

MAYRA MARA FERRARI BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS E DE SUPERFÍCIE DE
SCHISTOSOMA MANSONI COMO ANTÍGENOS VACINAIS, USANDO UM
SISTEMA APRESENTADOR DE MÚLTIPLOS ANTÍGENOS (MAPS-OMV)**

São Paulo

2015

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES -SP
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS-CRH
GRUPO DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HUMANOS-GDRH
CENTRO DE FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS PARA O SUS
“Dr. Antonio Guilherme de Souza”
SECRETARIA DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL – PAP

MAYRA MARA FERRARI BARBOSA

AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS E DE SUPERFÍCIE DE
SCHISTOSOMA MANSONI COMO ANTÍGENOS VACINAIS, USANDO UM
SISTEMA APRESENTADOR DE MULTIPLOS ANTÍGENOS (MAPS-OMV)

Monografia apresentada ao
Programa de Aprimoramento
Profissional - SES-SP, elaborada
no Instituto Butantan/Centro de
Biotecnologia.

Área: Biotecnologia Aplicada a
Saúde.

São Paulo

2015

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai Edelson, minha mãe Renata e minha irmã Mayta.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me guiado nesse ano todo, por ter me dado forças pra superar cada obstáculo encontrado neste caminho. Em segundo lugar eu gostaria de agradecer a minha família, pelo apoio, pela paciência, pelas sabias palavras de cada dia e principalmente por todo suporte, estrutura e confiança atribuída.

Em terceiro lugar gostaria de agradecer à todo o pessoal do Laboratório de Biotecnologia Molecular IV, do Instituto Butantã, principalmente Rafaela, Juliana e Leonardo, os quais me acompanharam e me ensinaram pacientemente.

Gostaria de agradecer a Dra. Luciana César de Cerqueira Leite por confiar à mim este trabalho e por ter apostado em minhas competências, agradeço vossa orientação e auxílio.

Agradeço a FUNDAP, órgão financiador do meu trabalho e também agradeço ao Instituto Butantan por todo suporte e instalações.

Resumo

As principais vacinas comercializadas atualmente seguem a estratégia da vacinologia convencional, baseada nos Princípios de Pasteur: “Isolar, inativar e injetar” o microrganismo causador da doença. Porém essa abordagem não se à patógenos com grande variabilidade antigênica ou organismos mais complexos, os quais possuem mecanismos de evasão do sistema imune mais sofisticados. Novas abordagens e tecnologias incluem o uso de rotas alternativas de imunização e novos adjuvantes. A esquistossomose é considerada a mais importante das helmintíases humanas em termos de morbidade e mortalidade. Um possível racional para o desenvolvimento de uma vacina anti-helmíntica seria selecionar moléculas secretadas ou expostas na superfície como candidatos vacinais, com o objetivo de interferir com a migração / desenvolvimento do parasita, bloqueando ou prejudicando processos-chave, tais como a penetração na pele, a penetração dos vasos sanguíneos e a alimentação. Objetivo: Construir e explorar o sistema de apresentação de múltiplos antígenos (MAPS), o qual permite a criação de um complexo macromolecular que imita as propriedades de vacinas de células inteiras através da integração de vários componentes antigênicos em uma matriz. Este complexo poderá incluir, além das proteínas recombinantes, elementos adjuvantes como vesículas de membrana externa (OMVs) na mesma construção. Materiais e métodos: MAPS usa uma abordagem de acoplamento à base de afinidade. A proteína de ligação à biotina, Rhizavidin (Rhavi), é modificada e expressa em fusão com os diferentes antígenos-alvo em *Escherichia coli*. As OMVs serão posteriormente obtidas a partir de *N. meningitidis* do serogrupo B, e após biotinilação funcionam como um suporte para as proteínas recombinantes fusionadas a rizavidina. Resultados: As proteínas de fusão com a rizavidina foram obtidas para os antígenos SmCD59.2, SmVAL4, SmVAL18, SmTSP-2, SmAP, SmAnnexin-2. Embora tenha sido observada expressão para todas as construções, os rendimentos foram não foram elevados, e formas de aumentar os rendimentos estão sendo avaliadas. Os resultados preliminares indicam que as proteínas de fusão foram expressas na forma insolúvel; purificação e processos de renovelamento estão em andamento para posteriormente realizar a ligação destas com o OMV biotinilado.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Esquistossomose, o impacto da doença e seu agente causador	8
1.1.1 A situação problema	9
1.2 Vacinas e os potenciais alvos vacinais para <i>Schistosoma mansoni</i>	11
1.2.1 Racional para escolha dos antígenos	12
1.3 Sistema múltiplo apresentador de antígenos (MAPS)	15
1.4 Vesículas de membrana externa (OMVs)	17
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Identificação e análise das sequencias para construção dos plasmídeos	19
4.2 Expressão das proteínas recombinantes	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Construção do vetor Rhavi-antígeno	21
5.2 Expressão das proteínas	22
5.2.1 Confirmação da expressão por gel SDS / PAGE	22
5.2.2 Confirmação por Western-Blot	23
6. CONCLUSÃO	25
7. BIBLIOGRAFIA	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose, o impacto da doença e seu agente causador

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande impacto mundial, sendo designada a doença helmíntica de maior importância em termos de morbidade e mortalidade. É endêmica em 78 países e já atinge mais de 240 milhões de pessoas no mundo; 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões sofrem de doenças graves. Esta doença é causada por um verme do gênero *Schistosoma*, que habita o sistema porta-hepático e as veias do mesentério (Boros 1989, McManus and Loukas 2008, WHO 2014). Cinco espécies de *Schistosoma* são capazes de causar a doença em humanos, *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. haematobium*. A espécie *S. mansoni* infecta 7,1 milhões de pessoas na América, das quais 95% se encontram no Brasil; a mesma atinge 54 milhões de pessoas na África Subsaariana (Silva, Marcet-Houben et al. 2012).

Estes vermes são trematódeos que vivem em casais e ligados às paredes das veias mesentéricas do hospedeiro. Seu ciclo de vida é complexo alternando entre caramujos aquáticos (hospedeiro intermediário), onde a reprodução assexuada ocorre e os seres humanos (hospedeiro definitivo), nos quais ocorre a reprodução sexuada (Boros 1989). A infecção humana é iniciada durante a exposição à água (plantio, pesca, higienização e natação) infestada por cercarias, larvas de vida livre capazes de penetrar através da pele do hospedeiro. As cercarias transformam-se em esquistossômulos, migram para o pulmão e depois para o sistema porta hepático, onde desenvolvem-se em vermes adultos, e após a maturação das fêmeas inicia a oviposição (Figura 1). Parte desses ovos são eliminados através das fezes e urina (*S. hematobium*), outra parte fica aderida a parede do sistema porta hepático, desencadeando os sintomas clássicos da doença, como dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes. O aumento do fígado é comum em casos avançados, e é frequentemente associada a um acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e hipertensão dos vasos sanguíneos abdominais. Em tais casos, pode também haver alargamento do baço (Boros 1989, McManus and Loukas 2008, WHO 2014). O ciclo de vida deste parasita se completa quando os ovos eliminados através das fezes ou urina chegam a água e após a eclosão originam-se miracídeos, larvas capazes de infectar os caramujos, no caso do *Schistosoma*

mansoni, estas larvas infectam caramujos da espécie *Biomphalaria*. No caramujo, os miracídeos transformam-se em esporocistos, os quais originarão as cercárias através da reprodução assexuada (McManus and Loukas 2008).

