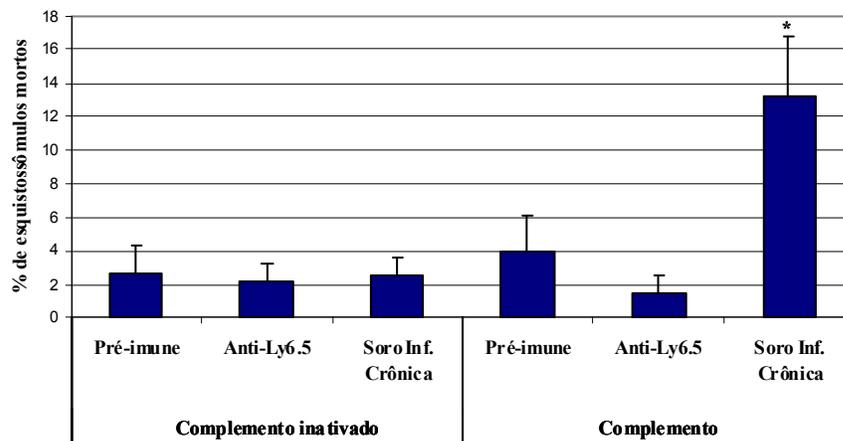


Figura 23. Ensaio da morte dos esquistossômulos pelo sistema complemento. Esquistossômulos de 3 h foram incubados com soro inativado anti-Ly6.5 por 30 min e depois com uma fonte de complemento (soro humano) ativado ou inativado por 24 h à 37°C. Após o período, os esquistossômulos foram visualizados no microscópio e contados. Foram utilizados 100 esquistossômulos por poço e soro anti-Ly6.5 na proporção 1:200.

4.4.11 Reconhecimento das proteínas rLy6.1 e rLy6.5 pelo soro anti-CD59

Soro anti-CD59 policlonal (Abnova) foi utilizado com a finalidade de verificar se este reconheceria as proteínas rLy6.1 e rLy6.5, uma vez que as proteínas possuem similaridade com a CD59 humana. No entanto, não foi visto nenhuma banda no Western blot (Figura 24). Foi usado a proteína Sm14 como controle negativo e o lisado de eritrócitos humanos como controle positivo.

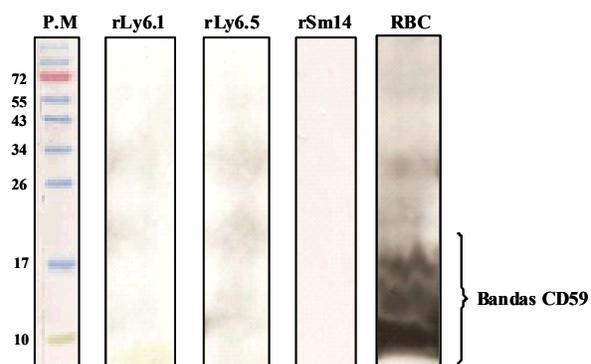


Figura 24. Western blot das proteínas rLy6.1 e rLy6.5 usando soro anti-CD59. Western blot contendo as proteínas recombinantes rLy6.1, rLy6.5, rSm14 e o lisado de eritrócitos humanos (RBC). A membrana foi incubada com soro policlonal anti-CD59 (1:500) e anticorpo secundário (anti-IgG de mouse conjugado com peroxidase, 1:5.000).

4.4.12 Reconhecimento da proteína CD59 pelos anticorpos anti-Ly6.1 e anti-Ly6.5

Anticorpos anti-Ly6.1 e anti-Ly6.5 também foram analisados com a finalidade de verificar o reconhecimento da proteína CD59 comercial (Abnova). No entanto, não foi visto nenhuma banda no Western blot (Figura 25). Foi usado o soro de rato com infecção crônica como controle positivo, mas também não foi observado nenhuma marcação no Western blot.

A proteína comercial CD59 foi encontrada para comprar apenas na empresa Abnova e é produzida pelo sistema *in vitro* de transcrição em células de trigo. Ela deve estar com uma estrutura diferente e sem a presença das glicoproteínas, o que pode dificultar o reconhecimento dos anticorpos.

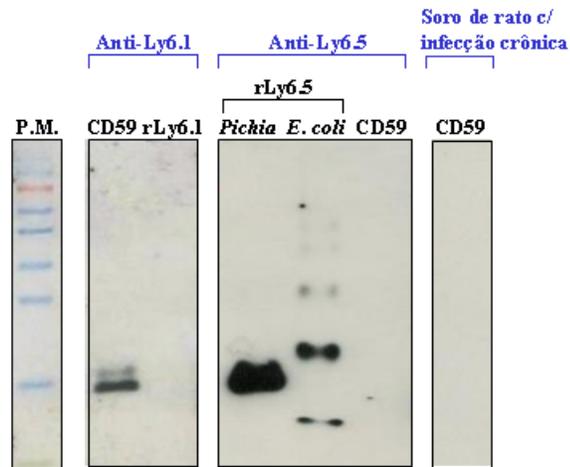


Figura 25. Reconhecimento da proteína CD59 pelos anticorpos anti-Ly6.1 e anti-Ly6.5. Western blot contendo as proteínas recombinantes CD59 (Abnova), rLy6.1, rLy6.5 de *P. pastoris*, rLy6.5 de *E. coli*. As membranas foram incubadas com soro policlonal anti-Ly6.1 (1:1.000), anti-Ly6.5 (1:10.000), soro de rato com infecção crônica (1:1.000) e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase, 1:5.000).

4.4.13 Ensaio hemolítico

Para finalizar a hipótese de que a proteína Ly6.5 estaria envolvida com a inibição do sistema complemento, o ensaio hemolítico da via alternativa do sistema complemento foi realizado. Hemácias de carneiro foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes Ly6.1 e Ly6.5 de *P. pastoris* ou Ly6.5 de *E. coli* por 10 minutos em diferentes concentrações e depois com a fonte de complemento humano por 1 h. A densidade óptica do sobrenadante foi medida, comparada quanto ao controle positivo (hemólise total das hemácias com a adição de água) e plotada na Figura 26. É possível observar pela Figura 26, que não há uma diminuição da hemólise, mesmo com o aumento da quantidade de proteína analisada.

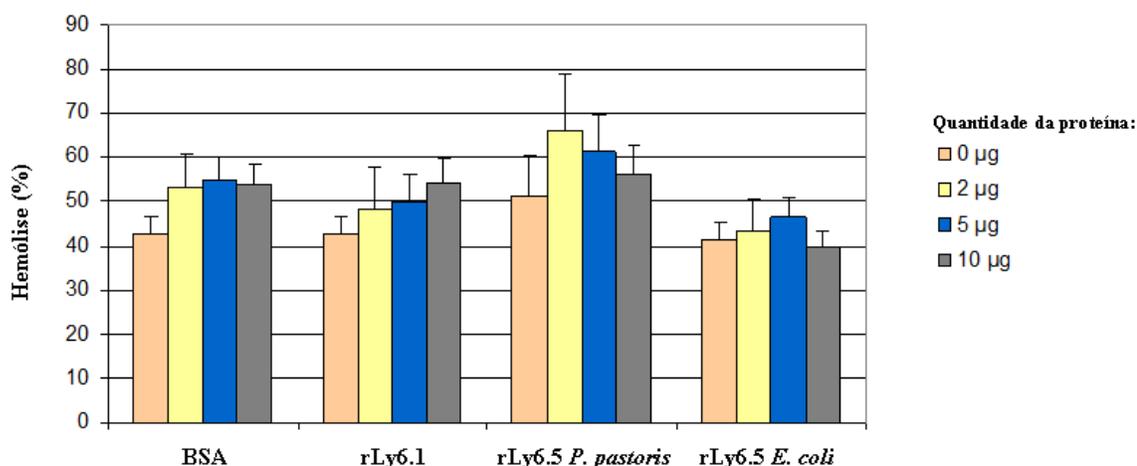


Figura 26. Ensaio hemolítico da via alternativa do sistema complemento. Hemácias de carneiro foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes Ly6.1 e Ly6.5 de *P. pastoris* e a Ly6.5 de *E. coli* por 10 minutos em diferentes concentrações (0, 2, 5 e 10 µg) e depois com uma quantidade de complemento humano que lisa em 50% as hemácias, por 1h a 37°C. A densidade óptica dos sobrenadantes das reações centrifugadas foi medida no espectrofotômetro e comparada o controle positivo (hemólise total das hemácias com a adição de água).

Também foi realizado, uma única vez, o ensaio para analisar a via clássica do sistema complemento, no qual, primeiro se sensibiliza as hemácias de coelho com anticorpos anti-hemolisina, e as proteínas não induziram inibição do sistema complemento (dados não apresentados). No entanto, as proteínas rLy6.1 e rLy6.5 foram analisadas por dicroísmo circular, apresentando estruturas randômicas (dados não apresentados), o que dificulta a interpretação dos ensaios biológicos. Esses resultados sugerem em conjunto com os demais ensaios descritos anteriormente, que as proteínas Ly6.1 e Ly6.5 não possuem a função de inibir o sistema complemento.

4.4.14 Imunização com a proteína recombinante rLy6.5

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com a proteína rLy6.5 usando CFA como adjuvante em 3 doses com 15 dias de intervalo e estes desafiados após 21 dias com 100 cercárias, conforme o regime de imunização descrito na metodologia. Foram investigadas as respostas imunes humoral e celular induzidas nos camundongos contra a proteína após o desafio com cercárias infectantes.

4.4.15 Imunização com a proteína rLy6.5

4.4.15.1 Resposta imune humoral induzida

A concentração de anticorpos anti-Ly6.5 nos grupos imunizados com a proteína rLy6.5 e no controle (imunizado com salina e adjuvante) foram determinadas por ELISA. Após a terceira imunização, o nível de anticorpos anti-Ly6.5 aumentou bastante, continuando a se elevar após o desafio, chegando a 15 ug/mL (Figura 27).

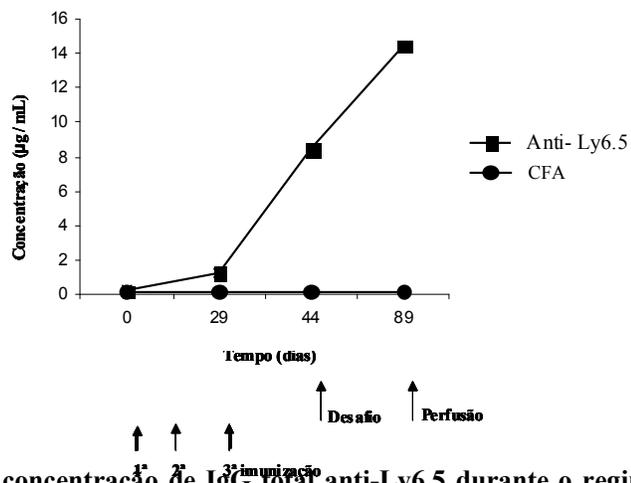


Figura 27. Análise da concentração de IgG total anti-Ly6.5 durante o regime de imunização e desafio dos animais. Os soros dos animais foram agrupados em “pool” e a concentração foi determinada pela curva de IgG recombinante. CFA é o soro dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund.

Os níveis de IgG1 e IgG2a também foram analisados a fim de determinar o tipo de resposta imune que a imunização com a proteína está gerando. A Tabela 3 apresenta as concentrações de IgG1 e IgG2a nas três sangrias entre os grupos imunizados e controle. A resposta imune tem um perfil fortemente Th2 e após o desafio, o caráter Th2 se reduz.

Tabela 3 - Análise da produção de IgG1 e IgG2a anti-Ly6.5 antes e após o desafio.

Tempo (dias)	IgG1 (ug/mL)		IgG2a (ug/mL)		Razão IgG1/IgG2a
	rLy6.5	Controle	rLy6.5	Controle	rLy6.5
29	0,813	0,028	0,133	0,015	6,09
44	15,046	0,038	0,211	0,031	70,99
89	16,030	0,057	1,993	0,025	8,04

(29) representa o soro coletado antes da 3ª imunização; (44) o soro coletado antes do desafio e (89) o soro antes da perfusão.

4.4.15.2 Resposta imune celular

Os baços dos animais imunizados e desafiados foram retirados durante a perfusão e submetidos aos ensaios de resposta celular ELISPOT e ELISA de sobrenadante das culturas dos esplenócitos. Pelo ensaio de ELISPOT foi possível observar uma média de 40 “spots” a cada 10^5 células para IFN- γ (Figura 28A) e nenhum “spot” para células secretoras de IL-5. No entanto, uma quantidade de aproximadamente 30 $\mu\text{g/mL}$ de IL-5 foi obtido do sobrenadante dos esplenócitos em cultura estimulados com rLy6.5 (Figura 28B), indicando um padrão Th1 ou misto Th1/Th2 de resposta imune.

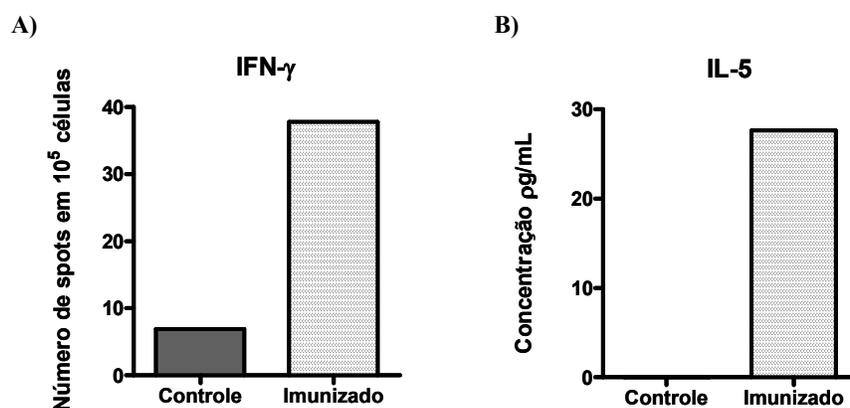
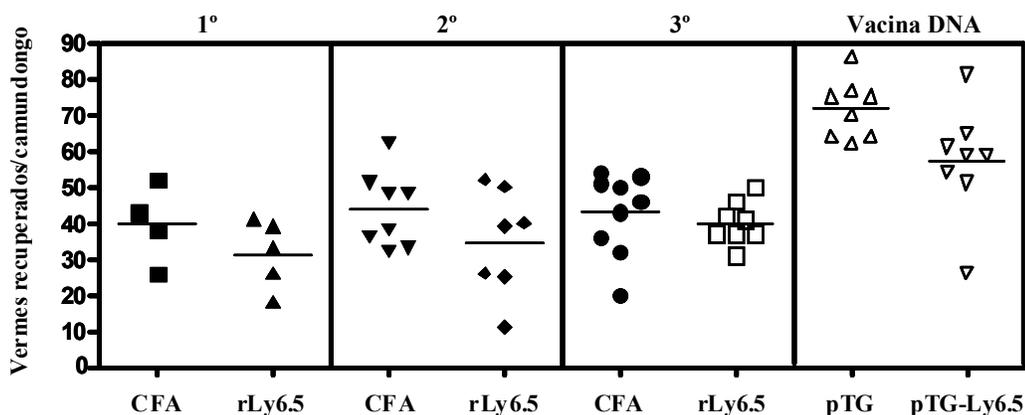


Figura 28. Análise da resposta imune celular para IFN- γ por ELISPOT e IL-5 por ELISA. Controle é o “pool” das células do baço dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund em relação ao imunizado (rLy6.5 + adjuvante de Freund). Os grupos foram estimulados com a proteína recombinante rLy6.5 e os seus valores foram subtraídos das células que não foram estimuladas.

4.4.15.3 Proteção

Os animais seguiram o regime de três imunizações a cada 15 dias com a proteína rLy6.5, usando CFA como adjuvante, desafiados com 110 cercárias e perfundidos após 45 dias. O número de vermes recuperados por animal está representado na Figura 29 para três experimentos, sendo o segundo realizado pelo grupo do Dr. Sérgio Costa Oliveira da Universidade Federal de Minas Gerais. A proteína apresentou uma redução de 7-20%, mas sem diferença estatística.



Média	40	31	43	35	43	40	72	57
Proteção %	-	21	-	20	-	7	-	20
P value	-	0,257	-	0,202	-	0,490	-	0,032

Figura 29. Gráfico de dispersão do número de vermes recuperados em camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína recombinante rLy6.5 ou a vacina de DNA pTG-Ly6.5. CFA: grupo de camundongos imunizados com salina e adjuvante. pTG: grupo de animais imunizados com o vetor pTARGET vazio. (—) média do número de vermes recuperados em cada grupo.

A proteína Ly6.5 também foi avaliada na forma de vacina de DNA pelo pós-doc Leonardo Paiva Farias durante o seu doutorado. Foram realizadas duas imunizações com 50 µg do vetor pTARGET expressando a proteína Ly6.5 e desafio com 100 cercárias, gerando proteção de 20% com diferença estatística, usando o teste T de student. O perfil da resposta imune obtido foi Th1, apresentando elevado número de spots de IFN-γ e reduzidos anticorpos específicos (dados não apresentados).

4.5 DIFE9 (SmVal7)

4.5.1 Caracterização

A sequência de aminoácidos do gene Dife 9 apresenta peptídeo sinal e domínio SCP (Sperm coating protein) que inclui subfamílias Tpx-1, Ag5, PR-1 e Sc7 quando analisada pelos programas Signal P e SMART, respectivamente (Figura 30). A função biológica dos membros dessa família ainda não está bem caracterizada. A proteína apresenta 34% de identidade com o Antígeno 5 (venom allergen 5) de vespa e 25% de identidade com o candidato vacinal NaASP-2 (da subfamília PR-1) de *Necator americanus*. O gene está entre os 12 membros da família SCP de *Schistosoma mansoni* que possui peptídeo sinal e foi nomeado de SmVal7 (Venon allergen-like) no trabalho de Chalmers et al. (2008). Alguns

desses membros estão sendo pesquisados em nosso laboratório pelo pós-doc Leonardo Paiva Farias para caracterizar melhor esta família, incluindo a investigação de potenciais reações alergênicas provocadas por esses antígenos. Ele tem visto que alguns deles têm a função de recrutar eosinófilos e macrófagos no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com a proteína.

A)



B)

```

706 aacagttttaaactaaactatcaactcaacatggttttataccatacaagtcaattttatt
    N S L K L N Y Q L N M F Y T I Q V N F I
646 attttcttggtgctaggatcacatttacgaaaatctagcctatagatgggtatacacaanaac
    I F L V L G Y I Y E N L A Y R W Y T Q N
586 tctgaattatttagctttacacaatgcatatagaaggaatataaaaatggtaatgttcgt
    S E L L A L H N A Y R R N I K Y G N V R
526 gatcaaccacaagcagatgagatgcttaaactaacatggagtcataaattggctgaaatg
    D Q P Q A M S M L K L T W S H K L A E M
466 gctcaggaatgggcattacaatgtgtgccaagacgaagtaacatgactatgaggaaaggt
    A Q E W A L Q C V P R R S N M T M R K G
406 tcgaaatggacatatgttggcagagtatcgctttcgttctctaaagtttagacaagcgca
    S K W T Y V G Q S I A F V P K V R Q A A
346 tctgtatggtttgaacaacacaagaattacaatttcgaaaacaatacttgtgaggcaaat
    S V W F E Q H K N Y N F E N N T C E A N
286 aaaactgtgcagattacaacaattagcttttcgccgataccacacatattggatgtggt
    K T C A D Y K Q L A F A D T T H I G C G
226 tatgcaatggttttaattcaacaggactagataaagttttgtgttgcaactatgga
    Y A M C F N L T G L D K V F V V C N Y G
166 ccagggggtaaatatgccaatagacaaccctatgatcctatataatcctgaagatccatac
    P G G K Y A N R Q P Y D P I Y P E D P Y
106 tacctccatggaatttaacctgtaataataactgatggtcatttatacaaatcagaataaa
    Y L P * I * P V N I T D G H L Y K S E *
46  tgtttgaatgaaatttcataataatatttaatttttaacacaat 1
    C L N E I S Y K Y L I F L T Q

```

Figura 30. Caracterização do gene Dife9 (SmVal7). A) Representação esquemática do domínio proteico SCP e do peptídeo sinal. B) Sequência de cDNA do gene SmVal7 e de seus correspondentes aminoácidos. Legenda: (REALCE) corresponde a porção de peptídeo sinal da proteína; (REALCE) corresponde ao domínio proteico SCP (“Sperm coating protein”) e (Letras minúsculas em negrito) corresponde à sequência nucleotídica clonada no vetor.

4.5.2 Expressão e purificação da rSmVal7

O gene SmVal7 foi clonado no plasmídeo pAE-6His. Bactérias da cepa BL21 (SI) foram transformadas com o vetor pAE-SmVal7 e induzidas com NaCl. Os extratos totais da bactéria antes e após a indução foram analisados em gel de SDS-PAGE, como mostra a Figura 31A. A expressão da proteína recombinante rSmVal7 apresentou um pouco de escape

de expressão antes da indução, quando comparado ao controle (bactéria transformada com pAE-6His vazio e induzida sob as mesmas condições).

Para a purificação da proteína, o clone foi expandido em 300 mL de cultivo. Após a lise das células no French Press, os corpúsculos de inclusão foram lavados com diferentes concentrações de uréia e por último com guanidina 6 M. Como mostra a Figura 31B, a proteína encontra-se em pequena quantidade na forma solúvel (sobrenadante), sendo solubilizada um pouco em uréia 8M e majoritariamente em guanidina 6 M.

A proteína solubilizada em 10 mL de guanidina 6 M foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-sepharose. A eluição foi feita em gradiente de concentração até 500 mM de imidazol e o pico de absorbância correspondente a eluição da proteína está entre 50-70 % de imidazol 500 mM (dados não apresentados). As frações recuperadas na eluição foram analisadas em gel de SDS-PAGE (Figura 31C). As frações de eluição que continham a proteína foram reunidas em uma membrana de diálise de 3 kDa para o renovelamento da proteína de forma lenta, ou seja, diluindo a concentração da guanidina. No entanto, a proteína precipitou durante a diálise, mesmo na presença de glicerol 3% e DTT 2,5 mM (usado para diminuir a formação de pontes de sulfeto).

