

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

Efeito de adjuvantes na eficácia de vacinas em modelos de infecção e/ou co-infecção com esquistossomose e malária

Vanusa Pousada da Hora

Pelotas, 2010

VANUSA POUSADA DA HORA

**EFEITO DE ADJUVANTES NA EFICÁCIA DE VACINAS EM
MODELOS DE INFECÇÃO E/OU CO-INFECÇÃO COM ESQUISTOSSOMOSE E
MALÁRIA**

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

Orientador: Dr. Odir Antônio Dellagostin

Co-orientadores: Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Dra. Denise Doolan

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

H811e

Hora, Vanusa Pousada da

Efeito de adjuvantes na eficácia de vacinas em modelos de infecção e/ou co-infecção com esquistossomose e malária / Vanusa Pousada da Hora. – 154f. : il. color. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, 2010. – Orientador Odir Antônio Dellagostin ; co-orientador Fabricio Rochedo Conceição e Denise Doolan.

1.Biotecnologia. 2.Vacinas. 3.Adjuvantes. 4.*Schistosoma mansoni*. 5.*Plasmodium chabaudi*. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Conceição, Fabrício Rochedo. III.Doolan, Denise. IV.Título.

CDD: 616.963

Banca examinadora:

Profa Dra. Ana Maria Barral de Martínez

Prof Dr. Alan John Alexander McBride

Prof Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Dedicatória

*Aos meus pais e irmão,
pelo apoio incondicional e dedicação em prol
da minha formação profissional.*

Ao Alex, por todo companherismo.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia desta Universidade, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao meu orientador Odir Antônio Dellagostin, pela orientação, apoio, confiança, paciência, amizade e oportunidade de crescimento pessoal e profissional que me proporcionou.

Aos co-orientadores Fabricio R. Conceição e Denise L. Doolan, por terem sido de suma importância no desenvolvimento desta tese através de orientação, incentivo e amizade.

A minha família, por ser minha base e fonte inesgotável de incentivo e amor.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pelas experiências compartilhadas, pelo apoio e carinho constantes durante todo o doutorado. A Clarice, por ter colaborado na execução deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Vacinologia Molecular do Queensland Institute of Medical Research da Austrália, pelo suporte e amizade. A Dra. Fernanda Cardoso, pela colaboração na execução do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada, pelo auxílio 'imunológico', bom convívio e carinho.

A todos colegas do Programa de Pós-Graduação, aos professores e funcionários do Centro de Biotecnologia pelo convívio harmonioso e apoio.

Aos amigos e colegas da FURG, pelo incentivo e carinho.

A CAPES, pela bolsa concedida no país e no exterior.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A Deus a quem peço forças para fazer sempre o meu melhor e para que as dificuldades do caminho reforcem meu ânimo. Agradeço também por ter me abençoado com pessoas tão especiais em todas as etapas da minha caminhada.

Muito Obrigada!!!

Resumo

DA HORA, Vanusa Pousada. **Efeito de adjuvantes na eficácia de vacinas em modelos de infecção e/ou co-infecção com esquistossomose e malária.** 2010. 154 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Malária e esquistossomose são as principais doenças parasitárias humanas nos países em desenvolvimento e a sua coexistência é frequentemente observada em regiões tropicais desses países. A co-infecção por estes dois parasitas pode ter uma importante influência na regulação dos fatores inflamatórios associados ao desenvolvimento destas infecções e suas respectivas morbidades. Não há uma vacina segura e eficaz disponível para o controle dessas doenças. As proteínas Sm29 e Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a proteína AMA-1 de *Plasmodium* spp. são promissores candidatos à vacinas contra esquistossomose e malária, respectivamente. Para qualquer vacina de subunidade, a seleção do adjuvante é importante. Os derivados não-tóxicos da toxina termolábil de *Escherichia coli* LTB e LTK63 têm sido relatados como potentes adjuvantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia vacinal dos antígenos Sm29, Sm14 e AMA-1 formulados com LTB ou LTK63 recombinantes em modelos de infecção e co-infecção com *S. mansoni* e *P. chabaudi* cepa AS (camundongos não infectados, pré-infectados com *S. mansoni* ou *P. chabaudi* e curados ou co-infectados com ambos e curados). Em geral, rLTK63 induziu níveis mais altos de anticorpos antígeno específicos (IgG1, IgG2a e IgG total) e citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-13) para rSm29 e rAMA-1 do que a rLTB. Camundongos co-infectados, curados e imunizados com rLTK63+rSm29 apresentaram redução na carga parasitária de 46.45 % em modelo de esquistossomose. Camundongos não infectados ou co-infectados, curados e imunizados com rLTK63+rAMA-1 tiveram redução na parasitemia de *P. chabaudi*. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a co-infecção mostrou uma tendência positiva na eficácia da vacinas rSm29 e rAMA-1 quando formuladas com rLTK63. O antígeno rSm14 foi fusionado ou co-administrado com LTB e posteriormente foi avaliada a melhor via de administração e proteção induzida. A rSm14 foi mais efetiva quando fusionada à LTB e administrada por via subcutânea. Apesar da rLTB-Sm14 ter

induzido uma razão equilibrada de IgG1/IgG2a e altos níveis de IgA e IgG totais, rLTB-Sm14 não protegeu camundongos contra infecção por *S. mansoni*.

Palavras-chave: Vacina, adjuvantes, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium chabaudi*.

Abstract

DA HORA, Vanusa Pousada. **The effect of adjuvants on vaccine efficacy in infection and co-infection models with schistosomiasis and malaria.** 2010. 154 f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Malaria and schistosomiasis are the major human parasitic diseases in developing countries and their coexistence is frequently observed in tropical regions of these countries. Co-infection by these two parasites may have an important influence on the regulation of inflammatory factors associated with the development of these infections and their respective morbidity. There is no safe and effective vaccine available to control these diseases. The *Schistosoma mansoni* proteins Sm29 and Sm14 and the *Plasmodium* spp. antigen AMA-1 are promising vaccine candidates against schistosoma and malaria infections, respectively. For a subunit vaccine, selection of the adjuvant is important. The non-toxic derivatives of the heat-labile toxin of *Escherichia coli* LTB and LTK63 have been reported as powerful adjuvants. The objective of this study was to evaluate the vaccine efficacy of recombinant Sm29, Sm14 and AMA-1 antigens formulated with LTB or LTK63, in infection and co-infection models with *S. mansoni* and *P. chabaudi* strain AS (prior to immunizations, naïve mice, pre-infected with *S. mansoni* and cured or *P. chabaudi* AS or infected with both and cured). Overall, rLTK63 stimulated high levels of antigen specific antibodies (IgG1, IgG2a and total IgG) and cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-13) to rSm29 and rAMA-1 than rLTB. Co-infected-cured mice immunized with rLTK63+rSm29 reduced the parasitic load by 46.45% in the schistosomiasis model. Naïve or co-infected-cured mice immunized with rLTK63+rAMA-1 had a reduction in the *P. chabaudi* parasitemia. Taken together, these data suggest that co-infection showed a positive trend in vaccine efficacy of rSm29 and rAMA-1 when formulated with rLTK63. rSm14 antigen was fused or co-administered with LTB and the best administration route and protection induced was assessed. The rSm14 was more effective when fused to LTB and administered by subcutaneous route. Despite the fact that rLTB-Sm14 induced a balanced ratio of IgG1/IgG2a and high levels of IgA and total IgG, rLTB-Sm14 did not protect mice against *S. mansoni* infection.

Keywords: Vaccine, adjuvants, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium chabaudi*.

Lista de Símbolos e Abreviações

µg – micrograma

°C – graus Celsius

µL – microlitro

Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

AMA-1 – antígeno-1 da membrana apical do merozoíto

BSA – albumina sérica bovina

CT – toxina termolábel de *Vibrio cholerae*

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – 2' - desoxinucleotídeo 5' – trifosfatos

ELISA – *Enzyme-linked immunossorbent assay*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – força da gravidade

i.m. – intramuscular

IPTG – isopropil β-D-tiogalactosídeo

kDa – kilodalton

kHz – kilohertz

LT – toxina termolábel de *Escherichia coli*

LTB – subunidade B da LT

LTK63 – mutante de LT com substituição de uma serina por lisina na posição 63 do sítio ativo da subunidade A da LT

M – molar

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – dihidrogenofosfato de sódio

ng – nanograma

Ni⁺² – níquel

nm – nanômetro

OD – densidade óptica

PBS – tampão fosfato salino

PBS -T – tampão fosfato salino acrescido de 0,05% de Tween 20

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial de hidrogênio

r - recombinante

rpm – rotações por minuto

s.c. - subcutânea

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Sumário

EFEITO DE ADJUVANTES NA EFICÁCIA DE VACINAS EM MODELOS DE INFECÇÃO E/OU CO-INFECÇÃO COM ESQUISTOSSOMOSE E MALÁRIA.	1
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1 Distribuição, Biologia, Ciclo de vida e Patologia.....	12
1.1.1 Esquistossomose	12
1.1.2 Malária.....	15
1.2 Resposta Imune.....	17
1.2.1 Imunidade Durante a Infecção por <i>Schistosoma</i>	18
1.2.2 Imunidade Durante a Infecção por <i>Plasmodium</i>	20
1.3 Co-infecção: <i>Schistosoma</i> e <i>Plasmodium</i>	23
1.4 Desenvolvimento de Vacina.....	26
1.4.1 Sm29.....	27
1.4.2 Sm14.....	28
1.4.3 AMA-1.....	29
1.4.4 Influência da Co-infecção no Desenvolvimento de Vacinas.....	31
1.5 Derivados da Enterotoxina Termolábil de <i>Escherichia coli</i> como Potente Adjuvantes.....	32
2 HIPÓTESE.....	33
3 OBJETIVOS GERAIS.....	33
4 ARTIGO 1.....	34
NON-TOXIC DERIVATIVES OF LT AS POTENT ADJUVANTS.....	34
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUCTION.....	37
2 Heat-labile enterotoxin of <i>E. coli</i> (LT): Structure and activity.....	38
3 Immunomodulating properties of LT.....	40
4 Immunological and adjuvant activity of non-toxic derivatives of LT.....	41
4.1 The B subunit of the heat-labile toxin of <i>Escherichia coli</i> (LTB).....	41

4.2 The LTK63, a synthetic non-toxic mutant of LT.....	45
5 Production of recombinant LTB and LTK63.....	48
6 CONCLUSIONS.....	48
ACKNOWLEDGEMENTS.....	49
REFERENCES.....	50
5 ARTIGO 2.....	64
THE EFFECT OF LTK63 AND LTB ADJUVANTS ON VACCINE	
RECOMBINANT EFFICACY IN INFECTION AND CO-INFECTION MODELS	
WITH <i>Schistosoma mansoni</i> AND <i>Plasmodium chabaudi</i>.....	64
ABSTRACT.....	66
1 INTRODUCTION.....	67
2 MATERIALS AND METHODS	69
3 RESULTS.....	77
4 DISCUSSION.....	83
ACKNOWLEDGEMENTS.....	89
REFERENCES.....	90
6 ARTIGO 3.....	111
SUBUNIDADE B DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE <i>Escherichia coli</i>	
POTENCIALIZA A RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELO ANTÍGENO	
VACINAL rSM14 MAS NÃO CONFERE PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS..	111
ABSTRACT.....	113
1 INTRODUÇÃO.....	115
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	116
3 RESULTADOS.....	123
4 DISCUSSÃO.....	126
REFERÊNCIAS.....	129
7 CONCLUSÕES.....	141
8 REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL.....	142

1 INTRODUÇÃO GERAL

A malária é a doença parasitária humana mais importante em termos de letalidade e prevalência. A esquistossomose é a infecção helmíntica humana mais relevante em termos de morbidade (CHITSULO et al., 2000; GARCIA, 2010). Infecções parasitárias concomitantes são eventos comuns em diferentes regiões endêmicas do mundo. Malária e esquistossomose são as principais doenças parasitárias humanas nos países em desenvolvimento e a sua coexistência é frequentemente observada em regiões tropicais desses países. Embora essa co-infecção seja frequente, a maior parte dos estudos aborda as doenças de forma individualizada. A co-infecção por estes dois parasitas pode ter uma importante influência na regulação dos fatores inflamatórios associados ao desenvolvimento destas infecções e suas respectivas morbidades (DIALLO et al., 2004; BROOKER et al., 2007). Apesar de estudos sobre as consequências da co-infecção terem sido realizados, o conhecimento de como este fenômeno afeta a resposta imune uma da outra ainda é limitado. Tal conhecimento é fundamental para o desenvolvimento racional e otimização de protocolos de vacina, uma vez que a co-infecção pode influenciar a eficiência de vacinas para malária ou esquistossomose (DIALLO et al., 2004; BROOKER et al., 2007; HARTGERS et al., 2009; MUOK et al., 2009; WILSON et al., 2009; 2010; WAKNINE-GRINBERG et al., 2010).

1.1 Distribuição, Biologia, Ciclo de vida e Patologia

1.1.1 Esquistossomose

A esquistossomose, doença endêmica crônica causada pelo platelminto trematódeo *Schistosoma* spp., é depois da malária a doença parasitária humana mais grave em termos de morbidade e mortalidade (KING; DICKMAN; TISCH, 2005). Estima-se que mais de 200 milhões de adultos e crianças estejam infectadas em todo mundo e que mais de 600 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco em 74 países de regiões tropicais (CHITSULO et al., 2000). No Brasil, a esquistossomose é considerada como uma importante endemia parasitária, tendo sido estimado em 10 milhões o

número de portadores dessa helmintose (COURA; AMARAL, 2004). Dentre as cinco espécies causadoras da esquistossomose humana, *Schistosoma mansoni* é o principal agente etiológico, estando associado à esquistossomose hepática e intestinal na África, na Península Arábica e na América do Sul (GRYSEELS et al., 2006). A transmissão da esquistossomose decorre de práticas agrícolas e manipulação dos recursos hídricos. Mudanças ambientais ligadas ao desenvolvimento dos recursos hídricos, o crescimento populacional, migração e doença têm facilitado a recente propagação da esquistossomose em áreas onde ela não é endêmica (GRYSEELS et al., 2006; LI et al., 2007).

O ciclo de vida das três principais espécies do *Schistosoma* está representado na Fig.1. Diferentemente de outros trematódeos, *Schistosoma* possui sexo separados com adultos possuindo corpo cilíndrico, duas ventosas terminais, tegumento complexo, trato digestivo cego e órgãos reprodutivos. O corpo do macho forma um sulco, ou canal ginecóforo, no qual abriga a fêmea de corpo longo e fino. O *S. mansoni* possui um ciclo de vida complexo, tendo como hospedeiro intermediário um caramujo de água doce do gênero *Biomphalaria* e como definitivo o homem. Através das fezes do homem infectado são eliminados os ovos do *S. mansoni*, os quais em contato com a água eclodem liberando o miracídio, embrião que nada 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 com cauda bifurcada nadantes, chamadas de cercárias, são liberadas na água. Ao encontrar o homem, as cercárias penetram ativamente na pele e mucosa, através de enzimas proteolíticas presentes na ventosa ventral (CURWEN; WILSON, 2003). Após a penetração, as cercárias perdem a cauda bifurcada 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, cerca de 45 dias após a infecção. A ovoposição perdura durante toda a vida

do parasita, que pode ser de até 15 anos. Os ovos (com o miracídio formado) atravessam à 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.

A principal morbidade crônica da esquistossomose mansônica não está associada com o verme adulto, mas com a resposta imune célula-T-dependente do hospedeiro contra os ovos do parasita que são levados pelo fluxo sanguíneo e se prendem principalmente aos capilares sinusóides do fígado. Neste ambiente, secretam proteínas que induzem a formação do granuloma (GRYSEELS et al., 2006). Reações inflamatórias granulomatosa e fibrosa contra os ovos caracterizam-se como a imunopatologia mais importante (PEARCE, 2005; WILSON M. et al., 2007). A maioria dos indivíduos infectados por *S. mansoni* desenvolve uma doença crônica relativamente tolerável, denominada esquistossomose intestinal. Entretanto, 5 a 10% dos indivíduos sofrem de uma forma severa, denominada esquistossomose hepatoesplênica, onde o paciente desenvolve fibrose hepática, hipertensão portal, ascite, hemorragia gastrointestinal, podendo conduzir a morte (BICA; HAMER; STADECKER, 2000).

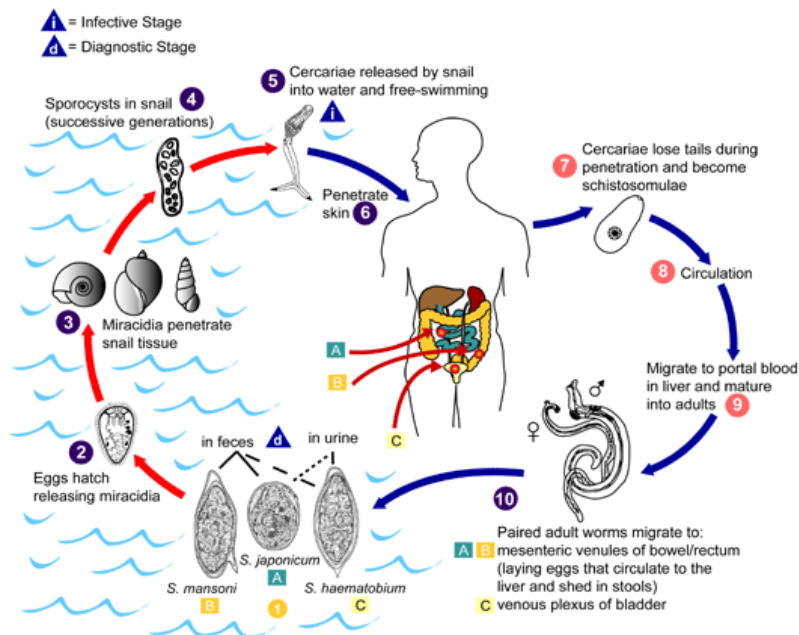


Figura 1. Ciclo de vida do *S. mansoni*, *S. japonicum*, e do *S. haematobium*. (<http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Schistosomiasis.htm>).

1.1.2 Malária

A malária é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo considerada a doença parasitária com maior relevância em termos de mortalidade e morbidade. Endêmica em 106 países, a malária é responsável por aproximadamente 780 mil mortes no mundo e por um número estimado de 250 milhões de novos casos de infecção por ano. A maioria dos casos é de crianças africanas, onde a cada 30 segundos uma a cada cinco crianças morre devido aos efeitos da malária (WHO, 2009). Além dos danos diretos causados pela mortalidade e morbidade, a malária causa uma severa diminuição do desenvolvimento sócio-econômico das regiões por ela afetadas (GALLUP; SACHS, 2001; BREMAN; ALILIO; MILLS, 2004; GUERRA; SNOW; HAY, 2006; WHO, 2009). As principais espécies de plasmódios que infectam seres humanos são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. O maior impacto sobre a saúde humana em termos de mortalidade é causado pelo *P. falciparum*, o qual tem uma distribuição pantropical. No entanto, *P. vivax* também constitui uma importante carga sobre a saúde pública em muitas regiões tropicais e em latitudes subtropicais ou temperadas (revisado por DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009). No Brasil, apesar do sucesso no controle da malária na década de 90 (BARAT, 2006), ela ainda é um grave problema de saúde pública, com cerca de 306 mil casos registrados em 2009 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). A ampla maioria dos casos (99,8%) é restrita à região da Bacia Amazônica, onde fatores combinados favorecem a transmissão da doença e prejudicam a utilização de procedimentos de controle padrão. No Brasil o *P. vivax* é responsável por 83,7% dos casos registrados, enquanto que o *P. falciparum* por 16,3% (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

O parasita *Plasmodium* possui um ciclo de vida complexo e com múltiplas fases, conforme ilustrado na Fig. 2. Esse ciclo ocorre em um hospedeiro vertebrado, o homem e em um hospedeiro invertebrado, um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. O homem é infectado quando é picado pelo mosquito infectado, o qual inocula saliva contendo esporozoítos do *Plasmodium*, os quais são introduzidos na corrente sanguínea do homem. Estima-se que cerca de 100 esporozoítos são transmitidos por picada (PONNUDURAI et al., 1991, VANDERBERG; FREVERT, 2004). Os esporozoítos

1 migram para o fígado invadindo os hepatócitos, sendo esta a fase hepática do ciclo.
2 Neste local, os esporozoítos passam por um processo de replicação assexuada,
3 denominado de esquizogonia. Esse processo resulta em uma forma multinucleada, o
4 esquizonte, o qual origina os merozoítos. O hepatócito se rompe liberando até 30.000
5 merozoítos na circulação, cada um dos quais pode rapidamente invadir um eritrócito.
6 No interior da hemácia o merozoíto realiza esquizogonia e evolui para trofozoíto. O
7 núcleo do trofozoíto começa a se dividir várias vezes, de forma assexuada, resultando
8 no esquizonte, o qual origina mais merozoítos. Após 48 h de reprodução assexuada,
9 um eritrócito único pode conter até 36 merozoítos (COWMAN; CRABB, 2006). O
10 esquizonte rompe-se liberando merozoítos na corrente sanguínea, os quais podem
11 infectar outras hemácias, resultando em um ciclo de crescimento exponencial do
12 parasita. A repetição do ciclo assexuado nas hemácias é denominada ciclo eritrocítico.
13 Nesse caso as esquizogonias se repetem com uma periodicidade que é específica de
14 cada espécie e se relaciona com o ritmo das crises febris. Os parasitas têm a tendência
15 de maturarem sincronicamente dentro do hospedeiro e assim que ocorre a ruptura dos
16 eritrócitos, simultaneamente, ocorre a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea.
17 Isto está associado com o ataque periódico de febres altas que é característica da
18 doença (BANNISTER; DLUZEWSKI, 1999; COWMAN; CRABB, 2006). Os merozoítos
19 liberados das hemácias, além de repetir o processo assexuado, podem diferenciar-se
20 em gametócitos masculinos ou femininos, que circulam de forma independente no
21 sangue periférico. Gametócitos do *P. falciparum* aparecem na circulação periférica cerca
22 de 7 a 15 dias após a invasão inicial de eritrócitos. Ainda não está claro quais os fatores
23 que estimulam a gametogênese. Os gametócitos que circulam no sangue podem ser
24 ingeridos por um mosquito anofelino durante a hematofagia, onde ocorre a reprodução
25 sexuada. A fecundação ocorre no tubo digestivo e a fusão dos gametócitos leva a
26 formação do oocisto, que penetra a parede intestinal do mosquito. Através de
27 esquizogonia o oocisto produz muitos esporozoítos. Após a ruptura do oocisto, os
28 esporozoítos migram ativamente para as glândulas salivares do mosquito, permitindo a
29 infecção de outro hospedeiro humano e assim dando continuidade à transmissão
30 (DRAKELEY et al., 2006).

A malária é uma infecção importante e difícil de tratar, caracterizada por ataques periódicos de calafrios e febre, anemia, esplenomegalia e complicações freqüentemente fatais. As complicações mais graves associadas com malária são causadas durante o desenvolvimento intra-eritrocitário do parasita, como resultado de múltiplas interações receptor-ligante de glóbulos vermelhos infectados com hemácias saudáveis e vasos capilares (citoaderência), que induz a agregação dessas células (TILLEY et al., 2007).

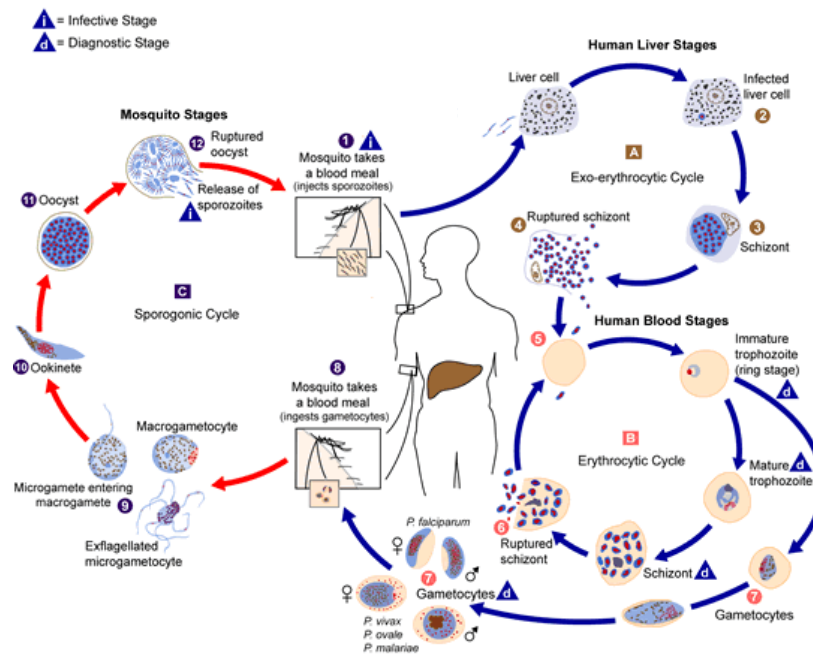


Figura 2. Ciclo de vida do *P. vivax*, *P. ovale* e do *P. malariae*. (<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>).

1.2 Resposta Imune

A infecção por *Schistosoma* ou *Plasmodium* representa um desafio para o sistema imune, uma vez que estes parasitos possuem diferentes estágios durante o ciclo de vida, migrando e habitando diferentes locais dentro do hospedeiro. O tipo da resposta imune determina o balanço entre a imunidade protetora e a patologia, a diferença entre saúde e morbidade. Uma das características mais notáveis da malária e da esquistossomose é que os parasitos persistem no hospedeiro humano, apesar de

suscitarem uma pronunciada resposta imune. Durante a infecção por estes parasitas o sistema imune é continuamente desafiado com o arranjo de moléculas associadas ao metabolismo e a reprodução desses patógenos. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que tais parasitas utilizam para escapar das defesas do hospedeiro e como o sistema imune tenta combater estas parasitoses (PEARCE; MACDONALD, 2002; EL-ANSARY, 2003; LANGHORNE et al., 2008; AUGUSTINE et al., 2009; DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009).

1.2.1 Imunidade Durante a Infecção por *Schistosoma*

Uma propriedade do *S. mansoni* é sua capacidade de sobreviver intravascularmente por muitos anos, mesmo sob a contínua resposta imune antiparasitária efetuada pelo hospedeiro. Esta habilidade para evadir do sistema imune parece ser devido às 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 estrutura de membrana dupla) 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. A aquisição pelo tegumento de produtos derivados do hospedeiro é fundamental para o parasita mascarar-se e desviar a resposta do sistema imune (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: (i) evitar o reconhecimento do antígeno (VAN DEN EIJNDEN et al., 1997; HOKKE; DEELDER, 2001; LOUKAS et al., 2001; EL-ANSARY, 2003; HOKKE; YAZDANBAKSHI, 2005); (ii) resistir aos mecanismos efetores (MKOJI et al., 1988; PLEASS et al., 2000; EL-ANSARY, 2003; ALGER; WILLIAMS, 2002; SAYED; WILLIAMS, 2004); e (iii) desviar a resposta imunológica (IMASE et al., 2003).

Os mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune do hospedeiro durante a esquistossomose têm sido caracterizados. Na infecção por *S. mansoni*, a produção e regulação de citocinas relacionadas com a resposta imune mediada por

1 linfócitos T CD4⁺ tipo 1 (Th1) e Th2 parece ser diferente, dependendo da fase da
2 esquistossomose humana. O *Schistosoma* parece suscitar uma resposta
3 significativamente associada a produção de IFN- γ (resposta Th1) durante a infecção
4 aguda e de IL-10 na crônica (resposta Th2) (MONTENEGRO et al., 1999). O balanço
5 entre a resposta Th1 e Th2 é o que determina o estado de proteção ou de doença. A
6 imunoproteção frente à infecção por *S. mansoni* ainda não está bem elucidada. Infecções
7 experimentais, principalmente com camundongos, têm contribuído significativamente
8 para o entendimento da imunobiologia da infecção. Grande parte da proteção contra
9 esquistossomose em modelo murino parece ter sido mediada por macrófagos ativados
10 e citocinas produzidas por células Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-5) (JANKOVIC et
11 al., 1999; HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005). Estudos realizados com
12 habitantes de áreas endêmicas para esquistossomose demonstram que existe uma
13 resistência para a re-infecção após o uso de drogas anti-esquistossomose
14 concomitante a anos de exposição, bem como ocorre também uma resistência natural
15 ao parasita (BRITO et al., 2000; MOUNTFORD, 2005; GRYSEELS, et al., 2006;). A
16 imunidade protetora contra a re-infecção em indivíduos previamente tratados com
17 drogas anti-esquistossomose como Praziquantel (PZQ) tem sido associada com uma
18 resposta Th2. Esta resposta parece estar relacionada com a produção de IgE e IgA
19 (CALDAS et al., 2000; WALTER, et al., 2006). Talvez o indício mais importante de todos
20 para a compreensão da imunidade protetora à esquistossomose é a imunidade
21 adquirida naturalmente exibida por algumas pessoas no Brasil, na ausência de
22 tratamento com PZQ (CORREA-OLIVEIRA; CALDAS; GAZZINELLI, 2000; VIANA et al.,
23 1994; 1995). Estes indivíduos são resistentes à infecção, apesar de anos de exposição
24 ao *S. mansoni*. Células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) desses pacientes
25 secretaram tanto citocinas do perfil Th1 (particularmente IFN- γ) quanto Th2 (CALDAS et
26 al., 2000). Embora as respostas imunológicas das coortes resistentes tenham sido
27 caracterizadas, ainda se sabe pouco sobre os mecanismos de proteção necessários
28 para o planejamento eficaz de vacinas recombinantes para a esquistossomose
29 humana. Dados contrastantes e conflitantes têm sido apresentados a partir de modelo
30 murino e de estudos de campo em humanos.

A resposta imune do hospedeiro contra os ovos do parasita aderidos no fígado e intestino está associada à patologia durante a infecção por *Schistosoma*. Em camundongos, a resposta imune Th1 predominante nos estágios iniciais da infecção é substituída para um perfil Th2 ovos-induzida, sendo que o desequilíbrio entre essas duas acarreta o desenvolvimento de lesões severas (PEARCE, 2005; TAYLOR et al., 2006). Na verdade, acredita-se que os antígenos de ovos são capazes de suprimir diretamente a resposta Th1, um fenômeno que pode ocorrer também em humanos (PEARCE et al., 1991; PEARCE; MCDONALD, 2002). Sabe-se que os ovos podem induzir uma resposta Th2 exacerbada em camundongos, a qual resulta em um aumento sérico de IL-5, eosinofilia e uma resposta granulomatosa caracterizada por deposição de colágeno e por fibrose hepática periportal severa (SWARTZ et al., 2006). Grande parte da morbidade e mortalidade associadas a esta doença é atribuída diretamente à deposição de tecido conectivo nos tecidos afetados (WILSON et al., 2007).

1.2.2 Imunidade Durante a Infecção por *Plasmodium*

A imunidade para malária é extremamente complexa. A habilidade do parasita evadir ou até inibir a resposta imune inata ou adaptativa confunde o entendimento sobre a imunidade para esta parasitose. Espécies de *Plasmodium* evadem da resposta imune inata através da produção de proteínas que inibem a atividade do complemento, do fator de transcrição NF κ - β e da expressão de citocinas, além de evadirem do inflamossoma do hospedeiro. Além disso, os plasmódios evadem da imunidade adaptativa pelo polimorfismo antigênico entre espécies ou cepas e por alterarem as características antigênicas dos eritrócitos infectados. Algumas evidências sugerem que eritrócitos infectados ou produtos do parasita podem alterar as funções das células apresentadoras de antígenos. Tal alteração provocada pelo *Plasmodium* pode levar à supressão das respostas imunes e, portanto, dificultar o desenvolvimento da imunidade (STEVENSON; URBAN, 2006). No entanto, estes processos não têm sido integralmente explorados e é provável que mecanismos de evasão adicionais existam (LANGHORNE et al., 2008; AUGUSTINE, 2009).

Apesar destes mecanismos de evasão, vários tipos de imunidade adaptativa contra o plasmódio foram identificados em humanos: (i) imunidade anti-doença,

1 conferindo proteção contra doença clínica, a qual afeta o risco e o grau de morbidade
2 associada a uma dada densidade de parasita; (ii) imunidade antiparasitária, fornecendo
3 proteção contra a parasitemia, o que afeta a densidade de parasitas; e (iii) premunicação,
4 promovendo proteção contra novas infecções por manter uma carga parasitária baixa e
5 um estado assintomático da doença. Em geral, considera-se a proteção como a
6 evidência de um risco menor de doença clínica, como indicado por ausência de febre
7 (na presença de parasitemia) e baixa carga parasitária (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD,
8 2009).

9 Sabe-se que existe uma imunidade naturalmente adquirida ao *Plasmodium*, mas
10 pouco se conhece sobre o modo como ela desenvolve-se (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD,
11 2009). O desenvolvimento da imunidade contra malária é marcado pela capacidade de
12 controle da doença e da densidade parasitária. A densidade parasitária está ligada à
13 doença, e a diminuição dos parasitas certamente contribui para o risco diminuído da
14 enfermidade. Após alguns episódios de malária, a susceptibilidade à doença grave é
15 menor, apesar de as pessoas infectadas continuarem a desenvolver uma forma “não
16 complicada” da doença, caracterizada por parasitemia, febre, calafrios e arrepios. Com
17 a exposição repetida as pessoas passam a ter poucos sinais clínicos e sintomas menos
18 severos, tornando-se resistentes a malária grave. No entanto, o *Plasmodium* não é
19 totalmente eliminado do hospedeiro e a parasitemia persiste, embora com uma baixa
20 carga parasitária. A imunidade resultante da exposição natural ao plasmódio leva anos
21 para se desenvolver e na ausência de re-exposição contínua ao parasita ela não
22 consegue sustentar-se. Em áreas holoendêmicas na África, um indivíduo só irá adquirir
23 imunidade clínica após expor-se ao parasita por um período de 10 a 15 anos e tendo
24 em média cinco infecções por ano. Neste contexto, a situação de imunidade contra
25 malária sugere uma imunidade mediada diretamente pela presença do parasita e não
26 como o resultado de uma infecção prévia (MARSH; SNOW, 1997; FRANKS et al., 2001;
27 AUGUSTINE, 2009; DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009).

