

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PPGGEv

BRUNA DIAS DE LIMA FRAGELLI

**Efeito das enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni*
Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e
Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) no tratamento da
esquistossomose experimental**

São Carlos – SP
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PPGGEv

BRUNA DIAS DE LIMA FRAGELLI

**Efeito das enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni*
Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPR) e
Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) no tratamento da
esquistossomose experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal
Co-orientador: Dr. Humberto D’Muniz Pereira

São Carlos – SP
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bruna Dias de Lima Fragelli, realizada em 26/02/2018:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Ricardo de Marco
USP

Profa. Dra. Mariluce Gonçalves Fonseca
UFPI

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de
meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.*

Aos meus pais, Valéria e Edinho, pelo amor e apoio incondicional e ao meu irmão

Hélio Raphael.

À minha querida vó Cida. Saudades!

À minha família e amigos, pela confiança e compreensão.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Nossa Senhora Aparecida por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou. Foi a minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida.

Aos meus pais, Valéria e Edinho, que me apoiam desde os 11 anos no meu sonho de ser bióloga. Que me ajudaram emocionalmente, financeiramente. Sempre mostrando orgulho e muito amor. Sou o que sou e estou aqui por causa de vocês. Serei eternamente grata!

Ao meu irmão, Hélio Raphael, pelo carinho, amizade e companheirismo. À minha falecida e eternamente amada, Vó Cida, que me ajudou de tantas formas nessa jornada e que me ensinou o que é bondade e coragem. Saudades eternas!

A minha querida orientadora, Prof^ª. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, por acreditar em mim e me dar um projeto lindo no qual me orgulho muito. Obrigada pela confiança e pela paciência ao longo desses anos. Mais do que uma orientadora é uma grande amiga. Muito obrigada!

Ao meu Co-orientador, Dr. Humberto D’Muniz Pereira, que contribuiu de maneira fundamental para a realização desse trabalho, não só pelo estudo com as enzimas, mas pela enorme agregação de conhecimentos. Obrigada!

À equipe do LIDI, que ao longo desses anos se tornaram mais do que colegas de bancada, se tornaram amigos e irmãos, que me ajudaram nos experimentos, nos estudos e principalmente, nos momentos de medo e de dúvida. Não teria feito nada sem vocês. Muito obrigada!

Aos meus amigos de graduação, Renan, Vinícius e Paula, que são além de amigos, são meus companheiros, que enfrentaram comigo todos os obstáculos e os momentos de felicidade. Obrigada!

À toda equipe do Departamento de Morfologia e Patologia, pela convivência feliz e pela contribuição nos trabalhos. Obrigada!

Às equipes do Laboratório de Cristalografia, do IFSC-USP, pelo auxílio e contribuição nesse trabalho e às alunas Larissa e Juliana que sempre se mostraram receptivas e contribuíram com este trabalho. Obrigada!

À equipe da prefeitura do *campus* da USP- Ribeirão Preto, que forneceu, via o seu Biotério Geral, os animais usados nesse trabalho. Obrigada!

À equipe do Prof^o Dr. Vanderlei Rodrigues, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP – USP, em especial a técnica Olinda Mara Brigoto e à aluna de Doutorado Andressa Barban do Patrocínio. Muito obrigada!

À equipe do Laboratório de Citopatologia, da FMRP-USP, pela contribuição nas análises histológicas, principalmente à Ana Maria da Rocha, pela confecção das lâminas e ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares, pela análise histopatológica.

À equipe do Prof^o. Dr. Anderson Ferreira da Cunha do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, do Departamento de Genética da UFSCar, por contribuir na extração de proteínas totais de *S. mansoni*. Em especial à aluna Karina Kirschner Lopes Teixeira.

À equipe da Prof^a. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em especial à aluna Patty Karina dos Santos, pela ajuda ao disponibilizar equipamentos.

À equipe da Prof^a. Dra. Maria da Graça Melão do Laboratório de Plâncton do Departamento de Hidrobiologia da UFSCar, em especial ao aluno Renan Castelhana Gebara pela disponibilização de equipamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular por toda a formação acadêmica e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos. ”
“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você lembrar de acender a luz. “

Alvo Dumbledore/ J. K. Rowling

RESUMO

A esquistossomose é uma doença que atinge um elevado número de pessoas em 78 países. O número de casos aumentou nos últimos anos e não há vacina e novos fármacos, aspecto preocupante, uma vez que há perda de sensibilidade ao medicamento utilizado, o Praziquantel. O presente estudo buscou avaliar os efeitos das enzimas recombinantes de *S. mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) e o MIX das duas enzimas no tratamento da esquistossomose no modelo murino. Camundongos fêmeas da linhagem Balb/c foram infectadas com cercárias e tratadas via intraperitoneal com 3 doses de 100 µg das proteínas em intervalos de 10 dias a partir do 28º dia de infecção. Foram contados números de ovos nas fezes no 48ª e 54º dia após a infecção pelo método Kato-Katz. No 55º dia após a infecção foram recuperados vermes adultos do sistema porta-hepático e mesentérico intestinal, contagem global e diferencial de células do LCP e do sangue. Também foram quantificadas as citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 no plasma, assim como a produção de anticorpos das classes IgG2a e IgE. Para a análise dos granulomas e deposição de colágeno foram confeccionadas lâminas histológicas do fígado. Nossos resultados demonstram que o tratamento com a enzima HGPRT parece estimular a produção das citocinas IL-4 e IL-10 e promoveu redução significativa de granulomas no fígado dos animais infectados e tratados. O tratamento com a enzima PNP foi capaz de reduzir o número de vermes no fígado e nos vasos mesentéricos do intestino. Já o tratamento com a enzima PNP e o MIX foram capazes de reduzir o número de ovos nas fezes e modular negativamente o número de eosinófilos no LCP e no sangue. Portanto, o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* HGPRT e PNP parece contribuir para o controle e redução dos aspectos fisiopatológicos da esquistossomose, contribuindo com a diminuição da morbidade associada a esquistossomose no modelo murino.

Palavras-chave: Imunoterapia. Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT). Purina Nucleosil Fosforilase (PNP). *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease that affects a large number of people in 78 countries. The number of cases has increased in recent years and there is no vaccine and new drugs, a worrying aspect, since there is loss of sensitivity to the drug used, Praziquantel. The present study aimed to evaluate the effects of the recombinant enzymes of *S. mansoni* Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HGPRT) and Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) and the MIX of the two enzymes in the treatment of schistosomiasis in the murine model. Female mice of the Balb / c strain were infected with cercariae and treated intraperitoneally with 3 doses of 100 µg of the proteins at 10 day intervals from the 28th day of infection. Egg numbers were counted in the feces on the 48th and 54th days after infection by the Kato-Katz method. On the 55th day after infection, adult worms were retaken from the hepatic and mesenteric intestinal system, global and differential counts of LCP and blood cells. Cytokines IFN- γ , IL-4 and IL-10 in plasma were also quantified, as well as the production of antibodies of the IgG2a and IgE classes. For the analysis of the granulomas and deposition of collagen histological laminae of the liver were made. Our results demonstrate that treatment with the HGPRT enzyme appears to stimulate the production of IL-4 and IL-10 cytokines and promoted significant reduction of liver granulomas in infected and treated animals. Treatment with the PNP enzyme was able to reduce the number of worms in the liver and in the mesenteric vessels of the intestine. The PNP and MIX enzyme treatment were able to reduce the number of eggs in the faeces and negatively modulate the number of eosinophils in the PCL and in the blood. Therefore, treatment with the recombinant enzymes of *S. mansoni* HGPRT and PNP seems to contribute to the control and reduction of pathophysiological aspects of schistosomiasis, contributing to the reduction of morbidity associated with schistosomiasis in the murine model.

Keywords: Immunotherapy. Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HGPRT). Purine Nucleosil Phosphorylase (PNP). *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição da Esquistossomose Mundial.	17
Figura 3. Fêmea de <i>Schistosoma mansoni</i> emergindo do canal ginecóforo do macho. .	20
Figura 4. Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>	21
Figura 5. Morfologia da concha de <i>Biomphalaria glabrata</i>	22
Figura 6. Distribuição do <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil.	23
Figura 7. Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	25
Figura 8. Granuloma hepático. A seta preta indica o granuloma ao redor do ovo no fígado.	27
Figura 9. O granuloma na Esquistossomose mansônica.	28
Figura 10. Intensidade da resposta imune nas fases da esquistossomose.	30
Figura 11. Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em <i>S. mansoni</i>	35
Figura 12. Estrutura cristalográfica da HGPRT isoformas 1 de <i>S. mansoni</i>	37
Figura 13. Alinhamento das três isoformas da HGPRT de <i>S. mansoni</i> com a HGPRT humana	38
Figura 14. Alinhamento das sequências de PNPs de humanos, de <i>S. mansoni</i> e <i>M. musculus</i>	40
Figura 15. Protocolo de Tratamento.	48
Figura 16. Ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes.	49
Figura 17. Método Kato-Katz.	50
Figura 18. Leucócitos no LCP e no sangue.	52
Figura 19. Eosinófilos no LCP e no sangue.	52
Figura 20. Gel de proteínas totais de <i>S. mansoni</i>	54
Figura 21. Número de ovos por grama de fezes no 48º dia após a infecção.	58
Figura 22. Número de ovos por grama de fezes no 54º dia após a infecção.	60
Figura 23. Número de vermes adultos recuperados na veia porta do fígado e no mesentério intestinal.	62
Figura 24. Número de vermes adultos acasalados e separados em fêmeas e machos recuperados nos grupos Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX.	63
Figura 25. Número de leucócitos totais no LCP.	65
Figura 26. Número de leucócitos totais no sangue.	66
Figura 27. Número de eosinófilos no LCP.	67
Figura 28. Número de eosinófilos no sangue.	68
Figura 29. Número de neutrófilos no LCP.	69
Figura 30. Número de neutrófilos no sangue.	70
Figura 31. Número de mononucleados no LCP.	71

Figura 32. Número de mononucleados no sangue.....	72
Figura 33. Dosagem da citocina IFN- γ no plasma.	73
Figura 34. Dosagem da citocina IL-4 no plasma.....	74
Figura 35. Dosagem da citocina IL-10 no plasma.....	75
Figura 36. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT.	76
Figura 37. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização pela enzima recombinante PNP.	77
Figura 38. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes.....	78
Figura 39. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização com PTS.	79
Figura 40. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT.	80
Figura 41. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante PNP.....	81
Figura 42. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes.....	82
Figura 43. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização com PTS.	83
Figura 44. Fotomicrografias de cortes de fígado no 55º dia após a infecção - HE.	84
Figura 45. Fotomicrografias de cortes de fígado no 55º dia após a infecção mostrando áreas de necrose - HE.	85
Figura 46. Fotomicrografias de cortes de fígado no 55 após a infecção – Tricrômico de Gomori.....	86
Figura 47. Número de granulomas no fígado no 55º dia após a infecção.	87
Figura 48. Número de ovos no fígado no 55º dia após a infecção.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Schistosoma</i> causadoras de esquistossomose.	19
Tabela 2. Estágio de vida ao qual pertence cada homólogo da HGPRT e identidade sequencial entre eles.	36
Tabela 3: Grupos experimentais.	48
Tabela 4. Número de ovos por grama de fezes dos animais e porcentagem de redução de ovos no 48º dia após a infecção.	59
Tabela 5. Número de ovos por grama de fezes dos animais e porcentagem de redução de ovos no 48º dia após a infecção.	61
Tabela 6. Número de granulomas no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de granulomas no 55º dia após a infecção.	88
Tabela 7. Número de ovos no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de granulomas no 55º dia após a infecção.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK – Adenosina Quinase

AMP – Adenosina Monofosfato

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina de Soro Bovino)

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBME – Centro de Biologia Molecular Estrutural

cDNA – *complementary Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico complementar)

CDP – Difosfato de Citosina

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DGE – Departamento de Genética e Evolução

DMP – Departamento de Morfologia e Patologia

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DO – Densidade Óptica

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

EPM – Erro Padrão da Média

ESP – Excreção e Secreção de Produtos

FAD – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GDP – Guanosina Difosfato

GMP – Guanosina Monofosfato

GTP – Guanosina Trifosfato

HE – Hematoxilina-Eosina

HGPRT – Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase

HXGPRT – Hipoxantina-Xantina-Guanina Fosforibosiltransferase

IFN – Interferon

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IMP – Inosina Monofosfato

IPTG – Isopropiltiogalactosídeo (Indutor de transcrição genética)

LCP – Lavado da Cavidade Peritoneal

NAD – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NK – Células *Natural Killer* (exterminadoras)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAGE – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Gel de Poliacrilamida)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

PRPP – Fosforribosil-pirofosfato

PTS – Proteínas Totais de *Schistosoma mansoni*

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNAi – *Ribonucleic Acid interference* (Ácido Ribonucleico de interferência)

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate* (Dodecil-Sulfato de Sódio)

SEA – *Soluble Egg Antigens* (Antígenos Solúveis dos Ovos)

SPF – *Specified Pathogen Free* (Livre de Patógenos Específicos)

Th – Células T *helper* (auxiliares)

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

Tris – Trisaminometano

UDP – Difosfato de Uridina

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 A esquistossomose.....	17
1.2 <i>Schistosoma mansoni</i>	20
1.3 Molusco do gênero <i>Biomphalaria</i> – Hospedeiro Intermediário - Vetor Biológico	22
1.4 Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	23
1.5 Patogenia da esquistossomose.....	25
1.6 Mecanismos Imunológicos na esquistossomose.....	29
1.7 Fármacos comerciais	31
1.8 Medidas alternativas para o controle do <i>S. mansoni</i>	32
1.9 Metabolismo de purinas.....	34
1.10 Enzimas da Via de salvação de purinas de <i>S. mansoni</i>	35
1.10.1 Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPRT).....	36
1.10.2 Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP).....	39
1.11 Imunoterapia.....	40
1.12 Tratamento com enzimas recombinantes	41
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral:	43
2.2 Objetivos específicos:.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Obtenção das enzimas recombinante Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) de <i>Schistosoma mansoni</i>	44
3.1.1 Expressão heteróloga da enzima recombinante HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	44
3.1.2 Expressão heteróloga da enzima recombinante PNP de <i>Schistosoma mansoni</i>	45
3.1.3 Purificação da enzima recombinante HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	45
3.1.4 Purificação da enzima recombinante PNP de <i>Schistosoma mansoni</i>	46
3.2 Animais.....	47
3.3 Obtenção das larvas infectantes do <i>Schistosoma mansoni</i>	47
3.4 Infecções dos animais com as larvas infectantes (cercárias) do <i>Schistosoma mansoni</i>	47
3.5 Tratamento dos animais.....	47
3.5.1 Adjuvante Hidróxido de alumínio	48
3.6 Contagem de ovos nas fezes.....	49

3.7 Avaliação celular	50
3.7.1 Coleta de sangue para a contagem de leucócitos.....	50
3.7.2 Coleta de células do LCP para contagem de leucócitos	51
3.7.3 Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue e do LCP.....	51
3.8 Avaliação da Carga Parasitária: Recuperação de vermes adultos	53
3.9 Ensaio Imunoenzimático – ELISA	53
3.9.1 Obtenção do plasma dos animais.....	53
3.9.2 Detecção de anticorpos – ELISA indireto	53
3.9.3 Dosagem de citocinas – ELISA direto	55
3.10 Avaliação histológica do fígado	56
3.11 Análise estatística	57
4. RESULTADOS	58
4.1 Contagem de ovos nas fezes.....	58
4.2 Avaliação da carga parasitária: recuperação de vermes adultos.....	61
4.3. Avaliação da resposta leucocitária	64
4.3.1 Avaliação de leucócitos totais no LCP e sangue	64
4.3.2 Avaliação de eosinófilos no LCP e no sangue	66
4.3.3 Avaliação de neutrófilos no LCP e no sangue.....	68
4.3.4 Avaliação de leucócitos mononucleados no LCP e no sangue.....	70
4.4 Avaliação da dosagem de citocinas	72
4.4.1 Determinação dos níveis de IFN- γ	72
4.4.2 Determinação dos níveis de IL-4.....	73
4.4.3 Determinação dos níveis de IL-10.....	74
4.5 Avaliação de anticorpos.....	75
4.5.1 Avaliação de anticorpos IgG2a.....	75
4.5.2 Avaliação dos anticorpos IgE	79
4.6 Avaliação histológica do fígado	83
5. DISCUSSÃO	90
7. REFERÊNCIAS	99
ANEXO	109

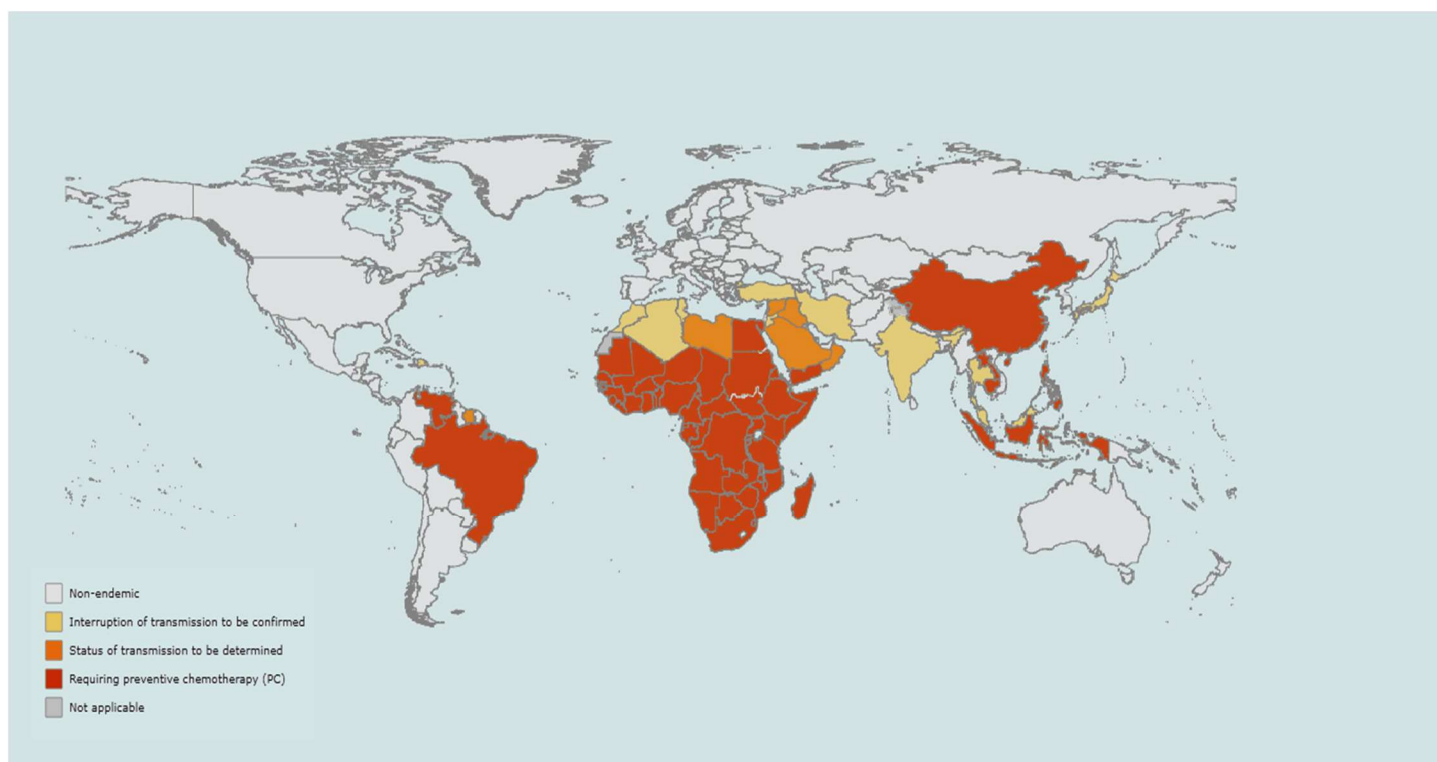
1. INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes achatados e intravasculares do gênero *Schistosoma*. Estimativas mostram que pelo menos 206,5 milhões de pessoas necessitaram de tratamento no ano de 2016. É uma doença com prevalência em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres sem acesso à água potável e com saneamento básico inadequado (WHO, 2017).

A Organização Mundial da Saúde afere que a esquistossomose acomete 240 milhões de pessoas, sendo que 779 milhões vivem em áreas de risco em 78 países, como pode ser observado na Figura 1 (WHO, 2014).

Figura 1. Distribuição da Esquistossomose Mundial.