A proteína rSmVal7 purificada e precipitada foi administrada em ratas com diferentes formulações de adjuvante (Adjuvante de Freund ou Al(OH)₃) para a obtenção dos anticorpos policlonais. O título dos anticorpos anti-SmVal7 nos soros dessas ratas apresentou-se muito baixo, de 1:80 (dados não apresentados).

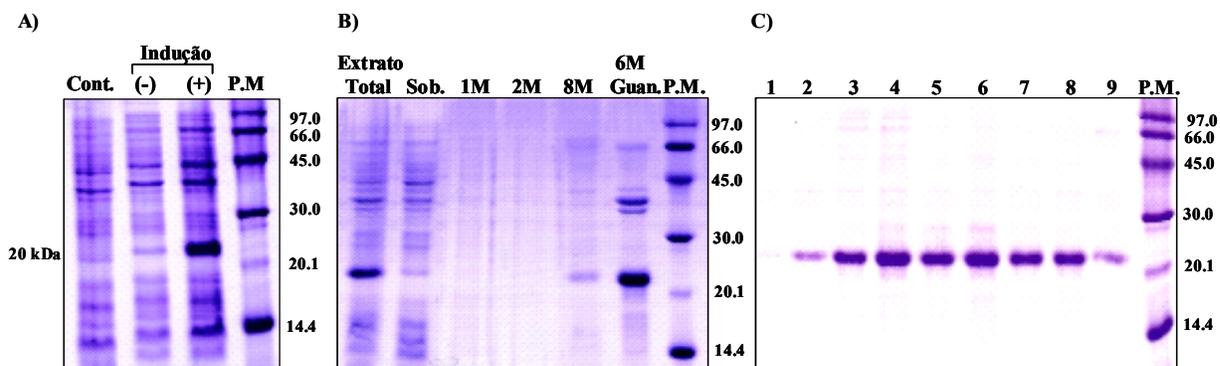


Figura 31. Expressão e purificação da proteína rSmVal 7 em *Escherichia coli*. A) Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% do extrato total da cepa de *E. coli* BL21 (SI) transformada com pAE-SmVal7, antes (-) e após (+) a indução com IPTG. O controle é a cepa de *E. coli* transformada com o vetor pAE vazio e induzida com IPTG. B) Gel de SDS-PAGE 15% do extrato total, sobrenadante e das frações de solubilização dos corpúsculos de inclusão do lisado da cepa de *E. coli* BL21 (SI), transformada com pAE-SmVal7. Os corpúsculos foram lavados em diferentes concentrações de uréia (1 M, 2 M e 8 M) e em guanidina 6M. C) Gel de SDS-PAGE 15% das frações de eluição obtidas da cromatografia de

afinidade em coluna de Ni-Sepharose dos corpúsculos de inclusão contendo a rSmVal7 e solubilizados em guanidina 6 M.

Na tentativa de conseguir a proteína recombinante na forma solúvel, o gene SmVal7 com códons otimizados para expressão em *Pichia pastoris* foi adquirido, clonado em pPICZ α e eletroporado na levedura. Vários clones foram analisados quanto à expressão da proteína recombinante rSmVal7 por Western blot, tanto o sobrenadante da cultura quanto o precipitado de levedura, usando anti-His. No entanto, não foi visto nenhum clone de levedura expressando a proteína (dados não apresentados).

4.5.3 Análise do perfil de expressão da proteína SmVal7

Mesmo com o título baixo, o soro anti-SmVal7 reconheceu a proteína recombinante e a proteína nativa no extrato total de ovo (massa molecular predita de 22.6 kDa) (Figura 32). Um ponto de marcação também foi encontrado no extrato total de miracídio, ainda não definido se específico.

A proteína não foi encontrada nos extratos protéicos de esquistossômulos *in vitro* de 7 dias como se esperava, uma vez que o gene é diferencialmente expresso nesse estágio, como visto por microarray (DILLON et al., 2006) e RT-PCR em tempo real (FARIAS et al., 2010) e que a proteína foi imunolocalizada no tegumento de esquistossômulos inteiros (dados apresentados a seguir).

Nenhuma marcação foi encontrada testando o Western blot dos diferentes extratos protéicos com soro de rato pré-imune e soro de rato com infecção crônica (dados não apresentados).

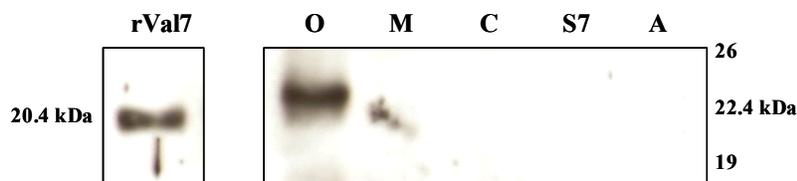


Figura 32. Perfil de expressão da proteína SmVal 7 nos estágios do parasita. Western blot contendo a proteína recombinante rSmVal7, extratos protéicos totais de ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo *in vitro* de 7 dias e verme adulto incubado com soro anti-SmVal7. O anticorpo primário (anti-Val7) foi usado na proporção de 1:200 e o anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase) na proporção de 1:5000. Legenda dos extratos protéicos totais: O: ovo; M: Miracídio; C: cercária; S7: Esquistossômulo *in vitro* de 7 dias; A: verme adulto.

Devido ao título de anticorpos baixo, outra estratégia de imunização foi utilizada, camundongos foram imunizados com rSmVal7 e adjuvante Titermax (Sigma) na primeira dose, e somente a proteína nas outras duas doses com intervalo de 15 dias cada. Dessa forma, foram alcançados títulos superiores de anticorpos anti-SmVal7, em torno de 1:15.000, e foi refeito novamente o Western blot analisando o perfil de expressão da proteína ao longo dos estágios do parasita (Figura 33). Bandas com tamanho não esperado aparecem nos estágios de ovo e miracídio, possivelmente reatividade cruzada com a SmVal9 (Leonardo Paiva Farias, comunicação pessoal)¹. Outras bandas com tamanho ainda maior aparecem em esquistossômulos e vermes adultos, o que poderia ser agregação da SmVal7.

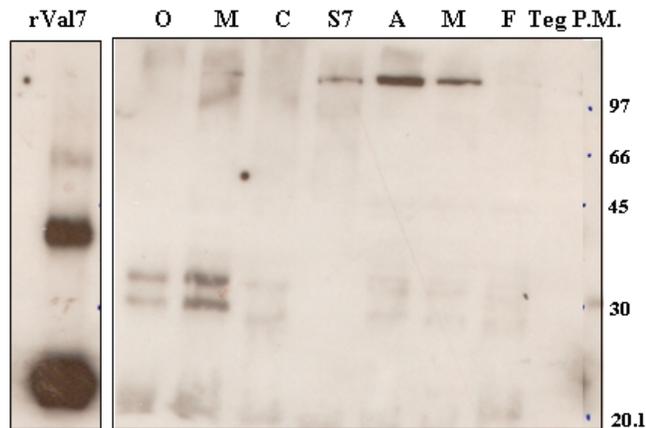


Figura 33. Perfil de expressão da proteína SmVal7 nos estágios do parasita. Western blot contendo extratos protéicos totais de ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo *in vitro* de 7 dias, verme adulto, macho, fêmea e a proteína recombinante rSmVal7 incubado com soro anti-SmVal7. O anticorpo primário (anti-SmVal7) foi usado na proporção de 1:3.000 e o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e adsorvido) na proporção de 1:3.000. Legenda dos extratos protéicos totais: O: ovo; M: miracídio; C: cercária; S7: esquistossômulo *in vitro* de 7 dias; A: verme adulto; M: macho; F: fêmea e Teg: tegumento.

Uma vez que a proteína possui peptídeo sinal e poderia estar sendo secretada, extrato protéico das proteínas secretadas no meio de cultura dos esquistossômulos de 3 h foi obtido e analisado por Western blot. No entanto nenhuma marcação foi encontrada. A fração de vômitos de vermes adultos em meio de cultura por algumas horas foi analisada e também não foi encontrada marcação (dados não apresentados).

4.5.4 Imunolocalização da proteína SmVal7

Secções de vermes adultos (7 μ m) incubados em OCT, ovos, miracídios, cercárias e esquistossômulos *in vitro* de 3 h, 7 e 21 dias fixados em paraformaldeído foram avaliados

¹ FARIAS, Leonardo Paiva. São Paulo, 2011.

para tentar imunolocalizar essa proteína com função desconhecida. Como esperado pelos resultados do Western blot, o ovo ficou marcado na casca e internamente, na região onde fica o miracídio. Analisando o miracídio, a proteína está presente na sua superfície. E surpreendentemente, a proteína encontra-se no tegumento dos esquistossômulos, indicando ser uma proteína exposta e possível candidato vacinal (Figura 34). Quando cercárias e cortes de vermes adultos foram analisados, apenas fluorescência inespecífica foi observada quando incubadas com soro anti-SmVal7 ou soro de rato pré-imune (dados não apresentados). Imunolocalização usando o soro anti-SmVal7 gerado recentemente, o qual apresenta títulos maiores de anticorpos, não foi realizada.

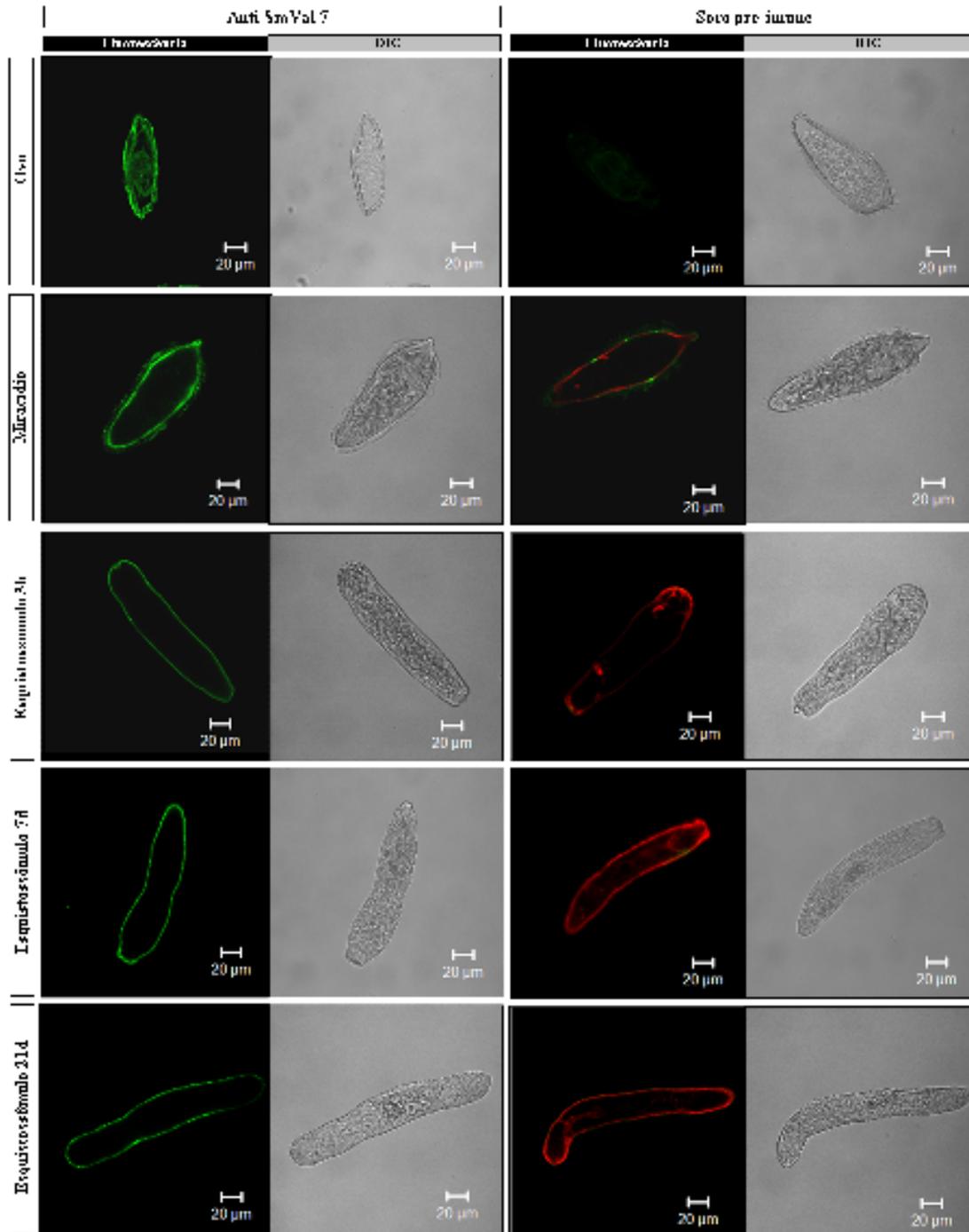


Figura 34. Imunolocalização da proteína SmVal7 em estágios do parasita. Imagens de microscopia confocal de fluorescência e suas correspondentes imagens em contraste diferencial de fase (DIC) de cortes transversais de ovos e de parasitas inteiros fixados em paraformaldeído (miracídios e esquistossômulos *in vitro* de 3 horas, 7 e 21 dias). O anticorpo primário (anti-Val7) foi utilizado na proporção 1:40 e o secundário (anti-IgG rat Alexa fluor 488) 1:200, com adição de foloidina/rodoamina em todos os estágios analisados, com exceção do ovo.

4.5.5 Ensaio de hibridização *in situ*

Na tentativa de esclarecer a localização da proteína SmVal7 e evitar ensaios que possam sugerir reatividade cruzada, o doutorando Henrique Krambeck Roffato em colaboração com o Prof. Alan Wilson, da Universidade de York, realizou os experimentos de hibridização *in situ* para investigar a localização do RNAm do gene SmVal7 em cercária, esquistossômulo de 10 dias e verme adulto, e assim tentar sugerir uma possível localização ou função da proteína SmVal7. É possível observar pela Figura 35, que os transcritos do gene SmVal7 estão localizados em aglomerados de células na região da glândula esofágica de cercárias e esquistossômulos, e nas glândulas esofágicas propriamente ditas de vermes adultos macho e fêmea, fazendo desse gene um importante alvo vacinal.

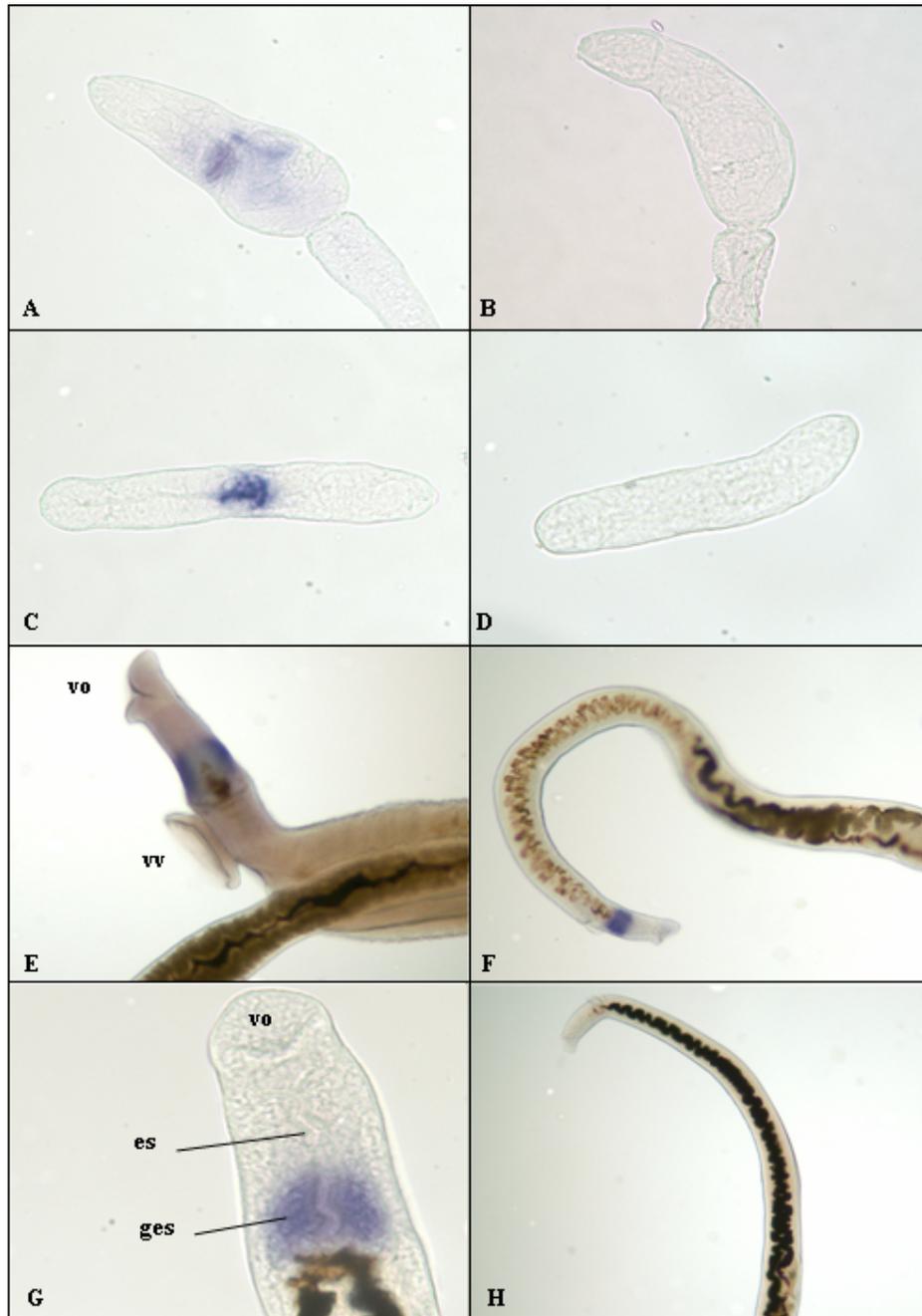


Figura 35. Hibridização *in situ* de parasitas inteiros mostrando a expressão do gene SmVal7 nas glândulas esofágicas. Cercárias, esquistossômulos *in vitro* de 10 dias e vermes adultos macho e fêmea foram hibridizados com a sonda fluorescente para o gene SmVal7 e o gene Chorion como controle. **A)** Cercária mostrando o transcrito na região da glândula esofágica. **B)** Cercária hibridizada com o controle negativo. **C)** Esquistossômulo mostrando o transcrito na região da glândula esofágica. **D)** Controle negativo em esquistossômulo. **E)** Casal de macho e fêmea mostrando a marcação na glândula esofágica do macho. **F)** Marcação do transcrito na glândula esofágica da fêmea. **G)** Aumento maior da extremidade anterior da fêmea, mostrando a ventrosa oral, o esôfago e a marcação nas

glândulas esofágicas. **H**) Controle negativo em verme adulto fêmea. Legenda: vo (ventosa oral), vv (ventosa ventral), es (esôfago), ges (glândulas esofágicas).

4.5.6 Imunização com a proteína recombinante rSmVal7

4.5.6.1 Resposta imune humoral

A produção de IgG total anti-SmVal7 foi quantificada por ELISA nas quatro sangrias realizadas durante o experimento de imunização e desafio do grupo de camundongos imunizado com a proteína rSmVal7 e do grupo controle (imunizado com salina e adjuvante de Freund). A proteína apresentou-se pouco imunogênica, como visto anteriormente quando administrada em rato. O nível de IgG total atingiu concentrações de aproximadamente 280 ng/mL até o final do experimento (Figura 36). Devido às baixas concentrações de anticorpos, a concentração e a razão IgG1 e IgG2a não foram analisadas.

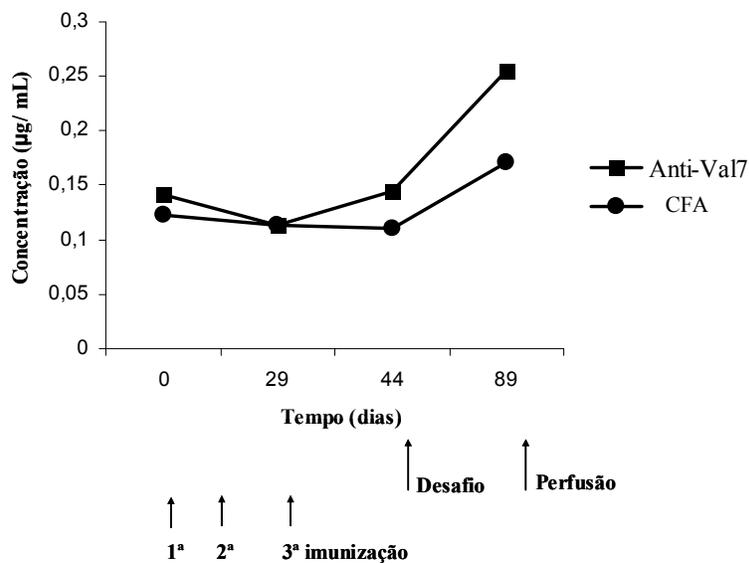


Figura 36. Análise da concentração de IgG total anti-SmVal7 durante o regime de imunização e desafio dos animais. Os soros dos animais foram agrupados em “pool” e a concentração foi determinada pela curva de IgG recombinante. CFA é o soro dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund.

4.5.6.2 Resposta imune celular

Os splenócitos dos animais imunizados e desafiados foram mantidos por 12 h na placa de ELISPOT e a secreção das citocinas IFN- γ e IL-5 foram analisadas através da contagem de “spots”. Como visto nas Figura 37A e B, a quantidade é comparável para as duas citocinas, sendo o número de “spots” para IL-5 um pouco mais elevado.

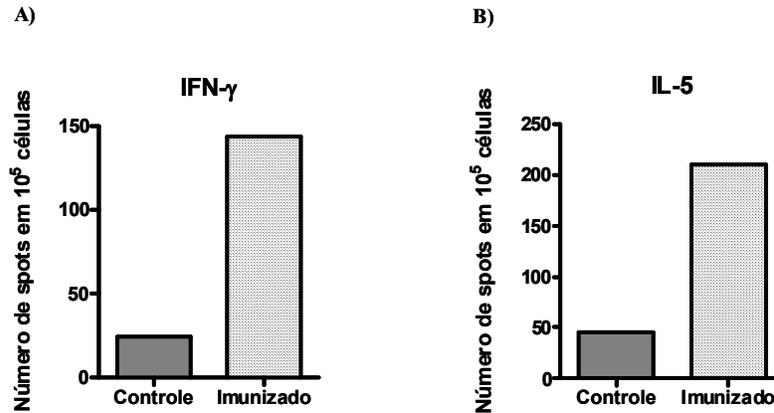


Figura 37. Análise da resposta imune celular por ELISPOT da cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com rSmVal7. **A)** Análise da resposta imune celular de IFN- γ por ELISPOT. **B)** Análise da resposta imune celular de IL-5 por ELISPOT. Controle é o “pool” das células do baço dos animais que receberam salina e adjuvante de Freund. Imunizado é o “pool” de células dos animais que receberam rSmVal7 e adjuvante. As células foram estimuladas com a proteína rSmVal7 e os seus valores foram subtraídos das células que não foram estimuladas.

