

Parte VI - Epidemiologia e controle

34 - Desenvolvimento de vacinas para Esquistossomose mansoni: estado atual e perspectivas

Frederico G. C. Abath
Naftale Katz

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

ABATH, FGC., and KATZ, N. Desenvolvimento de vacinas para Esquistossomose mansoni: estado atual e perspectivas. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 1009-1028. ISBN 978-85-7541-370-8. Available from SciELO Books
<<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

34

Desenvolvimento de Vacinas para Esquistossomose Mansonii: estado atual e perspectivas

Frederico G. C. Abath
Naftale Katz



Vacinação contra a poliomielite.

No dia 14 de maio de 2006, historiadores, médicos e cientistas celebraram o terceiro centenário da primeira vacinação contra varíola realizada pelo inglês Edward Jenner, utilizando um vírus relacionado, porém menos virulento. Em consequência desta descoberta, a varíola, que por séculos foi um tormento para a humanidade, foi erradicada em 1980. Contudo, muitas outras doenças infecciosas continuam representando desafios às estratégias profiláticas de controle, incluindo as doenças parasitárias humanas, para as quais não existem vacinas comercializáveis.

Neste capítulo sobre desenvolvimento de vacinas para a esquistossomose mansoni, pretende-se: apresentar as evidências para resistência adquirida na esquistossomose; discutir as estratégias que são usadas para identificar antígenos potencialmente protetores; dar ênfase àqueles candidatos a vacina que foram mais bem caracterizados, em nível molecular, e encontram-se em etapa mais avançada de experimentação; considerar alguns problemas que ainda precisam ser solucionados para que uma vacina possa ser aplicada em grande escala em seres humanos; comentar sobre as implicações de uma vacina para o controle da esquistossomose.

As mais bem-sucedidas vacinas desenvolvidas e licenciadas até hoje são as que agem contra infecções agudas bacterianas e viróticas. Para algumas doenças infecciosas, vacinas bastante eficazes foram desenvolvidas de maneira empírica e com base em um conhecimento mínimo dos mecanismos imunológicos envolvidos (Hilleman, 1998). Entretanto, no caso das doenças causadas por patógenos que exibem variação antigênica extensa ou causam infecções crônicas e persistentes, como é o caso das doenças parasitárias, as dificuldades e fracassos sugerem que um entendimento muito claro da biologia dos organismos envolvidos e da natureza da resposta imune estimulada seja necessário, antes que se consiga uma vacina protetora.

Sem dúvida alguma, as vacinas estão entre as estratégias menos dispendiosas e mais poderosas para a prevenção de doenças e óbitos decorrentes. Isto é particularmente importante porque as doenças infecciosas e parasitárias permanecem como importantes causas de óbitos no mundo (WHO, 2004a). Entre as doenças infecciosas, os parasitos e mais recentemente o *human immunodeficiency virus* (HIV) são patógenos preocupantes, haja vista que não são passíveis de prevenção pela vacinação e a coexistência de ambos pode ser desastrosa.

A esquistossomose é uma doença crônica, às vezes debilitante, que afeta mais de duzentos milhões de indivíduos no mundo. É endêmica em 74 países em desenvolvimento, com mais de 80% das pessoas infectadas residindo na África. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a pesquisa se concentre no desenvolvimento e avaliação de novas estratégias e ferramentas de controle da doença (WHO, 2004b). A introdução, durante a última década, do tratamento da doença com drogas seguras e efetivas como o praziquantel e a oxamniquine, juntamente com o desenvolvimento do conceito de controle de morbidade em vez de controle de transmissão, levou algumas pessoas a imaginarem que ferramentas alternativas para o controle de esquistossomose não eram mais necessárias. Embora, usualmente, após o tratamento em massa com drogas, haja uma redução na prevalência e intensidade de infecção, com a diminuição da incidência e da prevalência de formas graves, a reinfeção em áreas de intensa transmissão ocorre rapidamente. A necessidade de tratamentos repetidos em intervalos curtos de dois a três anos, com custos operacionais importantes, justifica o desenvolvimento de estratégias de controle alternativas que possam ter um efeito mais duradouro. Entre estas medidas pode ser incluído o desenvolvimento de uma vacina eficiente e de baixo custo (Butterworth, 1992; Dunne, Hagan & Abath, 1995). Contudo, do ponto de vista estratégico e operacional, uma vacina provavelmente deverá ser usada juntamente com o tratamento com droga e outras medidas de controle (Bergquist et al., 2002). O tratamento com drogas causaria uma redução da carga parasitária a curto prazo, ao passo que a vacina produziria proteção de longo prazo. Existem modelos matemáticos que mostram que esta estratégia seria benéfica mesmo na ausência de proteção absoluta (Chan, Woolhouse & Bundy, 1997). No entanto, as medidas ligadas ao saneamento básico e mudanças no meio devem ser priorizadas, para que o controle da transmissão seja alcançado.

EVIDÊNCIAS PARA IMUNIDADE PROTETORA NA ESQUISTOSSOMOSE

Grande parte do conhecimento indicando que existe resistência a infecção e reinfecção por *Schistosoma* derivou de estudos em animais experimentais cuja resistência à reinfecção pode ser induzida mediante exposição a cercárias, com o desenvolvimento subsequente de uma infecção patente (modelo de infecção), ou por exposição a cercárias que passaram por irradiação (modelo de vacina por cercárias irradiadas). Neste modelo, o esquistossômulo oriundo da cercária irradiada imunizante morre em vários pontos de sua trajetória migratória, antes que a maturidade parasitária seja atingida no sistema porto-mesentérico (Coulson, 1997).

A resistência imune que se segue à exposição a cercárias normais se desenvolve coincidentemente ao período de oviposição e atinge o seu ápice entre quatro e seis semanas depois (Smithers & Terry, 1967; Dean, 1983). O termo 'imunidade concomitante' foi utilizado para descrever esta situação na qual a resistência parcial à reinfecção ocorre na presença de uma infecção ativa (Smithers & Terry, 1969). A transferência intra-hepática de vermes adultos de *Schistosoma* para macacos *Rhesus* mostrou que a imunidade protetora neste modelo pode ser induzida pela presença do verme adulto sem exposição prévia a cercárias ou esquistossômulos (Smithers & Terry, 1967). Contudo, a resistência é dirigida contra a larva em migração da infecção-desafio, ao passo que os vermes adultos da primeira infecção sobrevivem ao ataque imune.

Diferentemente, na exposição a cercárias irradiadas, a resposta imunoprotetora se desenvolve rapidamente, atinge o seu máximo na quinta semana e permanece alta por longos períodos de tempo (Dean, 1983). A proteção conferida por este tipo de vacinação pode chegar a 70%-80 %, tendo sido considerada um referencial para o desenvolvimento de vacinas contra a esquistossomose. Em camundongos, uma exposição única produz uma resposta tipo Th1, e após exposições múltiplas o componente protetor dependente de anticorpos torna-se predominante (Coulson, 1997). Claramente, este tipo de imunidade não está associada com a fase adulta do parasito, nem com a patologia induzida pelo ovo, mas é induzida pelos esquistossômulos danificados pela radiação durante a sua migração e amadurecimento alterados. Da mesma forma que na imunidade concomitante, são as larvas em migração ou formas parasitárias imaturas da infecção de desafio que são alvos da imunidade. A imunidade concomitante não é espécie-específica (Smithers & Doenhoff, 1982), mas a proteção induzida por cercárias irradiadas é (Bickle et al., 1985), levando alguns autores a acreditarem que, além de mecanismos imunes específicos, fatores não imunológicos, envolvendo alterações na vasculatura hepática, possam ter alguma importância na imunidade concomitante (Wilson, Coulson & McHugh, 1983).