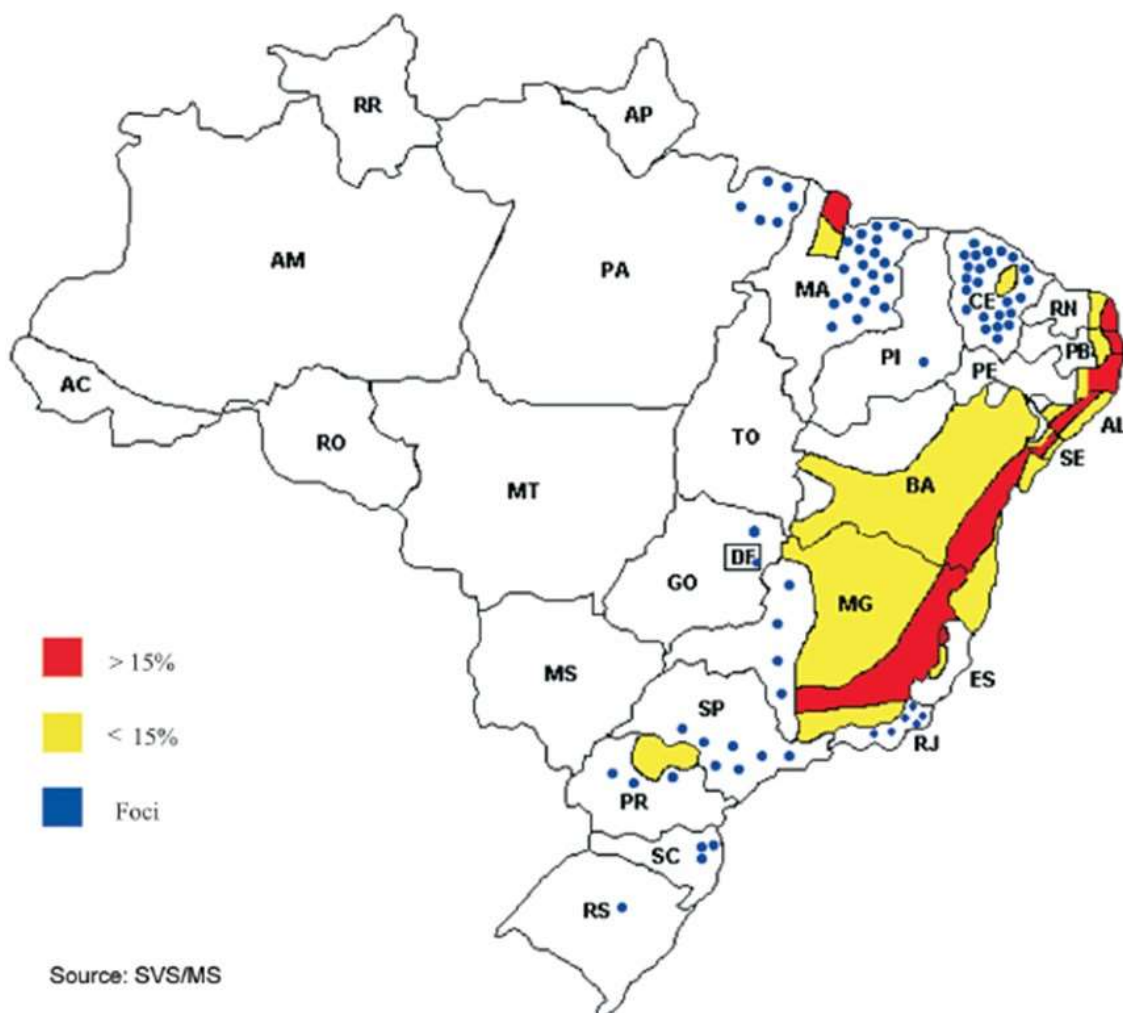


Fonte: Adaptado de Schistosomiasis: Status of Schistosomiasis endemic countries, 2016. Disponível em: < http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html >

No Brasil a esquistossomose atinge por volta de 7 milhões de indivíduos, sendo que 25 milhões de pessoas vivem em área de risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Está presente em 19 estados (Figura 2), sendo que as regiões Nordeste e Vale do

Jequitinhonha são as mais afetadas. É conhecida pelos brasileiros como barrida d'água, xistose, doença do caramujo e bilhardíase (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Figura 2. Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil.



Fonte: Adaptado de: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose – Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008.

A esquistossomose é foco recorrente nos debates sobre saúde no mundo, pois apresenta abrangência continental. É uma doença negligenciada, ou seja, causada por agente parasita e endêmica em populações de baixa renda, apresentando indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle (FIOCRUZ, 2017). Ocupa no *ranking* das doenças tropicais o segundo lugar em mortalidade, sendo que em primeiro lugar está a malária. É considerada uma doença insidiosa e incapacitante em idades precoces (DINIZ, 2009; WHO, 2014).

Há 2 formas principais de esquistossomose - a intestinal e a urogenital – causada por 5 espécies de parasitas, apresentadas na tabela 1 (WHO, 2017).

Tabela 1. Espécies de *Schistosoma* causadoras de esquistossomose.

Espécies		Distribuição geográfica
Formas intestinais	<i>Schistosoma mansoni</i>	África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname
	<i>Schistosoma japonicum</i>	China, Indonésia e Filipinas
	<i>Schistosoma mekongi</i>	Vários distritos do Camboja e da República Democrática Popular do Lao
	<i>Schistosoma guineenses</i> e relatos de <i>S. intercalatum</i>	Áreas da floresta tropical da África Central
Forma urogenital	<i>Schistosoma haematobium</i>	África, Médio Oriente, Córsega (França)

Fonte: Adaptada do site: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>.

O controle da esquistossomose é baseado no tratamento em larga escala de grupos de população em risco, acesso a água potável, saneamento básico adequado, educação em higiene e controle do hospedeiro intermediário (WHO, 2017).

Ovos de *Schistosoma* foram encontrados em órgãos de múmias do Egito datadas de 1250 a.C. (RUFFER, 1910) mostrando que a esquistossomose atinge a população humana há muito tempo. Considera-se que a parasitose apareceu no Brasil com os escravos oriundos da costa ocidental da África. E, uma vez que, localizou seu hospedeiro intermediário, o parasito aqui se instalou e permaneceu (DESPRÉS; IMBERT-ESTABLET; MONNEROT, 1993).

Nas Américas e no Brasil somente o *S. mansoni* permaneceu, pois encontrou os hospedeiros intermediários e ambientes favoráveis para sua instalação como: propriedades físico-químicas da água, leito de rios e lagos ricos em lodo ou em rochas, vegetação com raízes fixas ou flutuantes próximas às margens (PARAENSE, 1972).

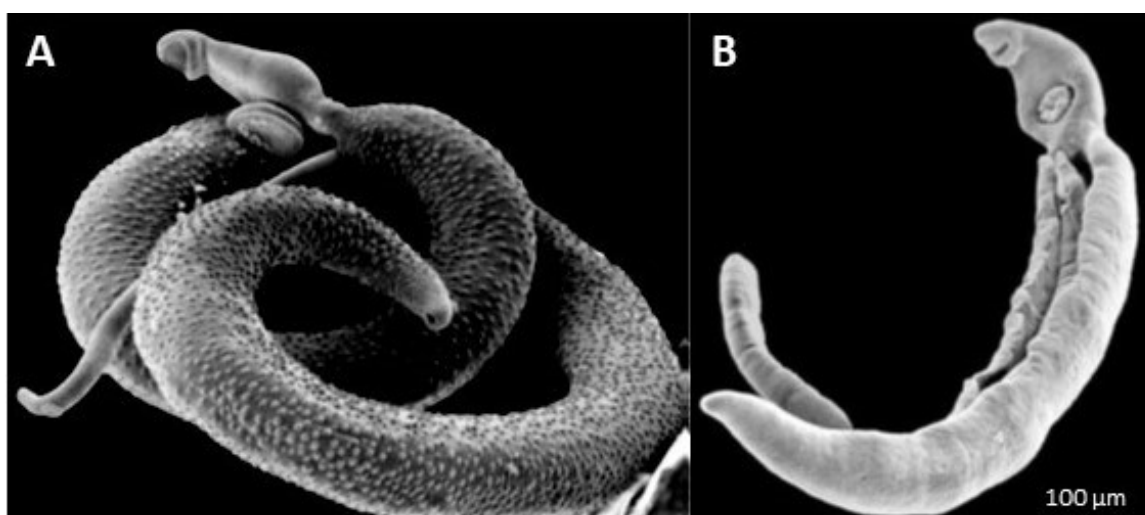
A espécie *Schistosoma mansoni*, única presente no Brasil, foi descrita, em 1907, pelo médico inglês Louis Sambon, que lhe deu esse nome homenageando o médico escocês Patrick Manson, conceituado pesquisador na parasitologia e fundador da medicina tropical. O *S. mansoni* foi identificado no Brasil pela primeira vez em 1908 e

descrito através de análises minuciosas pelo médico Pirajá da Silva (KATZ; ALMEIDA, 2003; COURA; AMARAL, 2004).

1.2 *Schistosoma mansoni*

O verme achatado *S. mansoni* é um platelminto (Filo Platyhelminthe) da classe Trematoda e da subclasse Digenea, pertencendo à família Schistosomatidae. Os indivíduos deste gênero diferem-se dos outros membros da subclasse Digenea por apresentarem sexos separados, com dimorfismo sexual bem salientado e pelos machos apresentarem menos de 10 massas testiculares. Os vermes adultos habitam o interior dos vasos sanguíneos de mamíferos. Os esquistossomos são delgados e longos, como pode ser verificado na Figura 3, o que os distingue dos demais trematódeos (REY, 2008).

Figura 3. Fêmea de *Schistosoma mansoni* emergindo do canal ginecóforo do macho.



Microscopia eletrônica de varredura de *Schistosoma mansoni* em vista lateral (A) e em vista frontal (B) mostrando a fêmea emergindo do canal ginecóforo. Fonte: Adaptado de: Parasite of day. Disponível em: <http://4.bp.blogspot.com/Schistosoma_mansoni2.jpg> e Science Blogs <http://scienceblogs.com.br/rainha/files/schistosoma_mansoni1.jpg>.

Indivíduos adultos se alimentam de sangue venoso. A absorção de nutrientes se dá via tegumento, no qual há diversos sistemas de transporte (REY, 2008). Os excretas são eliminados por regurgitação, pois não há abertura anal ao final do tubo digestivo, (LAWRENCE,1973).

O macho de *S. mansoni* pode atingir 1 cm de comprimento e coloração esbranquiçada. Uma ventosa oral está presente na porção anterior do corpo, o que faz com que o verme se fixe. Próxima a esta ventosa há o acetábulo, outra ventosa. O canal

ginecóforo localiza-se no segmento posterior e é onde a fêmea se aloja. A fêmea mede de 1,2 a 1,6 cm de comprimento com corpo mais fino e escuro. Suas ventosas são pequenas (REY, 2008).

Os ovos de *S. mansoni* (Figura 4) medem entre 110 a 180 μm de comprimento por 45 a 70 μm de largura. A porção anterior tem aspecto mais afinado e a posterior mais volumosa. A espícula lateral é saliente e aguda e é a principal característica para a identificação do ovo dessa espécie. As fêmeas liberam somente um ovo de cada vez e estima-se que cerca de 300 ovos são liberados por dia (REY, 2008). Através de análise de microscopia eletrônica, o ovo apresenta uma casca proteica com uma densa camada de microespinhos na porção externa e, mais internamente, ocorre conteúdo elevado de células vitelínicas com citoplasma rico em mitocôndrias, vesículas diversas, gotículas de gordura e uma membrana que envolve o miracídio (SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

Figura 4. Ovo de *Schistosoma mansoni*.

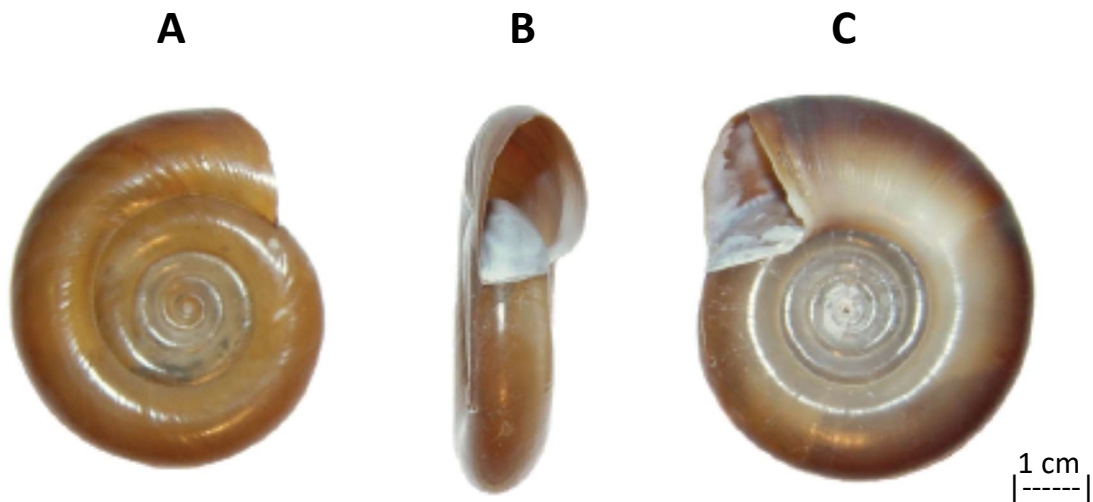


Fonte: Biblioteca Virtual em Saúde Adolpho Lutz. Adaptado de:
<http://www.bvsalutz.coc.fiocruz.br/html/pt/trajetoria/mudanca/imagens/s_mansoni.egg> .

1.3 Molusco do gênero *Biomphalaria* – Hospedeiro Intermediário - Vetor Biológico.

O gênero *Schistosoma* tem como hospedeiros intermediários os moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil existem três espécies. Por ordem de importância são: *Biomphalaria glabrata* (Figura 5), *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O gênero *Biomphalaria* pertence à Família Planorbidae, que engloba, além deste gênero outros gêneros. Apresenta concha geralmente planispiral, com diâmetro variando em indivíduos adultos de 7 mm a 40 mm (NASCIMENTO, 2011).

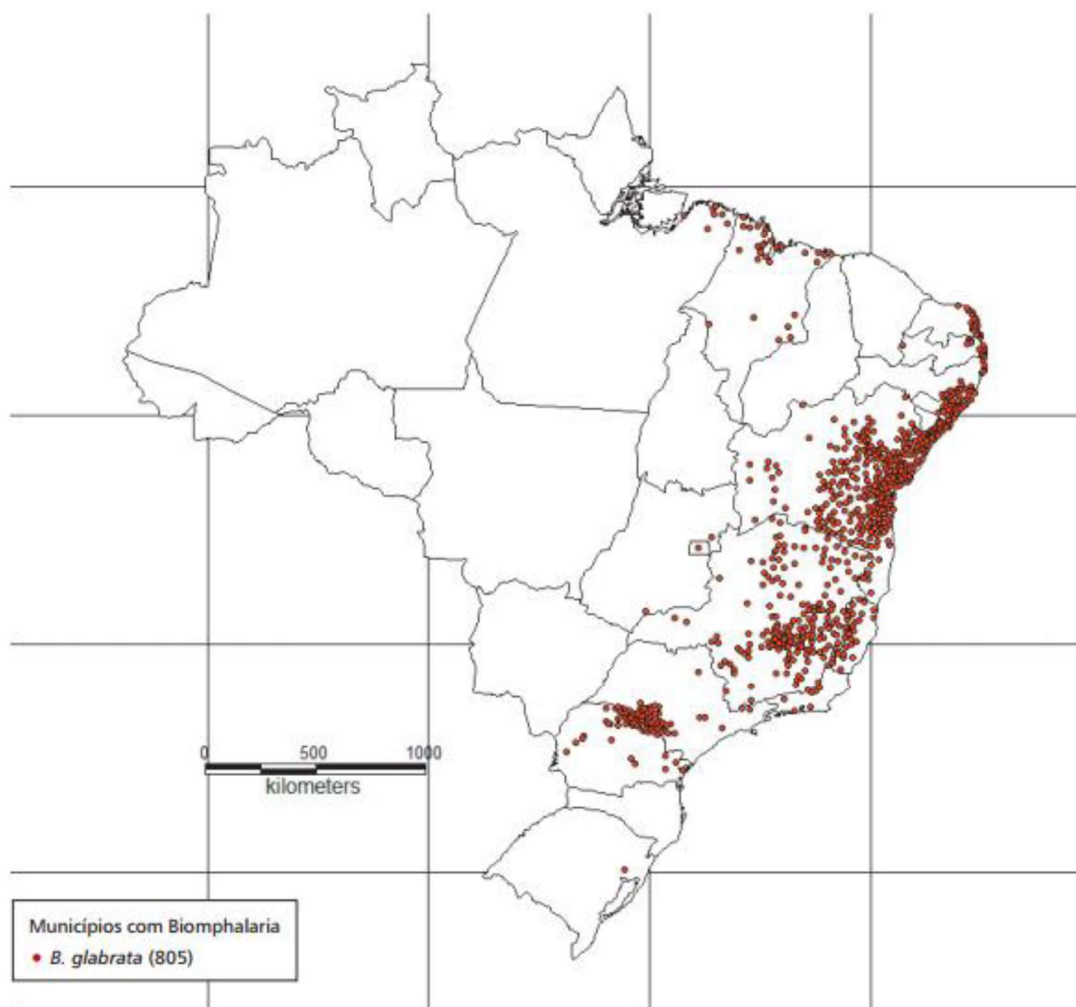
Figura 5. Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata*.



Caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* em vista lateral (A e C) e frontal (B). Fonte: Adaptado de: *Vigilância da Esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas*. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

O *B. glabrata* é o hospedeiro predominante de *S. mansoni* no Brasil, já que apresenta grande grau de suscetibilidade de suas populações ao parasito, além de se distribuírem geograficamente por todo o litoral do Nordeste e regiões do Centro e do Sul, como pode ser visto na Figura 6 (NEVES, 2010). Os indivíduos são hermafroditas simultâneos. A fecundação é cruzada, mas a autofecundação também pode ocorrer (PARAENSE, 1972).

Figura 6. Distribuição do *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: Extraído de Carvalho et al., 2008. Disponível em:
<<http://www.ufjf.br/labproteinas/material-de-apoio/esquistossomose/ciclo-biologico/>>

As propriedades físico-químicas da água localizadas no peridomicílio permanecem dentro dos limites de tolerância para os moluscos hospedeiros. O *B. glabrata* consegue tolerar níveis amplos de condutividade, íons (cálcio, sódio e potássio), cloretos, dióxido de carbono, nitrogênio (amônia), oxigênio dissolvido, turbidez, temperatura e pH (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

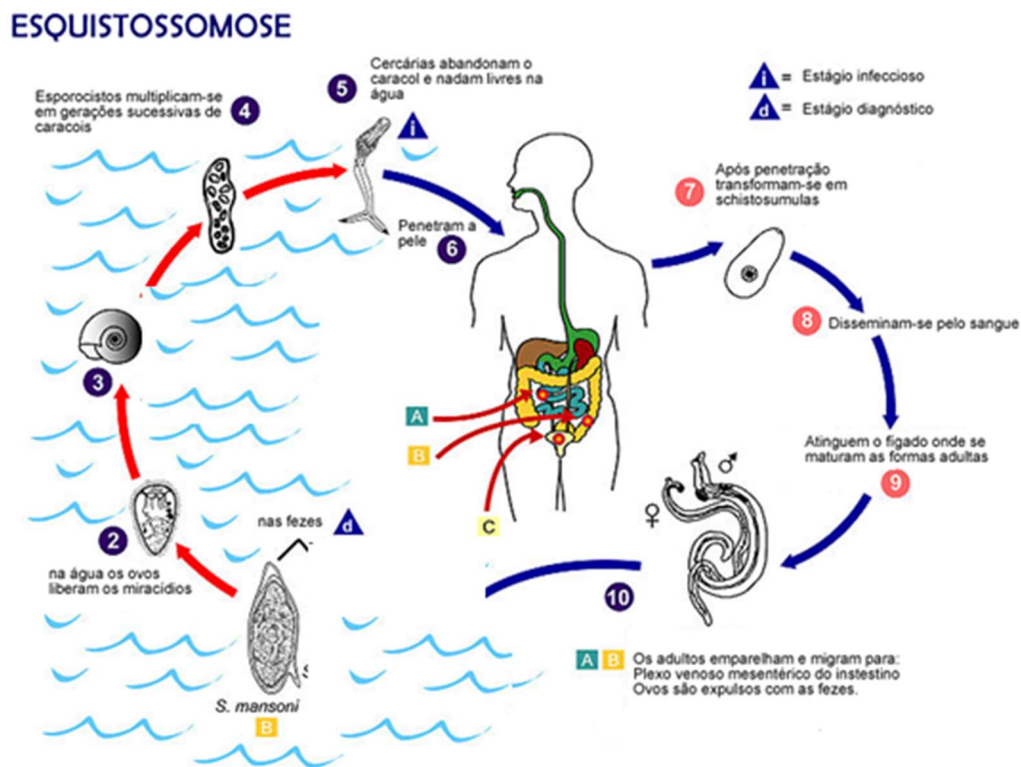
1.4 Ciclo de vida do *S. mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo (Figura 7), uma vez que apresenta duas fases: A. hospedeiro definitivo (vertebrado mamífero/ homem); B. hospedeiro intermediário (invertebrado/ molusco – *Biomphalaria* sp.). As etapas evolutivas consistem no verme adulto - macho e fêmea- ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulos (CIMERMAN; CIMERMAN, 2002). O ciclo de vida se inicia com

vermes adultos maduros habitando os vasos sanguíneos que conectam o intestino ao fígado (veias mesentéricas e sistema porta-hepático) do hospedeiro vertebrado. Após, aproximadamente, 48 dias de infecção, os vermes acasalam e inicia-se a postura dos ovos nos vasos capilares do intestino do hospedeiro, quando então passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Na água, a larva miracídio, que é livre natante, eclode do ovo e nada em círculos até encontrar o molusco. Os moluscos liberam substâncias na água que fazem com que o miracídio nada cada vez mais em círculos menores, fazendo com que aumente as chances de encontrar o molusco. Posteriormente, o miracídio penetra no corpo do molusco e sofre modificações (miracídio → esporocistos → esporocistos filhos → cercárias) abandonando o corpo deste como larva cercaria. (KATZ; ALMEIDA, 2003, NEVES, 2005; REY, 2008). A cercaria, também é livre natante, e quando encontra o hospedeiro definitivo -mamífero/ homem- pode penetrar na pele. Dentro do corpo do hospedeiro se transforma em esquistossômulos. Estes são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro definitivo e entram nos vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos. Muitos deles são destruídos pelo sistema de defesa humano e os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões (2ª semana de infecção) e, posteriormente, migram para o fígado, onde esses pequenos vermes se alimentam e tornam-se adultos (28 dias de infecção). O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (KATZ; ALMEIDA, 2003, NEVES, 2005; REY, 2008).

Figura 7. Ciclo de vida de *S. mansoni*.