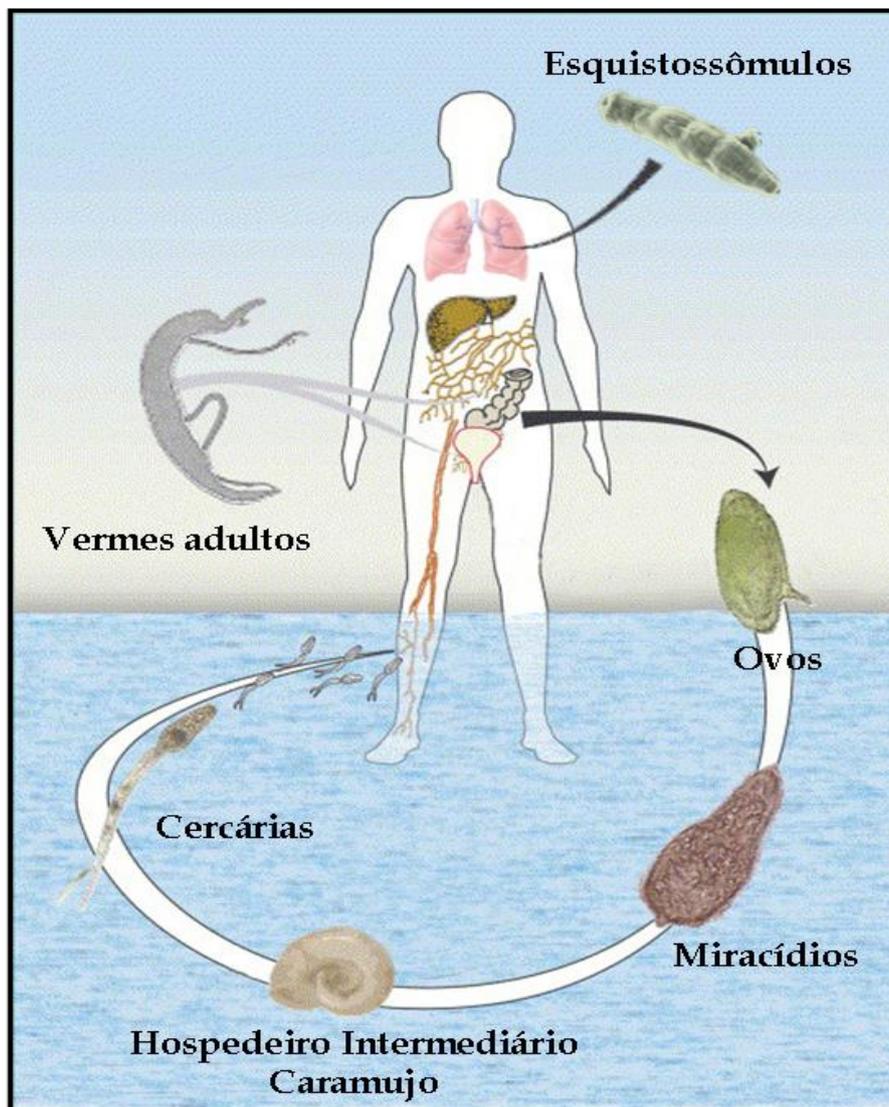


FIGURA 1: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Retirado e modificado de (Gryseels, Polman et al. 2006).

1.1.1 A situação problema

Existem evidências que correlacionam as infecções emergentes de esquistossomose a casos de HIV (Vírus da imunodeficiência humana), tuberculose e malária. Acredita-se que a esquistossomose pode impactar na etiologia e transmissão desses microrganismos (McManus and Loukas 2008). Estudos recentes mostram que os casos de poliparasitismo (co-infecções ocasionadas por ancilostomídeos, esquistossomos e filarias) já observado na

África, aumentam a suscetibilidade dos indivíduos à Malaria, HIV/AIDS e Tuberculose. Alguns dados apontam que o *Schistosoma* é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, tornando-o mais susceptível a Malária.

Outros estudos demonstram que as infecções helmínticas crônicas aumentam o risco de infecção por HIV através de um processo de ativação imune crônica, o que resulta num aumento da carga viral no plasma por HIV (Hotez, Molyneux et al. 2006). Sendo assim, a dimensão que essas interações podem alcançar é preocupante e merece a devida atenção, visto que, o combate a essa doença pode resultar em um benéfico efeito colateral sob o HIV/AIDS, a malária e a tuberculose.

O tratamento padrão da esquistossomose é a quimioterapia com praziquantel, que é eficaz contra todas as espécies que infestam o homem, não apresenta efeitos colaterais severos e atualmente é barato e de fácil acesso (Ribeiro-dos-Santos e col., 2006). Entretanto, a quimioterapia em massa nas regiões endêmicas é pouco efetiva, porque não age sobre o estágio de esquistossômulos e não previne à re-infecção, dificultando a erradicação da doença e sendo necessária a repetição do tratamento de tempos em tempos (Sabah e col., 1986). Além disso, já foi descrita a baixa eficácia do tratamento no Egito e Senegal, onde linhagens resistentes a droga foram isoladas (Fallon e col., 1995; Ismail e col., 1999). Desse modo, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novas drogas efetivas contra o parasita e de novas abordagens para erradicar a doença, como a utilização de vacinas.

Uma vacina eficaz preveniria a evolução de linhagens de parasitas resistentes ao tratamento com drogas e protegeria contra a patologia. Esta forma de prevenção pode ser considerada ainda mais relevante, pois a patologia não é revertida pela quimioterapia e o diagnóstico da doença é difícil nos estágios iniciais devido à sintomatologia inespecífica (Wilson e Coulson, 1999). A vacinação também acabaria com o círculo vicioso de sucessivas infecções, uma vez que interromperia o ciclo de vida do parasita. Modelos matemáticos indicam que a vacina não precisaria apresentar imunidade esterilizante, e que uma redução de pelo menos 40% na carga parasitária reduziria a morbidade e as taxas de transmissão significativamente (Chan e Bundy, 1997). Composto um tratamento com abordagens complementares: a quimioterapia seria

responsável pela redução da carga parasitária em curto prazo, enquanto a imunização proveria proteção à população em longo prazo (Bergquist and Colley 1998, Rofatto, Leite et al. 2011).

Diversos dados apoiam a plausibilidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a esquistossomose: I – pessoas residentes em áreas endêmicas desenvolvem naturalmente diferentes níveis de proteção contra a infecção (Bergquist 2002); II – diversos modelos animais da esquistossomose apresentam autocura baseada na resposta imune, como *Macaca mulata* e *Rattus norvegicus* (Wilson and Coulson 2009); III – diversos modelos animais, tanto primatas quanto roedores, apresentaram altos níveis de proteção quando imunizados com cercárias atenuadas por irradiação (Coulson 1997, Hewitson, Hamblin et al. 2005). Assim seria necessário apenas caracterizar e mimetizar essas respostas imunes protetoras, identificando os antígenos por elas responsáveis. Entretanto, na prática essa tarefa demonstrou-se mais difícil do que inicialmente previsto e um dos grandes desafios está na expressão e formulação desses antígenos vacinais, bem como no desenvolvimento de um bom sistema de apresentação de antígenos (McManus and Loukas 2008).

1.2 Vacinas e os potenciais alvos vacinais para *Schistosoma mansoni*

Atualmente o desenvolvimento de vacinas depende fundamentalmente do conhecimento dos mecanismos protetores envolvidos na resposta às infecções e dos mecanismos de patogênese. Sendo assim, muitas são as dificuldades para a formulação de novas vacinas, visto que, em muitos casos o patógeno possui alta variabilidade antigênica ou a resposta disparada pelo mesmo pode ser sistêmica (SCHATZMAYR 2003, Rappuoli, Bagnoli et al. 2011).

Duas linhas de pesquisas regem hoje a busca por novas vacinas: (1) uso de novos métodos para descobrir novos alvos vacinais (conceito de vacinologia reversa, uso das técnicas de proteômica e transcriptômica); (2) desenvolvimento de novas tecnologias para expressar, entregar e formular antígenos (DNA recombinante, vetores bacterianos, vetores virais, partículas virais [VLPs], vacinas de DNA e vacina de OMVs) (Rappuoli, Bagnoli et al. 2011).

No caso da esquistossomose, a busca pela vacina tem a intenção de prevenir a infecção e/ou reduzir a fecundidade do parasita. A redução no número de vermes é considerada o “padrão de ouro” no desenvolvimento de vacinas contra esquistossomose, tendo como principal alvo o bloqueio da migração dos esquistossômulos (McManus and Loukas 2008, Pinheiro, Ribeiro et al. 2014).

O processo de busca por potenciais alvos vacinais e alvos de drogas foi facilitado com o sequenciamento do transcriptoma do *Schistosoma mansoni* e do *Schistosoma japonicum* (Hu, Yan et al. 2003, Verjovski-Almeida, DeMarco et al. 2003); e posteriormente pelo sequenciamento do genoma do parasita (Berriman, Haas et al. 2009) juntamente com dados de estudos de proteômica (Curwen, Ashton et al. 2004, Braschi, Borges et al. 2006). Através da classificação funcional por “Gene Ontology”, estudos de bioinformática e caracterizações funcionais de muitas proteínas foi possível encontrar um grande grupo de proteínas que atuam na interface parasita hospedeiro (Farias, Rodrigues et al. 2012, Farias, Krautz-Peterson et al. 2013, Rofatto, Araujo-Montoya et al. 2013, El Ridi, Tallima et al. 2014, Pinheiro, Ribeiro et al. 2014, Ricciardi, Dalton et al. 2015).