4.5.6.3 Imunização com a proteína rSmVal7

O potencial protetor do antígeno rSmVal7 foi avaliado em dois experimentos. No entanto, não houve redução da carga parasitária nos camundongos imunizados com a proteína recombinante em 3 doses na presença de CFA, após o desafio com 100 cercárias e perfundidos após 45 dias (Figura 38).

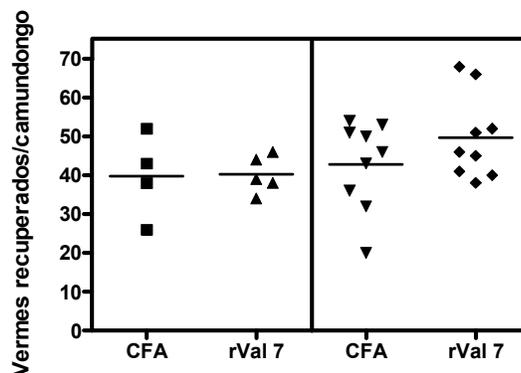


Figura 38. Gráfico de dispersão do número de vermes recuperados em camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína recombinante rSmVal7. CFA: grupo de camundongos imunizados com salina e adjuvante; (—) média do número de vermes recuperados em cada grupo.

4.6. ANEXINA

4.6.1 Caracterização de uma nova Anexina de *Schistosoma mansoni*

Além dos genes diferencialmente expressos escolhidos pelo número de transcritos aumentado em esquistossômulo quando comparado a cercária, outro gene foi escolhido para ser estudado, usando os dados de microarranjo de Dillon et al. (2006) como técnica para determinar a expressão diferencial. Foi selecionada uma nova anexina de *Schistosoma mansoni* que também é diferencialmente expressa no estágio de esquistossômulo. O gene Anexina (SmAE 612391.1) não está entre os 402 genes diferencialmente expressos (Figura 9), porque foi obtido através da montagem de seis transcritos vindos de bibliotecas de cDNA de vermes adultos e apenas três de esquistossômulos, enquanto nenhum de cercárias.

A sequência de aminoácidos da Anexina apresenta quatro domínios repetitivos ANX (anexina) e uma região N-terminal variável que confere propriedades específicas para cada anexina. A Anexina é uma proteína de superfície de membrana, da classe das proteínas que se ligam a fosfolipídeos na presença de cálcio. Esta família de proteínas tem uma variedade de subclasses encontradas em diferentes organismos e tem uma ampla diversidade funcional. Pode estar envolvida nos processos de estabilização da membrana, na regulação membrana-citoesqueleto, em atividades anticoagulantes, antiinflamatórias ou fibrinolíticas, acreditando-se ter um papel importante na sobrevivência do parasita no hospedeiro (GERKE; MOSS, 2002; ZHANG et al., 2007).

A proteína foi encontrada no tegumento do parasita por proteoma, associada à membrana plasmática e é uma das proteínas mais abundantes expostas na superfície do parasita (BRASCHI; WILSON, 2006; VAN BALKOM et al., 2005), similar a localização das proteínas Sm29 e TSP-2 que conferiram proteção de 50-60%. Ela também possui similaridade com um candidato vacinal de *Taenia solium*, uma anexina de *Cysticercus cellulosae* (fase larval de *Taenia solium*) (HONGLI et al., 2002).

A sequência de aminoácidos da nova Anexina foi nomeada de Anexina 2 e alinhada com anexinas de outros organismos (Figura 39) para a visualização da similaridade entre elas quanto aos domínios e sítios de ligação ao cálcio. A Anexina 2 possui um sítio de ligação ao cálcio tipo II (caracterizado pelo motivo “MK/RG/RXGT (38 residues) D/E) e tipo III (motivo GXGTDE) nos domínios 1 e 4 (diferenciados por letras vermelhas e verdes). No entanto, no domínio 1, o sítio de ligação ao cálcio tipo II apresenta algumas modificações como perda do aminoácido Gli e um intervalo de 42 resíduos. Nos domínios 2 e 3 não foi encontrado nenhum sítio de ligação a cálcio.

A perda dos sítios de ligação ao cálcio também foi identificada no ortólogo de *S. japonicum* (domínio 2 e 3), na anexina humana A2 (domínio 1), na anexina de *Arabidopsis* ANXAt1 (domínios 2 e 3) e na anexina de *M. sebastis* (domínio 3). As anexinas de *S. mansoni* e *S. bovis* apresentaram sítios em todos os domínios. Um motivo KGD tem substituído a perda dos sítios de ligação ao cálcio, como discute Morgan et al. (2004). Esse motivo foi encontrado no domínio 3 da Anexina 2 de *S. mansoni* e seu ortólogo em *S. japonicum*.

Outra característica obtida pelo alinhamento foi o sítio de ligação a actina caracterizado pelo motivo C-terminal LLYLCGGDD presente exclusivamente em anexinas de animais e o motivo IRI presente em anexinas de plantas e animais (MORTIMER et al., 2008). A anexina humana A2 apresenta os dois motivos e a Anexina 2 de *S. mansoni* e seu ortólogo em *S. japonicum* contém somente o motivo IRI.

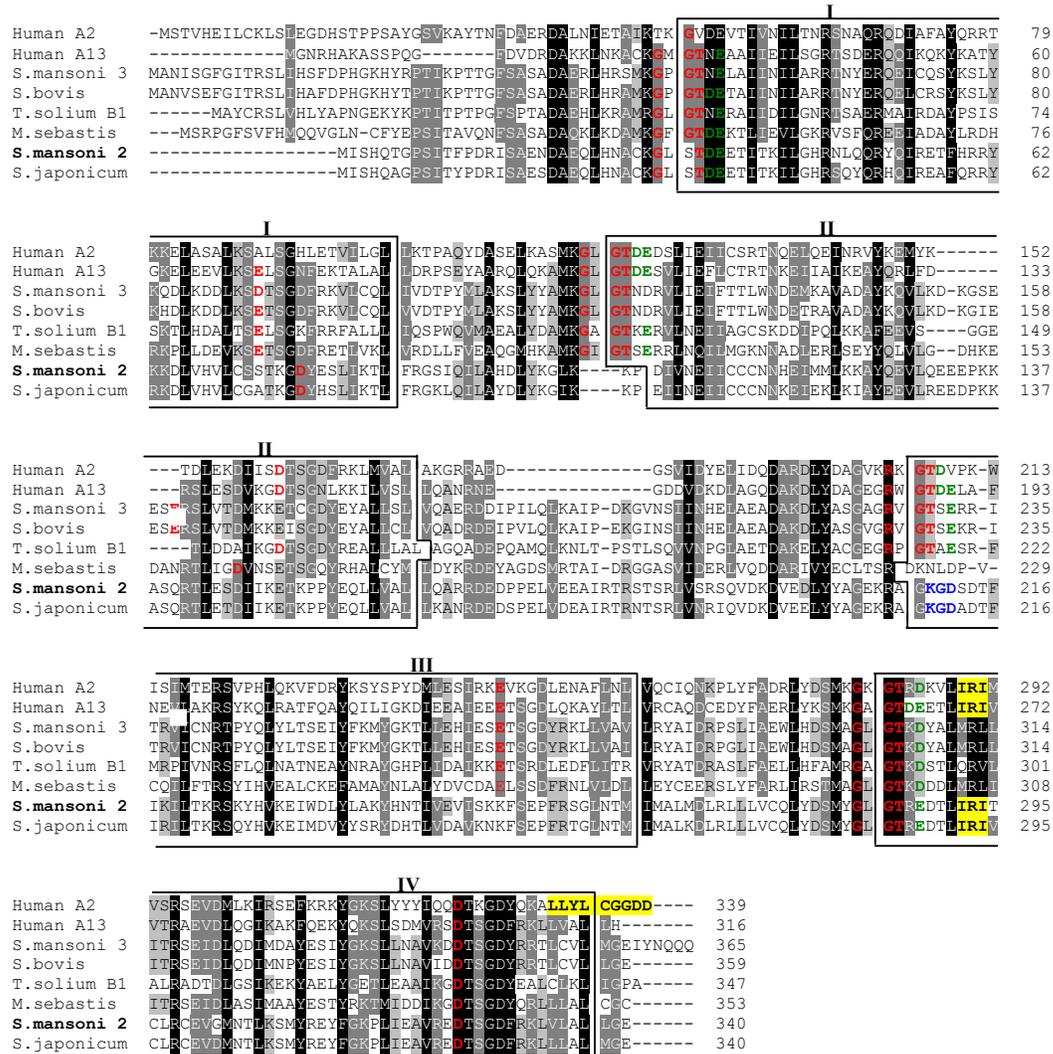


Figura 39. Alinhamento múltiplo por ClustalX da sequência completa de aminoácidos da Anexina 2 de *Schistosoma mansoni* (FJ860253) em relação às anexinas humanas A2 (P07355.2) and A13 (P27216.2), os ortólogos de *Schistosoma japonicum* (AAW24721), *Schistosoma bovis* (ACC78610.1), *Schistosoma mansoni* (AAC79802), *Microcotyle sebastis* (ACD93001), *Taenia solium* (AF147955_1) and *Arabidopsis* (NP_174810.1). As regiões com alta identidade e similaridade entre as sequências de anexina estão apresentadas em colunas pretas e cinzas, de acordo com o algoritmo do Clustal X. Legenda: os quarto domínios repetitivos de ANX estão delimitados pelas caixas; a seqüência de aminoácidos que representa o sítio de ligação a cálcio tipo II está representada em letras vermelhas; a seqüência de aminoácidos que representa o sítio de ligação a cálcio tipo III está representada em letras verdes e vermelhas; a seqüência de aminoácidos que representa o motivo de ligação a actina está representada por letras pretas preenchida por amarelo.

4.6.2 Estratégia de clonagem e expressão da Anexina 2

O gene inteiro da Anexina 2 foi clonado no vetor pAE-6His e as cepas de *E. coli* BL21 (SI) e (DE3) foram transformadas com estes plasmídeos. No entanto, a proteína recombinante rAnexina2 foi expressa em pequenas quantidades, detectáveis apenas por Western blot usando anti-His tag (dados não apresentados). Devido aos baixos níveis de expressão, a purificação da proteína recombinante completa não foi possível. Sendo assim, fragmentos da proteína foram construídos da seguinte forma:

- AneI-II: a região N-terminal que dá função à proteína e os domínios 1 e 2;
- AneII-III: os domínios 2 e 3;
- AneIII-IV: os domínios 3 e 4;
- AneI-II-III: os domínios 1, 2 e 3.

No entanto, somente as construções AneI-II (Figura 40A) e AneII-III (Figura 40B) mostraram significantes níveis de expressão após a indução com NaCl.

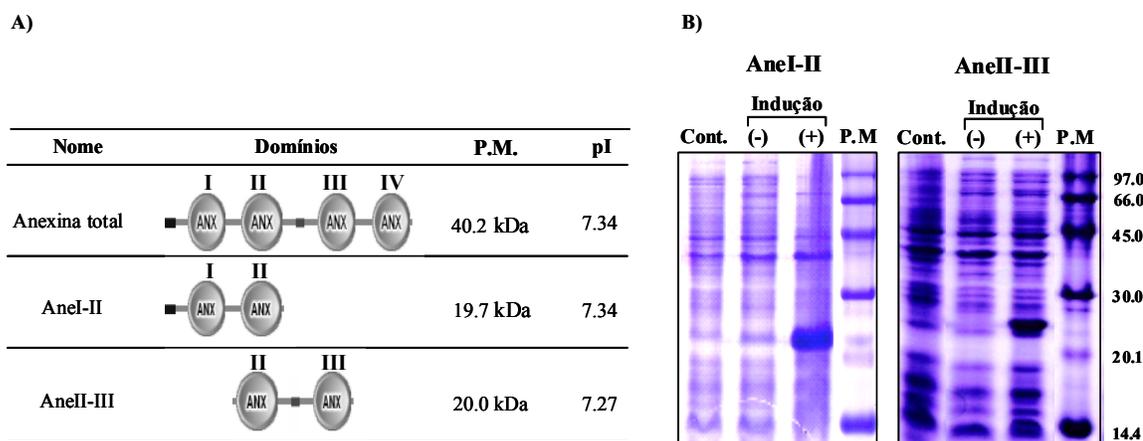


Figura 40. Expressão dos fragmentos de Anexina 2. **A)** Tabela contendo a nomenclatura e descrição dos fragmentos da proteína. **B)** Gel de SDS-PAGE (15%) dos extratos celulares de *E. coli* BL21 (SI) transformada com pAE-AneI-II antes (-) e depois (+) da indução com NaCl. **C)** Gel de SDS-PAGE (15%) dos extratos celulares de *E. coli* BL21 (SI) transformada com pAE-AneII-III antes (-) e depois (+) da indução com NaCl. Controle é o extrato celular de *E. coli* transformada com vetor pAE vazio.

4.6.3 Purificação da proteína recombinante rAneI-II

Os clones expressando as proteínas recombinantes rAneI-II e rAneII-III foram expandidos em volumes maiores de meio de cultura e este lisado no French press para separar nas frações de sobrenadante e corpúsculos de inclusão. As proteínas encontraram-se majoritariamente nos corpúsculos de inclusão e foram solubilizadas em 8M uréia. A Figura 41

mostra as frações de extrato total e sobrenadante da AneI-II. A AneII-III mostrou o mesmo perfil entre as lavagens e solubilização em 8 M uréia (dados não apresentados).

A proteína AneI-II solubilizada em 8 M uréia foi renaturada em tampão de renovelamento por gotejamento a 4 °C. Esse tampão foi filtrado e transferido para a coluna de Ni-Sepharose, onde foi realizada a cromatografia de afinidade. A proteína foi eluída em gradiente de imidazol até 500 mM em um volume de 30 mL. A Figura 41 apresenta as frações obtidas durante a eluição, mostra a proteína após o renovelamento e a filtração; o “flow through” e a solução denaturante de 8 M uréia injetada na coluna no final da cromatografia para verificar se a proteína precipitava. Conforme o gel da figura, pode-se notar que a proteína foi recuperada durante a cromatografia e não houve perda da proteína durante as etapas de purificação. No entanto, quando as frações foram reunidas e submetidas à diálise em PBS (pH 7.4), ocorreu uma substancial precipitação da proteína. A concentração da proteína após a purificação foi de aproximadamente 800 ng/μL. A proteína rAneII-III foi purificada sob condições desnaturantes (8 M uréia) por cromatografia de afinidade e as frações da eluição foram reunidas e submetidas ao renovelamento por diálise lenta. No entanto, também houve precipitação da proteína e a concentração final foi de aproximadamente 500 ng/μL (dados não mostrados). Anticorpos policlonais foram obtidos com a imunização de ratas com as proteínas rAneI-II e rAneII-III e os adjuvantes de Freund ou Titermax. Os títulos dos dois anticorpos chegaram a 1:80.000.

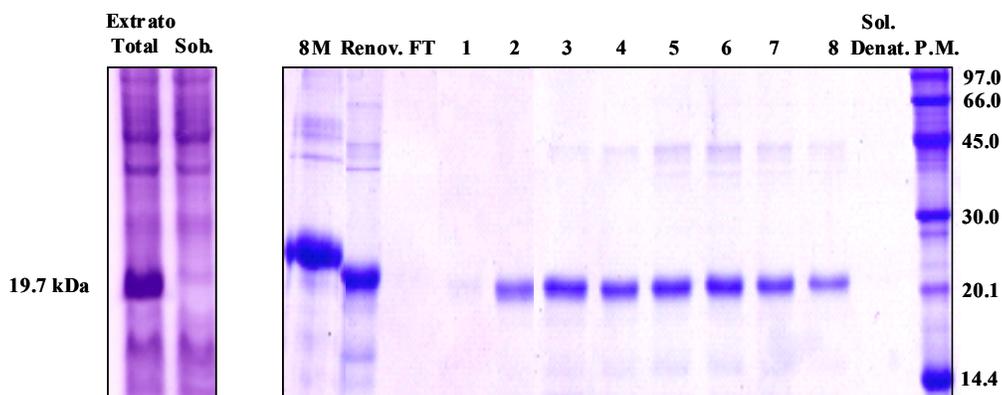


Figura 41. Gel de SDS-PAGE (15%) contendo as frações da purificação da proteína rAneI-II por cromatografia de afinidade. Legenda: 8 M: solubilização dos corpúsculos de inclusão em 8 M uréia; Renov: solução contendo a proteína rAneI-II renovelada e filtrada; FT: flow-through; Linhas 1-8: frações de eluição; Sol. Denat: solução desnaturante 8M uréia.

4.6.4 Perfil da expressão do mRNA e da proteína Anexina 2

A diferença de expressão do gene Anexina 2 entre os estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Os resultados da Figura 42A confirmam que o nível de expressão do mRNA é elevado no estágio de esquistossômulo quando comparado ao de cercária, sugerindo que o gene tem uma importância na transição da cercária de vida livre para o estágio de parasitismo do esquistossômulo. Essa elevada expressão é mantida no estágio de verme adulto quando comparado a cercária. A expressão tem uma aparente diminuição no estágio de verme adulto, mas sem diferença estatística significativa.

Quando os extratos protéicos de ovos, miracídeos, cercárias, esquistossômulos e vermes adultos foram analisados por Western blot usando anti-AneI-II, a proteína mostrou-se ser expressa em todos os estágios do parasita. No entanto, menores níveis de expressão foram observados em ovos e miracídeos, alguma expressão em cercárias e esquistossômulos, e altos níveis em vermes adultos. Quando o tegumento de vermes adultos e o corpo dos vermes adultos desnudos foram isolados pelo método de congelamento/descongelamento para também serem analisados por Western blot, a proteína pareceu ser mais abundante no tegumento de vermes adultos do que nos vermes desnudos (Figura 42B).

Quando o tegumento foi separado em frações contendo proteínas solúveis do sincício (sobrenadante) e proteínas de membrana (precipitado) e analisadas por Western blot usando anti-AneI-II, a proteína Anexina 2 foi encontrada principalmente no precipitado, indicando que a proteína está ligada ou associada à membrana plasmática. Quando os vermes adultos foram incubados com 10 mM Ca^{+2} , a fração das membranas de superfície (precipitado) parece estar enriquecido pela proteína, indicando que a proteína tem a capacidade de ligar-se à membrana aumentada na presença de cálcio. Adicionalmente, na presença de 10 mM de EDTA/EGTA, a proteína Anexina 2 mostrou um efeito oposto, estando presente em quantidades similares na fração solúvel (sincício) e insolúvel (membranas) (Figura 42C). Essas propriedades são melhores observáveis por densitometria óptica das bandas (Gráfico da Figura 42C).

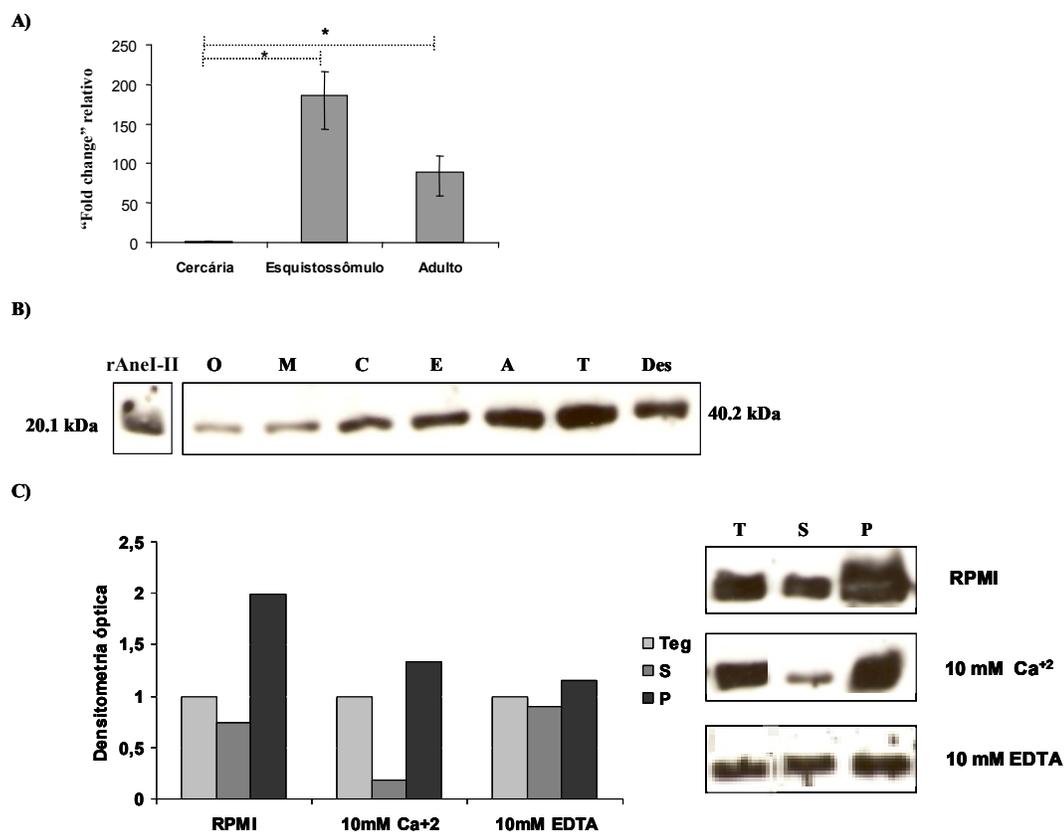


Figura 42. Perfil da expressão do mRNA e da proteína Anexina 2. A) Análise da expressão do gene Anexina 2 nos estágios de cercária, esquistossômulo e verme adulto. RNA total desses estágios foram transcritos em cDNA e analisados por RT-PCR em tempo real para quantificar as diferenças do nível de expressão dos genes entre os estágios, usando a actina como gene normalizador. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão; * Diferença estatística por ANOVA e Tukey. B) Western blot das frações do tegumento de vermes adultos incubados com meio RPMI, RPMI + 10 mM CaCl_2 e RPMI + 10 mM EDTA/EGTA. C) Quantificação das bandas por densitometria óptica. Legenda: S: sobrenadante e P: precipitado da centrifugação (100xg) do tegumento, respectivamente.

