

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



Dissertação

**Construção e avaliação da rLTB/Sm14:  
uma quimera recombinante candidata a uma vacina contra  
esquistossomose e fasciolose**

**Vanusa Pousada da Hora**

Pelotas, 2006

**VANUSA POUSADA DA HORA**

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DA rLTB/SM14: UMA QUIMERA RECOMBINANTE  
CANDIDATA A UMA VACINA CONTRA ESQUISTOSSOMOSE E FASCIIOLOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biologia Molecular).

Orientador: Dr. Odir Antônio Dellagostin

Co-orientador: Dr. Fabrício Rochedo Conceição

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/1032  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

H811c Hora, Vanusa Pousada  
Construção e avaliação da rLTB/SM14 : uma quimera recombinante candidata a uma vacina contra esquistossomose e fasciolose / Vanusa Pousada da Hora ; orientador Odir Antônio Dellagostin ; co-orientador Fabrício Rochedo Conceição. – Pelotas, 2006. – 80f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2006.

1.Biotecnologia. 2.Esquistossomose. 3.*Schistosoma mansoni*.  
4.Vacina. 5.Anticorpos monoclonais. I.Dellagostin, Odir Antônio.  
II.Conceição, Fabrício Rochedo. III.Titulo.

CDD: 616.963

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. José Antônio Guimarães Aleixo, Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne, Universidade Federal de Pelotas

## **Dedicatória**

*Aos meus pais Donato e Maria Aparecida  
e ao meu irmão Charles,  
por serem essenciais na minha trajetória.*

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola desta universidade, pela oportunidade de aprendizado proporcionada.

Ao meu orientador Odir Dellagostin e ao meu co-orientador Fabrício Conceição, por terem sido de suma importância no desenvolvimento desta dissertação através de orientação, incentivo, paciência, amizade e ensinamentos de Biologia Molecular compartilhados.

Às pesquisadoras Miriam Tandler e Mônica Vilar e aos funcionários do Laboratório de Esquistossomose Experimental da FIOCRUZ-RJ, por terem colaborado na execução do deste trabalho.

Ao professor José Guimarães Aleixo, a Ângela Moreira e aos demais membros do Laboratório de Imunologia Aplicada, pela contribuição na produção dos anticorpos monoclonais e pela amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pela convivência harmoniosa, pelas experiências compartilhadas e pelo apoio e carinho constantes durante todo o mestrado.

Aos demais amigos e colegas do Centro de Biotecnologia, pelo incentivo e bom convívio.

A todos meus amigos externos ao mundo da “Biotecnologia”, por estarem sempre presentes na minha vida de alguma forma.

Principalmente a Deus, por cada momento vivenciado.... e que por sua sabedoria insondável e misteriosa permitiu que eu tenha nascido aos cuidados de uma família tão especial ... uma família literalmente “da Hora”!

**Muito Obrigada!!!**

## Resumo

DA HORA, Vanusa Pousada. **Construção e avaliação da rLTB/Sm14: uma quimera recombinante candidata a uma vacina contra esquistossomose e fasciolose.** 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A esquistossomose, causada por *Schistosoma mansoni*, é a segunda doença parasitária mais prevalente no mundo causando doença crônica em milhões de pessoas em países em desenvolvimento. Semelhantemente, a fasciolose, causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, representa um reconhecido problema agrícola responsável por perdas econômicas assim como causa um significativo número de infecções em humanos por todo mundo. Embora a quimioterapia para ambos os parasitas esteja disponível, ela tem apresentado limitações, incluindo altas taxas de reinfecção em áreas endêmicas. Vacinas representam a alternativa mais atraente para inverter este cenário. Assim, a Organização Mundial da Saúde selecionou a proteína ligadora de ácidos graxos 14kDa de *S. mansoni* (Sm14) como uma de duas candidatas à vacina anti-esquistossomose prioritárias para triagem clínica em humanos. Além disso, a Sm14 é a única proteína candidata a vacina que induz imunidade protetora significativa contra ambos os helmintos acima mencionados. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar em camundongos uma vacina de subunidade contendo a Sm14 fusionada com a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), a qual é um potente imunoadjuvante; além disso, foi descrever a produção e caracterização de anticorpos monoclonais (MAbs) contra a Sm14 para usa-los como uma ferramenta para detectar e caracterizar a Sm14 e para o desenvolvimento de futuro teste diagnóstico. Os genes *ltb* e *sm14* foram amplificados por PCR a partir do DNA de *E. coli* e do plasmídeo pAESm14, respectivamente, e fusionados por PCR. A quimera recombinante foi expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade em coluna com níquel. Grupos de camundongos suíços não singênicos foram imunizados por via subcutânea com três doses de rLTB/Sm14, rLTB/Sm14 mais hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>), rSm14 plus Al(OH)<sub>3</sub>, rLTB ou Al(OH)<sub>3</sub>. Os níveis de proteção foram determinados através do número de parasitas recuperados após desafio com cercárias de *S. mansoni*. O pool de soros dos camundongos imunizados foi avaliado por ELISA e Western blot. Os resultados mostraram que a proteína quimera foi capaz de estimular a produção de anticorpos específicos para Sm14 e LTB, contudo o uso de LTB como adjuvante para imunização de rSm14 falhou em aumentar a proteção contra o desafio. Além disso, sete MAbs foram obtidos após imunização de um camundongo BALB/c com rLTB/Sm14. A isotipagem dos MAbs revelou que cinco foram do isotipo IgG1, um pertencente ao isotipo IgG2b e outro ao isotipo IgM. Estes MAbs serão úteis para monitorar a expressão da proteína em sistemas recombinantes, a estabilidade protéica e pode ter potencial para desenvolver teste diagnóstico.

Palavras-chave: Esquistossomose. *Schistosoma mansoni*. Vacina. Anticorpos monoclonais.

## Abstract

DA HORA, Vanusa Pousada. **Construction and evaluation of rLTB/Sm14: a recombinant chimera candidate vaccine against schistosomiasis and fascioliasis.** 2006. 80 f. Dissertation (Master Degree) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Schistosomiasis, caused by *Schistosoma mansoni*, is the second most prevalent parasitic disease worldwide causing chronic disease in millions of people in developing countries. Similarly, fascioliasis, caused by the trematode *Fasciola hepatica*, represents a recognized unsolved agricultural problem responsible for economic losses as well as causing a significant number of human infections worldwide. Although chemotherapy for both parasites has been available, this approach has limitations, including high reinfection rates in endemic areas. Vaccines represent the most attractive long-term alternative to invert this scenario. Accordingly, the World Health Organization selected *S. mansoni* fatty acid-binding protein 14kDa (Sm14) as one out of two anti-schistosome vaccine priority candidates for human clinical trials. Furthermore, Sm14 is the only vaccine candidate to have been shown to afford significant immune protection against both of the above-mentioned helminthes. The objective of this study was to develop and evaluate in mice a recombinant subunit vaccine containing the Sm14 fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LTB), which is a potent immunoadjuvant; furthermore, was describe the production and characterization of monoclonal antibodies (MAbs) against the Sm14 for use as a tool to detect and characterize Sm14 and for development of future diagnostic test. The *ltb* and *sm14* gene were obtained by PCR amplification from *E. coli* DNA and plasmid pAESm14, respectively, and fused by PCR. The recombinant chimera was expressed in *E. coli* and purified by nickel affinity chromatography. Groups of outbreed Swiss mice were immunized with three footpad doses of either rLTB/Sm14, rLTB/Sm14 plus aluminum hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>), rSm14 plus Al(OH)<sub>3</sub>, rLTB or Al(OH)<sub>3</sub>. Levels of protection were determined by number of worms recovered after *S. mansoni* cercarial challenge. The pooled sera of immunized mice were evaluated by ELISA and Western blot. The results showed that the chimera protein was able to elicit specific antibody production to rSm14 and rLTB, however the use of LTB as adjuvant to rSm14 immunization failed to enhance protection against challenge. Furthermore, seven MAbs were obtained after immunization of BALB/c mice with rLTB/Sm14. MAbs isotyping revealed that five were of the isotype IgG1, one belonged to the IgG2b isotype and another to the IgM isotype. These MAbs will be usefull for monitoring protein expression in recombinant systems, protein stability and may have potential for developing diagnostic test.

Keywords: Schistossomiasis. *Schistosoma mansoni*. Vaccine. Monoclonal antibodies.

## Lista de Figuras

Figura 1	Purificação com GFX dos genes <i>sm14</i> e <i>ltb</i> amplificados por PCR.....	40
Figura 2	Gel-purificação com GFX dos genes quiméricos amplificados por PCR.....	41
Figura 3	Mapa dos vetores pQE30 e pAE.....	43
Figura 4	Análise em gel de agarose 1% da extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	43
Figura 5	Análise em SDS-PAGE 15% da expressão da proteína rLTB/Sm14 clonada em pQE.....	44
Figura 6	Análise em SDS-PAGE 15% da expressão da proteína rLTB/Sm14 clonada em pQE e pAE.....	44
Figura 7	Análise em SDS-PAGE 15% da indução da proteína rLTB clonada em pAE e expressa por <i>E. coli</i> BL21 Star.....	45
Figura 8	Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da proteína rLTB clonada em pAE e expressa em <i>E. coli</i> BL21 Star.....	45
Figura 9	Quantificação da proteína rLTB/Sm14 através da análise em SDS-PAGE 15%.....	46
Figura 10	Quantificação da proteína rLTB/Sm14 através da análise em SDS-PAGE 15%.....	47
Figura 11	Quantificação da proteína rLTB através da análise em SDS-PAGE 15%.....	47
Figura 12	Antigenicidade da proteína rLTB/Sm14 através de Western blot.....	48
Figura 13	Western blotting com anti-CT para proteína rLTB.....	48
Figura 14	Avaliação da afinidade de ligação da proteína rLTBSm14 ao gangliosídeo GM1, através de ELISA indireto.....	49

Figura 15	Avaliação da resposta imune humoral anti-Sm14 através de ELISA indireto.....	51
Figura 16	Avaliação da resposta imune humoral anti-LTB através de ELISA indireto.....	51
Figura 17	Western blot da avaliação da resposta imune humoral do <i>pool</i> dos soros.....	52
Figura 18	Distribuição da frequência (%) da carga parasitária recuperada por perfusão.....	54
Figura 19	ELISA indireto da avaliação da resposta imune humoral anti-Sm14 e anti-LTB dos soros dos camundongos BALB/c imunizados com rLTB/Sm14, rLTB/Sm14+Adjuvante de Freund e rSm14+Adjuvante de Freund.....	55
Figura 20	Curva de titulação dos MAbs purificados.....	58
Figura 21	Western blot da reatividade dos MAbs purificados.....	59

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nas ampliações por PCR e enzimas de restrição utilizadas na clonagem.....	27
Tabela 2	Proteção de camundongos suíços <i>outbred</i> contra infecção experimental por cercárias de <i>S.mansoni</i> .....	53
Tabela 3	Isotipagem do anticorpos monoclonais anti-rSm14.....	56
Tabela 4	Determinação do índice de aditividade dos MAbs (%)......	60

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Esquistossomose e Fasciolose.....	15
1.2 Resposta Imune.....	17
1.3 Desenvolvimento de Vacina.....	20
1.4 Subunidade B da Enterotoxina Termolábel de <i>Escherichia coli</i> como Adjuvante.....	22
1.5 Anticorpos Monoclonais (MAbs).....	24
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Construção dos Oligonucleotídeos.....	27
3.2 Obtenção dos Genes e Construção das Quimeras.....	28
3.2.1 Amplificação dos Genes <i>sm14</i> e <i>ltb</i> .....	28
3.2.2 Construção das Quimeras <i>ltb/sm14</i> .....	28
3.3 Clonagem das Quimeras no vetor TOPO TA e Seqüenciamento dos Clones Recombinantes.....	29
3.4 Proteínas Recombinantes.....	30
3.4.1 Clonagem e Expressão.....	30
3.4.2 Purificação.....	31
3.4.3 Diálise Lenta.....	32
3.4.4 Quantificação.....	33
3.4.5 Antigenicidade.....	33
3.4.6 Avaliação da Ligação ao Gangliosídeo GM1.....	33
3.5 Protocolo de Imunização e Ensaio de Proteção Animal.....	34
3.6 Avaliação da Resposta Imune.....	35
3.7 Produção de Anticorpos Monoclonais (MAbs).....	36
3.7.1 Imunização dos Camundongos.....	36

3.7.2	Produção de Hibridomas e MAbs.....	37
3.7.3	Produção de Ascite em Camundongos BALB/c.....	37
3.7.4	Purificação dos MAbs.....	38
3.7.5	Índice de Aditividade (IA).....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1	Obtenção dos Genes e Construção de Quimeras .....	40
4.2.1	Amplificação dos Genes <i>sm14</i> e <i>ltb</i> .....	40
4.2.2	Construção das Quimeras <i>ltb/sm14</i> .....	40
4.2	Clonagem das Quimeras no vetor TOPO TA e Seqüenciamento dos Clones Recombinantes.....	41
4.3	Proteínas Recombinantes.....	42
4.3.1	Clonagem e Expressão.....	42
4.3.2	Purificação.....	45
4.3.3	Diálise Lenta.....	46
4.3.4	Quantificação.....	46
4.3.5	Caracterização.....	48
4.3.6	Avaliação da Ligação ao Gangliosídeo GM1.....	49
4.4	Imunização e Ensaio de Proteção Animal.....	49
4.4.1	Avaliação da Resposta Imune Humoral.....	49
4.4.2	Avaliação da Proteção.....	52
4.5	Produção de Anticorpos Monoclonais (MAbs).....	54
4.5.1	Imunização dos Camundongos.....	54
4.5.2	Produção e purificação de MAbs.....	55
4.5.3	Caracterização do MAbs.....	56
4.5.3.1	Isotipagem.....	56
4.5.3.2	Reatividade dos MAbs Purificados Contra rSm14.....	56
4.5.3.3	Índice de Aditividade.....	59

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose e a fasciolose são doenças parasitárias que continuam sendo um obstáculo ao desenvolvimento social e econômico de muitos países, principalmente aqueles subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. São atribuídas a elas perdas severas, por causarem grande número de mortes e morbidade em seres humanos ou em animais. Embora o caminho mais adequado, quando se fala em doença parasitária, seja o saneamento básico associado ao tratamento específico da enfermidade, as dificuldades políticas e econômicas enfrentadas pelos países mais pobres no momento da aplicação destas medidas têm de ser seriamente levadas em consideração (SPITHILL; DALTON, 1998; BERGQUIST, 2002). Além disso, as alternativas quimioterápicas para o tratamento de ambas são extremamente limitadas. Nesse contexto, vacinas seriam uma alternativa como instrumento complementar de controle dessas doenças parasitárias (MEEUSEN; MADDOX, 1999; BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL, 2005). Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina contra essas doenças parasitárias representa um grande desafio, uma vez que a esquistossomose e a fasciolose são causadas por parasitas multicelulares, que possuem diferentes estágios durante seus ciclos de vida (SPITHILL; DALTON, 1998; PEARCE; MCDONALD, 2002).

Nos últimos anos, grandes esforços vêm sendo realizados por organismos internacionais e institutos de pesquisa visando produzir vacinas que poderiam reduzir a morbidade, a transmissão e os índices de reinfecção de tais enfermidades. Algumas pesquisas têm revelado que existem moléculas candidatas à vacina que conferem proteção cruzada contra fasciolose (HILLYER et al., 1988) e esquistossomose (TENDLER et al., 1996). Nesse sentido, o desenvolvimento de uma única vacina capaz de combater ambas parasitoses surge como uma proposta muito atrativa (HILLYER, 1995; TENDLER et al., 1996; ALMEIDA et al., 2003; VILAR et al., 2003).

### 1.1 Esquistossomose e Fasciolose

A esquistossomose e a fasciolose são causadas por helmintos pertencentes ao filo Platyhelminthe, a classe Trematoda e a ordem Diginea. No entanto, a primeira doença é causada por digíneos pertencentes à família Schistosomatidae e ao gênero *Schistosoma*, sendo os humanos parasitados principalmente por três espécies: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Já a segunda doença, tem por agente etiológico o digíneo *Fasciola hepatica*, o qual pertence à família Fasciolidae e ao gênero *Fasciola* (REY, 1992).

A esquistossomose, nome coletivo dado à síndrome clínica resultante da infecção por uma das três espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, é depois da malária, a doença parasitária mais prevalente em humanos, afetando mais de 200 milhões de adultos e crianças em todo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Estudos revelaram que mais de 600 milhões de pessoas vivem em áreas de risco em 74 países de regiões tropicais na África, nas Américas Central e do Sul e no sudeste da Ásia (WHO, 2002a; CHITSULO; LOVERDE; ENGLÉS, 2004). Doenças humanas são freqüentemente classificadas em importância através de um cálculo chamado DALY (*Disability-Adjusted Life Years*), um indicador quantitativo do impacto das doenças na perda de anos de vida saudável, que combina mortalidade e morbidade em um único index (PRUS, 2002). Dados do DALY indicam que o impacto da esquistossomose vem sendo subestimado, especialmente quanto as suas seqüelas, tais como anemia, retardo do crescimento e dificuldade no aprendizado em crianças de idade escolar. Dessa forma, acredita-se que o impacto real da esquistossomose esteja perto daqueles causados pela malária e tuberculose (CHITSULO et al., 2000; VAN DER WERF et al., 2003).

Dentre as três espécies causadoras da esquistossomose, *S. mansoni* é o principal agente etiológico desta doença, sendo por isso o mais estudado e caracterizado (KING et al., 2003; CHITSULO; LOVERDE; ENGLÉS, 2004). Este helminto possui um ciclo de vida complexo, tendo como hospedeiro intermediário um caramujo de água doce do gênero *Biomphalaria* e como definitivo, o homem. É através das fezes do homem infectado que saem os ovos do *S. mansoni*, os quais em contato

com a água eclodem liberando o miracídio, embrião que nada velozmente em busca do caramujo. Após o miracídio penetrar no hospedeiro intermediário, transforma-se em esporocisto primário e, depois, secundário; trinta dias após a infecção do molusco, larvas bifurcadas livre nadantes, chamadas de cercárias, são liberadas na água. Ao encontrar o homem, as cercárias penetram ativamente através da pele e mucosa, perdem a cauda e se diferenciam em esquistossômulos. Estes migram pelo tecido subcutâneo e caem na corrente sanguínea e/ou linfática sendo conduzidos passivamente ao coração e pulmões. Posteriormente, os esquistossômulos migram para o sistema porta hepático, onde se alimentam e se desenvolvem, transformando-se em machos e fêmeas (forma madura) cerca de trinta dias após a infecção. Ao atingir a fase madura de seu ciclo biológico, os helmintos migram para as veias mesentéricas inferiores, onde as fêmeas fazem a postura dos ovos na submucosa intestinal. Cada fêmea põem aproximadamente 400 ovos por dia, esse número varia com a idade do parasita. Os ovos (com o miracídio formado) atravessam a submucosa caindo na luz intestinal, onde são misturados às fezes e liberados para o ambiente. Esses ovos, em contato com a água, eclodem liberando o miracídio, reiniciando assim o ciclo do parasita. Os ovos são os elementos fundamentais da patogenia da esquistossomose, uma vez que provocam uma reação inflamatória granulomatosa. As lesões granulomatosas podem apresentar-se em pontos isolados ou difusos no intestino e fígado. As variações clínicas são predominantemente intestinais, hepatointestinais e hepatoesplênicas (REY, 1992; CINERMAN; CINERMAN, 2002).

A fasciolose, causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica*, é uma infecção parasitária amplamente dispersa em regiões de clima temperado, acometendo principalmente ovinos e bovinos, além de caprinos, suínos e o próprio homem. Esta doença representa um grande problema para pecuária, sendo responsável por grandes perdas econômicas, estimadas em cerca de três bilhões de dólares perdidos anualmente em todo mundo (SPITHILL; SMOOKER; COPERMAN, 1999). Além disso, tem sido apontada como uma importante helmintose emergente em humanos, tendo particular relevância em zonas endêmicas da América Latina (RAYMUNDO et al., 2004) e em algumas regiões da Europa (COSME et al., 2001). As perdas econômicas são em função da mortalidade dos animais (ovinos principalmente), condenação de fígados,

redução da produção de leite, carne e lã, e da fertilidade, além dos altos gastos com tratamento anti-helmíntico. No homem, as conseqüências da infecção são mais brandas (REY, 1992; SPITHILL; SMOOKER; COPERMAN, 1999).