Na esquistossomose humana, existem evidências de que se possa adquirir resistência contra a reinfecção (Butterworth & Hagan, 1987; Hagan, 1992; Hagan & Abath, 1992; Hagan et al., 1991; Butterworth et al., 1996). A observação de uma redução da intensidade de infecção em pessoas com mais idade em populações não tratadas é uma evidência circunstancial. Um possível fator de confundimento é que o grau de exposição à infecção pode ser mais baixo nos grupos de idade mais avançada. Esta controvérsia foi resolvida por estudos de reinfecção que mostraram que as crianças eram mais suscetíveis a reinfecção após o tratamento, enquanto os adultos eram relativamente resistentes, apesar de registrarem níveis equiparados de exposição ao parasito infectante (Wilkins et al., 1987). Portanto, um nível significativo de imunidade protetora contra *Schistosoma* parece se desenvolver em indivíduos mais velhos, nas áreas endêmicas, como resultado de exposições repetidas. Foi demonstrado que altos níveis de anticorpos IgE

antiparasitários estavam associados com a resistência à infecção (Hagan et al., 1991; Dunne et al., 1992; Rihet et al., 1991). Além disso, os eosinófilos são importantes como efetores da citotoxicidade mediada por células e dependentes de anticorpos (Dunne et al., 1992).

Apesar de os mecanismos de imunidade protetora contra *Schistosoma* terem sido examinados em vários modelos animais, assim como em estudos populacionais de base epidemiológica, estas investigações não foram suficientes para orientar sem ambigüidades e de maneira consistente o desenvolvimento de vacinas. Ainda persistem dúvidas sobre o tipo protetor de resposta imune na esquistossomose. Os resultados dos estudos em ratos e seres humanos sugerem que uma vacina deveria explorar os mecanismos efetores tipo Th2, enquanto os estudos de vacinação em camundongos indicam que a imunidade celular, envolvendo produção de IFN- γ e IL-12, seria benéfica. Apesar deste aparente conflito, evidências recentes parecem indicar que a produção de uma resposta imune mista do tipo Th1-Th2 (celular-humoral) pode ser a mais apropriada para uma estratégia de vacinação (Wynn & Hoffmann, 2000). Portanto, a identificação de antígenos que estimulam resposta Th-1 e Th-2 é relevante. Um outro fator complicador é que a maioria dos estudos de vacinação foram feitos com animais experimentais, não havendo garantias de que as respostas protetoras encontradas sejam equivalentes às que se obteriam com o ser humano (Katz, 1999a).

ESTRATÉGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS POTENCIALMENTE VACINAIS

Algumas observações sugerem que mesmo uma preparação vacinal que confira proteção parcial pode ser de relevância biológica e clínica para o controle da doença esquistossomótica (Capron et al., 1987; Mahmoud, 1989):

- os esquistossomos não se multiplicam dentro do hospedeiro definitivo;
- uma proporção pequena de indivíduos infectados possui carga parasitária muito elevada;
- a morbidade relaciona-se, dentre outros fatores, com a carga parasitária. A indução de proteção parcial em indivíduos susceptíveis reduziria a probabilidade de desenvolvimento de doença severa e também diminuiria a contaminação do ambiente, talvez reduzindo a transmissão para indivíduos não infectados (Dunne, Hagan & Abath, 1995).

Como mencionado anteriormente, cercárias irradiadas foram utilizadas com sucesso na indução de resistência em animais em experimento (Taylor & Bickle, 1986; Yole et al., 1996). As limitações da vacina com cercárias atenuadas por irradiação se relacionam com a dificuldade de produção e manutenção das mesmas para uso em larga escala. Mais que isto, a multiplicidade de antígenos contida nestas preparações irradiadas também é preocupante, pois nem todos os antígenos podem estar estimulando uma resposta imune protetora, havendo o risco de conseqüências imunopatológicas ou imunossupressoras não desejáveis (Mahmoud, 1989). Portanto, é essencial identificar os antígenos relevantes do parasito que possam constituir uma vacina definida e segura. Camundongos vacinados com cercárias irradiadas apresentam resposta imune celular e humoral a vários antígenos, incluindo paramiosina, HSP70 (uma proteína de choque térmico – *heat shock protein*), a proteína de membrana Sm23, glutational-S-transferase e triose-fosfatidomerase (Richter, Reynoldss & Harn, 1993).

Várias estratégias foram utilizadas para a identificação de imunógenos para vacinas contra a esquistossomose (Sher et al., 1989). Uma das abordagens utiliza a produção de anticorpos monoclonais

contra fases do ciclo de vida do parasito que podem estar envolvidas no estímulo de respostas imunes protetoras ou representam alvos da imunidade protetora. Os anticorpos monoclonais capazes de transferir passivamente níveis altos de resistência a reinfeção são usados para identificar epitopos relevantes. Esta abordagem levou à identificação de GP32, GP38 (Capron et al., 1987) e da triose-fosfato-isomerase (Harn et al., 1992). A identificação de antígenos reconhecidos exclusivamente por hospedeiros experimentais resistentes revelou a importância dos antígenos GP22/Sm25 (El-Sherbeini et al., 1991; Knight et al., 1989; Omer-Ali et al., 1991). Anticorpos produzidos contra antígenos exclusivamente reconhecidos por soros de camundongos vacinados com cercárias irradiadas também foram usados em procedimentos de seleção que conduziram à identificação de um antígeno de 200 kDa (miosina) (Soisson et al., 1992; Richter, Incani & Harn, 1996). Embora os homogenatos parasitários ou frações parasitárias (por exemplo, frações solúveis, preparações de membranas do tegumento) sejam bem menos potentes que as vacinas de cercárias irradiadas na indução de imunidade protetora, eles permitiram a indução de anticorpos em animais parcialmente protegidos, que resultou na identificação de candidatos a imunógenos tais como paramiosina (37), Sm25 (34) e Sm14 (38).

Os estudos populacionais de resistência à infecção também foram úteis na identificação de candidatos potenciais a vacina. A resistência humana a *Schistosoma mansoni* foi associada com a reatividade aumentada de anticorpos contra determinados antígenos da superfície do esquistossômulo. O estudo comparativo do padrão de reatividade do soro de indivíduos com alta e baixa susceptibilidade à infecção indicou que a reatividade de anticorpos IgG contra um antígeno de 37 kDa (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase – Gapdh) pode estar associada com resistência (Dessein et al., 1988; Argiro et al., 2000). Uma outra abordagem alternativa foi a identificação, nos vários estágios do ciclo de vida do parasito, de componentes cuja função seja essencial para a sobrevivência, como é o caso da elastase cercariana (McKerrow & Doenhoff, 1988).

Todas estas abordagens têm vantagens e desvantagens, mas se mostraram úteis nas etapas iniciais para a identificação de antígenos relevantes. Como resultado, vários antígenos de *Schistosoma* foram gerados em diversas formas, incluindo preparações com proteínas nativas e produtos obtidos por várias abordagens de engenharia genética e testados para avaliação de imunogenicidade, proteção e toxicidade. Além disso, informações detalhadas sobre as seqüências dos genes que codificam aquelas proteínas permitiram o mapeamento e síntese dos epitopos relevantes para estudos da resposta imune de células T e B.