Fonte: Adaptado de Manual de doenças transmitidas por água e alimentos, 2005. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>

1.5 Patogenia da esquistossomose

Os aspectos patológicos da esquistossomose dependem da relação hospedeiro/parasita (CAVALCANTI et al., 1998). Em relação ao parasito a quantidade de infecções, a cepa, a fase evolutiva e intensidade são aspectos importantes. Já em relação ao hospedeiro a idade, estado de saúde, órgão lesado, associação à outras infecções, etnia, alimentação, genoma e facilidade em obter ajuda médica são fatores que influenciam no desenvolvimento da doença (LOPES et al., 1998; PEARCE; MACDONALD, 2002).

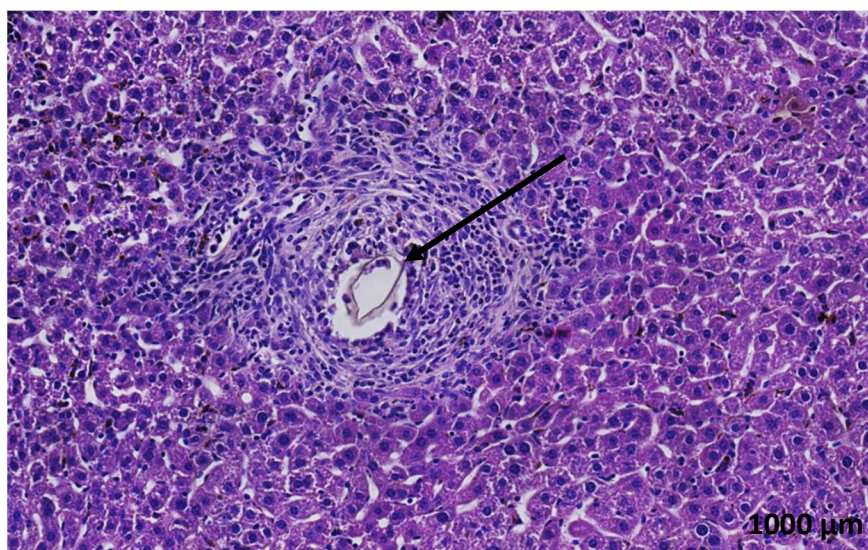
Durante a infecção, o *S. mansoni* sofre alterações importantes em sua morfologia e bioquímica que o ajudam a esquivar do sistema imunológico do hospedeiro (MILAN; KEIM, 2007). Nas 12 horas após a penetração das cercárias ocorre a dermatite cercariana, que é uma reação inflamatória dérmica e subdérmica, que destrói uma quantidade significativa de cercárias e esquistossômulos, sendo então a primeira linha de defesa contra a infecção. É caracterizada por intenso prurido, erupção urticariforme e, é seguida por eritema, edema, pequenas pápulas e dor. Essa reação inflamatória é

constituída por células mononucleares e células polimorfonucleares (neutrófilos) ao redor do parasito e dos vasos. Em seguida macrófagos e linfócitos também surgem. Tais aspectos são mais intensos em reinfecções e em indivíduos hipersensíveis (LICHTENBERGOVA et al, 2008; NEVES, 2005; REY, 2008).

Após 3 dias da penetração das larvas cercárias na pele, estas se transformam em esquistossômulos que migram para os pulmões. Na segunda semana após a infecção, estes podem ser encontrados nos vasos do fígado e, depois, no sistema porta intra-hepático. Nesse momento pode ocorrer focos de arteriolite, arterite e necrose, além de hepatite aguda e infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, pois alguns vermes foram destruídos pelo sistema imunológico do hospedeiro o que levou a obstrução embólica do vaso e à uma reação inflamatória. A desintegração do parasito pode gerar necrose do tecido e, como consequência, ocorre substituição por tecido cicatricial. Nesse estágio, pode haver sintomas pulmonares, linfadenia generalizada, aumento volumétrico do baço e febre. Alguns estudos mostraram que, em uma infecção primária, o verme pode já expressar mecanismos de evasão à ação da resposta do organismo, como, por exemplo a produção e obtenção de moléculas semelhantes às do hospedeiro e capacidade de renovação do tegumento lesado (NEVES, 2005; PRATA, 2007; REY, 2008). Os esquistossômulos evoluem para vermes adultos entre 30 e 60 dias após a infecção, período em que ocorre início das manifestações clínicas da esquistossomose aguda (MAHMOUD, 2008). A fase aguda apresenta duas fases evolutivas: a pré-patente (antes da oviposição) e a pós-patente (após a oviposição) (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Em torno de 50 dias após a infecção, no plexo mesentérico estão os vermes adultos acasalados que dão início a postura dos ovos que se propagam na parede intestinal, com áreas de necrose, gerando uma enterocolite aguda. Simultaneamente no fígado, ocorre a formação de granulomas (Figura 8), o que caracteriza a forma aguda da doença, em que há hepatoesplenomegalia discreta, mudanças discretas das funções hepáticas, fenômenos alérgicos, febre, calafrios, emagrecimento, diarreia, cólicas, leucocitose com eosinofilia e aumento das globulinas. Esse período pode durar até cerca de 120 dias após a infecção (NEVES, 2005).

Figura 8. Granuloma hepático. A seta preta indica o granuloma ao redor do ovo no fígado.



Fonte: Arquivo pessoal

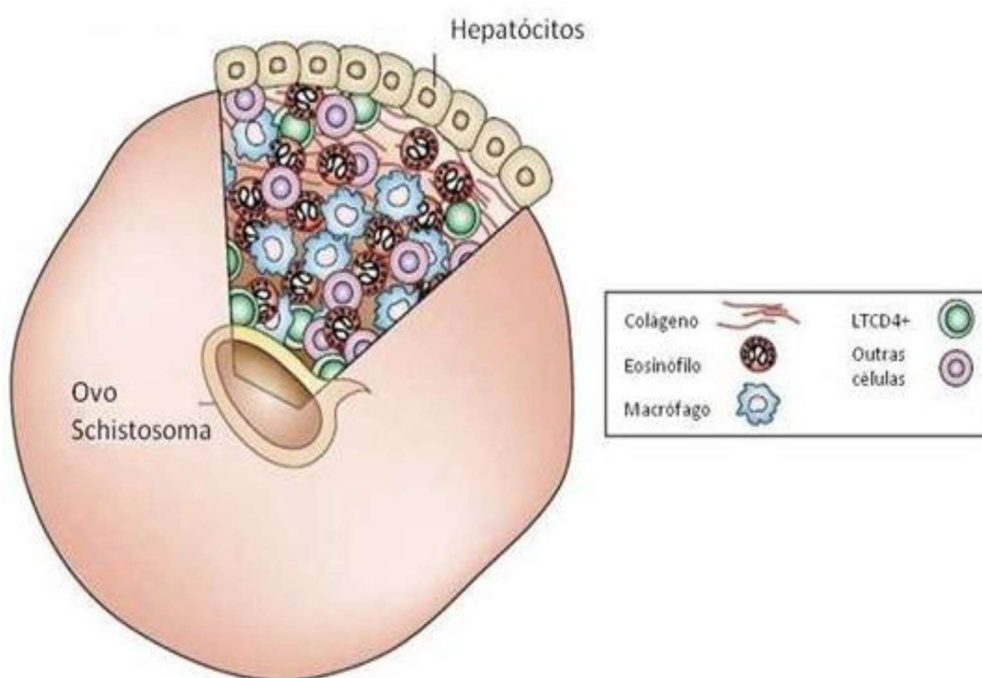
As lesões no fígado e no baço ocorrem em resposta a uma hipersensibilidade do hospedeiro à antígenos solúveis que são secretados pelos ovos (SEA - *Soluble Egg Antigens*, Antígenos Solúveis dos Ovos). Essa reação de hipersensibilidade é mais intensa no início da infecção, mas diminui na fase crônica da doença, o que reduz o tamanho dos granulomas via modulação da resposta imune (NEVES, 2005).

A formação do granuloma hepático e da fibrose hepática periportal são os eventos patogênicos mais importantes na esquistossomose (CARVALHO, MARTINS, OLIVEIRA, 2008; WARREN, 1972). A fibrose é mediada por várias subpopulações de linfócitos, levando a uma resposta inflamatória e fibrótica ao redor dos ovos alojados nos diferentes tecidos. Devido a oviposição, em torno de 60% dos ovos alcançam a luz intestinal. Os demais ovos ficam presos nos capilares da mucosa do intestino, sobrevivendo a morte do miracídio (PRATA, 2007). Muitos desses ovos permanecem no intestino, ao mesmo tempo que são transportados pela circulação mesentérica até o fígado, onde ficam presos nos sinusoides hepáticos (LENZI et al., 1991).

O granuloma (Figura 9) é constituído por inúmeras células inflamatórias como eosinófilos, componentes de matriz extracelular, proteínas de adesão. Fatores de crescimento e angiogênese, originando uma estrutura esférica que circunda cada ovo individualmente. Depois que o ovo “morre”, o granuloma diminui de tamanho. Ocorre formação de placas fibrosas rica em colágeno em seu lugar, o que gera um aumento na pressão sanguínea portal assim como o diâmetro da veia porta (PEARCE;

MACDONALD, 2002; LENZI et al., 2008). Portanto, o ovo do parasito é o mais importante agente patogênico da esquistossomose, superando muito os efeitos nocivos produzidos diretamente pelos vermes adultos (REY, 2008).

Figura 9. O granuloma na Esquistossomose mansônica.



Fonte: Adaptado de: PEARCE, MACDONALD, 2002.

Muitas variações clínicas, podem ocorrer durante a fase crônica da doença. Essas alterações podem ser intestinais, hepatointestinais ou hepatoesplênicas. Dor abdominal, diarreia com muco e sangue e tenesmo estão presentes em alterações intestinais. Em casos mais graves pode ocorrer fibrose da alça retossigmóide, levando à diminuição do peristaltismo e constipação constante (NEVES, 2005).

No início de alterações hepáticas, o fígado tem o volume aumentado e é bastante doloroso à palpação. Porém, com o passar do tempo, pode haver redução e fibrose do órgão. Os granulomas hepáticos podem gerar endoflebite aguda e fibrose periportal, provocando obstrução dos ramos intra-hepáticos da veia porta. Conseqüentemente, há a hipertensão portal, que, evolui para esplenomegalia, as varizes e a ascite (NEVES, 2005). Também na fase crônica ocorre lesões cardiopulmonares, tumorações esquistossomóticas, lesões renais e lesões neurológicas (REY, 2008).

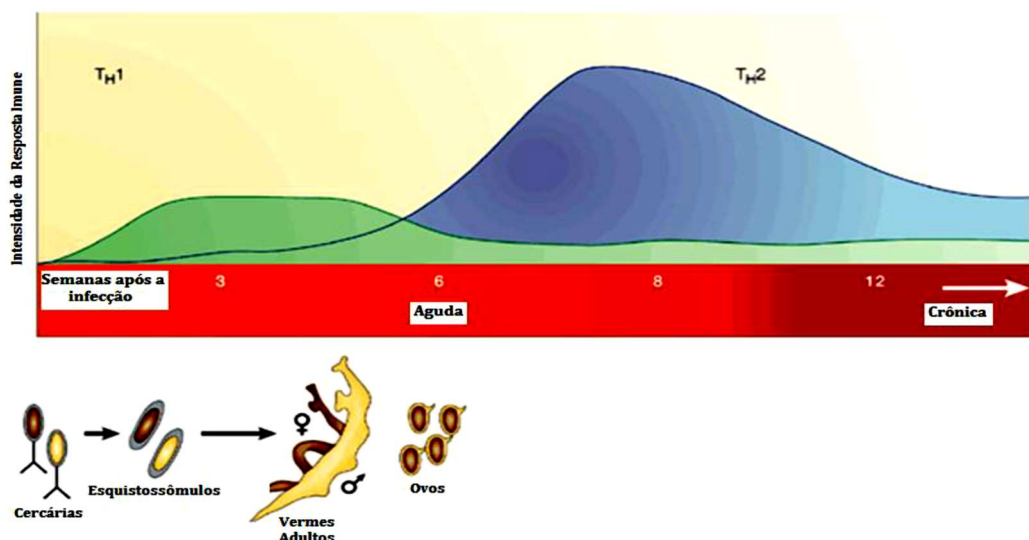
1.6 Mecanismos Imunológicos na esquistossomose

Durante a penetração das cercárias ocorre a Resposta Imune Inata - inespecífica. A pele é a primeira barreira imunológica natural e é nela que grande parte dos parasitos são destruídos e há a inibição da migração destes. Nesse momento ocorre uma reação inflamatória gerando a dermatite cercariana. Estudos mostraram que 1/3 das cercárias são destruídas na pele. Outro 1/3 é recuperado sob a forma de vermes adultos. Os esquistossômulos também são destruídos em seu percurso para pulmão e fígado (REY, 2008).

Os esquistossômulos são destruídos pela ação de anticorpos da classe IgG e de proteínas do sistema complemento (C3). Alguns fatores quimiotáticos sintetizados por mastócitos, fazem com que eosinófilos favoreçam os mastócitos, estimulados por anticorpos da classe IgE, a aderirem aos esquistossômulos. A excreção de tais fatores é fundamental na destruição dos parasitos (REY, 2008).

Na fase aguda (3 a 5 semanas de infecção) o padrão de resposta específica é do tipo Th1 (Figura 10). Nesse momento há níveis mensuráveis de fator de necrose tumoral (TNF) no plasma sanguíneo, além de células mononucleares no sangue periférico que sintetizam altos níveis de mediadores pró-inflamatórios: IFN- γ , TNF, IL-1 e IL-6 (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Figura 10. Intensidade da resposta imune nas fases da esquistossomose.



Fonte: Adaptado de Nature Reviews – Immunology – Pearce; MacDonald, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/nri/journal/v2/n7/images/nri843-f1.gif>>

Em torno da 6ª semana, devido a ação dos antígenos solúveis dos ovos, a resposta Th1 é modulada para a resposta do tipo Th2 via IL-10. Nesse momento há redução da produção e da ação dos mediadores pró-inflamatórios. Portanto, o balanço entre a resposta Th1 e Th2 via IL-10 é fundamental (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A resposta do tipo Th2 é predominante na fase crônica e é importante no estágio inicial dessa fase. No entanto, ela deve ser modulada a fim de não gerar fibrose hepática e morbidade crônica. A formação da fibrose tem participação das interleucinas IL-4 e IL-13, pois estimulam macrófagos e fibroblastos a produzirem colágeno, levando à forma mais grave da doença: a hepatoesplênica (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A homeostase imunológica é mantida pelos linfócitos TCD4+ reguladores que controlam a magnitude da resposta imune a organismos invasores (BELKAID; ROUSE, 2005). A efetividade dos mecanismos imunológicos do hospedeiro sofre contra balanço dos mecanismos de escape do parasito, via alteração do tegumento das larvas, uma vez que deixam de fixar anticorpos ou moléculas do sistema complemento; descamação da superfície externa do tegumento dos vermes adultos, que é substituída por novas camadas de membrana celular e presença de antígenos do hospedeiro adsorvidos ou incorporados à membrana do parasito, fato que impede que os vermes adultos sejam reconhecidos como estranho pelo organismo do hospedeiro (REY, 2008).

1.7 Fármacos comerciais

A esquistossomose é tratada com dois medicamentos, o Praziquantel (PZQ) e o Oxamniquine (OXM), já não mais recomendado nos dias atuais, ambos de dosagem oral e menos tóxicos do que os primeiros fármacos desenvolvidos (REY, 2008). O PZQ é utilizado há 45 anos e age contra todas as espécies de *Schistosoma* sp. e atua nos vermes adultos maduros e nos esquistossômulos 2 dias após a infecção, porém já há casos de perda de sensibilidade descritos (LIANG et al., 2003; CIOLLI et al., 2004).

O PZQ é originado a partir do núcleo isoquinoléínico-pirazínico com amplo espectro anti-helmíntico. É ministrado por via oral em que é absorvido rapidamente sendo capaz de atingir concentração sérica máxima entre 1 ou 2 horas. O fármaco é comercializado em tabletes de 600 mg, sob o nome de Biltricide®. A administração se dá em dose única de 50 mg/kg ou fracionada em duas doses com intervalo de 4 a 12 horas adultos. Já nas crianças, ocorre dose única de 60 mg/kg fracionada em duas tomadas (REY, 2008; VITORINO et al., 2012).

O PZQ é absorvido via difusão simples pelo verme adulto, promovendo um aumento da permeabilidade ao cálcio da membrana celular gerando contrações tetânicas, seguidas de paralisia muscular. Em seguida, ocorre vacuolização e desintegração do tegumento, matando, assim, o parasita (PAX et al., 1978; CAMPBELL; REW, 2013; GOODMAN; GILMAN, 1996). A porcentagem de cura através do tratamento com o PZQ varia de 60% a 90%. Tais índices são explicados devido à considerável redução da carga parasitária e da produção de ovos pelo parasito. De acordo com estudos o tratamento com o PZQ age na redução da morbidade em pacientes com fibrose hepática grave (ARAÚJO, 2010; VITORINO et al., 2012).

Contudo, havendo tratamento para a doença ainda há índice alto de pessoas infectadas, pois o PZQ não evita a reinfecção em regiões endêmicas, o que gera a necessidade de repetir o tratamento, tornando-se necessária a busca por novos medicamentos (NERIS, 2013).

O primeiro caso de resistência ao PZQ foi relatado no Senegal em 1995, onde o medicamento produziu baixas taxas de cura (18-39%). Essa suspeita foi confirmada quando os doentes foram tratados com Oxamniquine (OXM), que com baixas doses (20mg) levou a uma taxa satisfatória de cura (79%) (CIOLLI, 1998; PICAMATTOCCHIA, 2004; CIOLLI, 2003; HAGAN et al., 2004). Entretanto, nos dias atuais o OXM não é mais utilizado devido a reações adversas e comprometimento do tratamento.

O OXM é um derivado das tetraidroquinoleínas, cuja atividade é restrita sobre o *S. mansoni*. Seu nome comercial é Mansil® ou Vansil® e é comercializado em cápsulas de 250 mg ou em xarope contendo 50 mg/mL. É ministrado por via oral e é absorvido rapidamente. Em adultos há dose única de 15 mg/kg, após a última refeição; em crianças, em dose única de 20 mg/kg por via oral, uma hora após a refeição (REY, 2008; VITORINO et al., 2012).

O OXM é de uso exclusivo para tratar esquistossomose mansônica na África e Sul das Américas, no entanto no Brasil não é usado há 10 anos. Age na inibição da síntese de ácidos nucleicos em que ocorre a aquisição do DNA através da enzima sulfotransferase (ARAÚJO, 2010; VITORINO et al., 2012). Em pacientes reinfectados pouco antes do tratamento, existe a possibilidade de formas juvenis escaparem ao efeito terapêutico e chegarem a verme adulto, reiniciando a eliminação dos ovos nas fezes. O OXM tem bons resultados no tratamento dos casos crônicos avançados, com hepatoesplenomegalia, e nos casos de pólipose do colo. O tratamento com essa droga pode selecionar cepas de *S. mansoni* resistentes. Se assim ocorrer, é conveniente refazer o tratamento com PZQ. Porém, os efeitos colaterais como dores abdominais e tonturas são mais acentuados e como a eficiência entre ele e o PZQ é praticamente a mesma não é mais usado (EMANUEL; PRATA, 1983; NASCIMENTO, 2011).

A fitoterapia é uma opção para a prospecção de novos compostos. Grupos de pesquisa vem testando fitoterápicos para o tratamento da esquistossomose experimental. Alguns exemplos desses fitoterápicos são a menta (*Mentha piperita L.*) (ZAIA, 2016; FEITOSA, 2018) e a garra (*Harpagophytum procumbens*) (dados em publicação). Ambos os fitoterápicos parecem agir na redução da carga parasitária, na redução do número de ovos ovipositados pelo parasita e na modulação negativa de eosinófilos, o que leva à redução da morbidade.

1.8 Medidas alternativas para o controle do *S. mansoni*

O sequenciamento de genes de *S. mansoni* teve início em 1992 através de um projeto cuja colaboração de diferentes instituições possibilitou o sequenciamento de transcritos (FRANCO et al., 2000) e teve como objetivo descobrir genes de interesse para otimizar a compreensão da biologia do verme a fim de desenvolver novos antígenos para vacinas ou alvos proteicos para novos fármacos. Em 1994 a OMS iniciou o projeto genoma de *S. mansoni* através do sequenciamento completo (OLIVEIRA; JOHNSTON, 2001).

Posteriormente, dois grandes projetos brasileiros de transcriptoma foram feitos. Ambos trabalharam com o verme adulto e com estágios de vida larvais (OLIVEIRA, 2007; VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003).

O sequenciamento do genoma completo da espécie teve iniciativa internacional conduzida pelo instituto *The Institute for Genomic Research* - TIGR em associação com o *Wellcome Trust Sanger Institute* – WTSI (LOVERDE et al., 2004). As últimas versões do sequenciamento genômico e todas as análises efetuadas estão disponíveis nos bancos de dados online GeneDB (www.genedb.org) e SchistoDB (www.schistodb.net).

Os antígenos localizados na região superficial do tegumento do *S. mansoni* representam os principais alvos vacinais. Há algumas imunizações utilizando proteínas em fase de pesquisa clínica. Uma delas é a proteína de membrana Sm TSP-1 no tegumento apical da membrana do *S. mansoni* que apresentou redução de 30% a 50% contra vermes adultos e aproximadamente 50% contra ovos (TRAN, et al., 2006).

A proteína do tegumento dos esquistossômulos e da musculatura do verme adulto, a paramiosina Sm97, induziu uma ação contra os vermes adultos com redução de 30% a 50% (MATSUMOTO et al., 1988; PEARCE; MACDONALD, 2002; CORREA-OLIVEIRA et al., 1989; AL-SHERBINY et al., 2003).

A proteína Sm14 é metabólica e induziu uma ação que atingiu os vermes adultos, apresentando redução de aproximadamente 50%. Esta proteína é a única em fase de testes clínicos. (MOSER, et al., 1991; TENDLER, et al., 1996; AL-SHERBINY et al., 2003; FONSECA, et al., 2004; VARALDO et al., 2004).