28 Esforços têm sido realizados a fim de caracterizar a resposta imune do
29 hospedeiro ao *Plasmodium*, mas o conhecimento dos mecanismos imunológicos
30 envolvidos durante a malária é complexo e ainda incompleto (MARSH; KINYANJUI,
31 2006; LANGHORNE et al., 2008; AUGUSTINE et al., 2009). Estudos com humanos e

camundongos indicam que os linfócitos T (LT) CD4⁺ e CD8⁺ e os linfócitos B (LB) são necessários para o desenvolvimento de imunidade protetora (LANGHORNE et al., 1998; 2008; MARSH; KINYANJUI, 2006; HAFALLA; COCKBURN; ZAVALA, 2006;. STANISIC et al., 2009) assim como as células da imunidade inata (STEVENSON; RILEY, 2004; AUGUSTINE et al., 2009). As respostas imunes que se desenvolvem dependem da espécie do *Plasmodium* e do estágio da infecção. A imunidade celular parece ser de fundamental importância contra os parasitas no estágio hepático da infecção e a humoral, no eritrocítico. A imunidade mediada por células e a humoral podem agir conjuntamente ou em sequência para eliminar e controlar a infecção (HOLLINGDALE; KRZYCH, 2002; STANISIC et al., 2009). A resposta do hospedeiro à fase inicial da infecção é geralmente acompanhada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) 1- β , IL-6 e IL-12, fator de necrose tumoral (TNF) - α e interferon (IFN) - γ (GOOD et al., 2005). Além disso, metabólitos de nitrogênio e oxigênio reativos produzidos por macrófagos e neutrófilos também ajudam a controlar os primeiros ciclos de parasitemia (STEVENSON et al., 1992; STEVENSON; RILEY, 2004). Em uma fase posterior da infecção, após o pico de parasitemia, as células T CD4⁺ passam a expressar um perfil de citocinas T *helper* do tipo 2 (Th2). Essa mudança de perfil fornece sinais às células B para que elas produzam anticorpos (LANGHORNE et al., 1998). Os anticorpos parecem desempenhar um papel central na aquisição de imunidade à malária clínica (WEISS et al., 2010). Em humanos, as subclasses de imunoglobulinas que parecem estar envolvidos com a proteção são IgG1 e IgG3 (STANISIC et al., 2009).

É importante ressaltar que o desenvolvimento da patologia durante a infecção por malária está associado com o desequilíbrio das citocinas envolvidas na regulação das respostas inflamatórias (DAY et al, 1999; GOOD et al., 2005). Embora respostas pró-inflamatórias estejam associadas com a imunidade protetora à malária durante o início da infecção, a superprodução de TNF- α e IFN- γ predispõe o indivíduo a patologia grave da malária. Em geral o parasita desencadeia uma forte resposta Th1 durante o estágio eritrocítico (DAY et al, 1999;. PERKINS; WEINBERG; KREMSNER, 2000; MAITLAND; MARSH, 2004). Por outro lado, as respostas regulatórias, em geral mediadas por linfócitos T reguladores (Treg), que parecem suprimir respostas imunes e

assim permitir o crescimento do parasita, podem também contribuir para o controle da resposta inflamatória e prevenir o aparecimento da malária severa (HANSEN; SCHOFIELD, 2010). Nota-se que as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β parecem ter também um efeito protetor contra a patologia, como sugerido por PERKINS e colaboradores (2000).

1.3 Co-infecção: *Schistosoma* e *Plasmodium*

Infecções concomitantes são comuns na natureza e frequentemente envolvem parasitas. Durante uma infecção mista a carga parasitária de um ou de ambos agentes infecciosos pode ser aumentada ou diminuída e a resposta imune pode ser suprimida ou imunomodulada para um ou ambos (COX, 2001). Malária e esquistossomose dividem áreas de transmissão em comum em várias regiões tropicais, especialmente no continente africano. Nessas regiões, a associação de *Plasmodium* com *Schistosoma* e outros helmintos constitui um fator de confusão na avaliação da eficácia das intervenções de controle desses parasitas, incluindo a triagem clínica de vacinas (DRUILHE; TALL; SOKHNA, 2005). Como já foi mencionado, ambos parasitas possuem padrões de produção de citocinas específicos conforme os estágios de cada infecção, sendo que o balanço entre elas é fundamental, pois um desequilíbrio neste perfil pode determinar a patologia ou a proteção (LYKE et al., 2006). Por exemplo, na fase aguda da esquistossomose, a resposta imune dominante é do tipo Th1, o que pode fortalecer o combate da infecção por *Plasmodium*, mas por outro lado um aumento dela pode causar a malária severa. Entretanto, após a deposição dos ovos, a resposta imunológica nos indivíduos infectados com *Schistosoma* passa a ser Th2, o que pode interferir no desenvolvimento de uma resposta Th1 adequada, necessária para controlar a parasitemia e os ataques resultantes da malária (HARTGERS; YAZDANBAKHSH, 2006). Trabalhos experimentais demonstram que a co-infecção entre esses dois parasitos afeta profundamente um ao outro, seja no aspecto patológico como no imunológico (LYKE et al., 2006; MUOK et al., 2009; WILSON et al., 2009; WAKNINE-GRINBERG et al., 2010). Tais consequências da associação entre malária e esquistossomose têm sido estudadas em seres humanos e murinos.

Estudos em humanos demonstram que ocorre aumento da hepatoesplenomegalia durante a co-infecção por *P. falciparum* e *S. mansoni*, como demonstrado em estudos realizados em crianças no Quênia (WILSON et al., 2007; 2009; 2010). Tal patologia parece estar associada com uma diminuição da resposta de citocinas Th2 específica contra ovos do *S. mansoni*, um aumento de TNF- α (WILSON et al. 2008) e uma diminuição na porcentagem de células T ativadas e de células Treg de memória (MOUK et al.; 2009), sendo que esse perfil foi encontrado entre as crianças que eram co-infectadas com *P. falciparum* e não naquelas com esquistossomose apenas (WILSON et al. 2008; MOUK et al.; 2009). Por outro lado, o ambiente Th2 enriquecido pela infecção crônica por *S. haematobium* favoreceu a proteção de crianças em Mali contra o desenvolvimento da forma grave da malária (LYKE et al., 2005; 2006). Recentemente um estudo sugere que a co-infecção por *S. haematobium* favorece a produção de anticorpos protetores anti-malária, o que parece estar associado com a regulação de IL-10 e IFN- γ (DIALLO et al., 2010). Além disso, outro estudo mostrou que há um aumento nos ataques de malária entre crianças que apresentam infecção concomitante pelo *S. mansoni* no Senegal (SOKHNA et al., 2004). No entanto, os resultados atuais são controversos, uma vez que sugerem uma série de cenários, nos quais a co-infecção pode não apenas aumentar a susceptibilidade para infecções com *Plasmodium*, como também proteger contra malária severa em certas circunstâncias (HARTGERS; YAZDANBAKHS, 2006; BROOKER et al. 2007; HARTGERS et al., 2009).

Várias espécies de *Plasmodium* que infectam roedores, como *P. chabaudi*, *P. berghei* e *P. yoelii*, têm sido utilizadas para tentar compreender um pouco mais sobre a infecção de malária que ocorre em humanos (HELMBY et al., 1996; SANGWEME; SHIFF; KUMAR, 2009; WAKNINE-GRINBERG et al., 2010). Apesar desses modelos possuírem algumas características que diferem da doença nos seres humanos, eles são muito úteis para o estudo da susceptibilidade à infecção e da regulação das respostas imunes. Por exemplo, a resposta imune ao estágio intra-eritrocitário do *Plasmodium* foi caracterizada através da espécie *P. chabaudi*, a qual é um excelente modelo murino de malária experimental (HARTGERS; YAZDANBAKHS, 2006). Estudos sobre a influência da co-infecção entre *S. mansoni* e *Plasmodium* na patologia e na resposta imune à malária experimental têm sido realizados e os resultados são contrastantes. Por

exemplo, a hepato-esplenomegalia foi mais acentuada em animais co-infectados com *P. yoelii* e *S. mansoni* (SANGWEME; SHIFF; KUMAR, 2009). Além disso, a parasitemia, a severidade e a fatalidade da malária foram aumentadas pela co-infecção entre *S. mansoni* e *P. yoelii* ou *P. berghei* (LEGESSE; ERKO; BALCHA, 2004; SANGWEME; SHIFF; KUMAR, 2009). Entretanto, LARANJEIRAS e colaboradores (2008) demonstraram que animais co-infectados com *P. berghei* e *S. mansoni* não apresentaram um aumento na parasitemia do plasmódio, apesar de manifestarem a malária mais cedo e de forma mais severa do que os infectados apenas com *P. berghei*. Segundo estes mesmos pesquisadores, camundongos que adquiriram imunidade protetora para *P. berghei* através de repetidas infecções e por subsequente tratamento curativo tiveram uma redução desta proteção quando co-infectados por *S. mansoni* (LARANJEIRAS et al., 2008). Por outro lado, a co-infecção por *S. mansoni* forneceu proteção contra malária nos camundongos com *P. chabaudi* (YOSHIDA et al., 2000). Além disso, um estudo mostrou um efeito positivo da co-infecção na patologia, uma vez que a presença *S. mansoni* reduziu a incidência da manifestação de malária cerebral em camundongos co-infectados com *P. berghei* (WAKNINE-GRINBERG et al., 2010). Tem sido sugerido que a modulação da resposta imunológica se deve a regulação cruzada das respostas Th1 e Th2, as quais são conhecidas por serem induzidas por infecção por *Plasmodium* e *Schistosoma*, respectivamente (HELMBY; KULLBERG; TROYE-BLOMBERG, 1998; YOSHIDA et al., 2000). Isto é consistente com a observação de que IgE específica para malária, a qual não é induzida durante a infecção por *P. chabaudi* sozinho, é produzida quando há co-infecção com *S. mansoni* (HELMBY et al., 1996). Além disso, HELMBY e colegas (1998) observaram que durante a infecção dupla por aqueles mesmos parasitas ocorre uma significativa redução na proliferação de células T, na produção de citocinas tipo Th2 e no nível de anticorpos para o *S. mansoni* após a infecção por malária. Segundo estes mesmos autores, a parasitemia de *P. chabaudi* foi maior em camundongos co-infectados com *S. mansoni*. Estes animais apresentam uma menor produção de TNF- α , sugerindo que este fator pode ter contribuído para o aumento da parasitemia de malária, uma vez que a produção de IFN- γ , caracteristicamente induzida pelo *Plasmodium*, não foi alterada pela co-infecção (HELMBY; KULLBERG; TROYE-BLOMBERG, 1998). Em contra partida, outro estudo aponta que a co-infecção por *S.*

1 *mansoni* e *P. chabaudi* aumenta a produção de IFN- γ para antígenos de plasmódio e isso
2 pareceu estar associado com a proteção contra malária em camundongos (YOSHIDA et
3 al., 2000). Como descrito acima, existe uma gama de estudos sobre a co-infecção e
4 eles mostram uma disparidade nos resultados, a qual pode, provavelmente, estar
5 relacionada com as diferenças das espécies ou cepas de *Plasmodium* ou com o número
6 de cercárias de *Schistosoma* utilizadas nos experimentos (LEGESSE; ERKO; BALCHA,
7 2004).

9 **1.4 Desenvolvimento de Vacina**

10
11 A prevenção da malária e da esquistossomose é realizada principalmente por
12 tratamento quimioterápico. Embora a quimioterapia para ambas as parasitoses possa
13 influenciar na redução dos índices de morbidade e mortalidade, ela representa apenas
14 uma medida paliativa, uma vez que não é eficaz em controlar os altos índices de
15 transmissão e re-infecção em áreas endêmicas. Além disso, as estratégias de
16 intervenção com drogas para estas parasitoses são limitadas e tornam-se menos
17 eficazes com o surgimento de resistência parasitária às drogas (KASINATHAN;
18 MORGAN; GREENBERG, 2010; SMITH et al., 2010). Assim, o desenvolvimento de
19 vacinas efetivas contra estes parasitas seria um instrumento valioso de saúde pública,
20 complementando o tratamento com drogas, o controle dos vetores e as modificações
21 sanitárias e ambientais. Nesse sentido, grandes esforços estão sendo realizados por
22 organismos internacionais e institutos de pesquisa visando produzir vacinas que
23 poderiam reduzir a mortalidade, a morbidade, a transmissão e os índices de re-infecção
24 de tais enfermidades (TRAM et al., 2006; BARCLAY et al., 2008; CARDOSO et al.,
25 2008; JIANG et al., 2009). Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina contra essas
26 doenças parasitárias representa um grande desafio e apesar da intensiva pesquisa,
27 uma vacina comercialmente viável ainda não está disponível. Tal desafio é dado ao fato
28 do *Plasmodium* e do *Schistosoma* possuírem diferentes estágios durante seus ciclos de
29 vida e por terem um articulado sistema de escape ao reconhecimento pelo sistema
30 imune (MCMANUS; LOUKAS, 2008; GOOD, 2009).

1 Contudo, a viabilidade de vacinas contra malária e esquistossomose é
2 estimulada pelo fato de existirem indivíduos que adquirem resistência a tais parasitoses
3 após sucessivas infecções em regiões endêmicas (MCMANUS; LOUKAS, 2008;
4 DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009). Neste contexto, moléculas candidatas a compor
5 uma vacina vêm sendo avaliadas independentemente para cada parasitose.

6 7 **1.4.1 Sm29**

8 Quando se trata de uma vacina para esquistossomose, segundo a Organização
9 Mundial da Saúde (OMS), a redução da morbidade é tão desejada quanto à proteção
10 imune total. Dessa forma, uma vacina com proteção parcial, de no mínimo 40%, pode
11 ser aceita como válida, pois ainda é capaz de reduzir a patologia, limitar a transmissão
12 parasitária e ser menos cara do que tratamentos repetidos com drogas (WHO, 2000).
13 Em modelo murino, a proteção em esquistossomose é caracterizada pela redução da
14 carga parasitária adulta nas veias mesentéricas. No entanto, uma vacina que seja
15 capaz de reduzir o número de ovos liberados e a formação de granuloma, mesmo não
16 reduzindo a carga parasitária total, pode ser considerada ainda como uma candidata
17 vacinal (CHITSULO; LOVERDE; ENGELS, 2004).

18 Diversos estudos estão sendo desenvolvidos visando à busca de diferentes
19 antígenos e estratégias vacinais contra a esquistossomose (MCMANUS; LOUKAS,
20 2008). Nesse sentido, muitos antígenos de *S. mansoni* têm sido identificados e testados
21 como vacina em modelos experimentais (CARDOSO et al., 2008; TRAN et al., 2006;
22 ZHANG et al., 2010). Dentre estes antígenos, aqueles associados à superfície do
23 tegumento do *S. mansoni* adulto têm um grande potencial no desenvolvimento de
24 vacinas, pelo fato de estarem expostos ao sistema imune do hospedeiro. Além disso,
25 eles têm a vantagem de não apresentarem reação cruzada com antígenos de ovos do
26 parasita, os quais estão envolvidos na imunopatologia (SIMPSON, 1990). O tegumento
27 do *Schistosoma* é composto de diversas proteínas, sendo que as mais expostas estão
28 presentes na membrana apical, sendo denominadas '*S. mansoni Apical Membrane*
29 *Proteins*' (SmAMPs) (BRASCHI; WILSON, 2006). Dentre elas se destaca a proteína
30 Sm29, a qual vem sendo caracterizada quanto à função biológica e testada quanto ao
31 seu potencial vacinal em modelo humano e murino (CARDOSO et al., 2006; 2008).

Estudos mostram que a Sm29 está entre os genes mais expressados em *S. mansoni*, e que provavelmente tem uma importante função biológica na superfície deste parasita (GOBERT et al., 2006; VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2007). Mais estudos necessitam ser realizados a fim de melhor caracterizar a função desta proteína.

A Sm29 produzida como proteína recombinante (rSm29) foi fortemente reconhecida por anticorpos IgG1 e IgG3 de indivíduos naturalmente resistentes e por pacientes não susceptíveis a re-infecção que vivem em áreas endêmicas para esquistossomose no Brasil (CARDOSO et al., 2006). Quando a rSm29 foi testada como candidata vacinal em camundongos, ela conferiu redução da carga parasitária, de ovos no intestino e de granulomas no fígado de 51%, 60% e 50%, respectivamente. A imunidade protetora foi associada com altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Sm29 e uma elevada produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (CARDOSO et al., 2008). Apesar da Sm29 ser uma promissora candidata no combate à esquistossomose, ela foi administrada apenas com adjuvante de Freund (CARDOSO et al., 2008), o qual não é licenciado para o uso em humanos. Dessa forma, mais estudos precisam ser realizados com objetivo de potencializar a eficácia desta vacina.

1.4.2 Sm14

Outro candidato vacinal contra esquistossomose é a proteína ligadora de ácidos graxos de 14 kDa de *S. mansoni*, Sm14, uma proteína citosólica expressa na lamela do tegumento e do epitélio intestinal (BRITO et al., 2002). 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). O trematódeo *S. mansoni* carece de rotas metabólicas necessárias à biosíntese de ácidos graxos e seus derivados, sendo dessa forma, completamente dependente do hospedeiro para adquirir tais substâncias (MEYER et al., 1970). 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. 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 imunização com a forma recombinante da Sm14 (rSm14) formulada com hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) induziu proteção contra a infecção por *S. mansoni* em dois modelos animais *outbred* (camundongos suíços - 50-65% e coelhos da nova zelândia - 90%) (Tendler et al., 1996). A proteção conferida pela rSm14 parece estar associada com resposta imune celular, mediada por $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$, 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). No caso da rSm14, como a proteção parece estar associada com resposta imune mediada por Th1 e Th2, o uso de hidróxido de alumínio 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. Apesar da rSm14 ser uma candidata promissora no combate à esquistossomose, mais estudos são necessários a fim de potencializar a proteção induzida por esta vacina (WILSON, COULSEN, 2006).

1.4.3 AMA-1

Existem três categorias principais para o desenvolvimento de vacina contra a malária: (i) vacinas pré-eritrocíticas, as quais visam induzir uma resposta mediada por células T contra antígenos expressos nos hepatócitos infectados a fim de prevenir a doença clínica; (ii) vacinas eritrocíticas, aquelas projetadas para induzir anticorpos dirigidos contra antígenos da fase eritrocitária para prevenir a doença clínica ou reduzir a gravidade da doença; e (iii) vacinas de bloqueio de transmissão, as quais são destinadas a antígenos expressos na fase do desenvolvimento sexual do parasita, prevenindo assim a transmissão (GOOD, 2009; COUTINHO-ABREU; RAMALHO-ORTIGAO, 2010). Pode-se considerar que uma vacina é eficaz contra malária quando ela induz um risco menor de doença clínica e/ou é capaz de reduzir a carga parasitária e/ou proteger contra novas infecções (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009).

Vacinas potenciais contra o *P. falciparum* estão sendo direcionadas para vários estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*, particularmente, para o estágio eritrocitário dos merozoítos, pois antes de invadirem outro eritrócito eles estão inteiramente acessíveis ao ataque do sistema imunológico. Consequentemente existe muito interesse em moléculas protéicas expressas na superfície do merozoíto que possam ter potencial como vacina, sendo que muitas já foram identificadas e testadas (ANDERS et al., 1998; BUENO et al., 2008; LYNCH et al., 2009; SPRING et al., 2009; STANISIC et al., 2009). Entre essas moléculas, o antígeno-1 da membrana apical do merozoíto, chamado de AMA-1 ('*apical membrane antigen-1*') (PETERSON et al., 1989), uma proteína de 66 kDa, é um dos mais promissores e estudado candidato a vacina contra malária. Diferente de outros antígenos do merozoíto, AMA-1 possui um domínio conservado que apresenta pouco polimorfismo entre as espécies de *Plasmodium* (ANDERS et al., 1998; HODDER; CREWETHER; ANDERS, 2001). Esta molécula tem um papel fundamental na invasão das células vermelhas do sangue pelo *Plasmodium* (TRIGLIA et al., 2000). A imunização com AMA-1 confere proteção contra desafio parasitário em modelo animal murino (ANDERS et al., 1998; XU et al., 2000) e primata (STOWERS et al., 2002). Além disso, diferentes formulações de vacinas baseadas no alelo da AMA-1 do *P. falciparum* (PfAMA-1) estão sendo testadas em humanos e têm se mostrado seguras e imunogênicas (THERA et al., 2008; SPRING et al., 2009; LYKE et al., 2009).

A proteção conferida pela proteína AMA-1 está estreitamente relacionada com a produção de anticorpos (SU et al., 2003; BURNS et al., 2004; POLLEY et al., 2004; CORTÉS et al., 2005). Além deles, a produção de IFN- γ e a expansão de células TCD4⁺ parecem contribuir para a eliminação de *P. chabaudi* em camundongos. Dessa forma, a imunidade celular parece agir conjuntamente com a resposta humoral para gerar a imunoproteção, mas aquela não promove proteção na ausência de anticorpos (SU et al., 2003; BURNS et al., 2004). Entretanto, outros estudos sugerem que a imunidade mediada por células pode contribuir para a proteção conferida por AMA-1 em camundongos independentemente da participação de anticorpos (AMANTE et al., 1997; XU et al., 2000). Em populações de áreas endêmicas, anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra PfAMA-1 foram associados com proteção para malária (POLLEY et al., 2004; CORTÉS et al., 2005). STANISIC e colaboradores (2009) relataram que altos

níveis de anticorpos do isotipo IgG3 anti-PfAMA-1 foram fortemente preditores da redução do risco de malária sintomática causada por *P. falciparum* em indivíduos de Papua Nova Guiné. No entanto, tal produção de anticorpos não foi significativamente associada com proteção nessa população (STANISIC et al., 2009).

1.4.3 Influência da Co-infecção no Desenvolvimento de Vacinas

Embora existam estudos sobre como a co-infecção entre malária e esquistossomose pode influenciar a imunidade de ambas as parasitoses, não existem trabalhos que examinam como o efeito dessa dupla infecção pode modificar a resposta imune mediada por vacinas. Existem algumas pesquisas sobre como a co-infecção com esquistossomose pode afetar o desempenho das respostas imunes para a vacina tetânica e BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) (SABIN et al., 1996; ELIAS et al., 2005). Em pacientes infectados com *S. mansoni* a resposta de IFN- γ para toxina tetânica (TT) foi inversamente relacionada com a intensidade da infecção. Estes pacientes desenvolveram uma resposta semelhante a Th2, enquanto que aqueles não infectados montaram uma resposta Th1 (SABIN et al., 1996). Camundongos infectados por esquistossomose e vacinados com BCG tiveram uma redução no efeito protetor da vacina contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Essa imunomodulação pode ter sido exercida através da atenuação das respostas imunes contra antígenos micobacterianos, seja pela polarização da resposta imune para o perfil Th2 ou pelo decréscimo da produção de IFN- γ provocados pelo parasita (ELIAS et al., 2005). Em contraste, outro estudo demonstrou que camundongos com infecção concomitante de *S. mansoni* e *M. tuberculosis* não manifestaram alteração dos efeitos terapêuticos de uma vacina de DNA experimental (DNAhsp65), sendo os efeitos persistentes mesmo na presença da resposta Th2 induzida pelo helminto. Além disso, estes animais produziram TGF- β e IL-10, os quais podem estar associados com a proteção de longa duração para tuberculose (FRANTZ et al., 2010).

Dessa forma, é possível que a presença de *Plasmodium* e *S. mansoni* possa também influenciar no desempenho das vacinas contra uma ou outra infecção em indivíduos duplamente infectados (HARTGERS; YAZDANBAKHSH, 2006). A co-infecção pode induzir uma resposta imune eficaz ou deficiente em resposta a vacinação

1 e isso necessita ser avaliado. Há a necessidade de testar novas formulações e
2 esquemas vacinais para os antígenos AMA-1 e Sm29, a fim de verificar sua eficácia no
3 modelo de co-infecção e de potencializar a proteção induzida por eles.

4 5 **1.5 Derivados da Enterotoxina Termolábil de *Escherichia coli* como Potentes** 6 **Adjuvantes**

7 As vacinas de proteínas recombinantes como AMA-1 e Sm29, apesar de serem
8 mais seguras do que as vacinas tradicionais, são menos imunogênicas. Assim,
9 adjuvantes são componentes essenciais para que estas vacinas sejam mais eficientes
10 (REED et al., 2009; MBOW et al., 2010). No caso da AMA-1 e Sm29, como a proteção
11 parece estar associada com resposta imune mediada por Th1 e Th2 se faz necessário
12 usar um adjuvante adequado ao tipo específico de resposta imune protetora. Sabe-se
13 que derivados da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), como LTB e LTK63,
14 possuem uma potente atividade imuno-adjuvante. Esses adjuvantes têm sido
15 estudados em diferentes modelos animais e têm demonstrado eficiente atividade
16 imunomodulatória. Eles são capazes de aumentar as respostas imunes de moléculas
17 fusionadas ou co-administradas a eles (PIZZA et al., 2001; SIMMONS et al., 2001; CAO
18 et al., 2009; ROMERO et al., 2009).

19 Os dados gerados nesta tese estão apresentados na forma de artigos científicos.
20 O primeiro artigo é uma revisão sobre os adjuvantes LTB e LTK63, na qual
21 descrevemos as características estruturais e imunológicas de tais adjuvantes. Essa
22 revisão foi publicada no periódico *Vaccine*. Os adjuvantes, juntamente com o estudo
23 sobre a influência da co-infecção na vacinação, são objetos de estudo desta tese. O
24 segundo artigo contém um relato da influência desses adjuvantes sobre o potencial
25 vacinal de antígenos de esquistossomose e malária em modelo murino de infecção e/ou
26 co-infecção entre *Schistosoma* e *Plasmodium*. Este trabalho está formatado conforme as
27 normas do periódico *Vaccine*. Por último, o terceiro artigo contém dados sobre a
28 avaliação em camundongos do potencial imunogênico e imunoprotetor da proteína
29 rSm14 de *S. mansoni* formulada com o adjuvante LTB. Esse trabalho está formatado
30 segundo as normas do periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

2 HIPÓTESE

Este trabalho foi desenvolvido a partir das seguintes hipóteses:

- 1- A co-infecção entre malária e esquistossomose interfere na eficiência dos antígenos vacinais rAMA-1 e rSm29 quando administrados em camundongos duplamente infectados;
- 2- A associação dos adjuvantes rLTB e rLTK63 com os antígenos rAMA-1 e rSm29 induz proteção contra infecção com *P. chabaudi* e/ou *S. mansoni* em modelo murino;
- 3- O adjuvante rLTB melhora o desempenho do antígeno vacinal rSm14.

3 OBJETIVOS GERAIS

- Construir quimeras recombinantes compostas por LTB e Sm29 ou Sm14;
- Clonar, expressar e purificar as quimeras recombinantes e as proteínas rLTB, rSm29 e rSm14;
- Avaliar a proteção induzida pelas quimeras e pelas proteínas recombinantes associadas a adjuvantes, através de teste de desafio em camundongos não infectados, pré-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e/ou *P. chabaudi*;
- Avaliar a eficácia do antígeno rSm14 co-administrado ou fusionado ao adjuvante rLTB através de desafio com *S. mansoni* em modelo murino;
- Avaliar a resposta imune celular e humoral geradas pelas vacinas.

ARTIGO 1**NON-TOXIC DERIVATIVES OF LT AS POTENT ADJUVANTS**

(Revisão publicada no periódico *Vaccine*)

Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants

Vanusa P. da Hora^{a,b,‡}, Fabricio R. Conceição^c, Odir A. Dellagostin^a and Denise L. Doolan^{b*}

^a *Laboratório de Biologia Molecular and ^cLaboratório de Imunologia Aplicada, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 96010-900, Brazil*

^b *Molecular Vaccinology Laboratory, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, QLD 4006, Australia*

[‡] *Present address: Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 96200-190, Brazil*

Corresponding author: Denise L. Doolan, Queensland Institute of Medical Research, The Bancroft Centre, 300 Herston Road, P.O. Royal Brisbane Hospital, Brisbane, QLD 4029, Australia; Tel: (61-7) 3362 0382. Fax: (61-7) 3362 0105; E-mail: Denise.Doolan@qimr.edu.au

Running title: LTB and LTK63 adjuvants.

Abbreviations:

Keywords: adjuvant, LT, LTB, LTK63

Abstract

The heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LT) consists of an enzymatically active A subunit (LTA) and a pentameric B subunit (LTB). LT has been extensively studied as a potent modulator of immune responses but wild-type LT is toxic and therefore unsuitable for clinical use. Approaches pursued to avoid the toxicity associated with the use of the native toxin while retaining its adjuvant properties have included isolation of subunit B (LTB) and construction of non-toxic LT AB complex mutants, such as LTK63 mutant. Here we review the immunomodulatory characteristics of LTB and LTK63 and their potential as mucosal and parenteral vaccine adjuvants.

1. Introduction

Vaccination is undoubtedly the intervention with the greatest impact on global health [1]. New generation vaccines, particularly subunit vaccines, based on recombinant or purified proteins and synthetic peptides, are less reactogenic but poorly immunogenic in comparison with whole-organism vaccines which contain many immunostimulatory components. Thus, subunit vaccines are typically administered with adjuvants to amplify and direct vaccine-specific immunity [2, 3].

Adjuvants are defined as pharmacological or immunological agents that can stimulate the immune system and increase, modulate and/or prolong the intrinsic immunogenicity of co-administered antigens, thereby enhancing vaccine efficacy. The word “adjuvant” comes from the Latin word *adjuvare*, meaning to help or aid [4]. Adjuvants are a heterogeneous group of compounds and can be divided in two groups according to their dominant mechanisms of action. They can operate via activation and potentiation of innate immunity either directly or via pattern-recognition receptors (PRRs) to generate robust and long-lasting adaptive immune response. Alternatively, delivery systems may concentrate and display antigens in repetitive patterns, target vaccine antigens to antigen-presenting cells (APC) and help localize antigens and immune potentiators to ensure that the vaccine is delivered to the right place at the right time [5, 6]. These activities are not mutually exclusive and some adjuvants exhibit both properties [7]. In addition, immune polarization of the vaccine-induced response is an important consideration [8].

A range of compounds including emulsions, saponins, bacterial products, Toll-like receptor (TLR) agonists, nucleic acids, virosomes, liposomes and a combination of some of them have been shown to display potent adjuvant activity in animal models [2, 3, 5, 7]. However, only a few vaccine adjuvants are licensed for use in humans. For more than 70 years, aluminum mineral salts was the only vaccine adjuvant approved worldwide for clinical use and remained

the only one licensed for human use by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) until 2009. In the past decade, two oil-in water emulsions (MF59 and AS03), one recombinant toxin (cholera toxin B subunit, CTB), a virosome (immunopotentiating reconstituted influenza virosomes, IRIV) and one TLR- 4 agonist (monophosphoryl lipid A formulated in aluminum hydroxide, AS04) were licensed by the European Medicines Agency (EMA) as vaccine adjuvants for human use. Recently, the USA FDA approved the adjuvant AS04 for clinical use [2, 3, 9]. The need for new adjuvants has been led mainly by the shortcoming of the currently approved ones in eliciting the desired immune response against different target pathogens.

A number of novel adjuvants are in development and evaluation and some have demonstrated profound effects on vaccine potency in preclinical models. These include synthetic TLR agonists, such as unmethylated viral or bacterial CpG DNA and oligonucleotides [10], lipopeptides such as tripalmitoyl-S-glycerol cysteine (Pam3Cys) [11], water-in-oil emulsions such as Montanide ISA 720 [12], saponins such as QS21 [7], and bacterial enterotoxins such as the heat-labile enterotoxin from *Vibrio cholerae* (cholera toxin, CT) and *Escherichia coli* (LT) [13-15].

Of particular interest are products of the heat-labile enterotoxin of *E. coli* (LT) including subunit B (LTB) and non-toxic LT AB complex mutants such as LTK63. These enterotoxins have demonstrated potent immunomodulatory activity with a range of antigens in different animal models, with enhanced immunogenicity as well as protective efficacy, and are considered potent mucosal and parenteral adjuvants [13]. Herein, we review the immunomodulatory characteristics of the LTB and LTK63 and provide examples of how these properties have been exploited for vaccine development.

2. Heat-labile enterotoxin of *E. coli* (LT): Structure and activity

Certain enterotoxigenic strains of *E. coli* bacteria produce two types of toxins: heat-stable (ST) and heat-labile (LT). The heat-labile enterotoxin of *E. coli* (LT) is a bacterial adenosine diphosphate (ADP)-ribosylating exotoxin. Two major LT families are known, LT-I and LT-II, however most available information about LT relates to the LT-I family. The LT protein is composed of two subunits coded by an operon; subunit A (LTA) is a 28-kDa enzyme and subunit B (LTB) is a 60-kDa protein, composed of five identical polypeptides (11.6 kDa) [16]. Each polypeptide is produced separately, with a leader sequence which allows them to be transported into the cell periplasm where it is cleaved and a toxin unit is assembled [17]. The non-toxic B subunit is assembled as a highly stable pentameric structure arranged in a cylinder-like structure with a central cavity [18]. The A subunit is composed of two domains: 1) A₁, a globular structure with ADP-ribosylating activity; and 2) A₂, a long α -helix. The two domains are linked by a trypsin-sensitive loop and by a disulphide bridge between A₁ and A₂. The enzymatic activity is dependent on the proteolytic cleavage of the loop and reduction of the disulphide bridge [19, 20]. The A subunit is linked to the B subunit by the trypsin-sensitive loop and the long α -helix, the C terminus of which enters into the central cavity of the B subunit, thus anchoring the A subunit to the B pentamer structure (AB₅ complex or holotoxin) [19] (Figure 1). The B pentamer structure contains the cellular receptor binding function. The principal receptor for LTB is the ganglioside GM1, a glycosphingolipid found ubiquitously on the cell surface of mammalian cells. Hydrogen bond interactions within each of the five pockets formed by the B subunit pentamer allow LTB to crosslink GM1 with extremely high affinity. The receptor binding activity of LTB is required for the uptake and internalization of the AB₅ complex by host cells. The A subunit is the toxic portion of LT and is internalized and subsequently stimulates the cellular adenylate cyclase-cyclic AMP system, leading to dramatic and unregulated elevation of intracellular cAMP. In intoxicated gut epithelial cells, cAMP elevation results in massive secretion of electrolytes and

water into the gut lumen, clinically manifested as diarrhea. Therefore, the A subunit is responsible for the toxicity of LT [16, 19, 21-24].