É possível que os antígenos expressos em vários estágios parasitários sejam mais apropriados que os antígenos estágio-específicos para induzir os mecanismos efetores responsáveis pela imunidade (Capron et al., 1987). As moléculas usadas em vacinação devem estimular imunidade protetora sem produzir colateralmente anticorpos bloqueadores ou resposta imune potencialmente envolvida com a formação de granulomas e fibrogênese (Bergquist, 1990).

Com o avanço das tecnologias genômicas e proteômicas, novas estratégias se tornaram disponíveis para a identificação de genes/antígenos potencialmente relevantes para a imunidade protetora contra a esquistossomose. Os candidatos potenciais a vacina supostamente incluem proteínas que estão expostas na superfície ou são excretadas, e que são expressas nos estágios parasitários presentes no hospedeiro humano. Estas propriedades foram exploradas, no sentido de se identificar proteínas que pudessem ser categorizadas como toxinas, receptores de adesão de superfície, proteínas de membrana superficiais,

receptores para fatores do hospedeiro e enzimas expostas na superfície mediante categorização por ontologia genética (Verjovski-Almeida et al., 2003).

ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA

Será abordada, neste capítulo, a caracterização molecular, bioquímica e imunológica dos antígenos que foram considerados, pela OMS, como os mais promissores para o desenvolvimento de uma vacina: GST (glutathione-S-transferase); Sm14 (proteína ligante de ácidos graxos); paramiosina; TPI (triose-fosfato-isomerase); Sm23 e miosina (IrV5) (Quadro 1). Contudo, certamente existem vários outros antígenos igualmente promissores, que merecem ser mais bem avaliados visando ao desenvolvimento de uma vacina (Pearce, 2003). É interessante notar que muitos dos antígenos que continuam sendo testados presentemente como possíveis vacinas contra a esquistossomose foram identificados há mais de uma década, enquanto relativamente poucos novos antígenos foram experimentalmente propostos como candidatos vacinais nos últimos anos (Argiro et al., 2000; Webster et al., 1998; Petzke et al., 2000; Mohamed et al., 1998; Cook et al., 2004). Muitos dos antígenos potencialmente protetores identificados em *S. mansoni* correspondem a proteínas homólogas em *S. japonicum* e *S. haematobium*, que no entanto não receberão muita atenção neste capítulo, que se concentrará primariamente em *S. mansoni*.

A maior parte das preparações vacinais propostas para a esquistossomose consistiram em antígenos nativos purificados, antígenos recombinantes, construções moleculares com peptídeos sintéticos e, nos últimos anos, vacinas de DNA. Vários pesquisadores obtiveram êxito em induzir resposta imune antígeno-específica com vacinas de DNA (Yang et al., 2001; Waine et al., 1997; Zhang et al., 2000), apesar de poucas publicações terem relatado sucesso na imunidade protetora (Mohamed et al., 1998; Da'dara et al., 2001; Zhang et al., 2001), talvez indicando que esta abordagem não produza a resposta imune adequada para a proteção contra a esquistossomose. Sabidamente, indução de resposta imune não implica, necessariamente, imunidade protetora.

Quadro 1 – Fases de desenvolvimento de alguns candidatos a vacina prioritários

Antígeno	Descrição	Fase de desenvolvimento
Sm28-GST	glutathione-S-transferase, presente em esquistossômulos, vermes adultos e ovos	Fase I/II, clínica
IrV-5	Um segmento da miosina, proteína muscular expressa em esquistossômulos, vermes adultos e ovos	Fase 0, pré-clínica
TPI	triose-fosfato-isomerase, presente em todos os estágios do parasito	Fase 0, pré-clínica
Paramiosina	Proteína muscular presente em esquistossômulos e vermes adultos	Fase 0, pré-clínica
Sm14	Proteína ligante de ácidos graxos expressa em esquistossômulos e vermes adultos	Fase 0, pré-clínica
Sm23	Proteína integral de membrana provavelmente envolvida na sinalização celular; presente em esquistossômulos, vermes adultos e ovos	Fase 0, pré-clínica

Sm28 (glutathiona-S-transferase)

O antígeno protetor de 28 kDa de *S. mansoni* (Sm28-GST) pode ser detectado principalmente no parênquima do esquistossômulo e do verme adulto, e também nas estruturas espiculadas do tegumento (Balloul et al., 1987a). Este é o antígeno de *Schistosoma* mais bem caracterizado do ponto de vista bioquímico e imunológico. Soros de ratos vacinados com Sm28-GST foram capazes de transferir proteção a hospedeiros virgens de infecção, indicando a contribuição de um mecanismo humoral. A presença da proteína Sm28-GST também foi demonstrada em extratos de espécies relacionadas, tais como *S. bovis*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, sugerindo que uma vacina efetiva tanto contra a esquistossomose bovina como para a esquistossomose humana poderia ser elaborada. Subseqüentemente, o gene codificando Sm28 foi clonado, seqüenciado e expresso em *Escherichia coli* (Balloul et al., 1987b). Imunizações tanto com o antígeno nativo purificado ou com a proteína recombinante induziram proteção contra infecção por *S. mansoni* em vários animais em experimento (Balloul et al., 1987a), incluindo ratos (50% a 70% de redução da carga parasitária), camundongos (39% a 43%) e hamsters (52%). Além disso, foram induzidos altos níveis de citotoxicidade sérica contra o esquistossômulo. A resposta imune após a administração de Sm28-GST era composta principalmente por anticorpos das classes IgE e IgG, sendo IgE o principal isotipo responsável pela citotoxicidade dependente de eosinófilos. No modelo murino, os anticorpos anti-Sm28 não estavam envolvidos nos mecanismos protetores (Wolowczuk et al., 1989). Em contraste, linhagens celulares do tipo Th específicas para Sm28 podiam transferir de maneira adotiva altos níveis de proteção. Os principais epitopos destes antígenos foram identificados, destacando-se o peptídeo 115-131, que contém sítios de reconhecimento para células T e B (Wolowczuk et al., 1991). A propósito, foi demonstrado que uma construção octamérica do peptídeo 115-131 de Sm28 possuía imunogenicidade protetora em ratos, camundongos e babuínos. O fato de Sm28 não ser uma proteína integral de membrana, mas uma glutathiona-S-transferase (GST) excretada pelo parasito e expressa transitoriamente na superfície do esquistossômulo, aponta para o papel essencial que podem ter os antígenos excretórios e secretórios na indução de imunidade (Capron et al., 1987). Foi demonstrado que a imunização com Sm28 afeta a viabilidade do parasito e sua fecundidade no hospedeiro babuíno e implica a diminuição da eclosão dos ovos de *S. mansoni* eliminados por camundongos (Boulanger et al., 1991). Portanto, a proteção conferida pela imunização com Sm28 parece ser ativa em três níveis:

- ▶ na carga parasitária;
- ▶ na fecundidade do parasito;
- ▶ na capacidade de eclosão dos ovos.