Dentre esses potenciais alvos já estudados, sete candidatos foram escolhidos para compor o novo sistema de entrega para múltiplos antígenos a ser testado.

1.2.1 Racional para escolha dos antígenos

A resistência a infecção por helmintos não é devida a um fenótipo celular particular ou a um único mecanismo molecular de morte, pelo contrário deve-se a múltiplas vias orquestradas que desarmam, degradam e bloqueiam a migração e/ou aquisição de nutrientes dos parasitas levando-os morte (Wilson, Langermans et al. 2008, Maizels, Hewitson et al. 2012). Um helminto é muitas ordens de magnitude maior que qualquer célula hospedeira, a morte mediada por macrófagos, por exemplo, pode durar muito tempo, enquanto as células impõem uma morte lenta através do comprometimento da viabilidade do verme (Allen and Maizels , Allen and Maizels 2011).

Diante deste contexto, acreditamos que somente um ataque orquestrado contra diferentes antígenos, presentes em diferentes estágios e com funções chave na migração e nutrição dos vermes, possa ter êxito na eliminação do parasita. Com base neste racional, as proteínas selecionadas estão presentes em diferentes momentos do processo de invasão do hospedeiro, muitos desses alvos estão presentes no tegumento, principal interface parasita-hospedeiro, como:

- SmCD59.2, uma proteína localizada na superfície do tegumento e altamente regulada na transição de cercaria para verme adulto. Seu homólogo em humano desenvolve uma função singular, capaz de bloquear o complexo de ataque a membrana (MAC) mediado pelo sistema complemento. Em *S. mansoni*, acredita-se que essas proteínas estejam envolvidas em diversos processos de interação molecular, visto que, uma análise de sequência identificou a presença de um domínio “Three-fingered” de proteínas, o qual tem a capacidade de se ligar a diversas moléculas e receptores (Farias, Krautz-Peterson et al. 2013).

- SmAP (Fosfatase Alcalina), trata-se de uma proteína observada na superfície de vermes adultos, amplamente distribuída pelos tecidos e que possui uma tradução muito rápida durante a transformação de cercarias para esquistossômulos. Esta característica levantou a hipótese de seu envolvimento no processo de invasão do hospedeiro. Alguns estudos demonstram que o tratamento com o praziquantel e a co-administração de um anti-soro que inibe a atividade de fosfatase alcalina aumenta a morte de vermes fêmeas “in vivo”. Estudos mais recentes mostram que anti-soros de macacos Rhesus infectados, modelo de auto-cura para esquistossomose, reconhecem esta proteína. Com esses resultados, a fosfatase alcalina foi considerada um candidato vacinal e recentemente fora testada para tal finalidade. A formulação utilizada neste teste utilizou uma dose subcurativa de Praziquantel aliada a vacina resultando em 41% de redução da carga parasitária (Araujo-Montoya, Rofatto et al. 2011, Rofatto, Araujo-Montoya et al. 2013).

- Anexina 2, identificada no tegumento por estudos proteômicos, altamente regulada na transição de cercarias para esquistossômulos, possui um núcleo conservado com quatro domínios repetidos e uma região N-terminal

variável. Estudos sugerem que ela esteja intimamente associada ao arranjo do tegumento, em processos como: remodelamento de membrana, endocitose/exocitose, fusão de vesículas e regulação do fluxo de íons. Um estudo desenvolvido para demonstrar a abundância das proteínas de tegumento, mostrou que na categoria de proteína associadas a membrana, a Anexina 2 é uma das mais abundantes (Tararam, Farias et al. 2010, Castro-Borges, Simpson et al. 2011).

- SmTSP-2, é uma proteína integral de membrana, expressa na superfície, com um papel fundamental na integridade do tegumento. Estudos mostram que a redução de expressão deste gene no estágio imaturo do verme resulta em uma intensa degradação do tegumento. Outros estudos com uso de RNA de interferência, mostram que, durante uma infecção causada por esquistossômulos deficientes para esta proteína, possuem uma carga parasitária 83% menor, quando comparada a uma infecção com parasitas normais. Em outro estudo, uma vacina de proteína recombinante foi testada em camundongos, e após a imunização e desafio observou-se reduções de 57% e 64% para as cargas parasitárias de vermes adultos e de ovos no fígado, respectivamente. Sendo assim, SmTSP-2 parece ser um antígeno vacinal eficaz contra *S. mansoni* (Tran, Pearson et al. 2006, Jia, Schulte et al. 2014).

- Calpaína, uma cisteína protease neutra, dependente de cálcio, encontrada na superfície do epitélio sincicial e na musculatura subjacente, já teve sua eficácia profilática e capacidade de impedir a fecundação testada. Em estudos recentes teve sua eficácia terapêutica avaliada por duas estratégias diferentes e três formulações vacinais testadas em babuíños. As formulações vacinais foram capazes de diminuir vermes adultos estabelecidos em 10 - 36%, reduzir a retenção de ovos em tecidos em 10 - 57%, e diminuir a excreção de ovos nas fezes de 13 - 33%, em comparação com as formulações controle. Sendo assim, seu potencial como antígeno vacinal foi fortalecido (Karmakar, Zhang et al. 2014).

Além dessas moléculas, temos representantes da família de proteínas ortólogas a alérgenos de veneno de vespa (*Schistosoma mansoni* Venom Allergen-Like proteins (SmVALs)) que são secretadas (Farias, Rodrigues et al. 2012).

- SmVAL4 está presente na glândula da cabeça de esquistossômulos, possivelmente atuando na invasão de um vaso sanguíneo pelo parasita.
- SmVAL18 possivelmente atua no processo de penetração da pele, e encontra-se nas glândulas pré-acetabulares de cercarias.

Com antígenos presentes em diferentes momentos do processo de invasão do hospedeiro, acreditamos que a resposta imune disparada pelo sistema imune do hospedeiro seja capaz de bloquear/prejudicar a migração do parasita. Para tanto, necessitamos de uma estrutura eficiente para montagem e apresentação dos antígenos, a qual foi idealizada e será apresentada a seguir.

1.3 Sistema múltiplo apresentador de antígenos (MAPS)

As vacinas de subunidades raramente são tão eficazes quanto as vacinas de células inteiras (que utilizam microrganismos atenuados ou mortos como imunógenos), pois possuem uma baixa cobertura de antígenos e focam apenas na produção de anticorpos. Devido a isso, muito tem se investido na pesquisa por bons adjuvantes, capazes de potencializar a resposta imunológica e, novos mecanismos de apresentação de antígenos, assim permitindo o desenvolvimento de vacinas com composições bem caracterizadas e com um risco reduzido de reações adversas (Plotkin and Plotkin 2011, Rappuoli, Bagnoli et al. 2011).

O sistema apresentador de múltiplos antígenos (Multiple antigen-presenting system – MAPS) foi desenvolvido com o intuito de tornar uma vacina de proteína recombinante tão eficaz quanto uma vacina celular, procurando reproduzir os pontos fortes destas vacinas em um sistema acelular definido.

MAPS usa um suporte purificado e proteínas como imunógenos. Estes componentes antigênicos são isolados e posteriormente reagrupados em um complexo macromolecular integrado, de forma a mimetizar algumas características químicas e físicas de uma célula inteira. Tal complexo pode ativar a proteção mediada por células B e T, proporcionando a característica de proteção múltipla, como a observada em vacinas de células inteiras (Zhang, Lu et al. 2013).

A construção desse complexo macromolecular segue uma abordagem de acoplamento à base de afinidade, reduzindo os danos ao epítipo e proporcionando flexibilidade e versatilidade na preparação e formulação das construções. A rizavidina (Rhavi), uma proteína de ligação à biotina, é modificada e expressa de forma recombinante em *Escherichia coli*. Esse gene é então geneticamente fundido as proteínas alvo, as quais adquirem à capacidade de ligação a biotina. Desta forma, esses antígenos podem se ligar à uma matriz biotilada, a qual servirá de suporte para formação do complexo (Zhang, Lu et al. 2013).