Há também a proteína GlutathioneStransferase (Sm28) encontrada em todo corpo do verme adulto e atingiu os vermes adultos e os ovos com diminuição de carga parasitária de 30% a 50% (PORCHET et al., 1994).

E, por último, a proteína Sm23 encontrada no tegumento apical da membrana que apresentou ação contra os vermes adultos com redução de 30% a 50% de carga parasitária (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000; DA'DARA et al., 2001; AL-SHERBINY et al., 2003).

O *S. mansoni* possui um ciclo biológico complexo, com diferentes estágios de vida, além de apresentar inúmeros mecanismos de escape das defesas do hospedeiro (REY, 2008), assim como a maioria dos organismos que possuem vida parasitária obrigatória. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina contra a doença se mostra um desafio para a ciência atual. De acordo com Ribeiro de Jesus e colaboradores (2000) e Bergquist e colaboradores (2005) a elaboração de uma vacina ou imunoterapia deve ter

como principal característica a competência em induzir índices elevados de proteção, via estímulo do padrão de resposta do tipo Th1 e do Th2 e/ou diminuir a fecundidade dos vermes adultos e sua fisiopatologia. Ademais, uma proposta para um possível estímulo do sistema imune para a esquistossomose empregando diversos antígenos tem apontado para uma maior eficiência quando comparada com a utilização de um único antígeno (EL RIDI et al., 2014).

Uma vez que essas proteínas estão sendo testadas, a busca por novos antígenos de grande interesse para a geração de novos conhecimentos para o desenvolvimento de uma nova vacina, tratamento e imunoterapia se faz importante. Mesmo havendo tratamento para a doença, a esquistossomose ainda é uma das principais enfermidades que afetam o ser humano, sem nenhuma imunização efetiva (NERIS, 2013) e contribui com milhares de mortes todos os anos ao redor do mundo.

1.9 Metabolismo de purinas

Os nucleotídeos são moléculas que exercem inúmeras funções fundamentais em todos os tipos celulares de todos os organismos. São formados por um grupamento fosfato que se liga a ribose ou desoxirribose (açúcares). Este açúcar se liga à uma base nitrogenada que pode ser púrica - adenina (A) ou guanina (G) - ou pirimídica - citosina (C), timina (T) ou uracila (U). Os nucleotídeos são moléculas precursoras dos ácidos nucleicos, o DNA e o RNA, são componentes dos co-fatores NAD, FAD, S-adenosilmetionina e coenzima A, assim como de intermediários biossintéticos ativados como a UDP-glicose e o CDP diacilglicerol. Alguns, como o cAMP e o cGMP, também são mensageiros celulares secundários (LEHNINGER, 2006).

Existe um total de nucleotídeos presentes nas células que corresponde à cerca de 1% ou menos das quantidades requisitadas para a síntese do DNA. Então, a produção de nucleotídeos precisa acontecer de maneira paralela à síntese dos ácidos nucleicos, podendo esta última apresentar-se como um fator limitante aos processos celulares de replicação e transcrição (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008). Considerando a relevância que esses processos possuem para as células que estão se dividindo, agentes que possam inibir a síntese de nucleotídeos é de significativa importância para a medicina atual (ROMANELLO, 2011).

A *Via de novo* e a *Via de salvação* são duas vias metabólicas intracelulares que levam à síntese de nucleotídeos. A *Via de novo* para bases púricas e pirimídicas é praticamente igual em todos os seres vivos e apresenta como moléculas precursoras

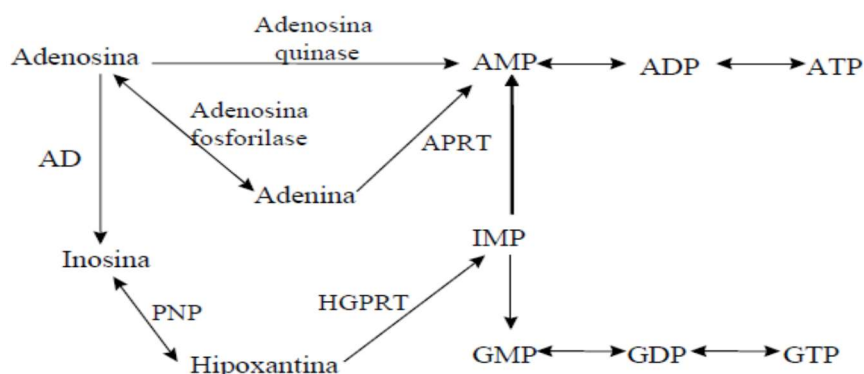
NH₃, CO₂, ribose 5-fosfato e aminoácidos. Já a *Via de salvação* para bases púricas e pirimídicas reutiliza nucleosídeos (nucleotídeos sem o grupamento fosfato) oriundos da quebra de ácidos nucleicos, requerendo uma quantidade menor de energia quando comparada a *Via de novo* (NELSON; COX, 2005; WILLEY & SONS, 2004).

Um estudo demonstrou que há uma rápida incorporação de adenina nos nucleotídeos sem a incorporação de ¹⁴C-glicina e ¹⁴C-glicose no anel púrico, evidenciando que *S. mansoni* depende de uma fonte externa de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos, o que mostra a perda da *Via de novo* para bases púricas (SENFT et al., 1972). Portanto para bases púricas o *S. mansoni* depende exclusivamente da *Via de salvação*.

1.10 Enzimas da Via de salvação de purinas de *S. mansoni*

A via de biossíntese de bases púricas e pirimídicas é uma das principais para o desenvolvimento de fármacos, pelo fato delas estarem diretamente relacionadas com a manutenção da síntese de DNA e RNA. Senft e Crabtree esquematizaram as várias vias pelas quais a adenosina, uma das principais enzimas da *Via de salvação* de *S. mansoni*, é convertida em nucleotídeos (PEREIRA, 2008). Este esquema é mostrado na figura 11 e mostra as demais enzimas presentes nessa via.

Figura 11. Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*.



AD: Adenosina Desaminase; PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase; HGPRT: Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase; APRT: Adenina Fosforibosiltransferase; AMP: Adenosina Monofosfato; ADP: Adenosina Difosfato; ATP: Adenosina Trifosfato; IMP: Inosina Monofosfato; GMP: Guanosina Monofosfato; GDP: Guanosina Difosfato; GTP: Guanosina Trifosfato.

Fonte: Pereira, H. M. Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*: Estruturas cristalográficas, estudos cinéticos e descoberta de novos ligantes. 2003. Tese (Doutorado em Ciências: Física).

As enzimas dessas vias metabólicas agem intracelularmente. Há na literatura trabalhos que utilizaram essas enzimas recombinantes a fim de identificar novos alvos terapêuticos: coelhos infectados com cercárias de *S. japonicum* foram imunizados com a enzima Adenilato Quinase mostrando resultados positivos, analisando o soro desses animais (PENG et al., 2004). Outro trabalho, utilizando RNAi (RNA de interferência) demonstrou a importância da enzima HGPRT para a sobrevivência do verme da espécie *S. mansoni*. Os RNAs foram projetados contra a HGPRT e injetados em camundongos após 70 dias de infecção. O número de vermes adultos reduziu em aproximadamente 27% após o tratamento (PEREIRA et al., 2009).

Tais trabalhos evidenciam que as enzimas da *Via de Salvação* parecem modular a infecção por *Schistosoma sp.* em diferentes espécies, porém ainda em um mecanismo não elucidado.

1.10.1 Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPRT)

A Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPRT) é codificada por um gene essencial do parasita *S. mansoni* (KEOUGH et al., 2005). Há três genes homólogos para essa enzima que estão relacionados aos diferentes estágios de vida do parasito (Tabela 2).

Tabela 2. Estágio de vida ao qual pertence cada homólogo da HGPRT e identidade sequencial entre eles.

HGPRT	Estágios de vida de <i>S. mansoni</i>	Identidade sequencial
HGPRT 1 (Smp_103500)	Esquistossômulos	Smp_148820 - 39%
HGPRT 2 (Smp_148820)	<i>S. mansoni</i> adulto	Smp_168500 - 46%
HGPRT 3 (Smp_168500)	<i>S. mansoni</i> adulto	Smp_103500 - 46%

Fonte: Adaptado de Romanello, 2011.

A enzima tem uma importante função na *Via de salvação* de bases púricas (TIMMERS, 2009). A HGPRT (Figura 12) catalisa a remoção do grupo pirofosfato (PPi) do fosforribosil-pirofosfato (PRPP) e a adição de uma base púrica (hipoxantina ou guanina), na presença do co-fator Mg²⁺. O produto dessa reação reversível é a formação de IMP (inosinamono-fosfato) ou GMP (guanina monofosfato), o que favorece a formação dos nucleotídeos (XU et al., 1997).

Figura 12. Estrutura cristalográfica da HGPRT isoformas 1 De *S. mansoni*.



Fonte: Extraído de: ROMANELLO et al, 2016.

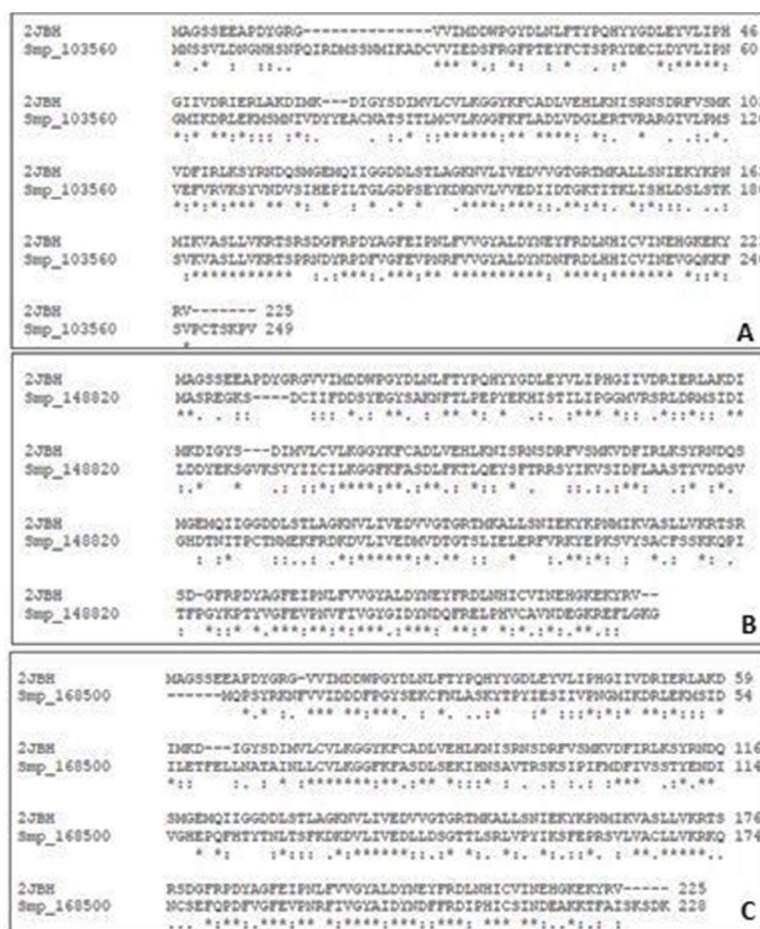
A HGPRT tem sido encontrada normalmente como dímero em solução nos organismos *Tritrichomonas foetus* (HGXPRT), *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* e *Leishmania tarentolae*. Ela é encontrada na forma tetramérica em solução, em *Escherichia coli* (HPRT), *Toxoplasma gondii* (HGXPRT), *Plasmodium falciparum* (HGXPRT) e em humano (SOMOZA et al., 1996; ULLMAN & CARTER, 1997; XU et al., 1997; HÉROU, 1999; KEOUGH et al., 1999; GUDATT et al., 2002; MONZANI et al., 2002;).

A enzima HGPRT pertence à família das fosforibosiltransferases, que catalisam a transferência do grupo ribose 5' fosfato vindo do PRPP, para uma variedade de substrato secundários na presença de Mg^{2+} , com liberação de pirofosfato (MUSICK, 1981). Esta enzima é de grande interesse, pois, desempenha um papel importante na reconstituição de purina nos nucleotídeos em certo número de parasitas (WANG et al., 2012; DOVEY et al., 1984).

Estudos sobre esquistossômulos de *S. mansoni* indicam que os organismos dependem basicamente da recuperação das bases púricas para cumprir suas exigências de nucleotídeos de purina (DOVEY et al., 1984; DOVEY et al., 1985). Devido a limitada interconversão entre nucleotídeos adenina e guanina, as HGPRTase de *S. mansoni* fornecem as principais fontes de nucleotídeos guanina para o parasito. No parasito *S. mansoni* a HGPRT é codificada por um gene essencial (KEOUGH et al., 2005), sendo que no genoma do mesmo foram encontrados três genes homólogos

para a síntese da HGPRT (Smp_148820, Smp_168500 e Smp_103560) que estão relacionados com diferentes estágios de vida do parasito. Essa enzima demonstrou várias propriedades que a distinguem de enzimas de mamíferos (DOVEY et al., 1985), favorecendo seu uso como alvo terapêutico em humanos como pode ser visto na figura 13.

Figura 13. Alinhamento das três isoformas da HGPRT de *S. mansoni* com a HGPRT humana



Alinhamento de HGPRT Smp_103560 de *Schistosoma mansoni* com HGPRT humana (2JBH), 45% de identidade sequencial. B. Alinhamento de HGPRT Smp_148820 de *Schistosoma mansoni* com HGPRT humana (2JBH), 32% de identidade sequencial. C. Alinhamento de HGPRT Smp_168500 de *Schistosoma mansoni* com HGPRT humana (2JBH), 38% de identidade sequencial. Fonte: ROMANELLO, L. Estudos das enzimas Adenosina Quinase e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

1.10.2 Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP)

A clivagem de nucleosídeos ocorre por fosforilação via enzimas nucleosídeos Fosforilase (PARKS; AGARWAL, 1972). A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) – uma nucleosídeo Fosforilase – é responsável pela catálise reversível de uma Fosforilase da purina nucleosídeo para gerar a base purina e ribose 1-fosfato. Desde sua descoberta em 1975 por Gibblet et al., a PNP é alvo para tratamento.

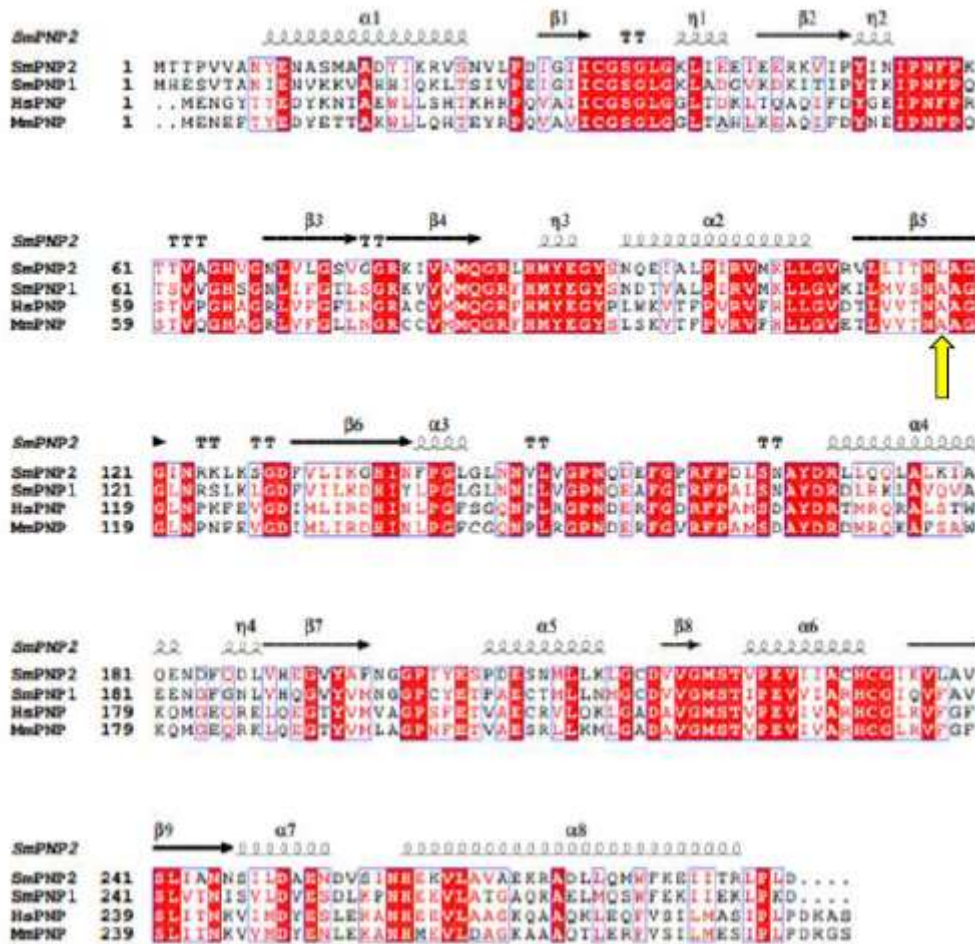
A PNP apresenta 2 isoformas e está distribuída em muitos tecidos, mas tem função maior nos rins, granulócitos e nos linfócitos periféricos. Nas hemácias também apresentam alto grau de ação (STOECKLER, 1984).

A importância da PNP na integridade do sistema imune tornou-se relevante a partir da descrição de uma imunodeficiência encontrada em crianças que não possuíam esta enzima (GIBBLET et al., 1975). Essas crianças exibiam uma depleção seletiva de células T, sugerindo que a atividade da enzima é necessária para a proliferação normal de células T humanas.

Há duas classes de PNP: A. Baixa massa molecular e; B. Alta massa molecular. As de baixa massa molecular são triméricas, específicas para nucleosídeos 6-oxopurina e encontradas, principalmente, mas não exclusivamente em mamíferos (BZOWSKA et al., 1990; STOECKLER, 1978; STOECKLER, 1984). As de alta massa molecular são encontradas em microrganismos (JENSEN; NYGAARD, 1975).

A PNP humana (huPNP) é trimérica no estado cristalino, com subunidades α e β (Figura 14). São muito conhecidas e bem elucidadas pela ciência e ambas apresentam uma conservação total dos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico (EALICK et al., 1990; KOELLNER, et al., 1997; NARAYANA et al., 1997).

Figura 14. Alinhamento das seqüências de PNPs de humanos, de *S. mansoni* e *M. musculus*.



Alinhamento das PNPs humana, de *S. mansoni* e *M. musculus*. As setas em preto representam fitas β ; espirais. A-hélice; o símbolo TT, β -turn; e o símbolo TTT, α -turns. Os resíduos escritos em branco com fundo vermelho são conservados e os escritos em vermelho com fundo branco são os não conservados. A seta amarela indica o único resíduo do sítio ativo que interage diretamente com o ligante, que difere do sítio ativo das demais PNPs analisadas. Fonte: (SOUZA, 2016).

1.11 Imunoterapia

Imunoterapia é um tipo de tratamento que promove a estimulação do sistema imunológico, por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica. O resultado da interação antígeno-anticorpo é a reação imunológica que também pode decorrer de mecanismos envolvidos na imunidade mediada por células (INCA, 2016).

A Imunoterapia vem sendo utilizada no tratamento de diversas doenças, sendo destaque para o tratamento do câncer. Sabe-se que há uma relação entre competência imunológica e evolução favorável de doenças malignas (INCA, 2016). No tratamento de

parasitoses o uso desse tipo de terapia ainda é pouco estudado, e para esquistossomose mansônica é inédito, sendo nosso grupo de pesquisa os primeiros a descrever esse modelo.

O objetivo de aplicar essa abordagem é estimular o sistema imunológico do hospedeiro contra o parasito, gerando uma resposta imune específica.

1.12 Tratamento com enzimas recombinantes

As principais ações para erradicar a esquistossomose são desenvolver tratamentos para a população atingida, controlar a população de caramujos, educação sanitária e saneamento básico. Já a principal patogênese na esquistossomose mansônica é a formação dos granulomas, que são formados pela resposta imune do hospedeiro contra antígenos dos ovos do parasito (MOHDA et al., 1998; CHITSULO et al., 2000).

No Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas – LIDI- do Departamento de Morfologia e Patologia – DMP – da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar foram realizadas pesquisas que mostraram que camundongos previamente imunizados com a enzima Adenosina Quinase (AK) da *Via de salvação* de *S. mansoni* e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni* obtiveram redução de carga parasitária de 27,32%, ainda também interferiu no pareamento da fêmea com o macho, quando comparado com os animais infectados e não imunizados (FATTORI, 2013). Níveis significantes na produção de anticorpos do tipo IgG1 foram verificados, o que sugere uma resposta com padrão Th2, após a imunização com a enzima AK, mostrando uma possível atividade antiparasitária e imunogênica a partir da imunização com a mesma (FATTORI, 2013).

Outras pesquisas foram realizadas nesse laboratório e demonstraram que, camundongos imunizados com a enzima Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e desafiados com cercárias de *S. mansoni* também mostraram redução de carga parasitária de 27% quando comparados com os animais infectados e não imunizados, além de uma significativa redução do número de ovos por grama de fezes (NERIS et al., 2013a). Também foi mensurada uma produção elevada de anticorpos do tipo IgE além de produção de anticorpos do tipo IgG2a, demonstrando uma resposta com padrão Th1 (NERIS et al., 2013b), sugerindo que a enzima HGPRT de *S. mansoni*, assim como a AK, apresentam-se como boas candidatas na busca por ferramentas que possam contribuir para o controle da esquistossomose.

Em um outro trabalho foi mostrado que camundongos imunizados com a enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) da *Via de salvação* de *S. mansoni* e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni* tiveram uma redução significativa de 50% no número de ovos quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento, além de reduzir significativamente a carga parasitária no fígado e intestino (NERIS, 2012).