3. Immunomodulating properties of LT

LT has been extensively studied for immunomodulatory properties which enhance immunogenicity and protective efficacy. Although the mechanisms by which the enterotoxin-based adjuvant exerts immunomodulating effects are not well characterized, enhancement of inflammatory cytokine and chemokine production and transient recruitment of immune effectors cells to the site of immunization have been implicated [25]. LT is also known to influence dendritic cell maturation [26], antigen presentation and T-cell activation and promote the induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses in mouse model [27, 28]. The use of LT as an adjuvant has resulted in a balanced cytokine response, involving the production of both Th1 and Th2 cytokines [29] and several antibody classes in mice [30] and in humans [31].

Both the ADP-ribosylation activity of LTA and GM1 binding of LTB have been proposed to be involved in immune stimulation. Results by Domingos and co-workers [32] suggest that both A and B subunits are required to induce TNF- α release by macrophages. Other studies have proposed that there are multiple immune-modulating pathways triggered by LT, including mechanisms independent of both ADP-ribosyl-transferase activity [22, 33] and GM1-binding affinity [22].

Despite its immunomodulatory effect, wild-type LT is toxic and unsuitable for clinical use in humans [21]. In order to avoid the toxicity associated with the use of the native toxin, while retaining the adjuvant properties, different avenues of research have been pursued, including isolation of subunit B [22, 34] and construction of non-toxic LT mutants [23, 35]. Several

genetically detoxified derivatives of LT have been created by site-directed mutagenesis. Some of them such as LTR192G (arginine-to-glycine substitution at position 192) have a mutation in the protease-sensitive loop, making the loop insensitive to proteases and therefore rendering the toxin not susceptible to the activation necessary for enzymatic activity and toxicity [36]. Others have a mutation in the enzymatically active region of A subunit, such as LTR72 (alanine-to-arginine substitution at position 72) which retains only 1% of the ADP-ribosyltransferase activity [37]. LTK63 has a mutation in the active site of A subunit, (serine-to-lysine substitution at position 63) and lacks total ADP-ribosylating activity. This molecule has been reported to retain the potent adjuvant properties of LT [38, 39].

Administration of antigens mixed with or coupled to LTB or LTK63 by oral (chicken) [34]; intranasal (mouse) [40], (human) [31]; subcutaneous (mouse) [30] [39]; intramuscular (mouse) [41] [42]; transcutaneous (human) [43] or sublingual (mouse) [44] routes of immunization has elicited robust humoral and cellular immune response. LTB and LTK63 have also demonstrated protective potential against enteric (*Helicobacter pylori* [45]), respiratory (Influenza virus [46]; tuberculosis [47]), genital (human papillomavirus [42]) or parasitic (*Toxoplasma gondii* [48]; *Plasmodium berghei* [15]) pathogens, as well as cancer [28, 49].

4. Immunological and adjuvant activity of non-toxic derivatives of LT

4.1. The B subunit of the heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTB)

The B subunit of LT is a potent signalling molecule capable of modulating immune responses [27, 50, 51]. The immunostimulatory effect of LTB appears to be related with its capacity to: (i) enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class I (MHC-I) [52] and MHC class II [53, 54]; (ii) activate selective differentiation of lymphocytes [55]; (iii) influence dendritic cells (DCs) maturation and activation [27]; (iv) induce B7-2 expression on antigen

presenting cells (APCs) for subsequent co-stimulatory signaling to CD4⁺ T-cells [56] and; (v) increase the expression of activation markers on B lymphocytes (MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1) [57]. The adjuvanticity of LTB has been directly related to GM1-binding activity. It is thought that the interaction between the B-subunit pentamers and the GM1 cell receptor activates B and CD4⁺ T-cells; and enhances antigen presentation by activating DCs and other APCs by facilitating antigen uptake through receptor-mediated endocytosis mechanism [22, 53]. Specifically, GM1-mediated presentation of LTB by B cells and CD11c⁺ DCs significantly enhanced the proliferation and cytokine expression of LTB-specific CD4⁺ T cells. LTB presentation by B cells induced the secretion of interleukin (IL)-2, IL-4 and IL-5, providing helper signals for induction of antigen-specific immunoglobulin. Moreover, GM1-mediated events can significantly enhance the presentation of LTB-conjugated antigens, as noted for OVA coupled to LTB, which was presented via the MHC-II pathway [53]. Furthermore, LTB can increase both T helper type 1 and 2 (Th1 and Th2) associated cytokine response to LTB-coupled antigens. For instance, IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 were specifically and significantly induced by a multi-epitope vaccine against *H. pylori* (HUepi) fused to LTB, HUepi-LTB, in mice immunized orally [58]. Also, oral immunization of mice with the antigen MOMP (*Chlamydomphila psittaci*) fused to LTB elicited significant levels of IFN- γ , TGF- β and IL-2 cytokine responses and a strong enhancement of the lymphoproliferative response, as well as the production of specific IgG and IgA antibodies [59].

LTB antigen-conjugates have also been shown to be potent inducers of CD8⁺ T cell responses in mice [28]. In one study of mice immunized intramuscularly with vectors encoding carcinoembryonic antigen (CEA) fused to LTA and LTB, potent CEA-specific antibody and CD8⁺ T-cell responses were induced by the CEA-LTB fusion, whereas the CEA-LTA

preferentially elicited a CD4⁺ T-cell response [49]. The potent antitumor effect of intramuscularly administered CEA-LTB was reported to be mediated primarily through the induction of NK and CD8⁺ T cells [49]. In another study, strong cytotoxic T lymphocyte responses were induced in mice immunized with LTB-MOMP [59]. In an earlier study, De Haan *et al.* [52] reported that conjugation of a class I epitope to LTB resulted in the epitope being delivered into the MHC-I presentation pathway in a GM1-binding-dependent fashion and appearance of MHC-I epitope complexes at the cell surface. Data demonstrate that LTB-peptide conjugates are potent vaccine vehicles for induction of protective CD8⁺ T cell responses [28].

The competence of LTB to modulate or improve vaccine-induced immune responses appears to depend to some extent on the antigen-LTB combination (whether administered as a mixture, a fusion construct or chemical coupling), the vaccination route [14, 27, 30, 34, 41, 60, 61] (Table 1) and dose [30, 61].

In some studies co-administration of LTB with the antigen of interest enhanced the antigen-specific immune response in mice [30] and in humans [31] but in other studies, a link between carrier and antigen appeared necessary to promote immunity to the target antigen [34, 60]. For example, Fingerut and co-workers [34] showed that the co-administration of LTB with viral protein 2 (VP2) of infectious bursal disease virus did not augment the response to VP2 in chickens, in contrast to results of a previous study [60] where the same researchers demonstrated that LTB-VP2 fused protein enhanced anti-VP2 antibody level and protected birds intramuscularly immunized from bursal disease virus (IBDV) infection. Interestingly, those researchers reported that birds vaccinated intramuscularly with a LTB-VP2 fusion exhibited high levels of protection, but birds vaccinated orally were not protected [60].

The route of administration appears to be critical factor influencing the immunoenhancing activities of LTB. Although LTB has demonstrated potent mucosal adjuvanticity when

administered intranasally or orally [34, 62, 63], it has also stimulated a strong systemic and secretory response when parenterally delivered. Fischer et al. [61] found that mice immunized intramuscularly with Suid herpesvirus type 1 (SuHV-1) inactivated suspension plus rLTB produced higher average titers of anti-SuHV-1 neutralizing antibodies and protection than mice immunized subcutaneously (56% and 32%, respectively) [61]. In another study, co-administration of LTB with recombinant Knob protein (egg drop syndrome adenovirus) elicited antigen-specific immune responses via either oral or transcutaneous vaccination routes, but not via intramuscular route [34]. In contrast, De Haan [41] and co-workers demonstrated that either intranasal or intramuscular vaccination of mice with LTB supplemented influenza A:PR8 subunit antigen (derived from influenza strain A:Puerto Rico:8:34) conferred complete protection of the lungs and the nasal cavity against intranasal viral infection. In that same study, analysis of the IgG subtypes in serum of mice showed induction of IgG1, IgG2a, IgG2b as well as IgG3, indicative of a mixed Th1:Th2 response in all immunized animals [41]. Furthermore, Weltzin and co-workers [30] found that mice immunized subcutaneously with LTB plus *Helicobacter pylori* urease antigen were protected against intragastric challenge with *H. pylori*, while mice orally immunized were not protected. In that work, urease specific IgG1 and IgG2a antibody subclass responses were stimulated by all routes, but the subcutaneous route elicited high level of both subclasses, preferentially enhancing IgG2a antibody subtype (associated with a Th1 immune response). On the other hand, oral administration elicited lower levels of both IgG1 and IgG2a. Others have reported that parenterally delivered LTB preferentially stimulates Th2 immune responses, whereas mucosally delivered LTB stimulates Th1. For instance, Conceição and co-workers [14] reported that a recombinant chimera composed of the R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin and LTB (LTB-R1) elicited Th2 type immune responses when administered via intramuscular route in mice, but Th1 type immune responses

when administered by intranasal route. Similarly, Ricci *et al* [64] reported in a streptococcal model that following subcutaneous immunization, the LTB monomer induced predominantly IgG1 antibody responses (associated with Th2 type immune responses), whereas Th1 type IgG2a antibody responses dominated following intragastric delivery.

The adjuvant activity of LTB has been reported to be impacted by the dose, the concentration of LTB, the antigen-LTB combination, and the route of administration. Fischer *et al.* studying the adjuvant effect of different concentrations of recombinant LTB (2.5, 10, 20, 30 and 40 µg/dose) in mice inoculated intramuscularly or subcutaneously with SuHV-1 inactivated suspension found an inverse relationship between protection and route of immunization [61]. A low dose of rLTB (10 µg/dose) was required for high protection (80%) and antibody responses when mice were immunized intramuscularly, but a high dose (40 µg/dose) was required to confer the same level of protection when mice were immunized subcutaneously [61]. Similarly, in the *H. pylori* urease model, Weltzin and co-workers found that the most effective reduction in gastric *H. pylori* colonization in mice was obtained following coadministration of high dose LTB (50 µg) with *H. pylori* urease antigen subcutaneously [30]. These data show that the immunomodulatory effect of LTB can vary depending on antigen-LTB combination, route of administration and dose, suggesting that each of these factors should be considered for specific vaccine applications.

4.2. The LTK63, a synthetic non-toxic mutant of LT

LTK63 is a synthetic non-toxic AB complex mutant of LT derived from LT by site-directed mutagenesis which introduces a serine-to-lysine substitution at position 63 of the active site of the A subunit [35]. This mutation eliminates ADP-ribosylating activity and associated toxicity, while retaining adjuvant activity [65]. Studies with LTK63 suggest that the enzymatically inactive A subunit is able to interact with the vesicular transport system to be

transported to the Golgi, undergo retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum, and subsequent translocation to the cytosol and binding of the ADP-ribosylation factors [33]. One or a combination of these activities is likely responsible for the adjuvanticity of the non-toxic AB complex, since the pro- and anti-inflammatory effects of LT appear to be derived from an independent contribution of the A and B subunits [25]. De Haan *et al* [66] suggested that adjuvants using non-toxic LTA in association with the LTB pentamer may be more potent than adjuvants using the B subunit alone, because the complex can stimulate the immune system stronger than using each molecule separated. Data implicating an important role for the enzymatically inactive A subunit in the induction of an immune response as well as in immunomodulating activities such as effects on antigen processing and presentation [23, 67] support this view.

LTK63 has been shown to act as a potent adjuvant when administered mucosally as well as parenterally (Table 2). With regard to mucosal delivery, LTK63 has reportedly enhanced APC activation and maturation, increased the proportion and total number of B cells as well as CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and stimulated and enhanced both Th1-type cytokine responses (including IFN- γ and TNF- α) as well as Th2 responses [23, 67, 68]. For example, when administered intranasally to mice, LTK63 co-administered with a *PbCSP* 242–310 peptide from *Plasmodium berghei* induced T and B cell immune response both locally and systemically (with production of CD8⁺ T cells and IFN- γ) and protected mice against challenge with live infectious sporozoites [15]. In another model, LTK63 administered intrapulmonary by itself induced the mouse lung activation of alveolar macrophages and the recruitment to the lung of T and B cells and innate immune cells such as granulocytes, NK, and dendritic cells [69].

Data also suggest LTK63 is a promising parenteral adjuvant. For instance, LTK63 plus KLH (keyhole limpet hemocyanin) antigen injected by subcutaneous route was able to stimulate inflammatory cytokine production *in vivo*, enhancing local IL-6 and MIP-2 production, IFN- γ , TNF- α and IL-12 production and NF- κ B activation in murine macrophage cells [25]. In another study, Olafsdottir *et al* [70] studied the effect of LTK63 on phenotype and function of murine neonatal lymphoid cells and found that subcutaneous co-administration of LTK63 with pneumococcal polysaccharide conjugated to tetanus toxoid (Pnc1-TT) induced significantly higher B-cell expression of CD40, CD86 and elevated IFN- γ response consistent with enhanced B-cell–T-cell interactions. Intramuscular immunization of BALB/c mice with LTK63 fused to human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles (cVLPs), HPV 16 L1/L2-LTK63 cVLPs, induced higher titres of specific long-lasting neutralizing serum antibodies. Moreover, that chimera was able to induce significantly higher levels of CD4⁺ Th responses, Th1-type (IFN- γ and IL-2) and Th2-type (IL-4) cytokines, and strong splenocyte proliferation [42]. Induction of CTL responses has been also reported by Simmons and co-workers [71] who detected MHC-I-restricted ovalbumin (OVA)-specific CD8⁺ CTL responses following subcutaneous immunization of C57BL/6 mice with co-administered LTK63 and OVA.

As noted for LTB, immunomodulatory effects of LTK63 appear to vary with vaccination route. For example, subcutaneous and intranasal administration of LTK63 with a meningococcal serogroup C polysaccharide conjugate, MenC-CRM (197) enhanced neonatal antibody responses, affinity maturation, immunological memory and protective immunity in neonatal mice but subcutaneous administration induced a dominant Th1 response whereas intranasal administration induced a mixed Th1/Th2 response [39].

A potential advantage of LTK63 relates to the effect of pre-existing antibodies on adjuvanticity. Studies in murine and swine models following intranasal immunization with LTK63 have demonstrated that pre-existing anti-LTK63 antibodies do not inhibit its performance as an adjuvant [72]. In contrast, although LTB subunit has been successfully used for repeated immunization in mice [34], Fischer *et al.* found the lower the anti-rLTB humoral response, the higher its adjuvant activity [61].

5. Production of recombinant LTB and LTK63

Recombinant LTB and LTK63 have typically been expressed in *E. coli* [27, 35, 61, 69], although other expression systems have been used. Specifically, functional LTB has been expressed in *Mycobacterium* BCG [73], *Lactobacillus casei* [74], *Saccharomyces cerevisiae* [75], and *Pichia pastoris* [76], as well as plants including *Oryza sativa* (rice) [77], *Lactuca sativa* (lettuce) [78] and *Peperomia pellucid* [79]. LTK63 has been expressed in tobacco chloroplasts [80] and attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains [81]. For both LTB and LTK63, plant-based systems have been reported to be efficient expression platforms suitable for oral delivery of candidate vaccines [77-80].

Differences have been noted in expression efficiency in the different systems, however. For example, the expression of LTB was reported to be higher in the homologous *E. coli* system as compared with the heterologous *P. pastoris* system [76]. Nonetheless, a number of different expression systems can be used to produce these potent immunomodulatory molecules, offering several options for scaling up the production.

6. Conclusions

The enterotoxins LTB and LTK63 have potent immunomodulatory activity in mammals and are recognized as powerful mucosal adjuvants. However, both LTB and LTK63 have also been used successfully as parenteral adjuvants, with immune potentiation and enhanced vaccine efficacy demonstrated in a number of different models. In contrast with most commonly used adjuvants, and all adjuvants currently licensed for use in humans, both LTB and LTK63 adjuvant formulations have induced a balanced cytokine response involving both Th1 and Th2 cytokines and different antibody subclasses, as well as induction of antigen-specific splenocyte proliferation and CTL responses. Protection against challenge in viral, bacterial and parasitic animal models (including influenza, HPV, *Helicobacter pylori*, tuberculosis, and malaria) has been demonstrated by mucosal and parenteral delivery of antigens co-administered or fused with LTB or LTK63. The immunomodulatory effects of LTB and LTK63 appear to be dependent to some extent on the antigen and on the vaccination route, and more studies are necessary in order to understand the mechanisms by which these adjuvants exert immunomodulatory effects. Nonetheless, a wealth of data suggests that LTB and LTK63 are potent adjuvants for both systemic and mucosal immunity, and suggest that clinical studies of these adjuvants are warranted.

Acknowledgements

We extend our thanks to Dr Andrew Redmond for his critical review of the manuscript. This work was supported in part by the National Health and Medical Research Council (Australia). VPH received a scholarship from CAPES (Brazilian Ministry of Education). DLD is supported by a Pfizer Australia Senior Research Fellowship (DLD). The authors report no conflicts of interest with regard to this manuscript.

References

- [1] Cooper MR, Stewart DC, Kahl FR, Brown WM, Cordell AR. Medicine at the medical center then and now: one hundred years of progress. *South Med J* 2002 Oct;95(10):1113-21.
- [2] Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* Jun;22(3):411-6.
- [3] Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009 Jan;30(1):23-32.
- [4] Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997 Feb;15(3):248-56.
- [5] Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 2005 Apr;11(4 Suppl):S63-8.
- [6] O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2003 Sep;2(9):727-35.
- [7] Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* 2007 Jul;5(7):505-17.
- [8] Schijns V, Brewer J. "Immunopotentiators in Modern Vaccines" (IMV-II) held in Malaga, Spain, May 18-20, 2005. *Vaccine* 2006 Jun 29;24(26):5391-2.
- [9] Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 2009 May 26;27(25-26):3331-4.
- [10] Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004 Nov;24(6):693-701.

- [11] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002 Feb 13;1589(1):1-13.
- [12] Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2002 Jun;1(1):111-8.
- [13] Simmons CP, Ghaem-Magami M, Petrovska L, Lopes L, Chain BM, Williams NA, et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand J Immunol* 2001 Mar;53(3):218-26.
- [14] Conceicao FR, Moreira AN, Dellagostin OA. 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* 2006 Jul 17;24(29-30):5734-43.
- [15] Romero JF, Ciabattini A, Guillaume P, Frank G, Ruggiero P, Pettini E, et al. Intranasal administration of the synthetic polypeptide from the C-terminus of the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* with the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) induces a complete protection against malaria challenge. *Vaccine* 2009 Feb 18;27(8):1266-71.
- [16] Yamamoto T, Tamura T, Yokota T. Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for humans. *J Biol Chem* 1984 Apr 25;259(8):5037-44.
- [17] Hofstra H, Witholt B. Heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. Kinetics of association of subunits into periplasmic holotoxin. *J Biol Chem* 1985 Dec 15;260(29):16037-44.
- [18] Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, et al. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 1993 Apr 5;230(3):890-918.
- [19] Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BA, Witholt B, et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 1991 May 30;351(6325):371-7.

- [20] Gill DM, Rappaport RS. Origin of the enzymatically active A1 fragment of cholera toxin. *J Infect Dis* 1979 Jun;139(6):674-80.
- [21] Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992 Dec;56(4):622-47.
- [22] de Haan L, Verweij WR, Feil IK, Holtrop M, Hol WG, Agsteribbe E, et al. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology* 1998 Jul;94(3):424-30.
- [23] Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, Monaci E, Douce G, Dougan G, et al. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine* 2001 Mar 21;19(17-19):2534-41.
- [24] Alone PV, Garg LC. Secretory and GM1 receptor binding role of N-terminal region of LT_B in *Vibrio cholerae*. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Nov 28;376(4):770-4.
- [25] Ryan EJ, McNeela E, Pizza M, Rappuoli R, O'Neill L, Mills KH. Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. *J Immunol* 2000 Nov 15;165(10):5750-9.
- [26] Petrovska L, Lopes L, Simmons CP, Pizza M, Dougan G, Chain BM. Modulation of dendritic cell endocytosis and antigen processing pathways by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and mutant derivatives. *Vaccine* 2003 Mar 28;21(13-14):1445-54.
- [27] Pitcovski J, Bazak Z, Wasserman E, Elias O, Levy A, Peretz T, et al. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. *Vaccine* 2006 Jan 30;24(5):636-43.

- [28] Fu N, Khan S, Quinten E, de Graaf N, Pemberton AJ, Rivett AJ, et al. Effective CD8(+) T cell priming and tumor protection by enterotoxin B subunit-conjugated peptides targeted to dendritic cells. *Vaccine* 2009 Aug 20;27(38):5252-8.
- [29] Fromantin C, Jamot B, Cohen J, Piroth L, Pothier P, Kohli E. Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response. *J Virol* 2001 Nov;75(22):11010-6.
- [30] Weltzin R, Guy B, Thomas WD, Jr., Giannasca PJ, Monath TP. Parenteral adjuvant activities of Escherichia coli heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric Helicobacter pylori infection. *Infect Immun* 2000 May;68(5):2775-82.
- [31] Stephenson I, Zambon MC, Rudin A, Colegate A, Podda A, Bugarini R, et al. Phase I evaluation of intranasal trivalent inactivated influenza vaccine with nontoxigenic Escherichia coli enterotoxin and novel biovector as mucosal adjuvants, using adult volunteers. *J Virol* 2006 May;80(10):4962-70.
- [32] Domingos MO, Andrade RG, Barbaro KC, Borges MM, Lewis DJ, New RR. Influence of the A and B subunits of cholera toxin (CT) and Escherichia coli toxin (LT) on TNF-alpha release from macrophages. *Toxicon* 2009 Apr;53(5):570-7.
- [33] Stevens LA, Moss J, Vaughan M, Pizza M, Rappuoli R. Effects of site-directed mutagenesis of Escherichia coli heat-labile enterotoxin on ADP-ribosyltransferase activity and interaction with ADP-ribosylation factors. *Infect Immun* 1999 Jan;67(1):259-65.
- [34] 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. *Vet Immunol Immunopathol* 2006 Aug 15;112(3-4):253-63.

- [35] Pizza M, Fontana MR, Giuliani MM, Domenighini M, Magagnoli C, Giannelli V, et al. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J Exp Med* 1994 Dec 1;180(6):2147-53.
- [36] Dickinson BL, Clements JD. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 1995 May;63(5):1617-23.
- [37] Giuliani MM, Del Giudice G, Giannelli V, Dougan G, Douce G, Rappuoli R, et al. Mucosal adjuvant activity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. *J Exp Med* 1998 Apr 6;187(7):1123-32.
- [38] Kende M, Tan X, Wlazlowski C, Williams R, Lindsey C, Del Giudice G. Enhancement of intranasal vaccination with recombinant chain A ricin vaccine (rRV) in mice by the mucosal adjuvants LTK63 and LTR72. *Vaccine* 2007 Apr 20;25(16):3219-27.
- [39] Brynjolfsson SF, Bjarnarson SP, Mori E, Del Giudice G, Jonsdottir I. Neonatal immune response and serum bactericidal activity induced by a meningococcal conjugate vaccine is enhanced by LT-K63 and CpG2006. *Vaccine* 2008 Aug 18;26(35):4557-62.
- [40] Zhang GG, Li DX, Zhang HH, Zeng YM, Chen L. Enhancement of mucosal immune response against the M2eHBc⁺ antigen in mice with the fusion expression products of LTB and M2eHBc⁺ through mucosal immunization route. *Vet Res Commun* 2009 Oct;33(7):735-47.
- [41] Haan L, Verweij WR, Holtrop M, Brands R, van Scharrenburg GJ, Palache AM, et al. 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* 2001 Apr 6;19(20-22):2898-907.

- [42] Xu Y, Zhang H, Xu X. Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008 Jan;52(1):99-109.
- [43] Guarena-Burgueno F, Hall ER, Taylor DN, Cassels FJ, Scott DA, Wolf MK, et al. Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine administered transcutaneously. *Infect Immun* 2002 Apr;70(4):1874-80.
- [44] Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko SY, Park SH, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 5;105(5):1644-9.
- [45] Zhou WY, Shi Y, Wu C, Zhang WJ, Mao XH, Guo G, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine* 2009 Aug 6;27(36):5013-9.
- [46] Zhou F, Goodsell A, Uematsu Y, Vajdy M. Prolonged protection against Intranasal challenge with influenza virus following systemic immunization or combinations of mucosal and systemic immunizations with a heat-labile toxin mutant. *Clin Vaccine Immunol* 2009 Apr;16(4):471-8.
- [47] Palma C, Iona E, Giannoni F, Pardini M, Brunori L, Fattorini L, et al. The LTK63 adjuvant improves protection conferred by Ag85B DNA-protein prime-boosting vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection by dampening IFN-gamma response. *Vaccine* 2008 Aug 5;26(33):4237-43.
- [48] Bonenfant C, Dimier-Poisson I, Velge-Roussel F, Buzoni-Gatel D, Del Giudice G, Rappuoli R, et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2001 Mar;69(3):1605-12.

- [49] Facciabene A, Aurisicchio L, Elia L, Palombo F, Mennuni C, Ciliberto G, et al. Vectors encoding carcinoembryonic antigen fused to the B subunit of heat-labile enterotoxin elicit antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Vaccine* 2007 Dec 21;26(1):47-58.
- [50] Guidry JJ, Cardenas L, Cheng E, Clements JD. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 1997 Dec;65(12):4943-50.
- [51] Cao S, Zhang Y, Liu F, Wang Q, Zhang Q, Liu Q, et al. Secretory expression and purification of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit and its applications on intranasal vaccination of hantavirus. *Mol Biotechnol* 2009 Feb;41(2):91-8.
- [52] De Haan L, Hearn AR, Rivett AJ, Hirst TR. Enhanced delivery of exogenous peptides into the class I antigen processing and presentation pathway. *Infect Immun* 2002 Jun;70(6):3249-58.
- [53] Nashar TO, Betteridge ZE, Mitchell RN. Evidence for a role of ganglioside GM(1) in antigen presentation: binding enhances presentation of *Escherichia coli* enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4(+) T cells. *International Immunology* 2001;13(4):541-51.
- [54] Bone H, Eckholdt S, Williams NA. Modulation of B lymphocyte signalling by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Int Immunol* 2002 Jun;14(6):647-58.
- [55] Williams NA. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. *International Journal of Medical Microbiology* 2000;290(4-5):447-53.
- [56] Yamamoto M, McGhee JR, Hagiwara Y, Otake S, Kiyono H. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology* 2001;53(3):211-7.

- [57] Nashar TO, Hirst TR, Williams NA. Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. *Immunology* 1997;91(4):572-8.
- [58] Zhou WY, Shi Y, Wu C, Zhang WJ, Mao XH, Guo G, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine* 2009;27(36):5013-9.
- [59] Zhang X, Yuan Z, Duan Q, Zhu H, Yu H, Wang Q. Mucosal immunity in mice induced by orally administered transgenic rice. *Vaccine* 2009 Mar 4;27(10):1596-600.
- [60] 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* 2005 Sep 7;23(38):4685-96.
- [61] Fischer G, Conceicao FR, Leite FPL, Moraes CM, Ferreira LN, Vilela CO, et al. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* Mar;26(3):489-95.
- [62] Richards CM, Aman AT, Hirst TR, Hill TJ, Williams NA. Protective mucosal immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection in mice by using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit as an adjuvant. *J Virol* 2001 Feb;75(4):1664-71.
- [63] Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, et al. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 2006 Apr 5;24(15):2815-23.
- [64] Ricci S, Medaglini D, Rush CM, Marcello A, Peppoloni S, Manganelli R, et al. Immunogenicity of the B monomer of *Escherichia coli* heat-labile toxin expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun* 2000 Feb;68(2):760-6.

- [65] Giannelli V, Fontana MR, Giuliani MM, Guangcai D, Rappuoli R, Pizza M. Protease susceptibility and toxicity of heat-labile enterotoxins with a mutation in the active site or in the protease-sensitive loop. *Infect Immun* 1997 Jan;65(1):331-4.
- [66] De Haan L, Holtrop M, Verweij WR, Agsteribbe E, Wilschut J. Mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the recombinant A subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Immunology* 1999 Aug;97(4):706-13.
- [67] Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, Snelgrove R, Rae A, Rappuoli R, et al. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. *J Immunol* 2004 Dec 15;173(12):7435-43.
- [68] Ryan EJ, McNeela E, Murphy GA, Stewart H, O'Hagan D, Pizza M, et al. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular pertussis vaccine: differential effects of the nontoxic AB complex and enzyme activity on Th1 and Th2 cells. *Infect Immun* 1999 Dec;67(12):6270-80.
- [69] Tritto E, Muzzi A, Pesce I, Monaci E, Nuti S, Galli G, et al. The acquired immune response to the mucosal adjuvant LTK63 imprints the mouse lung with a protective signature. *J Immunol* 2007 Oct 15;179(8):5346-57.
- [70] Olafsdottir TA, Hannesdottir SG, Giudice GD, Trannoy E, Jonsdottir I. Effects of LT-K63 and CpG2006 on phenotype and function of murine neonatal lymphoid cells. *Scand J Immunol* 2007 Oct;66(4):426-34.
- [71] Simmons CP, Mastroeni P, Fowler R, Ghaem-maghami M, Lycke N, Pizza M, et al. MHC class I-restricted cytotoxic lymphocyte responses induced by enterotoxin-based mucosal adjuvants. *J Immunol* 1999 Dec 15;163(12):6502-10.
- [72] Ugozzoli M, Santos G, Donnelly J, O'Hagan DT. Potency of a genetically detoxified mucosal adjuvant derived from the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LTK63) is not

adversely affected by the presence of preexisting immunity to the adjuvant. *J Infect Dis* 2001 Jan 15;183(2):351-4.

[73] Rocha ADR, Conceicao FR, Grassmann AA, Lagranha VL, Dellagostin OA. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. *Canadian Journal of Microbiology* 2008 Aug;54(8):677-86.

[74] Qiao XY, Li GW, Wang XQ, Li XJ, Liu M, Li YJ. Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice. *Bmc Microbiology* 2009 Dec;9.

[75] Lim JG, Kim JA, Chung HJ, Kim TG, Kim JM, Lee KR, et al. Expression of Functional Pentameric Heat-Labile Enterotoxin B Subunit of *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009 May;19(5):502-10.

[76] Ma XY, Bi Y, Zheng WY, Li LF. Comparative Study on Characterization of Recombinant B Subunit of *E. coli* Heat-Labile Enterotoxin (rLTB) Prepared from *E. coli* and *P. pastoris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* Mar;20(3):550-7.

[77] Kim TG, Kim BG, Kim MY, Choi JK, Jung ES, Yang MS. Expression and Immunogenicity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin B Subunit in Transgenic Rice Callus. *Molecular Biotechnology* Jan;44(1):14-21.

[78] Kim TG, Kim MY, Kim BG, Kang TJ, Kim YS, Jang YS, et al. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Protein Expression and Purification* 2007;51(1):22-7.

[79] Loc NH, Bach NH, Kim TG, Yang MS. Tissue culture and expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic *Peperomia pellucida*. *Protein Expr Purif* Jul;72(1):82-6.

[80] Kang TJ, Han SC, Kim MY, Kim YS, Yang MS. Expression of non-toxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco chloroplasts. *Protein Expr Purif* 2004 Nov;38(1):123-8.

[81] Covone MG, Brocchi M, Palla E, Dias da Silveira W, Rappuoli R, Galeotti CL. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 1998 Jan;66(1):224-31.

Table 1. Adjuvanticity of LTB in different animal models.

Model/ Disease	Treatment ^a	Route of immunization	Effect on			Protection	Reference
			Ab response	T cell response	Th1/Th2		
Chicken/ IBDV	LTB + VP2	i.m.	nil	nt	nt	nt	[34]
Chicken/ IBDV	LTB-VP2	i.m.	yes	nt	nt	100 %	[60]
Chicken/ IBDV	LTB-VP2	oral	yes	nt	nt	22 %	[60]
Mice/ SuHV-1	LTB + SuHV-1	i.m.	Yes (high)	nt	nt	56%	[61]
Mice/ SuHV-1	LTB + SuHV-1	s.c.	Yes (low)	nt	nt	32%	[61]
Chicken/ EDS	LTB + Knob	oral and s.p.	yes	nt	nt	nt	[34]
Chicken/ EDS	LTB + Knob	i.m.	nil	nt	nt	nt	[34]
Mice/ Influenza	LTB + A:PR8	i.n. and i.m.	yes	nt	both	100 %	[41]
Mice/ <i>H. pylori</i>	LTB + urease	s.c.	yes	nt	both (high Th1)	yes	[30]
Mice/ <i>H. pylori</i>	LTB + urease	oral	yes	nt	lower	0	[30]
Mice/ <i>M.hyo</i> pneumoniae	LTB-R1	i.m.	yes	nil	Th2	nt	[14]
Mice/ <i>M.hyo</i> pneumoniae	LTB-R1	i.n.	yes	IFN- γ	Th1	nt	[14]
Mice/ CEA	CEA-LTB	i.m.	yes	NK and CD8+ T-cell	nt	nt	[49]

Footnote: Ab, antibody; A:PR8, influenza subunit antigen derived from influenza strain A:Puerto Rico:8:34 (A:PR8); CEA, carcinoembryonic antigen; EDS, adenovirus egg-drop syndrome; *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; IBDV, infectious bursal disease virus; i.d., intradermal; i.m., intramuscular; i.n., intranasal; Knob, Knob part of the fiber protein of egg drop syndrome adenovirus; *M. hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*; nt, not tested; R1, repeat region of *M. hyopneumoniae* P97 adhesin; s.c., subcutaneous; s.p., skin patch; SuHV-1, Suid herpesvirus type 1; Urease, *Helicobacter pylori* urease antigen; VP2, viral protein 2 of infectious bursal disease virus.

^aLTB-Antigen= fusion of LTB and antigen; LTB + Antigen= co-administration of LTB and antigen.

Table 2. Adjuvanticity of LTK63 administered via mucosal or parenteral routes.