4.6.5 Imunolocalização da proteína Anexina 2

Experimentos de imunolocalização demonstraram que a proteína Anexina 2 está exclusivamente localizada nos tegumentos de esquistossômulos de 3 h, 7 e 21 dias e vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* (Figura 43). A proteína também foi encontrada na superfície de fêmeas (dados não apresentados). A proteína parece altamente expressa nos tegumentos desses estágios do parasita e ausente nos tecidos internos do corpo do parasita. No estágio de cercária, um baixo sinal foi observado.

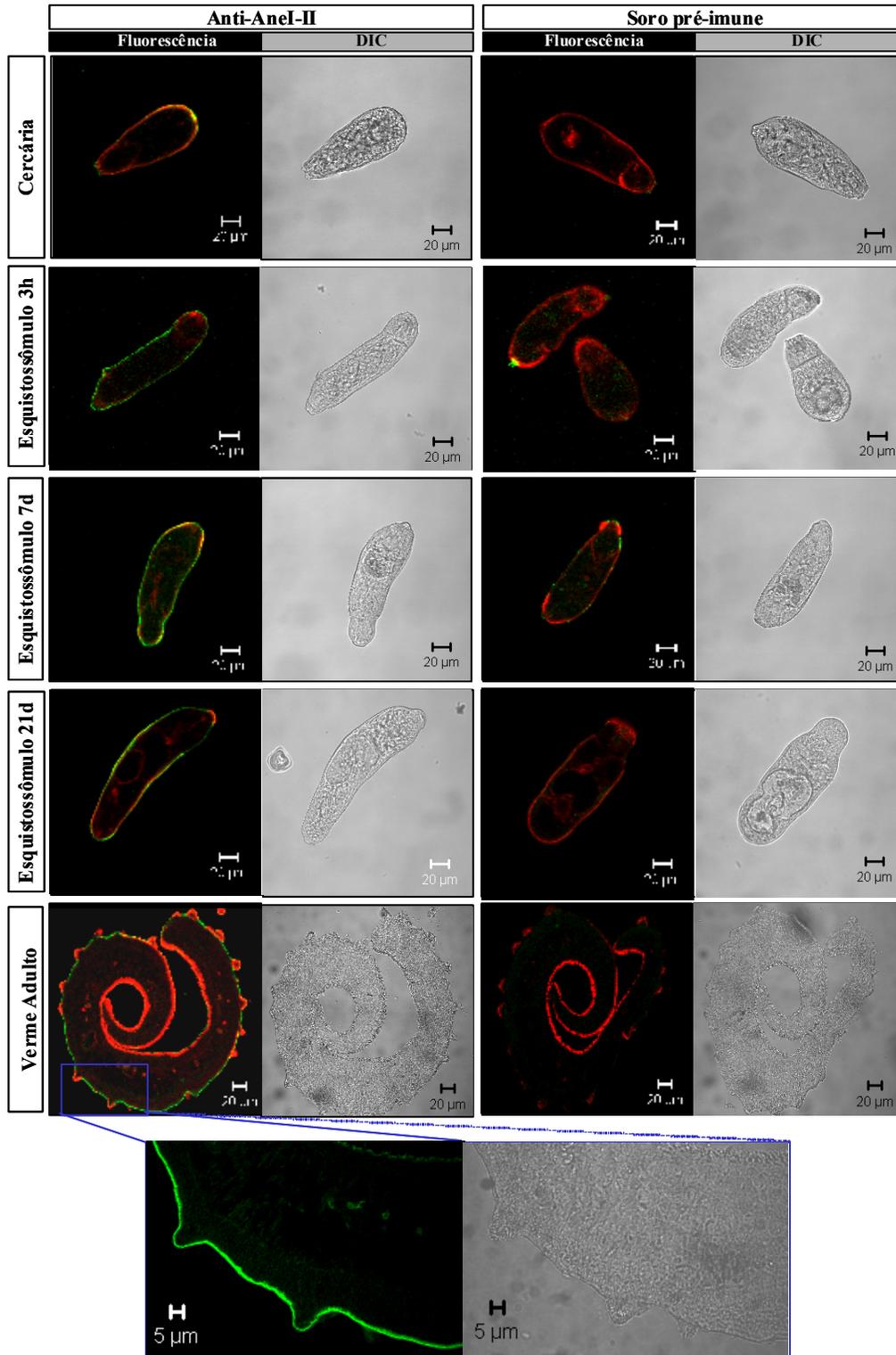


Figura 43. Imunolocalização da proteína Anexina 2 em estágios do parasita. Imagens de microscopia confocal de fluorescência e suas correspondentes imagens em contraste diferencial de fase (DIC) de cortes transversais de vermes adultos emblocados em OCT e de parasitas inteiros fixados em paraformaldeído (cercárias e esquistossômulos *in vitro* de 3 horas, 7 e 21 dias) incubados com anticorpos policlonais anti-Anel-II e o controle com soro pré-imune. O anticorpo primário (anti-Anel-II e soro pré-imune) foi utilizado na

proporção 1:40 e o secundário (anti-IgG de rato conjugado com o fluoróforo Alexa fluor 488) 1:200.

4.6.6 Imunização com as proteínas rAneI-II e rAneII-III

Foram realizados dois experimentos de imunização e desafio com a proteína recombinante rAneI-II e apenas um experimento, avaliando a proteína rAneII-III e em combinação com a rAneI-II. Todos os experimentos foram realizados sob as mesmas condições.

4.6.6.1 Resposta imune humoral

O perfil da concentração de anticorpos IgG totais anti-AneI-II e anti-AneII-III gerados contra as proteínas em quatro sangrias durante o experimento foram analisados por ELISA. As três formulações (rAneI-II, rAneII-III e a combinação das duas) apresentaram o mesmo perfil de produção de IgG, ou seja, ocorrem altas concentrações de anticorpos após a terceira imunização, chegando a 400 - 450 µg/mL; e após o desafio, a concentração diminui drasticamente para aproximadamente 50 µg/mL (Figura 44).

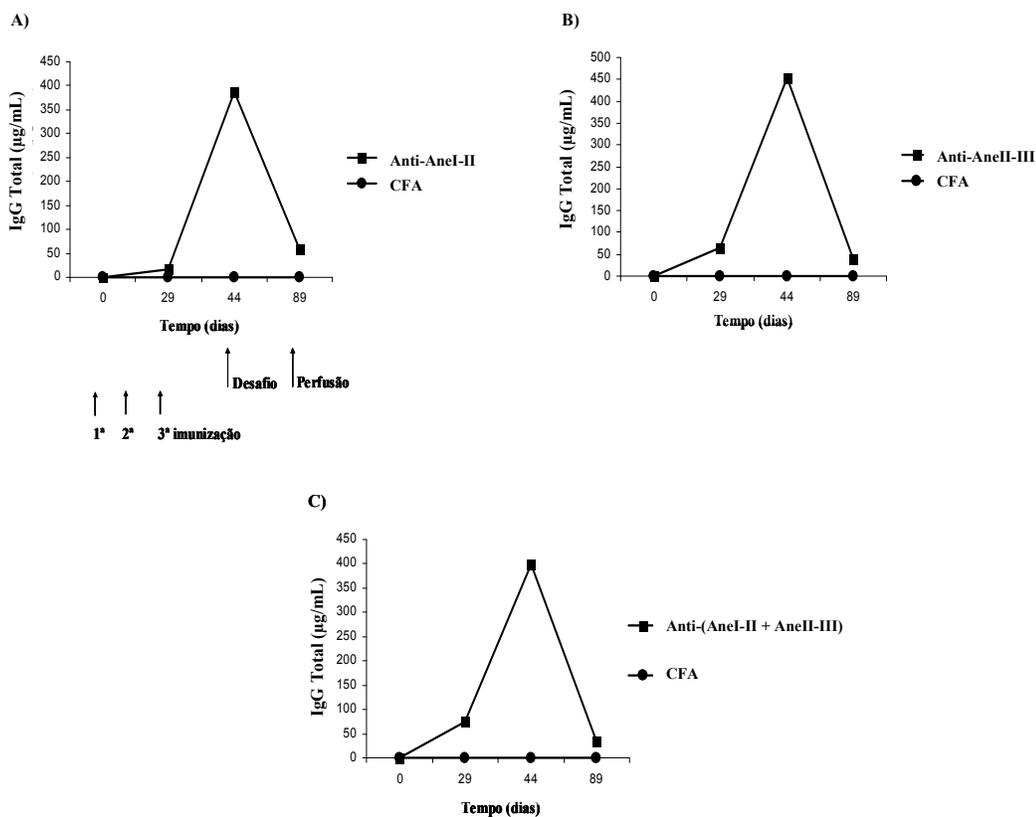


Figura 44. Análise da concentração de IgG total anti-Anexina das sangrias durante o regime de imunização e desafio dos animais com as proteínas rAneI-II, rAneII-III e a combinação. Os soros dos animais foram agrupados em “pool” e a concentração foi determinada pela curva de IgG recombinante. O “coating” foram as proteínas específicas do soro e para o soro anti-(AneI-II+AneII-III), foram realizadas duas quantificações, uma com o “coating” para a proteína rAneI-II e o outro para a proteína rAneII-III, sendo o gráfico representativo de uma delas. CFA é o soro dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund. **A)** Camundongos imunizados com rAneI-II. **B)** Camundongos imunizados com rAneII-III. **C)** Camundongos imunizados com as duas juntas.

Os níveis de IgG1 e IgG2a foram analisados a fim de determinar o tipo de resposta imune que está sendo gerada antes e após o desafio. A Tabela 4 apresenta as concentrações de IgG1 e IgG2a em três sangrias dos grupos imunizados [anti-AneI-II, anti-AneII-III e anti-(AneI-II + AneII-III)] e do controle (soro de rato imunizado com salina e adjuvante). Curiosamente, a imunização com a proteína rAneI-II sozinha induz elevada formação de IgG1 e IgG2a, que diminuem após o desafio, mas a proporção de IgG1 é muito maior em relação a IgG2a após o desafio, gerando um perfil de resposta imune Th2. A imunização com a proteína rAneII-III sozinha ou acompanhada de rAneI-II produz anticorpos IgG1 e IgG2a em proporções comparáveis, gerando um perfil de resposta imune misto Th1/Th2 tanto antes quanto após o desafio.

4.6.6.2 Resposta imune celular

Após a perfusão dos animais imunizados e desafiados, os baços dos animais foram retirados para o ensaio de ELISPOT. Como pode ser visto na Figura 45, os animais imunizados apenas com rAneI-II apresentaram elevada produção de IFN- γ e IL-5 após o desafio, caracterizando uma resposta Th1/Th2. Por outro lado, os animais imunizados com a proteína rAneII-III ou em combinação com rAneI-II apresentaram menor formação de citocinas em geral, um pouco maior para IFN- γ , o que caracterizaria uma resposta Th1 ou um pouco mista Th1/Th2.

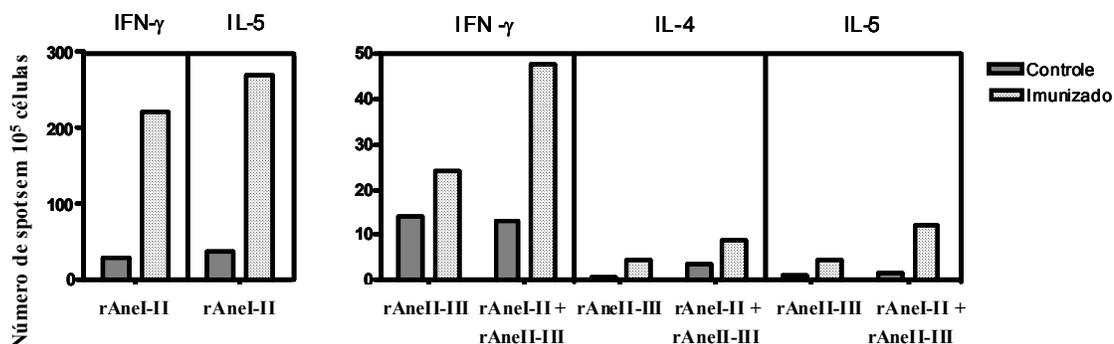


Figura 45. Análise da resposta imune celular por ELISPOT para IFN- γ , IL-4 e IL-5 de esplenócitos de camundongos imunizados com rAneI-II, rAneII-III ou a combinação. Controle é o “pool” das células do baço dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund em relação ao imunizado (AneI-II; AneII-III; AneI-II + AneII-III / Adjuvante de Freund). Os grupos foram estimulados com a proteína recombinante específica e os seus valores foram subtraídos das células que não foram estimuladas.

4.6.6.3 Proteção

Os camundongos imunizados com os diferentes grupo rAneI-II, rAneII-III ou a combinação das duas foram desafiados e tiveram os vermes perfundidos e recuperados. O número de vermes recuperados nos grupos imunizados foi comparado ao dos grupos controles que receberam salina e adjuvante, mas nenhuma das formulações apresentou proteção. A imunização com rAneII-III induziu uma redução de 7,7% na carga parasitária, mas sem diferença estatística. Como é possível ver na Figura 46, rAneI-II não induziu proteção em nenhum dos ensaios, assim como a combinação das duas não foi efetiva em reduzir a carga parasitária.

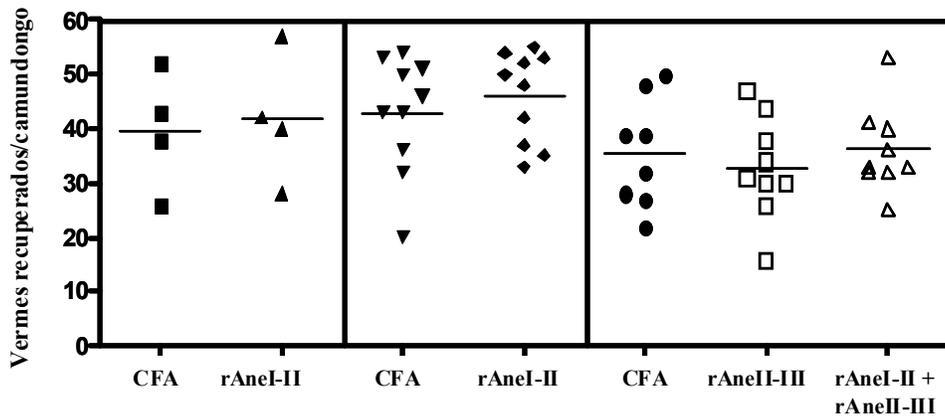


Figura 46. Gráfico de dispersão do número de vermes recuperados em cada camundongo C57BL/6 imunizados com as proteínas rAneI-II, rAneII-III ou a combinação (rAneI-II + rAneII-III). CFA: grupo de camundongos imunizados com salina e adjuvante. (—) média do número de vermes recuperados em cada grupo.

4.7 INVESTIGANDO UMA FUNÇÃO PARA A ANEXINA 2

4.7.1 Desenvolvimento do tegumento

Pelo fato do gene Anexina 2 apresentar: i) expressão aumentada em esquistossômulos (DILLON et al., 2006; TARARAM et al., 2010); ii) sua proteína ter sido encontrada no tegumento por proteoma, associada à membrana plasmática; iii) ser uma das proteínas mais abundantes expostas na superfície (BRASCHI; WILSON, 2006; VAN BALKOM et al., 2005); iv) e também ter sido identificada em experimentos enriquecidos com membranocálice, faz dela uma candidata ideal para funcionar como cimento celular entre o membranocálice e a membrana plasmática (BRASCHI et al., 2006). Assim, o silenciamento desse gene pela técnica de RNAi poderia acarretar um desenvolvimento alterado do tegumento do parasita, sendo prejudicial ao seu desenvolvimento.

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o professor Patrick Skelly da Universidade de TUFTS, Estados Unidos.

4.7.1.1 Mecanismo do RNAi

Uma série de genes tem sido descritos por estarem envolvidos no mecanismo de RNA de interferência em *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens* e *Drosophila melanogaster* e, usando ferramentas de bioinformática e o banco de dados geneDB do *Schistosoma mansoni* (<http://www.genedb.org/genedb/smansoni/>), Gomes et al. (2009) identificou alguns desses genes em *S. mansoni*. Dessa forma, uma análise de bioinformática complementar foi feita,

sugerindo um primeiro esboço do mecanismo de RNA de interferência em *S. mansoni*, representado pela Figura 47.

Primeiramente, RNAs de fita dupla (dsRNA) endógenos ou exógenos são capturados pela SmDicer, que juntamente com o cofator Partner Dicer, cliva o RNA de fita dupla em pequenos fragmentos de RNA, chamados siRNA (*short interfering RNA*). Esses siRNAs são capturados pelo complexo de silenciamento siRISC (*short interfering RNA induced silencing complex*) que é composto pela proteína SmAgo (Argonauta), o fator de ligação a RNA Fmr1, e a nuclease Tudor SN. O siRNA associado ao complexo RISC é aberto e uma das fitas simples é capturada pela endonuclease Argonauta (SmAgo) que, carregando o fragmento de RNA fita simples, busca no transcriptoma o RNA mensageiro alvo a fim de se complementarem. Uma vez pareados, a SmAgo cliva o RNA mensageiro, silenciando a expressão do gene alvo.

No caso do processamento dos miRNA (microRNAs gerados no núcleo por processamento errôneo), eles são primeiramente clivados dentro do núcleo pela SmDrosha em associação com o fator de ligação a RNA, Partner Drosha, gerando os pre-miRNAs que são enviados para o citoplasma através da Exportina-5. Fora do núcleo, eles são capturados pela SmDicer e a Partner Dicer e processados como o mecanismo dos dsRNA descrito acima, com exceção do silenciamento gênico que ocorre por inativação da transdução.

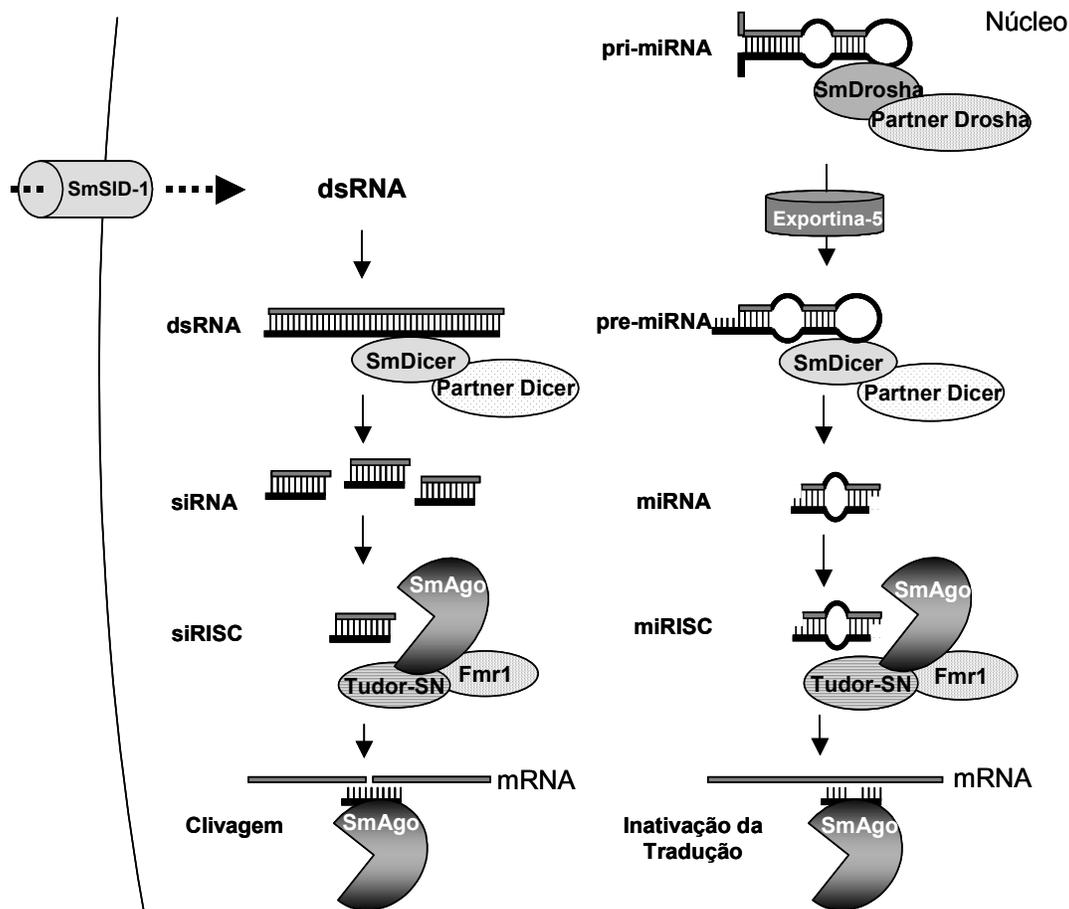


Figura 47. Mecanismo de RNA de interferência proposto em *Schistosoma mansoni*. Lado esquerdo, processamento de RNA fita dupla (dsRNA) e lado direito, processamento de microRNA (miRNA).

4.7.1.2 Supressão da expressão do gene Anexina

Esquistossômulos de 1 dia foram eletroporados com siRNAs cujos alvos eram o silenciamento do gene Anexina ou um gene irrelevante (SGTP4) de *S. mansoni* como controle. Outro controle negativo foi a eletroporação dos parasitas sem adição de qualquer siRNA. A supressão da expressão do gene Anexina foi analisada por RT-PCR em tempo real, Western blot e imunofluorescência.

A análise por RT-PCR em tempo real demonstrou que a técnica de silenciamento gênico por eletroporação de siRNA do gene Anexina induziu em esquistossômulos após 15 dias uma redução de em torno de 80% na expressão do gene Anexina, quando comparado a esquistossômulos sem tratamento ou ao controle tratado com siRNA irrelevante (Figura 48A). Esse perfil de expressão foi similar nos outros três pontos analisados, ou seja, em parasitas mantidos em cultura por 7, 21 ou 30 dias (dados não apresentados).