A *F. hepatica* também possui um ciclo de vida complexo, tendo como hospedeiro intermediário um caramujo de água doce do gênero *Lymnaea* e como definitivo, ovinos, bovinos, caprinos, suínos e o homem. Os hospedeiros definitivos eliminam junto com as fezes ovos da *F. hepatica*, os quais em contato com a água eclodem liberando o miracídio, o qual nada até encontrar o hospedeiro intermediário. Penetrando no molusco, cada miracídio forma um esporocisto, que dá origem a várias rédias, que por sua vez originam inúmeras cercárias, as quais são liberadas para o ambiente. Logo que sai do caramujo, as cercárias nadam alguns minutos e depois perdem a cauda; com a secreção de glândulas cistogênicas, encistam-se aderindo na vegetação aquática ou na superfície da água (por tensão superficial da película aquática). O hospedeiro definitivo infecta-se ao ingerir água e/ou vegetação contaminada com metacercárias. Estas desencistam-se no intestino delgado, perfuram a parede do mesmo, caem na cavidade peritoneal, perfuram a cápsula hepática e começam a migrar pelo parênquima hepático até os ductos biliares onde atingem o estágio adulto. Durante a migração pelo fígado, o parasito provoca uma extensiva reação inflamatória ao seu redor, causada principalmente por eosinófilos (TLIBA et al., 2000). A fasciolose caracteriza-se por ser um processo inflamatório do fígado e ductos biliares provocado pelas formas imaturas e adultas, respectivamente. À medida que as formas jovens e maduras migram pelo parênquima hepático e ductos, vão deixando atrás de si um tecido destruído (pela ação de proteinases e/ou pela espoliação), que é substituído por tecido conjuntivo fibroso. Essa alteração pode levar à insuficiência hepática, diminuição do fluxo biliar e cirrose (REY, 1992; SPITHILL; SMOOKER; COPERMAN, 1999).

## **1.2 Resposta Imune**

Uma das características mais notáveis da esquistossomose e da fasciolose é que os parasitos escapam do sistema imune do hospedeiro por modulação ou evasão, assim eles mantêm sua sobrevivência, migrando e se desenvolvendo no hospedeiro. Durante a infecção, o sistema imune é continuamente desafiado com o arranjo de

moléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) associadas com o metabolismo e a reprodução do parasito, entretanto, pouco se sabe sobre este mecanismo molecular (MEEUSEN; MADDOX, 1999; AL-SHERBINY et al, 2003).

Uma propriedade do *Schistosoma* é sua capacidade de sobreviver intravascularmente por muitos anos mesmo sob a contínua resposta imune anti-parasitária efetuada pelo hospedeiro. Esta habilidade para evadir ao sistema imune parece ser devido as diversas adaptações do parasita logo após a infecção ser iniciada. Entre estas adaptações estão processos que resultam na redução da antigenicidade da superfície parasitária e no desenvolvimento de um tegumento (superfície externa composta por uma única estrutura de dupla membrana) intrinsecamente resistente ao dano da resposta imune (PEARCE; Sher, 1987). O tegumento tem uma importância crucial para modulação da resposta imune do hospedeiro e para sobrevivência do parasita (VAN HELLEMOND et al., 2006). Apesar do mecanismo pelo qual o *S. mansoni* escapa da resposta imune não estar bem elucidado, parece que este parasita adota pelo menos três estratégias evasivas: 1) resistir aos mecanismos efetores; 2) evitar o reconhecimento do antígeno; e 3) desviar a resposta imunológica. Na primeira estratégia, as cercárias do parasito ativam diretamente o complemento, mas ejetam o C3 ligado ao desprender seu glicocálice. Na segunda, o esquistossômulo reveste sua superfície com proteínas do hospedeiro, assim conseguem sobreviver nos vasos mesentéricos, apesar do sangue que o banha conter anticorpos que podem evitar a reinfeção (EL-ANSARY, 2003). Na última estratégia, para desviar a resposta imune do hospedeiro, o *S. mansoni* possui um gene que codifica uma proteína homóloga à pró-opiomelanocortina, que no ser humano, é um pró-hormônio clivado para produzir o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o hormônio estimulador do melanócito (MSH) e o opióide  $\beta$ -endorfina. Todos possuem propriedades imunomoduladoras e tanto o ACTH quanto a  $\beta$ -endorfina foram demonstrados em cultura, quando os parasitas adultos foram incubados a 37°C em meio essencial mínimo (ROITT; DELVES, 2004).

Esforços têm sido realizados a fim de caracterizar a resposta imune do hospedeiro durante a esquistossomose e a fasciolose. Na infecção por *S. mansoni*, a produção e regulação de citocinas relacionadas com a resposta imune mediada por linfócitos TCD4<sup>+</sup> tipo 1 (Th1) e linfócitos TCD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th2) parece ser diferente,

dependendo do estágio de esquistossomose humana. Durante a infecção aguda, a resposta parece estar associada significativamente a produção de IFN- $\gamma$  (resposta Th1), enquanto que na crônica, a IL-10 (resposta Th2) parece exercer uma importante função (MONTENEGRO et al., 1999). Na infecção por *F. hepatica*, é observada eosinofilia massiva e presença de IgG1 durante a fase crônica da doença (TLIBA et al., 2000).

A imunoproteção frente à infecção por *S. mansoni* e por *F. hepatica* ainda não está bem elucidada. Estudos imunológicos realizados sobre habitantes de áreas endêmicas para esquistossomose têm demonstrado que uma resistência natural para reinfeção ocorre (BRITO et al., 2000), sendo associados a essa resistência altos níveis de imunoglobulinas específicas (IgE, IgG4 e IgG2) e IFN- $\gamma$  (DEMEURE, 1993; BRITO et al., 2000). Estes dados sugerem a participação dos mecanismos imunológicos na resistência humana à infecção por *S. mansoni*, com uma participação da resposta humoral e celular (JESUS et al., 2000). Enquanto que para *F. hepatica*, a proteção (em modelo murino) parece estar envolvida com a resposta mediada por células Th1 (O'NEILL et al., 2000).

Células dendríticas são especializadas na aquisição e apresentação de antígenos, ligando a imunidade inata e adaptativa. Seu papel central na ativação de linfócitos T lhe dá uma posição estratégica no controle da resposta imune adaptativa (MOSER; MURPHY, 2000). Enquanto o mecanismo pelo qual patógenos virais, bacterianos e protozoários interagem e ativam células dendríticas é bem compreendido, pouco se sabe sobre como estas células reagem frente a organismos mais complexos, tais como *S. mansoni*. Estudos recentes têm examinado o impacto que causam nas células dendríticas os antígenos de diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* e têm revelado que o fenótipo dessas células é bastante distinto daquele da ativação convencional. Uma vez que células dendríticas possam atuar como apresentadoras de antígenos, elas são capazes de gerar uma eficiente resposta imune Th2 contra *S. mansoni*. Assim, o conhecimento da interação entre este trematódeo e aquelas células pode abrir o caminho para a manipulação terapêutica do sistema imune (PERONA-WRIGHT; JENKINS; MACDONALD, 2006).

### 1.3 Desenvolvimento de Vacina

Embora a quimioterapia para esquistossomose e fasciolose ter sido desenvolvida há mais de duas décadas, influenciando na redução dos índices de morbidade, ela representa apenas uma medida paliativa, uma vez que não é eficaz em controlar os altos índices de transmissão e re-infecção em áreas endêmicas (BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL, 2005). Além disso, tem sido relatada resistência aos quimioterápicos para ambos parasitos (LIANG, 2003; MCCONVILLE et al., 2006), o que dificulta o tratamento, ainda mais considerando a pequena gama de anti-helmínticos disponíveis no mercado. Assim, o desenvolvimento de uma vacina eficiente e comercialmente viável surgiria como uma alternativa ao controle dessas parasitoses (MEEUSEN; MADDOX, 1999; BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL 2005). Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina contra *S. mansoni* e *F. hepatica* ainda representa um grande desafio, dada à complexidade destes organismos multicelulares, ao fato deles possuírem diferentes estágios durante seus ciclos de vida e por terem um articulado sistema de escape ao reconhecimento pelo sistema imune (PEARCE; SHER, 1987; SPITHILL; DALTON, 1998; PEARCE; MCDONALD, 2002).

Neste contexto, moléculas candidatas a compor uma vacina vêm sendo avaliadas independentemente para cada parasitose (PIAZENZA et al., 1999; EL RIDI et al., 2001) ou então para proteção cruzada entre elas (HILLYER et al., 1988; TENDLER et al., 1996; VILAR et al., 2003; ALMEIDA et al., 2003). Uma das moléculas que oferece imunoproteção cruzada entre *S. mansoni* e *F. hepatica* é uma proteína de 14 kDa de *S. mansoni*, denominada Sm14 (MOSER et al., 1991). A imunização com a proteína recombinante Sm14 (rSm14) induziu bons níveis de proteção contra a infecção por *S. mansoni* em dois modelos animais *outbred* (camundongos suíços - 50-65% e coelhos da nova zelândia - 90%). Além disso, induziu também proteção contra infecção por *F. hepatica* em camundongos suíços (100%). Estes resultados sugerem que a proteína Sm14 pode compor uma vacina de subunidade contra ambos parasitos (TENDLER et al., 1995, 1996). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), quando se trata de uma vacina para esquistossomose, a redução da morbidade é tão desejada quanto à proteção imune total, por isso uma vacina com proteção parcial, de no mínimo 40%, pode ser aceita como válida (WHO, 2000). É importante ressaltar que a Sm14 é uma

das seis moléculas selecionadas pela OMS com potencial para compor uma vacina contra esquistossomose e está entre as duas candidatas prioritárias para triagem clínica em humanos (WHO, 2000).

A Sm14 pertence à família das proteínas ligadoras de ácidos graxos (FABPs- *fatty acid binding proteins*) (MOSER et al., 1991), as quais estão envolvidas diretamente na captura, transporte e compartimentalização de ácidos graxos derivados do hospedeiro, principalmente ácido palmítico e linoléico (BROUWERS et al., 1997). Os trematódeos *S. mansoni* e *F. hepatica* carecem de rotas metabólicas necessárias à biosíntese de ácidos graxos e seus derivados, sendo dessa forma, completamente dependentes do hospedeiro para adquirir tais substâncias (MEYER et al., 1970). Dado ao fato dessas proteínas desempenharem um papel vital na fisiologia e desenvolvimento desses parasitos, elas representam um alvo ideal para o desenvolvimento de uma vacina. Estudos a respeito da relação molecular entre Sm14 e uma FABP de *F. hepatica*, denominada Fh15 (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 1992), revelaram que estas duas proteínas apresentam homologia de 44% (região C-terminal), enquanto que seus epítomos homólogos estão ausentes nas FABPs de mamíferos (TENDLER et al., 1996). Segundo estudo realizado por Brito et al. (2002), a Sm14 está presente em todos os estágios do ciclo de vida do *S. mansoni*, estando localizada na superfície externa, isto é, próximo à interface de contato parasita-hospedeiro. Em relação a *F. hepatica*, não existem informações disponíveis a respeito da presença da Fh15 durante as diferentes formas que o parasito assume no seu ciclo vital.

A instabilidade da forma recombinante tem sido um dos principais problemas durante a produção, o transporte e a estocagem da Sm14, fatores estes que dificultariam seu uso como vacina. Entretanto, estudos para determinar a estrutura e a flexibilidade molecular estão sendo realizados para elaborar mutantes com alta estabilidade e eficiência protetora contra estas doenças parasitárias (PERTINHEZ et al., 2004). A seqüência genômica da proteína Sm14 e o seu polimorfismo têm sido bem caracterizados. A proteína apresenta um baixo polimorfismo, sendo o mais comum no aminoácido de posição 20 (Met $\leftrightarrow$ Thr). Ramos et al. (2003) avaliaram a função desses aminoácidos construindo duas isoformas, rSm14-T20 e rSm14-M20, sendo que a rSm14-M20 exibiu maior estabilidade conformacional e maior afinidade pelas cadeias

longas de ácidos graxos do que a forma mutante com treonina na posição 20. Além disso, um único resíduo de cisteína na posição 62 foi identificado como responsável pelo tempo de dimerização e agregação da Sm14. A partir dessa informação, um mutante foi construído tendo a cisteína substituída por valina, rSm14M20(C62V). Este mutante apresentou maior estabilidade estrutural do que a proteína nativa, quando analisado *in silico* (PERTINHEZ et al., 2004).

Estudos vêm sendo realizados a fim de associar proteção e resposta imune utilizando a rSm14 como antígeno vacinal. Alguns sugerem que a proteção parece estar associada com resposta imune celular, mediada por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto outros, apontam uma associação entre a resposta imune celular e humoral, esta mediada principalmente por IL-4, IgG1 e IgG3 (BRITO et al., 2000; AL-SHERBINY et al, 2003; FONSECA et al., 2004).

As vacinas de proteínas recombinantes e de DNA, apesar de serem mais seguras do que as vacinas tradicionais, são menos imunogênicas. Assim, adjuvantes são componentes essenciais para que estas vacinas sejam mais eficientes (DZIERZBICKA; KOLODZIEJCZYK, 2006). No caso da Sm14, como a proteção parece estar associada com resposta imune mediada por Th1 e Th2, o uso de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) como adjuvante não parece ser o mais indicado, uma vez que ele estimula de forma mais adequada a resposta imune mediada por Th2 (BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL, 2005). Nesse sentido, se faz necessário usar um adjuvante adequado ao tipo específico de resposta imune protetora, estimulada pelo antígeno em estudo. A rota de administração dos antígenos e dos adjuvantes têm uma forte influência na efetividade da vacina, desde que estes sejam aplicados para modular a resposta imune na direção desejada (COMOY; CAPRON; THYPHRONITIS, 1998; FINGERUT et al, 2006).

#### **1.4 Subunidade B da Enterotoxina Termolábil de *Escherichia coli* como Adjuvante**

A imunomodulação por adjuvantes pode ser necessária quando formulações de antígenos específicos são usadas para imunização. Produtos microbianos têm sido utilizados como moduladores para ativar a imunidade adaptativa. Entre eles, uma nova

classe de imunoadjuvantes vem ganhando destaque na produção de vacinas recombinantes de subunidade. Esta classe é representada pela enterotoxina termolábil de *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (CT e LT, respectivamente), as quais exibem mais de 80% de identidade (SIMMONS, et al. 2001a).

A toxina LT é composta por uma molécula da subunidade A, de 27kDa, e por cinco moléculas da subunidade B, de 11.6kDa cada, a qual forma um homopentâmero. A subunidade A possui atividade catalítica ADP-ribosiltransferase e a subunidade B-pentamérica liga-se ao receptor celular gangliosídeo  $G_{M1}$ , permitindo que a subunidade A (porção tóxica) entre na célula (SIXMA; PRONK; KALK, 1991; SPANGLER, 1992). Devido à toxicidade da subunidade A, o uso da holotoxina LT como adjuvante não é recomendado. Por outro lado, a LTB pode ser utilizada, com a vantagem de não ter o efeito tóxico da LTA (DE HAAN et al., 1998).

A função adjuvante da LTB está diretamente relacionada com a capacidade dela se ligar no gangliosídeo  $G_{M1}$ , presente na superfície de células eucarióticas (DE HAAN et al., 1998). A LTB é reconhecida por sua grande eficiência como adjuvante de mucosa, conferindo resposta imune protetora em camundongos contra herpes vírus simples ocular tipo-1 (RICHARDS et al., 2001), grupo A *Streptococcus* (DALE; CHIANG, 1995) e *Helicobacter pylori* (WELTZIN et al., 2000). Além disso, estudos têm apontado a LTB como um adjuvante completo, capaz de induzir resposta imune celular, incluindo células T citotóxicas (SIMMONS et al., 2001b), e humoral, estimulando resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (GREEN et al, 1996; VERWEIJ, et al., 1998; WELTZIN et al. 2000; FINGERUT, 2006; PITCOVSKI et al., 2006; CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006). A segurança do uso da LTB como adjuvante utilizando as vias transcutânea, nasal e oral foi assegurada após ser testada em voluntários humanos (HASHIGUCCI et al., 1996; KOTLOFF et al., 2001; HAGIWAR et al., 2001; GÜEREÑA-BURGUEÑO et al., 2002).

Em geral, o processamento de antígenos exógenos induz à apresentação dos peptídeos por MHC classe II em vez de MHC I (HARDING, 1996), enquanto que peptídeos derivados da síntese citosólica de proteínas celulares ligam-se a moléculas de MCH classe I no retículo endoplasmático e são então transportadas para a superfície da célula, onde elas podem ser reconhecidas por células T citotóxicas.

Toxóides derivados de bactérias têm sido investigados como potentes veículos para apresentação de peptídeos ou proteínas via rota MHC I e MHC II. Entre estes derivados, a LTB tem sido capaz de dirigir antígenos exógenos para a rota de antígenos endógenos, ou seja, através da via de apresentação MHC classe I (DE HAAN et al., 2002). A LTB também ativa a diferenciação seletiva de linfócitos (WILLIAMS, 2000), influencia na maturação e ativação de células dendríticas (PETROVSKA et al., 2003; PITCOVSKI et al., 2006) e aumenta a apresentação de antígenos via MHC II (NASHAR; BETTERIDGE; MITCHELL, 2001; BONE; ECKHOLDT; WILLIAMS, 2002). Acredita-se que estas sejam a base de seu efeito imunoestimulatório (FINGERUT et al., 2006).

### **1.5 Anticorpos Monoclonais (MAbs)**

Anticorpos monoclonais (MAbs) são imunoglobulinas secretadas por uma população geneticamente idêntica de células (clones) conhecidas como hibridomas e que reagem especificamente com apenas um determinante antigênico (epítopo) na molécula do antígeno (GODING, 1986). A metodologia tradicional de obtenção de MAbs foi desenvolvida por Köhler e Milstein (1975) e envolve a fusão *in vitro* de células secretoras de anticorpos (linfócitos B) com células de mieloma (células de tumor de linfócitos B). Essa fusão resulta na obtenção de células imortalizadas, denominadas hibridomas, secretoras de anticorpos específicos.

Desde que a tecnologia de produção de MAbs foi desenvolvida, eles têm sido largamente empregados em métodos de diagnóstico (BERRY, 2005), como produtos terapêuticos (CAMPBELL, 1991; BERRY, 2005) e como reagentes em pesquisa. Além disso, MAbs são muito úteis na identificação de epítomos ou proteínas para uso em vacinas recombinantes (BERRY, 2005).

Apesar de ser uma técnica ainda cara, o seu uso é justificável uma vez que os MAbs possuem algumas vantagens em relação aos anticorpos policlonais, os quais são obtidos a partir do soro de animais previamente imunizados com um antígeno. Uma das vantagens diz respeito aos hibridomas, uma vez que eles podem ser facilmente congelados, estocados e descongelados vários anos depois sem alterações das suas características; enquanto que anticorpos policlonais, são inconstantes, no sentido de que as características dos anticorpos purificados refletem o exato momento no qual o

sangue foi retirado do animal. Apesar das vantagens do uso de MAbs, a sua produção é muito trabalhosa, principalmente no que diz respeito ao estabelecimento de uma linhagem secretora de anticorpos, especialmente na fase de triagem de hibridomas produtores de anticorpos para clonagem (CAMPBELL, 1991).