Model/ Disease	Treatment ^a	Route of immunization	Effect on			Protection	Reference
			Ab response	T cell response	Th1/Th2		
Mice/ <i>P. berghei</i>	LTK63+PbC SP 242–310	i.n.	yes	yes	nt	100%	[15]
Mice/ -	LTK63	i.p.m.	nt	yes	nt	nt	[69]
<i>B. pertussis</i>	LTK63 + KLH	s.c.	yes	yes	Both (high Th1)	nt	[25]
Mice/ <i>S.pneumonia</i>	LTK63 + Pnc1-TT	s.c.	yes	yes	nt	nt	[70]
Mice/ HPV 16	L1/L2- LTK63 cVLPs	i.m.	Yes (neut)	yes	both	nt	[42]
Mice/ MenC	LTK63+Me nC- CRM(197)	s.c.	yes	nt	Th1	yes	[39]
Mice/ MenC	LTK63+Me nC- CRM(197)	i.n.	yes	nt	both	yes	[39]

Footnote: Ab, antibody; *B. pertussis*, *Bordetella pertussis*; HPV 16, human papillomavirus type 16; i.m., intramuscular; i.p.m., intrapulmonary; i.n., intranasal; s.c., subcutaneous. KLH, Keyhole limpet hemocyanin (KLH); L1/L2-LTK63 cVLPs, LTK63 fused to the HPV 16 chimeric virus-like particles (cVLPs); MenC, meningococcal serogroup C; MenC-CRM(197), MenC polysaccharide conjugate; neut, neutralizing; nt, not tested; *P. berghei*, *Plasmodium berghei*; PbCSP 242–310, T cell peptide epitope from *P. berghei*; Pnc1-TT, pneumococcal polysaccharide of serotype 1 conjugated to tetanus toxoid (TT); *S. pneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*

^aLTB-Antigen= fusion of LTB and antigen; LTB + Antigen= co-administration of LTB and antigen.

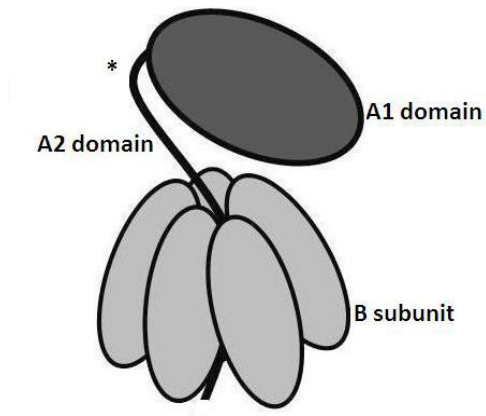


Fig. 1. Schematic structure of heat-labile enterotoxin produced by *E. coli*. The globular structure of A subunit (A_1 domain) is linked to the B subunit by a trypsin sensitive loop (*) and a long α -helix (A_2 domain), the C-terminal of which enters the central cavity of the B pentamer.

6 ARTIGO 2

THE EFFECT OF LTK63 AND LTB ADJUVANTS ON RECOMBINANT VACCINE EFFICACY IN INFECTION AND CO-INFECTION MODELS WITH *Schistosoma mansoni* AND *Plasmodium chabaudi*

**THE EFFECT OF LTK63 AND LTB ADJUVANTS ON RECOMBINANT
VACCINE EFFICACY IN INFECTION AND CO-INFECTION MODELS WITH
Schistosoma mansoni AND *Plasmodium chabaudi***

Vanusa P. da Hora^{a,b,‡}; Fernanda. C. Cardoso^b; Mary Duke^c; Melissa Kuwahata^c; Angela Trieu^b; Sérgio Costa^d; Giuseppe Del Giudice^e; Fabricio R. Conceição^f; Don P. McManus^c; Odir. A. Dellagostin^a; Denise. L. Doolan^b

^aLaboratório de Biologia Molecular and ^fLaboratório de Imunologia Aplicada, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 96010-900, RS, Brazil.

^bMolecular Vaccinology Laboratory; ^cMolecular Parasitology Laboratory, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, QLD 4006, Australia.

^dDepartamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil.

^eNovartis Vaccines srl, Siena, Italy.

[‡] Present address: Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 96200-190, RS, Brazil.

Corresponding author: Odir A. Dellagostin, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. Phone: +55 53 3275 7587; Fax +55 53 3275 7551; E-mail: odir@ufpel.edu.br

Running title: Adjuvants and vaccine efficacy during co-infection.

Keywords: LTB, LTK63, Sm29, AMA-1, *Schistosoma*, *Plasmodium*

Abstract

There is considerable overlap in the geographical and socio-economic distribution of *Schistosoma* and malaria infection. The proteins Sm29 and AMA-1 are promising vaccine candidates against *Schistosoma* and malaria infections, respectively. The non-toxic derivatives of the heat-labile toxin of *Escherichia coli* LTB and LTK63 have been reported as a powerful adjuvants. The objective of this study was to evaluate the vaccine efficacy of recombinants Sm29 and AMA-1 formulated with LTB or LTK63 adjuvants in a mouse model of *Schistosoma* and *Plasmodium chabaudi* AS infection and co-infection. Recombinant LTK63 elicited high levels of antigen specific antibodies and cytokines to rSm29 and rAMA-1 than did rLTB. Naïve mice immunized with rLTK63+rAMA-1 had a reduction in the *P. chabaudi* parasitemia. Co-infected mice immunized with rLTK63+rSm29 were protected against schistosomiasis; mice vaccinated with rLTK63+rAMA-1 showed reduction in the *P. chabaudi* parasitemia peak. Taken together, our data suggest that co-infection results in a positive trend in vaccine efficacy of rSm29 and rAMA-1 when formulated with rLTK63 adjuvant.

1. Introduction

Malaria, caused by the protozoan parasite *Plasmodium*, is the most important human parasitic disease in terms of death and clinical cases. Schistosomiasis, caused by the trematode worm *Schistosoma*, is the most important human helminth infection in terms of morbidity (Chitsulo, 2000; Garcia, 2010). Their coexistence is common event in populations in most endemic areas, mainly in tropical regions. In these regions, the association with both parasites is a confounding factor in assessing the effectiveness of interventions to control those diseases (Druilhe et al., 2005). Immunity to both parasites is extremely complex and still not well understood. *Schistosoma* spp. elicits in the host a response significantly associated with interferon (IFN)- γ during the acute infection and interleukine (IL)-10 during the chronic phase (at the time point of egg production) followed by a concomitant down regulation of T helper cells type 1 (Th1) cytokines (Montenegro et al., 1999). The host response to the initial phase of malaria infection is usually followed by the production of proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- α and IFN- γ (Good, 2005). In a later stage of infection, after the peak of parasitemia, CD4 + T cells express a Th2 cytokine profile. Co-infection by *Schistosoma* and *Plasmodium* have an important influence on the regulation of cytokine production and its balance is critical to determine the pathology or protection (Lyke et al., 2006; Muok et al., 2009, Wilson et al., 2009; Diallo et al., 2010). The consequences of the association between schistosomiasis and malaria have been studied in humans and mice. However, the knowledge of how such concurrent infections affect the immune response of each other is still limited (Diallo, 2004; Brooker et al., 2007; Hartgers et al., 2009; Muok, 2009; Wilson et al., 2009; 2010; Waknin-Grinberg et al., 2010). Furthermore, current findings are controversial, since they suggest a number of scenarios in which the co-infection may not only increase the susceptibility to

infection, but also protect against severe disease in certain circumstances (Helmby et al., 1998; Brooker et al., 2007; Laranjeiras et al., 2008; Hartgers et al., 2009; Sangweme et al., 2009; Waknin-Grinberg et al., 2010).

Great efforts are being made aiming to produce vaccines to those parasites (Tram et al., 2006; Barclay et al., 2008; Cardoso et al., 2008; Jiang et al., 2009), though, no vaccine is commercially available yet (McManus, 2008; Good, 2009). The protein Sm29, a *S. mansoni* Apical Membrane Proteins, has been tested for its potential as vaccine to *Schistosoma* (Cardoso et al., 2006; 2008). The recombinant Sm29 was strongly recognized by antibodies of naturally resistant individuals living in endemic areas (Cardoso et al., 2006). Immunization of mice with rSm29 elicited reduction in the parasite load, its protection was related with Th1 immune response (Cardoso et al., 2008). One of the leading *Plasmodium* blood-stage vaccine candidate antigens is apical membrane antigen 1 (AMA-1) which is a merozoite surface protein and have been extensively studied using several species of *Plasmodium* (Bueno et al., 2008; Spring et al., 2009; Stanisic et al., 2009). Immunization with AMA-1 confers protection against parasite challenge in animal model (Anders, 1998; Xu et al., 2000; Stowers et al., 2002). The protection of mice afforded by the *P. chabaudi* AMA-1 protein is closely related to Th1 and Th2 response (Su et al., 2003; Burns et al., 2004). For any subunit vaccine, the selection of the most effective adjuvant is important for optimal vaccine efficacy. The heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LT) consists of an enzymatically active A subunit (LTA) and a pentameric B subunit (LTB). LT has been extensively studied as a potent modulator of immune responses but wild-type LT is toxic (De Haan et al., 1998). The non-toxic LTB and the LT mutant LTK63 (which has a serine to lysine substitution at aminoacid 63 of the A subunit) has been reported as powerful mucosal and parenteral adjuvants. They are able to increase the immune responses of molecules fused or

co-administered to them inducing Th1 and/or Th2 immune response (Fingerut et al., 2006; Conceição et al., 2006; Brynjolfsson, 2008; Romero, 2009).

Although the consequences of the association between schistosomiasis and malaria have been reported, there are no studies about co-infection and its influence in the performance of immune responses mediated by vaccines. Co-infection may induce a change in immune response to vaccination and its need to be evaluated. Furthermore, in spite of Sm29 and AMA-1 are promising candidates against schistosomiasis and malaria, further studies need to be performed to enhance the effectiveness of those vaccines. In this way, the objective of this study was to evaluate the vaccine efficacy of recombinant Sm29 and AMA-1 formulated with LTB and LTK63 adjuvants in infection and co-infection models with *S. mansoni* and *P. chabaudi chabaudi*.

2. Materials and Methods

2.1. Mice and Parasites

Female C57BL/6J mice 6 to 8 week-old were purchased from Animal Resources Centre (Perth, Australia). The animals were maintained in the animal facility at Queensland Institute of Medical Research and supplied with food and water ad libitum.

The Puerto Rican strain of *S. mansoni* and *Biomphalaria glabrata* snails were provided by the National Institutes of Allergy and Infectious Diseases Schistosomiasis Resource Centre at the Biomedical Research Institute (Rockville, Maryland, USA). To obtain cercariae, *B. glabrata* snails infected with miracidia were exposed to incandescent light for 1 h and then washed twice in RPMI 1640, 1% antibiotic/antimycotic and 10 mM Hepes (Invitrogen) before experimentation. Cercariae were used to infect mice. The rodent malaria parasite *P. chabaudi chabaudi* strain AS was maintained by intra peritoneal (i.p.) passaging of 10^5 parasited red blood cells (pRBCs) into

naive recipient mice. Prior to any infection the percentage of parasitemia was checked every 2 days by blood smears, which were obtained from tail tips and stained with Giemsa. If it was greater than 5%, then the mouse was ready to be harvested for the pRBCs the following day. For each infection, mice were intravenous (i.v.) injected with fresh parasited RBCs from a passaged mouse. All animal studies were approved by the Queensland Institute of Medical Research Animal Ethics Committee.

2.2. Recombinant Proteins

Recombinants ectodomain of *P. chabaudi adami* DS AMA1 (rAMA1) (which is homologous to *P. c. chabaudi* AS) and rLTK63 were produced and purified as described by Crewther et al (1996) and Douce et al (1995), respectively. Refolded, *E. coli*-expressed, rAMA-1B and rLTK63 were kindly provided by Melisa Kuwahata and by Novartis Vaccines (Siena, Italy), respectively. Recombinant Sm29 (rSm29) was produced and purified as previously described (Cardoso et al., 2006).

The *sm29* gene was cloned into pAE/*ltb* vector allowing the fusion of the C-terminal region of *ltb* with the N-terminal of *sm29* gene. For this purpose, the *sm29* forward and reverse primers were constructed allowing a *Kpn*I and *Hind*III restriction site (underlined) insertion, respectively, for the correct reading frame fusion of the 3' end of *ltb* with the 5' end of *sm29* gene. The *sm29* gene was amplified from pET*sm29* by PCR using the Mastercycler EP gradient S thermocycler (Eppendorf), with the following program: 92 °C for 2 min followed by 35 cycles of 92 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 68 °C for 1 min, with a final extension of 68 °C for 7 min. The reactions were performed in final volume of 25 µl consisting of 0.4 mM dNTP (Invitrogen, USA), 0.2 µM of each forward and reverse primer (Sigma-Aldrich, AU), 2.5 µl of Expand High Fidelity (Roche) 10x buffer with 1.5 mM MgCl₂, 0.37 µl (1.3 unit) of Expand High

Fidelity enzyme mix (Roche), 19.13 μ l of Milli-Q water and 20 ng of template DNA. The *sm29* forward primer 5'-CCCGGTACCGTGCGTTGCTACGTCTG-3', and the reverse primer 5'-CCCAAGCTTATTTTGTTCATTCCGTTACATAG-3', were used in this study. The *ltb* gene was previously cloned (kindly supplied by Conceição, UFPel, Brazil) into plasmid pAE (Ramos et al., 2004), an expression vector coding for six N-terminally located histidine residues (6xHis). After PCR amplification, the *sm29* product was purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following manufacturer's instructions. Purified PCR product and the plasmid pAE/LTB were digested with *Kpn*I and *Hind*III restriction endonuclease (New England Biolabs, NEB), purified and ligated using T4 DNA ligase (NEB), creating the plasmid pAE/*ltb-sm29*. Plasmid DNA was characterized by PCR (using the Sm29 primes), restriction enzyme digestion (*Bam*HI and *Hind*III, *Xma*I and *Bgl*II) and DNA sequencing using the T7 forward and reverse universal primer with the Big Dye Terminator Mix (ABI Prism) (conducted by QIMR core facility).

Expression and purification of recombinant LTB-Sm29 and LTB in *Escherichia coli* is briefly described below. The *E. coli* strain BL21 (DE3) (Novagen) containing the recombinant plasmid pAE/LTB-Sm29 and pAE/LTB was grown at 37 °C to an OD₆₀₀ of 0.6. The expression of rLTB-Sm29 and rLTB was induced by 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The cultures were then incubated for additional 4 h and cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris HCl and 20 mM imidazole, pH 8.0). Cells were lysed by 3 times sonication at 30% of amplitude and after centrifugation at 10.000 x *g*, at 4 °C for 20 min, the supernatant was collected. Recombinant LTB-Sm29 and LTB were recovered as inclusion bodies and resuspended in 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris HCl, 20 mM imidazole and 8 M urea, pH 8.0. Proteins were purified by metal affinity chromatography using Ni-NTA Protein Purification System (QIAGEN), according the manufacture's protocol.

After purification, the denaturing buffer was exchanged by PBS buffer (pH 7.4) using a PD-10 desalting column (GE Healthcare) and 10% glycerol was added to recombinant proteins.

2.3. Recombinant Proteins Characterization

The purity of the recombinant proteins was assessed by SDS-PAGE according to the method of Laemmli (1970). Proteins were loaded into 12% polyacrylamide gel and ran with NuPage MOPS SDS running buffer, using an Xcell Surelock mini-cell apparatus (Invitrogen) following manufacturer's guidelines. The sample buffer used in SDS-PAGE contained β -mercaptoethanol as reducing agent. The concentration of recombinant proteins was measured by the Bradford method, using a Protein Assay (Bio-Rad); and by SDS-PAGE using a curve of bovine serum albumin (BSA) as molecular mass standard. The purity of rLTB-Sm29, rLTB and rSm29 was accessed by Western blot. After SDS-PAGE, the gel was transferred to a nitrocellulose membrane using the XCell Blot module (Invitrogen). Membranes were blocked overnight with 2% of BSA in phosphate buffer saline (PBS) at room temperature. Subsequently, the membrane was washed three times with PBS-T (PBS with 0.05% Tween 20) and incubated with anti-6xHis antibodies (Sigma) diluted to 1:5000 in PBS-T and incubated for 1 h at room temperature. After three washes using PBS-T the membrane was incubated in 1:1 Immun-star HRP enhancer and peroxide buffer (Bio-Rad) then exposed to Fuji film (Tokyo, Japan) for immune-detection. BenchmarkTM Prestained Protein Ladder (Invitrogen) was used as molecular mass standard.

2.4. GM1-ELISA

The adjuvantivity of LTB is related to bind to the cell surface receptor, the GM1 ganglioside (De Haan et al., 1998). Binding of the rLTB-Sm29 and rLTB to GM1 ganglioside

was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Liljeqvist et al., 1997). Briefly, MaxiSorp 96 well flat bottom plate (NUNC, Denmark) was coated overnight at 4 °C with 50 µL of bovine GM1 (Sigma) at 400 ng/well diluted in carbonate–bicarbonate buffer, pH 9.6, followed by blocking in 2% BSA in PBS-T solution for 1 h at 37 °C. rLTB-Sm29, rLTB, rSm29 and CT diluted in PBS were added in triplicate at 400 ng/well (50 µL), incubated at 37 °C for 1 h. Subsequently, the plate was incubated at 37 °C for 1 h with 50 µL of 1:800 mouse IgG anti-Sm29 or 1:3000 rabbit IgG anti-cholera toxin (Sigma) in PBS-T. After three PBS-T washes, the plate was incubated for 1 h at 37 °C with 50 µL of 1:1000 goat IgG anti-mouse peroxidase conjugate or 1:2500 goat IgG anti-rabbit peroxidase conjugate. The reactions were developed using 50 µL/well of TMB substrate reagent set (BD Biosciences) and stopped by the addition of 50 µL/well of TMB stop reagent (Sigma). Absorbance was read at 450 nm using a VERSAmax™ microplate reader (MDS Analytical Technologies) 20 min later. Wells with rSm29, CT and PBS were used as control. The same experiment was performed in plates without GM1 in order to check the specific GM1-bind affinity of the rLTB-Sm29 and rLTB proteins.

2.5. Experimental infections

In this study, prior to immunizations mice were either (1) uninfected (naïve), (2) pre-infected with *S. mansoni* or *P. c. chabaudi* AS alone or (3) co-infected with *S. mansoni* and *P. c. chabaudi* AS. For pre-infection with *S. mansoni*, mice were anaesthetised with injectable anaesthetic ketamine/xylazine and received 30 *S. mansoni* cercariae by abdominal skin penetration (Harn et al., 1984). In order to clear the adult parasites, at day 42 post infection, those mice were treated with Praziquantel, as a single dose of 300 mg/kg per mouse by gavage. Pre-infection of mice with *P. c. chabaudi* AS was done by an i.v. infection with 10^3 *P. c. chabaudi* AS pRBCs. Two days after, those mice were treated to clear the parasites with Malarone (200 mg

atovaquone + 80 mg proguanil hydrochloride) as a daily oral dose (via gavage) during 3 days. They were monitored for check the parasitemia clearance every day by blood smears for 3 days. Co-infection was performed infecting mice first with 30 *S. mansoni* cercariae by abdominal skin penetration and 23 days post cercariae infection they were i.v. co-infected with 10^3 *P. c. chabaudi* AS pRBCs. Two days later co-infection, mice were drug cured to eliminate the malaria parasites with Malarone (same scheme used during pre-infection) and the parasitemia monitored by blood smears every day for 3 days. These mice were drug cured to clear the *S. mansoni* adult worms at day 19 after co-infection (42 days post *S. mansoni* infection) with Praziquantel (same used for cure pre-infection). They were then immunized 49 days post cercariae infection and/or 25 post *P. c. chabaudi* AS infection.

2.6. Immunization

To evaluate the protective efficacy and immunogenicity conferred by vaccines, mice were segregated according to their characteristics, either for schistosomiasis or malaria, in three study groups defined as: 1) naïve; 2) pre-infected; and 3) co-infected. The immunization scheme is presented in Tab. 1. For all studies, mice were immunized in the nape of the neck with 3 doses of recombinant vaccine candidates (formulated with adjuvants) or controls with an interval of 15 days between each dose. For schistosomiasis, mice were immunized with 14 µg of rSm29; and for malaria , with 5 µg of rAMA-1 AS; both recombinants proteins were co-administered or fused with either adjuvants (1) 10 µg of rLTB or (2) 8 µg of rLTK63. Control groups were immunized with PBS, rLTB or rLTK63. For control groups, the amount of recombinant proteins was the same used in the immunization protocol. For immunological assessment, mice were sacrificed 14 days after the last immunization.

Mice from naïve and pre-infected study, for schistosomiasis, were divided into six groups of 10 mice/group and immunized with either: (1) rLTB-Sm29; (2) rLTB+rSm29; (3) rLTK63+rSm29; (4) rLTB; (5) rLTK63; and (6) PBS. For malaria, mice were allocated to five groups of 10 mice/group and immunized with either: (1) rLTB+rAMA-1; (2) rLTK63+rAMA-1; (3) rLTB; (4) rLTK63; and (5) PBS.

Mice from co-infected study were separated into three groups of 10 mice/group for schistosomiasis or 8 mice/group for malaria. For schistosomiasis mice were immunized with: (1) rLTB+rSm29 and (2) rLTK63+rSm29. For malaria, mice were immunized with: (1) rLTB+rAMA-1 and (2) rLTK63+rAMA-1. Control group was immunized with PBS.

2.7. Parasite challenge

For the schistosomiasis study, seven mice from each group were challenged with 100 *S. mansoni* cercariae by abdominal skin penetration two weeks after the last immunization and then evaluated for protection 6 weeks post challenge. Mice were sacrificed, perfused with PBS from the mesenteric veins and the worm burden was counted. Protection was calculated using the equation $[(C-V)/C].100$, where C is the average number of worms in control animals and V is the average number of worms in vaccinated animals.

For the malaria study, five mice were i.v. infected with 10^3 *P. c. chabaudi* AS pRBCs two weeks after the last immunization. Two days post-challenge mice were monitored for parasitemia for 14 days by blood smears, which were obtained from thin tail tips and stained with Giemsa. Parasitemias were examined by microscopic examination of stained blood films and percentages of parasitised erythrocytes were calculated.

2.8. Immunological assessment

2.8.1. Measurement of specific antibodies by ELISA

Mice were bled via tail-tip (10 µl of whole blood, diluted in 90 µl of PBS) prior to immunization and after each immunization until sacrifice. The profile of specific rSm29 or rAMA-1 antibodies was determined by indirect ELISA. Maxisorp 96-well microtiter plates (Nunc, Denmark) were coated overnight at 4 °C with 50 µl of 5 µg/ml of rSm29 (schistosomiasis study) or 1 µg/ml of rAMA-1 (malaria study) diluted in carbonate–bicarbonate buffer, pH 9.6. After three PBS-T washes, plates were blocked with 100 µl of 2% BSA in PBS-T for 2 h at 37 °C and then washed again. Sera pool were diluted in PBS-T and 50 µl of them added in triplicate at dilutions of 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 and 1:3200 or 1:50 to evaluate the titer of total IgG or to determine its subtypes profile, respectively. Following incubation at 37 °C for 1 h, plates were washed three times with PBS-T and incubated at 37 °C for 1 h with 50 µl of peroxidase conjugated anti-mouse either IgG (1:10000), IgG1 (1:5000) or IgG2a (1:2000) (Sigma). The isotyping was performed following manufacturer's instructions. The reactions were developed using 50 µl/well of TMB substrate reagent set (BD Biosciences) and stopped by the addition of 50 µl/well of TMB stop reagent (Sigma), after five PBS-T washes. Absorbance was read at 450 nm using a VERSAmax™ microplate reader (MDS Analytical Technologies) 20 min later.

2.8.2. Splenocyte cultures and Cytometric bead array (CBA)

Splenocyte cultures were prepared using three or five individual mice/group from schistosomiasis or malaria study, respectively. Mice were sacrificed two weeks after the last immunization and splenocytes were harvested and macerated in wash medium (Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma) plus 2% of heatinactivated fetal calf serum (FCS). Splenic RBCs were lysed in a red cell removal buffer (9 g NH₄Cl /L) at 37° and splenocytes were rinsed

with wash medium and resuspended in grow medium (Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) supplemented with 50 μ M 2-mercaptoethanol, 216 mg/L L-glutamine, 100 U/ml penicillin G sodium, 100 μ g/ml streptomycin sulfate and 10% heatinactivated FCS). Spleen cells were then adjusted to 0.5×10^6 cells/ 200 μ L well and polymyxin B (Sigma) (30 μ g/ml) was added to the cultures, in order to abrogate the cytokine response to lipopolysaccharide as previously described (Cardoso et al., 2007). Splenocytes were maintained in culture with grow medium alone or stimulated with either rSm29 (10 μ g/ml), rLTB (10 μ g/ml), rLTK63 (8 μ g/ml) or concanavalin A (ConA) (5 μ g/ml) at 37 °C and 5% CO₂ in flat-bottomed 96-well microtiter plates.

Culture supernatants were collected after 36 h, 48 h, 72 h and 96 h of stimulation and analyzed for the presence of IFN- γ , TNF α , and interleukin 13 using the BD™ CBA mouse/rat soluble protein flex set (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Analysis was performed on a FACSArray cytometer equipped with CellQuest Pro and CBA software (BD Biosciences). Postacquisition data analyses were performed using FlowJo Software V7.0 (Tree Star, Inc.).

2.9. Statistical analysis

Data were evaluated by unpaired Student's *t*-test using the computer software package Prism 4.0 (GraphPad, Inc.). A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. Values of *p* are indicated in the figures by the following symbols: *, 0.01–0.05; **, 0.001–0.01; ***, < 0.001.

3. Results

3.1. Production of recombinant proteins

The *sm29* was successfully inserted downstream of *ltb* gene creating the *ltbsm29* chimera. Sequencing of the chimeric gene showed 100% identity with *ltb* and *sm29* genes. *E. coli* BL21 (DE3) transformed with the expression plasmids pAE/*ltb-sm29* and pAE/*ltb* expressed recombinant proteins LTB-Sm29 and LTB (data not shown). They were obtained as inclusion bodies, purified under denaturing conditions and refolded in renaturing buffer. The expression of refolded rLTB-Sm29, rLTB and rSm29 is shown in Fig. 1. This figure shows the recombinant LTB-Sm29, LTB and Sm29 proteins with apparent molecular mass of 30, 13 and 17 kDa, respectively. During the refolding process, some protein was lost in a precipitated form, but yielded enough soluble recombinant protein to be used in the experiments.

3.2. GM1 binding assay

Purified rLTB-Sm29 and rLTB produced in *E. coli* were also tested for its biological activity by studies on its ability to bind to GM1 ganglioside in ELISA experiments. The GM1-binding capacity was detected with anti-rSm29 and anti-CT antibodies (Fig. 2). The results indicated that both recombinant proteins have GM1 ganglioside-binding capacity and showed that the fusion of the Sm29 to the 3' terminus of the LTB did not impair its ability to bind to GM1 receptor. Mean absorbance of the rLTB-Sm29 detected with anti-rSm29 showed statistical significance (p , 0.001–0.010) when compared to controls (rLTB, CT and PBS). Interestingly, the mean absorbance between rLTB-Sm29 and PBS was lower when this recombinant protein was detected by anti-CT, but the mean absorbance was still significant (p , 0.001–0.010). Following detection with anti-CT antibody, the mean absorbance of rLTB revealed significant ($p < 0.0001$) ganglioside-binding capacity when compared to rLTB-Sm29, rSm29 and PBS. Recombinant proteins and negative controls were not detected in microplates without GM1.

3.3. Antibody response to rSm29 and rAMA-1 following immunization

Pre-challenge sera collected 15 days after the last immunization were pooled and assayed in triplicate. To evaluate the titer of specific IgG to rSm29 or rAMA-1, pooled sera were assayed at dilutions of 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 and 1:3200. The specific anti-rSm29 or anti-rAMA-1 IgG1 and IgG2a antibodies levels were also evaluated in sera pool diluted 1:50.

Fig. 3 shows total IgG, IgG1 and IgG2a responses to rSm29 induced by vaccination from mice of the schistosomiasis study. The titer for total IgG is presented in Fig. 3A, Mice immunized with rLTK63+rSm29, in all studies, had high titer of rSm29-specific IgG antibodies. For pre-infected mice, this vaccine, together with rLTBSm29, induced the highest anti-rSm29 IgG titers (>3200). Fig. 3B shows the levels of IgG1 antibodies to rSm29. Overall, the levels of IgG1 did not change among the studies even for mice immunized with rSm29 co-administered with LTB or rLTK63 or fused with LTB. On the other hand, levels of IgG2a (Fig. 3C) induced by vaccines varied among studies. Pre-infected mice immunized with rLTB-Sm29 or rLTK63+rSm29 produced the highest amount of IgG2a. Analysis of the IgG1/IgG2a ratio showed that mice immunized with rLTK63+rSm29 produced a balanced IgG1/IgG2a ratio for naïve (1.78), pre-infected (1.2) and co-infected (2.24) studies. Immunization of pre-infected mice with rLTB-Sm29 also induced a balanced ratio (2.28).

Total IgG, IgG1 and IgG2a responses to rAMA-1 produced by vaccination of mice of the malaria study are presented in Fig. 4. The titer of total IgG is presented in Fig. 4A, which shows that rLTB+rAMA-1 elicited the highest titer of total IgG anti-rAMA-1 in naïve mice and rLTK63+rAMA-1 induced a high titer in co-infected ones. The level of specific IgG1 anti-rAMA-1 is shown in Fig. 4B. Naïve mice immunized with rAMA-1 co-administered with rLTB or rLTK63 produced the highest levels of IgG1 antibodies to rAMA-1. The level of IgG1 was the same in pre and co-infected mice immunized with rLTK63+rAMA-1. All vaccines elicited very

low levels or failed to induce IgG2a to rAMA-1 in all studies (data not shown). The IgG1/IgG2a ratio was high for all vaccines, indicating a Th2 type immune response induced by vaccination.

3.4. Cytokine profile produced by spleen cells of immunized mice

Cytokine production by spleen cells of immunized mice was measured two weeks after the third immunization by CBA. Culture supernatants collected 36 h after stimulation were used for measuring the cytokines. Fig. 5 shows the cytokine profile of splenocytes of mice from schistosomiasis study upon *in vitro* stimulation with rSm29 (10 µg/mL). Spleen cells of three individual mice/group were analyzed. Cytokine production by vaccinated naïve mice is presented in Fig. 5A. Naïve mice immunized with rLTK63+rSm29 showed a significant IFN- γ production compared with mice vaccinated with rLTB-Sm29 and PBS (p , 0.01–0.05). Mice immunized with rLTB+rSm29 showed a low but significant production of cytokines comparing with mice inoculated with PBS (IFN- γ and IL-13, p , 0.01–0.05; TNF- α , p <0.001). Interestingly, pre-infected mice immunized with rSm29 mixed or fused with rLTB or co-administered with rLTK63 generated low and irrelevant levels of IFN- γ and TNF- α and did not produce IL-13 (data not shown). Fig. 5B shows the concentration of cytokine produced by co-infected mice followed by vaccination. *S. mansoni*-*P. chabaudi*-infected mice vaccinated with rLTK63+rSm29 had significant production of IFN- γ and TNF- α comparing with those immunized with rLTB+rSm29 (p , 0.01–0.05). In general, the adjuvant rLTK63 induced in mice (either naïve, pre-infected or co-infected) higher levels of specific IFN- γ , IL-13 and TNF- α to rSm29 than induced by rLTB. Vaccine rLTK63+rSm29 elicited mainly a Th1 pattern of cytokine. Regarding the influence of infection and co-infection in the efficacy of vaccines, we observed a ranged in the concentration

of cytokines elicited by vaccines among studies. Even though differences among studies in the production of cytokines elicited by rLTK63+rSm29 exist, they were not statistically significant (data not shown). However, our data suggest that the co-infection had a negative influence in cytokine production elicited by rLTK63+rSm29. On the other hand, the amount of cytokines induced by rLTB+rSm29 was low and basically did not change according to the infection condition of mice prior to immunization.

Fig. 6 presents the cytokine production by individual spleen cells (stimulated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of rAMA-1) from mice of the malaria study, immunized with rAMA-1 co-administered with rLTB or rLTK63. Spleen cells of three individual mice/group were analyzed for naïve and double-infected mice and five for pre-infected ones. Only naïve mice immunized with rLTK63+rAMA-1 generated IFN- γ , despite its mean concentration was 570 times greater than for those inoculated with PBS, it did not show statistically significant difference. Production of IL-13 and TNF- α by those animals was low and not relevant for both vaccines (data not shown). Fig. 6A shows the cytokines production by splenocytes from pre-infected mice after immunization. Vaccination with rLTK63+rAMA-1 elicited in those mice a high and significative level of IFN- γ , IL-13 and TNF- α compared with the ones immunized with rLTB+rAMA-1 and PBS. Fig. 6B presents the mean concentration of cytokines for co-infected mice. Animals vaccinated with rLTK63+rAMA-1 generated significant levels of IFN- γ (p , 0.01–0.05) and IL-13 (p , 0.001–0.01) when contrasted with PBS inoculated group; mice immunized with rLTB+rAMA-1 also had significative IFN- γ production comparing with PBS group (p , 0.01–0.05). Overall, the antigen rAMA-1 administered with the adjuvant rLTK63 elicited higher levels of antigen-specific IFN- γ and IL-13 than when co-administered with rLTB. The cytokines induced by rLTK63+rAMA-1 suggests a Th1/Th2-like response elicited by this vaccine. Considering the infection condition of

mice prior to vaccination (uninfected, pre or co-infected), in general, we found that both vaccines induced high levels of specific cytokines to rAMA-1 in co-infected mice. Therefore, the concomitant schistosomiasis-malaria infection had a positive influence in the cytokine production to rAMA-1. Interestingly, rLTB+rAMA-1 elicited a significant cytokine production only in *S. mansoni*-*P. chabaudi* infected mice. Those animals presented a predominant Th2 immune response.