Então, o presente trabalho propõe avaliar o tratamento conjunto com as enzimas Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) e um MIX com as duas enzimas, uma vez que a enzima HGPRT induz a produção de anticorpos do tipo IgG2a, o que caracteriza um padrão de resposta Th1 e a PNP reduz a carga parasitária. Uma proposta de tratamento para a esquistossomose utilizando múltiplos antígenos tem demonstrado maior eficácia quando comparada com a utilização de um único antígeno (EL RIDI et al., 2014).

Sendo assim, o presente trabalho determinou os efeitos dessas imunizações como tratamento e modulação das respostas imunológicas celular e humoral, parasitológica e hepatohistológicas durante a esquistossomose mansônica experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Determinar os efeitos do tratamento com as enzimas recombinantes Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), e o MIX (HGPRT + PNP) de *Schistosoma mansoni* na esquistossomose murina.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito anti-parasitário do tratamento com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), além do MIX (HGPRT + PNP) em animais infectados com *S. mansoni*, por meio da quantificação de ovos nas fezes e recuperação de vermes adultos na veia porta e mesentério intestinal;
- Verificar a resposta leucocitária na cavidade peritoneal e no sangue mediante ao tratamento com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), além do MIX (HGPRT + PNP) em animais infectados com *S. mansoni*;
- Avaliar a produção de anticorpos (IgG2a e IgE) e a dosagem de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ) após tratamento com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), além do MIX (HGPRT + PNP) em animais infectados com *S. mansoni*;
- Analisar por meio de lâminas histológicas, o processo inflamatório e formação de granulomas no fígado, a deposição de colágeno em animais tratados com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), além do MIX (HGPRT + PNP) e infectados com *S. mansoni*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste estudo se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob parecer nº 7939170816 (ANEXO).

3.1 Obtenção das enzimas recombinante Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) de *Schistosoma mansoni*

As proteínas HGPRT e a PNP foram sintetizadas pela metodologia de expressão protéica através da inserção de plasmídeos em culturas bacterianas e foram purificadas pelo método de cromatografia de afinidade, em colaboração com o Laboratório de Cristalografia do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME) do Instituto de Física de São Carlos – IFSC, situado na Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, coordenado pelo Dr. Humberto d’Muniz Pereira, cujo projeto visa a obtenção das estruturas tridimensionais de todas as enzimas da Via de Salvação de Purinas e de Síntese de Pirimidinas do parasita *Schistosoma mansoni* através da técnica de Cristalografia por Difração de Raio-X. Nosso laboratório em parceria com o CBME teve como objetivo analisar a atividade biológica das enzimas estudadas *in vivo* no modelo da esquistossomose murina. As metodologias (etapas de expressão e purificação) da enzima e suas padronizações foram desenvolvidas pelo o grupo de cristalografia e serão descritas a seguir.

3.1.1 Expressão heteróloga da enzima recombinante HGPRT de *Schistosoma mansoni*

Para a expressão da enzima HGPRT de *S. mansoni* foram utilizados 1 L de meio de cultura *Power Broth* (específico para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e constituído por uma complexa mistura rica em aminoácidos, vitaminas e fonte de carbono) suplementado com 30 µg/mL de kanamicina e incubadas em frascos com 20 mL de uma cultura contendo bactérias recombinantes *E. coli* Lemo 21 (DE3) contendo o plasmídeo pOPINF e os genes das enzimas HGPRT de *S. mansoni* previamente crescida por 16 horas (ROMANELLO, 2011).

Os frascos ficaram sob agitação (160 rpm) a 37 °C até que a D.O. (densidade optica) fosse igual ou superior a 0,5. Após, os meios de cultura foram esfriados e adicionados 100µM/mL de IPTG (indutor de expressão). Em seguida as culturas foram mantidas a 20°C sob agitação de 150 rpm por aproximadamente 16 horas (ROMANELLO, 2011).

O produto da expressão foi centrifugado por 40 minutos a 4000 rpm e a 4°C e o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 50 mL de tampão de lise (50mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂) e congelado a -20°C até o uso (ROMANELLO, 2011).

3.1.2 Expressão heteróloga da enzima recombinante PNP de *Schistosoma mansoni*

Para a expressão da enzima PNP de *S. mansoni* foram utilizados 500 mL de meio de cultura 2XTY suplementado com 30µg/mL de kanamicina. Foram incubadas em frascos 10 mL de uma cultura de bactérias recombinantes de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET28a e o gene das enzimas de *S. mansoni* por 16 horas. Os tubos foram agitados (250 rpm) a 37°C até que a D.O. (densidade óptica) fosse igual ou acima de 0,5. Posteriormente, foi adicionado 100 µM/mL de IPTG e as culturas foram mantidas nas mesmas condições por 3 horas (PEREIRA, 2003).

O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 50 mL de tampão de lise (50 mM NAH₂PO₄ ph 7,8, 300 nM NaCl, 10 nM imidazol, 5 nM beta-Mercaptoetanol e nM MgCl₂) e congelado a -20°C (PEREIRA, 2003).

3.1.3 Purificação da enzima recombinante HGPRT de *Schistosoma mansoni*

Tanto o vetor pET28a quanto o pOPINF codificam a inserção de uma sequência de 6 histidinas na região N-terminal das proteínas expressas conferindo às mesmas afinidade pelos íons níquel ou cobalto. Para a purificação da HGPRT foi utilizada a coluna de cobalto. Após a sedimentação da resina na coluna, a mesma foi lavada com 10 volumes de coluna (50 mL) de água ultrapura para a retirada do etanol e foi equilibrada com 10 volumes de coluna (50 mL) de tampão de lise (50 mM de NaH₂PO₄ em pH 7,4; 300 mM de NaCl; 10 mM de imidazol; 5 mM de β- Mercaptoetanol e 1 mM de MgCl₂). Em seguida, o precipitado foi armazenado a - 20°C e ressuspenso em 50 mL de tampão de lise e posteriormente as bactérias (tubos mantidos em gelo) sofreram lise em sonicador utilizando-se a programação de 6 pulsos de duração de 1 minuto e

descanso de 30 segundos entre cada pulso. Após a sonicação, o produto foi centrifugado por 40 minutos a 14000 rpm e a 4°C e o sobrenadante (extrato bruto) foi aplicado na coluna e o eluato coletado (ROMANELLO, 2011).

A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna (50 mL) de tampão de lavagem (50 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 20 mM de imidazol; 5 mM de β-Mercaptoetanol e 1 mM de MgCl₂, pH 7,4) e o lavado foi coletado (ROMANELLO, 2011).

Para a eluição da enzima ligada à coluna foram utilizados 5 volumes de coluna (30 mL) de tampão de eluição (50 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 200 mM de imidazol; 5 mM de β-Mercaptoetanol e 1 mM de MgCl₂, pH 7,4) e a eluição (contém a enzima) foi coletada. O eluato, o lavado e a eluição de ambas as enzimas foram visualizadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado por Coomassie Blue (ROMANELLO, 2011).

Após a purificação a enzima HGPRT foi dialisada para a retirada do imidazol com tampão de diálise (20 mM de Tris; 200 mM de NaCl; 10 mM de β-Mercaptoetanol; 1 mM de MgCl₂ e 5% de glicerol, pH 7,8 para a AK2 e 20 mM de Tris; 200 mM de KCl; 5 mM de β-Mercaptoetanol e 500 μM de MgCl₂, pH 7,4 para a HGPRT). Ao final da diálise, a enzima foi concentrada utilizando-se um *Centricon* (10kDa) a 3500 rpm e a 4°C por 30 minutos (ROMANELLO, 2011).

Para a quantificação da enzima foi utilizado o equipamento *NanoDrop* (280 nm), obtendo-se como resultado a seguintes concentração: HGPRT – 8mg/ML (ROMANELLO, 2011).

3.1.4 Purificação da enzima recombinante PNP de *Schistosoma mansoni*

A PNP expressa foi submetida a clivagem em 1 μg de protease fator Xa (*New England Biolabs*). A clivagem durou 96 horas e foi mantida em repouso a 4°C. O produto da clivagem foi dialisado, a fim de se promover a troca de tampão da coluna de amilose por tampão MÊS (ácido N-morfolinoetilenossulfônico, pH 6,0). Posteriormente, foirealizada a purificação cromatográfica em coluna de troca catiônica POROS 20HS, empregando-se um cromatógrafo líquido, Nessa passagem, a PNP já aderida aderida na coluna e a MBP passa-se diretamente pela coluna (PEREIRA, 2003).

Após a purificação a enzima PNP passou pelos mesmo processos de diálise e quantificação descritos anteriormente (PEREIRA, 2003).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmea da linhagem Balb/c, pesando entre 18 a 20 gramas, provenientes do Biotério Geral da Prefeitura da Universidade de São Paulo (USP - Ribeirão Preto). Esses animais apresentam o certificado *Specified Pathogen Free* - SPF, o que garante que os mesmos são livres de patógenos. Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP - UFSCar), com livre acesso à água e ração para roedores.

3.3 Obtenção das larvas infectantes do *Schistosoma mansoni*

As larvas infectantes (cercárias) da cepa BH (Belo Horizonte – MG, Brasil) foram gentilmente cedidas pela Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (USP – Ribeirão Preto) as quais foram liberadas de caramujos infectados com o *S. mansoni* mantidos no Moluscário da mesma instituição com auxílio da técnica de laboratório Olinda Mara Brigoto e da aluna de Doutorado Andressa Barban do Patrocínio.

3.4 Infecções dos animais com as larvas infectantes (cercárias) do *Schistosoma mansoni*

Os animais foram infectados via subcutânea (s.c.) com as larvas do *S. mansoni*, onde foram inoculadas cerca de 80 cercárias /0,5 mL salina/animal, com o auxílio de uma seringa de 1mL.

3.5 Tratamento dos animais

Os camundongos foram tratados via intraperitoneal (i.p.) três vezes em intervalos de 10 dias com 100 µg da enzima recombinante HGPRT (Grupo Sm+HGPRT), 100 µg da enzima recombinante PNP (Grupo Sm+PNP) e 50 µg da enzima recombinante HGPRT mais 50 µg da enzima recombinante (Grupo Sm+MIX). As enzimas foram emulsificadas com o adjuvante Hidróxido de Alumínio (HA). O tratamento ocorreu após 28 dias de infecção: 1º dose: 28º dia; 2ª dose: 38º dia; 3ª dose: 48º dia (Figura 9). Os grupos experimentais foram divididos em 5:

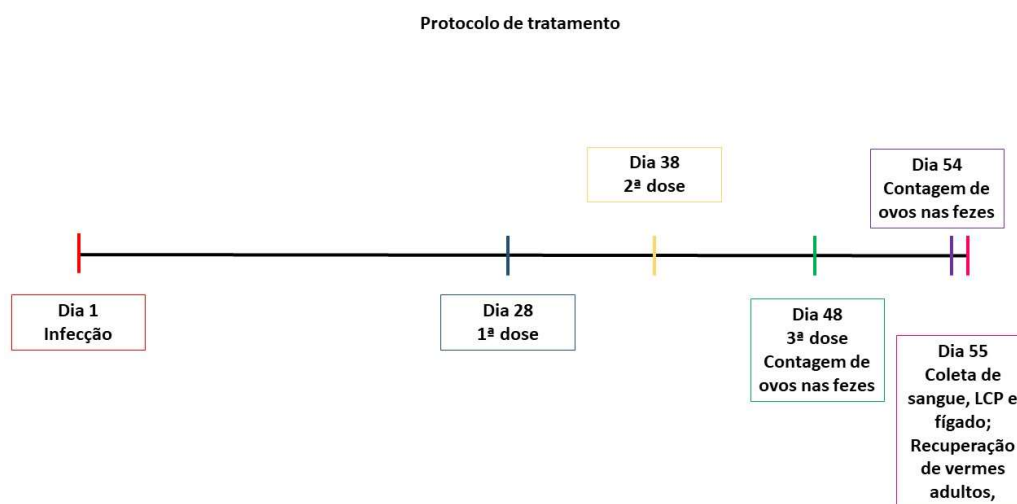
Tabela 3: Grupos experimentais.

	Controle	Sm	Sm+HGPRT	Sm+PNP	Sm+MIX
Número de animais	6	6	6	6	6
Infecção	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Tratamento	Não	Não	Sim	Sim	Sim

Cinco grupos experimentais foram criados: Controle negativo, em que os animais não receberam infecção e nem tratamento; Sm (controle positivo) em que os animais receberam somente infecção; Sm+HGPRT em que os animais receberam infecção e tratamento com a enzima recombinante HGPRT; Sm+PNP em que os animais receberam infecção e tratamento com a enzima recombinante PNP e; Sm+MIX em que os animais receberam infecção e tratamento com ambas enzimas recombinantes. Fonte: elaborada pela autora.

O modelo proposto foi repetido pelo menos duas vezes, para a confirmação dos resultados obtidos.

Figura 15. Protocolo de Tratamento.



No 1º dia foi realizada a infecção. No 28º dia foi feita o primeiro tratamento. Nos 38º e 48º dias o tratamento foi repetido. No 48º e no 54º foram contados os ovos nas fezes pelo método Kato-Katz. No 55º e último dia foi feita a eutanásia para coleta de sangue e de lavado da cavidade peritoneal e recuperação vermes adultos no fígado e mesentério. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.1 Adjuvante Hidróxido de alumínio

Adjuvantes são substâncias que quando associadas à antígenos auxiliam ou potencializam a resposta imunológica, que poderia apresentar menos intensidade caso o

antígeno fosse administrado isoladamente (LIMA, 2008). Quando o antígeno apresenta baixa imunogenicidade, o uso de adjuvantes em vacinas ou tratamentos que induzem uma resposta imunológica são importantes. O uso dessas substâncias é recomendado quando o antígeno é um peptídeo recombinante ou quando é subunidades de um peptídeo (GUPTA et al., 1993).

Os sais de alumínio: hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio são os únicos adjuvantes autorizados pelo FDA (*Food And Drug Administration*) para uso em humanos e vacinas veterinárias (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

Há pelo menos 3 características biológicas que esses sais apresentam: nos tecidos ocorre geração de depósito de colágeno levando à uma exposição prolongada, síntese de antígenos particulados, o que facilita a apresentação para APC e ativação do sistema complemento e estimulação de macrófagos induzindo a contenção e ativação de linfócitos (O'HAGAN; MACKICHAN, 2001).

3.6 Contagem de ovos nas fezes

A eliminação de ovos nas fezes dos animais foi analisada pelo método de Kato-Katz (KATZ & PEIXOTO, 2000) no 48º dia e 54º dia. O ovo do *S. mansoni* é característico, pois tem formato elíptico e uma espícula. Com a coloração de verde malaquita os ovos ficam transparentes facilitando sua identificação para contagem, como pode ser visto na figura 16.

Figura 16. Ovos de *S. mansoni* nas fezes.

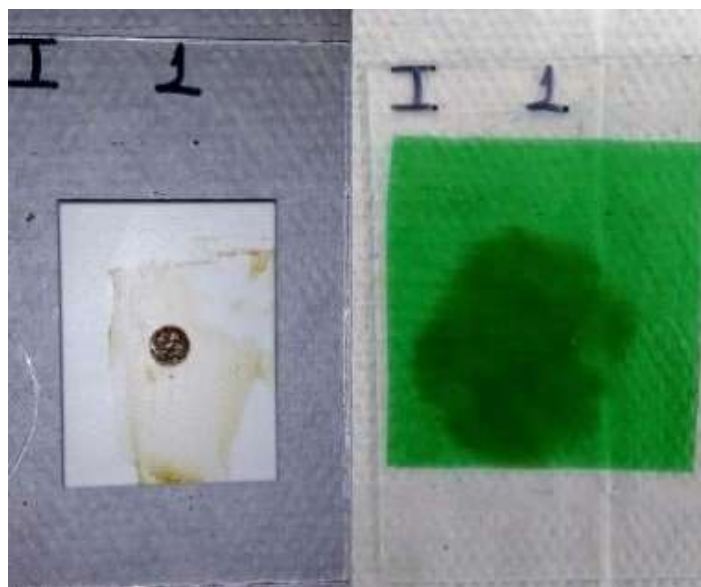


Fonte: Acervo pessoal.

As fezes foram peneiradas em filtro-Test (*Helm- Test*), montadas em lâminas de microscopia, com quantidade padronizada de fezes através de orifício com diâmetro conhecido da placa e cobertas com lamínula de papel celofane impregnada de verde malaquita, objetivando a conservação das fezes e o clareamento dos ovos do *S. mansoni*,

como pode ser observado na figura 17. Após leitura das lâminas e contagem dos ovos, foi calculada a quantidade de ovos por grama de fezes seguindo a seguinte fórmula: N° de ovos da amostra por grama de fezes = n° de ovos encontrados na lâmina x fator 24.

Figura 17. Método Kato-Katz.



Método de Kato-Katz. A. Placa com orifício no meio para coleta de quantidade específica de fezes. B. Lâmina de microscopia coberta com lamínula de papel celofane impregnada de verde malaquita. Fonte: acervo pessoal.

3.7 Avaliação celular

Os animais foram eutanasiados com anestésico Thionembutal (North Chigaco, Illinois, USA) nos tempos previamente por nós estabelecidos, ou seja, 55° dia após a infecção para coleta de sangue e LCP e recuperação de vermes adultos no sistema porta e mesentério intestinal.

3.7.1 Coleta de sangue para a contagem de leucócitos

O sangue dos animais foi obtido por meio de punção da veia braquial esquerda, utilizando-se EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetraacético) como anticoagulante na concentração final de aproximadamente 0,3M.. Posteriormente, esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados com Panótipo para análise microscópica (MALINSKY, 2002).

3.7.2 Coleta de células do LCP para contagem de leucócitos

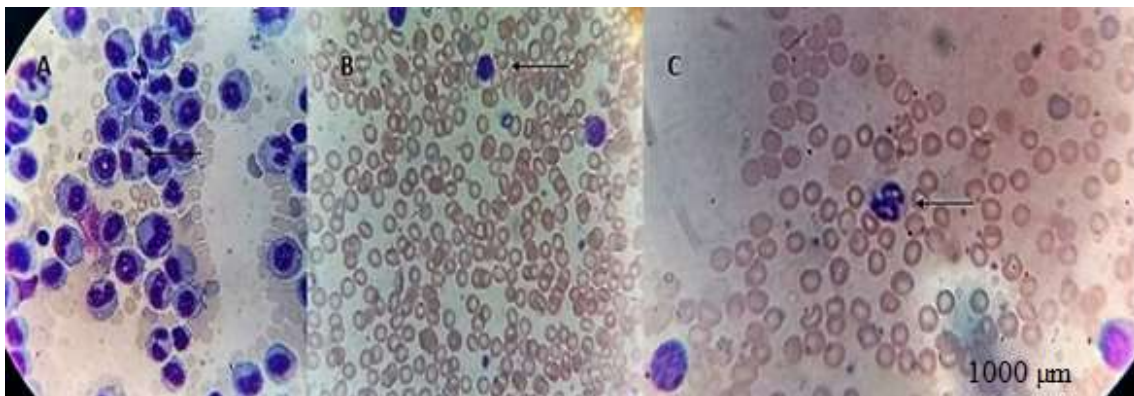
Para a coleta de LCP foi utilizada solução salina tamponada (PBS) contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), sendo empregado 3,0 mL no peritônio com o auxílio de agulhas 25x7mm. Posteriormente, lâminas com o tecido foram confeccionados e coradas com Panótico para análise microscópica (MALINSKY, 2002).

3.7.3 Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue e do LCP

A contagem global de células do sangue e do LCP foi realizada individualmente na câmara de Neubauer e às amostras foram adicionadas solução Turk (ácido acético 3% e azul de metileno 1%) na diluição de 1:20 (ROCHA, 2007).

Para a contagem diferencial (Eosinófilos, Neutrófilos e células Mononucleadas) foram confeccionadas lâminas de LCP preparadas na citocentrífuga e esfregaço de sangue, sendo ambas coradas com Panótico. Em cada lâmina foram contadas 100 células, com auxílio da microscopia de luz com aumento final de 1000 X, como podem ser vistos nas figuras 9 e 10. Os neutrófilos são células grandes com o núcleo bem corado e pode apresentar de 2 a 5 lóbulos. Outros mononucleados presentes foram os monócitos, linfócitos e basófilos. Os basófilos apresentam núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular. Os linfócitos apresentam núcleo arredondado. Já os monócitos apresentam dois tipos de núcleo, o riniforme e um achatado, ambos localizados na periferia da célula (FREIRE et al., 1995). Todos os tipos celulares são mostrados na figura 18.

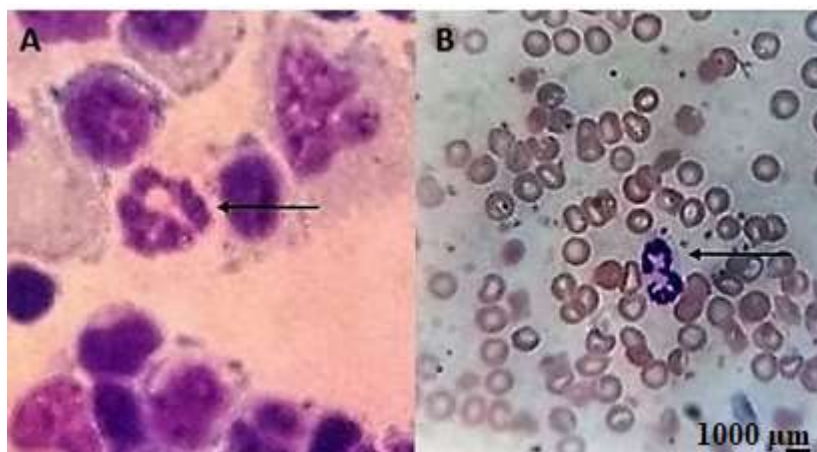
Figura 18. Leucócitos no LCP e no sangue.



Leucócitos totais no LCP (A) e no sangue (B e C). Em A há leucócitos totais no LCP, na seta está sendo indicado um neutrófilo. Em B e C há leucócitos no sangue. As setas indicam mononucleados e dois eosinófilos respectivamente. Aumento de 1000 vezes. Fonte: acervo pessoal.