Parte dos esquistossômulos tratados com siRNA após 15 dias foram separados para a obtenção do extrato protéico. A mesma quantidade de proteína dos três tratamentos foi aplicada no gel e transferida para uma membrana de PVDF para a realização do Western blot, utilizando soros anti-AneI-II e anti-Permease como controle. É importante lembrar que a mesma membrana foi utilizada para a revelação com os dois soros, separadamente, após a limpeza da membrana com tampão “stripping” (Pierce). Neste experimento é possível observar uma redução considerável na quantidade da proteína Anexina nos parasitas tratados com siRNA para Anexina, quando comparado com o controle tratado com siRNA para um gene irrelevante ou o controle que não foi tratado com siRNA. O controle positivo usou soro anti-Permease e apresentou bandas com marcação uniforme, indicando que o tratamento com siRNA é alvo-específico, no caso, contra a Anexina (Figura 48B). No entanto, para os extratos de esquistossômulos de 7, 21 e 30 dias, os resultados foram de difícil interpretação uma vez que os controles utilizando o anticorpo anti-Permease não foram satisfatórios, não indicaram uniformidade na transferência da mesma quantidade de extratos protéicos nos três tratamentos (dados não apresentados).

Os experimentos de RNA de interferência também foram validados por imunofluorescência de parasitas *in vitro* vivos de 15 dias. Na Figura 48C, pode-se notar que os esquistossômulos tratados com siRNA para o gene Anexina não apresentaram a proteína na superfície do parasita, ou seja, houve a supressão da expressão do gene alvo, a Anexina, enquanto que os controles apresentaram marcação da proteína na superfície e corpo do parasita. Esse ensaio também foi realizado em parasitas fixados de 7 dias e apresentou o mesmo resultado (dados não apresentados).

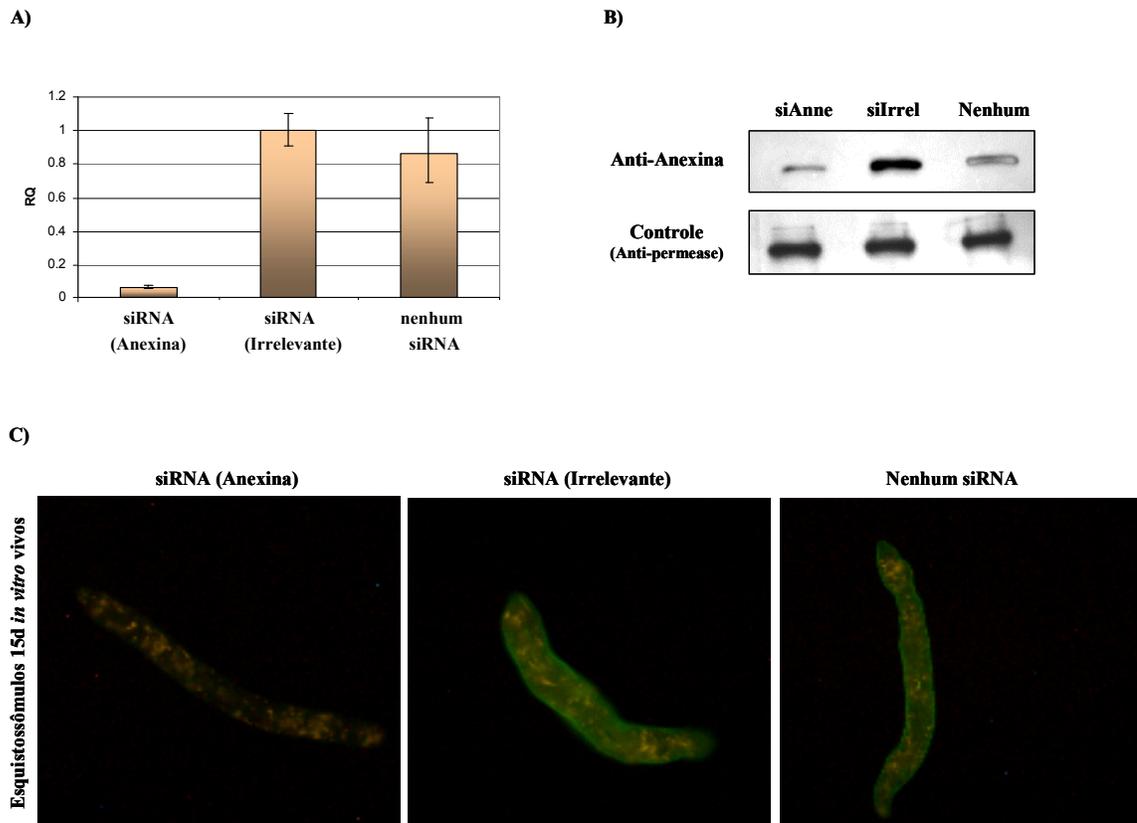


Figura 48. Supressão da expressão do gene Anexina e validação da técnica de RNAi. A) Quantificação da expressão do gene Anexina por RT-PCR em tempo real após tratamento com siRNA. Os controles são parasitas eletroporados com siRNA de um gene irrelevante de *S. mansoni* e outros eletroporados com nenhum siRNA. A RT-PCR em tempo real utilizou sondas para o gene alvo Anexina e o controle endógeno (Tubulina). A expressão gênica relativa foi calculada a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. **B)** Western blot de extratos protéicos de esquistossômulos após 15 dias tratados com siRNA para o gene Anexina (siAne), para um gene irrelevante de *Schistosoma mansoni* (siIrrel) e não tratados com siRNA (Nenhum), usando anticorpos policlonais anti-AneI-II e anti-permease (controle) como anticorpos primário. **C)** Imunofluorescência de esquistossômulos eletroporados com siRNA para o gene Anexina, para um gene irrelevante e sem tratamento. Foram utilizados esquistossômulos de 15 dias vivos em meio de cultura. Soro anti-AneI-II foi utilizado como anticorpo primário na proporção 1:100 e o FITC como anticorpo secundário na proporção 1:200.

4.7.1.3 Análise do fenótipo

Após a validação da técnica de RNA de interferência para o alvo Anexina em *S. mansoni*, foi feita a análise para verificação se havia ocorrido alguma alteração no fenótipo dos parasitas. Embora nenhum papel fisiológico tenha sido determinado até o momento, tem sido sugerido que a Anexina poderia estar associada em vários fenômenos relacionados à membrana, incluindo organização da membrana, tráfico entre as membranas, fusão e

formação de canais de íons (GERKE; MOSS, 2002). Como a Anexina em estudo é uma proteína abundante no tegumento do parasita (TARARAM et al., 2010), ela poderia estar relacionada ao desenvolvimento do tegumento. Diante disso, foi verificado se ocorria um aumento na morte dos parasitas, uma diminuição no tamanho deles ou alguma alteração morfológica no tegumento após o gene Anexina ser suprimido por RNAi comparado aos controles.

4.7.1.3.1. VIABILIDADE

A viabilidade dos esquistossômulos em cultura foi avaliada após 7, 15, 21 e 30 dias do tratamento. Eles foram quantificados na presença do corante de Hoetch e através do microscópio de fluorescência avaliados quanto à sobrevivência ou morte. Pode-se observar pela Figura 49 que a partir dos 21 dias, a porcentagem de esquistossômulos vivos no grupo tratado com siRNA para o gene Anexina foi menor em relação aos tratamentos controle; no entanto, sem diferença significativa. Outra observação é que com o passar do tempo, a quantidade de esquistossômulos vivos diminui naturalmente, devido à dificuldade deles se manterem vivos em um habitat artificial, mesmo em um meio de cultura rico em nutrientes e hormônios.

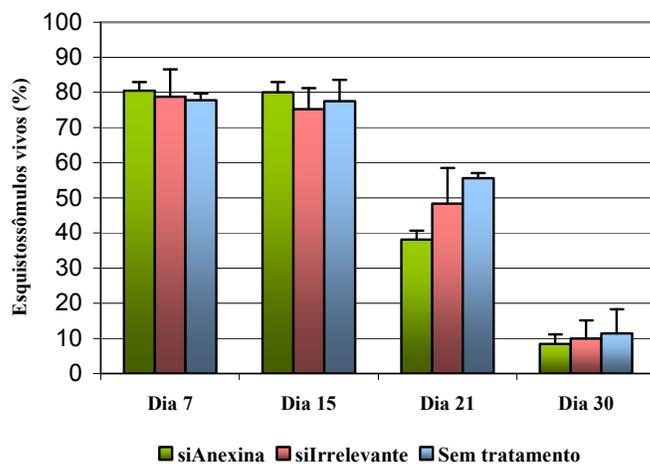


Figura 49. Gráfico representando a porcentagem de esquistossômulos vivos durante 7, 15, 21 e 30 dias após o tratamento com siRNA. Após o período, os esquistossômulos mortos foram contados com o auxílio do corante de Hoetch e do microscópio de fluorescência.

4.7.1.3.2 TAMANHO

Esquistossômulos após 7 e 15 dias de tratamento com siRNA para Anexina e os respectivos controles foram fotografados e o tamanho de seus corpos foram medidos pelo software ImageJ. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o tamanho dos parasitas tratados e controles (Figura 50).

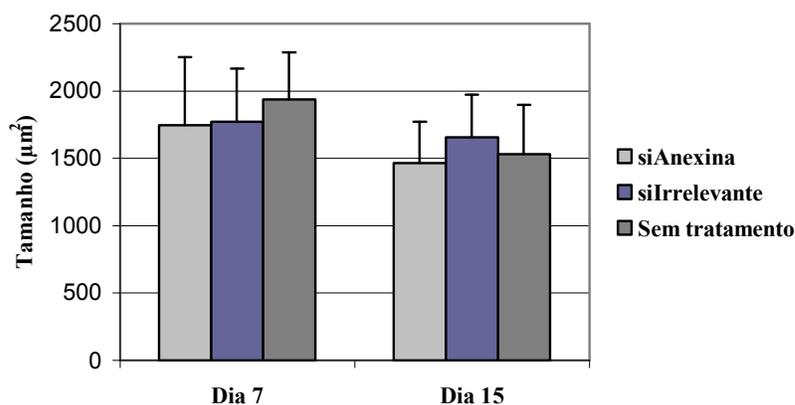


Figura 50. Gráfico representativo da área dos parasitas após 7 e 15 dias de tratamento com siRNA para Anexina. Esquistossômulos tratados foram fotografados e o tamanho de seus corpos foram medidos pelo software ImageJ.

4.7.1.3.3 ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Esquistossômulos após 15 dias de tratamento com RNAi para Anexina 2 foram fixados e trazidos ao Brasil para serem analisados por microscopia eletrônica pela Dra. Silvia Carneiro, do laboratório de morfologia e microscopia eletrônica do Instituto Butantan.

Esquistossômulos tratados com RNAi para Anexina apresentam a espessura do tegumento e o número de vesículas aparentemente menor em relação aos controles (Figura 51A, B e C). No entanto, não são em todas as fotos que podemos ver essas diferenças, porque o tegumento na porção anterior e posterior nos esquistossômulos muda e fica difícil de comparar as mesmas posições em diferentes parasitas.

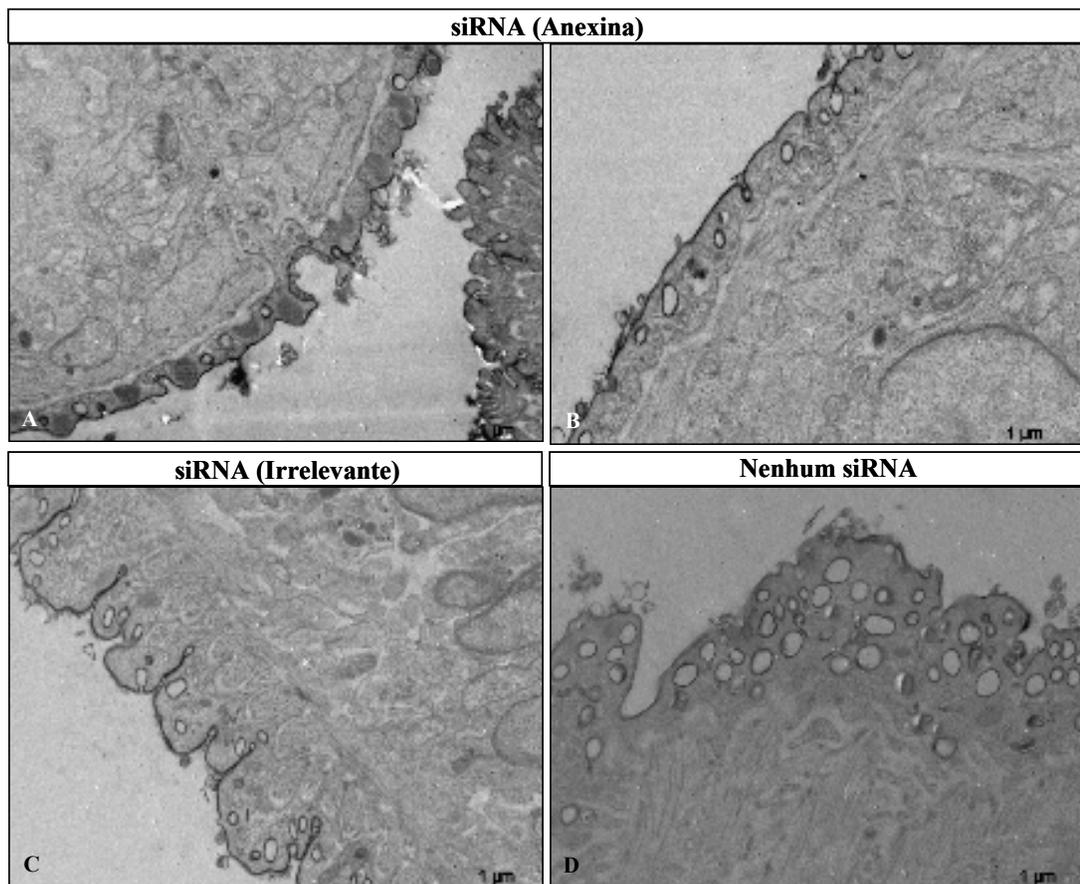


Figura 51. Microscopia eletrônica de esquistossômulos tratados com siRNA para o gene Anexina 2. (A e B) são fotos de cortes de esquistossômulo tratados com RNAi para o gene Anexina 2 de *S. mansoni* ; (C) é de esquistossômulo tratados com RNAi para um gene irrelevante de *S. mansoni* ; e (D) é de parasitas tratados sem siRNA.

Apesar da técnica de RNA de interferência para o alvo Anexina ter sido validada, as alterações fenotípicas *in vitro* não foram consistentes. Além disso, ainda não foi analisada a infecção de camundongos com esquistossômulos tratados apresentando supressão do gene Anexina para verificar a importância da proteína no desenvolvimento do parasita *in vivo*. Quando os camundongos fossem perfundidos, analisar-se-ia o número de vermes recuperados e o tamanho deles. Dessa forma, ainda não é possível concluir sobre a importância da Anexina no desenvolvimento do tegumento do parasita.

Vermes adultos também foram tratados com RNAi de Anexina e apresentaram o mesmo nível de redução da expressão do gene Anexina visto em esquistossômulos. No entanto, nenhuma diferença na expressão da proteína analisada por Western blot foi observada (dados não apresentados). É possível que já houvesse proteína expressa em quantidade antes de inibir a expressão.

4.7.2 Inibição da agregação plaquetária

Entre as funções já descritas para as Anexinas humanas está a capacidade da proteína de inibir a coagulação sanguínea. Para verificar esta possibilidade, realizamos um ensaio de inibição de agregação plaquetário simples e bem estabelecido no laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, com o auxílio da Dra Maisa Splendore Della Casa.

Antes de iniciar esses ensaios, tentamos conseguir a proteína Anexina de forma solúvel, dialisando as proteínas rAneI-II e rAneII-III em tampão de diálise com um pH superior ao utilizado nas purificações anteriores, em torno de pH 8.8. A proteína manteve-se solúvel a 4 °C por um período maior e conseguimos fazer os ensaios de dicroísmo circular e o de inibição de agregação plaquetária.

4.7.2.1 Análise de dicroísmo circular das proteínas rAneI-II e rAneII-III

As análises de dicroísmo circular indicam que as proteínas rAneI-II e rAneII-III apresentam estrutura terciária regular (Figura 52), possivelmente, formado pelas α -hélices conectadas por pequenos “loops”. Têm-se descrito que cada domínio é composto por 5 α -hélices conectadas por “loops”, formando um disco, cujo lado convexo fica ligado às membranas, enquanto o lado côncavo fica disponível para interagir com outros fatores ou ligantes (RESCHER; GERKE, 2004). O conteúdo estrutural dessas proteínas ainda precisa ser estimado utilizando um algoritmo como o K2D2 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>).

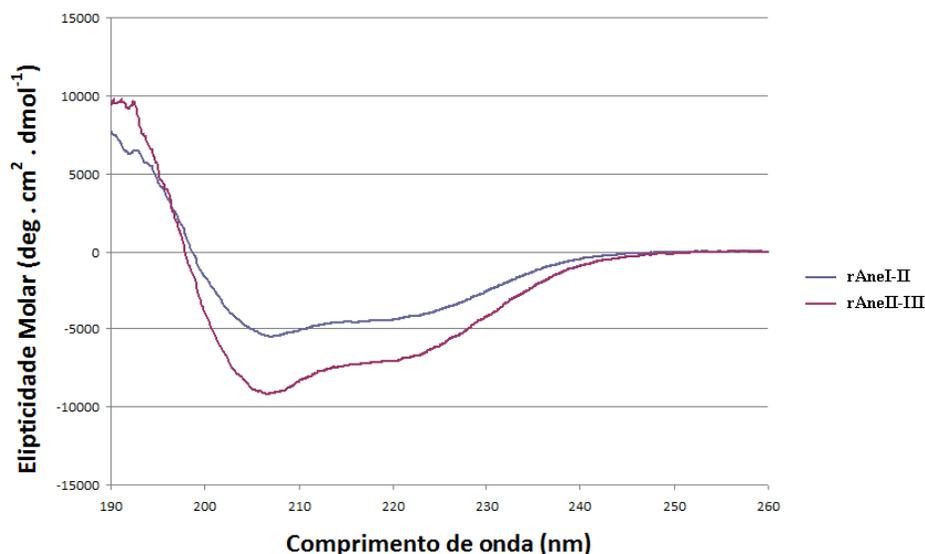


Figura 52. Espectro de dicroísmo circular das proteínas rAneI-II e rAneII-III. As medidas de dicroísmo circular foram realizadas no espectropolímero Jasco J-810 a 20°C e os espectros de CD foram adquiridos usando uma cubeta de 1 mm de comprimento. Cinco “scans” foram medidos de cada amostra e subtraídos do espectro médio branco (somente o tampão Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.8).

4.7.2.2 Inibição da agregação plaquetária

Sangue humano com anticoagulante foi centrifugado para recuperar o plasma rico em plaquetas (PRP) e uma parte desse plasma foi centrifugada novamente para conseguir o plasma pobre em plaquetas (PPP) e ser o branco do ensaio no agregômetro. O tampão da proteína foi usado como controle e o ADP foi usado como iniciador da agregação plaquetária. A adição de ADP inicia a agregação das plaquetas atingindo um platô próximo de 80% (Figura 53). Quando o ADP é adicionado na presença da proteína rAneI-II concentrada (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a agregação plaquetária diminui em aproximadamente 47%. O ensaio apresentado é representativo de três experimentos. A proteína rAneII-III (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) também foi testada, uma única vez e inibiu em torno de 23% (dados não apresentados).

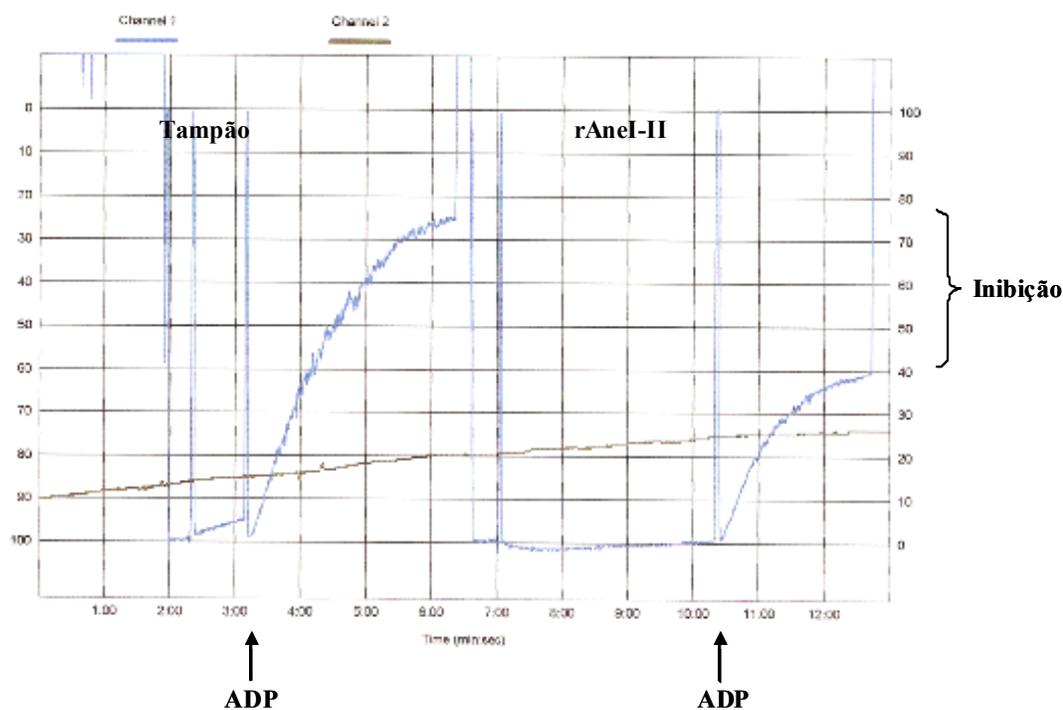


Figura 53. Ensaio de inibição de agregação plaquetária. A proteína Anel-II ($5\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi avaliada quanto ao potencial de inibir a agregação plaquetária em plasma humano rico em plaquetas, o tampão (Tris-NaCl 20mM, 150 mM NaCl, pH 8.8) foi usado como controle, o ADP como iniciador da agregação plaquetária e o plasma pobre em plaquetas como branco. Essas amostras foram adicionadas em cubetas no aparelho agregômetro (Chrono-log) que lê a absorvância durante o tempo.