3.5. Determination of vaccine efficacy

In order to assess the vaccine potential of rSm29 and rAMA-1 against schistosomiasis and malaria, respectively, we investigated the protection induced by these recombinant antigens administered with either rLTK63 or rLTB adjuvants in infection and co-infection murine model of *S. mansoni* and *P. chabaudi*. Naïve, pre-infected or co-infected C57BL/6J mice were immunized with three doses of rSm29 mixed with either rLTK63 or rLTB or fused to LTB. After the last immunization they were challenged with 100 *S. mansoni* cercariae. Forty-five days post parasite challenge mice were sacrificed and worm burden recovery was determined for each animal. Interestingly, only co-infected mice vaccinated with rLTK63+rSm29 had a significative reduction of 46.45% in adult worm burden (p , 0.01–0.05) compared with the PBS control group (Fig. 7).

To determine the parasitemia of mice from malaria study, uninfected, pre-infected or co-infected mice were challenged with 10^3 *P. chabaudi* AS pRBCs two weeks after the last immunization. Mice were then monitored for parasitemia for 14 days by blood smears. Fig. 8 shows the malaria parasitemia curve. Interestingly, malaria parasitemia was higher in naïve mice than in pre or co-infected ones. We observed a decreased peak of parasitemia in pre and co-infected groups. Mice with concomitant *S. mansoni*-*P. chabaudi* infection had a different kinetics

of parasitemia, manifesting malaria faster (peak of parasitemia on day 7) than the others (naïve, on day 10; pre-infected on day 9). On the other hand, they did not present increased malaria parasitaemia (compared with naïve or pre-infected mice) or delayed reduction/clearance in parasitaemia. In fact those mice presented the shortest parasitemia cycle. A trend for protection was observed in both, co-infected as well as naïve mice vaccinated with rLTK63, as indicated by both peak parasitemia and ‘area under the curve’ (AUC). Regarding naïve mice, the rLTK63+rAMA-1 group had consistently lower parasitemia at all timepoints throughout the infection, so the AUC was lower/smaller than for the other groups. Co-infected mice vaccinated with rLTK63+rAMA-1 showed the lowest parasitemia of the study and had 31% reduction in the peak of parasitemia compared with PBS. Mice immunized with rLTB+rAMA-1 had also a small reduction in the parasitemia peak.

4. Discussion

Concomitant infections are common in nature and often involve parasites. Schistosomiasis and malaria divide common transmission areas in a range of tropical areas. The knowledge about effects of concurrent infections on the immune response of each infection is scarce. Such comprehension is essential for the rational design and optimization of vaccine protocols, since co-infection may influence the efficiency of vaccines for schistosomiasis or malaria (Diallo et al. 2004; Brooker et al., 2007; Hartgers et al., 2009; Muok et al., 2009; Wilson et al., 2009; 2010; Waknin-Grinberg et al., 2010). In this report, we evaluated the ability of rSm29 and rAMA-1 formulated with rLTB or rLTK63 adjuvants to stimulate murine humoral and cellular immune responses as well as to induce protective immunity with regard to infection and co-infection models with *S. mansoni* and *P. c. chabaudi* AS.

Protective immunity of naïve mice vaccinated with rSm29 plus Freund's adjuvant (FA) have been correlated with production of high titers of specific anti-rSm29 IgG1 and IgG2a and elevated production of IFN- γ , TNF- α and IL-12, a typical Th1 response (Cardoso et al., 2008). In our study, naïve mice immunized with rLTK63+rSm29 produced a high and balanced ratio of IgG1/IgG2a and the highest amount of IFN- γ comparing with pre and co-infected mice. Moreover, naïve mice generated a low production of TNF- α in response to rLTK63+rSm29. Despite having showed a Th1 type of immune response, mice were not protected against *S. mansoni* infection. Even though IFN- γ seems to be important in the induction of resistance to *S. mansoni* in the murine model (Hewitson et al., 2005; Cardoso, 2008), a Th1-polarizing immunity can be correlated with severe exacerbation of immunopathology in mouse schistosome infection (Rutitzky et al., 2001). Besides IFN- γ , a high production of TNF- α is strongly associated with schistosomiasis protection in naïve mice (Fonseca et al., 2004). In this regard, we hypothesized that an exacerbated production of IFN- γ and a low amount of TNF- α elicited by rLTK63+rSm29 might be related with the lack of protection of naïve mice. Pre-infected mice immunized with rLTK63+rSm29 and rLTB-Sm29 produced in serum a balanced IgG1/IgG2a ratio comparing with naïve or co-infected mice. According to humoral responses achieved by pre-infected mice vaccinated with rLTK63+rSm29 or rLTB-Sm29, we were expecting that those mice could generate some IFN- γ , once such cytokine induces the production of IgG2a (Finkelman et al., 1990). In contrast, they generated low and irrelevant levels of IFN- γ and TNF- α and did not produce IL-13. Moreover, those mice did not show any protection after *S. mansoni* challenge.

Although there are some studies about the co-infection of malaria and schistosomiasis and its influence in the immunity to *Schistosoma* parasites, there are no studies that examine the effect of dual infection in the immune response mediated by *Schistosoma* vaccines. Our data

demonstrate that the concurrent *Plasmodium* infection is downregulating the production of IgG2a and increasing the amount of cytokines engendered by rLTK63+rSm29. Reduction of antibodies and Th2 cytokines responses to SEA, induced by concomitant infection of *S. mansoni* and *P. chabaudi*, were previously found in mouse model (Helmby et al., 1998). The initial phase of malaria infection usually stimulates the production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IFN- γ (Good, 2005). Thereby it can explain the increase in TNF- α and IFN- γ production by co-infected mice. Usually after egg position, infection with helminths induces the immune system towards Th2 response, characterized by high levels of IL-4, IL-5 and IL-13 (Maizels et al., 2003). Herein, we observed that the Th1 response typical of *P. chabaudi* infection appears to have some influence in the IL-13 production, once its level was not high in co-infected mice. Furthermore, co-infected mice followed by challenge infection with *S. mansoni* cercariae resulted in reduction of 46.45 % for mean adult worm burdens after immunization with rSm29 plus rLTK63. In this regarding, rLTK63+rSm29 provided protection to double-infected mice, according of the 40% benchmark set by the World Health Organization for progression of schistosome vaccine antigens into clinical trials (Chitsulo, 2004). Hence, our results postulate that presence of *S. mansoni*-*P. chabaudi*-infection modulates the immune response elicited by rLTK63+rSm29 vaccine toward reduction of schistosome worm burden. The immunoprotection against infection by *S. mansoni* is not well understood. Some studies showed that protection of mice seems to be mediated by both Th1 and Th2 cells (Jankovic et al., 1999; Wynn et al., 2000; McManus et al., 2008) while others correlates protection to Th1 response only (Fonseca et al., 2004; Hewitson et al., 2005; Cardoso, 2008). Our findings suggest a tendency of a Th1-biased cytokines and a mixed Th1/Th2 pattern of immune response according the antibody isotypes subset induced by rLTK63+rSm29 vaccination in *S. mansoni*-*P. chabaudi*-infected mice.

In spite of immunity the complexity of the immunity to *Plasmodium*, resistance against the parasite have been identified and protection is defined as evidence of a lower risk of clinical disease, as indicated by the absence of fever (in the presence of parasitemia), and low parasite density (Doolan et al., 2009). Herein, we considered as protected those animals with lower densities of parasitemia. In resistant mice, the protection conferred by the *P. chabaudi* AMA-1 (PcAMA-1) protein seems to be related to production of antibodies IgG1 and IgG2a and IFN- γ (Xu et al., 2000; Su et al., 2003). In this report, naïve mice upon immunization with rLTK63+rAMA-1 produced high levels of rAMA-1-specific IgG1 and IFN- γ and did not induce IgG2a, IL-13 and TNF- α . Notably, *P. chabaudi* parasitemia was higher in naïve mice than in pre or co-infected ones. All time points of parasitemia analysis for naïve mice vaccinated with rAMA-1 plus rLTK63 showed a decreased in the parasite density. Probably it is associated with the IFN- γ and the IgG1 production engendered by that vaccine. A study indicated that IFN- γ was associated with protection against malaria (Yoshida et al., 2000). Concerning mice pre-infected with *P. chabaudi*, these animals vaccinated with rLTK63+rAMA-1 produced low amount of total rAMA-1-specific IgG and IgG2a, high level of IgG1 and significant amount of IFN- γ , IL-13 and TNF- α when compared with rLTB+rAMA-1 or PBS. We observed that the parasitemia curve of pre-infected mice was lower than in naïve ones. Perhaps it is due a partial natural acquired immunity after the cycle of infection-cure to induce a pre-infection condition. Although the profile of cytokines and antibodies elicited by rLTK63+rAMA-1 is known to elicit protection by rAMA-1 antigens, those mice were not protected. Although IFN- γ , IgG1 and IgG2a are closely associated with protection of malaria, a study showed that mice immunized with rAMA-1 were resistant to infection by *P. chabaudi* in the absence of these molecules, suggesting that they might not be strict essential for PcAMA-1 vaccine-induced protection (Burns et al., 2004).

Co-infected mice produced greater amounts of IL-13 than did naïve or pre-infected animals vaccinated with rLTK63+rAMA-1. Moreover, co-infection reduced TNF- α concentration and did not change the IFN- γ level induced by rLTK63+rAMA-1 comparing with *P. chabaudi* infection only. Previously, Helmby et al (1998) found similar results to TNF- α and IFN- γ production by *S. mansoni*-*P. chabaudi* infected mice. Our results illustrate that the concomitant *S. mansoni* infection upregulates the production of IL-13 to rAMA-1 stimulated by rLTK63. As described before, infection with *Schistosoma* typically induces a predominant Th2 response (Maizels et al., 2003) then an increasing in the IL-13 concentration could be expected in double infected mice. In addition, IL-13 is known to antagonize Th1 responses (Wen et al., 2002) through inhibition of IL-12 production (Muchamuel, et al., 1997) which is recognized to induce a successful Th1-type immune responses (Magram et al., 1996). Thus, we postulate that IL-13 suppress the TNF- α production induced by rLTK63+rAMA-1 in double infected mice, but was insufficient for preventing IFN- γ production. In this study, we found that mice with concomitant *S. mansoni*-*P. chabaudi* infection manifested malaria rapidly than the others, but they did not had an increase in parasite density or delayed reduction/clearance in parasitaemia. It is reasonable to speculate that the initial immunological mechanism involved in the parasite control, mediated by a Th1 response, was altered by the Th2 immunity induced by schistosomiasis infection after egg laying. Then, it could collaborate to the rapid parasitemia observed in mice from co-infection study. On the other hand, Helmby and co-workers (1998) have found that mice with patent *S. mansoni* infection developed higher malaria parasitemias following infection with blood-stage *P. chabaudi* AS probably due to a defect in TNF- α production (Helmby et al., 1998). It is important to highlight that they used a higher concentration of *P. chabaudi* during infection than in the present study. In contrast, our study shows that co-infected mice had a drop in the parasite

density despite have a TNF- α reduction. Double infected animals vaccinated with PcAMA-1 plus rLTK63 had a significant reduction in the parasitemia peak comparing with PBS group. The partial protection achieved by these mice seems to be related to the elevation of anti-inflammatory cytokine IL-13 and decrease of pro-inflammatory TNF- α . We can conclude that the co-infection with *S. mansoni* had a positive influence to the vaccine performance of rLTK63+rAMA-1, which engendered a balanced Th1/Th2 immune response in co-infected mice. Similar supporting data are evident from studies of *P. berghei* which suggest that the decreasing of TNF- α and increasing of IL-10 were correlated to extend *P. berghei*-infected mice survival (Omer et al., 2000).

The adjuvant activity of non-toxic derivatives of LT, LTB and LTK63, can vary depending the route of administration and dose (Brynjolfsson et al., 2008; Fischer et al., 2010). In most of studies those molecules are used as mucosal adjuvants (Fingerut et al., 2006; Romero et al., 2009) however its activity as parenteral adjuvant have been reported (Weltzin et al., 2000; Xu et al., 2008). Overall, our data show that the adjuvant rLTK63 elicited high production of antigen specific antibodies and cytokines to rSm29 and rAMA-1 than that ones induced by rLTB, either in naïve, pre-infected or co-infected mice. Similarly, other studies have shown the ability of rLTK63 in enhance antibody and cytokine responses to co-administered antigens injected subcutaneously (Ryan et al., 2000; Olafsdottir et al., 2007; Brynjolfsson et al., 2008). Our results stress the immunomodulatory effects of rLTK63 as parenteral adjuvant. Taken together, our results show that rLTB was not able to stimulate the immune system in most of situations analyzed in this study. The rLTB and rLTB-Sm29 showed capacity to bind to GM1 receptor and were able to induce antibodies and cytokine production. Then, we believe the overall unsuccessful of rLTB in enhance the immune response of antigens was not due a fail during the construction of chimera or expression of proteins. The competence of LTB to modulate or improve vaccine-induced immune responses appears to depend to some extent on the vaccination

route, as showed by Fischer and co-workers (2010). In this way, we can suggest that the route of administration of rLTB vaccines might be influencing its performance in our study, so an alternative route need to be assessed. The fusion was able to induce IgG1/IgG2a antibodies to rSm29 unlike co-administration of rLTB plus rSm29 or rAMA-1 induced only IgG1. Our finds highlight the perception of to some constructions a link between LTB and antigen seems to be necessary to promote immunity to the target antigen (Fingerut et al., 2005; 2006). It is important to emphasize that rLTB mixed to rAMA-1 elicited significant amount of cytokines in co-infected mice and induced a small reduction in the parasitemia peak in these animals. In conclusion, the present study demonstrated that the profile of antigen specific antibodies, cytokines and protection elicited by rSm29 or rAMA-1 vaccines was strongly influenced by the different adjuvants and for the infection situation of mice prior immunization.

In sumary, the adjuvant rLTK63 induced in mice the highest level of antibodies and cytokines and elicited protection. Interestingly, co-infection showed a positive trend in vaccine efficacy in both, schistosomiasis and malaria study.

Acknowledgments

This work was supported by the National Health and Medical Research Council (Australia). VPH received a scholarship from CAPES.

5 References

- Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew MLSM, Pollock B, Pye D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 1998;(16):240-247.
- Barclay VC, Chan BHK, Anders RF, Read AF. Mixed allele malaria vaccines: Host protection and within-host selection. *Vaccine* 2008;(26):6099–6107.
- Beadle C, McElroy PD, Oster CN, Beier JC, Oloo AJ, Onyango FK, Hoffman SL. Impact of transmission intensity and age on *Plasmodium falciparum* density and associated fever: implications for malaria vaccine trial design. *J. Infect. Dis.* 1995;(172):1047–1054.
- Brooker S, Akwale W, Pullan R, Estambale B, Clarke SE, Snow RW, Hotez JP. Epidemiology of *Plasmodium* –helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *Am J Trop Med Hyg* 2007;(77):88–98.
- Brynjolfsson SF, Bjarnarson SP, Mori E, Del Giudice G, Jonsdottir I. Neonatal immune response and serum bactericidal activity induced by a meningococcal conjugate vaccine is enhanced by LT-K63 and CpG2006. *Vaccine* 2008;26(35):4557-62.
- Bueno LL, Fujiwara RT, Soares IS, Braga EM. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response. *Vaccine* 2008;(26): 1204—1213.
- Burns Jr JM, Flaherty PR, Nanavati P, Weidanz WP. Protection against *Plasmodium chabaudi* Malaria Induced by Immunization with Apical Membrane Antigen 1 and Merozoite Surface

Protein 1 in the Absence of Gamma Interferon or Interleukin-4 *Infect Immun* 2004;(72):5605–5612.

Cardoso FC, Pacífico RNA, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin Exp Immunol* 2006; (144):382–391.

Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, Melo AL, Caliari MV, Almeida GT, Venancio TM, Verjovski-Almeida S, Oliveira SC. *Schistosoma mansoni* tegument protein sm29 is able to induce a th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; (10):e308.

Cardoso LS, Araujo MI, Goes AM, Pacifico LG, Oliveira RR. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact* 2007;(6):1–6.

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

Chitsulo L, Loverde P, Engels D. Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol* 2004;(2):12–3.

Coelho PMZ, Toppa NH, Feldman JS, Gonçalves R, Mello RT. *Schistosoma mansoni*: Permanence of modulation of the granulomatous inflammatory response in mice cured in the chronic phase. *Int J Parasitol* 1996;(26):1393-5.

Conceicao FR, Moreira AN, Dellagostin OA. 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* 2006 Jul 17;24(29-30):5734-43

Cortés A, Mellombo M, Masciantonio R, Murphy VJ, Reeder JC, Anders RF. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun*. 2005;(73):422–30.

Crewther PE, Matthew MLSM, Flegg RH, Anders RF. Protective Immune Responses to Apical Membrane Antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* Involve Recognition of Strain-Specific Epitopes. *Infect Imm* 1996;8(64):3310–3317.

Crutcher JM, Stevenson MM, Sedegah M, Hoffman SL. Interleukin-12 and malaria. *Res Immunol* 1995;(146)552–9.

de Haan L, Verweij WR, Feil IK, Holtrop M, Hol WG, Agsteribbe E, et al. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology* 1998 Jul;94(3):424-30.

Diallo TO, Remoue F, Schacht AM, Charrier N, Dompnier JP, Pillet S, Garraud O, N'diaye AA, Capron A, Capron M, Riveau G. Schistosomiasis co-infection in humans influences inflammatory markers in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunology* 2004;(26):365–369.

Diallo TO, Remoue F, Gaayeb L, Schacht AM, Charrier N, De Clerck D, Dompnier JP, Riveau G. Schistosomiasis Coinfection in Children Influences Acquired Immune Response against Plasmodium falciparum Malaria Antigens. PLoS ONE 2010;5(9):e12764.

Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired Immunity To Malaria. Clinical Microbiology Reviews 2009;(22):13–36.

Douce G, Turcotte C, Cropley I. Mutants of Escherichia coli heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. Proc Natl Acad Sci USA 1995;(92):1644–8.

Druilhe P, Tall A, Sokhna C. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? Trends Parasitol 2005;(21):359-362.

Farah IO, Johansson M, Loè Vgren-Bengtson K, Hau J. Schistosoma mansoni in Mice: the Pattern of Primary Cercarial Exposure Determines Whether a Secondary Infection Post-chemotherapy Elicits a T Helper 1- or a T Helper 2-Associated Immune Response. Scand J Immunol 2000;(51):237-243.

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 2005 Sep 7;23(38):4685-96.

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. Vet Immunol Immunopathol 2006 Aug 15;112(3-4):253-63.

Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban Jr JF, Beckmann MP, Park LS. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;(8):303–33.

Fonseca CT, Brito CFA, Alves JB, Oliveira SC. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- γ and TNF- α dependent pathway. *Vaccine* 2004;(22):503–510.

Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Moraes CM, Ferreira LN, Vilela CO, et al. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* Mar;26(3):489-95.

Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*. 2010;30(1):93-129.

Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 2005;(23):69–99.

Good MF. The hope but challenge for developing a vaccine that might control malaria. *Eur J Immunol* 2009;(39):939–943.

Harn DA, Mitsuyama M, David JR. *Schistosoma mansoni*: anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. *J Exp Med* 1984;(159):1371–1387.

Hartgers FC, Obeng BB, Kruize YCM, Dijkhuis A, McCall M, Sauerwein RW, Luty AJF, Boakye DA, Yazdanbakhsh M. Responses to malarial antigens are altered in helminth-infected children. *The Journal of Infectious Diseases* 2009;(35)1528 –35.

Helmby H, Kullberg M, Troye-Blomberg M. Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect Immun* 1998;(66):5167–5174.

Hewitson JP, Hamblin PA, Mountford AP. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol* 2005;(27)271–280.

Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, James S, Cheever AW, Sher A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *J Immunol* 1999;(162):345–351.

Jiang G, Shi M, Conteh S, Richie N, Banania G, Geneshan H, Valencia A, Singh P, Aguiar J, Limbach K, Kamrud KI, Rayner J, Smith J, Bruder JT, King CR, Tsuboi T, Takeo S, Endo Y, Doolan DL, Richie TL, Weiss WR. Sterile Protection against *Plasmodium knowlesi* in Rhesus Monkeys from a Malaria Vaccine: Comparison of Heterologous Prime Boost Strategies. *PLoS ONE* 2009;4(8):e6559.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;(227):680–5.

Laranjeiras RF, Brant LCC, Lima ACL, Coelho PMZ, Braga EM. Reduced protective effect of *Plasmodium berghei* immunization by concurrent *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(7):674-677.

Legesse M, Erko B, Balcha F. Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium berghei* co-infected mice. *Acta Tropica* 2004;(91):161–166.

Liljeqvist S, Stahl S, Andr Eoni C, Binz H, Uhlen M, Murby M. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. *J Immunol Methods* 1997;(210):125–35.

Lyke KE, Dabo A, Sangare L, Arama C, Daou M, Diarra I, Plowe CV, Doumbo OK, Sztein MB. Effects of concomitant *Schistosoma haematobium* infection on the serum cytokine levels elicited by acute *Plasmodium falciparum* malaria infection in malian children. *Infect Imm* 2006;74(10):5718–5724.

Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1992;(4):471–481.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2003;(3):733–744.

Mcmanus DP, Loukas A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2008;21(1):225–242.

Montenegro S, Miranda P, Mahanty S, Abath F, Teixeira K, Coutinho EM, Brinkman J, Gonçalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA. 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* 1999;(179):1502-1514.

Muchamuel T, Menon S, Pisacane P, Howard MC, Cockayne DA. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF- α , IFN- γ , and IL-12 production. *J Immunol* 1997;(158):2898–2903.

Muok EM, Mwinzi PN, Black CL, Carter JM, Ng'ang'a ZW, Gicheru MM, Secor WE, Karanja DM, Colley DG. Childhood coinfections with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma mansoni* result in lower percentages of activated T cells and T regulatory memory cells than schistosomiasis only. *Am J Trop Med Hyg* 2009;(80):475-478.

Olafsdottir TA, Hannesdottir SG, Giudice GD, Trannoy E, Jonsdottir I. Effects of LT-K63 and CpG2006 on phenotype and function of murine neonatal lymphoid cells. *Scand J Immunol* 2007 Oct;66(4):426-34

Omer F, Kurtzhals J, Riley E. Maintaining the immunologic balance in parasitic infections: a role for TGF- β . *Parasitol Today* 2000;(16):18–23.

Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG. Reduced Interleukin-12 and Transforming Growth Factor- β 1 in Severe Childhood Malaria: Relationship of Cytokine Balance with Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases* 2000;(182):988–92.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian J Medical Biological Research* 2004;37(8)

Romero JF, Ciabattini A, Guillaume P, Frank G, Ruggiero P, Pettini E, Del Giudice J, Medaglini D, Corradin G. Intranasal administration of the synthetic polypeptide from the C-terminus of the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* with the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) induces a complete protection against malaria challenge. *Vaccine* 2009;27(8):1266-71.

Rutitzky LI, Hernandez HJ, Stadecker MJ. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. *PNAS* 2001;98(23):13243–13248.

Ryan EJ, McNeela E, Pizza M, Rappuoli R, O'Neill L, Mills KH. Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. *J Immunol* 2000 Nov 15;165(10):5750-9.

Sangweme D, Shiff C, Kumar N. *Plasmodium yoelii*: Adverse Outcome of Non-lethal *P. yoelii* Malaria during Co-infection with *Schistosoma mansoni* in BALB/c Mouse Model. *Exp Parasitol* 2009;122(3):254–259.

Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, Dutta S, Reidler R. Phase 1/2a Study of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Administered in Adjuvant System AS01B or AS02A. *PLoS ONE* 2009;4(4):e5254.

Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, Gilson PR, Murphy VJ, Anders RF, Mueller I, Beeson JG. Immunoglobulin G Subclass-Specific Responses against

Plasmodium falciparum Merozoite Antigens Are Associated with Control of Parasitemia and Protection from Symptomatic Illness. *Infect Immun* 2009;77(3):1165–1174.

Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, Miller LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun* 2002;(70):6961–7.

Su Z, Tam M, Jankovic D, Stevenson MM. Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 2003;(71):5178–5187.

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

Waknine-Grinberg JH, Gold D, Ohayon A, Flescher E, Heyfets A, Doenhoff MJ, Schramm G, Haas H, Golenser J. *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. *Malaria Journal* 2010;9:5

Weltzin R, Guy B, Thomas WD, Jr., Giannasca PJ, Monath TP. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2000 May;68(5):2775-82.

Wen FQ, Kohyama T, Liu X, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, Kobayashi T, Abe S, Spurzem JR, Rennard SI. Interleukin-4- and interleukin-13-enhanced transforming growth factor-beta2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(4):484-90.

Wilson S, Jones FM, Mwatha JK, Kimani G, Booth M, Kariuki HC, Vennervald BJ, Ouma JH, Muchiri E, Dunne DW. Hepatosplenomegaly associated with chronic malaria exposure: evidence for a pro-inflammatory mechanism exacerbated by schistosomiasis. *Parasite Immunology* 2009;(31):64–71.

Wilson S, Vennervald BJ, Kadzo H, Ireri E, Amaganga C, Booth M, Kariuki HC, Mwatha JK, Kimani G, Ouma JH, Muchiri E, Dunne DW. Health implications of chronic hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children chronically exposed to malarial infections and *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104(2):110–116.

Wynn TA, Hoffmann KF. Defining a schistosomiasis vaccination strategy-is it really Th1 versus Th2? *Parasitol Today* 2000;16(11):497–501.

Xu H, Hodder AN, Yan H, Crewther PE, Anders RF, Good MF. T Cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. *J Immunology* 2000;(165):389–396.

Xu Y, Zhang H, Xu X. Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52(1):99–109.

Yoshida A, Maruyama H, Kumagai T, Amano T, Kobayashi F, Zhang M, Himeno K, Ohta N. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int Immunol* 2000;(12):1117–1125.

Tab. 1. Immunization regimen employed to examine the protective efficacy and immunogenicity conferred by rSm29 and rAMA-1 formulated with either rLTB or rLTK63 adjuvants in infection/co-infection model.

Study/Vaccines	Mice condition prior vaccination		
	Naive	pre-infected with	<i>S.mansoni</i> - <i>P. chabaudi</i> - co-infected
Schistosomiasis			
		<i>S. mansoni</i>	
rLTB-Sm29	x	x	-
rLTB+rSm29	x	x	x
rLTK63+rSm29	x	x	x
rLTB	x	x	-
rLTK63	x	x	-
PBS	x		x
Malaria			
		<i>P. chabaudi</i>	
rLTB+rAMA-1	x	x	x
rLTK63+rAMA-1	x	x	x
rLTB	x	x	
rLTK63	x	x	
PBS	x	x	x

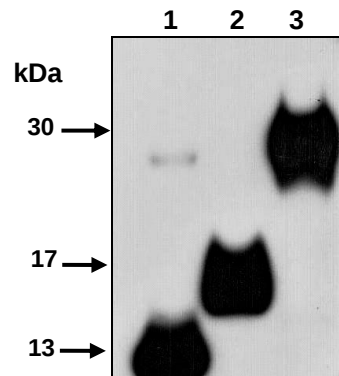


Fig. 1. Western blot analysis of the refolded proteins using anti6xHis antibody. rLTB, rSm29 and LTB-Sm29 were applied onto 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by western blot. Lane 1: rLTB; lane 2: rSm29; lane 3: rLTB-Sm29. Arrow indicates the apparent molecular mass.

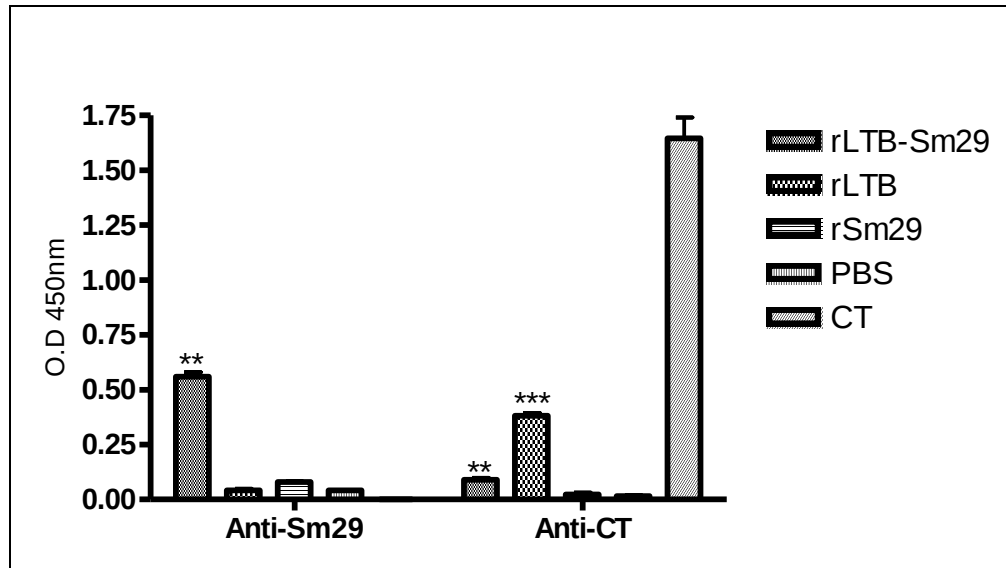
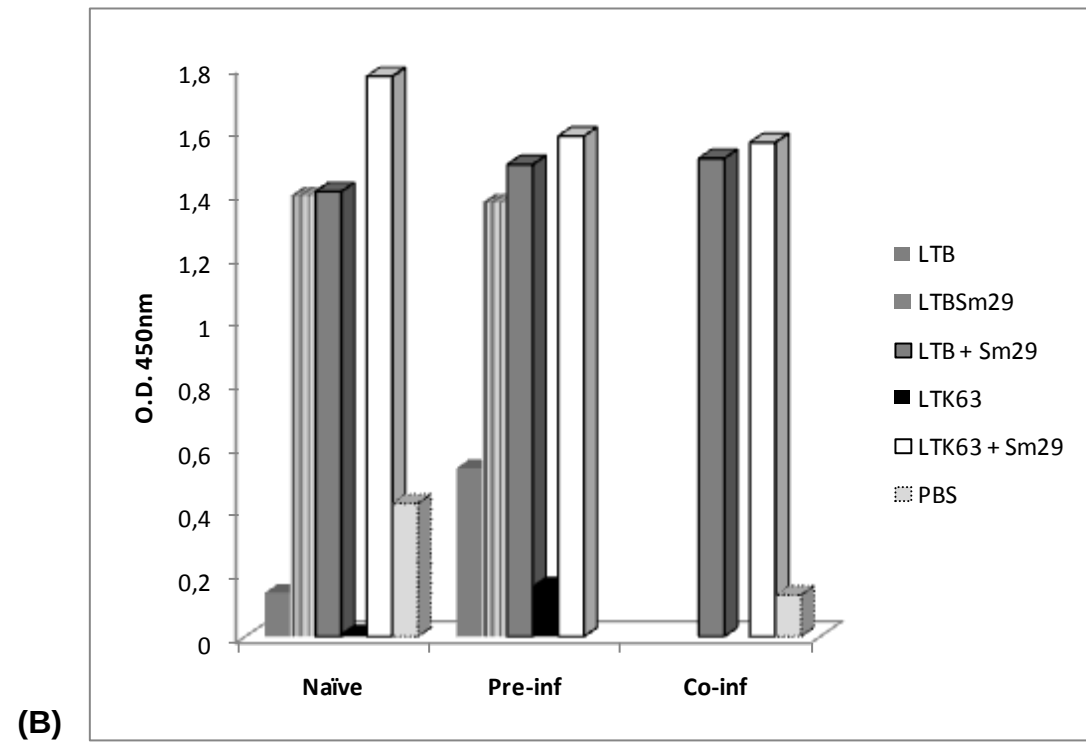
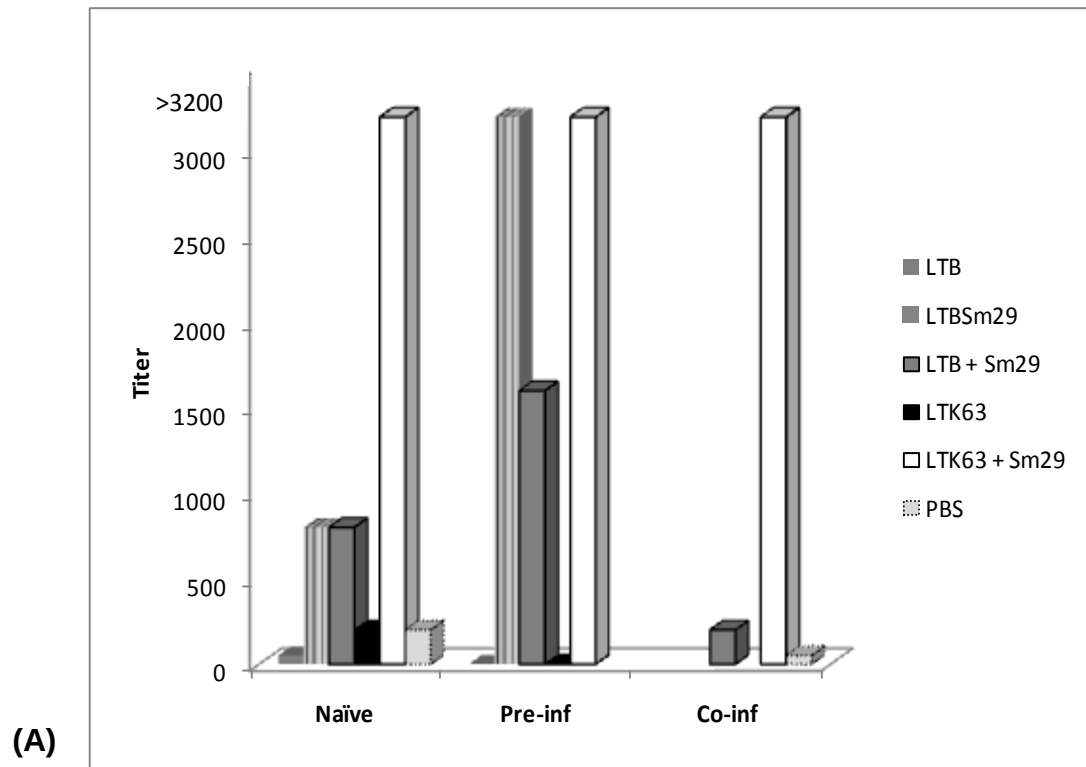


Fig. 2. Binding of the refolded rLTB-Sm29 and rLTB by GM1 ganglioside determined by ELISA. Plate was coated with GM1 and the GM1-bind recombinant proteins were detected by anti-rSm29 and anti-CT antibodies. Wells with rSm29, PBS and CT were the controls. Data are presented as mean absorbance $\pm$ standard error mean (S.E.M.). Statistically significant differences calculated by Student's *t*-test are indicated by asterisks (see material and methods). Note that statistic significance was found when rLTB-Sm29, identified with anti-rSm29, was compared with controls (rLTB, CT and PBS) and with PBS for its detection with anti-CT. Statistic significance was found for rLTB, detected with anti-CT antibody, when evaluated against rLTB-Sm29, rSm29 and PBS.