O diagnóstico laboratorial para esquistossomose é realizado por exame parasitológico de fezes, freqüentemente pelo método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). Entretanto, sabe-se que este método de diagnóstico é pouco eficiente quando aplicado em indivíduos com baixa carga parasitária (ENGELS; SINZINKAYO; GRYSEEL, 1996), particularmente em estudos epidemiológicos, onde apenas uma amostra fecal é examinada por indivíduo. Nesse sentido, métodos alternativos de diagnóstico têm sido desenvolvidos, apoiados por programas de controle da esquistossomose principalmente em áreas de baixa endemia (SILVA et al., 1993; SHAKER et al., 1998; VALLI et al., 1999; VAN GOOL et al., 2002; OLIVEIRA; KANAMURA; LIMA, 2005). No entanto, nenhum deles apresenta-se ainda satisfatório. Algumas destas técnicas de diagnóstico foram elaboradas utilizando MAbs, produzidos contra antígenos de *S. mansoni* (SILVA et al., 1993; SHAKER et al., 1998), entretanto nenhuma utilizando MAbs contra rSm14.

## **2 OBJETIVOS**

Este trabalho foi desenvolvido a partir da seguinte hipótese:

A quimera recombinante composta pela fusão da LTB com o antígeno Sm14 (rLTB/Sm14) induz maior proteção contra esquistossomose e fasciolose do que a proporcionada pela vacina constituída de rSm14 e hidróxido de alumínio como adjuvante.

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial imunoprotetor da rLTB/Sm14 e produzir MAbs anti-Sm14.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Construir uma quimera recombinante composta pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) e pelo antígeno Sm14 de *S. mansoni*;
- Clonar, expressar e purificar a quimera recombinante;
- Avaliar a imunogenicidade em camundongos;
- Avaliar a eficácia da vacina rLTB/Sm14 através de teste de desafio com *S. mansoni* em camundongos;
- Produzir e caracterizar MAbs anti-Sm14.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Construção dos Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos inicializadores (*primers*) desenhados para amplificação dos genes *sm14* e *ltb*, cujos números de acesso no GenBank são AF492389 e M17873, respectivamente, foram desenhados contendo sítios para enzimas de restrição, a fim de direcionar a clonagem no vetor. A fusão genética do gene *sm14* ao gene *ltb* (quimera) foi realizada por PCR. Para isso, o *primer reverse* para amplificar o gene *ltb* foi desenhado contendo 12 nucleotídeos sobrepostos aos *primers forward* utilizados na amplificação do gene *sm14*. Na tab. 1 estão dispostos os *primers* desenhados com seus respectivos sítios para enzimas de restrição e sobreposições gênicas. Todos os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.) e sintetizados pela MWG- Biotech AG (USA).

**Tabela 1.** Seqüência dos *primers* utilizados nas amplificações por PCR e das enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

Primers	Seqüência dos primers <sup>a,b</sup>	Enzima
Sm14	F: 5' <u>GAATCTAG</u> ACCTCGAGGATATCCA	<i>XbaI</i>
	R: 5' GG <b>GTACCT</b> TTAGGATAGTCGTTT	<i>KpnI</i>
LTB	F: 5' CG <b>GGATCC</b> ATGGCTCCCCAGACTATT	<i>BamHI</i>
	R: 5' <u>AGGTCTAG</u> ATTCATACTGATTGCCG	<i>XbaI</i>

<sup>a</sup> Os sítios das enzimas de restrição estão destacados em negrito.

<sup>b</sup> Os sítios de sobreposição gênica estão sublinhados.

F/R : *primer forward* e *reverse*, respectivamente.

## 3.2 Obtenção dos Genes e Construção da Quimera

### 3.2.1 Amplificação dos Genes *sm14* e *Itb*

A PCR foi utilizada para amplificar os genes *sm14* (M20C62) (402pb) e *Itb* (308pb). O gene *sm14* foi amplificado a partir do plasmídeo pAE-*sm14*, fornecido pelo Laboratório de Esquistossomose Experimental do Departamento de Helminologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O gene *Itb* foi amplificado a partir do DNA de *Escherichia coli* enterotoxigênica, fornecido pelo laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da UFPel. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 $\mu$ L, contendo  $\cong$  20ng de DNA molde, *primers forward* e *reverse* [0,4 $\mu$ M], MgCl<sub>2</sub> [1,5mM], dNTPs [200 $\mu$ M], tampão PCR [1x] e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf (modelo Mastercycle Gradient) onde as amostras foram submetidas às seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C, 3min) seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1min), anelamento (60°C, 1min) e extensão (72°C, 1min), sendo que ao término destes 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (72°C, 7min). Após a reação, os genes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose contendo 0,5 $\mu$ g/mL de brometo de etídeo, e purificados com GFX™ PCR DNA and gel Band Purification kit (Amersham Bioscience), seguindo orientações do fabricante.

### 3.2.2 Construção da Quimera *Itb/sm14*

A construção da quimera foi realizada pela estratégia de fusão genética entre os genes *sm14* e *Itb*, através de PCR-*primer linker*, sendo que para esse fim, o *primer reverse* para amplificar o gene *Itb* foi desenhado contendo 12 nucleotídeos sobrepostos aos *primers forward* do gene *sm14*. Esse PCR é diferenciado do convencional. Nele, os produtos da amplificação de cada gene se hibridizam, através da sobreposição de 12pb, servindo de *primer* para que a enzima realize a extensão. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 $\mu$ L, contendo  $\cong$  50ng de cada DNA amplificado (*sm14* e *Itb*), MgCl<sub>2</sub> [1,5mM], dNTPs [200 $\mu$ M], tampão PCR [1x] e 1 unidade de Taq DNA polimerase. Utilizaram-se diferentes gradientes de temperatura de

anelamento, com o propósito de padronizar a reação. As amostras foram submetidas às seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C, 3min) seguida de 15 ciclos de desnaturação (95°C, 30s), anelamento (45°C ou 50°C, 30s) e extensão (72°C, 90s), sendo que ao término destes 15 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (72°C, 10min). Os genes fusionados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Posteriormente, foi realizada outra reação de PCR, a fim de amplificar a quimera, utilizando-se o *primer forward* do gene *Itb* e o *primer reverse* do gene *sm14*. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50µL, contendo  $\cong$  50ng de DNA da quimera (*Itb/sm14*), *primers forward* e *reverse* [0,4µM], MgSO<sub>4</sub> [1,5mM], dNTP [200µM], 5µL de *Enhancer Solution*, tampão PCR [1x] e 2,5 unidades da enzima Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf utilizando-se diferentes gradientes na temperatura de anelamento, a fim de padronizar a reação. As amostras foram submetidas às seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C, 3min) seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1min), anelamento (50°C, 55°C ou 60°C, 1min) e extensão (68°C, 1min), sendo que ao término destes 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (68°C, 7min). Os genes quiméricos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, extraídos deste e purificados através do kit GFX™ PCR DNA and gel Band Purification kit (Amersham Bioscience), seguindo orientações do fabricante.

### **3.3 Clonagem da Quimera no Vetor TOPO TA e Seqüenciamento dos Clones Recombinantes**

Uma alíquota dos genes amplificados e purificados foi submetida à ligação em vetor de clonagem, a fim de confirmar através de seqüenciamento, a eficácia da construção das quimeras, bem como a legitimidade das seqüências gênicas. A reação de ligação do inserto ao vetor pCR® 2.1-TOPO do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) foi realizada seguindo as especificações do fabricante. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F (Invitrogen), preparadas para eletroporação conforme descrito por Sambrook (2001). Para cada processo de transformação, utilizou-se 50µL de células competentes e 2µL do produto de ligação

(Sambrook, 2001). As colônias crescidas na placa, oriundas do processo de transformação, foram submetidas a um processo de triagem rápida pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2002). Os clones caracterizados como recombinantes foram selecionados e cultivados em 3mL de LB líquido acrescido de 100µg/mL de kanamicina, sendo incubados em agitador orbital a 200rpm *overnight* a 37°C. Deste cultivo, extraiu-se o DNA plasmidial através do GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences); posteriormente, uma alíquota desse DNA foi submetida à digestão com as respectivas enzimas de restrição, *Bam*HI e *Kpn*I, a fim de checar a presença do inserto. O produto da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os vetores construídos foram seqüenciados por eletroforese capilar utilizando di-deoxi-nucleotídeos marcados em um seqüenciador MegaBACE (Amersham Biosciences). Os dados oriundos do seqüenciamento foram compilados e analisados no programa de alinhamento de seqüências ContigExpress (Informax inc.) e Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), localizado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **3.4 Proteínas Recombinantes**

#### **3.4.1 Clonagem e Expressão**

Uma vez confirmada a legitimidade dos clones recombinantes através do seqüenciamento, um clone de TOPO-*Itb/sm14* foi digerido visando a liberação do gene *Itb/sm14*, que foi posteriormente clonado nos plasmídeos pQE (Qiagen) e pAE (Ramos et al., 2004), vetores de expressão em *E. coli*. Esses vetores têm operador *lac* e promotor do fago T5 e T7, respectivamente, que são reconhecidos pela RNA polimerase de *E. coli*. Possuem também origem de replicação em *E. coli*, sítio de múltipla clonagem e gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Além disso, permitem a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de seis resíduos de histidinas em sua porção N-terminal, fato que possibilita a posterior purificação dessas proteínas por cromatografia de afinidade. A clonagem dos genes foi realizada conforme descrito por Sambrook (2001). O produtos de PCR (amplificados e purificados) e os vetores pQE30 e pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I e purificados com

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Os vetores foram desfosforilados com a enzima fosfatase alcalina (CIP) (Boehringer Mannheim) e re-purificados com o kit GFX especificado acima. Para a reação de ligação entre inserto e os vetores foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e concentrações equimolares de inserto e vetor, sendo a reação mantida a 16°C por 2 horas. O produto da ligação entre inserto e o vetor pQE foi utilizado para transformar por eletroporação células de *E. coli* TOP10F (Invitrogen); enquanto que o produto da ligação entre inserto e pAE foi introduzido, por eletroporação, em células de *E. coli* BL21(DE3) Códon Plus.

As colônias crescidas na placa, provenientes do processo de transformação, foram submetidas a uma triagem rápida pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2002). Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem foram selecionados e cultivados em 5mL de LB líquido acrescido de 100µg/mL de ampicilina e incubados em agitador orbital a 200rpm *overnight* a 37°C. Deste cultivo, extraiu-se o DNA plasmidial de 3mL da cultura, através do GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences); o restante do cultivo foi utilizado como inóculo em 9mL de LB líquido, acrescido de 100µg/mL de ampicilina, a cultura foi incubada a 37°C até atingir a densidade ótica a 600nm (OD<sub>600</sub>) de 0,5 a 0,7. Após atingir a OD recomendada, a cultura foi fracionada em duas alíquotas de igual volume, sendo uma induzida com 1mM de isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG) e a outra não induzida, esta atuando como controle negativo; ambas foram incubadas durante 4h. Ao final da indução, coletou-se uma alíquota de 1mL de cada amostra e centrifugou-se 14.000 x g por 1min. O *pellet* formado durante a centrifugação foi utilizado para verificar a expressão em pequena escala das proteínas recombinantes, através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 15%, com extrato protéico total de cada clone, como descrito por Sambrook (2001).

### 3.4.2 Purificação

As proteínas recombinantes foram expressas em maior escala e purificadas por cromatografia de afinidade utilizando o sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (Amersham Biosciences). Para purificação das proteínas em maior escala adicionou-se 50mL de inóculo em 500mL de LB líquido acrescido de 100µg/mL

de ampicilina. A cultura foi então cultivada em agitador orbital a 200rpm a 37°C até atingir densidade ótica a 600nm ( $OD_{600}$ ) entre 0,5 – 0,7; quando então foi acrescida de 1mM de IPTG e incubada novamente sob as mesmas condições por 4h. Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 7.000 x g por 20min a 4°C. As proteínas foram testadas quanto à solubilidade, sendo que para isso parte do *pellet* foi tratado com solução tampão fosfato salino pH 7,6 (PBS) contendo 8M de uréia e outra parte penas com PBS. Como as proteínas mostraram-se insolúveis, o *pellet* foi ressuspendido em um tampão de solubilização (8M de uréia; 20mM de  $NaH_2PO_4$ ; 0,5M de NaCl; pH 7,2) e submetido a agitador orbital a 60rpm por 18h à temperatura ambiente. As células foram então lisadas por três sucessivos ciclos de sonicação (30s, 20kHz) e centrifugadas a 10.000 x g por 60min a 4°C e o sobrenadante coletado e filtrado em filtro 0,8 $\mu$ m (Millipore). O sobrenadante foi então submetido à cromatografia de afinidade no ÄKTAPrime utilizando uma coluna de  $Ni^{+2}$ -Sephareose (Amersham Bioscience). No processo de purificação as proteínas inespecíficas (proteínas de *E. coli*) foram retiradas com aproximadamente 200mL de um tampão de lavagem (8M de uréia; 200mM de  $NaH_2PO_4$ ; 0,5M de NaCl; 5mM de imidazole; pH 7,2). Após a passagem do tampão de lavagem pelo sistema, as proteínas foram eluídas em cerca de 20mL de um tampão de eluição, contendo uma concentração alta de imidazole (8M de uréia; 200mM de  $NaH_2PO_4$ ; 0,5M de NaCl; 200mM de imidazole; pH 7,2). Conforme ocorreu a entrada do tampão de eluição no sistema e a passagem deste pela coluna de purificação  $Ni^{+2}$ -Sephareose, carregada com 50mM de níquel, as proteínas foram eluídas através de um gradiente de imidazole, onde as proteínas inespecíficas que ligaram na coluna foram retiradas com concentrações menores de imidazole em relação as recombinantes. As eluições das proteínas foram coletadas em frações de 1mL e visualizadas através de SDS-PAGE 15%.

### 3.4.3 Diálise Lenta

As alíquotas de proteínas recombinantes, coletadas através do sistema de purificação ÄKTAPrime, foram dialisadas de forma lenta utilizando-se membranas de celulose com limite de exclusão de 14.000Da (Sigma). As proteínas foram acondicionadas dentro das membranas e, inicialmente, mantidas em um Kitazato de 1L

contendo 500mL do tampão de eluição (8M de uréia; 20mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5M de NaCl; 200mM de imidazole; pH 7,2). A seguir, utilizando uma bomba peristáltica, foi injetado PBS no Kitazato com velocidade de 2mL/min, a fim de que a concentração de uréia fosse reduzida à metade em aproximadamente 4h. Após, as proteínas foram dialisadas contra 10L de PBS em sistema de fluxo contínuo com velocidade de 2mL/min por 92h/4°C, deixando as proteínas em uma concentração final de aproximadamente 2mM de uréia. Ao final da diálise, as proteínas foram concentradas em aproximadamente à metade do volume inicial em 20% de polietilenoglicol (PEG- MW 1,300 to 1,600), sendo acrescido 10% de glicerol ao volume final da proteína.

#### **3.4.4 Quantificação**

Após a concentração, as proteínas foram quantificadas através de SDS-PAGE 15% como método de dosagem das proteínas. Para isso, foram aplicadas no gel quantidades distintas de BSA (0,05µg, 0,1µg, 0,2µg, 0,3µg e 0,4µg). Mediante a intensidade das bandas, estimou-se a concentração aparente das proteínas recombinantes.

#### **3.4.5 Antigenicidade**

A antigenicidade das proteínas recombinantes foi caracterizada por Western blot (SAMBROOK, 2001). Para a realização do Western blot, as proteínas rLTB/Sm14 e rLTB na concentração de 1µg/cavidade, foram submetidas a um SDS-PAGE 15% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL™ (Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBS acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado ficando incubada a 4°C *overnight* e, após este período, lavada três vezes com PBS-T. Posteriormente, a membrana contendo rLTB/Sm14 foi incubada com anticorpos policlonais de coelho anti-Sm14 (produzido no Instituto Butantan) e anti-toxina colérica (CT) (Sigma), nas concentrações de 1:1000 e 1:1500, respectivamente; e a fração da membrana com rLTB foi incubada com anti-CT (1:1500). As respectivas incubações foram realizadas à temperatura ambiente por 1h. Em seguida, as membranas foram então lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com o soro anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) na

diluição 1:1500 em PBS-T. As bandas foram reveladas com cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /4-cloro-1-naftol (Amersham Bioscience) (10mL de Tris-HCl 50mM pH 7,6; 0,1mL de cloronaftol; 10µL de peróxido de hidrogênio).

#### **3.4.6 Avaliação da Ligação ao Gangliosídeo GM1**

A ligação entre a rLTB (nas formas quimeras e isolada) e o gangliosídeo GM1 bovino (Calbiochem) foi determinada por ELISA indireto. Placas de poliestireno foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 400ng/cavidade de GM1 bovina, diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 (50µL/cavidade). Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS-T. As placas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% por 1h a 37°C e posteriormente lavadas três vezes com PBS-T. Após, colocou-se 8µg das proteínas rLTB/Sm14, rSm14 e CT diluídas em PBS-T e se incubou a 37°C por 1h. A seguir foram feitas três lavagens com PBS-T e se adicionou o soro anti-Sm14 (1:1000) e anti-CT (1:1500), seguido por uma incubação a 37°C por 1h. Lavou-se três vezes a placa com a referida solução salina e adicionou-se o conjugado anti-coelho numa diluição de 1:1000, incubado-se novamente a 37°C por 1h. As reações foram reveladas com o substrato *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio, após cinco lavagens com PBS-T. A leitura da densidade óptica foi feita a 450nm (OD<sub>450</sub>) em um espectrofotômetro de microplaca (Dynatech Labs. Inc.) 15 minutos depois de colocado o substrato. Poços sem GM1 foram utilizados como controle da ligação específica entre as proteínas e o gangliosídeo. As reações foram repetidas em triplicata.

#### **3.5 Protocolo de Imunização e Ensaio de Proteção Animal**

As etapas referentes à imunização e desafio foram realizadas no Biotério do Laboratório de Esquistossomose Experimental (IOC – FIOCRUZ).

O protocolo para imunização foi realizado conforme descrito por Tendler *et al.* (1996). Foram utilizados 40 camundongos suíços fêmeas, não singênicos (*outbreed*) de 4 a 6 semanas de idade, sendo obtidos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos no Biotério do Laboratório de Esquistossomose Experimental (IOC–FIOCRUZ). Estes animais foram separados em cinco grupos de 10 animais. Os grupos

vacinais e as doses inoculadas por camundongo foram: 1) rLTB/Sm14, 20µg; 2) rLTB/Sm14 + Al(OH)<sub>3</sub>, 20µg ; 3); rSm14 + Al(OH)<sub>3</sub>, 10µg; 4) rLTB, 10µg; e 5) Al(OH)<sub>3</sub>. O protocolo de imunização consistiu em três doses de cada antígeno, via subcutânea no coxim plantar, tendo um intervalo de 7 dias entre a primeira e a segunda dose e 21 dias entre a segunda e a terceira dose.

No 60° dia após a última imunização os camundongos foram infectados com cerca de 100 cercárias/camundongo via subcutânea no dorso do animal. A perfusão foi realizada 45 dias após a infecção, sendo os helmintos adultos de *S. mansoni* recuperados do sistema venoso hepático e mesentérico dos animais. A proteção foi calculada pela fórmula  $\{(C-V)/C\} \times 100$ , onde C corresponde o número de parasitas coletados no grupo controle e V, os coletados no grupo vacinal.

### 3.6 Avaliação da Resposta Imune

O soro dos animais imunizados foi coletado, via plexo retro-orbital, nos dias zero (pré-imune), 35 e 60 após a primeira imunização (posteriores a terceira dose). A avaliação da resposta imune foi realizada utilizando-se o *pool* dos soros, através de ELISA indireto e Western blot, nos quais utilizou-se as proteínas recombinantes rSm14 e rLTB como antígeno.

Para realização do ELISA, microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 200ng/cavidade de proteína recombinante a 4°C, *overnight*, diluídas em PBS pH 9,8. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T pH 8,0, seguindo-se a adição dos soros dos animais dos dias zero, 35 e 60 e os controles, na diluição 1:100 em PBS-T e incubação por mais 1h a 37°C. Após nova lavagem das placas foi adicionado o soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO) na diluição 1:2000 em PBS-T e incubação por mais 1h a 37°C. Após esse período foi realizada cinco lavagens com PBS-T e adicionado o substrato ELISA-OPD Peroxidase (Sigma) com incubação por 15min a temperatura ambiente em local escuro e posterior leitura da densidade óptica a 450nm em um espectrofotômetro de microplaca (Dynatech Labs. Inc.). As amostras de soro de cada *pool* foram avaliadas em triplicata no ELISA.