Novos ensaios usando a Anexina completa precisam ser investigados antes de afirmar que a proteína pode apresentar alguma função de inibir a agregação plaquetária, mesmo que parcial.

4.7.3 Endocitose de partículas

Devido à queda brusca da quantidade de anticorpos IgG anti-Anel-II e anti-Anel-III após o desafio dos camundongos com cercárias infectantes descrita anteriormente, resolvemos investigar a possibilidade desses anticorpos estarem se ligando a Anexina na superfície do parasita e esta ter endocitado esses anticorpos com a formação de vesículas. Tem-se descrito que a Anexina A2 humana teria a função de se ligar a actina e formar vesículas de endocitose (GERKE; MOSS, 2002). Além disso, Kenis et al. (2004) descreveu essa nova via de endocitose para a Anexina humana A5.

4.7.3.1 ELISA individual dos soros dos animais imunizados com rAneI-II e desafiados com cercárias infectantes

Diante disso, foi reanalisado o experimento descrito anteriormente, medindo os soros de todos os animais imunizados e desafiados individualmente. Todos apresentaram o mesmo perfil de queda, com diferença significativa. A Figura 54 apresenta a média da concentração de IgG anti-AneI-II nos soros de cada animal analisado. Essa análise também foi feita para os soros dos animais imunizados com anti-AneII-II e foi obtido o mesmo resultado (dados não apresentados).

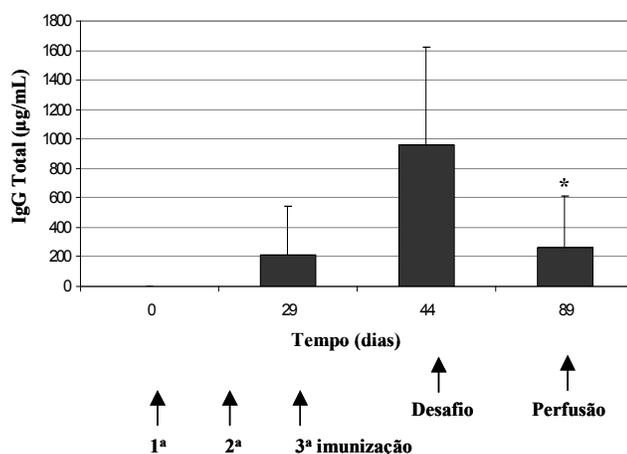


Figura 54. Análise da concentração de IgG total das sangrias durante o regime de imunização e desafio dos animais com a proteína AneI-II. O soro de cada animal foi analisado individualmente e a concentração foi determinada pela curva de IgG recombinante. O “coating” foi a proteína rAneI-II e CFA é o soro dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund. * Diferença estatística usando ANOVA e Tukey, $p < 0,05$.

4.7.3.2 Novo experimento de ELISA individual dos soros dos animais imunizados com AneI-II e desafiados com cercárias infectantes

Diante disso, para avaliarmos se a queda dos anticorpos não era natural, repetimos esse ensaio usando o mesmo esquema de imunização com a proteína rAneI-II e o controle em que os animais não foram desafiados. Foram usados os seguintes grupos:

Grupo 1: camundongos imunizados com a proteína rAneI-II mas não desafiados;

Grupo 2: camundongos imunizados com a proteína rAneI-II e desafiados com cercárias;

As sangrias foram realizadas nos mesmos dias e analisadas por ELISA. Na Figura 55A é possível observar que no grupo 1 controle o nível de anticorpo IgG anti-AneI-II aumentou

durante as imunizações e manteve-se elevado após o desafio, sem diferença significativa entre os dias analisados. Já no grupo 2 houve novamente uma queda brusca da quantidade de IgG anti-AneI-II após o desafio; no entanto, não foi observado diferença significativa entre os grupos devido ao elevado desvio padrão porque três animais do grupo (sendo um total de cinco animais) não produziram anticorpos anti-AneI-II (Figura 55B).

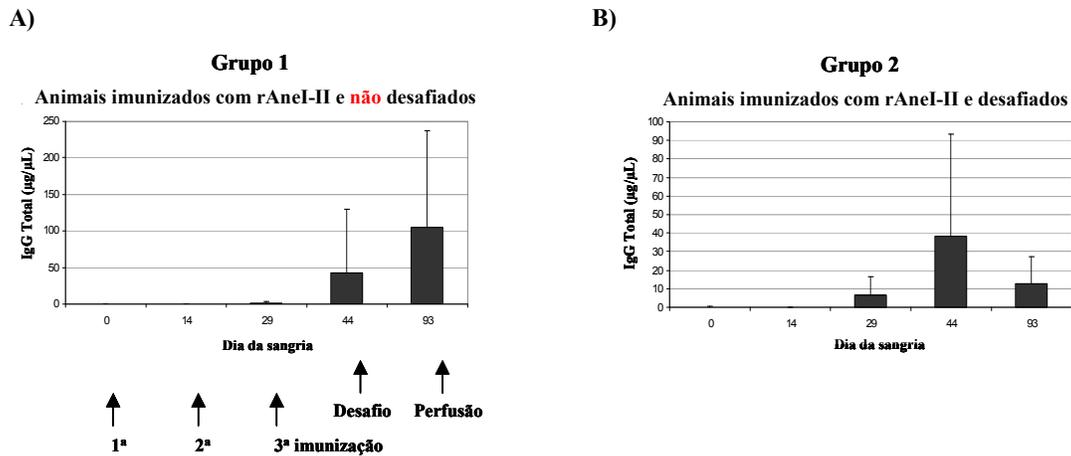


Figura 55. Análise da concentração de IgG total antiAneI-II durante o regime de imunização com rAneI-II com (grupo 2) e sem (grupo 1) desafio. O soro de cada animal foi analisado individualmente e a concentração foi determinada pela curva de IgG recombinante. O “coating” foi a proteína específica contra o soro, rAneI-II; e CFA é o soro dos animais imunizados com salina e adjuvante de Freund.

Quando analisamos os dados entre os grupos 1 e 2 no ponto de 93 dias, observamos diferença estatística entre eles, usando teste T-Student. Isso indica que o desafio é importante para a queda de anticorpos anti-AneI-II, mas um novo experimento com um maior número de animais nos grupos ainda precisa ser realizado.

4.7.3.3 Imunofluorescência da Anexina durante o tempo

Com a finalidade de verificar se a queda de anticorpos observada poderia ser causada por um processo de endocitose já citado para outras Anexinas, foi investigado por microscopia confocal se a marcação por imunofluorescência da Anexina na superfície do parasita permanecia em relação aos controles. Por imunofluorescência confocal, pode-se observar a marcação da Anexina na superfície de esquistossômulos a 4h, que após 24h, encontra-se bem reduzida, e praticamente inexistente a 48h. Nos controles, a marcação de

Ly6.5 e TSP-2 mantiveram a mesma ou diminuíram muito pouco (Figura 56). Estes resultados indicam que parece que está acontecendo um efeito além do “turnover” do parasita.

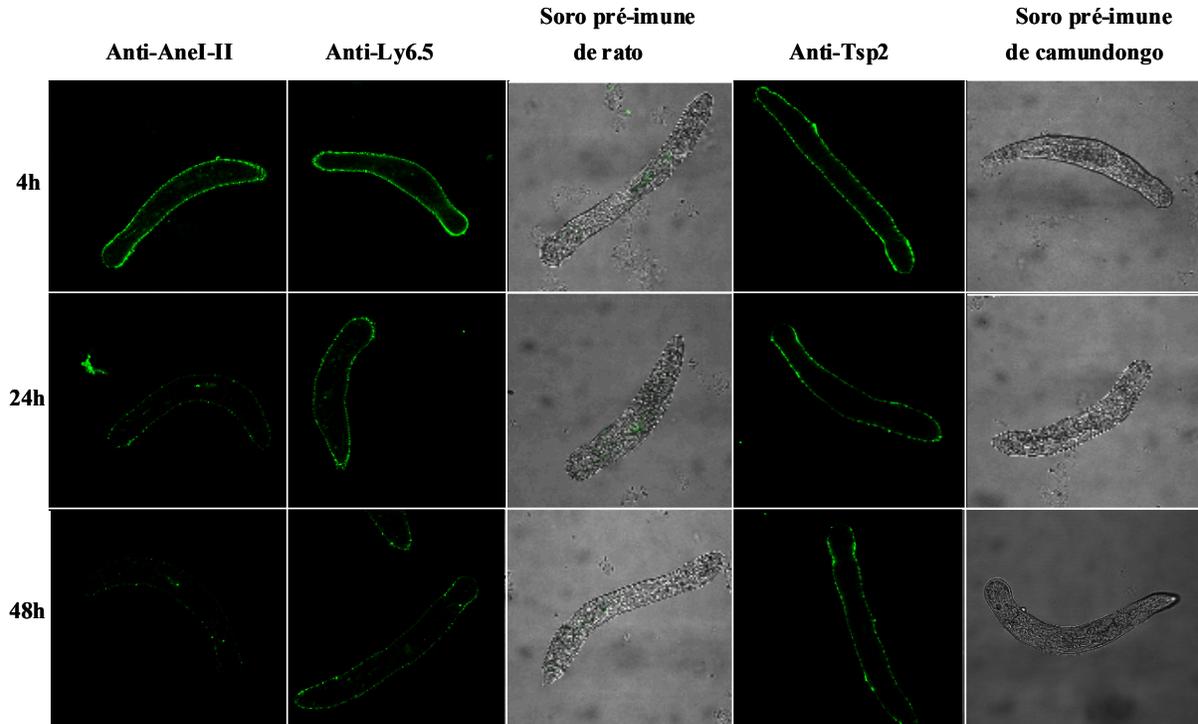


Figura 56. Imagens de microscopia confocal de fluorescência ou em contraste diferencial de fase (DIC) com a fluorescência dos controles para as proteínas Anexina 2, Ly6.5 e TSP-2. Esquistossômulos *in vitro* de 7 dias vivos incubados com antiAnel-II, anti-Ly6.5 ou anti-TSP-2 por 4 h e avaliados após 4, 24 ou 48 h. Os anticorpos primários (anti-Anel-II, anti-Ly6.5, anti-TSP-2 e soro pré-imune) foram utilizados na proporção 1:100 e o secundário (anti-IgG de rato ou camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa fluor 488) na proporção 1:200.

O envolvimento da anexina no processo de endocitose ainda precisa ser melhor investigado com outros experimentos. Inicialmente, precisamos avaliar se não está ocorrendo uma inibição das células B dos camundongos em produzir anti-Anel-II por algum motivo desconhecido e não específico, analisando as células do baço desses camundongos por ELISPOT. Posteriormente, será ainda necessário investigar com um ensaio mais específico com células e marcadores para confirmar melhor a função da proteína na endocitose.

5 DISCUSSÃO

5.1 TRANSCRIPTOMA

A idéia de procurar antígenos que pudessem estar envolvidos na adaptação e sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro humano levou à busca por genes próprio do parasita, isto é, com funções desconhecidas e com expressão aumentada no estágio de esquistossômulo. O fato de não ter função conhecida indica que provavelmente seria uma função que outros organismos não teriam, sendo possivelmente um mecanismo mais específico do parasita. A escolha do estágio de esquistossômulo se baseia no fato de que esse estágio é o principal alvo de ataque do sistema imune em camundongos imunizados (uma única vez) com cercárias irradiadas (COULSON, 1997) que apresentaram elevada proteção. Além disto, proteínas secretadas nesse estágio induzem secreção de elevados níveis de IFN- γ em experimentos *in vitro* (MOUNTFORD; HARROP; WILSON, 1995).

O número de transcritos (ESTs) vindos das bibliotecas de esquistossômulos e cercárias foram comparados e os genes que apresentavam número de transcritos em esquistossômulos maior que em cercária foram selecionados como diferencialmente expressos nesse estágio. Seria uma forma simples e econômica de selecionar expressão diferencial a partir dos dados do transcriptoma antes de fazer ensaios de microarranjo e SAGE. Quando a abordagem foi validada por RT-PCR em tempo real, o ensaio confirmou a expressão diferencial aumentada em esquistossômulos em aproximadamente 56% dos genes selecionados. Esta porcentagem é comparável ao trabalho de Li et al. (2004), que confirmou a expressão diferencial por RT-PCR em tempo real para 47% dos transcritos identificados por seleção eletrônica baseado nas diferenças de ESTs entre macho e fêmea de *Brugia malayi*.

Analisando os 400 genes diferencialmente expressos quanto à função gênica, de uma maneira geral, muitos genes estavam envolvidos na adaptação do parasita à corrente sanguínea. Ou seja, haviam genes envolvidos na contração e extensão do esquistossômulo, como fimbrina e diferentes isoformas de caderina, porque o esquistossômulo está crescendo e necessita reorganizar suas estruturas internas. Genes envolvidos na digestão da hemoglobina, como as catepsinas, e a expressão de lactato desidrogenase também foram encontrados, uma vez que são genes necessários para a mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico. Enquanto as chaperonas podem indicar que o esquistossômulo está sendo exposto a fatores de estresse com a mudança de ambiente, como calor e privação de alimento. No entanto, genes com função desconhecida em relação a proteínas de outros organismos foram escolhidos para

serem estudados como potenciais candidatos vacinais por serem potencialmente genes próprios do parasita e sugerirem uma importância na transição de cercárias para esquistossômulos.

Entre os genes selecionados, os genes Dife5 (Ly6.5) e Dife9 (SmVal7) foram melhor caracterizados e seus estudos serão discutidos a seguir. O gene Dife4 foi caracterizado por nosso grupo como sendo uma proteína de tegumento capaz de reduzir a carga parasitária em 30-32% após imunização e desafio experimental (FARIAS et al., 2010). Os genes Dife1, Dife2, Dife6 e Dife7 não foram estudados por não apresentarem expressão diferencial na transição de cercária para esquistossômulo, enquanto os genes Dife3 e Dife8, apesar de mostrar expressão diferencial em esquistossômulos, até o momento não apresentaram dados conclusivos quanto à expressão da proteína no parasita e poderão ainda ser investigados.

5.2 FAMÍLIA Ly6

A família do antígeno 6 de linfócitos (Ly6) em *Schistosoma mansoni* está representada por seis genes. Eles apresentam o motivo CCxxXxCN (sendo D no lugar de X para 85% das proteínas) bem conservado, o que caracteriza o domínio uPAR/Ly6, presente nos membros da superfamília Ly6. Eles também possuem sítios preditos para as âncoras de GPI, comprovado para os genes Ly6.5 e Ly6.1 através da incubação de vermes adultos com a enzima piPLC que digere essa âncora liberando as proteínas no meio (Castro-Borges, 2010) (comunicação pessoal)². Isso sugere que essas proteínas estão realmente expostas na superfície do parasita e poderia ter algum papel importante na defesa do parasita, assim que a cercária penetra no hospedeiro definitivo e se transforma em esquistossômulo.

Essas Ly6 de *S. mansoni* possuem similaridade com a proteína CD59 humana, uma proteína importante na inibição da lise de células do hospedeiro pelo sistema complemento; ela inibe a formação do MAC através da ligação aos fatores C8 e C9, prevenindo o recrutamento de novos fatores C9 necessários para a formação do poro (BODIAN et al., 1997). A CD59 humana é uma proteína ligada à membrana por âncora de GPI, presente em vários tipos celulares, de aproximadamente 20 kDa e pertencente à superfamília Ly6. Antígenos Ly6 foram identificados pela primeira vez em soro de camundongos e a função dessas moléculas é pouco compreendida, com exceção das proteínas CD59 e o receptor do ativador do plasminogênio tipo-uroquinase (BODIAN et al., 1997).

Em *S. mansoni* já foi descrito uma proteína inibidora da formação do MAC com parcial identidade com a CD59 humana, a SCIP-1, a qual é reconhecida por anticorpos anti-CD59 humanos. Essa proteína tem tamanho muito superior a CD59, de 94 kDa, apresenta um

² CASTRO-BORGES, Willian. Rio de Janeiro, 2010.

âncora de GPI e se liga aos componentes C8 e C9 do complemento. Quando esta proteína é inativada na superfície do verme, deixa o esquistossômulo susceptível à morte pelo complemento (PARIZADE et al., 1994). Posteriormente, essa proteína foi identificada por espectrometria de massa como sendo uma forma exposta na superfície da proteína muscular paramiosina (DENG et al., 2003). Lembrando-se que a paramiosina é considerado um candidato vacinal e uma proteína bastante imunogênica durante a infecção pelo parasita (LANAR et al., 1986; RIBEIRO DE JESUS et al., 2000).

Em relação aos genes Ly6 de *S. mansoni*, a maioria deles são diferencialmente expressos na transição de cercária para esquistossômulo, comparável com os dados de microarranjo do Prof. Alan Wilson, 2010 (comunicação pessoal)³, sugerindo que esses genes tenham alguma função importante de sobrevivência dentro do hospedeiro. Em especial, Ly6.4, que apresenta expressão muito aumentada em adulto, cerca de 7000 vezes e pode ter alguma função importante nesse estágio, como no desenvolvimento do tegumento ou a manutenção do sincício.

Quando extratos protéicos dos estágios do parasita foram analisados por Western blot, a proteína Ly6.1 foi encontrada em esquistossômulos e vermes adultos e a Ly6.5 em todos os estágios com exceção de ovo e em maior quantidade em esquistossômulos. Nos ensaios de imunolocalização, as proteínas também foram encontradas no tegumento dos estágios intra-hospedeiro, confirmando novamente que elas estão realmente presentes na superfície do parasita na transição de cercária para esquistossômulo. Isso nos revela que os genes podem ser potenciais candidatos vacinais, com exceção da Ly6.3 que apesar de a sequência de aminoácidos apresentar o motivo, os sítios preditos de GPI e as glicosilações, a proteína não apresenta o domínio uPAR/Ly6, quando analisada pelo programa SMART. Além disto, é o único gene que apresenta expressão diferencial aumentada em estágios do hospedeiro intermediário, ovo e miracídio.

Outra característica investigada foi a presença das glicosilações, uma vez que o tamanho molecular observado nas proteínas rLy6.1 e rLy6.5 originadas de *Pichia pastoris* era superior ao esperado. Quando o gel de SDS-PAGE contendo essas proteínas foi corado com reagente de Schiff, que cora açúcares, as bandas ficaram marcadas. No entanto, essas glicoproteínas não são ligadas por N-glicosilações, já que no ensaio onde as proteínas recombinantes e os extratos de vermes adultos foram tratados com a enzima PNGase que cliva as N-glicosilações, o tamanho delas não muda, confirmando a análise dos softwares que não encontraram sítios de N-glicosilação para essas duas proteínas. Isso sugere que as proteínas Ly6.1 e Ly6.5 podem ter O-glicosilações, apesar da análise de bioinformática ter

³ WILSON, Alan. São Paulo, 2010.

predito apenas um sítio para a Ly6.1 e de ser difícil de comprovar já que as enzimas que clivam O-glicosilações são específicas de mamíferos.

Na tentativa de comprovar a função de inibição do sistema complemento dessas proteínas, devido à similaridade com a proteína CD59, ensaios de Western blot foram realizados para ver se os anticorpos reconheciam a proteína CD59 humana comercial ou se anticorpos anti-CD59 reconheciam as proteínas rLy6.1 e rLy6.5, como visto para a proteína paramiosina (PARIZADE et al., 1994). No entanto, não foi observado o reconhecimento talvez devido à baixa similaridade (em torno de 30%) entre as proteínas e a CD59 humana. Adicionalmente, quando experimentos de inibição do sistema complemento pela via clássica e alternativa foram realizados, não foi observado diferença na porcentagem de inibição entre as proteínas rLy6.1, rLy6.5 (*P. pastoris*), rLy6.5 (*E. coli*) e o controle negativo (BSA), assim como em experimentos *in vivo*, morte dos esquistossômulos pelo sistema complemento quando incubados com anticorpos anti- Ly6.5 e depois com uma fonte de complemento.

Analisando melhor a sequência de aminoácidos dos antígenos Ly6 com o trabalho de Bodian et al. (1997), que caracteriza os principais sítios ativos da CD59 humana, muitos aminoácidos essenciais que dão função à proteína não são encontrados no alinhamento múltiplo dos antígenos Ly6 de *S. mansoni*, como Trp40, Arg53 e Glu56. Dessa forma, diante da baixa similaridade desses antígenos com a CD59 humana, o não reconhecimento das proteínas pelo anticorpo anti-CD59 e os resultados afastando o envolvimento desta proteína como inibidor do sistema complemento, acreditamos que esta família protéica apresente alguma outra função na interface parasita-hospedeiro.

Recentemente, foram descritas quatro novas proteínas da família Ly6 de *Drosophila*, essenciais na formação de junções celulares, funcionando como uma barreira paracelular (HIJAZI et al., 2009; NILTON et al., 2010). Em células musculares, também têm sido descrito a função de proteínas Ly6 em remodelar a matriz extracelular durante a regeneração do músculo esquelético (KAFADAR et al., 2009). A presença de âncoras de GPI nos antígenos Ly6 sugere que a proteína pode agregar pontes de lipídios para alterar a atividade de proteínas associadas (BAMEZAI, 2004; HALOVA; DRABEROVA; DRABER, 2002).

Outros trabalhos descrevem os antígenos Ly6 como genes de susceptibilidade a vírus porque suas proteínas são expressas na superfície de linfócitos e células mielóides, com a proposta de estarem envolvidas na adesão e sinalização celular e na própria entrada do vírus no linfócito, como no caso do HIV (LOEUILLET et al., 2008). Até mesmo a proteína CD59 humana apresenta outras funções além da inibição do sistema complemento, como participação em eventos de transdução de sinais, promovendo a ativação de células T,

timócitos e neutrófilos; como receptor para a intermedilina, uma toxina de *Streptococcus intermedius*; e como um adaptador de membrana para a ligação de calreticulina (proteína ligadora de cálcio) (KIMBERLEY; SIVASANKAR; PAUL MORGAN, 2007). Dessa forma, como as proteínas Ly6.1 e Ly6.5 não apresentaram o potencial de inibidoras do sistema complemento e pertencem a uma superfamília com diversas funções biológicas, o potencial dessas proteínas na formação ou ligação de proteínas do parasita ou do próprio hospedeiro no tegumento do parasita ainda precisam ser melhor investigados.