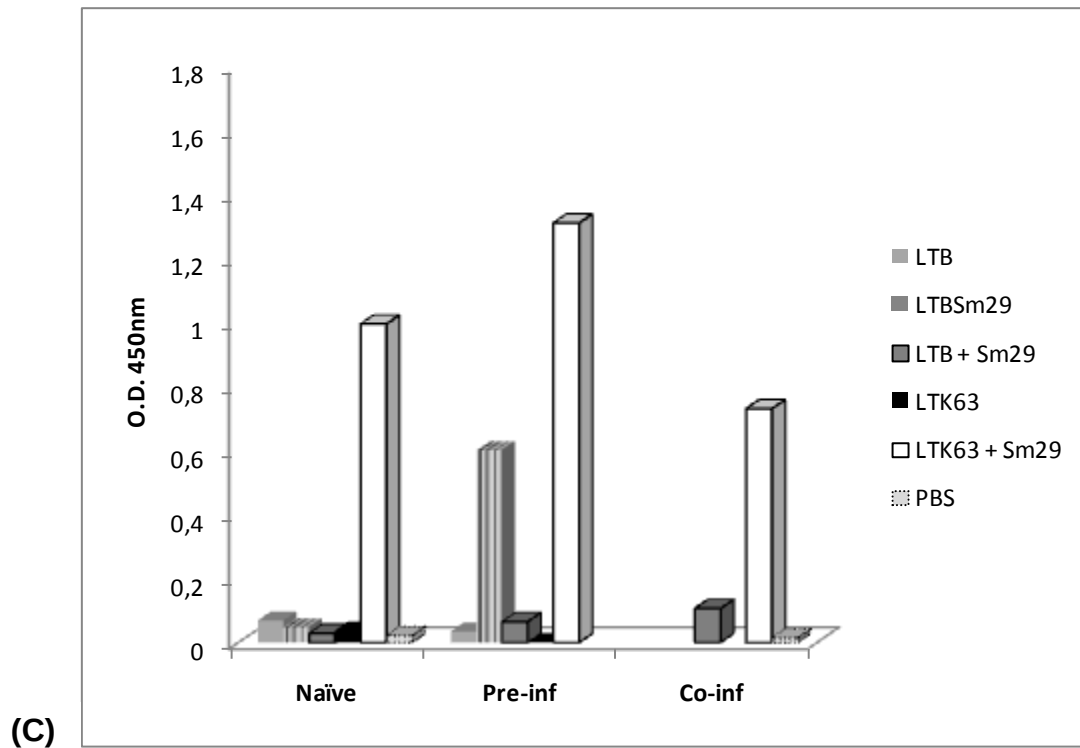


Fig. 3. End point titer for total IgG (A) and the levels of IgG1 (B) and IgG2a (C) antibodies to rSm29 from mice of schistosomiasis arm. To evaluate the level of specific antibodies to rSm29 pool sera from ten vaccinated animals were tested in triplicate by indirect ELISA for each study. Studies: Naïve, mice uninfected and immunized; Pre-inf, mice infected with 30 *S. mansoni* cercariae, cured and immunized; Co-inf, mice infected with 30 *S. mansoni* cercariae and 10^3 *P.c. chabaudi* AS pRBCs, cured to clear *S. mansoni* and *Plasmodium* parasites and then immunized. Mice were immunized with three doses of either: rLTB, rLTB-Sm29, rLTB+rSm29, rLTK63, rLTK63+rSm29 or PBS. Note that LTB-Sm29 vaccine is absent in co-infection study. (A) IgG titer was determined using pool sera at 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 and 1:3200 dilutions. Data are reported as antibody endpoint titers, which was defined as the highest dilution of test group sera that yielded an average OD three standard deviations greater than obtained in the pre-immune group (day 0). Specific anti-rSm29 (B) IgG1 and (C) IgG2a antibodies were performed with pool sera diluted 1:50. Data are presented as mean absorbance.

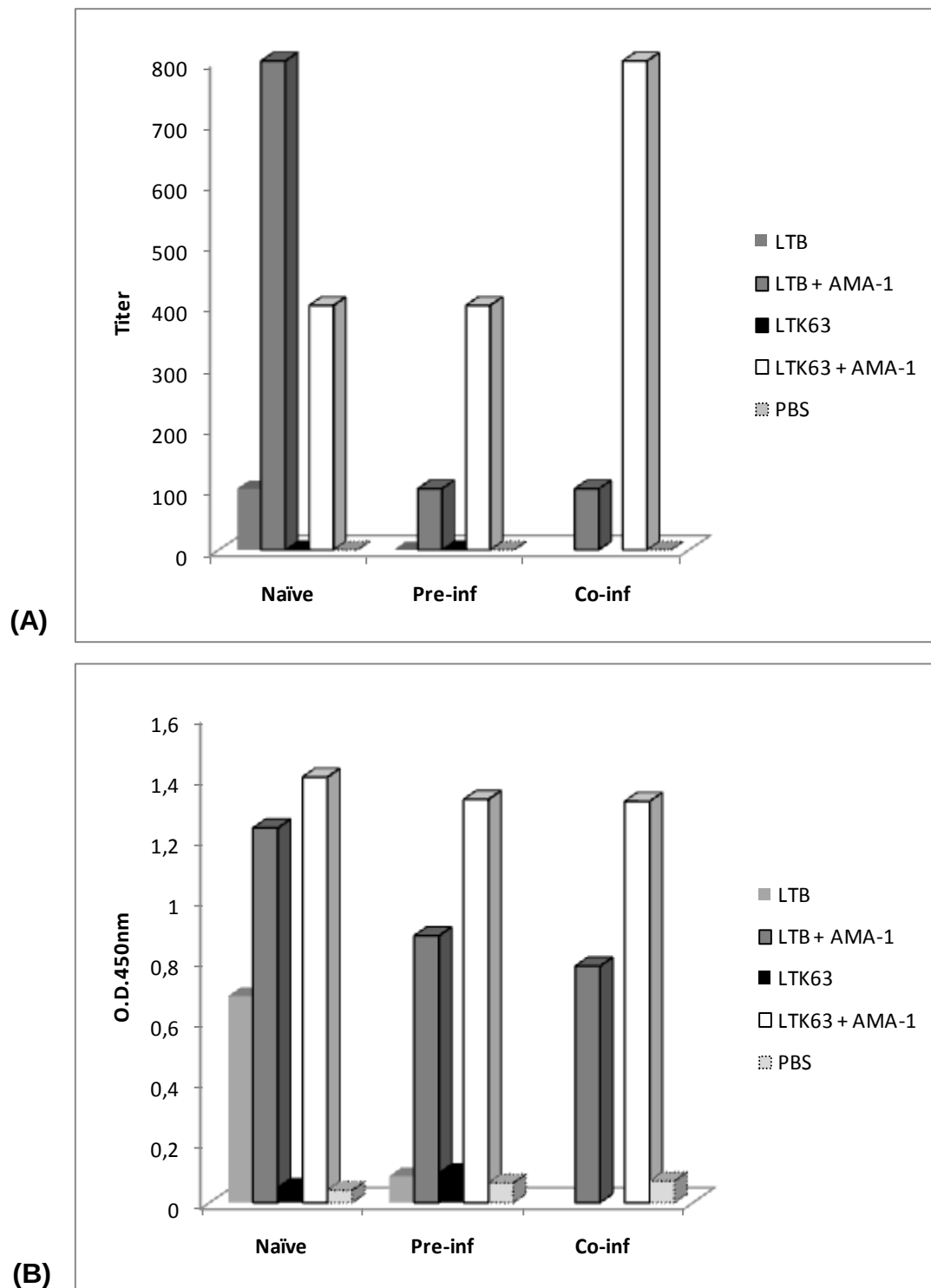


Fig. 4. End point titer for total IgG (A) and the level of IgG1 (B) antibodies to rAMA-1 from mice of malaria arm. To evaluate the level of specific antibodies to rAMA-1, pool sera from ten (naïve and pre-infected mice) or eight (co-infected mice) vaccinated animals were tested in triplicate by indirect ELISA. Studies: Naïve,

mice uninfected and immunized; Pre-inf, mice infected with 10^3 *P. chabaudi* AS pRBCs, cured and immunized; Co-inf, mice infected with 30 *S. mansoni* cercariae and 10^3 *P.c. chabaudi* AS pRBCs, cured to clear *S. mansoni* and *Plasmodium* parasites and then immunized. Mice were immunized with three doses of either: rLTB, rLTB+rAMA-1, rLTK63, rLTK63+rAMA-1 or PBS. (A) IgG titer was determined using pool sera at 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 and 1:3200 dilutions. Data are reported as antibody endpoint titers, which was defined as the highest dilution of test group sera that yielded an average OD three standard deviations greater than obtained in the pre-immune group (day 0). Specific anti-rAMA-1 (B) IgG1 antibodies were performed with pool sera diluted 1:50. Data are presented as mean absorbance.

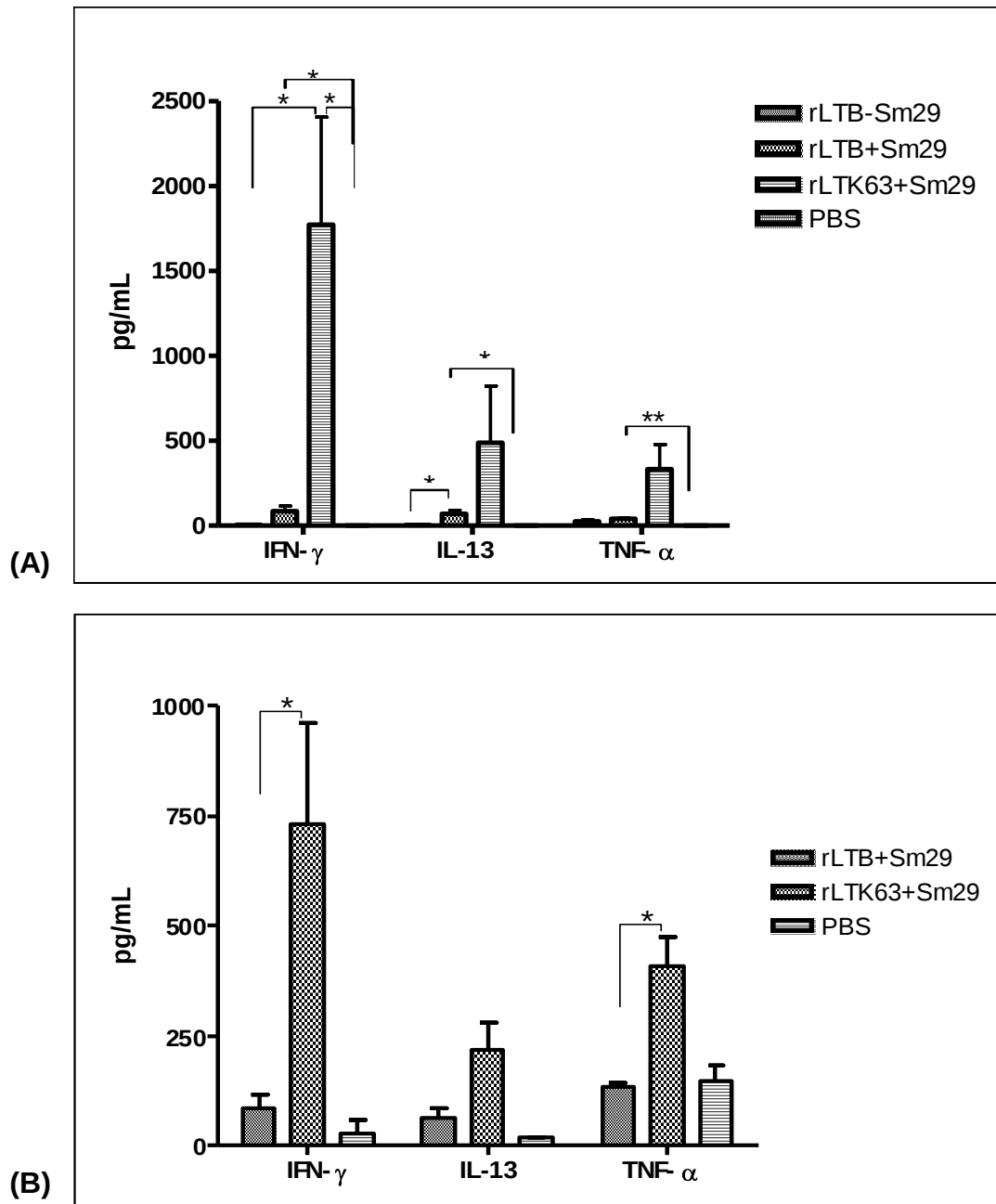


Fig.5. Cytokine profile of splenocytes of mice from schistosomiasis arm following vaccination. Splenic cells of three individual mice/group were assayed by CBA for IFN- γ , IL-13 and TNF- α production in response to 36 h of stimulation with rSm29 (10 μ g/mL). Fig. 5A provides the cytokine responses from naïve mice immunized with rLTB-Sm29, rLTB+rSm29, rLTK63+rSm29 or PBS. Fig. 5B shows the cytokine production by co-infected mice vaccinated with rLTB+rSm29, rLTK63+rSm29 or PBS. Note that rLTB-Sm29 vaccine is absent in co-infection study. The results are presented as cytokine produced by stimulated cells subtracted of cytokine produced by unstimulated cells. Bars represent mean of cytokine production $\pm$ standard error mean (S.E.M.). Groups were

compared using unpaired *t*-test and significant differences between them are denoted by asterisk (see Material and Methods).

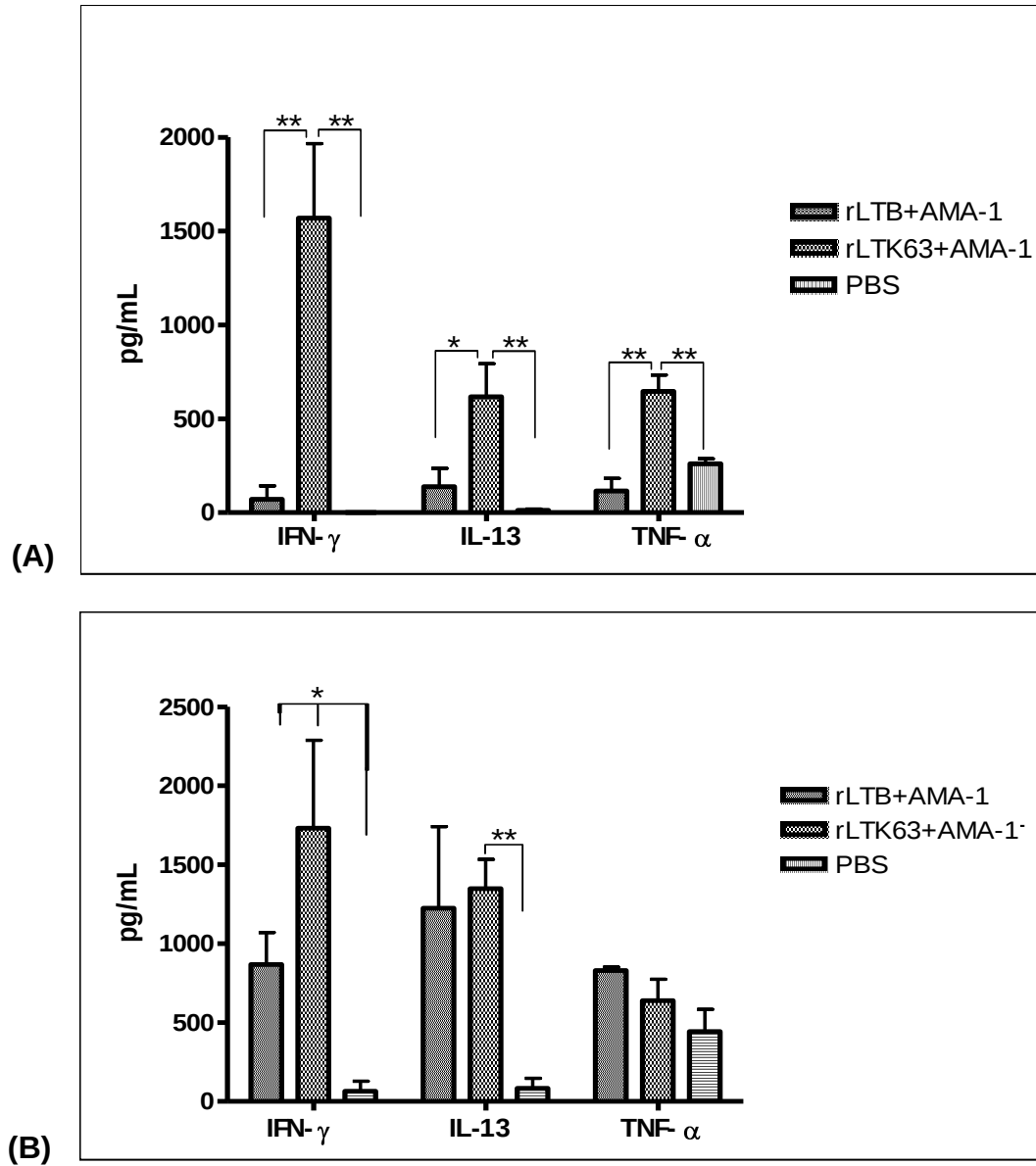


Fig. 6. Cytokine profile of splenocytes of mice from malaria study following vaccination. Splen cells of three individual mice/group (naïve and pre-infected study) or five (pre-infected study) were analyzed by CBA for IFN- γ , IL-13 and TNF- α production in response to 36 h of stimulation with rAMA-1 (10 μ g/mL). Fig. 6A and 6B show the cytokine production by pre-infected and co-infected mice, respectively, vaccinated with the same vaccines mentioned above. The results are presented as cytokine produced by stimulated cells subtracted of cytokine produced

by unstimulated cells. Bars represent mean of cytokine production $\pm$ standard error mean (S.E.M.). Groups were compared using unpaired *t*-test and significant differences between them are denoted by asterisk (see Material and Methods).

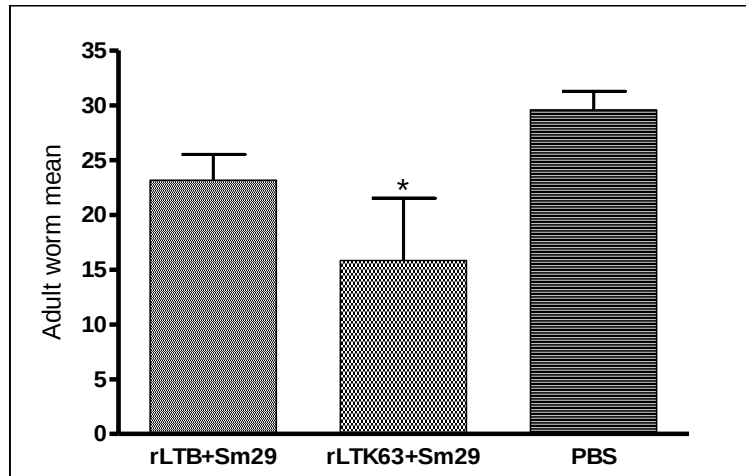


Fig. 7. Protection level of mice with concomitant *S. mansoni*-*P. chabaudi* infection induced by immunization with rSm29 mixed with either rLTK63 or rLTB. Two weeks after the third immunization 7 mice/group were challenged with 100 *S. mansoni* cercariae. Bars represent adult worm mean $\pm$ standard error mean (S.E.M.). Statistically significant difference between rLTK63+rSm29 and PBS using unpaired *t*-test is denoted by an asterisk (*p*, 0.01–0.05).

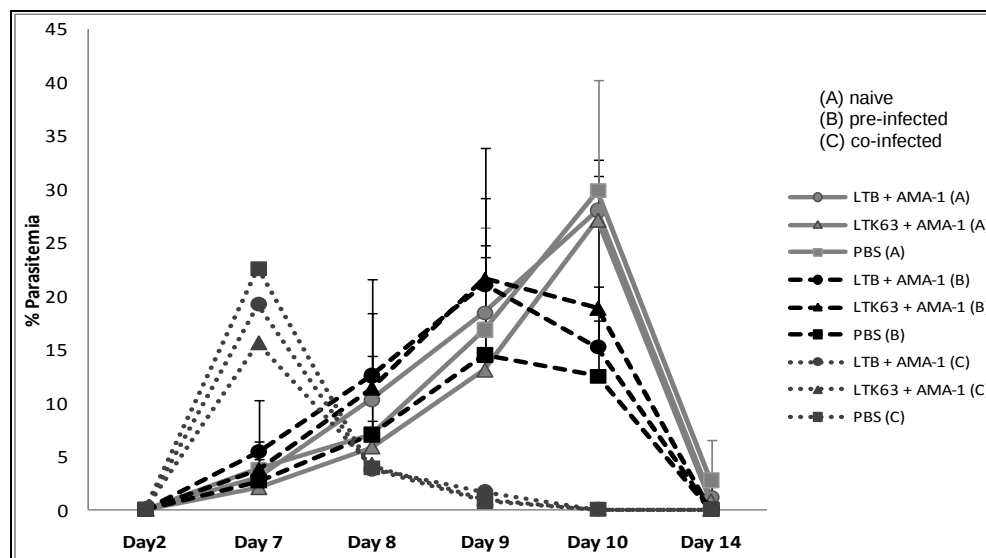


FIG. 8. Efficacy of immunization with rAMA-1 administered with either rLTK63 or rLTB in naïve (A, solid lines), pre-infected (B, traced lines) or co-infected (C, dotted lines) mice. Five mice per group were challenged with 10^3 *P. c. chabaudi* AS pRBCs at two weeks after the last immunization with either rLTK63+rAMA-1 (o), rLTB+rAMA-1 (Δ) or PBS ($\square$). Two days post-challenge, mice were monitored for parasitemia for 14 days by blood smears. Value represents the mean parasitemia values $\pm$ standard error mean (S.E.M.).

7 ARTIGO 3

**SUBUNIDADE B DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE *Escherichia coli*
POTENCIALIZA A RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELO ANTÍGENO VACINAL
rSM14 MAS NÃO CONFERE PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS**

SUBUNIDADE B DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE *Escherichia coli*
POTENCIALIZA A RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELO ANTÍGENO VACINAL
rSM14 MAS NÃO CONFERE PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS

Vanusa Pousada da Hora^{1,‡}; Clarice Brum¹; Angela N. Moreira²; José Antônio G. Aleixo²;
Mônica, Villar³; Miriam, Tendler³; Fabricio R. Conceição²; Odir A. Dellagostin¹

¹ Laboratório de Biologia Molecular e ² Laboratório de Imunologia Aplicada, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

³ Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

[‡] Endereço atual: Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

Autor para correspondência: Odir A. Dellagostin, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.
Tel. +55 53 3275 7587; Fax +55 53 3275 7551

Abstract

Schistosomiasis is an endemic disease that affects 200 million people worldwide. Vaccines represent the most attractive alternative to reverse this scenario. The World Health Organization selected the *S. mansoni* fatty acid-binding protein 14 kDa (Sm14) as one out of two anti-schistosome vaccine priority candidates for human clinical trials. The B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LTB) have been reported as a powerful immunoadjuvant. In this study we assessed in mice the influence of subcutaneous (s.c.) and intramuscular (i.m.) administration route on the humoral immune response of mice vaccinated with rSm14 fused or co-administered to LTB and evaluated protection against schistosomiasis. The *ltb* and *sm14* gene were fused by PCR. The recombinant chimera LTB-Sm14, rLTB and rSm14 were expressed in *E. coli* and purified by nickel affinity chromatography. Sm14 was more effective when fused to LTB and administrated by subcutaneous route. Despite of rLTB-Sm14 having induced a balanced ratio of IgG1/IgG2a and high levels of IgA and total IgG, it did not protect mice against *S. mansoni* infection.

Resumo

A esquistossomose é uma doença endêmica que afeta 200 milhões de pessoas mundialmente. Vacinas representam a alternativa mais atraente para inverter este cenário. A Organização Mundial da Saúde selecionou a proteína ligadora de ácidos graxos de 14 kDa de *S. mansoni* (Sm14) como uma de duas candidatas à vacina anti-esquistossomose prioritárias para triagem clínica em humanos. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) tem sido reportada como um potente imunoadjuvante. Neste estudo nós avaliamos em camundongos a influência das rotas de administração subcutânea (s.c.) e intramuscular (i.m.) sobre a resposta imune humoral de camundongos vacinados com rSm14 fusionada ou co-administrado a LTB e

sobre a proteção induzida contra esquistossomose. Os genes *ltb* e *sm14* foram fusionados por PCR. A químera recombinante LTB-Sm14, rLTB e rSm14 foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. Sm14 foi mais efetiva quando fusionada a LTB e administrada por via subcutânea. Apesar da rLTB-Sm14 ter induzido uma razão equilibrada de IgG1/IgG2a e altos níveis de IgA e IgG totais ela não protegeu camundongos contra infecção por *S. mansoni*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, Sm14, LTB, Vacina

Suporte financeiro: CAPES; CNPq

INTRODUÇÃO

A esquistossomose, doença endêmica crônica causada pelo trematódeo *Schistosoma* sp., afeta mais de 200 milhões de pessoas em 74 países no mundo (Chitsulo et al. 2000). Atualmente, o controle da esquistossomose é feito através de tratamento quimioterápico. Embora o uso de drogas influencie na redução dos índices de morbidade e mortalidade, ele não previne a re-infecção e tratamentos repetidos são necessários em áreas endêmicas (Fenwick & Webster 2006). Além disso, existem relatos de resistência do parasito aos quimioterápicos (Kasinathan et al. 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente e comercialmente viável surgiria como uma alternativa ao controle dessa parasitose (Bergquist et al. 2005).

Quando se trata de uma vacina para esquistossomose, a proteção parcial de no mínimo 40% pode ser aceita como válida, uma vez que isso poderia consideravelmente reduzir a patologia e limitar a transmissão (Chitsulo et al. 2004). Diversos estudos vêm sendo realizados com diferentes antígenos vacinais e protocolos de vacinação (McManus & Loukas 2008). Entre eles, a proteína ligadora de ácidos graxos de 14 kDa de *S. mansoni*, Sm14, uma proteína citosólica expressa na lamela do tegumento e do epitélio intestinal (Brito et al. 2002), induziu cerca de 50-60% de proteção contra a infecção em modelo murino quando formulada com hidróxido de alumínio (Tendler et al. 1996). A OMS selecionou a Sm14 recombinante (r) como uma de duas candidatas à vacina anti-esquistossomose prioritárias para triagem clínica em humanos (Tendler & Simpson 2008). A proteção conferida pela rSm14 parece estar associada com resposta imune celular, mediada por interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α , enquanto outros, apontam uma associação entre a resposta imune celular e humoral, esta mediada principalmente por interleucina (IL)-4, imunoglobulina (Ig) G1 e IgG3 (Al-Sherbiny et al. 2003, Fonseca et al. 2004, 2006). Apesar da proteína rSm14 ser uma candidata promissora no combate

à esquistossomose, mais estudos são necessários a fim de potencializar a proteção induzida por ela (Wilson & Coulsen 2006).

Sabe-se que além da busca por novos antígenos vacinais é desejável também testar novas formulações e estratégias de vacinação para as moléculas já caracterizadas (Wilson & Coulson 2006). Sendo assim, a escolha adequada de adjuvantes e das rotas de administração podem potencializar a eficácia dos antígenos (McManus & Loukas 2008). Produtos microbianos têm sido utilizados como adjuvantes, entre eles a enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) (Simmons et al. 2001). A LT é composta por uma subunidade A (tóxica) e por cinco moléculas da subunidade B (atóxica), a qual forma um homopentâmero que se liga ao receptor celular gangliosídeo GM1 (Spangler 1992). A função adjuvante da LTB está diretamente relacionada com sua capacidade de se ligar ao GM1 (De Haan et al. 1998). Estudos têm apontado a LTB como um adjuvante capaz de induzir resposta imune celular e humoral contra antígenos co-administrados ou fusionados a ela (Weltizin et al. 2000, Conceição et al. 2006, Facciabene et al. 2007, Qiao et al. 2009). Sabe-se que a LTB tem sua atividade adjuvante fortemente influenciada pela rota de imunização e pela natureza do antígeno (Fingerut et al. 2006, Fischer et al. 2010), sugerindo que cada um desses fatores devem ser considerados para aplicações de vacinas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar uma vacina de subunidade contendo a rSm14 fusionada ou co-administrada ao adjuvante rLTB em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção e clonagem da quimera

O gene *sm14* (GenBank: AF492389) foi obtido do plasmídeo pAE/*sm14* (M20C62), fornecido pelo Laboratório de Esquistossomose Experimental (FIOCRUZ-RJ) e o *ltb* (GenBank: M17873) foi amplificado a partir do DNA de *E. coli* enterotoxigênica de suínos, fornecido pelo

laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia (UFPel). Ambos os genes foram amplificados por PCR. Os seguintes primers foram utilizados no estudo: Sm14 forward: 5' GAATCTAGACCTCGAGGATATCCA; Sm14 reverse: 5' GGGGTACCTTAGGATAGTCGTTT; LTB forward: 5' CGGGATCCATGGCTCCCCAGACTATT; LTB reverse: 5' AGGTCTAGATTTCATACTGATTGCCG. Os *primers* Sm14 e LTB foram desenhados contendo sítios para enzimas de restrição, a fim de direcionar a clonagem no vetor. A amplificação dos genes foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo $\cong$ 20 ng de DNA molde, *primers forward* e *reverse* [0,4 µM], MgCl₂ [1,5 mM], dNTPs [200 µM], tampão PCR [1x] e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf (modelo Mastercycle Gradient) sob as seguintes etapas: 95 °C por 3 min seguida de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1min, com uma extensão final de 72 °C por 7 min. A construção da quimera foi realizada pela estratégia de fusão genética entre os genes *sm14* e *ltb*, através de PCR-*primer linker*, sendo que para esse fim, o *primer reverse* para amplificar o gene *ltb* foi desenhado contendo 12 nucleotídeos sobrepostos aos *primers forward* do gene *sm14*. Neste PCR os produtos da amplificação de cada gene se hibridizam, através da sobreposição de 12 pb, servindo de *primer* para que a enzima realize a extensão. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo $\cong$ 50 ng de cada DNA amplificado (*sm14* e *ltb*), MgCl₂ [1,5 mM], dNTPs [200µM], tampão PCR [1x] e 1 unidade de Taq DNA polimerase. As amostras foram submetidas às seguintes etapas: 95° C por 3 min seguida de 15 ciclos de 95° C por 30 s, 50° C por 30 s e 72° C por 90 s com uma extensão final de 72° C por 10 min. Posteriormente, foi realizada outra reação de PCR, a fim de amplificar a quimera, utilizando-se o *primer forward* do gene *ltb* e o *primer reverse* do gene *sm14*. As reações de PCR

foram realizadas em um volume final de 50 μ L, contendo $\cong$ 50ng de DNA da quimera (*ltb/sm14*), *primers forward* e *reverse* [0,4 μ M], MgSO_4 [1,5 mM], dNTP [200 μ M], 5 μ L de *Enhancer Solution*, tampão PCR [1x] e 2,5 unidades da enzima Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas para amplificar os genes. Após cada reação de PCR, os genes foram purificados com GFX™ PCR DNA and gel Band Purification kit (Amersham Bioscience), seguindo orientações do fabricante.

O gene quimérico foi clonado ao vetor pCR® 2.1-TOPO do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. A identidade do inserto foi determinada por seqüenciamento de DNA através do DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems–MegaBACE 500 (GE Healthcare, Brasil). Posteriormente, os clones recombinantes de TOPO-*ltb/sm14* foram submetidos à reação com as endonucleases *Bam*HI e *Kpn*I (New England BioLabs, USA) e o gene *ltb/sm14* foi liberado e depois clonado no plasmídeo de expressão em *E. coli* pQE-6xHis (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A clonagem do gene foi realizada conforme descrito por Sambrook (2001). O produto da ligação entre inserto e o vetor pQE foi utilizado para transformar por eletroporação células de *E. coli* TOP10F (Invitrogen). Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina e caracterizados por PCR e por reação com enzimas de restrição. Os plasmídeos pAE-6xHis/*sm14* (M20C62) e pAE-6xHis/*ltb* foram previamente construídos e caracterizados e gentilmente fornecidos por Mirian Tendler e Fabricio R. Conceição, respectivamente.

Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A proteína recombinante Sm14 foi obtida em *E. coli* BL21(DE3) Códon Plus conforme descrição prévia (Abreu et al. 2004). As proteínas rLTB-Sm14 e rLTB foram produzidas em *E.*

coli TOP10F e *E.coli* BL21 (DE3) Star, respectivamente. A expressão e purificação das proteínas recombinantes LTB-Sm14 e LTB são descritas abaixo. Células competentes contendo os plasmídeos foram cultivadas a 37° C a uma densidade óptica (DO) 600 nm de 0,6. A expressão protéica foi induzida pela adição de 1 mM de isopropil β -D-tiogalactosídeo (IPTG) na cultura. Após incubação a 37° C por 4 h as culturas foram centrifugadas a 7.000 x g por 20 min a 4° C e resuspendidas em tampão de solubilização (8 M de uréia; 20 mM de NaH₂PO₄ ; 0,5 M de NaCl; pH 7,2) e submetido a agitador orbital a 60 rpm por 18 h à temperatura ambiente. As células foram então lisadas por três sucessivos ciclos de sonicação (30 s, 20 kHz) e centrifugadas a 10.000 x g por 60 min a 4° C e o sobrenadante coletado e filtrado em filtro 0,8 μ m (Millipore). O sobrenadante foi então lavado (8 M de uréia; 200 mM de NaH₂PO₄; 0,5 M de NaCl; 5 mM de imidazole; pH 7,2) e submetido à cromatografia líquida de afinidade em coluna de Ni⁺²-Sephrose (Amersham Bioscience) usando o sistema ÄKTAPrime (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas em 8 M de uréia; 200 mM de NaH₂PO₄; 0,5 M de NaCl; 200 mM de imidazole; pH 7,2. Na sequência, as proteínas foram dialisadas lentamente contra tampão PBS pH 7,2 por 48 h a 4° C. 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. A pureza das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE de acordo com o método de Laemmli (1970) e a concentração foi medida pelo método de Bradford.