Para a realização do Western blot, as proteínas rSm14 e rLTB na concentração de 1µg/cavidade foram submetidas a um SDS-PAGE 15% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ECL™(Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBS-T e 5% de leite em pó desnatado, a 4°C *overnight* e, após este período, lavada três vezes com PBS-T e incubada com o *pool* dos soros dos camundongos dos dias zero e 60 na diluição de 1:50 à temperatura ambiente por 1h. A membrana foi então lavada três vezes com PBS-T e incubada com o soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO) na diluição 1:2000 em PBS-T. As bandas foram reveladas com cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/4-cloro-1-naftol (10mL de Tris-HCl 50nm pH 7,6; 0,1mL de cloronaftol; 10µL de peróxido de hidrogênio).

### **3.7 Produção de Anticorpos Monoclonais (MAbs)**

#### **3.7.1 Imunização dos Camundongos**

A imunização dos camundongos teve por objetivo a produção de MAbs, bem como fazer uma prévia comparação entre a resposta imune da rLTB/Sm14 e da rSm14. Camundongos BALB/c (com 6 a 8 semanas de idade) foram inoculados intraperitonealmente com: 1) 80µg de rLTBSm14 emulsificada com igual volume de adjuvante de Freund completo; 2) 80µg rLTBSm14; e, 3) 40µg de rSm14 emulsificada com igual volume de adjuvante de Freund completo. Foi utilizado um animal por grupo. Foram realizadas duas outras inoculações com intervalo de 14 dias entre a primeira e a segunda dose e intervalo de 7 dias entre a segunda e a terceira. Estas doses foram similares à primeira, exceto pelo fato do adjuvante de Freund ser incompleto. Uma semana após a última imunização, foi coletado sangue do plexo venoso retrocular, o soro foi separado por centrifugação e a titulação de anticorpos foi determinada por ELISA indireto utilizando as proteínas rSm14 e CT (200ng/cavidade). O animal com índice mais alto de anticorpos anti-Sm14 recebeu uma dose reforço, intraperitonealmente, uma semana após a última imunização; e, após quatro dias, foi sacrificado por deslocamento cervical, a fim de obter os esplenócitos para realizar a fusão com as células de mieloma.

### 3.7.2 Produção de Hibridomas e MAbs

A obtenção dos anticorpos monoclonais foi executada de acordo com as recomendações de Harlow e Lane (1988). Células do baço de camundongos imunizados com o antígeno rLTBSm14 e células de mieloma da linhagem Sp2/0-Ag14 foram misturadas numa proporção 1:10, a mistura foi centrifugada e as células induzidas à fusão com solução de polietilenoglicol (PEG) a 50% em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma). Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em DMEM contendo 20% de soro fetal bovino e HAT (hipoxantina,  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ; aminoptericina,  $4 \times 10^{-9} \text{M}$ ; timidina,  $1,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ) e a suspensão distribuída ( $200 \mu\text{L}/\text{cavidade}$ ) em quatro placas de cultivo de células de 96 cavidades. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em uma atmosfera contendo 7% de  $\text{CO}_2$  e, a intervalos de três dias,  $100 \mu\text{L}$  do meio foram trocados em cada cavidade. Após duas semanas em meio DMEM-HAT, a pressão da aminoptericina foi removida pela substituição de  $200 \mu\text{L}$  do sobrenadante por  $200 \mu\text{L}$  de DMEM-HT. As cavidades que tiveram um bom crescimento de células ao fim de 14 a 21 dias de cultivo foram testadas através de um ELISA indireto para verificar a produção de anticorpos. Os cultivos que apresentaram boa atividade de anticorpos foram expandidos e retestados com os antígenos rSm14 e CT. Os cultivos que reagiram especificamente com os antígenos acima foram clonados duas vezes pela técnica da diluição limitante, retestados, expandidos e congelados em nitrogênio líquido e/ou injetados em camundongos para produção de ascites. A classe e subclasse dos anticorpos monoclonais foi determinada com soros anti-classe e subclasse específicos através de ELISA, utilizando-se o sobrenadante do cultivo de hibridomas (GODING, 1986).

### 3.7.3 Produção de Ascite em Camundongos BALB/c

Para obter alta produção de anticorpos, os hibridomas foram crescidos como tumores ascíticos em camundongos BALB/c previamente tratados com pristane (2,6,10,14-tetramethyl pentadecane) (Sigma). Foram injetados intraperitonealmente  $0,5 \text{mL}$  (por camundongo) de pristane em camundongos BALB/c (entre 6 a 8 semanas de idade). Dez dias após, os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com  $0,25-1,25 \times 10^6$  células do hibridoma misturadas a  $0,5 \text{mL}$  de meio estéril DMEM.

Cerca de 10 a 12 dias após, os camundongos foram puncionados para retirada da ascite. O fluido ascítico foi centrifugado a 180g por 5min e o sobrenadante foi estocado a -18°C até o uso.

#### **3.7.4 Purificação dos MAbs**

As ascites foram descongeladas, passadas em filtro com poro de 0,8µm e purificadas em coluna de proteína A-Sepharose (Hi-Trap) conforme as instruções do fabricante (Amersham). As frações obtidas foram dialisadas contra PBS (500 vezes o volume das frações) e então concentradas em solução de polietilenoglicol (PM 20.000) a 20%. A concentração de anticorpos nas preparações concentradas foi determinada por UV a 280nm, utilizando o coeficiente de extinção da IgG (1,35) para o cálculo e por curva de BSA em SDS-PAGE. A pureza dos MAbs foi determinada por SDS-PAGE. Os anticorpos foram estocados a -18°C até o uso.

#### **3.7.5 Índice de Aditividade (IA)**

O IA foi determinado conforme a metodologia descrita por Friguet et al. (1983). Primeiramente foi realizado um ELISA indireto para determinação da curva de saturação do antígeno com cada um dos MAbs purificados. Este ELISA utilizou rSm14 numa concentração de 200ng/cavidade para sensibilizar as cavidades da placa e diluições seriadas em base dois de cada MAb purificado e ajustado para menor concentração (0,270mg/mL). Após, foi realizado um novo ELISA que utilizou a mesma concentração de antígeno com os MAbs (0,270mg/mL), adicionados individualmente ou em pares, nas suas respectivas diluições de saturação. A seguir foi adicionado a cada cavidade conjugado de peroxidase-imunoglobulinas de coelho anti-Ig de camundongo diluído 1:1000 em PBS-T. Após 15min a placa foi lavada como descrito abaixo e a solução do cromógeno ortofenilenodiamina (0,4mg.mL<sup>-1</sup>) diluído em tampão citrato-fosfato (0,2M, pH 4,0), contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio, foi adicionado às cavidades. A leitura foi realizada após 15min em comprimento de onda de 450nm. O resultado foi analisado de acordo com a fórmula  $\{[2A_{1+2}/(A_1+A_2)]-1\} \times 100$ , onde A1, A2 e A<sub>1+2</sub> são, respectivamente, os valores da absorbância do MAb 1 quando adicionado individualmente, do MAb 2 individualmente e da soma dos dois MAbs adicionados

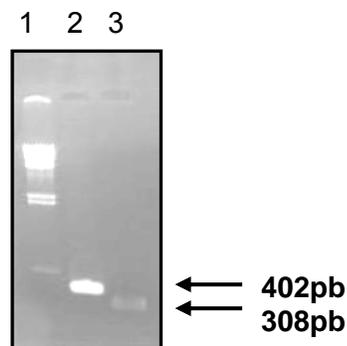
juntos. O volume dos reagentes usados neste ELISA foi 50 $\mu$ L, todas as incubações foram de 1h e todas as lavagens foram repetidas três vezes com PBS-T. A determinação dos IA foi repetida duas vezes com cada par de MAbs.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção dos Genes e Construção de Quimera

#### 4.1.1 Amplificação dos Genes *sm14* e *Itb*

Os genes *sm14*(M20C62) e *Itb* foram amplificados por PCR, e posteriormente, purificados e visualizados através de eletroforese em gel de agarose, conforme observado na Fig. 1. Os fragmentos gerados foram de 402pb e 308pb, respectivamente.

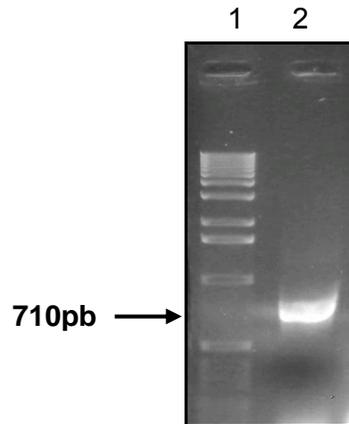


**Figura 1.** Purificação com GFX dos genes amplificados por PCR. Gel de agarose 1%. 1- marcador  $\lambda$  *HindIII* (Invitrogen); 2- *sm14* (M20C62); 3- *Itb*.

#### 4.1.2 Construção da Quimera *Itb/sm14*

A construção de quimera foi realizada pela estratégia de fusão genética entre os genes *sm14* e *Itb*, pela sobreposição de 12pb, através da PCR-*primer linker*. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se diferentes gradientes na temperatura de anelamento, após visualização em gel de agarose da eficácia da reação e da concentração das amostras, não se observou diferença na amplificação entre as temperaturas de anelamento usadas (45°C ou 50°C). Posteriormente, foi realizada outra reação de PCR, a fim de amplificar as quimeras. Após visualização da PCR em gel de agarose, constatou-se que entre as diferentes temperaturas de anelamento utilizadas (50°C, 55°C ou 60°C), 60°C foi a mais eficiente. Logo após, o gene quimérico

amplificado foi extraído do gel e purificado, sendo a eficiência da extração visualizada em gel de agarose, como é visto na Fig. 2.



**Figura 2.** Gel-purificação com GFX do gene quimérico amplificado por PCR. Gel de agarose 1%. 1- marcador 1kb; 2- *ltb/sm14*.

#### **4.2 Clonagem da Quimera no Vetor TOPO TA e Seqüenciamento dos Clones Recombinantes**

Uma alíquota dos genes amplificados e purificados foi submetida à ligação em vetor de clonagem pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO e à transformação de células de *E. coli* eletrocompetentes. Diversos clones foram caracterizados como recombinantes, sendo alguns deles selecionados e cultivados, e o seu DNA plasmidial extraído. Através de uma eletroforese em gel de agarose pode-se observar a eficiência da extração de DNA plasmidial. Uma alíquota desse DNA foi digerida com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Kpn*I, confirmando a presença e orientação do inserto, visualizada em gel de agarose 1%. A legitimidade da fusão entre os genes *ltb/sm14* foi confirmada através do seqüenciamento dos vetores construídos, sendo verificada a homologia entre as quimeras e as proteínas individuais.

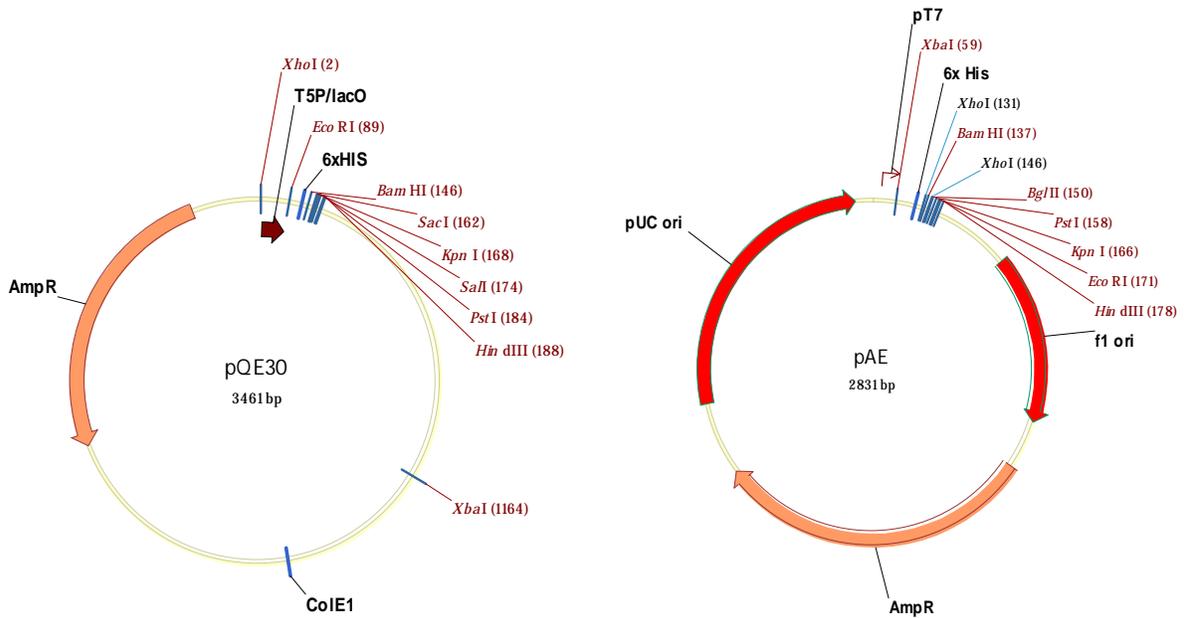
## 4.3 Proteínas Recombinantes

### 4.3.1 Clonagem e Expressão

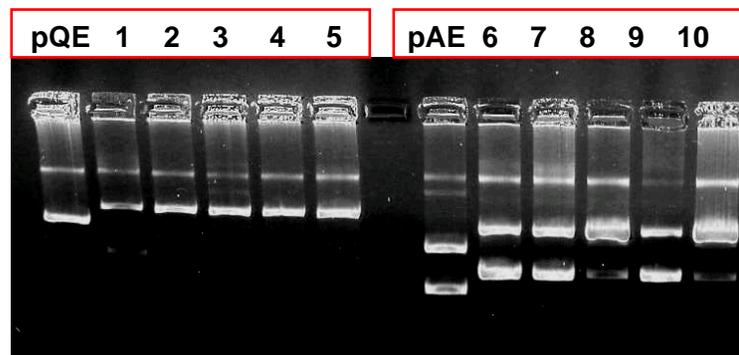
Os produtos de PCR purificados, bem como os vetores pQE30 e pAE (mapa do vetores na Fig. 3) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I e posteriormente purificados. A eficácia das digestões foi monitorada por eletroforese em gel de agarose 1%. Após os vetores serem desfosforilados e purificados, foram submetidos à reação de ligação com os insertos. O produto da ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* eletrocompetentes, sendo que para a ligação com o vetor pQE30 transformou-se TOP10F e, com o vetor pAE, transformou-se BL21. A triagem rápida revelou um número similar entre recombinantes pQE30 e pAE. Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem foram cultivados e o DNA plasmidial foi extraído. Para verificar a eficiência da extração plasmidial, submeteram-se amostras do DNA extraído a uma eletroforese em gel de agarose, conforme pode ser visualizado na Fig. 4. A presença do inserto foi confirmada através da digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I (dados não apresentados).

Os clones caracterizados como recombinantes foram selecionados para posterior cultivo e expressão em 9mL de LB líquido. Ao final da indução, coletou-se 1mL e o *pellet* formado durante a centrifugação foi utilizado para verificar a expressão das proteínas recombinantes, através de uma eletroforese em um gel SDS-PAGE 15% com extrato protéico total de cada clone. Conforme pode-se observar na Fig. 5, as células de *E. coli* Top10F transformadas com o vetor pQE-LTB/Sm14 expressaram a proteína quimera com grande eficiência no tamanho esperado de 28,8kDa, bem como as células de *E. coli* BL21 Códon Plus transformadas com o vetor pAE-LTB/Sm14. Conforme pode-se visualizar na Fig. 6, não há diferença aparente na expressão entre a proteína rSm14 e a quimera rLTB/Sm14. Visando a purificação da quimera rLTB/Sm14 em maior escala, a indução foi realizada em um volume final de 500mL de meio LB líquido; foram realizadas três induções neste volume.

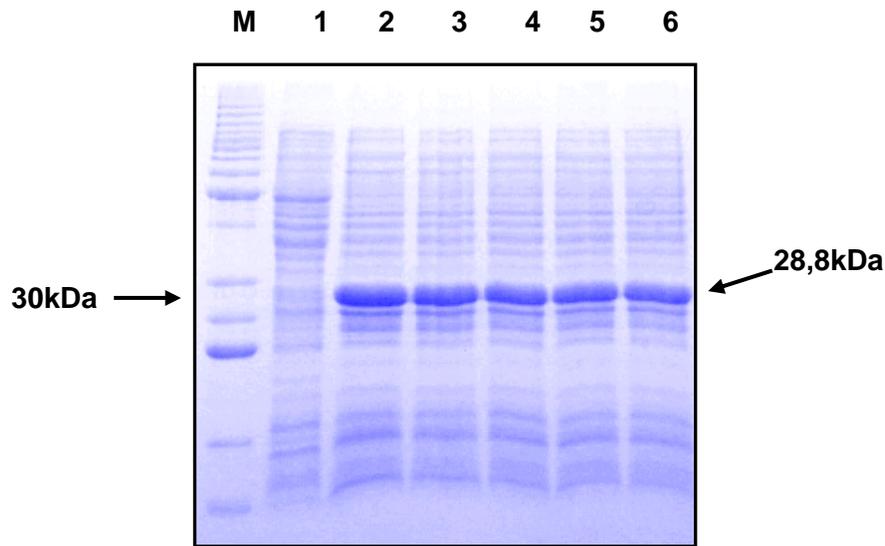
A proteína LTB foi ligada ao vetor pAE e expressa eficientemente em 9mL, no tamanho esperado da proteína, 13,7kDa (Fig. 7). Posteriormente, foi expressa em maior escala num volume de 500mL de meio.



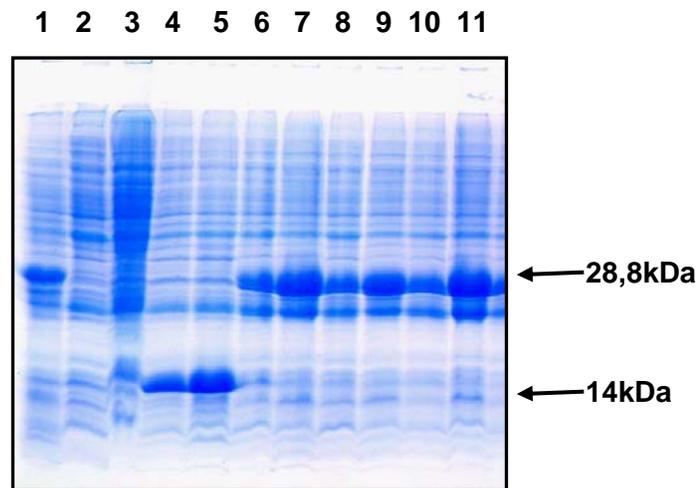
**Figura 3.** Mapa dos vetores pQE30 e pAE.



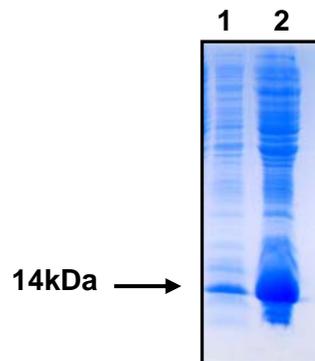
**Figura 4.** Análise em gel de agarose 1% da extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes. Coluna 1 a 5- clones recombinantes pQE-LTB/Sm14; coluna 6 a 10- clones recombinantes pAE-LTB/Sm14.



**Figura 5.** Análise em SDS-PAGE 15% da expressão da proteína rLTB/Sm14 clonada em pQE. Coluna 1- *E. coli* TOP10F não induzida; Coluna 2 a 6- clones recombinantes expressando a proteína rLTB/Sm14.