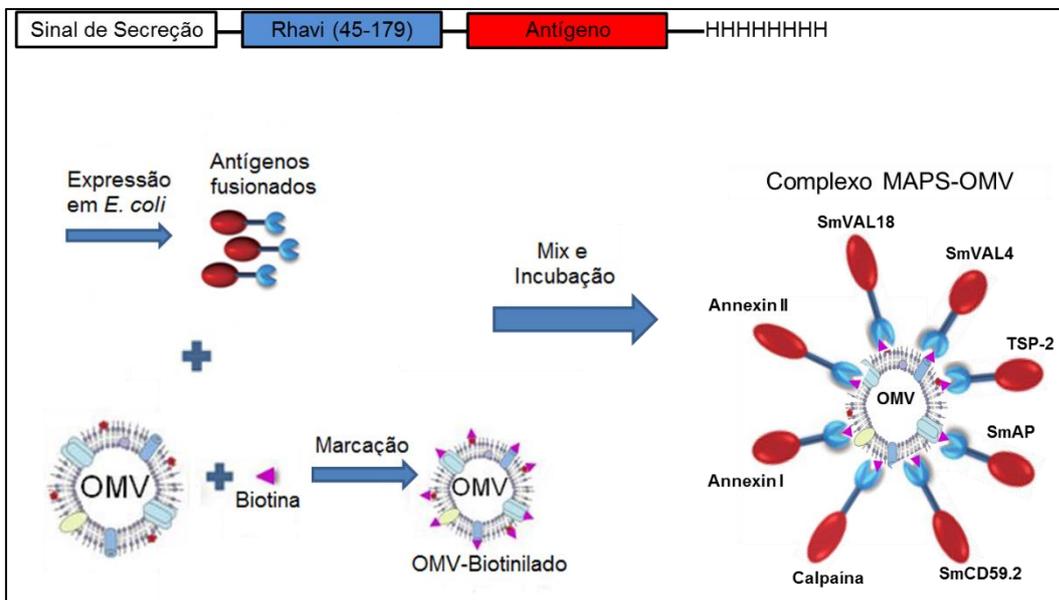


Figura 2. Esquema representativo da montagem do complexo OMV. A Representação do cassete de expressão encontra-se no topo da figura, ao lado esquerdo, contendo os antígenos fusionados a proteína rhavi. Uma sequência sinal de secreção (5-ATGAAAAAGATTTGGCTGGC GCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCGGCGCAGGATCCG-3) está presente na região N terminal de rhavi. Um espaçador flexível (5-GGAGGCGGAGGTTTCGAGCTCC-3) será utilizado entre o motivo rhavi e o antígeno alvo. A representação esquemática da produção dos complexos multimoleculares MAPS-OMV ocupa o restante da figura, itens da figura fora de escala (extraído e modificado de (Zhang, Lu et al. 2013)).

No estudo realizado por Zhang, Lu et al. 2013, a matriz utilizada foi um polissacarídeo de *S. pneumoniae*, já que o objetivo deles era a produção de uma vacina para pneumonia. Para adequar o uso desta plataforma à uma vacina contra esquistossomose, uma revisão na literatura foi feita, de modo a definir uma matriz capaz de suportar as proteínas do *Schistosoma mansoni* ancoradas.

Através desta revisão, foi possível observar que as vacinas em desenvolvimento procuram conjugar polissacarídeos, partículas semelhantes a

virus (Virus like particle - VLP) ou vesículas de membrana externa (Outer membrane vesicles – OMV), às proteínas recombinantes, buscando obter uma resposta imunológica mais robusta (Roldao, Mellado et al. 2010, Zhang, Lu et al. 2013, Tani, Stella et al. 2014). Levando em consideração o tamanho da partícula, suas propriedades e vantagens, foi feita a escolha pelas OMVs.

1.4 Vesículas de membrana externa (OMVs)

As vesículas de membrana externa, também conhecidas como OMVs (Outer membrane vesicles), são estruturas produzidas por bactérias Gram-negativas. Essas estruturas esféricas são formadas a partir da própria membrana externa das bactérias Gram-negativas e seu periplasma, associam-se a proteínas solúveis e insolúveis, e desempenham, diversas funções biológicas (Kulp and Kuehn 2010).

As OMVs participam da patogênese dessas bactérias e vias de sinalização, essas vesículas podem funcionar como potente adjuvantes em vacinas, dada a presença de lipopolissacarídeos (LPS), proteínas e DNA bacterianos na sua superfície, e também como um importante carreador. As vesículas advindas da bactéria *Neisseria meningitidis* serogroup B é um exemplo disso, estudos recentes mostram a propensão em ativar células dendríticas e macrófagos. A presença do LPS juntamente com as proteínas de membrana externa como PorA, induzem a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 ou CD40, as quais são essenciais para a produção de anticorpos, também induzem o aumento da secreção de quimiocinas, ativam neutrófilo, células T e células dendríticas imaturas (Kulp and Kuehn 2010, Moshiri, Dashtbani-Roozbehani et al. 2012). Já a proteína PorB, por sua vez, liga-se a TLR-1 e TLR-2, induzindo uma cascata de sinalização que promove a maturação de células dendríticas e o aprimoramento na apresentação dos antígenos (Sanders and Feavers 2011).

Para viabilizar o uso dessas estruturas em vacinas humanas é necessário um tratamento capaz de eliminar parte do LPS presente na superfície, uma vez que este componente é tóxico. Estudos recentes apontam o uso da extração a base de detergentes como deoxicolato de sódio (DOC),

que elimina uma boa porcentagem do LPS presente na molécula. A vacina Bexsero®, recém desenvolvida pela Novartis, é um dos exemplos do uso desta abordagem. Já aprovada pelo FDA (Foods and Drugs Administration), essa vacina utiliza uma combinação de quatro proteínas recombinantes, OMVs e hidróxido de alumínio como adjuvante, o que resultou em uma estrutura estável e viável, aparentemente o hidróxido de alumínio diminui a atividade pirogênica (Holst, Martin et al. 2009, Acevedo, Fernandez et al. 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Dada à amplitude da doença, bem como a sua interação com outras doenças de grande abrangência (HIV, Malária e Tuberculose) e a limitação já observada do tratamento quimioterápico, torna desejável a busca por uma vacina para esquistossomose. Seguindo neste contexto, vimos que, muitos candidatos vacinais já foram testados e caracterizados isoladamente, porém sempre resultando em baixos níveis de proteção.

Sendo assim, acreditamos que o desenvolvimento de um sistema de apresentação de múltiplos antígenos para *Schistosoma mansoni*, montado em uma estrutura bem definida, possa ser a solução para a formulação de uma vacina eficaz e com altos índices protetores, mimetizando talvez, desta forma, o padrão de imunogenicidade da vacina de cercaria irradiada.

3. OBJETIVOS

Munidos do conhecimento sobre o trabalho do Sistema de apresentação de múltiplos antígenos (MAPS) originalmente desenvolvido pelo grupo do Dr. Richard Malley (Boston Children's Hospital, Boston, USA) (Zhang, Lu et al. 2013), nosso objetivo é conjugar antígenos recombinantes de *Schistosoma mansoni* em um esqueleto de OMV derivado de *N. meningitidis* serogroup B e avaliar o tipo de resposta imune induzida.

3.1 Objetivos Específicos

Neste primeiro momento, nosso objetivo é realizar as construções gênicas que permitirão a produção dos antígenos proteicos em fusão com a Rizavidina, expressar e purificar as respectivas proteínas recombinantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Identificação e análise das sequências para construção dos plasmídeos

As sequências gênicas foram retiradas do banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org/>) ou do GenBank no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as informações obtidas encontram-se resumidamente apresentadas na tabela 1. As sequências das proteínas foram avaliadas pelos programas ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), Web Cutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) e SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para identificação da região de fase aberta de leitura, identificação dos sítios de restrição ideais para as enzimas de clivagem e a identificação da localização ou existência de peptídeos sinais, respectivamente.

Tabela1: Características dos antígenos selecionados.