Antigenicidade das proteínas recombinantes

A antigenicidade das proteínas recombinantes foi caracterizada por *Western blot* (Sambrook 2001). Brevemente, as proteínas rLTB-Sm14 e rLTB na concentração de 1 μ g/cavidade, foram submetidas a um SDS-PAGE 15% e eletrotransferidas para uma membrana

de nitrocelulose Hybond™ ECL™ (Amersham Biosciences). Após bloqueio com 5% de leite em pó desnatado, a membrana contendo rLTB/Sm14 foi incubada com anticorpos policlonais de coelho anti-rSm14 (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). Em seguida, as membranas foram incubadas com soro anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:1500 em PBS-T. As bandas foram reveladas com cromógeno H₂O₂ /4-cloro-1-naftol (Amersham Bioscience) (10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 0,1 mL de cloronaftol; 10 µL de peróxido de hidrogênio). Utilizou-se a enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT) como controle devido a sua alta identidade (80%) com LT (Simmons et al. 2001).

Avaliação da ligação ao gangliosídeo GM1

A ligação entre a rLTB e rLTB-Sm14 ao gangliosídeo GM1 bovino (Calbiochem) foi determinada por ELISA indireto conforme descrito previamente (Conceição et al. 2006). Os reagentes utilizados foram: 8 µg de rLTB-Sm14, rSm14 e CT, soro anti-rSm14 (1:1000), soro anti-CT (1:1500), conjugado anti-coelho (1:1000) e anti-camundongo (1:1500). As reações foram reveladas com *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio, após cinco lavagens com PBS-T. Poços sem GM1 foram utilizados como controle da ligação específica entre as proteínas e o gangliosídeo. As reações foram repetidas em triplicata.

Avaliação da via de administração

Camundongos BALB/c fêmeas com 4-6 semanas de idade foram utilizados para avaliar a resposta imune conferida pela rSm14 fusionada ou co-administrada a rLTB administrada por diferentes rotas. Estes animais foram obtidos e mantidos no Biotério Central da UFPel. Grupos de 5 animais foram inoculados via intramuscular (i.m.) ou subcutânea (s.c.) com três doses de 20 µg da quimera recombinante (rLTB-Sm14) e 10 µg de cada proteína (rLTB e rSm14). Houve um intervalo de 7 dias entre a primeira e a segunda dose e 21 dias entre a segunda e a terceira dose. Grupos vacinados com rSm14 associada com hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] e outro vacinado apenas com rLTB ou PBS foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O soro dos animais imunizados foi coletado, via plexo retro-orbital, nos dias zero (pré-imune), 15, 30, 60 e 120 após a primeira imunização.

Imunizações e ensaio de proteção

Camundongos suíços fêmeas, não singênicos (*outbred*) de 4 a 6 semanas de idade, foram utilizados para o teste de desafio, uma vez que fazem parte do protocolo padrão de imunização para rSm14+Al(OH)₃ descrito por Tendler et al. (1996). Esses animais foram obtidos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos no Biotério do Laboratório de Esquistossomose Experimental (IOC-FIOCRUZ). Os animais foram separados em cinco grupos de 10 animais e foram imunizados com as vacinas selecionadas na etapa anterior quanto à formulação e a via. No 60º 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. Dois ensaios independentes foram realizados para determinar a proteção.

Avaliação da resposta imune humoral

A detecção de anticorpos específicos presentes no soro dos animais vacinados foi monitorado por ‘Enzyme-Linked Immunosorbent Assay’ (ELISA). O soro dos animais imunizados foi coletado via plexo retro-orbital, nos dias zero (pré-imune), 35 e 60 após a primeira imunização. A avaliação da resposta imune dos camundongos foi realizada através de ELISA indireto. Foi utilizado o *pool* dos soros dos camundongos suíços para detectar os níveis de IgG total e o soro individual para titular IgG1 e IgG2a. Soros individuais dos BALB/c foram usados para analisar IgG total, IgG1 e IgG2a, exceto IgA foi avaliada por *pool*. Para quantificar IgG total e IgA, microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 200 ng/cavidade de rSm14 ou rLTB (para detecção de IgG total dos camundongos suíços) a 4 °C, *overnight*, diluída em PBS pH 9,8. Foram adicionados os soros dos animais dos dias zero, 35 e 60 e os controles, na diluição 1:100 para a detecção de IgG nos camundongos suíços, para IgA utilizou-se soro do dia 35 diluído 1:10. Após incubação por 1 h a 37° C foi adicionado o soro anti-imunoglobulina (Ig) de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO) IgG ou IgA na diluição 1:2000 ou or 1:1000, respectivamente. Seguido de incubação por 1 h a 37 °C foi e adicionado o substrato ELISA-OPD Peroxidase (Sigma) por 15 min a temperatura ambiente e a leitura da densidade óptica a 450 nm realizada em espectrofotômetro de microplaca (Dynatech Labs. Inc.). As reações dos soros dos camundongos BALB/c foram paradas com 1 N de ácido sulfúrico e a leitura foi realizada a 492 nm. As amostras de soro de cada *pool* foram avaliadas em triplicata e as amostras individuais em duplicata.

A quantificação dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-rSm14 foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante dos anticorpos secundários (Invitrogen). A revelação foi feita com OPD e a leitura dos resultados foi realizada com filtro de comprimento de onda de 492 nm. Os

títulos foram definidos individualmente utilizando diluições seriadas de soro. O título foi definido como a maior diluição do soro com absorbância maior ou igual a 0.2 (DO₄₉₂ nm).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste *t* de Student não pareado, utilizando o pacote do *software* Prisma 4.0 (GraphPad, Inc.), para comparar médias entre dois grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Construção da quimera *ltb-sm14*

A construção da quimera *ltb-sm14* foi realizada pela estratégia de fusão genética entre os genes *sm14* e *ltb*, pela sobreposição de 12 pb, através da PCR-*primer linker*. O gene *sm14* foi inserido com sucesso na região C terminal do gene *ltb*. Após amplificação por PCR observou-se um produto de 710 pb. O seqüenciamento da quimera mostrou 100% de identidade com os genes *ltb* e *sm14*.

Expressão e purificação da rLTB-Sm14, rLTB e rSm14

E. coli TOP10F transformada com o plasmídeo de expressão pQE/LTB-Sm14 expressou eficientemente uma proteína de aproximadamente 28 kDa. As células competentes *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus e *E.coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/Sm14 e pAE/LTB produziram de forma eficiente proteínas de 14 kDa e 13 kDa, respectivamente. Todas as proteínas foram expressas na forma de corpos de inclusão. Durante a diálise perdeu-se um pouco de proteínas, mas a quantidade recuperada foi suficiente para o experimento.

Caracterização das proteínas

Na Fig. 1 pode-se observar o *Western blot* realizado para verificar a antigenicidade da proteína rLTB-Sm14 contra os anticorpos policlonais anti-rSm14 (Fig. 1A), anti-rLTB (Fig. 1B) e anti-CT (Fig. 1C). Dessa forma, verificou-se que a rLTB-Sm14 foi reconhecida por anticorpos que reconhecem as proteínas individuais, mostrando que a fusão não prejudicou a antigenicidade da rSm14 ou da rLTB. A ligação entre a rLTB-Sm14 e o gangliosídeo GM1 foi determinada por ELISA indireto. Conforme se pode observar na Fig. 2, a proteína rLTB-Sm14 ligou-se especificamente ao gangliosídeo GM1, demonstrando que a ligação à Sm14 não alterou a capacidade da LTB de reconhecer e ligar-se ao GM1. Parte da placa de ELISA estava sem GM1, a fim de ter um controle sobre a ligação específica da LTB a este gangliosídeo; não houve ligação na placa sem GM1 (dados não mostrados).

Influência das vias de imunização e da fusão na resposta imune humoral

Com o intuito de selecionar a formulação ideal da vacina rSm14 com o adjuvante rLTB, estudou-se a influência da fusão e da co-administração bem como das vias de administração i.m. e s.c. na estimulação da resposta imune humoral em camundongos BALB/c. As fig. 3, 4 e 5 apresentam a produção de IgG total, IgA e IgG1/IgG2a, respectivamente, estimulada pelas vacinas. Em relação à formulação das vacinas, a fusão rLTB-Sm14 mostrou-se mais eficiente em induzir a produção de Igs do que a co-administração. Quando analisada a influência da rota de administração na modulação da resposta imune, apenas a vacina rLTB-Sm14 apresentou diferença na produção de IgG2a entre as vias de imunização, sendo que a rota s.c. produziu significativamente ($p < 0.001$) um título maior deste anticorpo contra rSm14 do que a via i.m. Entre as vacinas, a rLTB-Sm14 administrada via s.c. apresentou o melhor desempenho produzindo a razão mais equilibrada de IgG1/IgG2a (1.25), sendo essa razão significativamente ($p < 0.01$)

menor do que a induzida pelo controle positivo rSm14+(AlOH)₃ (4.26). Esse dado permite inferir que a quimera por via s.c. ativou respostas imunes mediadas tanto por linfócitos T CD4⁺ auxiliar (Th) do tipo 1 quanto Th2. Além disso, rLTB-Sm14 estimulou a produção de níveis elevados de IgA e IgG total em camundongos BALB/c.

Avaliação da proteção contra infecção experimental

Camundongos suíços *outbred* foram imunizados com 1) rLTB-Sm14, 20 µg; 2) rLTB-Sm14+Al(OH)₃, 20 µg ; 3); rSm14+Al(OH)₃, 10 µg; e 4) rLTB, 10 µg e desafiados subcutaneamente com 100 cercárias de *S. mansoni*. Os parasitas adultos foram recuperados do sistema venoso hepático e mesentérico por perfusão 45 dias após o desafio. Na Tab. 1 encontra-se o resultado da perfusão e índices de proteção. A imunização com rLTB-Sm14 não conferiu proteção dos camundongos desafiados com cercárias de *S. mansoni*, quando comparado com o grupo controle da vacina, rSm14+Al(OH)₃.

Análise da resposta imune humoral após vacinação

O *pool* dos soros de camundongos suíços imunizados com rLTB-Sm14, rLTB-Sm14+Al(OH)₃, rSm14+Al(OH)₃ e rLTB foi utilizado para detectar anticorpos IgG total contra rSm14 (Fig. 6A) ou rLTB (Fig. 6B) e IgG1/IgG2a anti-rSm14 (Fig. 7). Como se pode observar na Fig. 6A, o *pool* do soro dos camundongos imunizados com rLTB-Sm14+Al(OH)₃ no dia 35 apresentou o maior nível de anticorpos específicos anti-rSm14 (DO₄₅₀ 0.30); no entanto, no dia 60 o *pool* do soro dos animais imunizados com rSm14+Al(OH)₃ passou a apresentar a maior absorbância média (DO₄₅₀ 0.42). Em relação aos anticorpos anti-rLTB (Fig. 6B), o soro do grupo rLTB-Sm14+Al(OH)₃ apresentou um nível crescente de anticorpos anti-rLTB do dia 0 ao 60. A vacina rLTB-Sm14+Al(OH)₃ produziu a razão IgG1/IgG2a (2.0) mais equilibrada entre as

vacinas testadas, sugerindo uma resposta mista de células Th1 e Th2. A razão entre IgG1/IgG2a induzida pela rSm14 com Al(OH)₃ foi de 4.0, não sendo estatisticamente diferente da induzida pela rLTB-Sm14+Al(OH)₃. A quimera sozinha não estimulou produção elevada de nenhum dos anticorpos analisados, apresentando uma produção significativa apenas de IgG1, comparada com o controle negativo (Fig. 7).

DISCUSSÃO

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de buscar novas estratégias para aumentar a resposta imune conferida pela rSm14 quando administrada com hidróxido de alumínio (Abreu et al. 2004, Pacheco et al. 2008). A proteção contra *S. mansoni* não está bem elucidada. Alguns estudos mostram que a proteção de camundongos parece ser mediada por células Th1 e Th2 (Jankovic et al. 1999, Wynn et al. 2000), enquanto outros a relacionam apenas com resposta Th1 (Fonseca et al. 2004, Cardoso et al. 2008). O adjuvante LTB tem mostrado ser eficaz em estimular tanto células Th1 quanto Th2 para antígenos fusionados ou co-administrados (Conceição et al. 2006, Zhou et al. 2009, Qiao et al. 2009, Fischer et al. 2010). A atividade deste adjuvante parece ser fortemente influenciada pela via de administração e pela natureza do antígeno (Fingerut et al. 2006, Fischer et al. 2010). Dessa forma, neste trabalho buscou-se definir a via e a formulação ideal para administrar o antígeno rSm14 com o adjuvante rLTB para posterior avaliação da proteção.

A construção da quimera rLTB-Sm14, através da ligação entre a região C-terminal do gene *ltb* e a N-terminal do *sm14*, foi obtida eficientemente. Proteínas ligadas na região C-terminal da LTB tem mostrado não afetar a formação do pentâmero, portanto, não alteram sua ligação ao gangliosídeo GM1 (Fingerut et al. 2005, Conceição et al, 2006), como também foi observado aqui. A fusão da porção N-terminal da Sm14 com outra proteína (fragmento C da

toxina tetânica) não afetou as características imunogênicas da rSm14 (Abreu et al. 2004), o que foi igualmente constatado neste estudo. Sabe-se que a região que contém os epítomos protetores da Sm14 é a C-terminal (Tendler et al. 1996), o qual permaneceu livre na quimera rLTB-Sm14.

Em relação à combinação do antígeno e capacidade adjuvante da rLTB, observou-se que a fusão foi mais eficaz em estimular anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgA anti-rSm14 do que a co-administração. Isso corrobora com outro estudo onde a rLTB fusionada ao antígeno VP2 (proteína viral 2 do vírus da doença infecciosa da bursa) inoculada por via i.m. induziu um aumento da produção de anticorpos específicos (Fingerut et al. 2005). No entanto, quando a proteína rVP2 foi co-administrada com rLTB, não houve acréscimo da resposta imune (Fingerut et al. 2006).

Sabe-se que a via de administração influencia a atividade adjuvante da rLTB. Fischer et al. (2010) demonstraram que o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) inativado, administrado i.m. com rLTB em camundongos, induziu elevado título de anticorpos anti-SuHV-1, ao passo que a mesma combinação inoculada via s.c. produziu baixos títulos de anticorpos. No presente trabalho, em geral as vias de administração não influenciaram a resposta imune humoral de camundongos BALB/c. Apenas a molécula rLTB-Sm14 apresentou um melhor desempenho em gerar anticorpos quando administrada via s.c. do que por via i.m em BALB/c. Quando administrada subcutaneamente a rLTB-Sm14 induziu uma produção equilibrada de IgG1/IgG2a, sugerindo uma resposta Th1 e Th2 combinada. Esta razão foi significativamente maior do que a induzida pela rSm14 com hidróxido de alumínio. Respostas imunes do tipo Th1 e Th2 mediadas por rSm14 são reconhecidas como mediadoras da proteção contra infecção por *S. mansoni* em camundongos (Fonseca et al. 2006). Além disso, IgA anti-rSm14 foi produzida de forma eficiente por camundongos BALB/c imunizados com rLTB-Sm14 via s.c. A presença de IgA é

associada com resistência para re-infecção em indivíduos recém expostos a este parasita (Vereecken et al. 2007).

Apesar da quimera rLTB-Sm14 (s.c.) ter estimulado em BALB/c uma resposta imune Th1 e Th2 superior do que a gerada por aqueles animais imunizados com rSm14+Al(OH)₃, ela não foi eficaz em proteger camundongos suíços contra infecção por cercárias de *S. mansoni*. Sabe-se que espécies diferentes de camundongos podem montar respostas distintas entre si, entretanto usualmente espécies isogênicas, como BALB/c, são utilizadas para estudar a resposta imune induzida por vacinas (De Haan et al. 2001, Abreu et al. 2004). Varaldo et al (2004) ao estudar a eficácia de uma vacina recombinante de BCG expressando a Sm14 também utilizaram BALB/c para estudar a resposta imune induzida pela vacina e camundongos suíços para avaliar a proteção. A falha da quimera em suscitar proteção pode estar relacionada com o baixo nível de anticorpos anti-rSm14 gerados em camundongos suíços por ela, uma vez que a resposta humoral é importante na aquisição da proteção. O insucesso da rLTB como adjuvante parece não estar associada com a fusão, pois como mencionado anteriormente, as características da rLTB foram preservadas. A quimera formulada com hidróxido de alumínio apresentou um desempenho melhor do que sozinha, estimulando em camundongos suíços a produção de IgG1/IgG2a semelhante a induzida pela rSm14 com Al(OH)₃. Apesar do perfil Th1/Th2 gerado pela quimera adsorvida com hidróxido de alumínio ser semelhante ao da rSm14+Al(OH)₃, a quimera não foi capaz de promover proteção aos animais desafiados. Pouco se sabe o quanto a presença de anticorpos anti-LTB pode ser prejudicial para a atividade adjuvante da LTB. Dados relatam que quanto menor a resposta imune contra LTB maior é sua capacidade adjuvante (Pitcovski et al. 2006, Fischer et al. 2010). No caso da quimera sozinha a resposta humoral contra rLTB foi baixa e não parece ter influenciado no insucesso da quimera. Altos níveis de

anticorpos contra rLTB foram observados no grupo imunizado com rLTB-Sm14+Al(OH)₃ e talvez isso tenha prejudicado o desempenho da rLTB.

Outros trabalhos realizados a fim de buscar alternativas que melhorem a resposta imune conferida pela rSm14 formulada com hidróxido de alumínio também não obtiveram êxito quanto à melhora da proteção frente ao desafio por *S. mansoni*. Entre essas alternativas estão (i) o uso de bactérias vivas atenuadas, como *Salmonella enterica* sorovarTyphimurium *aroA* (Pacheco et al. 2008) e BCG (Varaldo et al. 2004) expressando a proteína rSm14; (ii) a injeção de vacina de DNA com o gene da Sm14 co-administrada com um plasmídeo expressando IL-12 (adjuvante) (Fonseca et al. 2006); e (iii) a fusão do fragmento C (atóxico) da toxina tetânica (TTFC) com a rSm14 sendo a fusão administrada com o Al(OH)₃ (Abreu *et al.*, 2004).

Neste estudo demonstrou-se que a rSm14 fusionada ao adjuvante rLTB é capaz de induzir em camundongos uma resposta imune humoral mais eficaz do que a estimulada pela rSm14 em combinação com hidróxido de alumínio. No entanto a quimera não protegeu camundongos do desafio contra *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS

- Abreu PAE, Miyasato PA, Vilar M, Dias WO, Ho PL, Tandler M, Nascimento AL 2004. Sm14 of *Schistosoma mansoni* in fusion with tetanus toxin fragment C induces immunoprotection against tetanus and Schistosomiasis in mice. *Infection and immunity* 72:5931–5937.
- Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, Morshedy HE, Bergquist R, Olds R 2003. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta Tropica* 88:117–130.

- Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchell G 2005. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends in Parasitology* 21: 112-117.
- Brito CF, Oliveira GC, Oliveira SC, Street M, Riengrojpitak S, Wilson RA, Simpson AJ, Correa-Oliveira R 2002. 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* 35: 377-81.
- Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, Melo AL, Caliari MV, Almeida GT, Venancio TM, Verjovski-Almeida S, Oliveira SC 2008. *Schistosoma mansoni* tegument protein sm29 is able to induce a th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e308.
- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77:41-51.
- Chitsulo L, Loverde P, Engles D 2004. Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiology* 2:12–13.
- Conceição FR, Moreira AN, Dellagostin OA 2006. 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* 24:5734–5743.
- De Haan L, Verweij WR, Feil IK, Holtrop M, Hol WGJ, Agsteribbe E, Wilschut J 1998. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology* 94:424-430.
- De Haan L, Verweij WR, Holtrop M, Brands R, van Scharrenburg GJ, Palache AM 2001. 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* 19:2898-907.

- Facciabene A, Aurisicchio L, Elia L, Palombo F, Mennuni C, Ciliberto G 2007. Vectors encoding carcinoembryonic antigen fused to the B subunit of heat-labile enterotoxin elicit antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Vaccine* 26:47-58.
- Fenwick A, Webster JP 2006. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19:577–582.
- Fingerut E, Gutter B, Meir R, Eliahoo D, Pitcovski J 2005. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. *Vaccine* 23:4685-96.
- Fingerut E, Gutter B, Goldway M, Eliahoo D, Pitcovski J 2006. B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination *Veterinarian Immunology Immunopathology* 112:253–263.
- Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Moraes CM, Ferreira LN, Vilela CO 2010. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (3):489-95.
- Fonseca CT, Brito CF, Alves JB, Oliveira SC 2004. 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* 22:503-510.
- Fonseca CT, Pacifico LGG, Barsante MM, Rassi T, Cassali GD, Oliveira SC 2006. 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* 1-8.

- Jankovic D, Wynn TA, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, James S, Cheever AW, Sher A 1999. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. *J Immunol* 162:345–351.
- Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM 2010. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol* 173:25-31.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–5.
- McManus DP, Loukas A 2008. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 225–242.
- Pacheco LGC, Mati VLT, Castro TLP, Dorella FA, Oliveira SC, Miyoshi A, de Melo AL, Azevedo V 2008. Oral immunization with *Salmonella* harboring a Sm14-based DNA vaccine does not protect mice against *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology International* 57:506-8.
- Pitcovski J, Bazak Z, Wasserman E, Elias O, Levy A, Peretz T, Fingerut E, Frankenburg S 2006. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. *Vaccine* 24:636-643.
- Qiao XY, Li GW, Wang XQ, Li XJ, Liu M, Li YJ 2009. Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice. *BMC Microbiology* 9:249.
- Ramos CR, Abreu PA, Nascimento A, Ho PL 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37:1103-9.

- Sambrook J, Russel DW 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simmons CP, Ghaem-Magami M, Petrovska L, Lopes L, Chain BM, Williams NA 2001. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. Scand Journal Immunology 53:218–226.
- Spangler BD 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiology Review 56:622–647.
- Sun J-B, Mielcarek N, Lakew M 1999. Intranasal administration of a *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase-cholera toxoid conjugate vaccine evokes anti-parasitic and anti-pathological immunity in mice. J Immunol 163:1045-52.
- Sun JB, Stadecker MJ, Mielcarek N, Lakew M, Li BL, Hernandez HJ, Czerkinsky C, Holmgren J 2001. Nasal Administration of *Schistosoma mansoni* Egg Antigen-Cholera B Subunit Conjugate Suppresses Hepatic Granuloma Formation and Reduces Mortality in *S. mansoni*-Infected Mice. Scan J Immunol 54:440-447.
- Tendler M, Britto C, Silva JF, Savino W, Garratt R, Katz N, Simpson A 1996. 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 93: 269-273.
- Tendler M, Simpson AJ 2008. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. Acta Trop 108:263-6.
- Varaldo PB, Leite LC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, Mcfadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D 2004. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. Infect Immun 72:3336–3343.

- Vereecken K, Naus CW, Polman K, Scott JT, Diop M, Gryseels B, Kestens L 2007. Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*. *Trop Med Int Health* 12:431-44.
- Weltzin R, Guy B, Thomas WD, Jr., Giannasca PJ, Monath TP 2000. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 68:2775-82.
- Wilson AR, Coulson PS 2006. Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 13-20.
- Wynn TA, Hoffmann KF 2000. Defining a schistosomiasis vaccination strategy-is it really Th1 versus Th2? *Parasitol Today* 16:497-501.
- Zhang X, Yuan Z, Duan Q, Zhu H, Yu H, Wang Q 2009. Mucosal immunity in mice induced by orally administered transgenic rice. *Vaccine* 27:1596-600.
- Zhou WY, Shi Y, Wu C, Zhang WJ, Mao XH, Guo G 2009. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine* 27:5013-9.

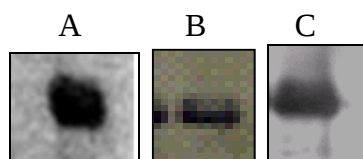


Figura 1. Antigenicidade da proteína rLTB-Sm14 avaliada por *Western blot*. A quimera foi detectada com os anticorpos (A) anti-rSm14, (B) anti-rLTB e (C) anti-CT.

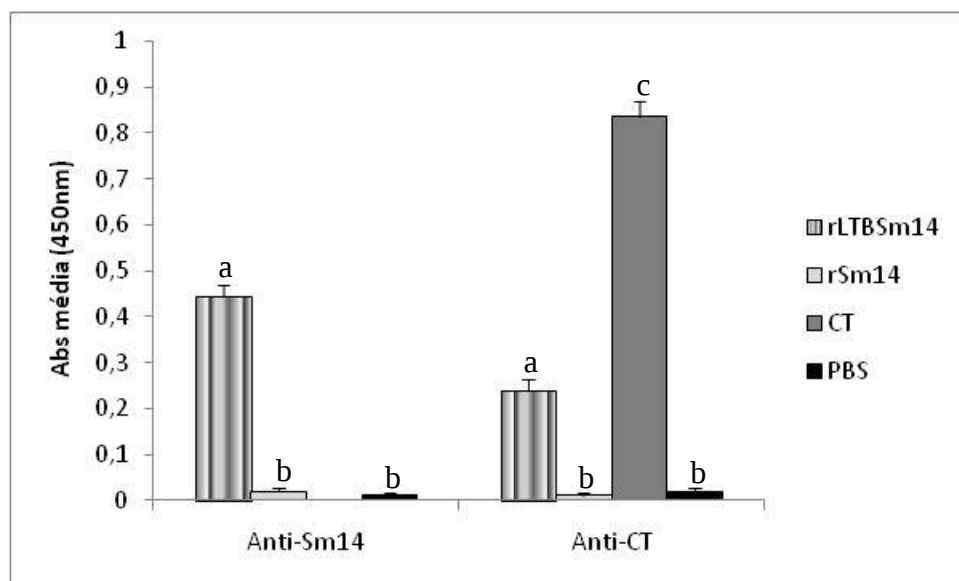


Figura 2. Avaliação da ligação da proteína rLTB-Sm14 ao gangliosídeo GM1, através de ELISA indireto. Como controle positivo utilizou-se a proteína CT e como negativos rSm14 e PBS. As barras representam a absorbância média ($DO_{450\text{ nm}} \pm$ desvio padrão (D.P.)). Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.001$).

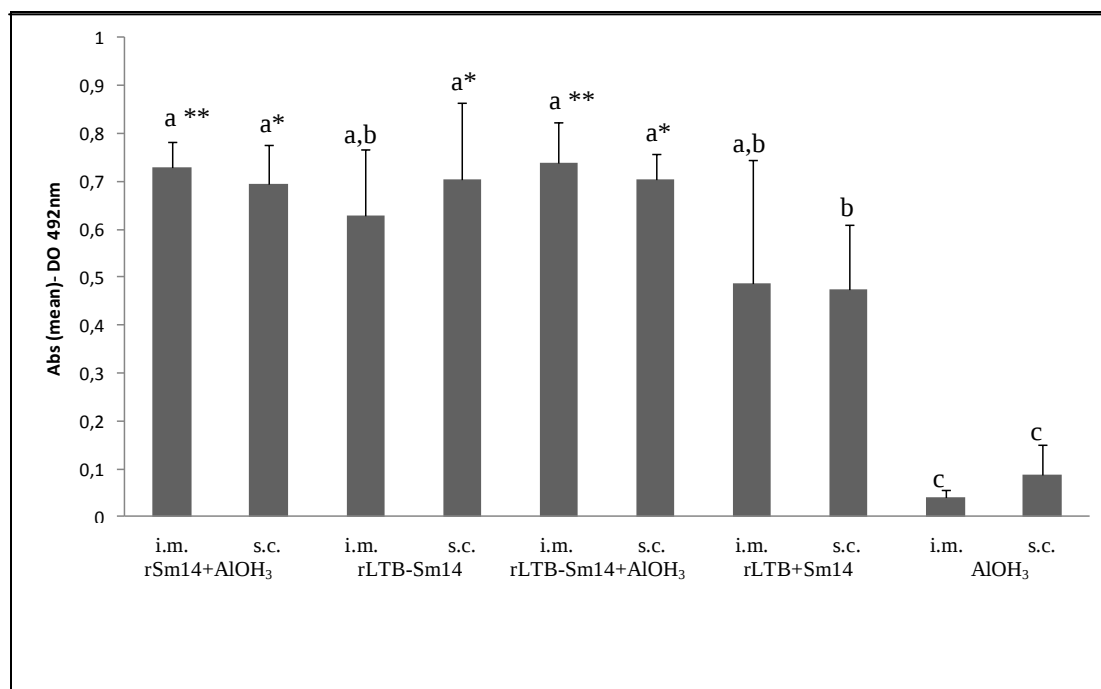


Figura 3. Avaliação da produção de anticorpos IgG anti-rSm14 em BALB/c. Placas foram sensibilizadas com rSm14 e o soro de cinco animais/grupo coletado 35 dias após a primeira imunização foi diluído individualmente (1:100) e testado em duplicata por ELISA indireto. Os resultados são expressos como a média das absorbâncias ($DO_{492\text{ nm}}$) (barras) $\pm$ D.P. Imunização de camundongos com LTB (i.m. ou s.c.) não induziu produção de IgG anti-rSm14 (dados não mostrados). Letras diferentes expressam significância estatística. Todos os grupos foram significativamente diferentes quando comparado com o seu respectivo controle de $Al(OH)_3$ ($p < 0.001$). O grupo rLTB+rSm14 s.c. apresentou a menor produção de IgG total quando comparado com os outros grupos. Esta diferença é indicada por asteriscos, onde valores de p significam: *, 0.01-0.05; **, 0.001-0.01.

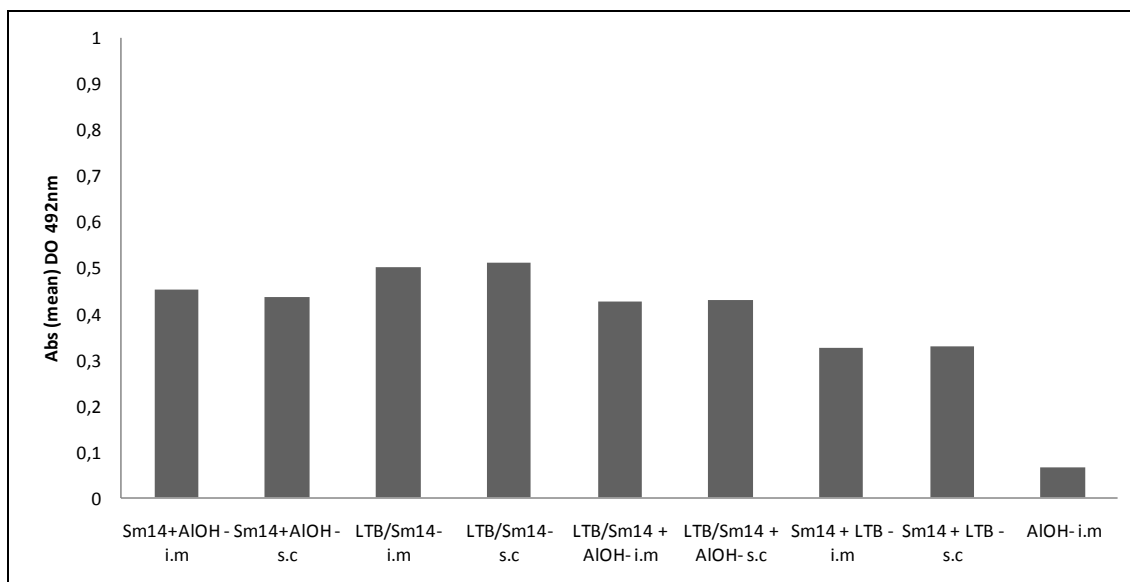


Figura 4. Avaliação da produção de anticorpos IgA anti-rSm14 em BALB/c mensurados por ELISA indireto. Soro de 5 animais/grupo coletados 35 dias após a primeira imunização foram misturados, diluídos (1:10) e testados em triplicata quanto a sua ligação à rSm14. Posteriormente soro anti-IgA de camundongo conjugado com peroxidase foi adicionado. As barras indicam a média das absorbâncias ($DO_{492\text{ nm}}$). Camundongos imunizados com rLTB (i.m ou s.c) e $Al(OH)_3$ (s.c) não produziram IgA anti-rSm14 (dados não mostrados), sendo o controle representado pelo $Al(OH)_3$ (i.m.).