Estes dois últimos aspectos da imunidade podem se relacionar com o reconhecimento das extremidades carboxi-terminais e amino-terminais da molécula, inibindo a atividade enzimática da GST (Xu et al., 1993). Muitos destes efeitos são compartilhados por ShGST, antígeno homólogo encontrado em *S. haematobium*. Um programa de pesquisa bastante abrangente do Instituto Pasteur conduziu à produção de GST com qualidade apropriada para uso pela própria instituição. Em decorrência disso, a GST de *S. haematobium* foi utilizada em ensaios clínicos de Fase I e está sendo avaliada atualmente em ensaios clínicos de Fase II no Senegal (Capron et al., 2001). Até o presente os resultados obtidos não foram publicados. Lebens et al. (2003) construíram uma proteína de fusão contendo epitopos de Sm28-GST (aa

24-43 e 191-212) dominantes para linfócitos B e T, geneticamente ligados à subunidade B da toxina da cólera, visando à administração da vacina através de mucosas em camundongos infectados com *S. mansoni*. O resultado desta abordagem foi promissor, haja vista que a preparação suprimiu a imunopatologia hepática dependente de ovos, além do que diminuiu a carga de vermes adultos e a produção de ovos. Estes efeitos estavam associados com a supressão da resposta imune celular e com a produção específica de anticorpos, incluindo IgG, IgA e IgE.

Sm97 (paramiosina)

A paramiosina (Sm97) foi identificada após experimentos de imunização intradérmica de camundongos com extratos de *Schistosoma* em combinação com o adjuvante bacteriano *Bacille Calmette Guerin* de *Mycobacterium bovis* (BCG), que resultaram em indução de imunidade celular antígeno-específica. Os camundongos que foram imunizados por esta via foram protegidos, enquanto aqueles imunizados por via intravenosa ou intramuscular, que preferencialmente induziam a produção de anticorpos, não se tornaram imunes (James, Pearce & Sher, 1987). Além disso, frações solúveis do verme livres de membranas também induziam proteção quando administradas por via intradérmica, mas muitas vezes não estimulavam níveis significantes de anticorpos contra a superfície do esquistossômulo. Apesar de a ativação macrófago-dependente de células T ser o provável mecanismo efetor da proteção observada, a resposta humoral também foi avaliada, observando-se que os soros dos camundongos vacinados com frações antigênicas complexas de *Schistosoma* reconheciam um único polipeptídeo de 97 kDa (Sm97) (Pearce et al., 1986). Com a caracterização molecular do gene correspondente descobriu-se que a proteína parasitária reconhecida pelos soros dos animais vacinados era a paramiosina, uma proteína miofibrilar presente exclusivamente em invertebrados (Lanar et al., 1986). Esta molécula está presente no músculo e nos corpos discóides do tegumento (Matsumoto et al., 1988), mas não está presente na superfície do parasito (Pearce et al., 1986). A paramiosina purificada ou recombinante administrada por via intradérmica com BCG em camundongos induz níveis de proteção equivalentes àqueles induzidos por extratos não fracionados do parasito (26%-39% de resistência a infecções-desafio). Esta imunidade é caracterizada por uma resposta imune específica para antígenos parasitários, com a participação de células T com produção de IFN- γ e altos níveis de anticorpos (Pearce et al., 1988). Além disso, a paramiosina purificada foi capaz de conferir proteção significativa mesmo quando administrada sem adjuvante (Flanigan et al., 1989). Não se sabe claramente como a paramiosina, que é uma proteína não exposta na superfície, age como alvo da resposta imune dependente de células T, mas foi proposto que os parasitos da infecção-desafio liberariam a paramiosina como um antígeno excretório/secretório, estimulando uma reação inflamatória mediada por células localizadas, que resultaria no encarceramento ou destruição do parasito pelos macrófagos ativados (James, Pearce & Sher, 1987). Além de sua importância imunológica como candidato a vacina, a paramiosina desperta interesse por causa de sua provável função fisiológica para o parasito (Lanar et al., 1986). Como se verá adiante, a paramiosina foi uma das moléculas que recebeu apoio do Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial da Saúde para produção de acordo com boas práticas laboratoriais (*good manufacturing practice* – GMP), mas nada de novo foi publicado sobre este candidato a vacina nos últimos anos, no contexto de uma vacina contra *S. mansoni*. A paramiosina também se mostrou protetora contra infecções por *S. japonicum* (Nara et al., 1997).

Triose-fosfato-isomerase (TPI)

Objetivando a identificação de antígenos candidatos para uma vacina contra a esquistossomose, anticorpos monoclonais foram preparados em camundongos que haviam sido imunizados com preparações antigênicas obtidas mediante tratamento de esquistossômulos transformados mecanicamente (Harn et al., 1992). Um destes anticorpos monoclonais (mAb M1) se ligava transitoriamente à superfície de esquistossômulos recém-transformados e imunoprecipitava um antígeno de 28 kDa de todas as estágios do parasito. Por meio de imunofluorescência indireta foi demonstrado que este antígeno estava presente em todas as células do verme adulto, inclusive no tegumento. Os anticorpos mAb M1 eram capazes de transferir, passivamente, altos níveis de resistência (41%-49%) contra desafios cercarianos, sugerindo que o antígeno de 28 kDa reconhecido pelo mAb M1 fosse um antígeno potencialmente relevante para o desenvolvimento de uma vacina definida. Também foi demonstrado que esta proteína funciona cataliticamente como uma triose-fosfato-isomerase (TPI), uma enzima glicolítica/gliconeogênica cuja atividade é alterada pelo anticorpo monoclonal. Portanto, TPI também pode ser alvo de ataque farmacológico. O anticorpo mAb M1 não se liga a TPI de coelho, cão ou levedura em experimentos de *Western blot*, indicando que pelo menos alguns dos epitopos da enzima não são conservados na enzima homóloga do hospedeiro. O cDNA para TPI foi clonado e expresso em *E. coli* (Shoemaker et al., 1992), e os epitopos específicos para células T e B das regiões não conservadas da TPI foram determinados. Com base nestes estudos, uma estrutura bastante imunogênica foi construída, composta por quatro braços antigênicos de peptídeos sintéticos múltiplos originando-se em um núcleo de ramificação de lisina (Harn et al., 1995a, 1995b; Reynolds, Dahl & Harn, 1994). Estes construídos sintéticos, denominados MAP-4, se mostraram altamente protetores para camundongos C57Bl/6J, reduzindo a carga parasitária para 38%-82%, quando alume era usado como adjuvante e para 52%-75%, quando lipossomos eram usados como o sistema de apresentação antigênico (Reynolds, Dahl & Harn, 1994). O efeito protetor observado podia ser aumentado com adição de IL-12. A triose-fosfato-isomerase também foi uma proteína estimulada para produção em condições apropriadas para uso clínico, embora novos resultados não tenham sido publicados.

Sm23

Os estudos para o desenvolvimento de uma vacina utilizando Sm23 foram empreendidos pelo mesmo grupo que investigou a TPI. Sm23 é uma proteína integral de membrana de *S. mansoni*, identificada como alvo de um anticorpo monoclonal protetor (Harn et al., 1985). É expressa em todos os estágios de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado. Após a clonagem do gene, e identificação dos epitopos relevantes, peptídeos múltiplos antigênicos derivados de Sm23 foram construídos (MAP-3) e se mostraram protetores (Harn et al., 1995a). Sm23 é membro de uma família de proteínas que estão envolvidas nas vias de sinalização celular. Apesar de compartilharem alguns domínios com proteínas humanas, há pouca homologia no nível de seqüência primária. Além disso, foi demonstrado que a vacinação (estímulo e reforço) com Sm23 na forma de vacina de DNA plasmidial conferia proteção parcial a camundongos (36%-44%), produzindo uma resposta imune do tipo Th1. Entretanto, quando a dose de reforço era feita com Sm23 recombinante, não havia redução significativa na quantidade de vermes, e a resposta imune desviava-se para o tipo Th2, sugerindo que esta resposta ao imunógeno Sm23 não era protetora (Da'Dara et al., 2003).