Foi realizado o ensaio de inibição de penetração das cercárias, onde quase 60% das cercárias não conseguiram penetrar devido a ligação dos anticorpos anti-rLy6.5 e das 40% que penetraram, apenas 60% desenvolveram-se a verme adulto. Novamente, sugere-se que a proteína Ly6.5 pode ter alguma função na penetração e no desenvolvimento e sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro. O bloqueio da proteína Ly6.5 pode fazer com que outras proteínas não se liguem na superfície, proteínas próprias do parasita ou do próprio hospedeiro, essenciais para a defesa e sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Quando avaliada nos ensaios de imunização e desafio a proteína recombinante rLy6.5 induziu uma resposta imune Th2 e após o desafio ocorreu um “shift” em direção a Th1; no entanto, não houve redução da carga parasitária. Por outro lado, quando camundongos foram imunizados com vacina de DNA, expressando esse antígeno, induziu-se um perfil de resposta imune Th1 e obteve-se 20% de redução na carga parasitária. Dessa forma, a indução de uma resposta imune celular predominantemente Th1 contra este antígeno parece gerar melhores níveis de proteção. Portanto, será importante investigar outros adjuvantes ou formas de apresentação que induzam a esse tipo de resposta imune.

5.3 DIFE9

O gene Dife9 também foi selecionado a partir dos dados do transcriptoma, foi identificado como SmVal7 por Chalmers et al. (2008) por pertencer a família VAL (Venom Allergen Like proteins). A proteína apresenta um peptídeo sinal e um domínio SCP (Sperm Coating Protein) que inclui subfamílias Tpx-1, Ag5, PR-1 e Sc7. A função biológica dos membros da família SCP ainda não está bem caracterizada. A proteína SmVal7 apresenta maior similaridade com membros da subfamília Ag5 e PR-1. Apesar da função do Antígeno 5 ser desconhecida, é postulado ser uma neurotoxina de invertebrados com a função de paralisar a presa (HOFFMAN, 1993). Proteínas secretórias de *Necator americanus*, ASP-1 e ASP-2, da subfamília das proteínas PR-1, também não têm função conhecida, mas podem ter um papel

importante na interação parasita-hospedeiro. Camundongos imunizados com essas proteínas recombinantes (ASP-1 e ASP-2) resultaram em altos títulos de anticorpos, redução da carga parasitária após desafio, diminuição da fecundidade das fêmeas e inibição *in vitro* da migração larval pela pele (ASOJO et al., 2005). O candidato vacinal mais bem caracterizado até o momento é a proteína ASP-2 (“Ancylostoma secreted protein-2”).

Apesar da distância evolutiva entre o *Schistosoma mansoni* (Platelminto) e *Necator americanus* (Nematelminto), existem algumas similaridades entre estes helmintos, quando seus ciclos de vida são comparados. A liberação da proteína (ASP-2) em *N. americanus* acontece durante a mudança do estágio de vida livre para o parasitário (L3), sugerindo que a ASP-2 tenha alguma função no processo infeccioso e desta maneira tenha um papel chave no estabelecimento do parasitismo.

O *Schistosoma mansoni* possui mais de 30 proteínas com domínio SCP e doze dessas apresentam peptídeo sinal e podem ser secretadas (dados do trabalho de pós-doutorado do pesquisador Leonardo Paiva Farias). Algumas delas estão sendo estudadas quanto ao potencial alergênico e tem-se visto que alguns desses antígenos têm a propriedade de recrutar eosinófilos e macrófagos no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com a proteína. Chalmers et al. (2008) sugerem funções ligadas a penetração da cercária, e também à modulação da resposta imune e o desenvolvimento do verme adulto.

Em *S. mansoni*, o gene SmVal7 apresenta expressão aumentada em esquistossômulos, sugerindo que a proteína seria importante na transição de cercária para esquistossômulo. Esses dados estão de acordo com os do trabalho de microarranjo de Dillon et al. (2006), no qual classificou o gene como diferencialmente expresso em esquistossômulo. No entanto, estão em desacordo com os dados de Chalmers et al. (2008), no qual o gene SmVal7 apresentou maior expressão em cercária em relação aos outros estágios. Essa diferença de resultados pode ser devido ao uso de diferentes normalizadores e a abordagem de análise dos resultados. Lembrando-se que nesse trabalho (CHALMERS et al., 2008) o gene SmVal7 foi apresentado como o mais expresso no estágio de esquistossômulo em relação aos outros genes da família SmVal.

No entanto, a localização da proteína ainda não está definida. Inicialmente, usando anticorpo de rato, a proteína foi reconhecida apenas no estágio de ovo no tamanho esperado. Posteriormente, usando soro anti-SmVal7 obtido de camundongos e que apresentava títulos maiores de anticorpos, apareceram bandas em esquistossômulos e vermes adultos com tamanho muito superior e outras duas menores com tamanho um pouco maior ao esperado em ovos e miracídio. A proteína pode estar agregando, dificultando a sua corrida pelo gel, o que

justificaria ela estar com um tamanho elevado e confirmaria a expressão diferencial em esquistossômulos. Já as bandas marcadas em ovo e miracídio poderiam ser alguma reatividade cruzada com outro membro da família SmVal, já que o Dr. Leonardo Paiva Farias tem explorado essas características muito comum entre as SmVals (comunicação pessoal)⁴.

Por imunolocalização, a proteína foi encontrada na casca e interior do ovo, na superfície dos miracídios e no tegumento dos esquistossômulos. Lembrando-se que a proteína não foi encontrada entre as proteínas secretadas pelo ovo, obtidas pelos estudos proteômicos de Cass et al. (2007), que identificou quatro proteínas com domínio SCP nas secreções de ovos. Outro fato, é que apesar de a proteína SmVal7 possuir um peptídeo sinal, o que indica ser secretada, a proteína também não foi detectada nos ensaios de proteoma de secreções das glândulas acetabulares de cercárias, durante a penetração na pele (CURWEN et al., 2006; HANSELL et al., 2008). Secreções de esquistossômulos cultivados *in vitro* por 3 h também foram analisados por Western blot e a proteína não foi encontrada.

Como o gene SmVal7 é altamente expresso em esquistossômulo (DILLON et al., 2006; CHALMERS et al., 2008; FARIAS et al., 2010), acreditamos que sua proteína seja encontrada em esquistossômulo e verme adulto e que as marcações vistas em ovo e miracídio por Western blot e imunolocalização sejam reatividade cruzada com outras SmVals de *S. mansoni*. Com a finalidade de esclarecer estas questões, ensaios de hibridização *in situ* nos estágios de cercária, esquistossômulos e vermes adultos foram realizados. Os resultados preliminares indicaram a presença do transcrito nas glândulas esofágicas, o que reforça esse antígeno como um bom candidato vacinal. Proteínas encontradas nas glândulas esofágicas seriam essenciais na defesa do parasita dentro do hospedeiro, ou seja, seriam liberadas por essas glândulas para interferirem contra os anticorpos do hospedeiro que entram no parasita através do tubo digestivo (WILSON; COULSON, 2009). Além disto, uma vacina contra essas proteínas seria capaz de matar vermes adultos através do bloqueio de sua alimentação, como reportado por Wilson et al. (2008) para o modelo de macaco rhesus.

No entanto, em nossos experimentos de imunização com a proteína recombinante SmVal7, a proteína se demonstrou pouco imunogênica, induzindo níveis muito baixos de anticorpos IgG. O perfil de resposta imune gerada foi misto e após o desafio com cercárias, não apresentou proteção. Talvez seja necessário a utilização de um sistema adjuvante mais potente ou mais polarizado.

⁴ FARIAS, Leonardo Paiva. São Paulo, 2009.

5.4 ANEXINA

Uma nova anexina foi caracterizada no tegumento de *Schistosoma mansoni*. Ela possui quatro domínios repetitivos de anexina, uma região N-terminal variável e foi nomeada Anexina 2. Ela se liga às frações de membrana de maneira dependente de cálcio e está localizada principalmente no tegumento de esquistossômulos e vermes adultos.

O gene Anexina foi escolhido como candidato vacinal porque apresentou expressão diferencial no estágio de esquistossômulo (DILLON et al., 2006) e a proteína foi encontrada como uma das proteínas mais abundantes e expostas na superfície do tegumento, possivelmente sendo acessível ao sistema imune (BRASCHI; WILSON, 2006; VAN BALKOM et al., 2005), de forma semelhantes às proteínas Sm29 e TSP-2 que conferiram 50-55% de proteção (CARDOSO et al., 2008; TRAN et al., 2006). Além disto, possui similaridade com o candidato vacinal Anexina B1 de *Taenia solium*. Esse antígeno cC1 foi identificado a partir de uma biblioteca de expressão de cisticerco, usando soro de suínos e humanos infectados com cisticercos (HONGLI et al., 2002). A identificação de novas proteínas de tegumento é o foco da pesquisa contemporânea em alcançar o entendimento da interação parasita-hospedeiro e fornecer novos potenciais candidatos vacinais contra a esquistossomose (CARDOSO et al., 2006)

Embora nenhum papel fisiológico tenha sido determinado para essa família, tem sido sugerido que elas estão associadas com vários fenômenos relacionados à membrana, incluindo a sua organização, tráfico entre as membranas, fusão e formação de canais de íons (GERKE; MOSS, 2002). *In vitro* tem apresentado funções como: atividade anti-coagulante, anti-inflamatória, transdução de sinais, endo e exocitose, mas pouco se sabe sobre seu papel *in vivo* (TURNAY et al., 2005).

Em relação aos sítios de ligação a Ca^{+2} tipo II e III presentes em cada domínio repetitivo de anexina, a Anexina humana A2, Anexina de *S. japonicum* e de *M. sebastis*, bem como a Anexina2 de *S. mansoni* revelaram a perda desses sítios em alguns domínios, assim como em muitas anexinas que tem sido descritas em alguns trabalhos (KONOPKA-POSTUPOLSKA, 2007; MORGAN et al., 2004). Além da perda, os sítios foram substituídos pelo motivo KGD no domínio III. Essa substituição também está de acordo com a análise molecular feita por Morgan et al. (2004), no qual mostra que muitos domínios de anexina contém mudanças de aminoácidos consistentes com a perda dos sítios de ligação a Ca^{+2} tipo II em que 11% dos domínios analisados perderam o sítio e continham o novo motivo K/H/RGD.

A identificação da anexina em experimentos enriquecidos com membranocálice faz dessa proteína uma candidata ideal para funcionar como cimento celular entre o membranocálice e a membrana plasmática (BRASCHI; WILSON, 2006). Assim, o silenciamento desse gene foi realizado em colaboração com o Prof. Patrick Skelly, através de um estágio de 6 meses em seu laboratório, na Universidade de Tufts, Massachusetts, a fim de observar algum fenótipo alterado no tegumento, que resultasse no não desenvolvimento do corpo do parasita.

Em paralelo, o genoma do parasita foi investigado novamente, procurando no banco de dados por proteínas que possuíssem os mesmos domínios daquelas envolvidas no mecanismo de RNAi em *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila melanogaster*, ou fazendo alinhamentos das sequências de aminoácidos através das ferramentas de bioinformática com a finalidade de buscar ortólogos em *S. mansoni*. Gomes et al. (2009) descreveu a maioria desses genes, enquanto o gene SID-1, foi encontrado e adicionado ao mecanismo de RNAi em *S. mansoni*, o qual está relacionado à captura de RNA fita dupla exógeno em *C. elegans*. Com esses genes, foi feito o primeiro esboço do mecanismo de RNAi em *S. mansoni* (KRAUTZ-PETERSON et al., 2010). Há algumas diferenças entre os mecanismos de RNAi entre os organismos citados, como diferentes proteínas argonautas e diferentes cofatores (JINEK; DOUDNA, 2009; TIJSTERMAN et al., 2004; HANNON, 2002). Por exemplo, em *C. elegans* há o cofator Rrf-1, uma RNA-polimerase dependente de RNA, o qual tem a função de gerar um segundo siRNA, amplificando o silenciamento gênico (AOKI et al., 2007), talvez justificando porque a supressão do gene em *S. mansoni* não é tão estável quanto em *C. elegans* e é mantida somente até 40 dias de tratamento em esquistossômulos (KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2008a).

Já em relação aos ensaios de RNAi, resultados confirmaram a supressão da expressão do gene Anexina após 15 dias em esquistossômulos eletroporados por RT-PCR em tempo real, da proteína por Western blot e por imunofluorescência. No entanto, esta supressão não foi suficiente para induzir uma alteração fenotípica significativa quanto à viabilidade e tamanho. Por microscopia eletrônica foram observadas algumas alterações na organização do tegumento, como a espessura e número de vesículas no tegumento, semelhante às observadas pelo grupo do pesquisador Alex Loukas com a supressão do gene TSP-2 (TRAN et al., 2010), cuja proteína também é estrutural e tem a mesma localização que a Anexina 2. No entanto, devido à variabilidade e o baixo número de cortes dos esquistossômulos com o gene Anexina 2 suprimido, estas alterações não podem ser consideradas significativas, sendo necessário observar um maior número de cortes. Uma avaliação mais definitiva do papel da Anexina no

desenvolvimento do tegumento poderá ser obtida verificando o efeito dessa supressão na sobrevivência e desenvolvimento dos parasitas *in vivo*.

No Western blot da supressão da proteína Anexina 2 é possível observar uma redução considerável da proteína nos esquistossômulos tratados com siRNA para Anexina em relação ao controle, mas ainda existe uma leve marcação. Isso pode ser justificado pelo fato que os esquistossômulos tratados eram de 1 dia, lembrando-se que a expressão do gene aumenta em grande quantidade do estágio de cercária para o de esquistossômulo e que a proteína já está presente em grande quantidade no tegumento de esquistossômulos de 3 h por imunolocalização (TARARAM et al., 2010). No entanto, também esta marcação pode ser fruto de alguma reatividade cruzada com outras Anexinas de *Schistosoma mansoni* e isso ainda deve ser investigado, uma vez que o parasita apresenta outras 10 anexinas com peso molecular similares.

Tem sido descrito que a Anexina A5 humana teria a função de inibir a agregação plaquetária (RAND, 2000). Dessa forma, os fragmentos rAneI-II e rAneII-III foram avaliados quanto a esse potencial e apresentaram em torno de 50 e 30% de inibição da agregação plaquetária. Como as Anexinas possuem vários domínios repetitivos e muito similares entre si, esse resultado pode ser relativo a apenas um domínio em comum e que apresente essas características; ou seja, usar a proteína completa no ensaio não seria garantia de obter um resultado melhor. Portanto, a propriedade de inibir a agregação plaquetária usando a Anexina 2 completa ainda precisa ser melhor investigada.

Uma hipótese que está sendo avaliada seria uma possível função da proteína de se ligar a fosfatidilserina e endocitar anticorpos ligados a Anexina que estão presentes na superfície, para justificar a queda acentuada de anticorpos anti-Anexina em soro de camundongos após a infecção com cercárias. Kenis et al. (2004) descreveram essa nova via de endocitose também para a Anexina humana A5, sugerindo-a como um alvo para drogas, pois quando induziu células Jubart à apoptose para expressar fosfatidilserina na superfície e incubou com a proteína Anexina A5, a proteína se ligou nos lipídios da superfície da célula e ocorreu endocitose, ou seja, as fosfatidilserinas foram eliminadas da superfície, consequentemente, inibindo a apoptose. Esse desaparecimento de anticorpos também pode ser visto nos ensaios de imunolocalização *in vivo*, onde a fluorescência da Anexina na superfície diminuiu após 24 h e 48 h de incubação com o anticorpo primário, enquanto os outros esquistossômulos tratados com soro anti-TSP-2 mantiveram a fluorescência.

Foram realizados ensaios de imunização e desafio com o fragmento rAneI-II, uma vez que este possui a região N-terminal que confere função à anexina e o primeiro e segundo

domínios repetitivos; com o fragmento rAneII-III (contendo o segundo e terceiro domínios repetitivos) e com as duas proteínas juntas. A imunização de camundongos com a proteína rAneI-II apresentou um perfil mais Th2, enquanto a rAneII-III ou as duas juntas apresentaram um perfil mais Th1. A análise dos resultados do ensaio de ELISPOT dos esplenócitos dos animais após o desafio indicou indução do mesmo tipo de resposta imune. No entanto, não foi induzido proteção em nenhum dos grupos imunizados. Seria ainda prematuro especular sobre um possível papel da Anexina em endocitar os anticorpos pelo “turnover” na membrana, reduzindo a proteção induzida pela imunização com a Anexina.

Ainda não foi possível concluir sobre uma função para a Anexina 2, porque outras funções ainda tem que ser investigadas. Por ser uma proteína de membrana e abundantemente exposta na superfície, acreditamos que ela tenha alguma função importante no tegumento. Mas se a função de endocitar moléculas na superfície, como os próprios anticorpos anti-Anexina, ou remodelar o tegumento, com alguma função no “turnover” e no desenvolvimento do tegumento fossem confirmadas, poderia justificar a falta de proteção obtida em camundongos imunizados com as proteínas recombinantes rAneI-II e rAneII-III.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a abordagem de selecionar genes diferencialmente expressos através da frequência aumentada de transcritos no estágio de esquistossômulo quando comparado ao de cercária foi satisfatória porque a expressão diferencial foi confirmada para 56% dos genes, quando validados por RT-PCR em tempo real (FARIAS et al., 2010).

Entre os genes diferencialmente expressos, foi confirmada a presença das proteínas Ly6.1 e Ly6.5 no tegumento associada a uma âncora de GPI. Apesar de não ter sido possível confirmar seu envolvimento em mecanismos de inibição da lise celular pelo sistema complemento, estas parecem ser importante para a sobrevivência e desenvolvimento do parasita dentro do hospedeiro.

O gene SmVal7 foi confirmado ser diferencialmente expresso no estágio de esquistossômulos e seus transcritos foram revelados em glândulas esofágicas de vermes adultos pela técnica de hibridização *in situ*, o que caracterizaria esse como um potencial candidato vacinal. No entanto, a localização da proteína ainda não foi concluída. Ela foi encontrada no tegumento de esquistossômulos por imunolocalização, mas novos experimentos precisam ser realizados para confirmar a presença da proteína nesse estágio e a caracterizar a reatividade cruzada com os estágios de ovo e miracídio.

Outro potencial candidato vacinal é a Anexina; experimentos de RT-PCR em tempo real, Western blot e imunolocalização confirmaram que o gene é diferencialmente expresso em esquistossômulo e a proteína é encontrada majoritariamente no tegumento de esquistossômulos e vermes adultos, associada às membranas por um mecanismo dependente de cálcio (TARARAM et al., 2010). Dados preliminares sobre a função da proteína puderam caracterizar uma inibição da coagulação. A supressão do gene por RNAi não provocou alteração significativa no desenvolvimento do parasita *in vitro*, mas necessita ser investigado *in vivo*. A queda dos anticorpos anti-Anexina após o desafio indicam potencial atividade de endocitose de anticorpos ligados à superfície do parasita.

A imunização de camundongos com as proteínas recombinantes rLy6.5, rSmVal7, rAnel-II ou rAnel-III não induziu redução de carga paristária significativa após desafio. Para algumas delas talvez seja necessário obter a proteína com estrutura. Por outro lado, novos vetores de DNA, melhores sistemas de apresentação, novos adjuvantes que induzam citocinas imunodulatórias poderiam permitir significativo aumento da resposta imune para estes antígenos e indução de mecanismos protetores específicos (WYNN; HOFFMANN, 2000), uma vez que estes antígenos apresentam importantes características que fazem deles ainda

serem potenciais candidatos vacinais. No entanto, não há ainda um consenso sobre o tipo de resposta imune desejada para se obter uma melhor proteção.

De uma forma geral, estes estudos permitiram caracterizar 3 membros de importantes famílias de proteínas de superfície de *Schistosoma mansoni* que permitirá estabelecer melhor como ocorre a interação parasita-hospedeiro.

REFERÊNCIAS *

- AL-SHERBINY, M.; OSMAN, A.; BARAKAT, R.; EL MORSHEDY, H.; BERGQUIST, R.; OLDS, R. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Trop.**, v. 88, p. 117-130, 2003.
- AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 79-85, 2006. Suppl 1.
- AOKI, K.; MORIGUCHI, H.; YOSHIOKA, T.; OKAWA, K.; TABARA, H. In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. **EMBO J.**, v. 26, p. 5007-5019, 2007.
- ARGIRO, L.; HENRI, S.; DESSEIN, H.; KOURIBA, B.; DESSEIN, A. J.; BOURGOIS, A. Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum. **Vaccine**, v. 18, p. 2033-2038, 2000.
- ASOJO, O. A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; DEUMIC, V.; LIU, S.; BORGSTAHL, G. E.; HOTEZ, P. J. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. **J. Mol. Biol.**, v. 346, p. 801-814, 2005.
- BAMEZAI, A. Mouse Ly-6 proteins and their extended family: markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. **Arch Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v. 52, p. 255-266, 2004.
- BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1, p. 95-101, 1998.
- BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccine: research to development. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 99-104, 1998.
- BERGQUIST, R.; AL-SHERBINY, M.; BARAKAT, R.; OLDS, R. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. **Acta Trop.**, v. 82, p. 183-192, 2002.
- BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T.; WILSON, R. A.; DILLON, G. P.; CERQUEIRA, G. C.; MASHIYAMA, S. T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L. F.; ASHTON, P. D.; ASLETT, M. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C. R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY, T. A.; DELCHER, A.; DEMARCO, R.; DJIKENG, A.; EYRE, T.; GAMBLE, J. A.; GHEDIN, E.; GU, Y.; HERTZ-FOWLER, C.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; HOUSTON, R.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LACERDA, D.; MACEDO, C. D.; MCVEIGH, P.; NING, Z.; OLIVEIRA, G.; OVERINGTON, J. P.; PARKHILL, J.; PERTEA, M.; PIERCE, R. J.; PROTASIO, A. V.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; SAJID, M.; SALZBERG, S. L.; STANKE, M.; TIVEY, A. R.; WHITE, O.; WILLIAMS, D. L.; WORTMAN, J.; WU, W.; ZAMANIAN, M.; ZERLOTINI, A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; BARRELL, B. G.; EL-SAYED, N. M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, p. 352-358, 2009.