Proteínas	Estágios	Localização	Peptídeo sinal	Expressa em <i>E. coli</i>	Número de acesso
SmCD59.2	Adulto	Tegumento	Presente	Solúvel	Smp_105220
SmAP	Adulto	Tegumento	Ausente	Solúvel	HM045783.1
Anexina 2	Esquistossomulo de 7 dias	Tegumento	Ausente	Solúvel	Smp_077720
SmTSP-2	Adulto	Tegumento	Ausente	Solúvel	Af521091
SmVAL4	Germball / cercária	G. da cabeça	Presente	Solúvel	Smp_002070
SmVAL18	Germball	G. acetabulares	Presente	Solúvel	Smp_001890
Calpaína	Adulto	Tegumento	Ausente	Solúvel	M67499.1

A clonagem dos genes ou fragmentos gênicos foram realizadas no vetor pET21b, entre os sítios de restrição (*SacI/XhoI*) para gerar as proteínas de fusão com a sequência da Rizavidina (Rhavi). Assim como descrito em (Zhang, Lu et al. 2013), nesta construção de fusão dos antígenos com a rizavidina, também encontra-se uma sequência de sinal de secreção na porção 5' da Rizavidina, e uma sequência espaçadora flexível, na porção 3'. Os antígenos foram inseridos logo após a sequência espaçadora.

Concluída as construções, três clones de cada construção foram selecionados para análise da fusão via PCR, utilizando os oligonucleotídeos do promotor T7 forward e região 3' de cada gene. A confirmação de cada

sequência também foi feita via sequenciamento. Os oligonucleotídeos utilizados para as construções e também para a confirmação de cada uma delas, encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências de interesse e confirmação das construções.

Proteínas	Oligonucleotídeos
SmCD59.2	FW 5' - TACGAGCTCCTGTTATCGATGTTCCGATTGT - 3' REV 5' - TACCTCGAGATGTTTAGGTGATGCATT - 3'
SmAP	FW 5' - TACGAGCTCCAAATCGTCCTTATTGAATGTA- 3' REV 5' - TACCTCGAGTCGAGATCCATTGTTTCC - 3'
Anexina 2 (I) *	FW 5' - TACGAGCTCCATGATAAGTCATCAAAC - 3' REV 5' - TACCTCGAGTGCTTGTATAATAATGCTAC-3'
Anexina 2 (II) *	FW 5' - TACGAGCTCCGGATTAAAGAAACCAGAT- 3' REV 5' - TACCTCGAGTGCCATAATCATTGTATT -3'
SmTSP-2	FW 5' - TACGAGCTCCGAAAAGCCCAAGGTCAA - 3' REV 5' - TACCTCGAGGTGCGCTTTGCTTAGATC - 3'
SmVAL4	FW 5' - TACGAGCTCCAAGTTATCGGAAGGACAA - 3' REV 5' - TACCTCGAGTTCTGATTTATTACATTT - 3'
SmVAL18	FW 5' - TACGAGCTCCAAAAAATTAATAATTACCTAAA - 3' REV 5' - TACCTCGAGATATTCTGCATCATCAAC - 3'
Calpaína	FW 5' - TACGAGCTCCATGGGACGAATACAAATT- 3' REV 5' - TACCTCGAGGATATCGACTCGAAATCG - 3'

* Como a Anexina 2 possui quatro domínios ela foi fragmentada segundo o trabalho já descrito em (Tararam, Farias et al. 2010), sendo portanto, Anexina 2 (I) constituída pelos domínios 1 e 2, e a Anexina 2 (II) constituída pelos domínios 2 e 3.

Os sítios de restrição presente nos oligonucleotídeos tem sua sequência destacada em verde. Em vermelho, esta destacada a base inserida na sequência para o perfeito encaixe da mesma na fase aberta de leitura.

4.2 Expressão das proteínas recombinantes

As construções acima descritas foram transformadas em *E. coli* BL21 (DE3), plaqueadas em meio LB amp durante 16 h, e no dia seguinte, uma colônia de cada transformação foi utilizada para inocular 3 mL de meio LB amp. Após incubação a 37°C *overnight*, o pré-inóculo foi transferido para 300 mL de meio LB amp e o crescimento das culturas foi acompanhado até atingir D.O.₆₀₀ 0,6-0,8, quando foram induzidas com 1 mM IPTG durante 4 h a 37°C para expressão. Além desta condição, foram testadas mais dois protocolos de indução, como 16°C – 0.2 mM IPTG por 20 h e 16°C – 1 mM IPTG por 20 h. Sendo que dentre estas, a que melhor apresentou resultados foi a terceira condição descrita.

Após o cultivo, as bactérias foram centrifugadas e ressuspensas em 30 mL de tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4; 300 mM NaCl), sonicadas (40 Hz, 5 min, pulso de 1 s) e foi retirado 1 mL de cada amostra para avaliação da expressão. A alíquota foi separada em fração solúvel e corpúsculos, os quais foram solubilizados em tampão TRIS-HCl 40mM pH 7.4; SDS-2%. As proteínas foram então observadas por SDS-PAGE 12%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do vetor Rhavi-antígeno

Conforme descrito anteriormente, as construções foram realizadas no vetor pET21b, entre os sítios (*SacI/XhoI*) e foram avaliadas por PCR com os oligos do promotor T7 FW e região 3' de cada proteína.

Na Figura 3 podemos observar que seis construções, entre as oito proposta, foram bem sucedidas, de modo que, entre os três clones testados e avaliados, pelo menos dois de cada uma das construções amplificaram as sequencias alvo nos tamanhos esperados.

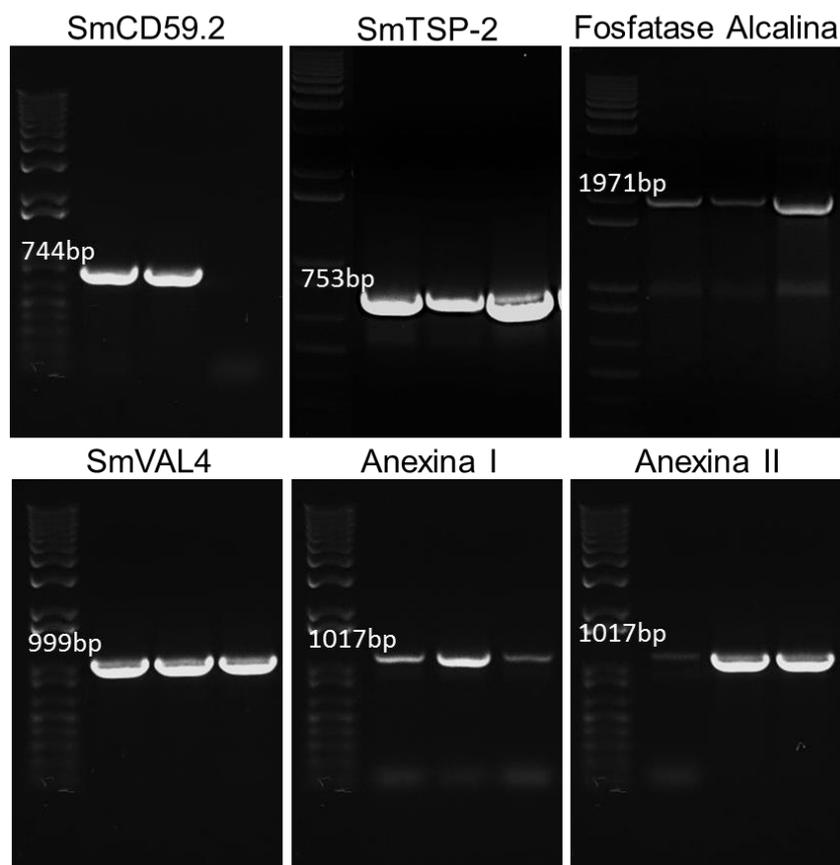


Figura 3: Análise das construções do vetor Rhavi-antígeno por eletroforese em gel agarose 1%. A esquerda de cada imagem encontra-se o tamanho esperado em pares de bases (bp) para cada construção (Marcador de peso molecular, 1kb Plus DNA Ladder – Life Technologies).

Os clones que amplificaram corretamente a sequência de interesse foram também sequenciados e os cromatogramas foram analisados cuidadosamente, confirmando desta forma a integridade das sequências nas construções.

As construções não relatadas acima, SmVAL18 e Calpaína, passaram por problemas que ainda estão sendo contornados e, portanto, os dados não serão aqui apresentados.