Miosina (antígeno de 200 kDa)

Alguns antígenos da superfície do esquistossômulo são reconhecidos exclusivamente por soros de camundongos vacinados com cercárias atenuadas por irradiação, podendo representar possíveis candidatos para imunoprofilaxia. Anticorpos policlonais foram produzidos contra estes antígenos e usados para isolar um cDNA, denominado rIrV-5, a partir de uma biblioteca de cDNA do verme adulto de *S. mansoni* (Soisson et al., 1992). O cDNA completo para a miosina foi clonado e seqüenciado (Weston et al., 1993), observando-se que a seqüência derivada de aminoácidos apresenta homologia com a cadeia pesada da miosina de seres humanos e muitas outras espécies. Este cDNA foi subclonado em um vetor de expressão, e a proteína recombinante (rIrV-5) foi utilizada para vacinar camundongos na forma de complexos de proteína ou proteossomos compostos pela proteína recombinante e proteínas da membrana externa do meningococo. O nível de proteção variou de 60% a 80% em camundongos (Soisson et al., 1992) e 94% a 97% em ratos (Soisson & Strand, 1993). A vacinação de babuínos produziu um nível de proteção que variou de 0%-54%. A análise dos soros individuais dos babuínos demonstrou uma correlação direta entre os títulos de anticorpos anti-rIrV e resistência contra infecções desafiadoras, sugerindo que o mecanismo de imunoproteção é anticorpo-dependente (Soisson et al., 1993). Análises imunológicas utilizando anticorpos monoclonais e soros de camundongos vacinados com rIrV-5 demonstraram que a proteína nativa possuía 200 kDa, sendo expressa na superfície do esquistossômulo recentemente transformado e no tegumento de vermes adultos (Soisson et al., 1992). Entretanto, a proteína homóloga de *S. japonicum* utilizada em vacinação não é capaz de estimular uma resistência imune significativa. Experimentos recentes tiveram sucesso no que se refere à produção de anticorpos específicos mas não resultaram em proteção (Zhang et al., 2000).

Proteína Ligante de Ácido Graxo (Sm14)

A vacinação protetora de camundongos *outbred* tipo Swiss e coelhos, com um extrato salino solúvel do verme adulto de *S. mansoni*, resulta respectivamente em 50% e 90% de proteção. Um dos componentes protetores foi identificado por clonagem e seqüenciamento e denominado Sm14, uma proteína ligante de ácidos graxos (Moser et al., 1991). Em experimentos de vacinação de camundongos, Sm14 recombinante conferiu imunidade protetora de 67% contra infecções desafiadoras de cercárias, mesmo na ausência de adjuvante. Este mesma preparação antigênica era também capaz de conferir forte proteção a camundongos contra infecções com metacercárias de *Fasciola hepatica*, sugerindo a possibilidade da produção de uma única vacina com eficácia contra estes dois parasitos: *F. hepatica* (de interesse em medicina veterinária) e *S. mansoni* (de interesse em medicina humana) (Tandler et al., 1996). Recentemente, várias formas de apresentação de Sm14 ao sistema imune foram desenvolvidas e testadas experimentalmente. Em um destes estudos, uma fusão de Sm14 com a β -lactamase foi expressa no bacilo de Calmette-Guérin (BCG), predominantemente na parede celular da bactéria. A imunização com esta BCG recombinante resultou em uma resposta imune do tipo Th1 e proteção de 48%, mesmo quando a preparação era administrada em uma única dose (Varaldo et al., 2004). Em um outro estudo, camundongos foram imunizados com Sm14 fusionada com o fragmento C da toxina tetânica, resultando na produção de anticorpos contra Sm14 e redução de 50% na carga parasitária, após o desafio com cercárias de *S. mansoni* (Abreu et al., 2004). Embora os estudos discutidos anteriormente sugiram que tanto as respostas imunes Th1 e Th2 contra

Sm14 sejam importantes para a imunidade protetora, os mecanismos subjacentes não estão ainda bem definidos. Sm14 foi testada como uma vacina veterinária contra *F. hepatica* em um grande número de ovelhas, mas não apresentou resultados satisfatórios de proteção.

Uma série de reuniões, patrocinadas pela United States Agency for International Development, pelo ministério da saúde do governo do Egito e pelo Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial da Saúde, foram realizadas para avaliar os resultados dos experimentos de proteção em camundongos isogênicos e dos estudos de correlação em seres humanos que, apesar de residirem em áreas endêmicas de alta transmissão, apresentavam graus variados de infecção (WHO, 1997). Os estudos em camundongos foram desapontadores (a indução consistente de uma proteção de no mínimo 40% não foi atingida). Os resultados para correlacionar a carga parasitária (excreção de ovos nas fezes) e a resposta imune aos candidatos a vacina em seres humanos mostraram que havia uma correlação inversa entre a produção de IFN- γ em resposta a paramiosina e IrV5 e níveis de infecção (Ribeiro de Jesus et al., 2000). Além disso, havia uma correlação inversa entre os níveis de produção de IL-5 em resposta a MAP-3 (derivado de Sm23) e MAP-4 (derivado de TPI) e carga parasitária. Estes resultados sugeriam que diferentes antígenos induzem tipos diferentes de resposta imune protetora. No caso de paramiosina e IrV5 a imunidade protetora seria dependente de IFN- γ , enquanto no caso de MAP-3 e MAP-4, seria dependente de IL-5. Estes resultados foram subsequentemente complementados e ampliados por um outro grupo, que, além de estudarem a resposta imune de pacientes resistentes e suscetíveis frente a MAP-3, MAP-4, IrV5 e paramiosina, incluíram nos testes Sm28-GST, Sm14 e outros antígenos promissores (Al-Sherbiny et al., 2003). A conclusão principal destes estudos foi que cada candidato a vacina não induzia apenas respostas imunes que se correlacionavam com resistência, pois também havia correlações negativas da resposta imune com o estado de resistência resultante (Quadro 2).

As reuniões antes mencionadas consideraram alguns candidatos a vacina como prioritários e estimularam que os mesmos avançassem para os ensaios em Fase I (WHO, 1997). Embora os resultados experimentais com os antígenos mais promissores não tivessem sido confirmados por dois laboratórios independentes e os resultados das citocinas *in vitro*, após estímulo com antígenos vacinantes, também não fossem conclusivos, foram iniciados os ensaios clínicos em Fase I e ensaios de Fase II – estes últimos especificamente em áreas endêmicas da África – com a GST de *S. haematobium* (Capron et al., 2001; Capron, 1998). Os resultados obtidos nos ensaios clínicos ainda não foram divulgados. Por outro lado, outros antígenos estão sendo produzidos de acordo com boas práticas de laboratório, como já mencionado.

Quadro 2 – Correlações entre o tipo de resposta imune a alguns candidatos a vacina e o estado de resistência à infecção

Antígeno	Correlação positiva com resistência	Correlação negativa com resistência
MAP3 (Sm23)	IgG3	IgG4
MAP4 (TPI)	IgG2	IgG1, IL-5
Paramiosina	IL-2, IL-5	IgG1, IgG4, IGA, IL-10
IrV5 (miosina)	IgE	-
Sm28-GST	IGA	-
Sm14	IgG2, IgE, IGA, IFN- γ	IgG3

Fonte: adaptado de Al-Sherbiny et al. (2003).