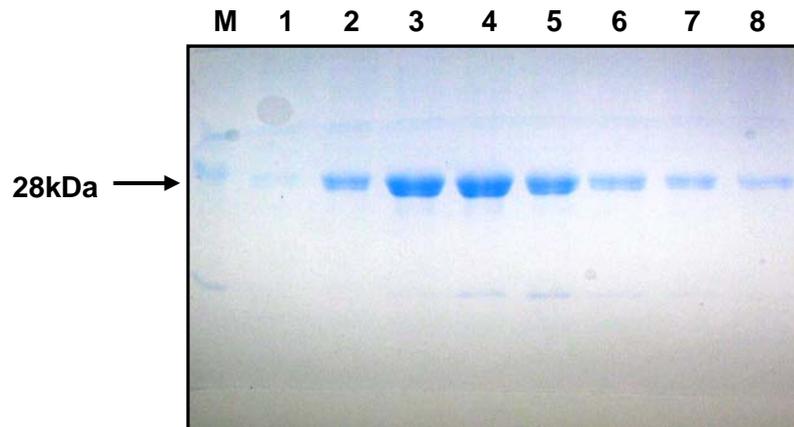
**Figura 6.** Análise em SDS-PAGE 15% da expressão da proteína rLTB/Sm14 clonada em pQE e pAE e da proteína rSm14 clonada em pAE, a fim de verificar a eficiência da expressão entre estas duas proteínas recombinantes. As culturas não induzidas não reproduziram o controle da expressão, uma vez que não houve um controle eficaz da expressão pelo vetor pAE, sendo a proteína recombinante expressa mesmo na ausência do agente indutor IPTG. Coluna 1- pQE-LTB/Sm14; coluna 2- *E. coli* Códon Plus não induzida; coluna 3- *E. coli* Códon Plus induzida; coluna 4- pAE-Sm14 não induzida; coluna 5- pAE-Sm14 induzida; colunas 6, 8 e 10- clones recombinantes pAE-LTB/Sm14 não induzidos; colunas 7, 9 e 11- clones recombinantes pAE-LTB/Sm14 induzido.



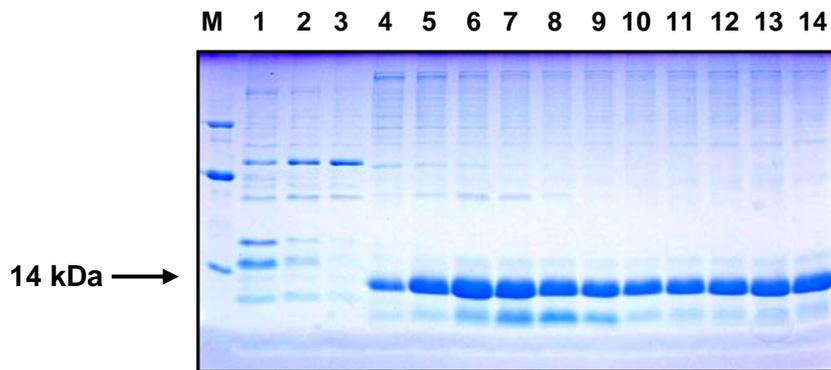
**Figura 7.** Análise em SDS-PAGE 15% da indução proteína rLTB clonada em pAE e expressa por *E. coli* BL21 Star. 1- Cultura de clone não induzida; 2- Cultura de clone induzida.

#### 4.3.2 Purificação

As proteínas recombinantes foram purificadas através de cromatografia de afinidade, as eluições das proteínas foram coletadas em frações de 1mL e uma alíquota de 16 $\mu$ L das eluições foi visualizada através de SDS-PAGE 15%. Como pode-se visualizar na Fig. 8, a rLTB/Sm14 foi purificada com grande eficiência assim como a rLTB (Fig. 9).



**Figura 8.** Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da proteína rLTB/Sm14 clonada em pQE expressa em *E. coli* TOP10F. M- marcador de proteína; colunas 1 a 8 representam as frações de proteínas coletadas através do sistema de purificação ÄKTA-prime.



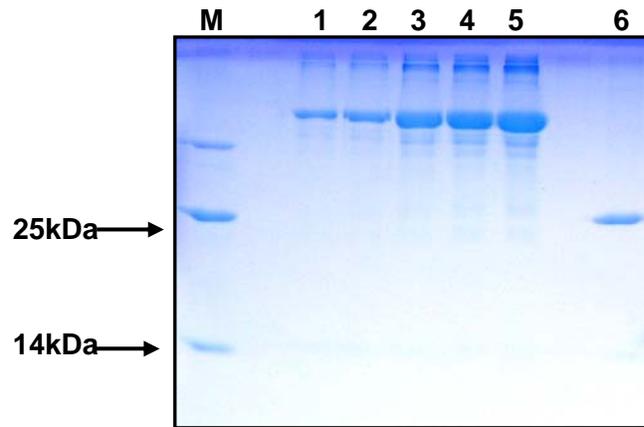
**Figura 9.** Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da proteína rLTB clonada em pAE expressa em *E. coli* BL21 Star. M- marcador de proteína; colunas 1 a 3 representam frações de proteínas inespecíficas coletadas através do sistema de purificação ÄKTA-prime; colunas 4 a 14 representam as frações de rLTB coletadas através do sistema mencionado acima.

#### 4.3.3 Diálise Lenta

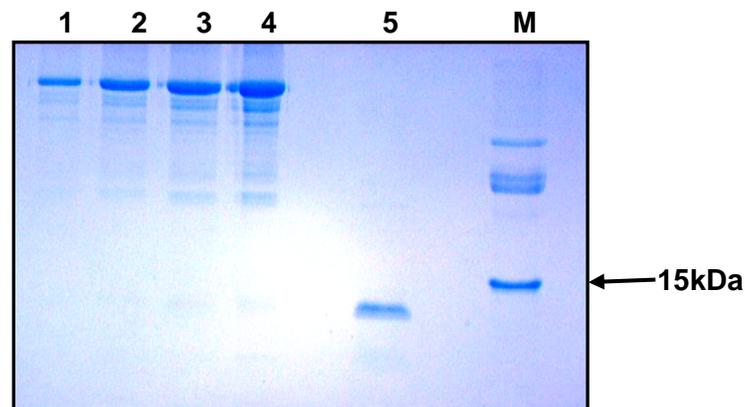
As alíquotas coletadas da proteína recombinante rLTB/Sm14 foram dialisadas de forma lenta contra PBS, a fim de retirar a uréia e assim ela poder fazer seu *refolding*. Este processo de retirada da uréia foi bastante crítico, uma vez que as proteínas precipitavam durante a metade do processo de diálise. Foram testados alguns tampões de diálise alternativos, mas constatou-se que o PBS foi o mais eficiente. A diálise foi otimizada diluindo-se a amostra cerca de três vezes, mas ainda assim, observou-se um pouco de proteína precipitada. O conteúdo da diálise foi então centrifugado, sendo o *pellet* descartado e o sobrenadante imerso em PEG 20%, a fim de concentrar a proteína. Ao fim desse processo de concentração, foi acrescido 10% de glicerol (100%) ao volume final da proteína, a fim de auxiliar na sua conservação à -20°C.

#### 4.3.4 Quantificação

Do cultivo de 1 ½ L da quimera rLTB/Sm14, obteve-se um volume final de 21mL de proteína purificada e concentrada. A quantificação feita pelo método de microtitulação de Bradford e por SDS-PAGE revelou uma concentração de cerca de 0,200mg/mL (Fig. 10). A proteína rLTB, cultivada em 500mL rendeu 5mL de proteína purificada e concentrada a 0,100mg/mL (Fig. 11).



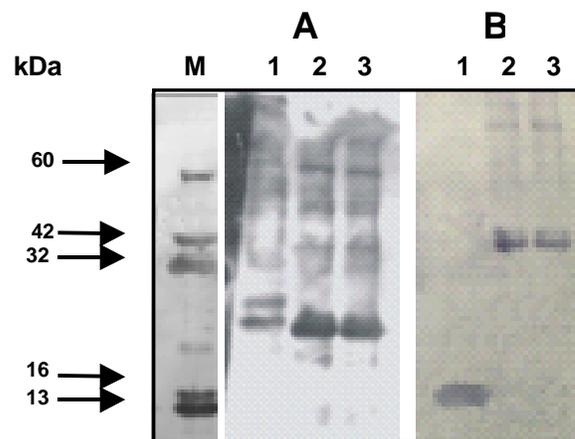
**Figura 10.** Quantificação da proteína rLTB/Sm14 através da análise em SDS-PAGE 15%. M- Marcador de proteína; 1- BSA 0.5µg/10µL; 2- BSA 1µg/10 µL; 3- BSA 2µg/10µL; 4- BSA 3µg/10 µL; 5- BSA 4µg/10µL; 6- rLTB/Sm14 (µg/10µL).



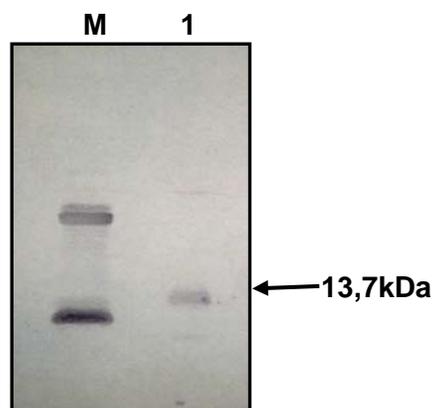
**Figura 11.** Quantificação da proteína rLTB através da análise em SDS-PAGE 15%. 1- BSA 0.5µg/10µL; 2- BSA 1µg/10µL; 3- BSA 2µg/10µL; 4- BSA 3µg/10µL; 5- rLTB; M- Marcador de proteína.

#### 4.3.5 Caracterização

A antigenicidade das proteínas foi confirmada através da técnica de Western blot. Na Fig. 12 pode-se observar o Western blot realizado para verificar a antigenicidade da proteína rLTB/Sm14 contra os anticorpos policlonais anti-CT (Fig. 12, painel A) e anti-LTB (Fig.12, painel B), sendo a proteína recombinante desnaturada ou não. Não houve diferença quanto à formação de oligômeros entre a proteína desnaturada ou não. Na Fig.13 pode-se observar o resultado da técnica realizada com anticorpo policlonal anti-CT para a proteína rLTB, confirmando a antigenicidade da mesma.



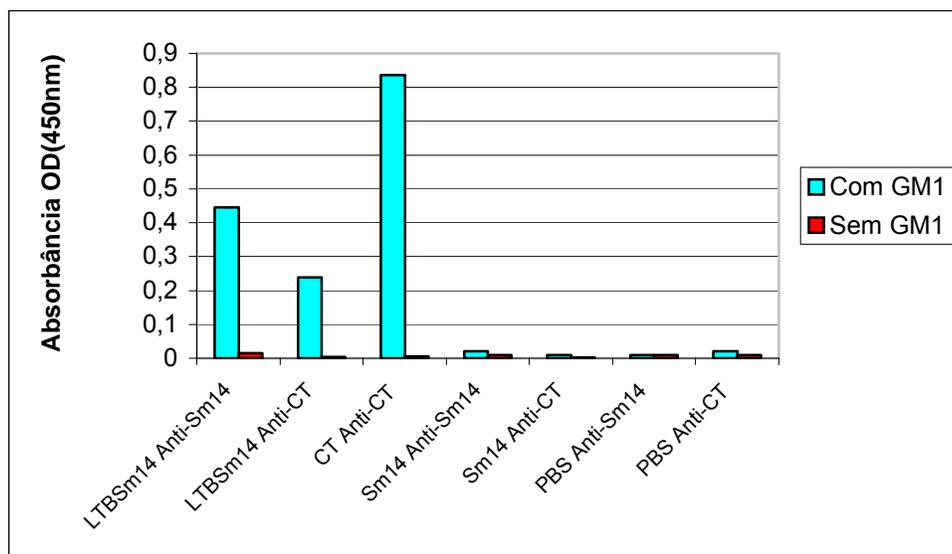
**Figura 12.** Antigenicidade da proteína rLTB/Sm14 através de Western blot. **Painel A-** anticorpo anti-CT: 1- rLTB/R1, 2-rLTB/Sm14 desnaturada, 3- rLTB/Sm14 não desnaturada. **Painel B-** anticorpo anti-Sm14: 1- rSm14, 2-rLTB/Sm14 desnaturada, 3- rLTB/Sm14 não desnaturada.



**Figura 13:** Western blot com anti-CT para proteína rLTB. M- CT; 1- rLTB.

#### 4.3.6 Avaliação da Ligação ao Gangliosídeo GM1

A ligação entre a rLTB/Sm14 e o gangliosídeo GM1 foi determinada por ELISA indireto. Parte da placa de ELISA foi sensibilizada com GM1 e outra não, a fim de ter um controle sobre a ligação específica da LTB a este gangliosídeo. Como controle positivo utilizou-se a proteína CT e como negativos rSm14 e PBS. Conforme pode-se observar na Fig. 14, a proteína rLTB/Sm14 ligou-se especificamente ao gangliosídeo GM1.



**Figura 14.** Avaliação da ligação da proteína rLTBSm14 ao gangliosídeo GM1, através de ELISA indireto.

### 4.4 Imunização e Ensaio de Proteção Animal

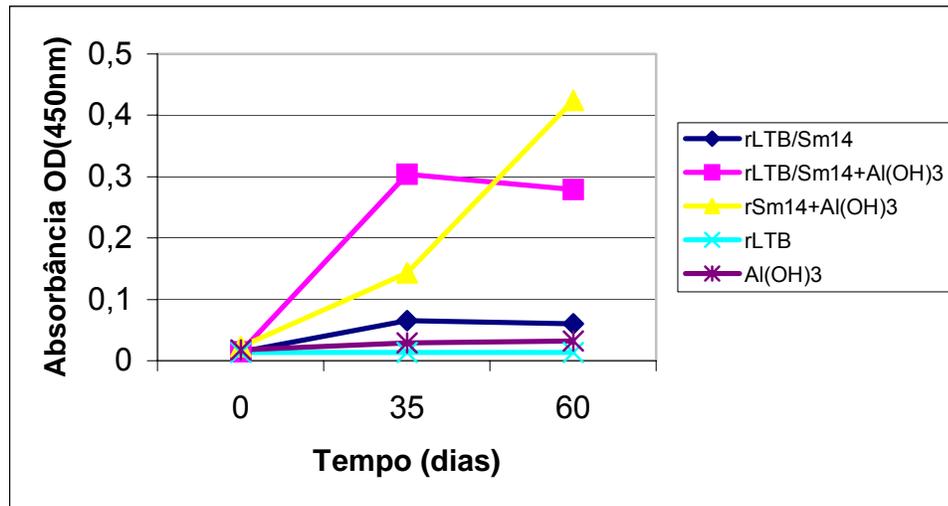
#### 4.4.1 Avaliação da Resposta Imune Humoral

O *pool* dos soros de camundongos suíços imunizados com rLTB/Sm14, rLTB/Sm14+Al(OH)<sub>3</sub>, rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>, rLTB e Al(OH)<sub>3</sub> foi utilizado para detectar anticorpos específicos contra rSm14 ou rLTB.

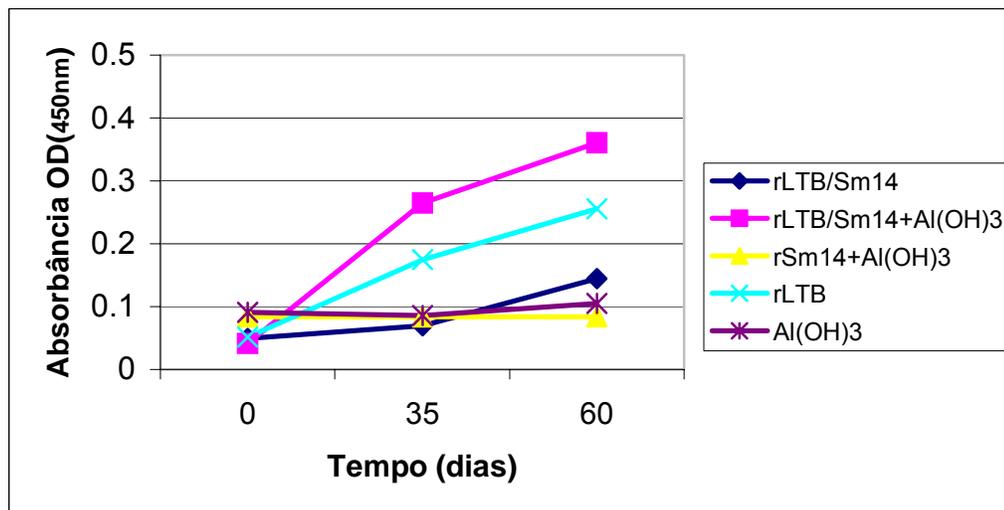
A avaliação da resposta humoral foi realizada através de ELISA indireto, testando a reatividade do *pool* dos soros com a proteína recombinante Sm14. Anticorpos anti-Sm14 foram detectados no soro dos animais vacinados com

rLTB/Sm14, sozinha ou acrescida do adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e no grupo controle positivo rSm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Fig.15). Como se pode observar na Fig.15, em relação aos soros pré-imune e aos grupos controle negativo (rLTB e  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), o *pool* do soro dos camundongos imunizados com rLTB/Sm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  no dia 35 apresentou o maior nível de anticorpos específicos anti-Sm14 ( $\text{DO}_{450}$  0,30); no entanto, no dia 60 o *pool* do soro dos animais imunizados com rSm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  passou a apresentar a maior absorvância média ( $\text{DO}_{450}$  0,42). O grupo vacinado com rLTB/Sm14 manteve os níveis de anticorpos anti-Sm14 próximos aos dos grupos do controle negativo. O ELISA indireto, testando a reatividade do *pool* dos soros com a proteína rLTB, detectou a presença de anticorpos anti-LTB nos soros dos grupos vacinais rLTB/Sm14, sozinha ou acrescida do adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , e no grupo controle positivo, rLTB (Fig.16). Em relação aos soros pré-imune e aos grupos controle negativo (rSm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  e  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), o soro do grupo rLTB/Sm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  apresentou o maior nível de anticorpos anti-LTB nos dias 35 e 60, com  $\text{DO}_{450}$  de 0,26 e 0,36, respectivamente. A produção de anticorpos contra LTB nos animais imunizados com rLTB/Sm14 apresentou níveis próximos aos grupos controle negativo, nas duas coletas.

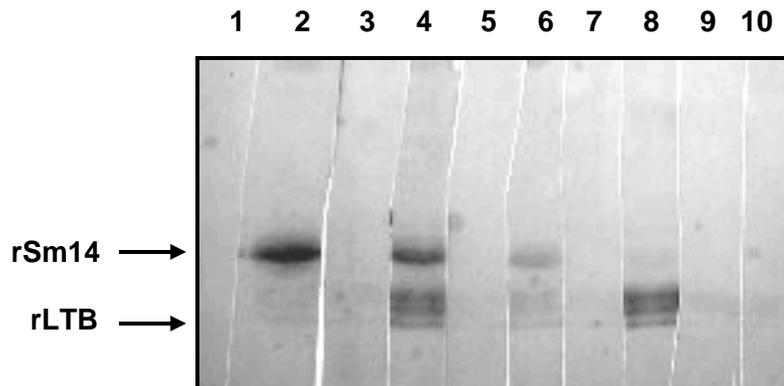
Outro teste realizado para avaliar a resposta imune foi o Western blot, onde se avaliou a reatividade do *pool* dos soros, das coletas dos dias zero e 60, com os antígenos rSm14 e rLTB. Este teste confirmou a presença de anticorpos específicos anti-Sm14 nos soros dos grupos imunizados com rLTB/Sm14, rLTB/Sm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  e rSm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ; e anti-LTB nos dois primeiros grupos e no grupo rLTB (Fig. 17). Como se pode observar na Fig.17, os soros do dia zero dos diferentes grupos experimentais não reagiram contra os antígenos. No que tange o dia 60, os soros dos camundongos vacinados com rLTB/Sm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  e rSm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  apresentaram as reações anti-Sm14 mais intensas, quando comparados com os soros dos demais grupos experimentais. O Western blot confirmou o que se tinha observado no ELISA, ou seja, os animais imunizados com rLTB/Sm14+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ , parecem produzir anticorpos contra Sm14 e LTB com igual intensidade, enquanto que aqueles imunizados com rLTB/Sm14 não possuem resposta imune satisfatória.