A figura 19 mostra os eosinófilos no LCP (A) e no sangue (B). Os eosinófilos apresentam núcleo bilobado e a primeira característica para a sua identificação é a presença de granações ovoides que se coram pela eosina dando um aspecto avermelhado. O aumento do número de eosinófilos é indicativo de que o indivíduo provavelmente apresenta alguma infecção parasitária (verminose), algum tipo de doença alérgica ou asma (FREIRE et al., 1995).

Figura 19. Eosinófilos no LCP e no sangue.



A. Eosinófilo no LCP com aumento de 1000 vezes. B. Dois eosinófilos no sangue com aumento de 400 vezes. Fonte: acervo pessoal.

3.8 Avaliação da Carga Parasitária: Recuperação de vermes adultos

Para avaliar a eficácia das estratégias terapêuticas propostas, os vermes adultos foram recuperados dos camundongos através da perfusão do sistema porta e mesentério intestinal (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956). O grau de proteção será medido pela comparação entre o número de vermes recuperados em cada grupo experimental e seu respectivo controle (Sm), de acordo com a fórmula de DELGADO et al., 1992:

$$RCP = \frac{RGC - RGE}{RGC} \times 100$$

Em que RCP é a recuperação da carga parasitária, RGC é recuperação no grupo controle e RGE, recuperação no grupo experimental (FONSECA et al., 2004).

3.9 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

3.9.1 Obtenção do plasma dos animais

O plasma dos animais foi obtido após a centrifugação do sangue total, extraído por punção da veia braquial esquerda, em uma velocidade de 1500 rpm, por um período de 15 minutos. Posteriormente o plasma foi armazenado em uma temperatura de – 20°C para a realização da detecção de anticorpos e dosagem de citocinas.

3.9.2 Detecção de anticorpos – ELISA indireto

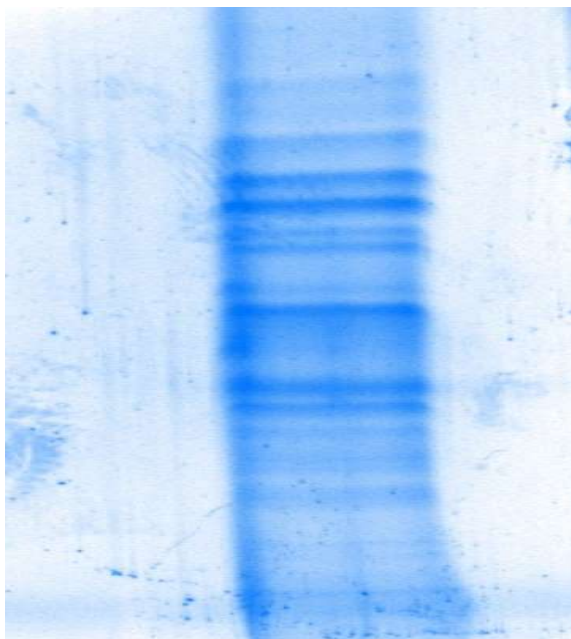
A partir do plasma total dos animais foi realizada a pesquisa de anticorpos por ELISA Indireto (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático), onde os antígenos fixados (enzimas analisadas) estimularam a ligação com os possíveis anticorpos presentes no plasma dos camundongos, que posteriormente foram detectados por conjugados específicos contra os possíveis anticorpos presentes neste plasma, sendo feita a detecção de anticorpos do tipo IgG2a (anti-Mouse IgG2a Antibody HRP Conjugated, Bethyl Laboratories, Inc.) e IgE (*Kit OptEIATM*, BD Biosciences), seguindo o protocolo abaixo descrito.

Foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços (*Corning® Costar 3590*) sendo aplicados 8 µg/poço da enzima analisada (HGPR, PNP e MIX) e também PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*), que corresponde ao antígeno, diluída em tampão carbonato 0,1 M - pH 9,5, totalizando 100 µL/poço, para

sensibilização das placas por 12 horas a 4°C. A quantidade de proteína aplicada por poço foi estabelecida mediante padronização anterior realizada em nosso laboratório. O extrato contendo as proteínas totais de *S. mansoni* (PTS) foi obtido a partir de cerca de 100 vermes adultos de *S. mansoni* (cepa BH), recuperados de camundongos Balb/c infectados, através da perfusão do sistema portahepático e veias mesentéricas.

A extração das proteínas foi realizada pelo tampão de extração (Tris-HCl, DTT e Glicerol). A amostra (vermes adultos) foi tratada com Inibidor de Protease (*Sigma*), sonicada e centrifugada e o pellet foi descartado. Posteriormente, a quantificação do extrato proteico (sobrenadante) foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Foi feito gel de poliacrilamida 15% (Figura 20) pela técnica SDS-Page para constatar a pureza da amostra.

Figura 20. Gel de proteínas totais de *S. mansoni*.



Fonte: Acervo pessoal.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300 µL/poço de PBS 1X + Tween 20 à 0,05%, pH 7,4 (solução de lavagem). Posteriormente à lavagem foram acrescentados 200 µL/poço de solução bloqueio (PBS 1X + BSA – *Bovine Serum Albumin*, Albumina de Soro Bovino 1%) e as placas foram incubadas por 1 hora. Após este período foi realizada, novamente, a lavagem das placas, por 5 vezes, com a solução de lavagem. Então foi realizada a aplicação das amostras nas placas, sendo aplicados

100 µL/poço do *pool* do plasma dos camundongos em quadruplicatas para os grupos Controle e em quintuplicatas para o grupo infectado/sem tratamento e os grupos imunizados HGPRT, PNP e MIX, sendo que o mesmo foi diluído em tampão carbonato, na proporção 1:10 e a placa foi incubada por 2 horas. A diluição das amostras foi estabelecida mediante padronização anterior também realizada em nosso laboratório.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes, com a solução de lavagem. Foi então preparado, ao abrigo de luz, o anticorpo secundário conjugado com enzima peroxidase diluindo-o em PBS 1X + BSA 1%, na proporção 1:10.000 para IgG2a e 1:500 para IgE, recomendada pelos respectivos fabricantes, e posteriormente foi aplicado 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos ao abrigo de luz.

Após este período, as placas foram lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB (3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, por 15 minutos aproximadamente, quando a solução passou a apresentar uma coloração azul mais forte. Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N. Finalmente, a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pela leitora de placas de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

3.9.3 Dosagem de citocinas – ELISA direto

Para a dosagem das citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ (*Kit* OptEIATM, BD Biosciences) e foi realizado o ELISA direto seguindo o protocolo abaixo descrito.

Para este procedimento também foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços. Inicialmente foi realizada a sensibilização das placas com 100 µL/poço de solução contendo 80 µL do anticorpo monoclonal anti-citocina em 20 µL do tampão específico: para IL-4 e IFN- γ , tampão carbonato 0,1 M - pH 9,5; para IL-10, tampão fosfato 0,2M - pH 6,5. As placas foram então incubadas por 12 horas a 4°C. Após este período foi realizada a lavagem das placas, por 3 vezes com 300 µL/poço de solução de lavagem descrita no item 3.9.2. Posteriormente à lavagem foram acrescentados 200 µL/poço de solução bloqueio (PBS 1X + BSA 1%) e as placas foram incubadas por 1 hora. Após este período foi realizada, novamente, a lavagem das placas, por 5 vezes, com a solução de lavagem. Então foi realizada a aplicação da curva e das amostras nas placas, sendo aplicados 100 µL/poço do *pool* do plasma dos

camundongos de cada grupo experimental em sextuplicatas e as placas foram incubadas por 2 horas.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes, com a solução de lavagem. Foi então preparado, ao abrigo de luz, o anticorpo secundário e a enzima de detecção, diluindo-o em PBS 1X + BSA 1% na proporção recomendada pelos respectivos *kits*, e posteriormente foi aplicado 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos ao abrigo de luz. Após este período, as placas foram lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, de 15 a 30 minutos aproximadamente.

Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N, e a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pela leitora de placas de ELISA, sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/mL.

3.10 Avaliação histológica do fígado

O fígado de dois camundongos por grupo experimental foi removido no 55º dia após a infecção, sendo padronizado o animal 1 e 2 de cada grupo antes da realização da eutanásia (2 experimentos independentes: n = 4), para avaliação do processo inflamatório e formação de granulomas além da observação de deposição de colágeno neste órgão.

Após a remoção, os órgãos foram lavados com PBS 1X e secos cuidadosamente em papel. Os mesmos foram então fixados em formol tamponado (4 g de NaH₂PO₄, 6,5 g de Na₂HPO₄, 100 mL de formol e 900 mL de água destilada).

A confecção das lâminas histológicas foi realizada pela técnica Ana Maria da Rocha do Laboratório de Citopatologia, no Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Garcia Soares, sendo que fragmentos de cada órgão foram incluídos em blocos de parafina e seccionados em cortes de 4 µm.

As lâminas foram coradas por dois tipos de colorações: Hematoxilina-Eosina (HE), para avaliação das células que compõem o tecido e também observação dos granulomas, e Tricômico de Gomori, para avaliação da deposição de colágeno.

A leitura das lâminas foi realizada pelo médico patologista responsável pelo laboratório, Prof. Dr. Edson Garcia Soares, sendo realizada a contagem de granulomas e

ovos presentes nos cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental.

Posteriormente, as lâminas foram escaneadas no *Pannoramic Desk*, da 3D Histech, que é um Equipamento Multi-Usuário (EMU) da FAPESP (2014/50256-4), localizado no Laboratório de Imunologia Aplicada, no Departamento de Genética e Evolução – DGE, da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra. As imagens foram feitas no programa *Pannoramic Viewer* 1.15.4, também da 3D Histech.

3.11 Análise estatística

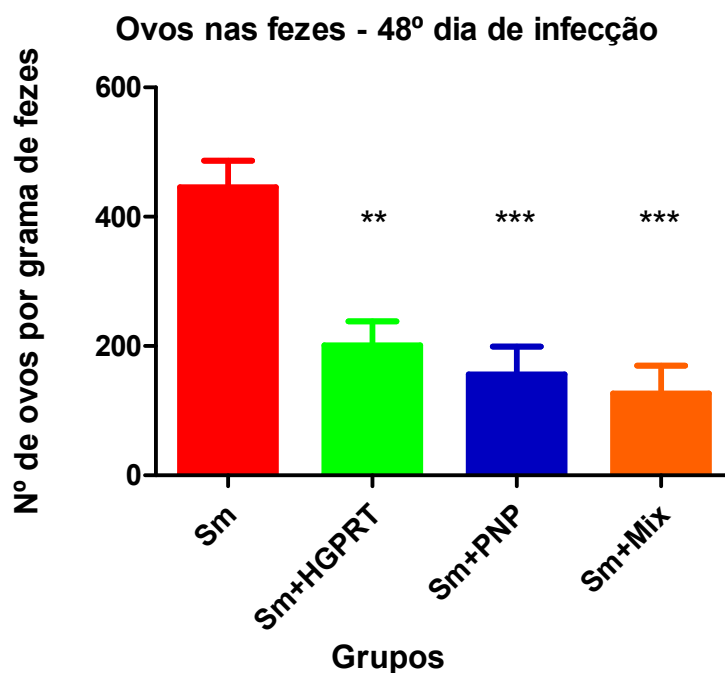
Os resultados foram expressos com média \pm EPM e analisados no programa *GraphPad Prism*, versão 5.01 – 2005 (San Diego, Califórnia, USA). Foi aplicado, para todos os dados obtidos, o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov E *One-Way* RM ANOVA para verificar a natureza paramétrica ou não paramétrica dos mesmos. Posteriormente, para os dados paramétricos foi aplicado o teste *One-way* ANOVA (*One-way Analysis of Variance*) e o pós-teste foi realizado pelo método de Tukey (*Tukey's Multiple Comparison Test*). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste foi realizado pelo método de *Dunn's* (*Dunn's Multiple Comparison Test*). A significância estatística estabelecida é em valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Contagem de ovos nas fezes

A figura 21 mostra a contagem de ovos nas fezes no 48º dia de infecção dos animais dos grupos infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX). Observa-se que nos 3 grupos experimentais infectados e tratados com as enzimas recombinantes (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) houve uma redução significativa no número de ovos após o tratamento. Os grupos Sm+HGPRT e Sm+MIX foram o que apresentaram uma redução maior.

Figura 21. Número de ovos por grama de fezes no 48º dia após a infecção.



Contagem de ovos nas fezes no 48º dia após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo **($p < 0,01$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm=HGPRT) quando comparado com o grupo infectado e sem tratamento (Sm). O símbolo ***($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos infectados e tratados com as enzimas PNP (Sm+PNP) e MIX (Sm+MIX) quando comparado com o grupo infectado e sem tratamento (Sm).

Na tabela 4, estão as médias \pm EPM do número de ovos por grama de fezes dos animais dos grupos infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 48º dia de infecção, bem como suas

respectivas porcentagens (%) de redução de ovos nas fezes calculada segundo Delgado et al., 1992. No grupo Sm+HGPRT houve uma redução de 54.9% quando comparado ao grupo Sm. O grupo Sm+PNP apresentou redução de 64.9% quando comparado ao grupo Sm. O grupo Sm+MIX apresentou redução de 71.5% quando comparado ao grupo Sm.

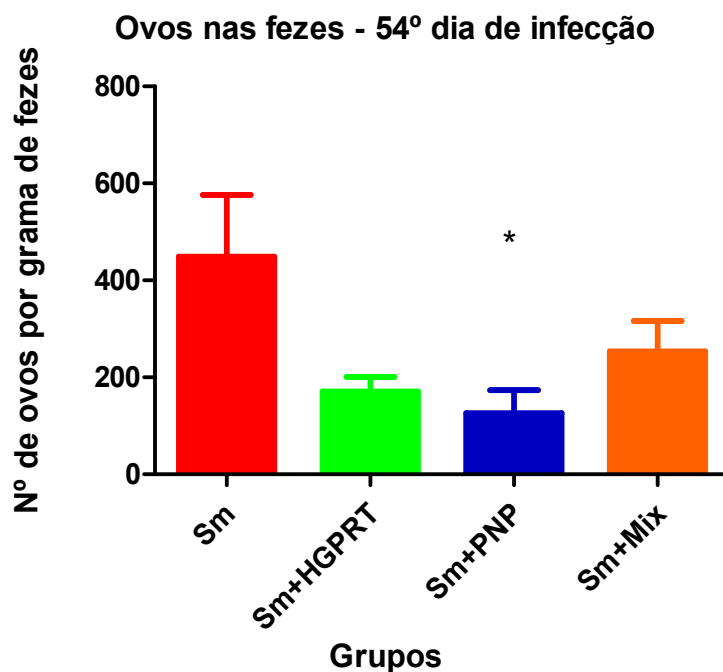
Tabela 4. Número de ovos por grama de fezes dos animais e porcentagem de redução de ovos no 48º dia após a infecção.

Grupos experimentais	Ovos/grama de fezes	Redução (%)
Sm	445.7	-
Sm+HGPRT	201	54,9
Sm+PNP	156	64,9
Sm+MIX	126,8	71,5

Os valores apresentam média \pm EPM. Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 22 mostra a contagem de ovos nas fezes no 54º dia dos animais nos grupos infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX). Houve redução do número de ovos nas fezes nos grupos experimentais após tratamento utilizando as enzimas recombinantes HGPRT, PNP e MIX de *S. mansoni* quando comparado ao grupo Sm. Observa-se que no grupo Sm+PNP houve uma redução significativa no número de ovos quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm).

Figura 22. Número de ovos por grama de fezes no 54º dia após a infecção.



Contagem de ovos nas fezes no 54º dia após a infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado com o grupo infectado e sem tratamento (Sm).

Na tabela 5 estão as médias do número de ovos por grama de fezes dos animais dos grupos infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 54º dia de infecção, bem como suas respectivas porcentagens (%) de redução de ovos nas fezes (DELGADO et al., 1992). Os 3 grupos tratados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* apresentaram redução quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento. O grupo tratado com a enzima HGPRT apresentou redução de 63.8%. O grupo tratado com a enzima PNP apresentou a maior redução de 73.36%. O grupo tratado com o MIX de enzimas apresentou redução de 46.37%.

Tabela 5. Número de ovos por grama de fezes dos animais e porcentagem de redução de ovos no 48º dia após a infecção.

Grupos experimentais	Ovos/grama de fezes	Redução (%)
Sm	473,1	-
Sm+HGPRT	171	63,8
Sm+PNP	126	73,36
Sm+MIX	253,7	46,37

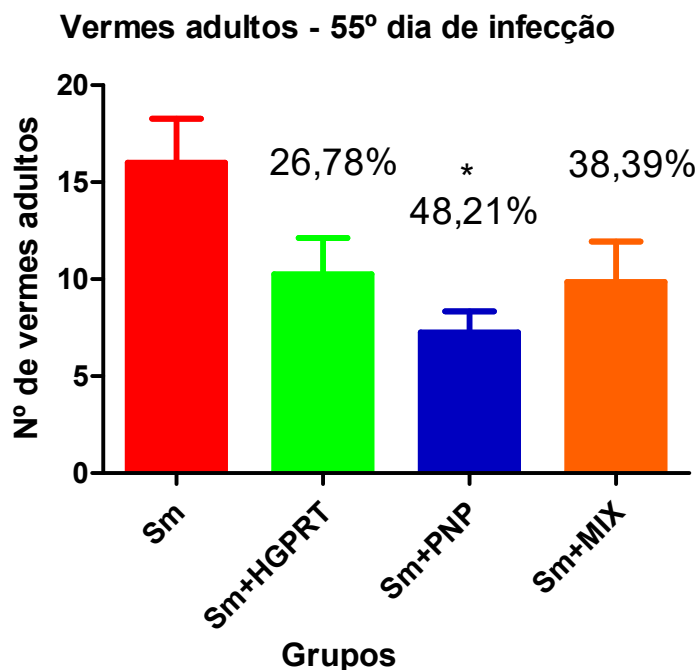
Os valores apresentam média \pm EPM.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Avaliação da carga parasitária: recuperação de vermes adultos

A figura 23 mostra a quantidade de vermes adultos recuperados na veia porta do fígado e no mesentério intestinal dos animais nos grupos infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. Os dados demonstram que houve uma redução de 26,78% no grupo tratado com a enzima HGPRT, uma redução significativa de 48,21 % no grupo tratado com a enzima PNP e uma redução de 38,39% no grupo tratado com MIX de enzimas.

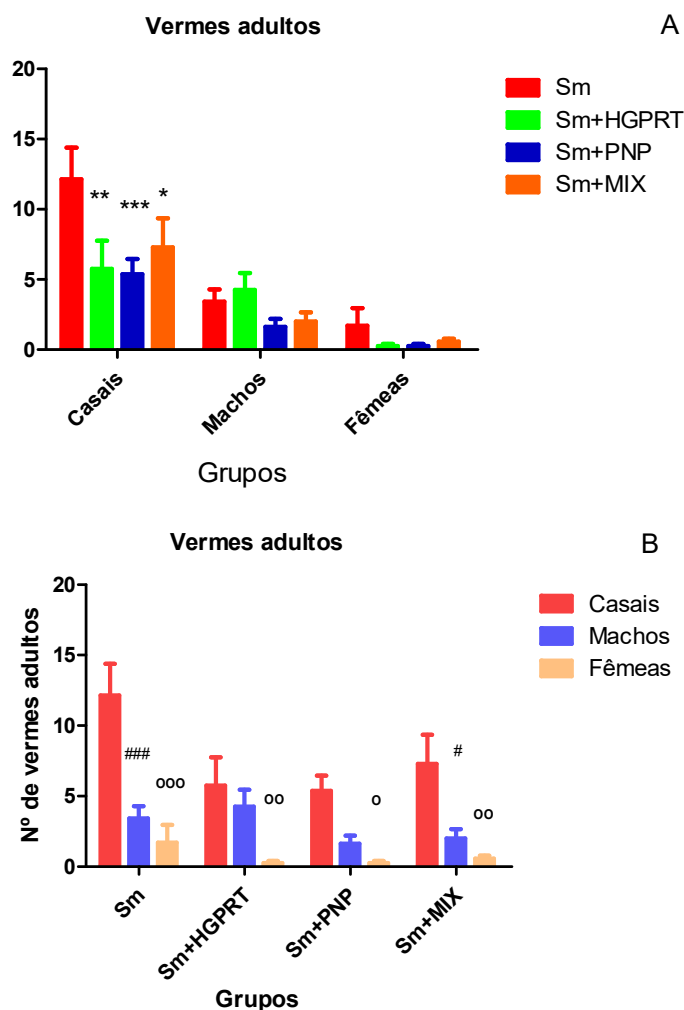
Figura 23. Número de vermes adultos recuperados na veia porta do fígado e no mesentério intestinal.



Recuperação de vermes adultos na veia porta do fígado e mesentério intestinal. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8).

A figura 24 mostra a recuperação de vermes adultos acasalados e separados em machos e fêmeas na veia porta do fígado e no mesentério dos animais nos grupos infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) sob 2 análises: A. Distribuição entre casais, machos e fêmeas entre os grupos; B. Distribuição de casais, machos e fêmeas em cada grupo. Em ambos os casos o número de casais supera com grande significância o número de machos e fêmeas separados. Quando comparado os grupos infectados e tratados com as enzimas (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) com o grupo infectado sem tratamento (Sm), observa-se um menor número de fêmeas.

Figura 24. Número de vermes adultos acasalados e separados em fêmeas e machos recuperados nos grupos Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX.