POTENCIAIS PROBLEMAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A expectativa de fabricação de uma vacina contra a esquistossomose existe há muitos anos. Porém, não seria prudente se fazer previsões exageradamente otimistas sobre os avanços futuros. Apesar do progresso feito recentemente na identificação e expressão de antígenos, a construção de uma vacina eficiente ainda não é tarefa fácil. A esquistossomose é uma das doenças mais complexas com a qual a imunoprofilaxia está se debatendo (Dunne, Hagan & Abath, 1995). A este respeito, existem pesquisadores que questionam se existem evidências de que seja possível desenvolver uma vacina eficiente contra a esquistossomose, opinando que um pré-requisito para a realização de ensaios clínicos seria um entendimento mais profundo e consistente sobre a imunidade protetora na esquistossomose humana (Katz, 1999a; Gryseels, 2000). Uma vacina contra a esquistossomose enfrentará todos os problemas inerentes à aplicação de qualquer vacina em áreas endêmicas. Em muitos países em que a esquistossomose é endêmica, os programas de distribuição de vacinas não são bons, pois mesmo aquelas vacinas com comprovada atividade não têm sido utilizadas em larga escala.

Várias etapas de testes têm que ser percorridas antes que uma vacina possa ser utilizada amplamente. As diretrizes para o desenvolvimento de vacinas usualmente têm sido descritas na forma de fases que têm que ser rigorosamente seguidas (Quadro 3). O início do processo diz respeito a todos os experimentos pré-clínicos (Fase 0), incluindo os estudos em animais em experimentação, utilizados para a coleta de informações preliminares sobre o potencial vacinal do produto (imunogenicidade, imunidade protetora e toxicidade). Se os resultados forem adequados então se avança para as fases de ensaios clínicos II, III, IV. Questões éticas importantes, associadas à seleção dos grupos-controles apropriados, acompanharão todas as etapas de avaliação. Haja vista que este tipo de ensaio clínico provavelmente se estenderá por muitos anos, não seria aceitável monitorar o progresso da infecção em indivíduos não vacinados e sem qualquer tipo de tratamento. O mesmo se aplicaria aos indivíduos vacinados nos quais a vacinação tiver um efeito limitado. Talvez a única maneira de avaliar os benefícios a longo prazo seja mediante comparação com outras áreas previamente não investigadas, onde uma vacina não tenha sido usada, ou por meio de controles históricos, mas nenhuma destas alternativas levaria em conta as variações nos níveis de transmissão da infecção. Em um ensaio clínico de avaliação de uma vacina contra a esquistossomose, a monitoração dos parasitos é essencial, mas se reveste de dificuldades.

Quadro 3 – Diretrizes para a avaliação de vacinas

Fase avaliativa	Objetivos
Fase 0	Avaliação pré-clínica de candidatos a vacinas no laboratório (toxicidade, imunogenicidade e proteção, incluindo técnicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em animais usados experimentalmente).
Fase I	Vacinação de pequeno número de voluntários não imunes (p.ex., vinte) para avaliar a segurança e níveis de resposta imune.
Fase II	Avaliação da imunogenicidade e dos níveis de proteção em um número maior de indivíduos.
Fase III	Ensaio clínico de campo para avaliar a proteção induzida pela vacina contra a infecção natural em áreas de estudo bem caracterizadas, incluindo áreas onde a imunidade é adquirida naturalmente.
Fase IV	Avaliação de campo em larga escala de vacinas licenciadas: monitoramento da resposta imune, proteção, patologia e transmissão.

Fonte: baseado nas diretrizes para avaliação de vacinas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003).

Usualmente, a quantidade de vermes é estimada indiretamente a partir do número de ovos nas fezes, com óbvias limitações e falta de sensibilidade. Uma alternativa seria a utilização dos métodos diagnósticos baseados na detecção de antígenos circulantes dos vermes adultos, que, no entanto, também não são muito sensíveis (Bergquist et al., 2002).

A vacinação como estratégia para o controle de doenças e como parte de um programa de controle teria muitas vantagens, em comparação com a quimioterapia ou a prevenção da transmissão, pois o tratamento com drogas geralmente é difícil ou dispendioso, tendo que ser repetido várias vezes, além do que não é fácil modificar as condições sanitárias e socioeconômicas (fatores contribuintes para a transmissão das doenças parasitárias), seja por causa do alto investimento necessário inicialmente, seja por falta de vontade ou consciência política. A esperança de se ter uma vacina contra a esquistossomose permanece bastante motivadora para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à doença. Contudo, o fornecimento de água potável e condições sanitárias adequadas com melhora das condições em que as pessoas de áreas endêmicas residem devem permanecer prioritários. Seria um erro presumir que uma única medida de controle fosse eficaz em todas as situações.

O delineamento das características de uma vacina ideal pode servir de referencial para os esforços de desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Seriam as seguintes as características de uma vacina ideal (Katz, 1999b):

- poder ser administrada por via oral e em dose única;
- ter baixo custo;
- conferir imunidade de longa duração;
- poder ser administrada juntamente com outras vacinas no contexto do Programa Nacional de Imunizações;
- estimular imunidade protetora sem conduzir a efeitos imunopatológicos desfavoráveis ou conseqüências imunossupressoras.

No entanto, mesmo a obtenção de uma vacina que se afaste um pouco das características delineadas pode ser útil no contexto de um programa articulado de controle da esquistossomose.

Vários pesquisadores apontam para a necessidade de mais pesquisas sobre vacinas contra a esquistossomose, considerando essencial a consolidação do conhecimento, de forma que se tenha uma idéia clara do que poderia ser esperado de uma vacina contra a esquistossomose e qual a melhor forma de monitorar seus efeitos (Katz, 1999a; Gryseels, 2000; Hagan, Ndhlovu & Dunne, 1998). De fato, o desenvolvimento bem-sucedido de uma vacina eficaz contra a esquistossomose talvez dependa de entendimento mais claro dos componentes protetores da resposta imune deflagrada pela infecção e da identificação dos antígenos responsáveis pela resposta protetora. O que se nota é que o progresso na identificação e produção de antígenos potencialmente protetores encontra-se em descompasso com o conhecimento ainda incompleto e fragmentário dos mecanismos imunes ou indicadores imunológicos de uma resposta imune protetora contra a esquistossomose humana.

Os genes que influenciam a resposta imune variam na espécie humana. Da mesma forma, existe alguma variabilidade genética e antigênica na população parasitária. Possivelmente, as abordagens contemplando múltiplos epitopos ou genes poderão contornar a restrição genética da resposta imune do hospedeiro e a variabilidade antigênica. Contudo, estas abordagens ainda não se mostraram produtivas

(Yang et al., 2001). Presentemente, não há nenhuma vacina contra doenças parasitárias humanas com aceitação geral, apesar de haver evidências para resistência imune adquirida contra reinfecção em quase todas as doenças parasitárias (Abath, Montenegro & Gomes, 1998; Abath, 2000). Contudo, diferentemente da maioria das infecções virais e bacterianas, os parasitos causam infecções crônicas e persistentes, usualmente associadas com lesões imunopatológicas e imunidade parcialmente protetora. Apesar de uma imunidade protetora parcial poder resultar em efeitos benéficos sobre a transmissão e risco de desenvolvimento das formas graves da esquistossomose, devido a questões metodológicas e éticas isto será difícil de demonstrar (Abath, 2000). Talvez a estimulação do sistema imune por mecanismos diferentes daqueles deflagrados pela infecção natural possa resultar em proteção mais completa, e conseqüentemente mais eficaz. Com este objetivo, vários pesquisadores examinaram as possibilidades da imunomanipulação, isoladamente ou em combinação com a quimioterapia e vacinação (Kaye et al., 1995). A capacidade da vacina para conferir imunidade protetora contra as doenças parasitárias pode ser melhorada com a administração de citocinas apropriadas, que podem regular a resposta imune de maneira a favorecer o hospedeiro (Wynn et al., 1995a, 1995b; Sher et al., 1996). Foi mostrado que camundongos deficientes em IL-10 (Hoffmann et al., 1999) ou tratados com IL-12 (Chougnet et al., 1996) eram quase completamente protegidos por uma vacinação com cercárias irradiadas. Por outro lado, o desenvolvimento de vacinas que minimizem a imunopatologia associada à deposição de ovos nos tecidos também é desejável. Neste sentido, IL-12 foi utilizada como adjuvante em combinação com antígenos do ovo do parasito para prevenir a patologia ante uma infecção desafiadora (Wynn et al., 1995b).