5.2 Expressão das proteínas

5.2.1 Confirmação da expressão por gel SDS / PAGE

O ensaio de expressão seguiu as etapas descritas nos Materiais e métodos e as culturas foram avaliadas primeiramente por gel SDS / PAGE 12%. Alíquotas de culturas não induzidas e induzidas, também separadas em fração solúvel e corpúsculos (os quais foram devidamente solubilizados em

solução TRIS-HCl 40 mM pH 7.4; SDS-2%) foram aplicadas no gel e comparadas, para cada uma das seis construções citadas acima.

Os resultados observados em alguns casos não foram muito conclusivos, a resolução do gel não permitiu a perfeita visualização da banda correspondente a proteína de interesse. Como exemplo encontra-se abaixo algumas imagens que representam os fatos observados.

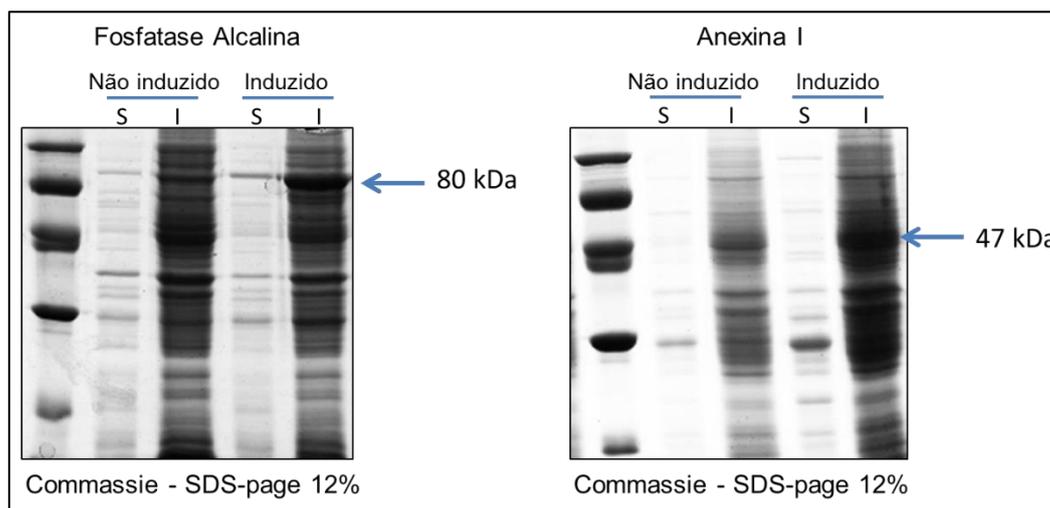


Figura 4: Avaliação da expressão das proteínas por SDS-PAGE 12%. Para a devida comparação, amostras induzidas e não induzidas foram aplicadas lado a lado no gel. S-solúvel; I-insolúvel (corpúsculos de inclusão). As setas indicam a banda correspondente as proteínas recombinante de acordo com os pesos moleculares preditos destacados ao lado da seta.

O resultado apresentado da Fosfatase Alcalina representa as amostras que foram claramente identificadas por esta metodologia, visto que, há uma banda diferencialmente expressa na altura esperada de 80kDa. Já o resultado apresentado da Anexina I, representa as amostras que não foram claramente identificadas por essa análise, visto que, na altura esperada de 47kDa não é possível ver uma banda diferenciada.

Dados os resultados encontrados, foi necessário fazer Western Blot para certificarmos que de fato eram as proteínas de interesse que estavam sendo expressas.

5.2.2 Confirmação por Western-Blot

O Western-Blot foi realizado com as frações solúveis e insolúveis de cada proteína expressa. A identificação de cada uma delas foi feita através do anticorpo Anti-HIS, o qual se liga a calda de histidina presente na porção C-terminal de cada sequência proteica, assim nos permitindo constatar a

integridade da sequência e a produção da proteína de fusão. Em alguns cultivos foi possível verificar que a expressão ocorre antes da indução (dado não mostrado). Esse primeiro perfil avaliado segue da primeira condição de indução testada, ou seja, foram 4 h de indução com 1 mM de IPTG a 37°C.

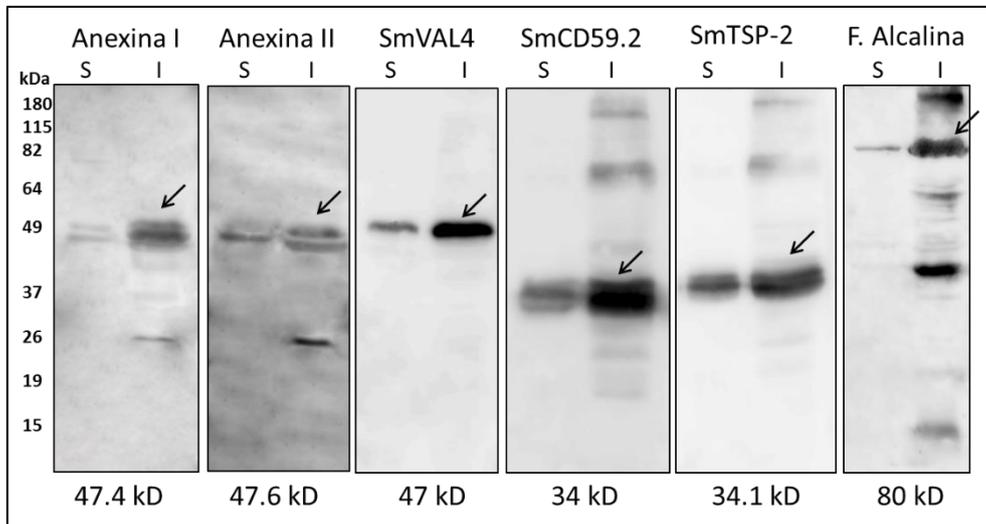


Figura 5: Identificação das proteínas recombinantes expressas por Western-Blot utilizando anticorpo Anti-his. As setas indicam as bandas correspondentes as proteínas expressas e identificadas. Pode-se observar que a maior parte das proteínas encontram-se na forma de corpúsculo. O peso molecular predito para cada proteína encontra-se na parte inferior da figura. A esquerda encontra-se representado o padrão de peso molecular utilizado (BenchMark Pre-stained Protein Standard). S-solúvel; I- Insolúvel (corpúsculo de inclusão).

A mesma membrana, foi utilizada para detecção das proteínas com anticorpos específicos contra cada uma delas. Neste caso, foi possível observar que algumas proteínas aparentemente estavam degradando, fato observado na Figura 6, para as proteínas Anexina II e SmVAL4.

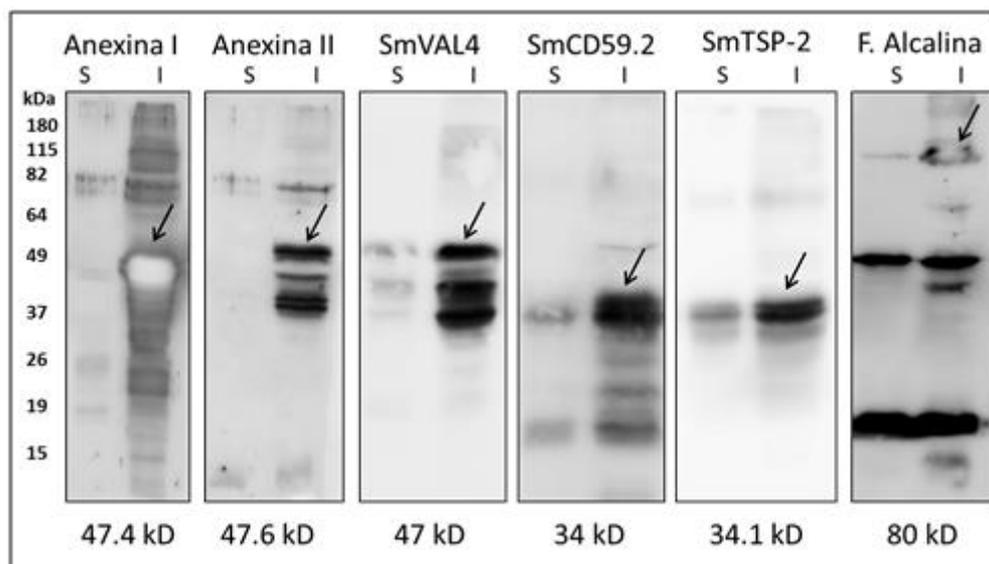


Figura 6: Confirmação da produção das proteínas de interesse por Western-Blot utilizando os anticorpos específicos contra cada uma delas. As setas indicam as bandas correspondentes as proteínas expressas e identificadas. Pode-se observar que a maior parte das proteínas encontram-se na forma de corpúsculo. O peso molecular predito para cada proteína encontra-se na parte inferior da figura. A esquerda encontra-se representado o padrão de peso molecular utilizado (BenchMark Pre-stained Protein Standard). S-solúvel; I- Insolúvel (corpúsculo de inclusão).