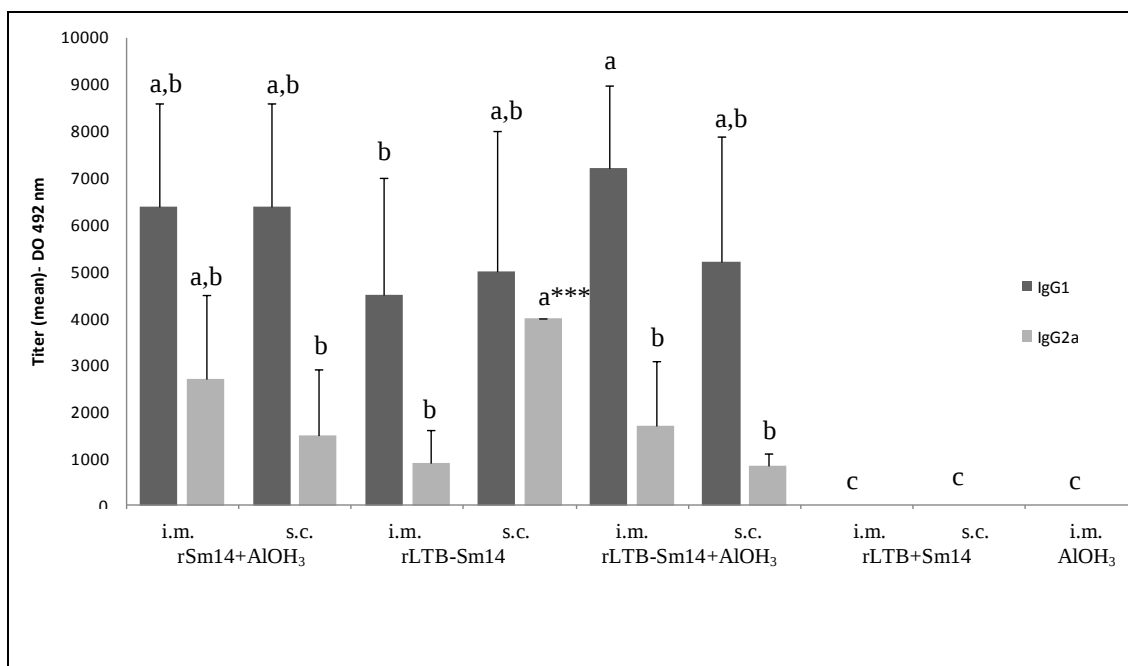


Figura 5. Titulação da produção de IgG1 e IgG2a anti-rSm14 por camundongos BALB/c imunizados via i.m. ou s.c. Os isotipos IgG1 e IgG2a foram mensurados em duplicata por ELISA indireto utilizando-se soro de 5 animais/grupo coletado 35 dias após a primeira imunização nas diluições de 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000. As barras apresentam a média dos títulos $\pm$ D.P. Camundongos imunizados com rLTB (i.m ou s.c) e Al(OH)₃ (s.c) não produziram IgG1 ou IgG2a anti-rSm14 (dados não mostrados), sendo o controle representado no gráfico pelo IgG1 produzido por animais do grupo Al(OH)₃ (i.m.). Letras diferentes indicam significância estatística (p , 0.01-0.05). Os grupos foram comparados individualmente quanto à produção de cada isotipo, não sendo os diferentes isotipos comparados entre si. Todos os grupos foram significativamente diferentes dos grupos Al(OH)₃ e rLTB+rSm14 i.m./s.c. ($p < 0.001$). A vacina rLTB-Sm14 via s.c. produziu um título de IgG2a anti-rSm14 significativamente (***, $p < 0.001$) maior do que o induzido pela via i.m.

Tabela 1: Proteção de camundongos suíços *outbred* contra infecção experimental por cercárias de *S.mansoni*.

Vacina ^a	Carga parasitária recuperada (Média±D.P.) ^b	Proteção (%)
rLTB-Sm14	23,5±11,4	0,0 ^c
rLTB-Sm14+Al(OH) ₃	15,0±6,2	36,38 ^c
rSm14+Al(OH) ₃	12,5±6,5	50,45 ^c
rLTB	25,5±10,5	0 ^c

^a Foram utilizados 10 animais/grupo em cada experimento independente.

^b Média de dois experimentos independentes.

^c Proteção comparada com o grupo LTB.

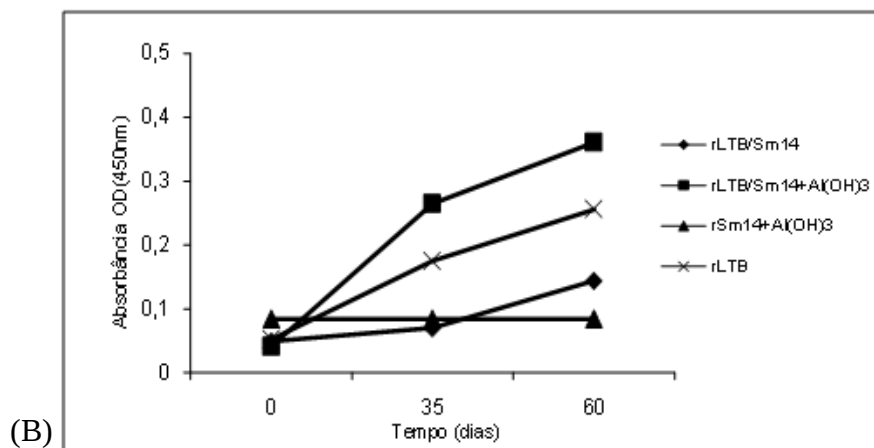
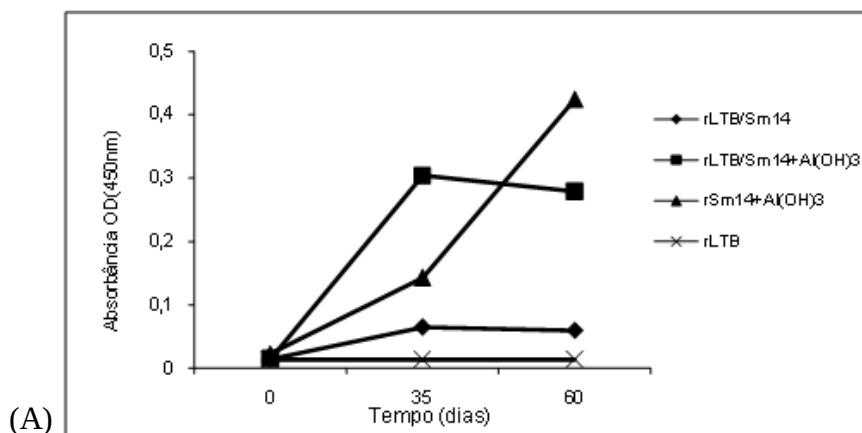


Figura 6. Avaliação da produção de IgG total anti-rSm14 (A) e anti-rLTB (B) por camundongos suíços. O *pool* dos soros de 10 animais coletados dia 0, 35 e 60 após a primeira imunização foram diluídos 1:100 e analisados em triplicata por ELISA indireto. A medida da resposta imune está expressa na média das três absorvâncias.

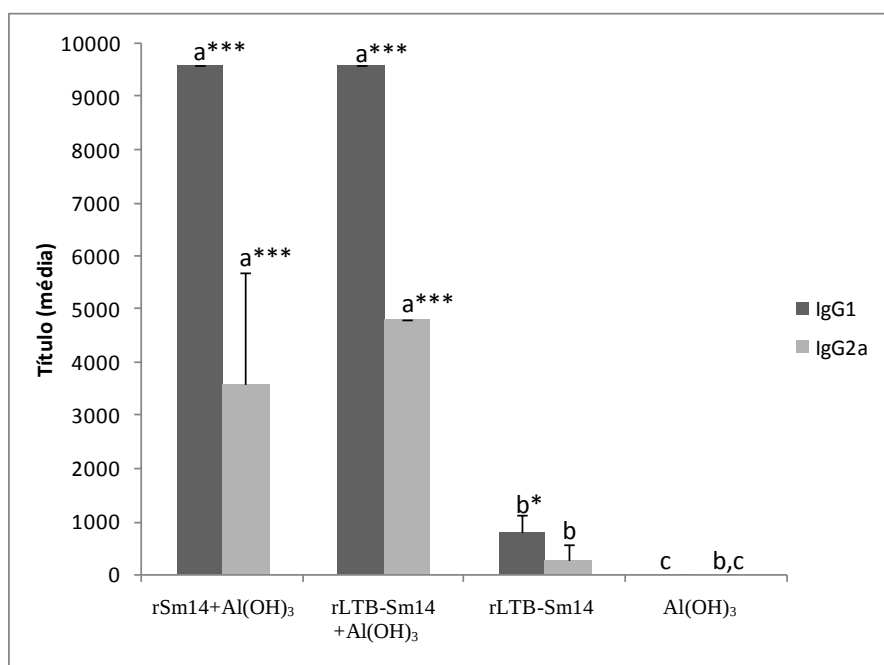


Figura 7. Titulação da produção de IgG1 e IgG2a anti-rSm14 por camundongos suíços imunizados via s.c. Os isotipos IgG1 e IgG2a foram mensurados em duplicata por ELISA indireto utilizando-se soro de 6 animais/grupo coletado 35 dias após a primeira imunização nas diluições de 1:300, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800 e 1:9600. As barras representam a média dos títulos $\pm$ D.P. Letras diferentes indicam significância estatística. Os grupos foram comparados individualmente quanto à produção de cada isotipo, não sendo os diferentes isotipos comparados entre si. Os valores de *p* são indicados por asteriscos, os quais significam: *, 0.01-0.05; ***, < 0.001.

7 CONCLUSÕES

- A construção das quimeras rLTB-Sm14 e rLTB-Sm29 foi efetuada com sucesso, visto que as quimeras mantiveram características individuais das proteínas fusionadas e que foram tanto antigênicas quanto imunogênicas;
- A molécula rLTK63 apresentou um feito adjuvante maior do que a rLTB na indução da resposta imune contra os antígenos rSm29 e rAMA-1.
- A co-infecção modulou a resposta imune mediada pelos antígenos vacinais rSm29 e rAMA-1 co-administrados com o adjuvante rLTK63 favorecendo a indução de resposta imune protetora contra esquistossomose e malária, respectivamente.
- A via de administração subcutânea influenciou a amplitude e a modulação da resposta imune induzida pelo antígeno rLTB-Sm14.
- A vacina rLTB-Sm14 não protegeu camundongos contra o desafio com cercárias de *S. mansoni*.

8 REFERÊNCIAS- INTRODUÇÃO GERAL

ALGER, H.M.; WILLIAMS, D.L. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. **Mol Biochem Parasitol**, v. 121, p. 129–139, 2002.

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.

AMANTE, F.H.; CREWETHER, P.E.; ANDERS, R.F.; GOOD, M.F. A cryptic T cell epitope on the apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi adami* can prime for an anamnestic antibody response: implications for malaria vaccine design. **J Immunol**, v. 159, p. 5535–5544, 1999.

ANDERS, R.F.; CREWETHER, P.E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M.L.S.M.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine**, v. 16, p. 240-247, 1998.

AUGUSTINE, A. D; HALL, B. F.; LEITNER, W. W; MO, A. X.; WALI, T. M.; FAUCI, A. S. NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges. **Nature immunology**, v. 10, n. 7, 2009.

BANNISTER, L.H.; DLUZEWSKI, A.R. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. **Blood Cells**, v. 16, n. 2-3, p. 257-92, 1990.

BARAT, L.M. Four malaria success stories: how malaria burden was successfully reduced in Brazil, Eritrea, India, and Vietnam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 12–16, 2006.

BARCLAY, V.C.; CHAN, B.H.K.; ANDERS, R.F.; READ, A.F. Mixed allele malaria vaccines: Host protection and within-host selection. **Vaccine**, v. 26, p. 6099–6107, 2008.

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.

BICA, I.; HAMER, D.H.; STADECKER, M.J. Hepatic schistosomiasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 14, p. 583–604, 2000.

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

BREMAN, J.G.; ALILIO, M.; MILLS, A. Conquering the intolerable burden of malaria: What's new, what's needed: a summary. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 1-15, 2004.

BRITO, C.F.A; CALDAS, I.R.; COURA FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S.C. CD4+T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon- γ and tumour necrosis factor- α 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 J Med Biol Res**. v. 35, p. 377-81, 2002.

BROOKER, S.; AKWALE, W.; PULLAN, R.; ESTAMBALE, B.; CLARKE, S.E.; SNOW, R.W.; HOTEZ, J.P. Epidemiology of *Plasmodium* –helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, p. 88–98. 2007.

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 Biochem Parasitol**, v.88, p. 175-185, 1997.

BUENO, L.L.; FUJIWARA, R.T.; SOARES, I.S.; BRAGA, E.M. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response. **Vaccine**, v. 26, p. 1204—1213, 2008.

BURNS JR, J.M.; FLAHERTY, P.R.; NANAVATI, P.; WEIDANZ, W.P. Protection against *Plasmodium chabaudi* Malaria Induced by Immunization with Apical Membrane Antigen 1 and Merozoite Surface Protein 1 in the Absence of Gamma Interferon or Interleukin-4 **Infect Immun**, v. 72, n. 10, p. 5605–5612, 2004.

CALDAS, I.R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLOSIMO, E.; CARVALHO, O.S.; MASSARA, C.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 62, p. 57–64, 2000.

CAO, S.; ZHANG, Y.; LIU, F.; WANG, Q.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; LI, C.; LIANG, M.; LI, D. Secretory expression and purification of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit and its applications on intranasal vaccination of hantavirus. **Mol Biotechnol**, v. 41, n. 2, p. 91-8, 2009.

CARDOSO, F.C.; PACÍFICO, R.N.A.; MORTARA, R.A.; OLIVEIRA, S.C. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the

tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clin Exp Immunol**, v. 144, p. 382–391, 2006.

CARDOSO, F.C.; MACEDO, G.C.; GAVA, E.; KITTEN, G.T.; MATI, V.L.; MELO, A.L.; CALIARI, M.V.; ALMEIDA, G.T.; VENANCIO, T.M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S.C. Schistosoma mansoni tegument protein sm29 is able to induce a th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e308, 2008.

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.; ENGELS, D. Schistosomiasis. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 12–3, 2004.

CORREA-OLIVEIRA, R.; CALDAS, I.R.; GAZZINELLI, G. Natural versus drug-induced resistance in Schistosoma mansoni infection. **Parasitol Today**, v. 16, p. 397–399, 2000.

CORTÉS, A.; MELLOMBO, M.; MASCIANTONIO, R.; MURPHY, V.J.; REEDER, J.C.; ANDERS, R.F. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. **Infect Immun**, v. 73, p. 422–30, 2005.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-19, 2004.

COUTINHO-ABREU, I.V.; RAMALHO-ORTIGAO, M. Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 1-12, 2010.

COWMAN, A.F.; CRABB, D.B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, p. 755–766, 2006.

COX, F.E. Concomitant infections, parasites and immune responses. **Parasitology**, v. 122 Suppl:S23-38, 2001.

CURWEN, R.S.; WILSON, R.A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 63–66, 2003.

DAY, N.P.; HIEN, T.T.; SCHOLLAARDT, T.; LOC, P.P.; CHUONG, L.V.; CHAU, T.T.; MAI, N.T.; PHU, N.H.; SINH, D.X.; WHITE, N.J.; HO, M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. **J Infect Dis**, v. 180, p. 1288–1297, 1999.

DIALLO, T. O.; REMOUE, F.; SCHACHT, A.M.; CHARRIER, N.; DOMPNIER, J.P.; PILLET, S.; GARRAUD, O.; N'DIAYE, A.A.; CAPRON, A.; CAPRON, M.; RIVEAU, G. Schistosomiasis co-infection in humans influences inflammatory markers in

uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Parasite Immunology**, v. 26, p. 365–369, 2004.

DIALLO, T.O.; REMOUE, F.; GAAYEB, L.; SCHACHT, A-M.; CHARRIER, N.; DE CLERCK, D.; DOMPNIER, J-P.; RIVEAU, J. Schistosomiasis Coinfection in Children Influences Acquired Immune Response against *Plasmodium falciparum* Malaria Antigens. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12764, 2010.

DOOLAN, D.L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J.K. Acquired Immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13–36, 2009.

DRAKELEY, C.; SUTHERLAND, C.; BOUSEMA, J.T.; SAUERWEIN, R.W.; TARGETT, G.A. The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 424–430, 2006.

DRUILHE, P.; TALL A.; SOKHNA, C. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? **Trends Parasitol**, v. 21, p. 359-362, 2005.

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

ELIAS, D.; AKUFFO, H.; PAWLOWSKI, A.; HAILE, M.; SCHON, T.; BRITTON, S. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 23, p. 1326–1334, 2005.

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.

FRANKS, S.; KORAM, K.A.; WAGNER, G.E.; TETTEH, K.; MCGUINNESS, D.; WHEELER, J.G.; NKURUMAH, F.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; RILEY, E.M. Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. **J Infect Dis**; v. 183, p. 796–804, 2001.

FRANTZ, F.G.; ROSADA, R.S.; PERES-BUZALAF, C.; PERUSSO, F.R.T.; RODRIGUES, V.; RAMOS, S.G.; KUNKEL, S.L.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Helminth Coinfection Does Not Affect Therapeutic Effect of a DNA Vaccine in Mice Harboring Tuberculosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 6, p. e700, 2010.

GALLUP, J.L.; SACHS, J.D. The economic burden of malaria. **Am J Trop Med Hyg**, v. 64, p. 85–96, 2001.

GARCIA, L.S. Malaria. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 93-129, 2010.

GOBERT, G.N.; MCINNES, R.; MOERTEL, L.; NELSON, C.; JONES, M.K.; HU, W.; MCMANUS, D.P. Transcriptomics tool for the human *Schistosoma* blood flukes using microarray gene expression profiling. **Exp Parasitol**, v. 114, p. 160–172, 2006.

GOOD, M.F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C.R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 69–99, 2005.

GOOD, M.F. The hope but challenge for developing a vaccine that might control malaria. **Eur J Immunol**, v.39, p. 939–943, 2009.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

GUERRA, C.A.; SNOW, R.W.; HAY, S.I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 353–358, 2006.

HAFALLA, J.C.; COCKBURN, I.A.; ZAVALA, F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. **Parasite Immunol**, v. 28, p. 15–24, 2006.

HANSEN, D.S.; SCHOFIELD, L. Natural Regulatory T Cells in Malaria: Host or Parasite Allies? **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000771, 2010.

HARTGERS, F.C.; YAZDANBAKHSH, M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 497–506, 2006.

HARTGERS, F.C.; OBENG, B.B.; KRUIZE, Y.C.M.; DIJKHUIS, A.; MCCALL, M.; SAUERWEIN, R.W.; LUTY, A.J.F.; BOAKYE, D.A.; YAZDANBAKHSH, M. Responses to malarial antigens are altered in helminth-infected children. **The Journal of Infectious Diseases**, v.199, p.1528–35, 2009.

HELMBY, H.; PERLMANN, H.; TROYE-BLOMBERG, M.; PERLMANN, P. Immunoglobulin E elevation in *Plasmodium chabaudi* malaria. **Infect Immun**, v. 64, p. 1432–1433, 1996.

HELMBY, H.; KULLBERG, M.; TROYE-BLOMBERG, M. Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. **Infect Immun**, v. 66, p. 5167–5174, 1998.

HEWITSON, J.P.; HAMBLIN, P.A.; MOUNTFORD, A.P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 271–280, 2005.

HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; ANDERS, R.F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infect Immun**, v. 69, p. 3286–94, 2001.

HOKKE, C.H. & DEELDER, A.M. Schistosome glycoconjugates in host–parasite interplay. **Glycoconj J**, v. 18, p. 573–587, 2001.

HOKKE, C.H. & YAZDANBAKHSH, M. Schistosome glycans and innate immunity. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 257–264, 2005.

HOLLINGDALE, M.R.; KRZYCH, U. Immune responses to liver-stage parasites: implications for vaccine development. **Chem Immunol**, v. 80, p.97–124, 2002.

HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends Immunol**, v. 249, p.491–499, 2003.

IMASE, A.; MATSUDA, H.; IRIE, Y.; IWAMURA, Y. Existence of host DNA sequences in schistosomes – horizontal and vertical transmission. **Parasitol Int**, v. 52, p. 369–373, 2003.

JANKOVIC, D.; WYNN, T.A.; KULLBERG, M.C.; HIENY, S.; CASPAR, P.; JAMES, S.; CHEEVER, A.W.; SHER, A. Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. **J Immunol**, v. 162, p. 345–351, 1999.

JIANG, G.; SHI, M.; CONTEH, S.; RICHIE, N.; BANANIA, G.; GENESHAN, H.; VALENCIA, A.; SINGH, P.; AGUIAR, J.; LIMBACH, K.; KAMRUD, K.I.; RAYNER, J.; SMITH, J.; BRUDER, J.T.; KING, C.R.; TSUBOI, T.; TAKEO, S.; ENDO, Y.; DOOLAN, D.L.; RICHIE, T.L.; WEISS, W.R. Sterile Protection against *Plasmodium knowlesi* in Rhesus Monkeys from a Malaria Vaccine: Comparison of Heterologous Prime Boost Strategies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6559, 2009.

KASINATHAN, R.S.; MORGAN, W.M.; GREENBERG, R.M. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. **Mol Biochem Parasitol**, v. 173, n. 1, p. 25–31, 2010.

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

LANGHORNE, J.; CROSS, C.; SEIXAS, E.; LI, C.; VON DER WEID, T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 1730–1734, 1998.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F.M.; SPONAAS, A.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, p. 725 – 732, 2008.

LARANJEIRAS, R.F.; BRANT, L.C.C.; LIMA, A.C.L.; COELHO, P.M.Z.; BRAGA, E.M. Reduced protective effect of *Plasmodium berghei* immunization by concurrent

Schistosoma mansoni infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 674-677, 2008.

LEGESSE, M.; ERKO, B.; BALCHA, F. Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in Schistosoma mansoni and Plasmodium berghei co-infected mice. **Acta Tropica**, v. 91, p. 161–166, 2004.

LI, Y.S.; RASO, G.; ZHAO, Y.; HE, H.K.; ELLIS, M.; MCMANUS, D.P. Predicted impact of large water management projects on schistosomiasis transmission and control in the Dongting Lake Region, China. **Emerg Infect Dis**, v. 13, p. 973–979, 2007.

LOUKAS, A.; JONES, M.K.; KING, L.T.; BRINDLEY, P.J.; MCMANUS, D.P. Receptor for Fc on the Surfaces of Schistosomes. **Infect Immun**, p. 3646–3651, 2001.

LYKE, K.E.; DICKO, A.; DABO, A.; SANGARE, L.; KONE, A.; COULIBALY, D.; GUINDO, A.; TRAORE, K.; DAOU, M.; DIARRA, I.; SZTEIN, M.B.; PLOWE, C.V.; DOUMBO, O.K. Association of Schistosoma haematobium infection with protection against acute Plasmodium falciparum malaria in Malian children. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, p. 1124-30, 2005.

LYKE, K.E.; DABO, A.; SANGARE, L.; ARAMA, C.; DAOU, M.; DIARRA, I.; PLOWE, C.V.; DOUMBO, O.K.; SZTEIN, M.B. Effects of concomitant Schistosoma haematobium infection on the serum cytokine levels elicited by acute Plasmodium falciparum malaria infection in malian children. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5718–5724, 2006.

LYNCH, M.M.; CERNETICH-OTT, A.; WEIDANZ, W.P.; BURNS Jr, J.M. Prediction of Merozoite Surface Protein 1 and Apical Membrane Antigen 1 Vaccine Efficacies against Plasmodium chabaudi Malaria Based on Prechallenge Antibody Responses. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 3, p. 293–302, 2009.

MAITLAND, K.; MARSH, K. Pathophysiology of severe malaria in children. **Acta Trop**, v. 90, p. 131–140, 2004.

MARSH, K.; SNOW, R.W. Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. **Philos Trans R Soc London B**, v. 352, p. 1385–1394, 1997.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol**, v. 28, p. 51–60, 2006.

MBOW, M.L.; DE GREGORIO, E.; VALIANTE, N.M.; RAPPUOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 3, p. 411-6, 2010.

MCMANUS D. P.; LOUKAS, A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 225–242, 2008.

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

MKOJI, G.M.; SMITH, J.M.; PRICHARD, R.K. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. **Int J Parasitol**, v. 18, p. 661–666, 1988.

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- γ 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. **J Biol Chemistry**, v. 266, n. 13, p. 8447 – 8454, 1991.

MOUNTFORD, A.P. Immunological aspects of schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 243–246, 2005.

MUOK, E.M.; MWINZI, P.N.; BLACK, C.L.; CARTER, J.M.; NG'ANG'A, Z.W.; GICHERU, M.M.; SECOR, W.E.; KARANJA, D.M.; COLLEY, D.G. Childhood coinfections with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma mansoni* result in lower percentages of activated T cells and T regulatory memory cells than schistosomiasis only. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, p. 475-478, 2009.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.B.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, p. 9:115, 2010.

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

PEARCE, E.J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J.M.; LEWIS, F.A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, p. 159–166, 1991.

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

PEARCE, E.J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 265–270, 2005.

PETERSON, M.G.; MARSHALL, V.M.; SMYTHE, J.A.; CREWETHER, P.E.; LEW, A.; SILVA, A.; ANDERS, R.F.; KEMP, D.J. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. **Mol Cell Biol**, v. 9, p. 3151, 1989.

PERKINS, D.J.; WEINBERG, J.B.; KREMSNER, P.G. Reduced interleukin- 12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. **J Infect Dis**, v. 182, p. 988–992, 2000.

PIZZA, M.; GIULIANI, M.M.; FONTANA, M.R.; MONACI, E.; DOUCE, G.; DOUGAN, G.; MILLS, K.H.G.; RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. **Vaccine**, v. 19, p. 2534-41, 2001.

PLEASS, R.J.; KUSEL, J.R.; WOOF, J.M. Cleavage of human IgE mediated by *Schistosoma mansoni*. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 121, p. 194–204, 2000.

POLLEY, S.D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS, A.W.; DUTTA, S.; LANAR, D.E. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. **Vaccine**, v. 23, p. 718–28, 2004.

PONNUDURAI, T.; LENSEN, A.H.W.; VAN GEMERT, G.J.; BOLMER, M.G.; MEUWISSEN, J.H. Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 85, p. 175–180, 1991.

REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**, v. 30, p. 23-32, 2009.

ROMERO, J.F.; CIABATTINI, A.; GUILLAUME, P.; FRANK, G.; RUGGIERO, P.; PETTINI, E.; DEL GIUDICE, J.; MEDAGLINI, D.; CORRADIN, G. Intranasal administration of the synthetic polypeptide from the C-terminus of the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* with the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) induces a complete protection against malaria challenge. **Vaccine**, v. 27, p. 1266-71, 2009.

SABIN, E.A.; ARAUJO, M.I.; CARVALHO, E.M.; PEARCE, E.J. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J Infect Dis**, v. 173, p. 269–272, 1996.

SANGWEME, D.; SHIFF, C.; KUMAR, N. *Plasmodium yoelii*: Adverse Outcome of Non-lethal *P. yoelii* Malaria during Co-infection with *Schistosoma mansoni* in BALB/c Mouse Model. **Exp Parasitol**, v. 122, p. 254–259, 2009.

SAYED, A.A. & WILLIAMS, D.L. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 26159–26166, 2004.

SIMMONS, C.P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B.M.; WILLIAMS, N.A.; et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scand J Immunol**, v. 53, n. 3, p. 218-26, 2001.

SIMPSON, A.J. Schistosome surface antigens: developmental expression and immunological function. **Parasitol Today**, v. 6, p. 40–5, 1990.

SMITH, D.L.; KLEIN, E.Y.; MCKENZIE, F.E.; LAXMINARAYAN, R. Prospective strategies to delay the evolution of anti-malarial drug resistance: weighing the uncertainty. **Malaria J**, v. 9, p. 217, 2010.

SOKHNA C, LE HESRAN JY, MBAYE PA, AKIANA J, CAMARA P, DIOP M, LY A, DRUILHE P 2004. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. **Malaria J**, v. 3, p. 43, 2004.

SPRING, M.D.; CUMMINGS, J.F.; OCKENHOUSE, C.F.; DUTTA, S.; REIDLER, R.; et al. Phase 1/2a Study of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Administered in Adjuvant System AS01B or AS02A. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5254, 2009.

STANISIC, D.I.; RICHARDS, J.S.; MCCALLUM, F.J.; MICHON, P.; KING, C.L.; SCHOEPLIN, S.; GILSON, P.R.; MURPHY, V.J.; ANDERS, R.F.; MUELLER, I.; BEESON, J.G. Immunoglobulin G Subclass-Specific Responses against *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens Are Associated with Control of Parasitemia and Protection from Symptomatic Illness. **Infect Immun**, v. 77, n. 3, p. 1165–1174, 2009.

STEVENSON, M.M.; HUANG, D.Y.; PODOBA, J.E.; NOWOTARSKI, M.E. Macrophage activation during *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant C57BL/6 and susceptible A/J mice. **Infect Immun**, v. 60, p. 1193–1201, 1992.

STEVENSON, M.M.; RILEY, E. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 169–180, 2004.

STEVENSON, M.M.; URBAN, B.C. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. **Parasite Immunol**, v. 28, p. 5–14, 2006.

STOWERS, A.W.; KENNEDY, M.C.; KEEGAN, B.P.; SAUL, A.; LONG, C.A.; MILLER, L.H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect Immun**, v. 70, p. 6961–7, 2002.

SU, Z.; TAM, M.; JANKOVIC, D.; STEVENSON, M.M. Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. **Infect Immun**, v. 71, p. 5178–5187, 2003.

SWARTZ, J.M.; DYER, K.D.; CHEEVER, A.W.; RAMALINGAM, T.; PESNICAK, L.; DOMACHOWSKE, J.B.; LEE, J.J.; LEE, N.A.; FOSTER, P.S.; WYNN, T.A.;

ROSENBERG, H.F. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood**, v. 108, p. 2420–2427, 2006.

TAYLOR, J.J.; MOHRS, M.; PEARCE, E.J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J Immunol**, v. 176, p. 5839–5847, 2006.

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. **PNAS**, v. 93, p. 269–273, 1996.

TENDLER, M.; SIMPSON, A.J. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Trop*, v. 108, p. 263–6, 2008.

THERA, M.A.; DOUMBO, O.K.; COULIBALY, D.; DIALLO, D.A.; KONE, A.K.; GUINDO, A.B.; et al. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1465, 2008.

TILLEY, L.; MCFADDEN, G.; COWMAN, A.; KLONIS, N. Illuminating *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. **Trends Parasitology**, v. 23, p. 268–77, 2007.

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

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S.R.; HODDER, A.N.; ANDERS, R.F.; CRABB, B.S.; COWMAN, A.F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Molecular Microbiology**, v. 38, p. 706–718, 2000.

VANDERBERG, J.P.; FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 991–996, 2004.

VAN DEN EIJNDEN, D.H.; BAKKER, H.; NEELEMAN, A.P.; VAN DEN NIEUWENHOF, I.; VAN DIE, I. Novel pathways in complex-type oligosaccharide synthesis: new vistas opened by studies in invertebrates. **Biochem Soc Trans**, v. 25, p. 887–893, 1997.

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. **Inter J Parasitol**, v. 36, p. 691–699, 2006.

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

VIANA, I.R.; SHER, A.; CARVALHO, O.S.; MASSARA, C.L.; ELOI-SANTOS, S.M.; PEARCE, E.J.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 88, p. 466–470, 1994.

VIANA, I.R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARVALHO ODOS, S.; MASSARA, C.L.; COLOSIMO, E.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. **Parasite Immunol**, v. 17, p. 297–304, 1995.

WAKNINE-GRINBERG, J.H.; GOLD, D.; OHAYON, A.; FLESCHER, E.; HEYFETS, A.; DOENHOFF, M.J.; SCHRAMM, G.; HAAS, H.; GOLENSER, J. *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. **Malaria J**, v. 9, p. 5, 2010.

WALTER, K.; FULFORD, A.J.; MCBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KARIUKI, H.C.; MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N.B.; VENNERVALD, B.J.; OUMA, J.H.; DUNNE, D.W. Increased human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens. **J Immunol**, v. 177, p. 5490–5498, 2006.

WEISS, G.E.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; DIA, S.; GUINDO, A.; TRAORE, A.; HUANG, C-Y.; MIURA, K.; MIRCETIC, M.; LI, S.; BAUGHMAN, A.; NARUM, D.L.; MILLER, L.H.; DOUMBO, O.K.; PIERCE, S.K.; CROMPTON, P.D. The plasmodium falciparum-specific human memory b cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 5, p. e1000912, 2010.

WILSON, A.R.; COULSON, P.S. Schistosome vaccines: a critical appraisal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 13-20, 2006.

WILSON, S.; VENNERVALD, B.J.; KADZO, H.; IRERI, E.; AMAGANGA, C.; BOOTH, M.; KARIUKI, H.C.; MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; OUMA, J.H.; MUCHIRI, E.; DUNNE, D.W. Hepatosplenomegaly in Kenyan schoolchildren: exacerbation by concurrent chronic exposure to malaria and *Schistosoma mansoni* infection. **Trop Med Int Health**, v. 12, p. 1442-1449, 2007.

WILSON, S.; JONES, F.M.; MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; BOOTH, M.; KARIUKI, H.C.; VENNERVALD, B.J.; OUMA, J.H.; MUCHIRI, E.; DUNNE, D.W. Childhood

schistosomiasis and malaria co-infection: hepatosplenomegaly is associated with low regulatory and Th2 responses to schistosome antigens. **Infect Immun**, v. 76, p. 2212-2218, 2008.

WILSON, S.; JONES, F. M.; MWATHA, J. K.; KIMANI, G.; BOOTH, M.; KARIUKI, H.C.; VENNERVALD, B.J.; OUMA, J.H.; MUCHIRI, E.; DUNNE, D.W. Hepatosplenomegaly associated with chronic malaria exposure: evidence for a pro-inflammatory mechanism exacerbated by schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, p. 64–71, 2009.

WILSON, S.; VENNERVALD, B.J.; KADZO, H.; IRERI, E.; AMAGANGA, C.; BOOTH, M.; KARIUKI, H.C.; MWATHA, J. K.; KIMANI, G.; OUMA, J.H.; MUCHIRI, E.; DUNNE, D.W. Health implications of chronic hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children chronically exposed to malarial infections and *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 2, p. 110–116. 2010.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M.M.; PESCE, J.T.; RAMALINGAM, T.R.; THOMPSON, R.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, p. 148–154, 2007.

WHO, TDR Progress. (2000) World Health Organization Tropical Diseases Research. New and Improved Tools – New candidates in development: vaccine development schistosomiasis.

WHO, World Health Organization. World Malaria Report 2009. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf (2009).

XU, H.; HODDER, A.N.; YAN, H.; CREWETHER, P.E.; ANDERS, R.F.; GOOD, M.F. T Cells Acting Independently of Antibody Contribute to Protective Immunity to *Plasmodium chabaudi* Infection After Apical Membrane Antigen 1 Immunization1. **J Immunol**, v. 165, p. 389–396, 2000.

YOSHIDA, A.; MARUYAMA, H.; KUMAGAI, T.; AMANO, T.; KOBAYASHI, F.; ZHANG, M.; HIMENO, K.; OHTA, N. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. **Int Immunol**, v. 12, p. 1117–1125, 2000.

ZHANG, W.; AHMAD, G.; TORBEN, W.; SIDDIQUI, A.A. Sm-p80-based DNA vaccine made in a human use approved vector VR1020 protects against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mouse. **Parasite Immunol**, v. 32, n. 4, p. 252-8, 2010.