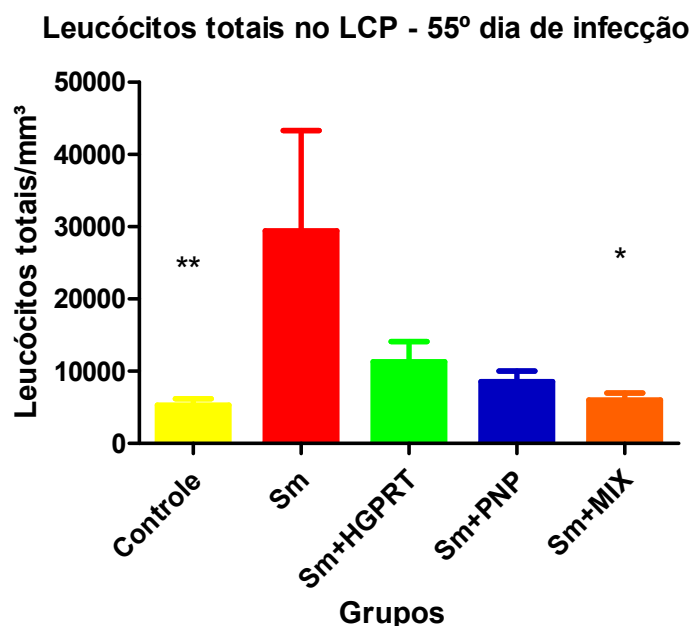
Recuperação de vermes adultos acasalados e separados, fêmeas e machos na veia porta do fígado e mesentério intestinal. A Distribuição entre casais, machos e fêmeas entre os grupos; B. Distribuição de casais, machos e fêmeas em cada grupo Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre casais nos grupos Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX quando comparados com o grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo ** ($p < 0,01$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre casais nos grupos Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX quando comparados com o grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo *** ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre casais nos grupos Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX quando comparados com o grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo ° ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre fêmeas quando comparados a casais. O símbolo °° ($p < 0,01$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre fêmeas quando comparados a casais. O símbolo °°° ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre fêmeas quando comparados a casais. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre machos quando comparados a casais. O símbolo ### ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre machos quando comparados a casais.

4.3. Avaliação da resposta leucocitária

4.3.1 Avaliação de leucócitos totais no LCP e sangue

A figura 25 mostra a contagem total de leucócitos no LCP nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. Foi observada uma redução nos grupos controle e tratados com as enzimas (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Essa redução foi significativa nos animais do grupo Controle e Sm+MIX quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Isso comprova que a infecção foi efetiva, uma vez que houve um número maior de leucócitos nos animais no grupo infectado sem tratamento (Sm) e quando os animais receberam o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* os leucócitos apresentaram redução. O grupo tratado com o MIX de enzimas foi o único que apresentou diferença significativa.

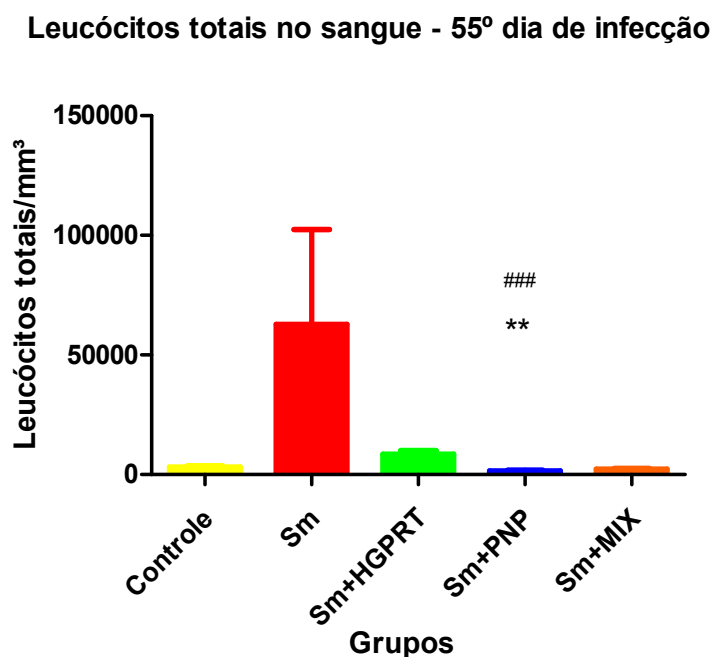
Figura 25. Número de leucócitos totais no LCP.



Contagem de leucócitos totais no LCP. Leucócitos totais/mm³ no LCP. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo *(p<0,05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com o Mix de enzimas (Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo ** (p<0,01) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo Controle quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm).

A Figura 26 mostra a contagem total de leucócitos no sangue nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55° dia de infecção. Foi observada uma redução nos grupos controle e infectados e tratados com as enzimas (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Houve uma redução significativa dessas células nos animais do grupo infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparada aos grupos infectado sem tratamento (Sm) e ao grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

Figura 26. Número de leucócitos totais no sangue.

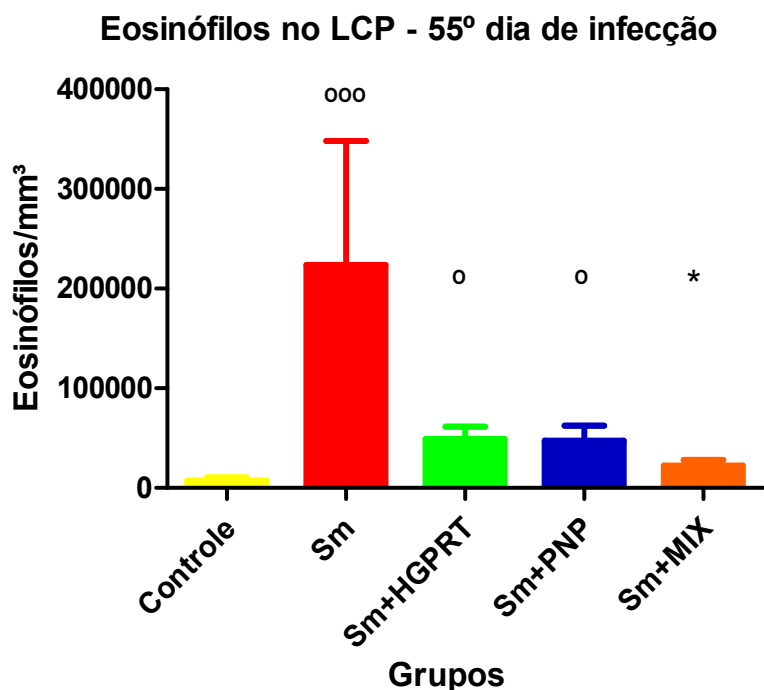


Contagem de leucócitos totais no sangue. Leucócitos totais/mm³ no sangue. Os dados representam a média ± EPM (n= 7-8). O símbolo ** (p<0,01) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo ### (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

4.3.2 Avaliação de eosinófilos no LCP e no sangue

A figura 27 mostra a quantidade de eosinófilos no LCP nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. O tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* modulou negativamente o recrutamento de eosinófilos no LCP nos animais dos grupos experimentais (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm). Os grupos Sm, Sm+HGPRT e Sm+PNP mostraram diferenças significativas quando comparados ao grupo Controle. Já o grupo tratado com os MIX das proteínas (Sm+MIX) mostrou diferença significativa e diminuição quando comparado os dados obtidos no grupo infectado e sem tratamento (Sm).

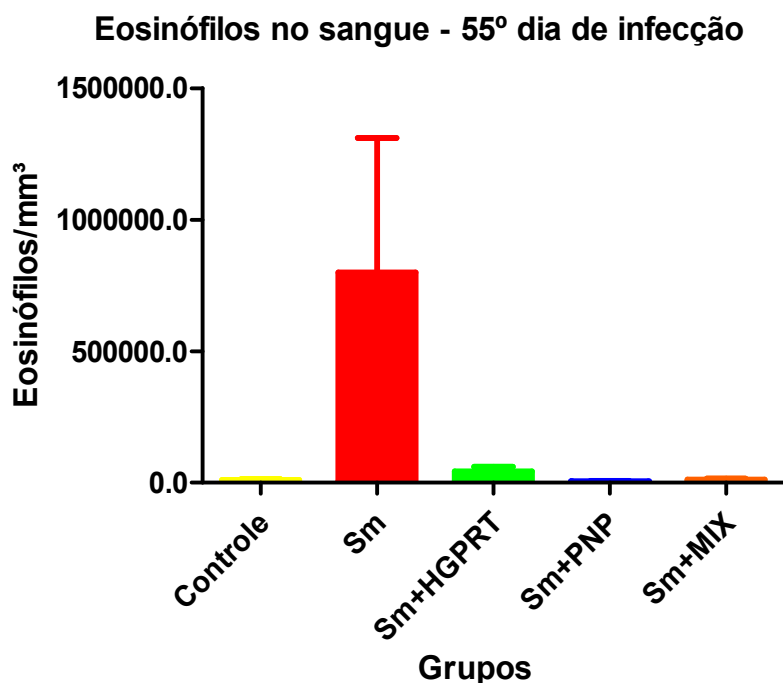
Figura 27. Número de eosinófilos no LCP.



Contagem diferencial de eosinófilos no LCP. Eosinófilos/mm³ no LCP. Os dados representam a média ± EPM (n= 7-8). O símbolo ° (p<0,05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre os grupos Sm+HGPRT e Sm+PNP quando comparado ao grupo Controle. O símbolo °°° (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre o grupo infectado sem tratamento (Sm) quando comparado ao grupo Controle. O símbolo * (p<0,05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre o grupo Sm+MIX quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm).

A figura 28 mostra a quantidade de eosinófilos no sangue nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. O tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* também modulou negativamente, embora não haja diferenças significativas, o número de eosinófilos no sangue dos animais tratados com as enzimas (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm) foi menor.

Figura 28. Número de eosinófilos no sangue.

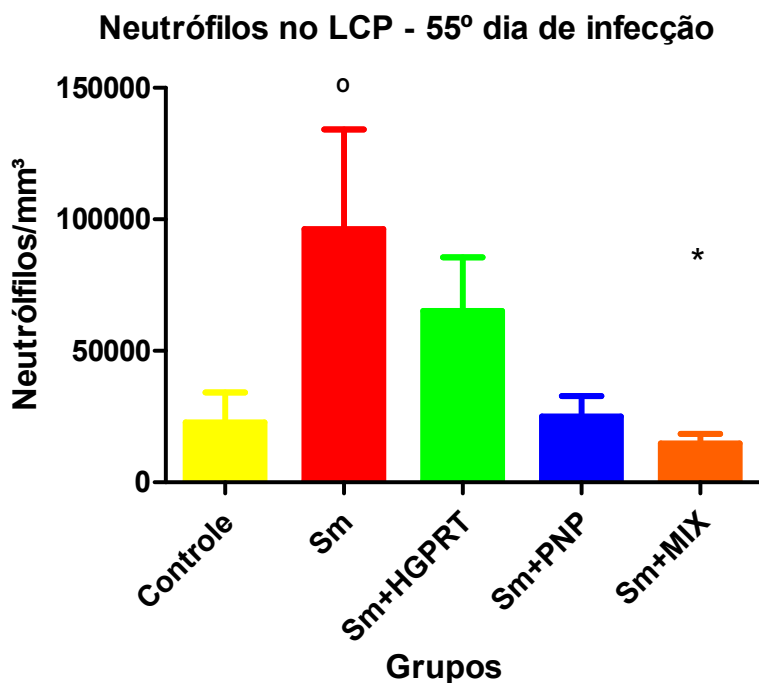


Contagem diferencial de eosinófilos no sangue. Eosinófilos/mm³ no sangue. Os dados representam a média ± EPM (n= 7-8).

4.3.3 Avaliação de neutrófilos no LCP e no sangue

A figura 29 mostra a quantidade de neutrófilos no LCP nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. O tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* modulou negativamente o número de neutrófilos no LCP dos animais dos grupos experimentais (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Essa diminuição no número de neutrófilos foi significativa no grupo infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Já a quantidade de neutrófilos no grupo infectado sem tratamento (Sm) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle.

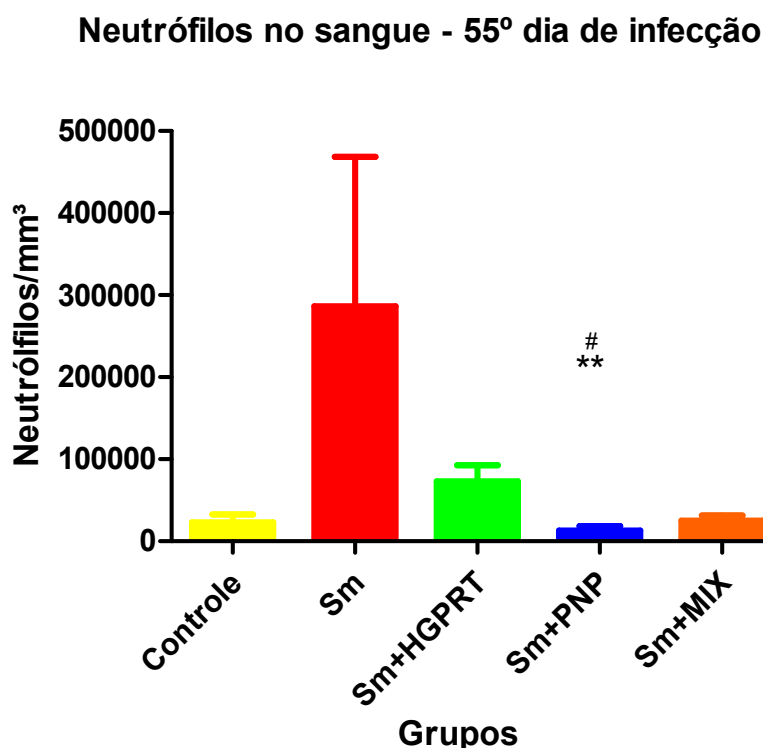
Figura 29. Número de neutrófilos no LCP.



Contagem diferencial de neutrófilos no sangue. Neutrófilos/mm³ no sangue. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo ° ($p < 0,05$) representa diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado sem tratamento (Sm) quando comparado ao grupo controle. O símbolo * ($p < 0,05$) representa diferença significativa entre o resultado obtido no grupo Sm+MIX quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm).

A figura 30 mostra a quantidade de neutrófilos no sangue nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. O tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* modulou negativamente o recrutamento de neutrófilos no sangue nos animais dos grupos experimentais (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX). Essa diminuição do número de neutrófilos no sangue foi significativa no grupo tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm). Esse grupo também apresentou uma diminuição significativa no número de neutrófilos quando comparado ao grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

Figura 30. Número de neutrófilos no sangue.

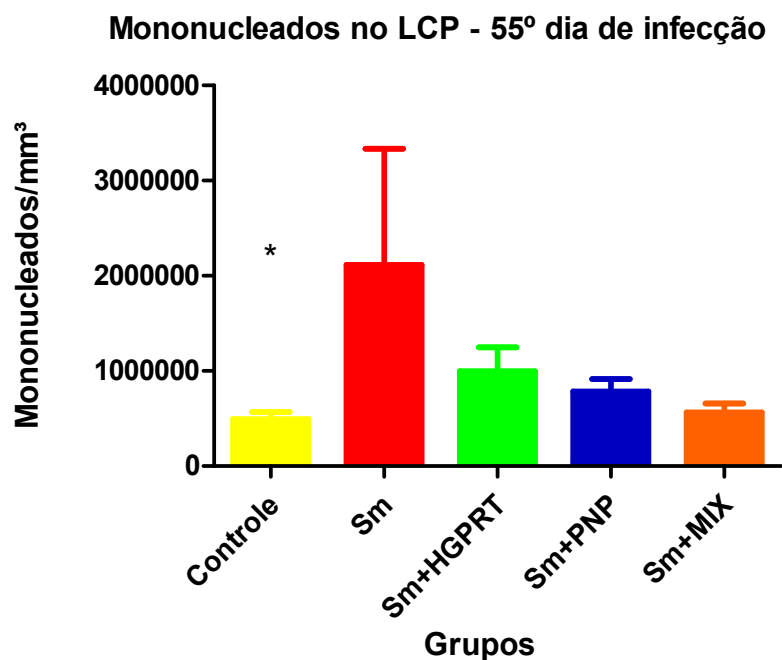


Contagem de neutrófilos no sangue. Neutrófilos/mm³ no sangue. Os dados representam a média ± EPM (n= 7-8). O símbolo ** (p<0,01) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo # (p<0,05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

4.3.4 Avaliação de leucócitos mononucleados no LCP e no sangue

A figura 31 mostra a quantidade de leucócitos mononucleados (linfócitos, macrófagos, basófilos e mastócitos) no LCP nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. O tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* HGPRT, PNP e MIX diminuiu o número de mononucleados nessa cavidade. Essa diminuição foi significativa somente no grupo controle quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm).

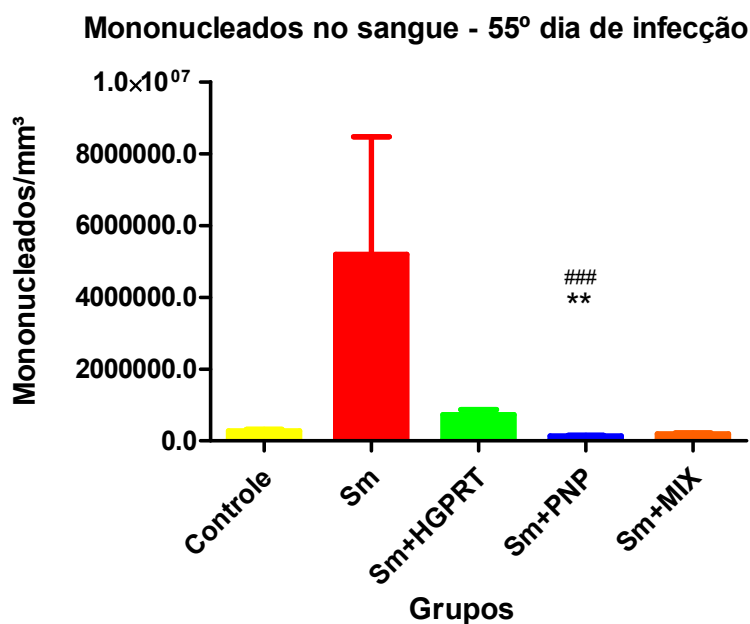
Figura 31. Número de mononucleados no LCP.



Contagem de mononucleados no LCP. Mononucleados/mm³ no LCP. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo *(p<0,05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo controle quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm).

A figura 32 mostra a quantidade de leucócitos mononucleados no sangue nos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPR), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. O tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* HGPR, PNP e MIX diminuiu o número de mononucleados no tecido sanguíneo. Essa diminuição foi significativa somente no infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm) e quando comparado ao grupo infectado e tratado com a enzima HGPR (Sm+HGPR).

Figura 32. Número de mononucleados no sangue.



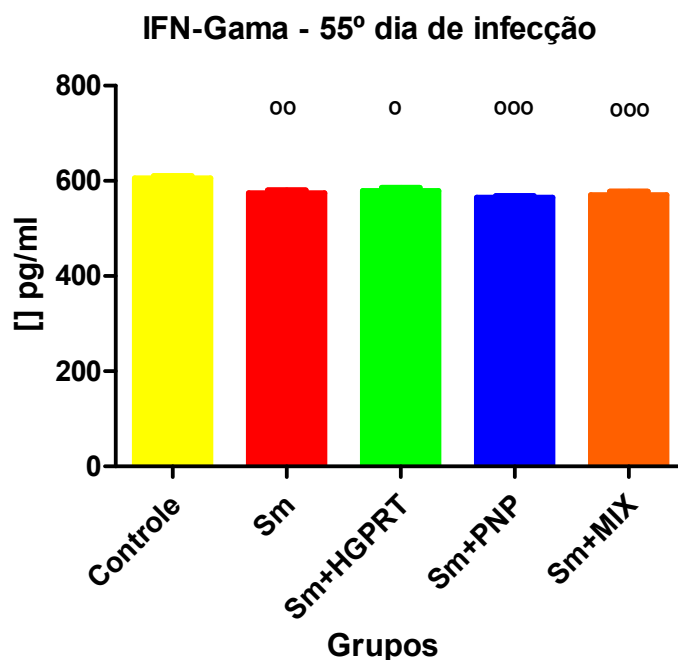
Contagem de mononucleados no sangue. Mononucleados/mm³ no sangue. Os dados representam a média \pm EPM (n= 7-8). O símbolo **($p < 0,01$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (Sm). O símbolo ### ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

4.4 Avaliação da dosagem de citocinas

4.4.1 Determinação dos níveis de IFN- γ

Na Figura 33 estão representadas as concentrações da citocina IFN- γ , em pg/mL, presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HRPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. É possível observar que uma discreta diminuição na concentração de IFN- γ no plasma dos animais do grupo infectado e sem tratamento e dos grupos experimentais, quando comparado ao grupo controle. Entre os grupos experimentais o grupo tratado com a HGPRT foi o que apresentou maior concentração de IFN- γ .

Figura 33. Dosagem da citocina IFN- γ no plasma.

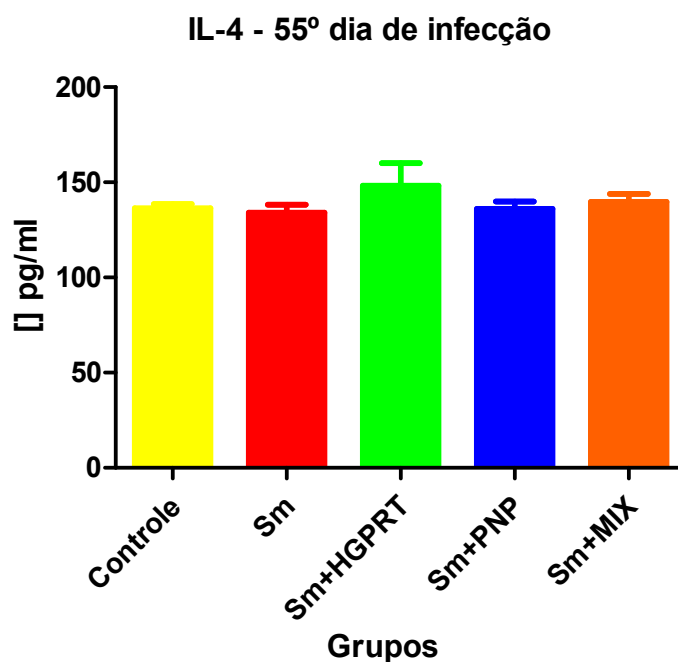


Concentrações da citocina IFN- γ , em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média \pm EPM (n = 7-8). Os símbolos ° (p<0.05), °° (p<0.01) e °°° (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX quando comparados ao grupo controle.