Apesar das ponderações feitas por vários pesquisadores no sentido de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro humano, assim como sobre qual seria a melhor caracterização dos atributos biológicos dos antígenos potencialmente vacinais, é certo que algumas questões só poderão ser resolvidas com ensaios clínicos em populações de zona endêmica, tais como os já iniciados para ShGST. Contudo, não basta financiamento para o estabelecimento da eficácia de uma vacina contra a esquistossomose em ensaios populacionais, pois a disponibilidade de recursos financeiros para a produção e distribuição de uma possível vacina pode definir se esta será utilizada primariamente para proteger visitantes provenientes de regiões não endêmicas para esquistossomose ou se será aplicada em larga escala para as populações residentes em zona endêmica. As grandes empresas tecnológicas, talvez por razões relacionadas ao lucro financeiro, não têm demonstrado grande interesse industrial no desenvolvimento de vacinas ou de medicamentos contra as doenças parasitárias humanas, que usualmente são endêmicas e representam problemas de saúde pública apenas nos países em desenvolvimento. Desta forma, é necessário que empresas tecnológicas sejam estimuladas criativamente a se consorciarem com as instituições acadêmicas (universidades e institutos de pesquisa) para, em um esforço conjunto, desenvolverem aquelas vacinas. Tem havido um progresso enorme na compreensão da esquistossomose. Contudo, estamos ainda distantes da produção de uma vacina eficaz para aplicação em larga escala contra a esquistossomose.

REFERÊNCIAS

ABATH, F. G. Development of vaccines against human parasitic diseases: tools, current status and perspectives. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9: 301-310, 2000.

- ABATH, F. G.; MONTENEGRO, S. M. & GOMES, Y. M. Vaccines against human parasitic diseases: an overview. *Acta Tropica*, 71: 237-254, 1998.
- ABREU, P. A. et al. Sm14 of *Schistosoma mansoni* in fusion with tetanus toxin fragment C induces immunoprotection against tetanus and schistosomiasis in mice. *Infection and Immunity*, 72: 5.931-5.937, 2004.
- AL-SHERBINY, M. et al. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta Tropica*, 88: 117-130, 2003.
- ARGIRO, L. L. et al. Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine*, 18: 2.039-2.048, 2000.
- BALLOUL, J. M. et al. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology*, 138: 3.448-3.453, 1987a.
- BALLOUL, J. M. et al. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*, 326: 149-153, 1987b.
- BERGQUIST, R. Prospects of vaccination against schistosomiasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 76, suppl.: 60-71, 1990.
- BERGQUIST, R. et al. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Tropica*, 82: 183-192, 2002.
- BICKLE, Q. D. et al. Resistance against *Schistosoma mansoni* induced by highly irradiated infections: studies on species specificity of immunization and attempts to transfer resistance. *Parasitology*, 90: 301-312, 1985.
- BOULANGER, D. et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, 13: 473-490, 1991.
- BUTTERWORTH, A. E. Vaccines against schistosomiasis: where do we stand? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 1-2, 1992.
- BUTTERWORTH, A. E. & HAGAN, P. Immunity in human schistosomiasis. *Parasitology Today*, 3: 11-16, 1987.
- BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity and morbidity in *Schistosoma mansoni* infection: quantitative aspects. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55: 109-115, 1996.
- CAPRON, A. Schistosomiasis: Forty Years' War on the Worm. *Parasitology Today*, 14: 379-384, 1998.
- CAPRON, A. et al. Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. *International Archives of Allergy and Immunology*, 124: 9-15, 2001.
- CAPRON, A. et al. Immunity to schistosomiasis: progress toward vaccine. *Science*, 238: 1.065-1.072, 1987.
- CHAN, M. S.; WOOLHOUSE, M. E. & BUNDY, D. A. Human schistosomiasis: potential long-term consequences of vaccination programmes. *Vaccine*, 15: 1.545-1.550, 1997.
- CHOUGNET, C. et al. Molecular analysis of decreased interleukin-12 production in persons infected with human immunodeficiency virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 174: 46-53, 1996.
- COOK, R. M. et al. Nucleic acid vaccination with *Schistosoma mansoni* antioxidant enzyme cytosolic superoxide dismutase and the structural protein filamin confers protection against the adult worm stage. *Infection and Immunity*, 72: 6.112-6.124, 2004.
- COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Advances in Parasitology*, 39: 271-336, 1997.

- DA'DARA, A. A. et al. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine*, 20: 359-369, 2001.
- DA'DARA, A. A. et al. A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite Immunology*, 25: 429-437, 2003.
- DEAN, D. A. *Schistosoma* and related genera: acquired resistance in mice. *Experimental Parasitology*, 55: 1-104, 1983.
- DESSEIN, A. J. et al. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. *Journal of Immunology*, 140: 2.726-2.736, 1988.
- DUNNE, D. W.; HAGAN, P. & ABATH, F. G. C. Prospects for immunological control of schistosomiasis. *The Lancet*, 345: 1.488-1.492, 1995.
- DUNNE, D. W. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *European Journal of Immunology*, 22: 1.483-1.494, 1992.
- EL-SHERBEINI, M. et al. Cloning and sequence analysis of the *Schistosoma mansoni* membrane glycoprotein antigen ene GP22. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49: 83-98, 1991.
- FLANIGAN, T. P. et al. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *The Journal of Clinical Investigation*, 83: 1.010-1.014, 1989.
- GRYSEELS, B. Schistosomiasis vaccines: a devils' advocate view. *Parasitology Today*, 16: 46-48, 2000.
- HAGAN, P. Reinfection, exposure and immunity in human schistosomiasis. *Parasitology Today*, 8: 12-16, 1992.
- HAGAN, P. & ABATH, F. G. Recent advances in immunity to human schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, supl. 4: 95-98, 1992.
- HAGAN, P.; NDHLOVU, P. D. & DUNNE, D. W. Schistosome immunology: more questions than answers. *Parasitology Today*, 14: 407-412, 1998.
- HAGAN, P. et al. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, 349: 243-345, 1991.
- HARN, D. A. et al. *Schistosoma mansoni*: detection by monoclonal antibody of a 22,000-dalton surface membrane antigen which may be blocked by host molecules on lung stage parasites. *Journal of Immunology*, 135: 2.115-2.120, 1985.
- HARN, D. A. et al. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *Journal of Immunology*, 148: 562-567, 1992.
- HARN, D. A. et al. Synthetic peptide and naked DNA vaccines for *Schistosoma mansoni*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, 1995, Salvador, Abstracts. *Anais...* Salvador, 1995a.
- HARN, D. A. et al. Synthetic peptide vaccines for schistosomiasis. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6: 891-905, 1995b.
- HILLEMANN, M. R. Six decades of vaccine development – a personal history. *Nature Medicine*, 4: 507-514, 1998.
- HOFFMANN, K. F. et al. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-Type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, 163(2): 927-938, 1999.