Tendo em vista os resultados acima apresentados, foi que partimos para o teste de novas condições de produção dessas proteínas, esperando eliminar o problema de degradação e buscando melhores rendimentos.

Após vários testes, chegamos a condição ideal de indução para maioria das proteínas, indução overnight a 16°C com 1mM de IPTG. Essa condição foi analisada por Western Blot realizado apenas com anticorpos específicos contra cada uma das proteínas. Esse resultado é observado na figura 7, onde podemos perceber que a maioria das bandas inespecíficas sumiram, com exceção da Anexina II.

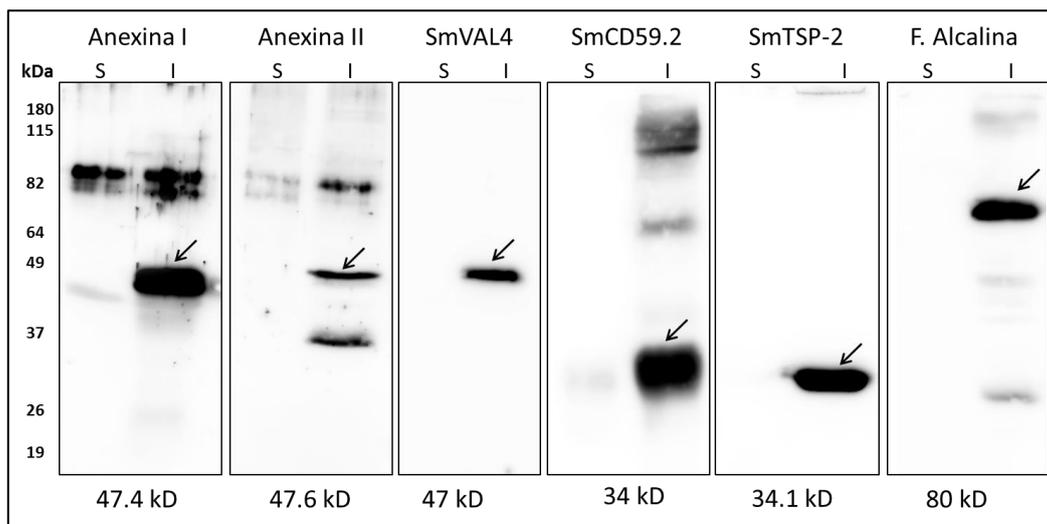


Figura 7: Confirmação da produção das proteínas de interesse por Western-Blot utilizando os anticorpos específicos contra cada uma delas. As setas indicam as bandas correspondentes as proteínas expressas e identificadas. Pode-se observar que a maior parte das proteínas encontram-se na forma de corpúsculo. O peso molecular predito para cada proteína encontra-se na parte inferior da figura. A esquerda encontra-se representado o padrão de peso molecular utilizado (BenchMark Pre-stained Protein Standard). S-solúvel; I- Insolúvel (corpúsculo de inclusão).

6. CONCLUSÃO

Com a utilização dos MAPS-OMV, podemos fazer formulações que contenham um grande número de antígenos, visto que, na construção desenvolvida pelo grupo do Dr. Richard Malley, cinco proteínas recombinantes

de pneumococos foram ancoradas com sucesso na matriz de polissacarídeo. Essa proposta de utilizar diversos antígenos recombinantes buscando interferir com os processos de migração das cercarias e esquistossômulos, além de atingir proteínas de superfície, é promissora.

Os resultados obtidos até o momento permitem dizer que as construções dos antígenos conjugados à Rizavidina são possíveis, porém, o rendimento dessas proteínas caíram bastante em comparação aos dados já publicados de algumas delas. Uma forma de transpor esse problema seria apostar no uso de outras cepas bacterianas ou de um outro vetor, isso seria necessário porque o baixo rendimento pode ser um fator limitante para as etapas seguintes do processo.

Outra barreira a ser transposta é o fato da fusão com a Rizavidina tornar essas proteínas insolúveis, o que talvez possa ser revertido por processos denaturantes, seguidos pelo re-enovelamento. Uma outra alternativa seria a utilização da técnica de re-enovelamento sob pressão hidrostática, a qual tem sido eficiente para solubilização de algumas proteínas, como a Sm29 (Chura-Chambi, Nakajima et al. 2013). Desta forma acreditamos que com obtenção das proteínas solúveis, a conjugação delas ao esqueleto biotinilado será viável.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, R., S. Fernandez, C. Zayas, A. Acosta, M. E. Sarmiento, V. A. Ferro, E. Rosenqvist, C. Campa, D. Cardoso, L. Garcia and J. L. Perez (2014). "Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications." Front Immunol **5**: 121.
- Allen, J. E. and R. M. Maizels "Diversity and dialogue in immunity to helminths." Nat Rev Immunol **11**(6): 375-388.
- Allen, J. E. and R. M. Maizels (2011). "Diversity and dialogue in immunity to helminths." Nat Rev Immunol **11**(6): 375-388.
- Araujo-Montoya, B. O., H. K. Rofatto, C. A. Tararam, L. P. Farias, K. C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, R. A. Wilson and L. C. Leite (2011). "Schistosoma mansoni: molecular characterization of Alkaline Phosphatase and expression patterns across life cycle stages." Exp Parasitol **129**(3): 284-291.
- Bergquist, N. R. (2002). "Schistosomiasis: from risk assessment to control." Trends Parasitol **18**(7): 309-314.
- Bergquist, N. R. and D. G. Colley (1998). "Schistosomiasis vaccine: research to development." Parasitol Today **14**(3): 99-104.
- Berriman, M., B. J. Haas, P. T. LoVerde, R. A. Wilson, G. P. Dillon, G. C. Cerqueira, S. T. Mashiyama, B. Al-Lazikani, L. F. Andrade, P. D. Ashton, M. A. Aslett, D. C. Bartholomeu, G. Blandin, C. R. Caffrey, A. Coghlan, R. Coulson, T. A. Day, A. Delcher, R. DeMarco, A. Djikeng, T. Eyre, J. A. Gamble, E. Ghedin, Y. Gu, C. Hertz-Fowler, H. Hirai, Y. Hirai, R. Houston, A. Ivens, D. A. Johnston, D. Lacerda, C. D. Macedo, P. McVeigh, Z. Ning, G. Oliveira, J. P. Overington, J. Parkhill, M. Perteira, R. J. Pierce, A. V. Protasio, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, M. Sajid, S. L. Salzberg, M. Stanke, A. R. Tivey, O. White, D. L. Williams, J. Wortman, W. Wu, M. Zamanian, A. Zerlotini, C. M. Fraser-Liggett, B. G. Barrell and N. M. El-Sayed (2009). "The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni." Nature **460**(7253): 352-358.
- Boros, D. L. (1989). "Immunopathology of Schistosoma mansoni infection." Clin Microbiol Rev **2**(3): 250-269.
- Braschi, S., W. C. Borges and R. A. Wilson (2006). "Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes." Mem Inst Oswaldo Cruz **101** Suppl 1: 205-212.
- Castro-Borges, W., D. M. Simpson, A. Dowle, R. S. Curwen, J. Thomas-Oates, R. J. Beynon and R. A. Wilson (2011). "Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke Schistosoma mansoni determined by QconCAT proteomics." J Proteomics **74**(9): 1519-1533.
- Chura-Chambi, R. M., E. Nakajima, R. R. de Carvalho, P. A. Miyasato, S. C. Oliveira, L. Morganti and E. A. Martins (2013). "Refolding of the recombinant protein Sm29, a step toward the production of the vaccine candidate against schistosomiasis." J Biotechnol **168**(4): 511-519.
- Coulson, P. S. (1997). "The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine?" Adv Parasitol **39**: 271-336.
- Curwen, R. S., P. D. Ashton, D. A. Johnston and R. A. Wilson (2004). "The Schistosoma mansoni soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages." Mol Biochem Parasitol **138**(1): 57-66.
- El Ridi, R., H. Tallima, S. Selim, S. Donnelly, S. Cotton, B. Gonzales Santana and J. P. Dalton (2014). "Cysteine peptidases as schistosomiasis vaccines with inbuilt adjuvanticity." PLoS One **9**(1): e85401.
- Farias, L. P., G. Krautz-Peterson, C. A. Tararam, B. O. Araujo-Montoya, T. R. Fraga, H. K. Rofatto, F. P. Silva-Jr, L. Isaac, A. A. Da'dara, R. A. Wilson, C. B. Shoemaker and L. C. Leite (2013). "On the three-finger protein domain fold and CD59-like proteins in Schistosoma mansoni." PLoS Negl Trop Dis **7**(10): e2482.
- Farias, L. P., D. Rodrigues, V. Cunha, H. K. Rofatto, E. L. Faquim-Mauro and L. C. Leite (2012). "Schistosoma mansoni venom allergen like proteins present differential allergic responses in a murine model of airway inflammation." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1510.

Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx and L. Kestens (2006). "Human schistosomiasis." Lancet **368**(9541): 1106-1118.

Hewitson, J. P., P. A. Hamblin and A. P. Mountford (2005). "Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine." Parasite Immunol **27**(7-8): 271-280.

Holst, J., D. Martin, R. Arnold, C. C. Huergo, P. Oster, J. O'Hallahan and E. Rosenqvist (2009). "Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*." Vaccine **27** Suppl 2: B3-12.

Hotez, P. J., D. H. Molyneux, A. Fenwick, E. Ottesen, S. Ehrlich Sachs and J. D. Sachs (2006). "Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria." PLoS Med **3**(5): e102.

Hu, W., Q. Yan, D. K. Shen, F. Liu, Z. D. Zhu, H. D. Song, X. R. Xu, Z. J. Wang, Y. P. Rong, L. C. Zeng, J. Wu, X. Zhang, J. J. Wang, X. N. Xu, S. Y. Wang, G. Fu, X. L. Zhang, Z. Q. Wang, P. J. Brindley, D. P. McManus, C. L. Xue, Z. Feng, Z. Chen and Z. G. Han (2003). "Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource." Nat Genet **35**(2): 139-147.

Jia, X., L. Schulte, A. Loukas, D. Pickering, M. Pearson, M. Mobli, A. Jones, K. J. Rosengren, N. L. Daly, G. N. Gobert, M. K. Jones, D. J. Craik and J. Mulvenna (2014). "Solution structure, membrane interactions, and protein binding partners of the tetraspanin Sm-TSP-2, a vaccine antigen from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*." J Biol Chem **289**(10): 7151-7163.

Karmakar, S., W. Zhang, G. Ahmad, W. Torben, M. U. Alam, L. Le, R. T. Damian, R. F. Wolf, G. L. White, D. W. Carey, D. Carter, S. G. Reed and A. A. Siddiqui (2014). "Use of an Sm-p80-based therapeutic vaccine to kill established adult schistosome parasites in chronically infected baboons." J Infect Dis **209**(12): 1929-1940.

Kulp, A. and M. J. Kuehn (2010). "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles." Annu Rev Microbiol **64**: 163-184.

Maizels, R. M., J. P. Hewitson and K. A. Smith (2012). "Susceptibility and immunity to helminth parasites." Curr Opin Immunol **24**(4): 459-466.

McManus, D. P. and A. Loukas (2008). "Current status of vaccines for schistosomiasis." Clin Microbiol Rev **21**(1): 225-242.

Moshiri, A., A. Dashtbani-Roozbehani, S. Najar Peerayeh and S. D. Siadat (2012). "Outer membrane vesicle: a macromolecule with multifunctional activity." Hum Vaccin Immunother **8**(7): 953-955.

Pinheiro, C. S., A. P. Ribeiro, F. C. Cardoso, V. P. Martins, B. C. Figueiredo, N. R. Assis, S. B. Morais, M. V. Caliari, A. Loukas and S. C. Oliveira (2014). "A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice." Parasite Immunol **36**(7): 303-312.

Plotkin, S. A. and S. L. Plotkin (2011). "The development of vaccines: how the past led to the future." Nat Rev Microbiol **9**(12): 889-893.

Rappuoli, R., F. Bagnoli, R. Arnon and D. R. Bundle (2011). "Vaccine Design. Innovative Approaches and Novel Strategies." Caister Academic Press.

Ricciardi, A., J. P. Dalton and M. Ndao (2015). "Evaluation of the immune response and protective efficacy of *Schistosoma mansoni* Cathepsin B in mice using CpG dinucleotides as adjuvant." Vaccine **33**(2): 346-353.

Rofatto, H. K., B. O. Araujo-Montoya, P. A. Miyasato, J. Levano-Garcia, D. Rodriguez, E. Nakano, S. Verjovski-Almeida, L. P. Farias and L. C. Leite (2013). "Immunization with tegument nucleotidases associated with a subcurative praziquantel treatment reduces worm burden following *Schistosoma mansoni* challenge." PeerJ **1**: e58.

Rofatto, H. K., L. C. C. Leite, C. A. Tararam, A. I. Kanno, B. O. Araujo-Montoya and L. P. Farias (2011). "Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente." Revista da Biologia **6b**: 54-59.

Roldao, A., M. C. Mellado, L. R. Castilho, M. J. Carrondo and P. M. Alves (2010). "Virus-like particles in vaccine development." Expert Rev Vaccines **9**(10): 1149-1176.

Sanders, H. and I. M. Feavers (2011). "Adjuvant properties of meningococcal outer membrane vesicles and the use of adjuvants in *Neisseria meningitidis* protein vaccines." Expert Rev Vaccines **10**(3): 323-334.

SCHATZMAYR, H. G. (2003). "Novas perspectivas em vacinas virais. História, Ciências, Saúde." Manguinhos **10**: 655-669.

Silva, L. L., M. Marcet-Houben, L. A. Nahum, A. Zerlotini, T. Gabaldon and G. Oliveira (2012). "The *Schistosoma mansoni* phylome: using evolutionary genomics to gain insight into a parasite's biology." BMC Genomics **13**: 617.

Tani, C., M. Stella, D. Donnarumma, M. Biagini, P. Parente, A. Vadi, C. Magagnoli, P. Costantino, F. Rigat and N. Norais (2014). "Quantification by LC-MS(E) of outer membrane vesicle proteins of the Bexsero(R) vaccine." Vaccine **32**(11): 1273-1279.

Tararam, C. A., L. P. Farias, R. A. Wilson and L. C. Leite (2010). "*Schistosoma mansoni* Annexin 2: molecular characterization and immunolocalization." Exp Parasitol **126**(2): 146-155.

Tran, M. H., M. S. Pearson, J. M. Bethony, D. J. Smyth, M. K. Jones, M. Duke, T. A. Don, D. P. McManus, R. Correa-Oliveira and A. Loukas (2006). "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis." Nat Med **12**(7): 835-840.

Verjovski-Almeida, S., R. DeMarco, E. A. Martins, P. E. Guimaraes, E. P. Ojopi, A. C. Paquola, J. P. Piazza, M. Y. Nishiyama, Jr., J. P. Kitajima, R. E. Adamson, P. D. Ashton, M. F. Bonaldo, P. S. Coulson, G. P. Dillon, L. P. Farias, S. P. Gregorio, P. L. Ho, R. A. Leite, L. C. Malaquias, R. C. Marques, P. A. Miyasato, A. L. Nascimento, F. P. Ohlweiler, E. M. Reis, M. A. Ribeiro, R. G. Sa, G. C. Stukart, M. B. Soares, C. Gargioni, T. Kawano, V. Rodrigues, A. M. Madeira, R. A. Wilson, C. F. Menck, J. C. Setubal, L. C. Leite and E. Dias-Neto (2003). "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*." Nat Genet **35**(2): 148-157.

WHO (2014). Schistosomiasis.

Wilson, R. A. and P. S. Coulson (2009). "Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour." Trends Parasitol **25**(9): 423-431.

Wilson, R. A., J. A. Langermans, G. J. van Dam, R. A. Vervenne, S. L. Hall, W. C. Borges, G. P. Dillon, A. W. Thomas and P. S. Coulson (2008). "Elimination of *Schistosoma mansoni* Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for a Therapeutic Vaccine?" PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e290.

Zhang, F., Y. J. Lu and R. Malley (2013). "Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(33): 13564-13569.