**Figura 15.** Avaliação da resposta imune humoral anti-Sm14 através de ELISA indireto, onde o *pool* dos soros diluído 1:100 foi analisado em triplicata. A medida da resposta imune está expressa na média das três absorbâncias.



**Figura 16.** Avaliação da resposta imune humoral anti-LTB através de ELISA indireto, onde o *pool* dos soros diluído 1:100 foi analisado em triplicata. A medida da resposta imune está expressa na média das três absorbâncias.



**Figura 17.** Western blot para avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas rSm14 e rLTB. Coluna 1 e 2- *pool* do soro dos camundongos imunizados com rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>, nos dias zero e 60, respectivamente; coluna 3 e 4- *pool* do soro dos camundongos imunizados com rLTB/Sm14+Al(OH)<sub>3</sub>, nos dias zero e 60, respectivamente; coluna 5 e 6- *pool* do soro dos camundongos imunizados com rLTB/Sm14, nos dias zero e 60, respectivamente; coluna 7 e 8- *pool* do soro dos camundongos imunizados com rLTB, nos dias zero e 60, respectivamente; coluna 9 e 10- *pool* do soro dos camundongos imunizados com Al(OH)<sub>3</sub>, nos dias zero e 60, respectivamente.

#### 4.4.2 Avaliação da Proteção

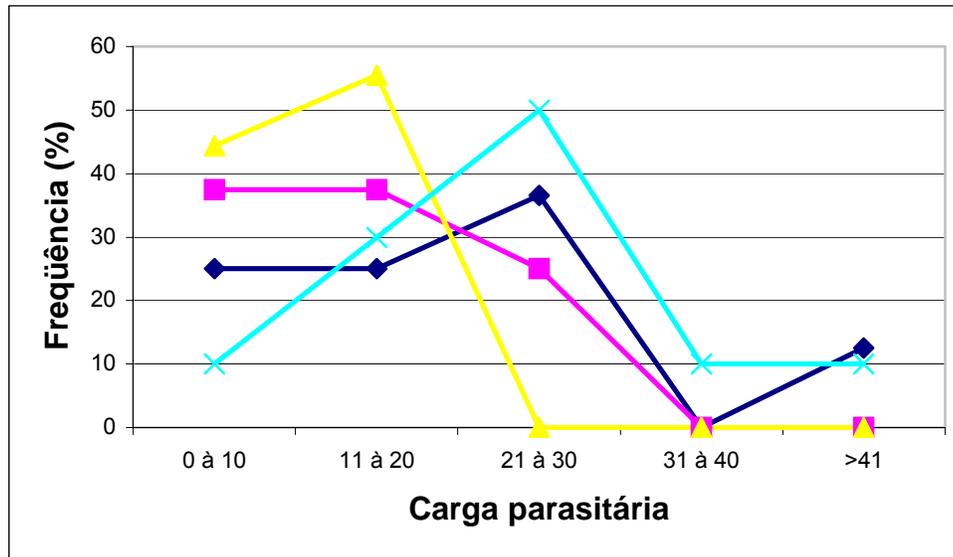
Camundongos suíços *outbred* foram desafiados subcutaneamente com 100 cercárias de *S. mansoni*, 60 dias após a última imunização. Após 45 dias, os parasitas adultos foram recuperados do sistema venoso hepático e mesentérico por perfusão. Conforme pode-se observar na tab. 2, o grupo com Al(OH)<sub>3</sub> não reproduziu o controle da infecção, uma vez que apresentou praticamente a mesma média da carga parasitária encontrada no controle da vacina, o grupo rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>. Dada esta intercorrência, utilizou-se o grupo imunizado com rLTB como controle para o cálculo da proteção, uma vez que sua média de carga parasitária está próxima daquela normalmente encontrada no grupo controle negativo da infecção.

Os animais vacinados com rSm14+Al(OH)<sub>3</sub> tiveram proteção de 54,01%, quando comparados com aqueles imunizados com rLTB. A imunização com rLTB/Sm14 não aumentou a proteção dos camundongos desafiados com cercárias de *S.mansoni*, quando comparado com o grupo controle da vacina, rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>.

A Fig. 18 ilustra a distribuição da freqüência da carga parasitária, expressa em porcentagem, entre o diferentes grupos vacinais e o grupo controle, rLTB. A distribuição da freqüência da carga parasitária entre os grupos vacinais rLTB/Sm14+Al(OH)<sub>3</sub> e rSm14+Al(OH)<sub>3</sub> foi bastante semelhante, estando a maior porcentagem da carga parasitária, em ambos grupos, distribuída entre 0 a 10 e 11 a 20 parasitas recuperados do sistema venoso hepático e mesentérico por perfusão. Já os grupos rLTB/Sm14 e rLTB, assemelharam-se apresentando a maior distribuição de freqüência de carga parasitária entre 21 a 30 parasitas recuperados.

**Tabela 2:** Proteção de camundongos suíços *outbred* contra infecção experimental por cercárias de *S.mansoni*.

Vacina	Nº de animais	Carga parasitária recuperada (Média ± Desvio padrão)	Proteção (%)
rLTB/Sm14	8	22,6 ± 14,2	0,0
rLTB/Sm14+Al(OH) <sub>3</sub>	8	14,5 ± 7,4	40,7
rSm14+Al(OH) <sub>3</sub>	9	11,2 ± 5,5	54,0
rLTB	10	24,4 ± 13,7	0
Al(OH) <sub>3</sub>	8	13,5 ± 8,5	44,6



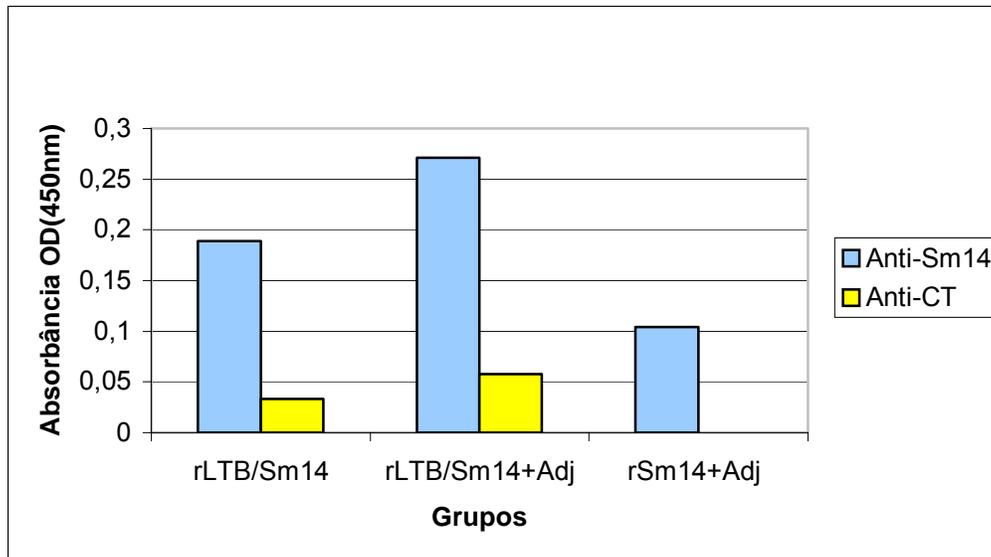
**Figura 18.** Distribuição da freqüência (%) da carga parasitária recuperada por perfusão do sistema venoso hepático e mesentérico, entre animais vacinados e animais do grupo controle da infecção (rLTB).

## 4.5 Anticorpos Monoclonais (MAbs)

### 4.5.1 Imunização dos Camundongos

Os soros dos camundongos BALB/c imunizados com rLTB/Sm14, rLTB/Sm14+Adjuvante de Freund e rSm14+Adjuvante de Freund coletados uma semana após a última imunização foram testados quanto à sua reatividade com as proteínas rSm14 e CT. Os soros foram diluídos na fração de 1:3200 e testados, em triplicata, através de ELISA indireto. Conforme pode-se observar na Fig.19, o animal imunizado com rLTB/Sm14+Adjuvante de Freund apresentou o maior nível de anticorpos específicos anti-Sm14 ( $DO_{450}$  0,27). No entanto, neste ELISA não foi detectada a presença de anticorpos contra LTB no soro dos animais vacinados com rLTB/Sm14, sozinha ou acrescida do adjuvante. O animal imunizado com rLTB/Sm14+Adjuvante de Freund foi escolhido para receber uma dose reforço e fornecer os esplenócitos para realizar a fusão com as células de mieloma. Além disso, com este ensaio imunológico, foi possível verificar que houve maior produção de anticorpos anti-Sm14 naquele animal imunizado com rLTB/Sm14, sozinha ou co-

administrada com adjuvante de Freund, do que naquele com rSm14 co-administrada com adjuvante.



**Figura 19.** ELISA indireto da avaliação da resposta imune humoral anti-Sm14 e anti-LTB dos soros dos camundongos BALB/c imunizados com rLTB/Sm14, rLTB/Sm14+Adjuvante de Freund e rSm14+Adjuvante de Freund.

#### 4.5.2 Produção e Purificação de MAbs

Células do baço de camundongos imunizados com o antígeno rLTB/Sm14 + Adjuvante de Freund e células de mieloma da linhagem Sp2/0-Ag14 foram hibridizadas com sucesso. Ao fim de 16 dias de cultivo, as cavidades que tiveram crescimento de células (hibridomas) foram testadas através de um ELISA indireto com antígenos rLTB/Sm14, rSm14 e CT. Estes dois últimos foram utilizados a fim de verificar se os hibridomas estavam produzindo anticorpos específicos para a fusão rLTB/Sm14 ou, individualmente, para Sm14 e LTB. Utilizou-se a proteína CT (homóloga a LT), pois a rLTB não havia sido expressa e purificada no momento da produção dos MAbs. No ELISA foi detectada a produção de anticorpos anti-rLTB/Sm14 e anti-rSm14, mas não anti-LTB; dessa forma, pode-se verificar que os hibridomas produziram anticorpos apenas contra a proteína Sm14. Os cultivos que apresentaram atividade de anticorpos foram expandidos e retestados com os mesmos antígenos, sendo que o ELISA

confirmou novamente a produção de MAbs apenas contra Sm14. Obteve-se sete clones produzindo eficientemente MAbs anti-rSm14.

Os MAbs obtidos de fluídos ascíticos foram purificados e posteriormente caracterizados. A isotipagem foi o único experimento de caracterização que utilizou o sobrenadante do cultivo dos hibridomas.

A pureza dos MAbs foi confirmada por SDS-PAGE 12% (dado não mostrado).

### 4.5.3 Caracterização dos MAbs

#### 4.5.3.1 Isotipagem

A isotipagem foi realizada utilizando o sobrenadante do cultivo dos hibridomas. Os sete MAbs foram isotipados através de um kit de isotipagem com anticorpos anti-isotipo específico, utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma), sendo os resultados dispostos tab. 3. A subclasse predominante dos anticorpos monoclonais foi IgG1, sendo produzida por cinco clones; além disso, um clone produziu IgG2b e outro IgM. Destes MAbs, o único que não foi purificado foi o isotipo IgM.

**Tabela 3:** Isotipagem dos anticorpos monoclonais anti-rSm14, a partir do sobrenadante do cultivo de hibridomas.

<b>Anticorpos Monoclonais (MAbs)</b>							
	<b>11F1</b>	<b>14F3</b>	<b>37B3</b>	<b>44D1</b>	<b>49E2</b>	<b>110D1</b>	<b>111G2</b>
<b>Isotipos</b>	IgG1	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG1	IgM	IgG1

#### 4.5.3.2 Reatividade dos MAbs Purificados Contra rSm14

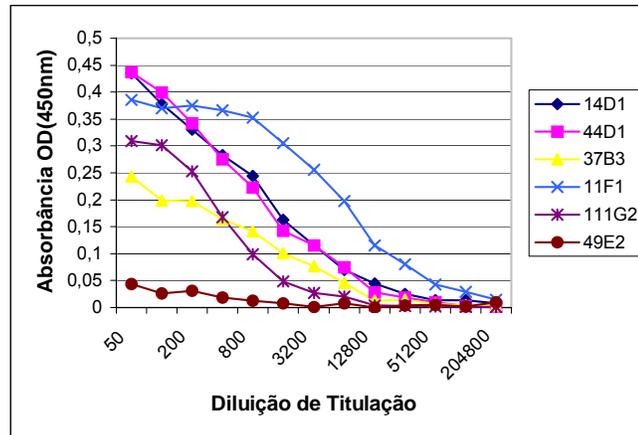
Após a purificação dos fluídos ascíticos, os MAbs foram testados através de ELISA indireto e de Western blot, a fim de verificar sua reatividade contra rSm14.

O ELISA foi realizado em duplicata utilizando os MAbs ajustados para a concentração de 0,270mg/mL, e em diluições seriadas em base 2, a fim de determinar a curva de titulação. Este teste confirmou a reatividade contra rSm14 de todos os MAbs, exceto o 49E2 que não reconheceu esta proteína. O Mab 111G2 foi o que apresentou a menor titulação (1:1600) e o 11F1 a maior (1:12800) (Fig. 20). Foi realizado outro ELISA

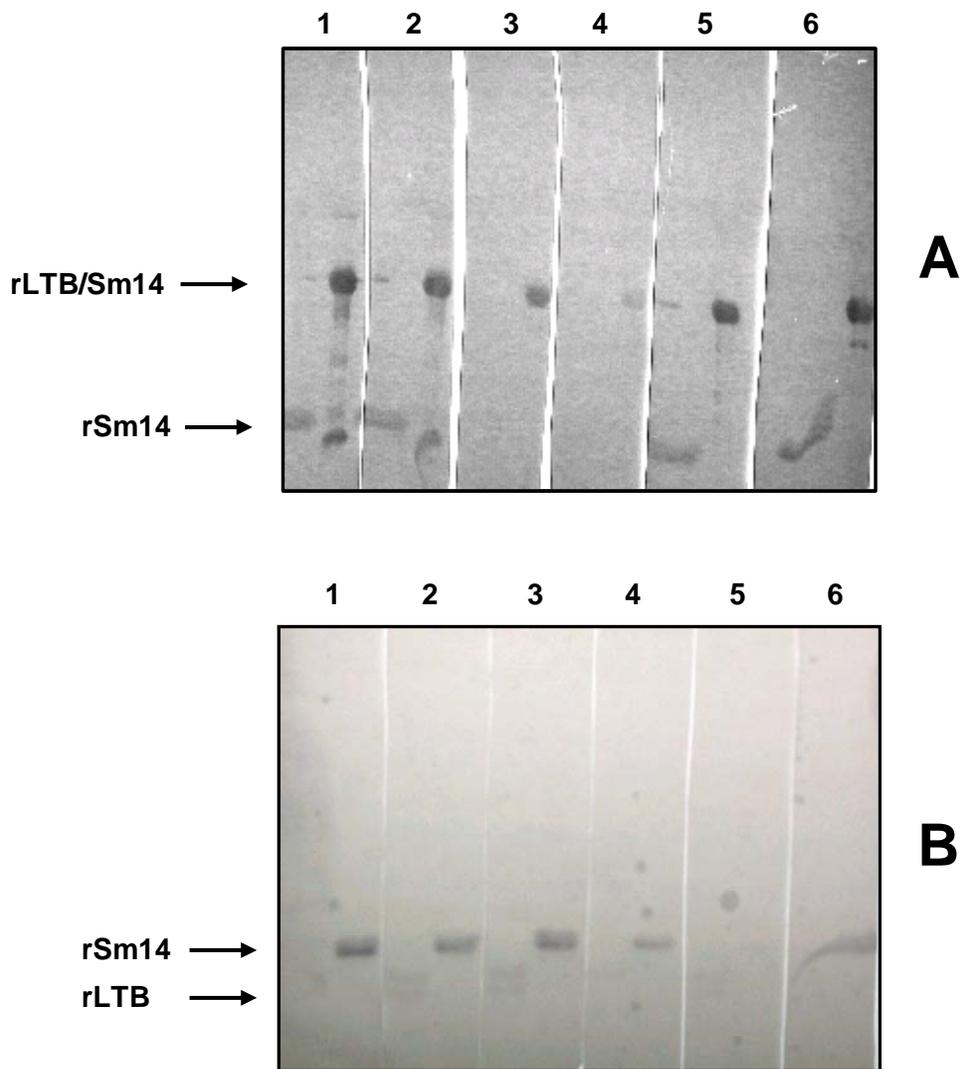
indireto, utilizando os MAbs na sua concentração final, contra a proteínas rLTB e BSA, a fim de verificar a especificidade das reações dos monoclonais contra rSm14. Nenhuma reação ocorreu neste ELISA, confirmando a reatividade dos MAbs apenas contra rSm14 (dados não mostrados).

Para confirmar se as reações positivas do ELISA eram frutos da reação específica dos MAbs com a rSm14, foi realizado o Western blot com as proteínas recombinantes LTB/Sm14, Sm14 e LTB. Os MAbs foram utilizados em uma concentração final de 10 $\mu$ g/mL e as proteínas recombinantes 1 $\mu$ g/cavidade. Na Fig. 21 estão representadas as reações de Western blot, sendo que no painel A está representado o teste realizado contra as proteínas rLTB/Sm14 e rSm14; enquanto no painel B, contra as proteínas rSm14 e rLTB. Como se pode observar no painel A, é possível visualizar bandas reativas contra as duas proteínas, exceto os MAbs 37B3 e 49E2 (painel A, 3 e 4, respectivamente) que reagiram apenas com a rLTB/Sm14, sendo que o último teve uma fraca reação. No painel B, observa-se que os MAbs reagiram apenas contra rSm14, inclusive o 37B3 (painel B, 4), que no Western blot anterior (painel A, 3) não havia reagido com esta proteína. Este Mab foi utilizado numa concentração de 20 $\mu$ g/mL, mostrando que a concentração influencia na sua reatividade. No entanto, o Mab 49E2, que também foi utilizado nesta concentração, não reagiu com nenhuma das proteínas recombinantes, sugerindo que a reação visualizada contra a rLTB/Sm14 (painel A, 4), pode ter sido fruto de reação inespecífica. Este teste confirma o que foi encontrado no ELISA .

Como no Western blot usa-se o agente desnaturante (SDS) as proteínas ficam linearizadas, sendo então possível determinar se os MAbs reagem em epítomos lineares ou conformacionais. Todos os MAbs, exceto o 49E2, reagiram com a proteína rSm14 sob condições redutoras, significando que todos reagem com epítomos lineares. Os MAbs não foram testados quanto a sua reatividade com a Sm14 nativa, uma vez que não havia extrato de *S. mansoni* disponível durante a realização do presente trabalho.



**Figura 20.** Curva de titulação dos MAb's purificados. Titulação realizada com a concentração dos MAb's ajustadas para 0,27mg/mL e diluídos serialmente duas vezes em PBS-T. Os pontos são médias da absorbância ( $OD_{450nm}$ ) das duplicatas.



**Figura 21.** Western blot da reatividade dos MAb's purificados. **Painel A-** Reatividade dos Mabs contra as proteínas rLTB/Sm14 e rSm14. 1- 14F3; 2- 44D1; 3- 37B3; 4- 49E2; 5- 11F1; 6- 111G2. **Painel B-** Reatividade dos MAb's contra as proteínas rSm14 e rLTB. 1- 111G2; 2- 14F3; 3- 44D1; 4- 37B3; 5- 49E2; 6- 11F1.

#### 4.5.3.3 Índice de Aditividade

Como pode ser observado na tab. 4, a ligação de qualquer um dos MAb's obtidos resulta na incapacidade de outro MAb reagir com o antígeno, conforme determinado pelo índice de aditividade menor que 50%. Na realização deste experimento os MAb's purificados foram utilizados em diluições entre 1:20 e 1:200 em

PBS-T. Foram feitos dois experimentos independentes com duas repetições de cada diluição.