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

BODIAN, D. L.; DAVIS, S. J.; MORGAN, B. P.; RUSHMERE, N. K. Mutational analysis of the active site and antibody epitopes of the complement-inhibitory glycoprotein, CD59. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 507-516, 1997.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 250-269, 1989.

BOULANGER, D.; WARTER, A.; TROTTEIN, F.; MAUNY, F.; BREMOND, P.; AUDIBERT, F.; COURET, D.; KADRI, S.; GODIN, C.; SELLIN, E.; ET AL. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 361-369, 1995.

BOYLE, J. P.; WU, X. J.; SHOEMAKER, C. B.; YOSHINO, T. P. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 128, p. 205-215, 2003.

BRASCHI, S.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 205-212, 2006.

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

BRASCHI, S.; WILSON, R. A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Mol. Cell Proteomics**, v. 5, p. 347-356, 2006.

BRINDLEY, P. J.; PEARCE, E. J. Genetic manipulation of schistosomes. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 465-473, 2007.

BUTTERWORTH, A. E.; CAPRON, M.; CORDINGLEY, J. S.; DALTON, P. R.; DUNNE, D. W.; KARIUKI, H. C.; KIMANI, G.; KOECH, D.; MUGAMBI, M.; OUMA, J. H.; ET AL. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 393-408, 1985.

CAPRON, A.; CAPRON, M.; DOMBROWICZ, D.; RIVEAU, G. Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. **Int. Arch Allergy Immunol.**, v. 124, p. 9-15, 2001.

CAPRON, A.; CAPRON, M.; RIVEAU, G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. **Br. Med. Bull.**, v. 62, p. 139-148, 2002.

CARDOSO, F. C.; MACEDO, G. C.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; MATI, V. L.; DE MELO, A. L.; CALIARI, M. V.; ALMEIDA, G. T.; VENANCIO, T. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. e308, 2008.

- CARDOSO, F. C.; PACIFICO, R. N.; MORTARA, R. A.; OLIVEIRA, S. C. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 144, p. 382-391, 2006.
- CASS, C. L.; JOHNSON, J. R.; CALIFF, L. L.; XU, T.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J.; YATES, J. R., 3RD; WILLIAMS, D. L. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 155, p. 84-93, 2007.
- CHALMERS, I. W.; MCARDLE, A. J.; COULSON, R. M.; WAGNER, M. A.; SCHMID, R.; HIRAI, H.; HOFFMANN, K. F. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. **BMC Genomics**, v. 9, p. 89, 2008.
- CORRENTI, J. M.; BRINDLEY, P. J.; PEARCE, E. J. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 143, p. 209-215, 2005.
- COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? **Adv. Parasitol.**, v. 39, p. 271-336, 1997.
- CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Mol. Cell Proteomics**, v. 5, p. 835-844, 2006.
- DAINICHI, T.; MAEKAWA, Y.; ISHII, K.; ZHANG, T.; NASHED, B. F.; SAKAI, T.; TAKASHIMA, M.; HIMENO, K. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7380-7386, 2001.
- DALTON, J. P.; DAY, S. R.; DREW, A. C.; BRINDLEY, P. J. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. **Parasitology**, v. 115 (Pt 1), p. 29-32, 1997.
- DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasite vaccines--a reality? **Vet. Parasitol.**, v. 98, p. 149-167, 2001.
- DAVIS, R. E.; PARRA, A.; LOVERDE, P. T.; RIBEIRO, E.; GLORIOSO, G.; HODGSON, S. Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, p. 8687-8692, 1999.
- DENG, J.; GOLD, D.; LOVERDE, P. T.; FISHELSON, Z. Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6402-6410, 2003.
- DESSEIN, A. J.; BEGLEY, M.; DEMEURE, C.; CAILLOL, D.; FUERI, J.; DOS REIS, M. G.; ANDRADE, Z. A.; PRATA, A.; BINA, J. C. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **J. Immunol.**, v. 140, p. 2727-2736, 1988.

DIAS NETO, E.; HARROP, R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; WILSON, R. A.; PENA, S. D.; SIMPSON, A. J. Minilibraries constructed from cDNA generated by arbitrarily primed RT-PCR: an alternative to normalized libraries for the generation of ESTs from nanogram quantities of mRNA. **Gene**, v. 186, p. 135-142, 1997.

DILLON, G. P.; FELTWELL, T.; SKELTON, J. P.; ASHTON, P. D.; COULSON, P. S.; QUAIL, M. A.; NIKOLAIDOU-KATSARIDOU, N.; WILSON, R. A.; IVENS, A. C. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 1-8, 2006.

DILLON, G. P.; ILLES, J. C.; ISAACS, H. V.; WILSON, R. A. Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount in situ hybridization. **Parasitology**, v. 134, p. 1589-1597, 2007.

DINGUIRARD, N.; YOSHINO, T. P. Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, p. 219-230, 2006.

DOENHOFF, M. J. A Vaccine for Schistosomiasis: alternative approaches. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 105-109, 1998.

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

EL RIDI, R.; TALLIMA, H. *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. **Vaccine**, v. 27, p. 666-673, 2009.

FAGHIRI, Z.; SKELLY, P. J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. **FASEB J.**, v. 23, p. 2780-2789, 2009.

FALLON, P. G.; STURROCK, R. F.; NIANG, A. C.; DOENHOFF, M. J. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 61-62, 1995.

FARIAS, L. P.; CARDOSO, F. C.; MIYASATO, P. A.; MONTOYA, B. O.; TARARAM, C. A.; ROFFATO, H. K.; KAWANO, T.; GAZZINELLI, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A.; OLIVEIRA, S. C.; LEITE, L. C. *Schistosoma mansoni* Stomatin like protein-2 is located in the tegument and induces partial protection against challenge infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e597, 2010.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FISHELSON, Z. Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 289-292, 1995.

- FITZPATRICK, J. M.; JOHNSTON, D. A.; WILLIAMS, G. W.; WILLIAMS, D. J.; FREEMAN, T. C.; DUNNE, D. W.; HOFFMANN, K. F. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 141, p. 1-13, 2005.
- GELDHOF, P.; VISSER, A.; CLARK, D.; SAUNDERS, G.; BRITTON, C.; GILLEARD, J.; BERRIMAN, M.; KNOX, D. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. **Parasitology**, v. 134, p. 609-619, 2007.
- GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 331-371, 2002.
- GOMES, M. S.; CABRAL, F. J.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O.; RODRIGUES, V.; BABA, E. H.; SA, R. G. Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Int.**, v. 58, p. 61-68, 2009.
- GOUD, G. N.; BOTTAZZI, M. E.; ZHAN, B.; MENDEZ, S.; DEUMIC, V.; PLIESKATT, J.; LIU, S.; WANG, Y.; BUENO, L.; FUJIWARA, R.; SAMUEL, A.; AHN, S. Y.; SOLANKI, M.; ASOJO, O. A.; WANG, J.; BETHONY, J. M.; LOUKAS, A.; ROY, M.; HOTEZ, P. J. Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. **Vaccine**, v. 23, p. 4754-4764, 2005.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.
- HAGAN, P.; BLUMENTHAL, U. J.; DUNN, D.; SIMPSON, A. J.; WILKINS, H. A. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, v. 349, p. 243-245, 1991.
- HAGAN, P.; SHARAF, O. Schistosomiasis vaccines. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 1271-1278, 2003.
- HALOVA, I.; DRABEROVA, L.; DRABER, P. A novel lipid raft-associated glycoprotein, TEC-21, activates rat basophilic leukemia cells independently of the type 1 Fc epsilon receptor. **Int. Immunol.**, v. 14, p. 213-223, 2002.
- HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.
- HANSELL, E.; BRASCHI, S.; MEDZIHRADESKY, K. F.; SAJID, M.; DEBNATH, M.; INGRAM, J.; LIM, K. C.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. e262, 2008.
- HARN, D. A.; GU, W.; OLIGINO, L. D.; MITSUYAMA, M.; GEBREMICHAEL, A.; RICHTER, D. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. **J. Immunol.**, v. 148, p. 562-567, 1992.

- HARROP, R.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A. Characterization, cloning and immunogenicity of antigens released by lung-stage larvae of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 118 (Pt 6), p. 583-594, 1999.
- HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol.**, v. 27, p. 271-280, 2005.
- HIJAZI, A.; MASSON, W.; AUGÉ, B.; WALTZER, L.; HAENLIN, M.; ROCH, F. boudin is required for septate junction organisation in *Drosophila* and codes for a diffusible protein of the Ly6 superfamily. **Development**, v. 136, p. 2199-2209, 2009.
- HOFFMAN, D. R. Allergens in *Hymenoptera venom*. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 92, p. 707-716, 1993.
- HONGLI, Y.; SHUHAN, S.; RUIWEN, C.; YINGJUN, G. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 119, p. 1-5, 2002.
- HOTA-MITCHELL, S.; CLARKE, M. W.; PODESTA, R. B.; DEKABAN, G. A. Recombinant vaccinia viruses and gene gun vectors expressing the large subunit of *Schistosoma mansoni* calpain used in a murine immunization-challenge model. **Vaccine**, v. 17, p. 1338-1354, 1999.
- HU, W.; YAN, Q.; SHEN, D. K.; LIU, F.; ZHU, Z. D.; SONG, H. D.; XU, X. R.; WANG, Z. J.; RONG, Y. P.; ZENG, L. C.; WU, J.; ZHANG, X.; WANG, J. J.; XU, X. N.; WANG, S. Y.; FU, G.; ZHANG, X. L.; WANG, Z. Q.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; XUE, C. L.; FENG, Z.; CHEN, Z.; HAN, Z. G. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. **Nat. Genet.**, v. 35, p. 139-147, 2003.
- ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L. F.; DAY, T. A.; BENNETT, J. L. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 932-935, 1999.
- JAMES, S. L. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvicidal macrophages. **J Immunol.**, v. 136, p. 3872-3877, 1986.
- JINEK, M.; DOUDNA, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v. 457, p. 405-412, 2009.
- KAFADAR, K. A.; YI, L.; AHMAD, Y.; SO, L.; ROSSI, F.; PAVLATH, G. K. Sca-1 expression is required for efficient remodeling of the extracellular matrix during skeletal muscle regeneration. **Dev. Biol.**, v. 326, p. 47-59, 2009.
- KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansônica. **Ver. Soc. Bras. Med. Tropical**, v. 32, p. 705-711, 1999.

KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. P. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 7, p. 381-387, 1973.

KENIS, H.; VAN GENDEREN, H.; BENNAGHMOUCH, A.; RINIA, H. A.; FREDERIK, P.; NARULA, J.; HOFSTRA, L.; REUTELINGSPERGER, C. P. Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 52623-52629, 2004.

KIMBERLEY, F. C.; SIVASANKAR, B.; PAUL MORGAN, B. Alternative roles for CD59. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 73-81, 2007.

KINES, K. J.; MANN, V. H.; MORALES, M. E.; SHELBY, B. D.; KALINNA, B. H.; GOBERT, G. N.; CHIRGWIN, S. R.; BRINDLEY, P. J. Transduction of *Schistosoma mansoni* by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped Moloney murine leukemia retrovirus. **Exp. Parasitol.**, v. 112, p. 209-220, 2006.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Initiation and regulation of disease in schistosomiasis. In: _____. **Schistosomiasis**. 6th ed. Londres: Imperial College Press, 2001. Cap. 1, p. 213-264.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, p. 1561-1569, 2005.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADESKY, K. F.; LIM, K. C.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Mol. Cell Proteomics**, v. 4, p. 1862-1875, 2005.

KONOPKA-POSTUPOLSKA, D. Annexins: putative linkers in dynamic membrane-cytoskeleton interactions in plant cells. **Protoplasma**, v. 230, p. 203-215, 2007.

KOSTER, B.; DARGATZ, H.; SCHRODER, J.; HIRZMANN, J.; HAARMANN, C.; SYMMONS, P.; KUNZ, W. Identification and localisation of the products of a putative eggshell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 31, p. 183-198, 1988.

KRAUTZ-PETERSON, G.; BHARDWAJ, R.; FAGHIRI, Z.; TARARAM, C. A.; SKELLY, P. J. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. **Parasitology**, v. 137, p. 485-495, 2010.

KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. *Schistosoma mansoni*: the dicer gene and its expression. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 122-128, 2008a.

KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. Schistosome asparaginyl endopeptidase (legumain) is not essential for cathepsin B1 activation in vivo. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 159, p. 54-58, 2008b.

- LANAR, D. E.; PEARCE, E. J.; JAMES, S. L.; SHER, A. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. **Science**, v. 234, p. 593-596, 1986.
- LAZDINS, J. K.; STEIN, M. J.; DAVID, J. R.; SHER, A. *Schistosoma mansoni*: rapid isolation and purification of schistosomula of different developmental stages by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. **Exp. Parasitol.**, v. 53, p. 39-44, 1982.
- LI, B. W.; RUSH, A. C.; TAN, J.; WEIL, G. J. Quantitative analysis of gender-regulated transcripts in the filarial nematode *Brugia malayi* by real-time RT-PCR. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 137, p. 329-337, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOEUILLET, C.; DEUTSCH, S.; CIUFFI, A.; ROBYR, D.; TAFFE, P.; MUNOZ, M.; BECKMANN, J. S.; ANTONARAKIS, S. E.; TELENTI, A. In vitro whole-genome analysis identifies a susceptibility locus for HIV-1. **PLoS Biol.**, v. 6, p. e32, 2008.
- LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 257-263, 2007.
- MAJID, A. A.; BUSHARA, H. O.; SAAD, A. M.; TAYLOR, M. G.; DARGIE, J. D.; MARSHALL, T. F. C.; G.S., N. Immunization of calves against *Schistosoma bovis* using irradiated cercariae and schistosomula of *S. bovis*. **Parasitology**, v. 77, p. 303-320, 1978.
- MARQUES, H. H.; ZOUAIN, C. S.; TORRES, C. B.; OLIVEIRA, J. S.; ALVES, J. B.; GOES, A. M. Protective effect and granuloma down-modulation promoted by RP44 antigen a fructose 1,6 bisphosphate aldolase of *Schistosoma mansoni*. **Immunobiology**, v. 213, p. 437-446, 2008.
- MCMANUS, D. P.; HU, W.; BRINDLEY, P. J.; FENG, Z.; HAN, Z. G. Schistosome transcriptome analysis at the cutting edge. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 301-304, 2004.
- MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 225-242, 2008.
- MORGAN, R. O.; MARTIN-ALMEDINA, S.; IGLESIAS, J. M.; GONZALEZ-FLOREZ, M. I.; FERNANDEZ, M. P. Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1742, p. 133-140, 2004.
- MORTIMER, J. C.; LAOHAVISIT, A.; MACPHERSON, N.; WEBB, A.; BROWNLEE, C.; BATTEY, N. H.; DAVIES, J. M. Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. **J. Exp. Bot.**, v. 59, p. 533-544, 2008.
- MOUNTFORD, A. P.; HARROP, R.; WILSON, R. A. Antigens derived from lung-stage larvae of *Schistosoma mansoni* are efficient stimulators of proliferation and gamma interferon secretion by lymphocytes from mice vaccinated with attenuated larvae. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1980-1986, 1995.

NILTON, A.; OSHIMA, K.; ZARE, F.; BYRI, S.; NANNMARK, U.; NYBERG, K. G.; FEHON, R. G.; UV, A. E. Crooked, coiled and crimped are three Ly6-like proteins required for proper localization of septate junction components. **Development**, v. 137, p. 2427-2437, 2010.

OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; FARIAS, L. P.; LEITE, L. C. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop.**, v. 108, p. 256-262, 2008.

PARIZADE, M.; ARNON, R.; LACHMANN, P. J.; FISHELSON, Z. Functional and antigenic similarities between a 94-kD protein of *Schistosoma mansoni* (SCIP-1) and human CD59. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1625-1636, 1994.

PEARCE, E. J.; JAMES, S. L.; HIENY, S.; LANAR, D. E.; SHER, A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 85, p. 5678-5682, 1988.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PEREIRA, T. C.; PASCOAL, V. D.; MARCHESINI, R. B.; MAIA, I. G.; MAGALHAES, L. A.; ZANOTTI-MAGALHAES, E. M.; LOPES-CENDES, I. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 619-623, 2008.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. e45, 2001.

PLUMMER, T. H., JR.; TARENTINO, A. L. Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. **Glycobiology**, v. 1, p. 257-263, 1991.

RAND, J. H. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. **J. Autoimmun.**, v. 15, p. 107-111, 2000.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 2631-2639, 2004.

REY, L. Esquistossomose mansônica: o parasito. In: _____. **Bases da Parasitologia Médica**. 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992. Cap. 15, p. 143-156.

REYNOLDS, S. R.; SHOEMAKER, C. B.; HARN, D. A. T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, v. 149, p. 3995-4001, 1992.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. Schistosomiasis--a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitol. Res.**, v. 99, p. 505-521, 2006.

- RIBEIRO DE JESUS, A.; ARAUJO, I.; BACELLAR, O.; MAGALHAES, A.; PEARCE, E.; HARN, D.; STRAND, M.; CARVALHO, E. M. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2797-2803, 2000.
- ROSS, A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 1212-1220, 2002.
- SCHECHTMAN, D.; TARRAB-HAZDAI, R.; ARNON, R. The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 23, p. 213-217, 2001.
- SHALABY, K. A.; YIN, L.; THAKUR, A.; CHRISTEN, L.; NILES, E. G.; LOVERDE, P. T. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. **Vaccine**, v. 22, p. 130-136, 2003.
- SKELLY, P. J.; DA'DARA, A.; HARN, D. A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 363-369, 2003.
- SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making sense of the schistosome surface. **Adv. Parasitol.**, v. 63, p. 185-284, 2006.
- SMITH, M. A.; CLEGG, J. A. Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. **Science**, v. 227, p. 535-538, 1985.
- SMITHERS, S. R.; HACKETT, F.; ALI, P. O.; SIMPSON, A. J. Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. **Parasite Immunol.**, v. 11, p. 301-318, 1989.
- STEFANIC, S.; DVORAK, J.; HORN, M.; BRASCHI, S.; SOJKA, D.; RUELAS, D. S.; SUZUKI, B.; LIM, K. C.; HOPKINS, S. D.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e850, 2010.
- TARARAM, C. A.; FARIAS, L. P.; WILSON, R. A.; LEITE, L. C. *Schistosoma mansoni* Annexin 2: molecular characterization and immunolocalization. **Exp. Parasitol.**, v. 126, p. 146-155, 2010.
- TENDLER, M.; BRITO, C. A.; VILAR, M. M.; SERRA-FREIRE, N.; DIOGO, C. M.; ALMEIDA, M. S.; DELBEM, A. C.; DA SILVA, J. F.; SAVINO, W.; GARRATT, R. C.; KATZ, N.; SIMPSON, A. S. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, p. 269-273, 1996.
- TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Trop.**, v. 108, p. 263-266, 2008.
- TIJSTERMAN, M.; MAY, R. C.; SIMMER, F.; OKIHARA, K. L.; PLASTERK, R. H. Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 111-116, 2004.

TRAN, M. H.; FREITAS, T. C.; COOPER, L.; GAZE, S.; GATTON, M. L.; JONES, M. K.; LOVAS, E.; PEARCE, E. J.; LOUKAS, A. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. e1000840, 2010.

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

TURNAY, J.; LECONA, E.; FERNANDEZ-LIZARBE, S.; GUZMAN-ARANGUEZ, A.; FERNANDEZ, M. P.; OLMO, N.; LIZARBE, M. A. Structure-function relationship in annexin A13, the founder member of the vertebrate family of annexins. **Biochem. J.**, v. 389, p. 899-911, 2005.

VAN BALKOM, B. W.; VAN GESTEL, R. A.; BROUWERS, J. F.; KRIJGSVELD, J.; TIELENS, A. G.; HECK, A. J.; VAN HELLEMOND, J. J. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **J. Proteome Res.**, v. 4, p. 958-966, 2005.

VAN HELLEMOND, J. J.; RETRA, K.; BROUWERS, J. F.; VAN BALKOM, B. W.; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 691-699, 2006.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A.; GUIMARAES, P. E.; OJOPI, E. P.; PAQUOLA, A. C.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y., JR.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P.; HO, P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C.; MARQUES, R. C.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A.; SA, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet.**, v. 35, p. 148-157, 2003.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E.; MENCK, C. F.; WILSON, R. A. Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 304-308, 2004.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VENANCIO, T. M.; OLIVEIRA, K. C.; ALMEIDA, G. T.; DEMARCO, R. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. **Exp. Parasitol.**, v. 117, p. 236-245, 2007.

VERMEIRE, J. J.; TAFT, A. S.; HOFFMANN, K. F.; FITZPATRICK, J. M.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 147, p. 39-47, 2006.

WILKINS, H. A.; BLUMENTHAL, U. J.; HAGAN, P.; HAYES, R. J.; TULLOCH, S. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 29-35, 1987.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? **Microbes Infect.**, v. 1, p. 535-543, 1999.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol.**, v. 25, p. 423-431, 2009.

WILSON, R. A.; LANGERMANS, J. A.; VAN DAM, G. J.; VERVENNE, R. A.; HALL, S. L.; BORGES, W. C.; DILLON, G. P.; THOMAS, A. W.; COULSON, P. S. Elimination of *Schistosoma mansoni* Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for a Therapeutic Vaccine? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. e290, 2008.

WYNN, T. A.; HOFFMANN, K. F. Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th1 versus Th2? **Parasitol. Today**, v. 16, p. 497-501, 2000.

YANG, W.; JACKSON, D. C.; ZENG, Q.; MCMANUS, D. P. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine**, v. 19, p. 103-113, 2000.

YUAN, X. S.; SHEN, J. L.; WANG, X. L.; WU, X. S.; LIU, D. P.; DONG, H. F.; JIANG, M. S. *Schistosoma japonicum*: a method for transformation by electroporation. **Exp. Parasitol.**, v. 111, p. 244-249, 2005.

ZHANG, Y.; WANG, K. H.; GUO, Y. J.; LU, Y. M.; YAN, H. L.; SONG, Y. L.; WANG, F.; DING, F. X.; SUN, S. H. Annexin B1 from *Taenia solium* metacestodes is a newly characterized member of the annexin family. **Biol. Chem.**, v. 388, p. 601-610, 2007.