- JAMES, S. L.; PEARCE, E. J. & SHER, A. Prospects for a nonliving vaccine against schistosomiasis based on cell-mediated immune resistance mechanisms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, supl. IV: 121-123, 1987.
- KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansonii. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 705-711, 1999a.
- KATZ, N. Schistosomiasis vaccines: the need for more research before clinical trials. *Parasitology Today*, 15: 165-166, 1999b.
- KAYE, P. M. et al. Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 89, supl. 1: 75-81, 1995.
- KNIGHT, M. et al. A cDNA clone encoding part of the major 25000-dalton surface membrane antigen of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 75: 280-286, 1989.
- LANAR, D. E. et al. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science*, 234: 593-596, 1986.
- LEBENS, M. et al. A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection. *Vaccine*, 21: 514-520, 2003.
- MAHMOUD, A. A. F. Parasitic protozoa and heminths: biological and immunological challenges. *Science*, 246: 1.015-1.022, 1989.
- MATSUMOTO, Y. et al. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature*, 333: 76-78, 1988.
- MCKERROW, J. H. & DOENHOFF, M. J. Schistosome proteases. *Parasitology Today*, 4: 334-340, 1988.
- MOHAMED, M. M. et al. Characterization of Sm20.8, a member of a family of schistosome tegumental antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 96: 15-25, 1998.
- MOSER, D. et al. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 8.447-8.454, 1991.
- NARA, T. et al. The B cell epitope of paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine*, 15: 79-84, 1997.
- OMER-ALI, P. et al. Structure of Sm25, an antigenic integral membrane glycoprotein of adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45: 215-222, 1991.
- PEARCE, E. J. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Tropica*, 86: 309-313, 2003.
- PEARCE, E. J. et al. Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. *Journal of Immunology*, 137: 3.593-3.600, 1986.
- PEARCE, E. J. et al. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85: 5.678-5.682, 1988.
- PETZKE, M. M. et al. *Schistosoma mansoni* gene GP22 encodes the tegumental antigen Sm: (1) antibodies to a predicted B-cell epitope of Sm25 cross-react with other candidate vaccine worm antigens; (2) characterization of a recombinant product containing tandem-repeats of this peptide as a vaccine. *Parasite Immunology*, 22: 381-395, 2000.

- REYNOLDS, S. R.; DAHL, C. E. & HARN, D. A. T and B epitope determination and analysis multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* triose-phosphate isomerase. *Journal of Immunology*, 152: 193-200, 1994.
- RIBEIRO DE JESUS, A. et al. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infection and Immunity*, 68: 2.797-2.803, 2000.
- RICHTER, D.; INCANI, R. N. & HARN, D. A. Lacto-N-fucopentaose III (Lewis x), a target of the antibody response in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, 64: 1.826-1.831, 1996.
- RICHTER, D.; REYNOLDS, S. R. & HARN, D. A. Candidate vaccine antigen that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, 151: 255-265, 1993.
- RIHET, P. et al. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *European Journal of Immunology*, 21(11): 2.679-2.686, 1991.
- SHER, A. et al. Schistosome vaccines: current progress and future prospects. *Parasitology*, 98: S61-S68, 1989.
- SHER, A. et al. An IL-12 based vaccine approach for preventing immunopathology in schistosomiasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 795: 202-207, 1996.
- SHOEMAKER, C. B. et al. cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 189: 1.842-1.846, 1992.
- SMITHERS, S. R. & DOENHOFF, M. J. Schistosomiasis. In: COHEN, S. & WARREN, K. S. (Eds.) *Immunology of Parasitic Infections*. Oxford: Blackwell Scientific, 1982.
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. Resistance to experimental infection with *Schistosoma mansoni* in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 61: 517-533, 1967.
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. Immunity in schistosomiasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 160: 826-840, 1969.
- SOISSON, L. M. A. & STRAND, M. *Schistosoma mansoni*: induction of protective immunity in rats using a recombinant fragment of a parasite surface antigen. *Experimental Parasitology*, 77: 492-494, 1993.
- SOISSON, L. M. A. et al. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *Journal of Immunology*, 149: 3.612-3.620, 1992.
- SOISSON, L. M. A. et al. Protective immunity in baboons vaccinated with a recombinant antigen or radiation-attenuated antibody-dependent. *Journal of Immunology*, 151: 4.782-4.789, 1993.
- TAYLOR, M. G. & BICKLE, Q. D. Towards a schistosomiasis vaccine: irradiated schistosome vaccines. *Parasitology Today*, 2: 132-136, 1986.
- TENDLER, M. et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 269-273, 1996.

- VARALDO, P. B. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infection and Immunity*, 72: 3.336-3.343, 2004.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics*, 35: 148-157, 2003.
- WAINE, G. J. et al. A dominant B-cell epitope on the 22kDa tegumental membrane associated antigen of *Schistosoma japonicum* maps to an EF-hand calcium binding domain. *Parasite Immunology*, 19: 337-345, 1997.
- WEBSTER, M. et al. Human IgE responses to rSm22.6 are associated with infection intensity rather than age per se, in a recently established focus of Schistosomiasis mansoni. *Tropical Medicine & International Health*, 3: 318-326, 1998.
- WESTON, D. et al. Cloning and sequencing of a complete myosin heavy chain cDNA from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58: 161-164, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Special programme for research and training in tropical diseases (TDR). *TDR News*, 54, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations*. Geneva: WHO, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Health Organization special programme for research and training in tropical disease, 2004a. Disponível em: <www.who.int/tdr>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report 2004: changing history, 2004b. Disponível em: <http://www.who.int/whr/en>.
- WILKINS, H. A. et al. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 29-35, 1987.
- WILSON, R. A.; COULSON, P. S. & MCHUGH, S. M. A significant part of the 'concomitant immunity' of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Parasite Immunology*, 5: 595-601, 1983.
- WOLOWCZUK, I. et al. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *Journal of Immunology*, 142: 1.342-1.350, 1989.
- WOLOWCZUK, I. et al. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat. 1. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *Journal of Immunology*, 146: 1.987-1.995, 1991.
- WYNN, T. A. & HOFFMANN, K. F. Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th 1 versus Th 2? *Parasitology Today*, 16(11): 497-501, 2000.
- WYNN, T. A. et al. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*, 376: 594-596, 1995a.
- WYNN, T. A. et al. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. *Journal of Immunology*, 154: 4.701-4.709, 1995b.

- XU, C. B. et al. *Schistosoma mansoni* 28-kda glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. *Journal of Immunology*, 150: 940-949, 1993.
- YANG, W. et al. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine*, 19: 103-113, 2001.
- YOLE, D. S. et al. Protective immunity to *Schistosoma mansoni* induced in the olive baboon *Papio anubis* by the irradiated cercaria vaccine. *Parasitology*, 112: 37-46, 1996.
- ZHANG, Y. et al. Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against *Schistosoma japonicum* infection. *Vaccine*, 20: 724-730, 2001.
- ZHANG, Y. Y. et al. Immunogenicity of plasmid DNA encoding the 62 kDa fragment of *Schistosoma japonicum* myosin. *Vaccine*, 18: 2.102-2.109, 2000.