**Tabela 4:** Determinação do índice de aditividade dos MAbs (%). Os resultados são médias de dois experimentos independentes.

	<b>11F1</b>	<b>14F3</b>	<b>37B3</b>	<b>44D1</b>	<b>111G2</b>
<b>11F1</b>	—	7,5	47,6	8,3	-0,47
<b>14F3</b>		—	19,1	29,8	25,6
<b>37B3</b>			—	22,0	30,3
<b>44D1</b>				—	17,8
<b>111G2</b>					—

## 5 Discussão

A infecção por *S. mansoni* e *F. hepatica* representa um desafio para o sistema imune, uma vez que estes parasitos são organismos multicelulares e que possuem diferentes estágios durante o ciclo de vida, habitando diferentes locais dentro do hospedeiro. O resultado da resposta imune determina o balanço entre a imunidade protetora e a patologia, a diferença entre saúde e morbidade (SPITHILL; DALTON, 1998; PEARCE; MCDONALD, 2002). Em muitos casos, a esquistossomose e a fasciolose podem ser tratadas por quimioterapia, mas o rápido índice de reinfecção em áreas endêmicas requer tratamentos repetidos que pode levar à resistência aos quimioterápicos para ambas parasitoses. Sendo assim, é necessário uma medida de controle de longo prazo, tal como uma vacina (SPITHILL; DALTON, 1998; CAPRON et al., 2002). Estudos sugerem que a proteína Sm14 pode compor uma vacina de subunidade contra ambos parasitos (TENDLER et al., 1995, 1996). Esta proteína é uma das seis moléculas selecionadas pela OMS com potencial para compor uma vacina recombinante contra esquistossomose (WHO, 2000).

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidade vem crescendo. Um dos problemas de tais vacinas é a fraca imunogenicidade dos antígenos quando comparada à vacinas compostas do patógeno inteiro. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) tem sido destacada por sua atividade adjuvante, sendo capaz de aumentar a resposta imune humoral e celular para antígenos suplementados com ela, melhorando assim a eficácia de vacinas recombinantes (VERWEIJ; HAAN; HOLTROP, 1998; WELTZIN et al. 2000; WILLIAMS, 2000; CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006; FINGERUT, 2006; PITCOVSKI et al., 2006).

No presente estudo foi realizada a fusão gênica entre a região C-terminal da LTB e a N-terminal da proteína Sm14 de *S. mansoni* através de um método denominado PCR-*primer linker*. Para realização deste método, os *primers* LTB Rev e Sm14 For

possuíam 12pb complementares. Após amplificação por PCR, os produtos se hibridizaram, servindo de *primers* para a polimerização da quimera. Este método mostrou-se eficiente, sendo a fusão obtida na primeira tentativa. Além disso, foi menos laborioso do que o método utilizado por CONCEIÇÃO (2006-comunicação pessoal) para fusionar a LTB com o antígeno R1 de *Mycoplasma hyopneumoniae*, baseado na amplificação dos alvos, digestão com enzimas de restrição, ligação com T4 DNA Ligase e posterior PCR utilizando o produto da ligação como molde e os *primers* LTB For e R1 Rev. Os epítomos protetores da Sm14 são descontínuos e se localizam principalmente na porção C-terminal da proteína, por isso a região N-terminal foi eleita para ser fusionada com a LTB, a fim de assegurar que a porção C-terminal ficasse livre. A forma como o antígeno é combinado com a LTB, seja co-administrado, fusionado ou quimicamente acoplado, também parece influenciar na atividade da LTB. Quando a LTB foi fusionada ao antígeno VP2 houve aumento da produção de anticorpos contra VP2 e proteção das aves na infecção por vírus causador da doença infecciosa da bursa (*infectious bursal disease vírus- IBDV*) (FINGERUT et al., 2005). No entanto, quando a proteína VP2 foi co-administrada com LTB, não houve aumento da resposta imune (FINGERUT et al., 2006).

A quimera LTB/Sm14 foi clonada nos plasmídeos pQE e pAE e expressa em *E. coli* satisfatoriamente. Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão entre pQE-LTB/Sm14 e pAE-LTB/Sm14, bem como entre elas e pAE-Sm14. A fusão rLTB/Sm14 apresentou-se estável e apesar de ter sido expressa como corpos de inclusão insolúvel, seu *refolding* pareceu satisfatório, visto que a quimera manteve as características individuais das proteínas fusionadas. Mesmo fusionada, a LTB manteve sua capacidade de ligação ao gangliosídeo GM1, o que é fundamental para que ela desempenhe sua função imunoadjuvante (DE HAAN, et al., 1998), como pode ser constatado pelo ELISA-GM1. Durante a produção dos MAbs, foi confirmada a adjuvancidade da LTB *in vivo*, uma vez que os camundongos que foram imunizados com a construção rLTB/Sm14 apresentaram um nível de anticorpos superior ao do animal inoculado com rSm14. A fusão parece não ter alterado as características da Sm14, uma vez que sua antigenicidade foi confirmada *in vitro* através dos testes de ELISA e Western blot e sua imunogenicidade, *in vivo*, através do teste de imunização.

Em relação à imunogenicidade, a vacina rLTB/Sm14 adicionada com hidróxido de alumínio foi imunogênica, visto que os camundongos produziram anticorpos específicos contra rSm14, embora em níveis menores do que o estimulado pela rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>, e contra rLTB, em níveis superiores ao do grupo imunizado com rLTB. Resultados semelhantes foram encontrados por Pitcovski et al. (2006), onde a LTB co-administrada, via transcutânea, com um antígeno de melanoma (gp100), também não proporcionou aumento na produção de anticorpos contra gp100, quando comparada com ela sozinha; entretanto, praticamente o dobro de anticorpos anti-LTB foi detectado. Tal autor sugere competição entre o adjuvante e o antígeno, mais do que o aumento da resposta imune. Em outro trabalho (ROCK et al., 1996), a LTB fusionada com uma porção do hormônio hCG (CTP) foi inoculada via subcutânea, sozinha ou acrescida de adjuvante (Ribi R-700), e estimulou a produção de anticorpos anti-LTB e anti-CTP na mesma intensidade dos grupos acrescidos ou não de Ribi R-700. Por outro lado, no presente estudo a rLTB/Sm14 sem adição de adjuvante exógeno mostrou-se fracamente imunogênica, uma vez que estimulou a produção de anticorpos anti-Sm14 num nível bem inferior ao produzido pelo grupo rLTB/Sm14+Al(OH)<sub>3</sub>; além disso, induziu também a produção de baixos níveis de anti-LTB. Yamamoto et al. (1997) também não encontraram atividade adjuvante para enterotoxina de *V. cholerae* -CTB (molécula com estrutura e atividade similares à LTB) quando esta foi administrada via subcutânea com ovoalbumina. Contrastando com estes achados, Weltzin e colaboradores (2000) relataram atividade adjuvante para LTB inoculada via subcutânea com um antígeno de *Helicobacter pylori*, sendo constatada uma melhora na resposta imune para tal antígeno. Conceição, Moreira e Dellagostin (2006), também encontraram atividade imunoestimulatória para LTB fusionada com um antígeno de *M. hyopneumoniae* (rR1) e inoculada via intramuscular ou intranasal, sendo ela capaz de estimular a produção de altos níveis de anticorpos anti-R1 e baixos níveis de anti-LTB.

Em relação a imunoproteção frente ao desafio com cercárias de *S. mansoni*, a vacina rLTB/Sm14+Al(OH)<sub>3</sub> promoveu proteção de 40,73%, a qual se enquadra no valor mínimo aceito para uma vacina contra esquistossomose (WHO, 2000); apresentando uma distribuição da carga parasitária parecida com aquela encontrada no grupo controle (rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>). Apesar disso, esta vacina não foi superior à rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>.

no que diz respeito à produção de anticorpos anti-Sm14 e à proteção contra a infecção por *S. mansoni*. Em estudos prévios, Abreu et al. (2004) obtiveram resultados bastante semelhantes aos encontrados neste trabalho, fusionando o fragmento C (porção atóxica) da toxina tetânica (TTFC) com a rSm14 e inoculando essa fusão via subcutânea com o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>. Tal fusão não aumentou a imunogenicidade do antígeno rSm14 e não afetou as características imunogênicas dele, uma vez que manteve no mesmo patamar a produção de anticorpos e a proteção (50%) conferida pela rSm14+Al(OH)<sub>3</sub>. Além disso, eles também constataram a presença de altos índices de anticorpos contra o adjuvante (anti-TTFC), concordando com o encontrado neste trabalho. Por outro lado, a vacina rLTB/Sm14 sozinha não conferiu proteção aos camundongos desafiados. Khan et al. (1994) encontraram resultado semelhante a este quando fusionaram o antígeno de *S. mansoni* Sm28-GST com o imunoadjuvante TTFC, que apesar de ter aumentado os níveis de anticorpos nos camundongos imunizados, não os protegeu no desafio contra *S. mansoni*. Estes dados entram em conflito com o resultado obtido em outro trabalho, onde a administração via subcutânea da LTB com uma proteína de *H. pylori* promoveu proteção contra esta bactéria (WELTZIN et al., 2000).

Outros trabalhos realizados a fim de buscar alternativas que melhorem a resposta imune conferida pela Sm14, através do uso de outros adjuvantes que não o hidróxido de alumínio, também não obtiveram êxito quanto à melhora da proteção frente ao desafio com *S. mansoni*. Entre essas alternativas estão o uso de bactérias vivas atenuadas, como *Salmonella enterica* sorovarTyphimurium *aroA* e BCG, expressando a proteína rSm14, sendo elas administradas via oral (PACHECO et al., 2005) e subcutânea (VARALDO et al, 2004), respectivamente; a injeção, via intramuscular, de vacina de DNA com o gene da Sm14 co-administrada com um plasmídeo expressando IL-12 (adjuvante) (FONSECA et al., 2006); e a fusão da TTFC com Sm14, como apresentada anteriormente. No entanto, até o momento, nenhuma dessas construções pareceu melhorar a proteção conferida pela rSm14 inoculada via subcutânea com o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>.

No presente trabalho, onde a fusão rLTB/Sm14 não melhorou a imunogenicidade e a proteção conferida pelo antígeno Sm14, a falha da LTB como

adjuvante parece não estar associada com a fusão, uma vez que proteínas ligadas na porção C-terminal da LTB não afetam a formação de pentâmeros, portanto, não alterando sua ligação ao gangliosídeo GM1 (SIXMA et al., 1992; GREEN et al., 1996), como foi observado aqui. Além disso, a região que contém os epítomos protetores da Sm14 é a C-terminal (TENDLER et al., 1996), que permaneceu livre na quimera rLTB/Sm14. Além disso, o grupo vacinado com rLTB/Sm14+Al(OH)<sub>3</sub> produziu anticorpos contra rSm14 de maneira satisfatória, comprovando sua imunogenicidade, embora os animais imunizados apenas com rLTB/Sm14 tenham produzido anti-Sm14 em níveis muito inferiores ao grupo da fusão com Al(OH)<sub>3</sub>. Outros trabalhos também comprovam que a fusão da porção N-terminal da Sm14 com outra proteína não afeta as características imunogênicas da rSm14 (ABREU et al., 2004).

Pouco se sabe o quanto à presença de anticorpos anti-LTB pode ser prejudicial para a atividade adjuvante da LTB, levando em consideração alguns trabalhos que geraram resultados conflitantes a respeito desse assunto. Segundo Fingerut et al. (2006), a produção de anticorpos anti-LTB parece não estar vinculada com a atividade adjuvante, tendo em vista que aves imunizadas oralmente e intramuscularmente com LTB co-administrada com uma proteína de adenovírus (EDS- *egg drop syndrome*) não produziram anticorpos contra LTB, tanto no grupo que teve melhora na resposta imune (via oral), quanto naquele em que anticorpos contra o antígeno co-administrado não foram produzidos (via intramuscular). Contrapondo com esse resultado, Pitcovski e colaboradores (2006) encontraram uma correlação inversamente proporcional entre a produção de anticorpos contra LTB e a atividade adjuvante da mesma. Onde a presença desses anticorpos foi detectada somente no grupo em que a LTB falhou em aumentar a resposta imune. Segundo esse pesquisador, a falta de anticorpo contra LTB permite repetir o uso desse adjuvante, pois sem ter anticorpo contra ele, pode-se garantir seu efeito adjuvante.

Todavia, a falha da LTB como adjuvante pode estar correlacionada com a sua via de administração, pois estudos têm mostrado que a atividade adjuvante da LTB pode ser fortemente influenciada pela rota da imunização e pela natureza do antígeno envolvido (ROCK et al., 1996; WELTZIN et al., 2000; DE HAAN et al., 2001; CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006; FINGERUT et al., 2006; PITCOVSKI

et al., 2006). Um trabalho em que se pode observar claramente a influência da rota e do antígeno foi o realizado por Fingerut et al. (2006), onde a co-administração da LTB com uma proteína de adenovírus (rKnob) resultou em uma significativa elevação da produção de anticorpos nos grupos vacinados via oral e transcutânea, ao passo que outro grupo imunizado via intramuscular, com a mesma combinação, não sofreu influência adjuvante da LTB. Por outro lado, quando a proteína foi substituída por uma do vírus causador da doença infecciosa da bursa (IBDV) (VP2), não foi detectado aumento na resposta imune para nenhuma daquelas três vias de administração, comprovando dessa forma que a via e a natureza do antígeno co-administrado são de suma importância para a atividade adjuvante da LTB. Além disso, a rota parece influenciar também na modulação da resposta imune desencadeada pela LTB, como foi demonstrado para a fusão rLTB/R1, onde a inoculação via intramuscular induziu resposta imune do tipo Th2, enquanto que a via intranasal tipo Th1 (CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006).

Levando-se em consideração a importância da rota de administração na atividade adjuvante da LTB e a falha da quimera rLTB/Sm14 em aumentar o caráter imunoprotetor da Sm14, quando inoculada via subcutânea, é viável pensar em uma nova rota de imunização para esta quimera. Vale lembrar, que a LTB é um dos mais potentes adjuvantes de mucosa (VERWEIJ, W.R.; HAAN, L.; HOLTROP, 1998; DE HAAN et al., 2001; MILLAR; HIRST; SNIDER, 2001). Nesse sentido, a via intranasal parece atrativa, uma vez que vem sendo utilizada, com relativo sucesso, como via de administração para outros antígenos vacinais de *S. mansoni* fusionados a subunidade B da toxina colérica (CTB), homólogo à LTB. A administração intranasal do antígeno mais importante do ovo de *S. mansoni*, Sm-p40, conjugado com CTB diminuiu as manifestações imunopatológicas em hospedeiros infectados (SUN et al., 2001). Da mesma forma, a administração intranasal de uma das seis moléculas candidata a vacina contra *S. mansoni*, a Sm28GST (28kDa glutathiona S-transferase), conjugada com CTB, resultou na redução da carga parasitária e da produção de ovos, e na parcial inibição da formação de granulomas no fígado (SUN et al., 1999). Colaborando com estes achados, a imunização intranasal de camundongos com a proteína Sfb1 de *Streptococcus pyogenes*, utilizando como adjuvante a CTB, induziu proteção no teste

desafio (MCARTHUR et al., 2004). Além disso, a via intranasal é capaz de desencadear resposta imune tipo Th1 e tipo Th2 (CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006), fato esse que seria vantajoso, já que a proteção conferida pela Sm14 contra *S. mansoni* parece estar relacionada com uma associação entre a resposta imune celular e humoral (BRITO et al., 2000; AL-SHERBINY et al., 2003; FONSECA et al., 2004).

Em relação aos anticorpos monoclonais, foi obtido um painel de sete MAbs contra rSm14, sendo que deste apenas o 110D1 (IgM) não foi purificado e caracterizado quanto à sua capacidade de reconhecer a rSm14 e quanto à sua aditividade. O experimento realizado para a determinação do índice de aditividade é utilizado para verificar se a ligação de um MAb interfere na ligação de outro MAb, ou seja para verificar se eles reconhecem os mesmos epítopos ou não. Se o índice encontrado for maior do que 50% pode-se considerar que os dois anticorpos testados reagem em regiões diferentes do mesmo antígeno (FRIGUET et al., 1983). O cálculo do índice de aditividade sugere que todos MAbs reagem no mesmo epítipo ou em regiões próximas, de forma que a ligação de um MAb causa um impedimento espacial para a ligação do outro anticorpo.

É válido ressaltar que o modelo animal freqüentemente utilizado na avaliação de resposta imune é o camundongo isogênico BALB/c (RICCI, et al., 2000; DE HAAN, et al., 2001; ABREU et al., 2004). Considerando-se que os animais utilizados para a avaliação da resposta imune do presente trabalho foram *outbred* e que foi utilizado o *pool* dos soros, é pertinente supor que estes fatos podem ter influenciado nos valores obtidos na resposta imune, uma vez que se um destes animais tiver uma produção muito baixa ou muito elevada de anticorpos, pode influenciar no valor real do nível de anticorpos mensurado. No entanto, sabe-se que o nível de anticorpos desencadeados por uma vacina nem sempre está correlacionado com a proteção conferida por ela (KHAN et al., 1994; ABREU et al., 2004).

Levando-se em consideração os resultado obtidos no grupo controle negativo Al(OH)<sub>3</sub>, em que conferiu praticamente a mesma proteção obtida do grupo rSm14+ Al(OH)<sub>3</sub> (44,7% e 54,0%, respectivamente), é importante ressaltar a importância de repetir este experimento. Além disso, cabe ressaltar mais uma vez que a avaliação da proteção realizada para as vacinas neste trabalho teve como grupo controle negativo

aquele imunizado com rLTB. O experimento de desafio está sendo repetido, com uma única alteração, a inclusão de um grupo de camundongos suíços inoculados apenas com PBS. Além disso, um experimento para avaliar a resposta imune celular e humoral da rLTB/Sm14 em camundongos BALB/c está sendo elaborado, bem como futuros testes de desafio com *F. hepatica*.

## 6 CONCLUSÕES

- A construção de uma quimera através da fusão gênica entre a região C-terminal da subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) e a N-terminal da proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* foi efetuada com sucesso;
- A fusão rLTB/Sm14 apresentou-se estável e apesar de ter sido expressa como corpos de inclusão insolúvel, seu *refolding* pareceu satisfatório, visto que a quimera manteve as características individuais das proteínas fusionadas;
- A proteína rLTB/Sm14 mostrou-se antigênica e imunogênica;
- A vacina rLTB/Sm14 aplicada via subcutânea não melhorou a resposta imune ou a proteção de camundongos desafiados com *S. mansoni*;
- Foram obtidos 6 MAbs que reagem especificamente com rSm14 no mesmo epítipo ou com epítipos situados em regiões próximas na molécula do antígeno.

## 7 REFERÊNCIAS

ABREU, P. A. E.; MIYASATO, P. A.; VILAR, M.; DIAS, W. O.; HO, P. L.; TENDLER, M.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Sm14 of *Schistosoma mansoni* in fusion with tetanus toxin fragment C induces immunoprotection against tetanus and Schistosomiasis in mice. **Infection and immunity**, v. 72, n. 10, p. 5931–5937, 2004.

AL-SHERBINY, M.; OSMAN, A.; BARAKAT, R.; MORSHEDY, H. E.; BERGQUIST, R.; OLDS, R. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Tropica**, v. 88, p.117–130, 2003.

ALMEIDA, M. S.; TORLONI, H.; LEE-HO, P.; VILAR, M. M.; THAUMATURGO, N.; SIMPSON, A. J.; TENDLER, M. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 3, p.135-137, 2003.

BANASZAK, L.; WINTER, N.; XU, Z.;BERNLOHR, D. A.;COWAN, S.; JONES, T. A. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. **Adv Protein Chemistry**, v. 45, p. 89-151, 1994.

BERGQUIST, N.R. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option. **Parasitology Today**, v. 11, p. 191–194, 1995.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to con-trol. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 309–314, 2002.

BERGQUIST, N. R.; LEONARDO, L. R.; MITCHELL, G. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 112-117, 2005.

BERRY, J.D. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 193 – 211, 2005.

BONE, H.; ECKHOLDT, S.; WILLIAMS, N.A. Modulation of B lymphocyte signalling by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **International Immunology**, v.14, p. 647–658, 2002.

BRITO, C. F. A; CALDAS, I. R.; COURA FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S. C. CD4<sup>+</sup>T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-g and tumour necrosis factor-a in response to the recombinant 14kda *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scand Journal Immunology**, v. 51, p. 595-601, 2000.

- BRITO, C. F.; OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, S. C.; STREET, M.; RIENGROJPITAK, S.; WILSON, R. A.; SIMPSON, A. J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 35, p. 377-81, 2002.
- BROUWERS, J. F.; SMEENK, I. M.; VAN GOLDE, L. M.; TIELENS, A. G. The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.88, p. 175-185, 1997.
- CAMPBELL, A.M.; **Monoclonal and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- CAPRON, A.; RIVEAU, G. J.; BARTLEY, P. B.; MCMANUS, D.P. Prospects for a schistosome vaccine. **Drug Targets Immune Endocrine Metabolism**, v. 2, p. 281–290, 2002.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.
- CHITSULO, L.; LOVERDE, P.; ENGLES, D. Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiology*, v. 2, p. 12–13, 2004.
- CINERMAN, B.; CINERMAN, S. **Parasitologia humana**. 2 ed., São Paulo: Atheneu, 2002.
- COMOY, E. E.; CAPRON, A.; THYPHRONITIS, G. Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST. **Scand Journal Immunology**, v. 4, p. 444–452, 1998.
- CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 5734–5743, 2006.
- COSME, A.; OJEDA, E.; CILLA, G.; TORRADO, J.; ALZATE, L.; BERISTAIN, X.; ORIVE, V.; ARENAS, J. *Fasciola hepatica*: study of a series of 37 patients. **Gastroenterology Hepatology**, v. 24, n. 8, p. 375-380, 2001.
- DALE, J. B.; CHIANG, E. C. Intranasal immunization with recombinant group a streptococcal M protein fragment fused to the B subunit of *Escherichia coli* labile toxin protects mice against systemic challenge infections. **Journal Infection Diseases**, v. 171, p. 1038-1041, 1995.

DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; FEIL, I.K.; HOLTROP, M.; HOL, W.G.J.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. **Immunology**, v. 94, p. 424-430, 1998.

DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; HOLTROP, M.; BRANDS, R.; SCHARRENBURG, G. J. M.; PALACHE, A. M.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. **Vaccine**, v. 19, p. 2898–2907, 2001.

DE HAAN, L.; HEARN, A.R.; RIVETT, A.J.; HIRST, T.R. Enhanced delivery of exogenous peptides into the Class I antigen processing and presentation pathway. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3249–58, 2002.

DEMEURE, C. E.; RIHET, P.; ABEL, L.; OUATTARA, M.; BOURGOIS, A.; DESSEIN, A. J. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. **Journal Infection Disease**, v. 168, p.1000–1008, 1993.

DZIERZBICKA, K.; KOLODZIEJCZYK, A. M. Adjuvants essential components of new generation vaccines. **Postepy Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 204-211, 2006.

EL-ANSARY, A. Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. B, n. 136, p. 227-243, 2003.

EL RIDI, R.; MAHROUS, A.; AFIFI, A.; MONTASH, M.; VELEK, J.; JEZEK, J. Human and murine humoral immune recognition of multiple peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-P dehydrogenase is associated with resistance to schistosomiasis. **Scand Journal Immunology**, v. 54, p. 477–482, 2001.

ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSSELS, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 54, p. 319-24, 1996.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; MEIR, R.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. **Vaccine**, v. 23, n. 38, p. 4685–4696, 2005.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination **Veterinarian Immunology Immunopathology**, v. 112, p. 253–263, 2006.

FONSECA, C. T.; BRITO, C. F.; ALVES, J. B.; OLIVEIRA, S. C. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. **Vaccine**, v. 22, p. 503-510, 2004.

- FONSECA, C. T.; PACIFICO, L. G. G.; BARSANTE, M. M.; RASSI, T.; CASSALI, G. D.; OLIVEIRA, S. C. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. **Microbes and Infection**, p. 1-8, 2006.
- FRIGUET, B.; DJAVADI-OHANIAN, L.; PAGES, J.; BUSSARD, A.; GOLDBERG, M. E. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the  $\alpha$ -subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. **Journal of Immunological Methods**, v. 60, p. 351-358, 1983.
- GREEN, E.A.; BOTTING, C.; WEBB, H.M.; HIRST, T.R.; RANDALL, R.E. Construction, purification and immunogenicity of antigen-antibody-LTB complexes **Vaccine**, vol. 14, n. 10, p. 949-958, 1996.
- GÜEREÑA-BURGUEÑO, F.; HALL, E.R.; TAYLOR, D.N.; CASSELS, F.J.; SCOTT, D.A.; WOLF, M.K.; ROBERTS, Z.Y.J.; NESTEROVA, G. V.; ALVING, C. R.; GLENN, G.M. Safety and Immunogenicity of a Prototype Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Administered Transcutaneously. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, P. 1874–1880, 2002.
- HAGIWAR, Y.; TSUJI, T.; IWASAKI, T.; KADOWAKI, S.; ASANUMA, H.; CHEN, Z.; KOMASE, K.; SUZUKI, Y.; AIZAWA, C.; KURATA, T.; TAMURA, S. Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. **Vaccine**, v. 19, p. 2071–2079, 2001.
- HARDING, C.V. Class II antigen processing: analysis of compartments and functions. **Crit Review Immunology**, v. 16, p.13–29, 1996.
- HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, 1988.
- HASHIGUCCI, K.; OGAWA, H.; ISHIDATE, T.; YAMASHITA, R.; KAMIYAT, H.; WATANABE, K.; HATTORI, N.; SATO, T.; SUZUKI, Y.; NAGAMINE, T.; AIZAWA, C.; TAMURAG, S.; KURATA, T.; OYA, A. Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. **Vaccine**, v. 14, n. 2, p. 113-119, 1996.
- HILLYER, G. V.; GARCIA ROSA, M. I.; ALICEA, H.; HERNANDEZ, A. Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12kDa *Fasciola hepatica* cross-reactive antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, p. 103-110, 1988.
- HILLYER, G.V. Comparison of purified 12kDa and recombinant 15kDa *Fasciola hepatica* and antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90 (2): 249-253, 1995.

HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein-production in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 456-463, 1994.

JESUS, A. R.; ARAÚJO, I.; BACELLAR, O.; MAGALHÃES, A.; PEARCE, E.; HARN, D.; STRAND, M.; CARVALHO, E. M. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infection and immunity**, vol. 68, n. 5, p. 2797–2803, 2000.

JOUGLARD, S. D., MEDEIROS, M. A., VAZ, E. K., BASTOS, R. G., DA CUNHA, C. W., ARMOA, G. R. G., AND DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-Rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, H 71, 234, 2002.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. 1972. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 397-400, 1972

KHAN, C. M. A.; VILLAREAL-RAMOS, B.; PIERCE, R. J.; RIVEAU, G.; DE HORMAECHE, R.; MCNEILL, H.; ALI, T.; FAIRWEATHER, N.; CHATFIELD, S.; CAPRON, A.; DOUGAN, G.; HORMAECHE, C. E. Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. **Proc Natl Acad Science USA**, v. 91, p. 11261–11265, 1994.

KING, C. H.; MAGAK, P.; SALAM, E. A.; OUMA, J. H.; KARIUKI, H. C.; BLANTON, R. E. Measuring morbidity in schistosomiasis mansoni: relationship between image pattern, portal vein diameter and portal branch thickness in large-scale surveys using new WHO coding guidelines for ultrasound in schistosomiasis. **Tropical Medicine International Health**, v. 8, p.109-117, 2003.

KOHLER, G. MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, p. 256: 495. 1975.

KOTLOFF, K.L.; SZTEIN, M.B.; WASSERMAN, S.S.; LOSONSKY, G.A.; DILORENZO, S.C.; WALKER, R.I. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. **Infection and Immunity**, v. 69, p.3581–3590, 2001.

LIANG, Y-S. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Southeast Asia Journal Tropical Medicine Public Health**, v. 34, p. 70-76, 2003.

MCARTHUR, J.; SCHULZE, K.; CHIN, J.; CURRIE, B. J.; SRIPRAKASH, K. S.; TALAY, S. R.; CHHATWAL, G. S.; GUZMAN, C. A.; WALKER, M. J. Immune responses of a liposome/ISCOM vaccine adjuvant against streptococcal fibronectin binding protein 1 (Sfb1) in mice. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 115-120, 2004.

MCCONVILLE, M.; BRENNAN, G. P.; MCCOY, M.; CASTILLO, R.; HERNANDEZ-CAMPOS, A.; IBARRA, F.; FAIRWEATHER, I. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. **Parasitology**, v. 2, p.1-14, 2006.

MEEUSEN, E. N. T.; MADDOX, J. F. Progress and expectation for helminth vaccines. **Adv Veterinarian Medicine**, v. 41, p. 241-256, 1999.

MEYER, F.; MEYER, H.; BUEDING, E. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flat-worms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 210, p. 257-266, 1970.

MILLAR, D. G.; HIRST, T. R.; SNIDER, D. P. *Escherichia coli* heat labile entero-toxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 3476–3482, 2001.

MONTENEGRO, S.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F.; TEIXEIRA, K.; COUTINHO, E. M.; BRINKMAN, J.; GONÇALVES, I.; DOMINGUES, L. A.; DOMINGUES, A. L.; SHER, A.; WYNN, T. A. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-g and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mono-nuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **Journal Infectious Diseases**, v. 179, p. 1502-1514, 1999.

MOSER, D.; TENDLER, M.; GRIFFITHS, G.; KLINKERT, M. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. **Journal Biology Chemistry**, v. 266, n. 13, p. 8447 – 8454, 1991.

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nature Immunology**, v. 1, p. 199-205, 2000.

NASHAR, T. O.; BETTERIDGE, Z. E.; MITCHELL, R. N. Evidence for a role of ganglioside GM1 in antigen presentation: binding enhances presentation of *Escherichia coli* enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4(+) T cells. **International Immunology**, v. 13, p. 541–551, 2001.

OLIVEIRA, E. J.; KANAMURA, H. Y.; LIMA D. M. R. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 421-425, 2005.

O'NEILL, S. M.; BRADY, M. T.; CALLANAN, J. J.; MULCAHY, G.; JOYCE, P.; MILLS, K. H.; DALTON, J. P. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. **Parasite Immunology**, v. 22, p. 147–155, 2000.

PACHECO, L. G. C.; ZUCCONI, E.; MATI, V. L. T.; GARCIA, R. M.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S. C.; MELO, A. L.; AZEVEDO, V. Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 95, p. 132–142, 2005.

PEARCE, E. J.; SHER, A. Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. **Contribution of Microbiology and Immunology**, n. 8, p. 219-239, 1987.

PEARCE, E. J.; MCDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Review Immunology**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PERONA-WRIGHT, G.; JENKINS, S. J.; MACDONALD, A. S. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 711-721, 2006.

PERTINHEZ, T. A.; SFORÇA, M. L.; ALVES, A. C.; RAMOS, C. R. R.; HO, P. L.; TENDLER, M.; ZANCHIN, N. I. T.; SPISNI, A. Letter to the Editor:  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of the apo Sm14-M20(C62V) protein, a mutant of *Schistosoma mansoni* Sm14. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 29, p. 553–554, 2004.

PETROVSKA, L.; LOPES, L.; SIMMONS, C.P.; PIZZA, M.; DOUGAN, G.; CHAIN, B.M. Modulation of dendritic cell endocytosis and antigen processing pathways by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and mutant derivatives. **Vaccine**, v. 21, p.1445–1454, 2003.

PIACENZA, L.; ACOSTA, D.; BASMADJIAN, I.; DALTON, J. P.; CARMONA, C. Vaccination with cathepsin I proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1954-1961, 1999.

PITCOVSKI, J.; BAZAK, Z.; WASSERMAN, E.; ELIAS, O.; LEVY, A.; PERETZ, T.; FINGERUT, E.; FRANKENBURG, S. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. **Vaccine**, v. 24, p. 636-643, 2006.

PRUS, A. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. **Environment Health Perspective**, v. 110, p. 537–542, 2002.

RAMOS, C. R. R.; FIGUEREDO, R. C. R.; PERTINHEZ, T. A.; VILAR, M. M.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; TENDLER, M.; RAW, I.; SPISNI, A.; HO, P. L. Gene Structure and M20T Polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 Fatty Acid-binding Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.12745–12751, 2003.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, n.8, 2004.

RAYMUNDO, L. A.; FLORES, V. M.; TERASHIMA, A.; SAMALVIDES, F.; MIRANDA, E.; TANTALEAN, M.; ESPINOZA, J. R.; GOTUZZO, E. Hyperendemicity of human fasciolosis in the Mantaro Valley, Peru: factors for infection with *Fasciola hepatica*. **Review Gastroenterology Peru**, v. 24, n. 2, p.158-164, 2004.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

RICCI, S.; MEDAGLINI, D.; RUSH, C. M.; MARCELLO, A.; PEPOLONI, S.; MANGANELLI, R.; PALU, G.; POZZI, G. Immunogenicity of the b monomer of *Escherichia coli* heat-labile toxin expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 760–766, 2000.

RICHARDS, C. M.; AMON, A. T.; HIRST, T. R.; HILL, T. J.; WILLIAMS, N. A. Protective immunity to ocular herpes simplex virus type-1 infection in mice using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Journal of Virology**, v. 75, p. 1664–71, 2001.

ROCK, E. P.; REICH, K.; LYU, D. M.; HOVI, M.; HARDY, J.; SCHOOLNIK, J. K.; STOCKER, B. A. D.; STEVENS, V. Immunogenicity of a fusion protein linking the beta subunit carboxyl terminal peptide (CTP) of human chorionic gonadotropin to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB). **Vaccine**, vol. 14, n. 16, p. 1560-1568, 1996.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.; RODRÍGUEZ-MEDINA, J.R.; GARCÍA-BLANCO, M. A.; HILLYER, G. V. *Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Exp Parasitology**, v. 74, p. 400- 407, 1992.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**, cap. Estratégias de defesa durante a infecção- imunidade contra infecções parasitárias, p. 276-282, 2004.

SAMBROOK, J. & RUSSEL. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. In (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.

SHAKER, Z. A.; KADDAH, M. A.; HANALLAH, S.B.; ELKHODARY, M. I. Production of monoclonal antibodies against target schistosomal antigen secreted in the urine of *Schistosoma mansoni* infected patients. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1893-1901, 1998.

SILVA, A. J.; PIUVEZAM, M. R.; MOURA, H.; MADDISON, S.; PERALTA, J. M. Rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody reacting with a 15-kilodalton tegumental antigen of schistosoma mansoni for serodiagnosis of schistosomiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2315-2319, 1993.

SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. M.; WILLIAMS, N.A.; et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scand Journal Immunology**, v. 53, p.218–226, 2001a.

SIMMONS, C. P.; HUSSELL, T.; SPARER, T.; WALZL, G.; OPENSHAW, P.; DOUGAN, G. Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. **Journal Immunology**, v.166, p.1106-1113, 2001b.

SIXMA, T.; PRONK, S. E.; KALK, K. H. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. **Nature**, v. 7, p. 351–371, 1991.

SIXMA, T. K.; PRONK, S. E.; KALIK, K. H.; VAN ZANTEN, B. A. M.; BERAHUIS, A. M.; HOI, W. G. J. Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by x-ray crystallography. **Nature**, v. 355, p. 561-564,1992.

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiology Review**. v. 56, p. 622–647, 1992.

SPITHILL, T. W.; DALTON, J. P. Progress in development of liver fluke vaccines. **Parasitology Today**, v. 14, p. 224–228, 1998.

SPITHILL, T. W.; SMOOKER, P. M.; COPERMAN, D. B. In: *Fascioliasis* ed. Dalton, J. Oxford. **CAB International**, p. 465–525, 1999.

SUN, J-B; MIELCAREK, N.; LAKEW, M. Intranasal administration of a *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase-cholera toxoid conjugate vaccine evokes anti-parasitic and anti-pathological immunity in mice. **Journal Immunology**, v. 163, p.1045-52, 1999.

SUN, J. B.; STADECKER, M. J.; MIELCAREK, N.; LAKEW, M.; LI, B. L.; HERNANDEZ, H. J.; CZERKINSKY, C; HOLMGREN, J. Nasal Administration of *Schistosoma mansoni* Egg Antigen-Cholera B Subunit Conjugate Suppresses Hepatic Granuloma Formation and Reduces Mortality in *S. mansoni*-Infected Mice. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 54, p. 440- 447, 2001.

TENDLER, M.; VILAR, M. M.; BRITO, C. A.; FREIRE, N. M. S.; KATZ, N.; SIMPSON, A. J. G. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multivalent anti-helminth vaccine? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 255–256, 1995.

TENDLER, M.; BRITTO, C.; SILVA, J. F.; SAVINO, W.; GARRATT, R.; KATZ, N.; SIMPSON, A. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 269-273, 1996.

TLIBA, O.; SIBILLE, P.; BOULARD, C.; CHAUVIN, A. Local hepatic immune response in rats during primary infection with *Fasciola hepatica*. **Parasite**, v. 7, p. 9–18, 2000.

VALLI, L. C. P.; KANAMURA, H. Y.; SILVA, R. M.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; DIETZE, R.; Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 302–307, 1999.

VAN DER WERF, M.; VLAS, S. J.; BROKER, S.; LOOMAN, C. W. N.; NAGELKERKE, N. J. D.; HABBEMA, J. D. F.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, v. 86, p. 125 – 139, 2003.

VAN GOOL, T.; VETTER, H.; VERVOORT, T.; DOENHOFF, M. J.; WETSTEYN, J.; OVERBOSCH, D. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *s. mansoni* egg antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3432–3437, 2002.

VAN HELLEMOND, J. J.; RETRA, K.; BROUWERS, J. F. H. M.; VAN BALKOM, B. W. M.; YAZDANBAKHS, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. M. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 691–699, 2006.

VARALDO, P. B.; LEITE, L. C.; DIAS, W. O.; MIYAJI, E. N.; TORRES, F. I. G.; GEBARA, V. C.; ARMÔA, G. R. G; CAMPOS, A. S.; MATOS, D. C. S; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VILAR, M. M; MCFADDEN, J; ALMEIDA, M. S.; TENDLER, M.; MCINTOSH, D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3336–3343, 2004.

VERWEIJ, W. R.; DE HAAN, L.; HOLTROP, M.; AGSTERIBBE, E.; BRANDS, R.; VAN SCHARRENBURG, G. J. M.; WILSCHUT, J. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 2069-2076, 1998.

VILAR, M. M.; BARRIENTOS, F.; ALMEIDA, M.; THAUMATURGO, N.; SIMPSON, A.; GARRATI, R.; TENDLER, M. An experimental bivalente peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. **Vaccine**, v. 22, p. 137-144, 2003.

WELTZIN, R.; GUY, B.; THOMAS, W. D.; GIANNASCA, P. J.; MONATH, T. P. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. **Infection and Immunity**, n. 68, p., 2775-2782, 2000.

WILLIAMS, N.A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **International Journal Medical Microbiology**, v. 290, p. 447–453, 2000.

WHO, TDR Progress. World Health Organization Tropical Diseases Research. New and Improved Tools – **New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. 2000. Disponível em:  
<<http://www.who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistosomiasis.htm>>  
Acesso em: 10 nov 2006.

WHO, TDR Strategic direction for research. Disease burden and epidemiological trends. 2002a. Disponível em:  
<<http://www.who.int/dtr/diseases/schisto/direction.htm>>. Acesso em: 10 nov 2006.

YAMAMOTO, S.; TAKEDA, Y.; YAMAMOTO, M.; KURAZONO, H.; IMAOKA, K.; YAMAMOTO, M.; FUJIHASHI, K.; NODA, M.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R. Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrheagenicity but retain adjuvant activity. **Journal Experimental Medical**, v. 185, p. 1203–1210, 1997.