4.4.2 Determinação dos níveis de IL-4

Na figura 34 estão as concentrações da citocina IL-4 no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção. Observa-se que nos 3 grupos experimentais (Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX) houve um ligeiro aumento nas concentrações de IL-4, quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Já no grupo infectado sem tratamento houve uma discreta diminuição das concentrações de IL-4 no *pool* do plasma quando comparados aos dados obtidos no grupo Controle.

Figura 34. Dosagem da citocina IL-4 no plasma.

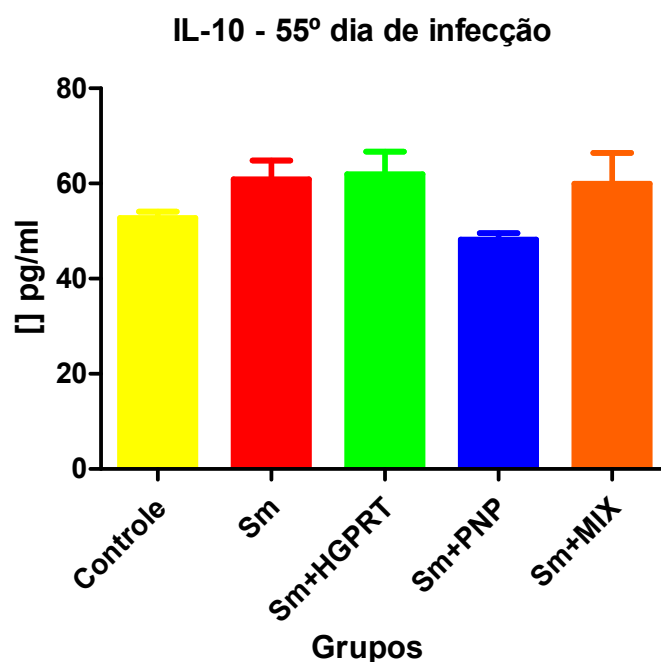


Concentrações da citocina IL-4, em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média \pm EPM (n = 7-8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

4.4.3 Determinação dos níveis de IL-10

Na figura 35 estão as concentrações da citocina IL-10 no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55° dia de infecção. Observa-se um aumento das concentrações de IL-10 no *pool* do plasma no grupo infectado sem tratamento quando comparado ao grupo Controle. Já as concentrações de IL-10 no *pool* do plasma nos grupos tratados com PNP (Sm+PNP) e com o MIX de enzimas (Sm+MIX) mostraram uma redução nas concentrações de IL-10 quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Já no grupo Sm+HGPRT houve um aumento das concentrações de IL-10 no *pool* do plasma quando comparada aos dados obtidos no grupo infectado e sem tratamento (Sm).

Figura 35. Dosagem da citocina IL-10 no plasma.



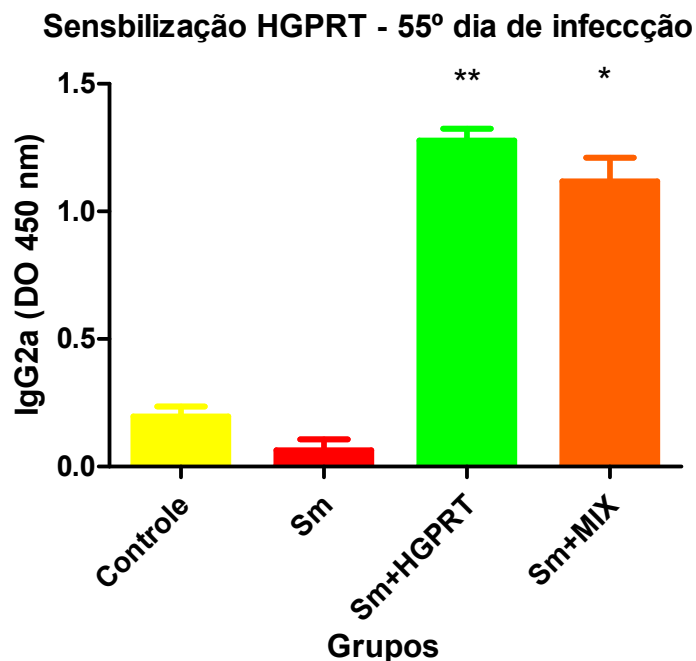
Concentrações da citocina IL-10, em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 7-8$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

4.5 Avaliação de anticorpos

4.5.1 Avaliação de anticorpos IgG2a

Na figura 36 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55° dia de infecção após a sensibilização da placa com a enzima recombinantes HGPRT de *S. mansoni*. Observa-se que no grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT e no grupo infectado e tratado com o MIX de enzimas apresentaram aumento significativa na produção de anticorpos IgG2a quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento.

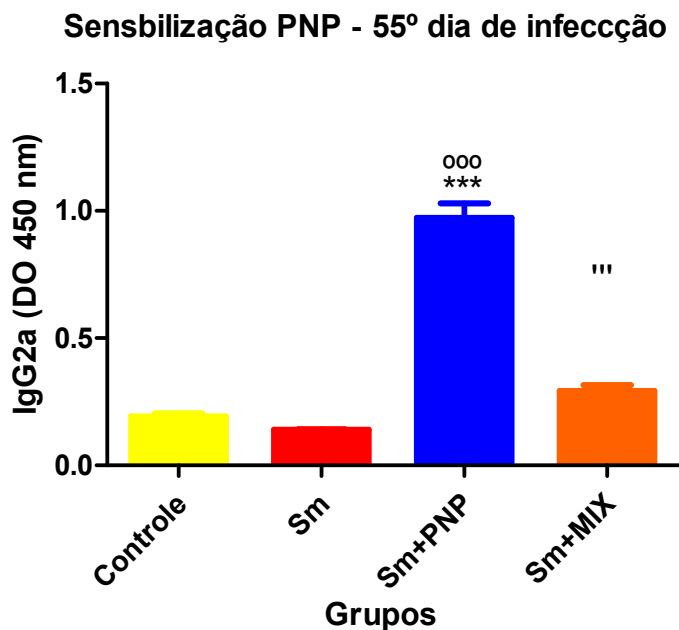
Figura 36. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT.



Detecção de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com a enzima HGPRT. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). O símbolo * ($p < 0,5$) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). O símbolo ** ($p < 0,01$) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com a HGPRT (Sm+HGPRT) quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm).

Na figura 37 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção após a sensibilização da placa com a enzima recombinantes PNP de *S. mansoni*. Observa-se que no grupo infectado e tratado com a enzima PNP houve aumento significativo na produção de anticorpos IgG2a quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento e ao grupo controle. O grupo infectado e tratado com o MIX de enzimas mostrou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo infectado e tratado com a PNP.

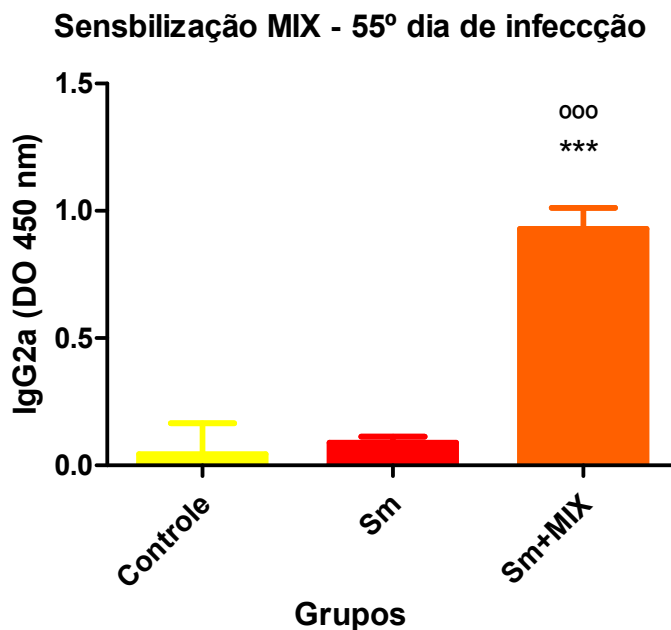
Figura 37. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização pela enzima recombinante PNP.



Detecção de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com a enzima PNP. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). O símbolo *** (p<0,001) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com a PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). O símbolo °°° (p<0,001) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com a PNP (Sm+PNP) quando comparado ao controle. O símbolo ''' (p<0,001) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado e tratado com a PNP (Sm+PNP).

Na figura 38 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55° dia de infecção após a sensibilização da placa com o MIX de enzimas recombinantes de *S. mansoni*. Observa-se que o grupo infectado e tratado com o MIX mostrou aumento significativo na produção de anticorpos IgG2a quando comparado o resultado obtido nos grupos controle e infectado e sem tratamento.

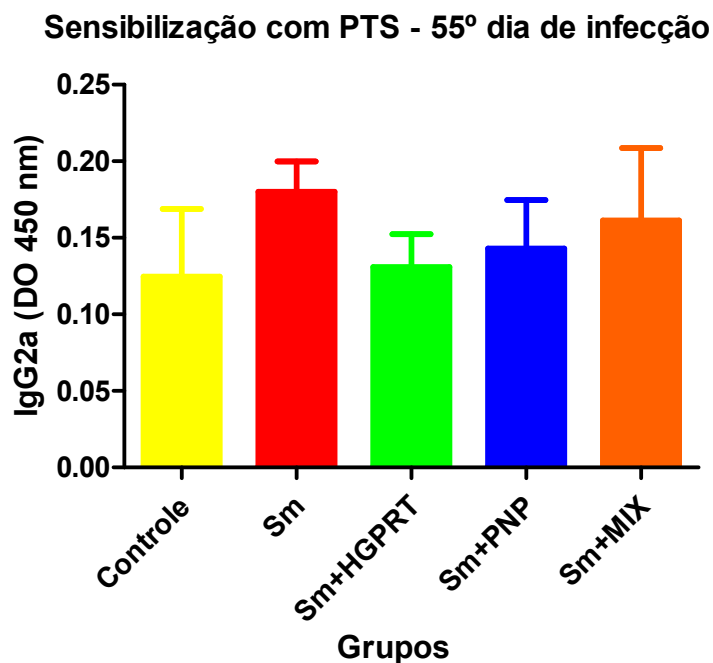
Figura 38. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes.



Detecção de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com o MIX de enzimas. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). O símbolo *** (p<0,001) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com o MIX (Sm+MIX) quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). O símbolo ooo (p<0,001) representa a diferença obtida no resultado do grupo infectado e tratado com o MIX (Sm+MIX) quando comparado ao controle.

Na figura 39 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção após a sensibilização da placa com proteínas totais de *S. mansoni* (PTS). Observa-se que, embora não haja diferença significativa entre os grupos, os três grupos experimentais que foram infectados e tratados apresentaram menor quantidade de IgG2a quando comparado aos grupos Controle e infectado e sem tratamento.

Figura 39. Detecção de anticorpos IgG2a após a sensibilização com PTS.

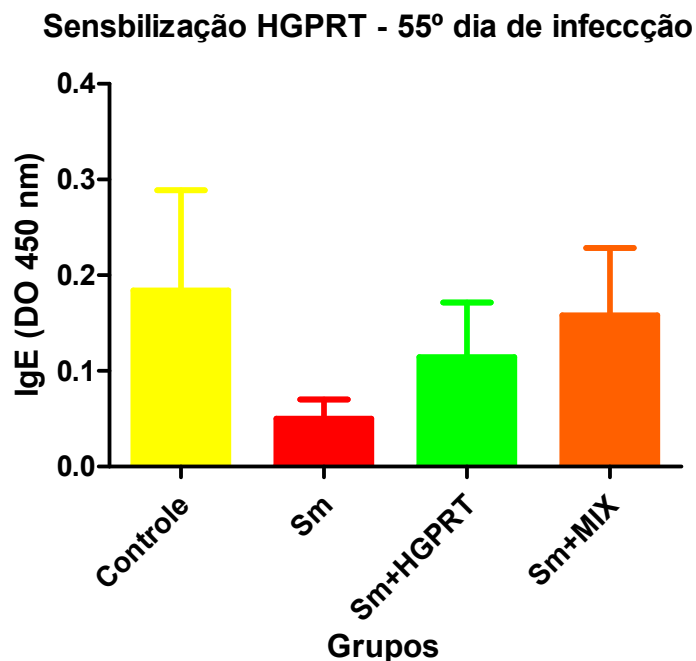


Detecção de anticorpos IgG2a no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8 μ g/poço com PTS. Os dados representam média \pm EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.5.2 Avaliação dos anticorpos IgE

Na figura 40 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55° dia de infecção após a sensibilização da placa com a enzima HGPRT. Embora não tenha diferença significativa entre os grupos, o grupo infectado e sem tratamento apresenta um número menor de IgE quando comparado aos outros grupos. Os grupos infectados e tratados com a HGPRT e com o MIX apresentam maior produção de IgE quando comparado ao grupo Sm, mas também apresenta uma quantidade menor de IgE quando comparado ao grupo controle.

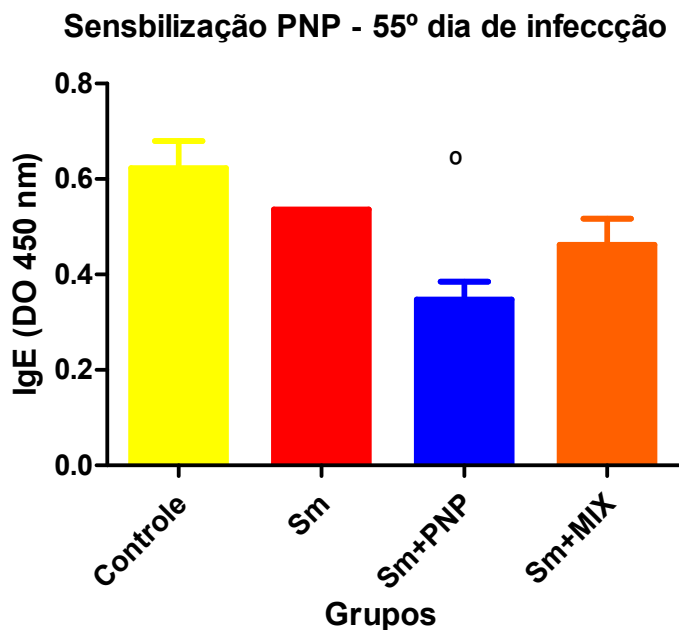
Figura 40. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT.



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com a enzima HGPRT. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Na figura 41 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção após a sensibilização da placa com a enzima PNP. O grupo infectado e tratado com a PNP apresentou menor redução na produção de IgE quando comparado aos demais grupos e essa diferença foi significativa quando comparado ao grupo Controle. O grupo infectado e sem tratamento e o grupo infectado e tratado com o MIX apresentaram menor produção de IgE quando comparado ao grupo Controle.

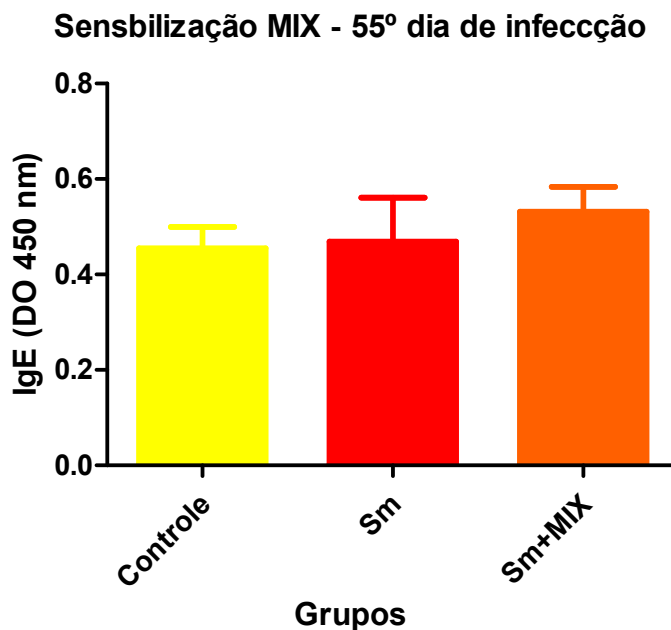
Figura 41. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante PNP.



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com a enzima PNP. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). O símbolo ° (p,0,5) representa a diferença no resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao resultado obtido no grupo Controle.

Na figura 42 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55° dia de infecção após a sensibilização da placa com o MIX de enzimas. Observa-se que não houve aumento significativo entre os grupos, somente um aumento discreto de produção de IgE no grupo tratado com o MIX de enzimas.

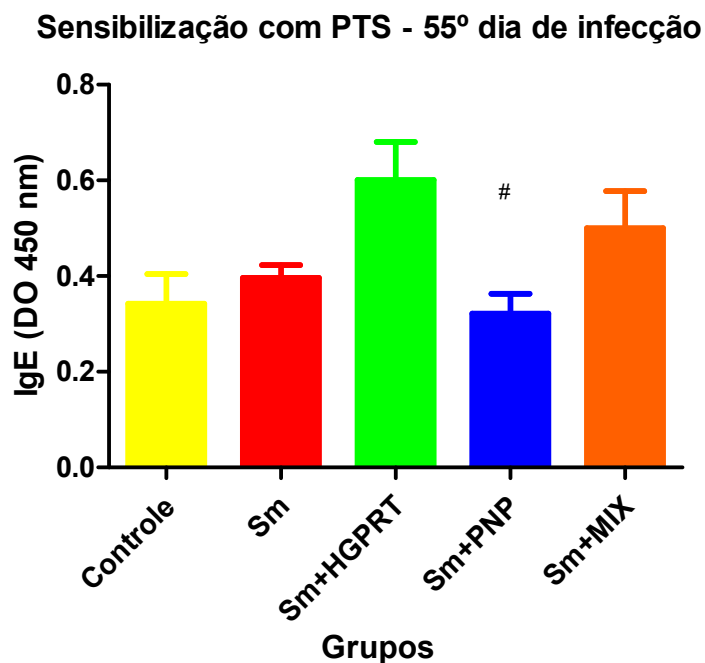
Figura 42. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes.



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com o MIX de enzimas. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Na figura 43 estão as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais dos grupos controle, infectado e sem tratamento (Sm), infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT), infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) e infectado e tratado com o MIX de enzimas (Sm+MIX) no 55º dia de infecção após a sensibilização da placa com proteínas totais de *S. mansoni* (PTS). É possível notar que no grupo infectado e tratado com a PNP houve uma redução significativa na produção de IgE quando comparado ao grupo infectado e tratado com a HGPRT. Já os grupos infectados e tratados com a HGPRT e com o MIX mostraram aumento na produção de IgE quando comparado aos demais grupos.

Figura 43. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização com PTS.



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais em cada grupo experimental após sensibilização da placa com 8µg/poço com PTS. Os dados representam média ±EPM de dois experimentos independentes (n=7-8). O símbolo # representa a diferença no resultado obtido no grupo infectado e tratado com a PNP (Sm+PNP) quando comparado ao resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

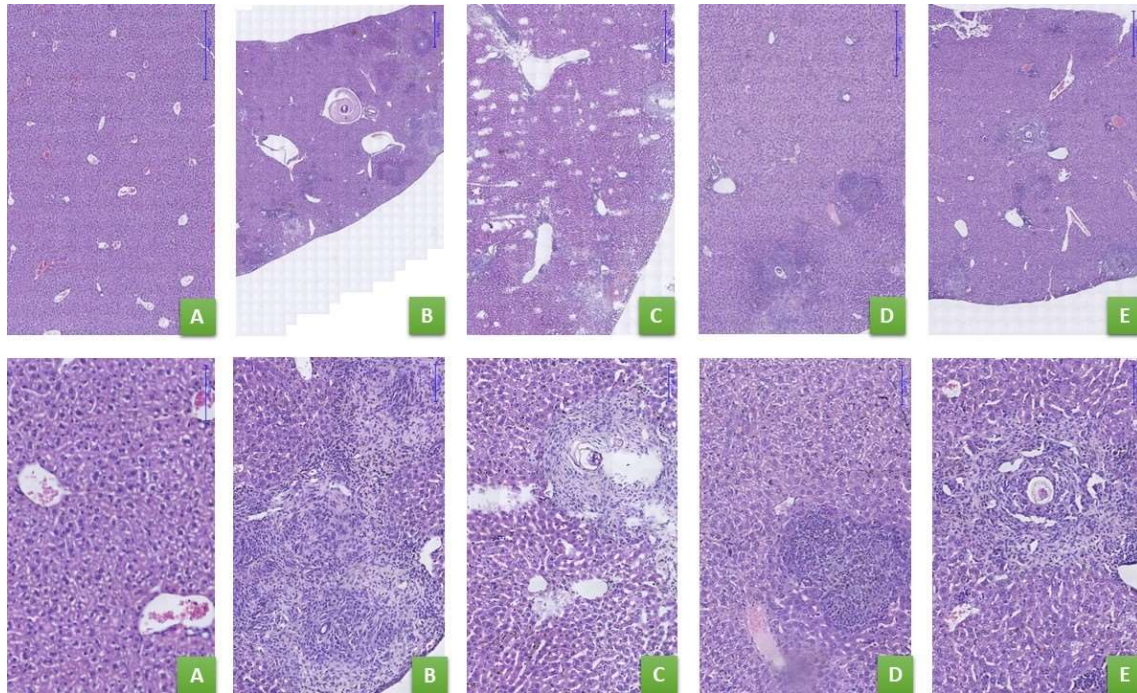
4.6 Avaliação histológica do fígado

As fotomicrografias de cortes de fígado dos animais dos grupos Controle, infectado e não tratado (Sm) e dos grupos infectados e tratados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* HGPRT, PNP e MIX (HGPRT+PNP) no 55º dia de infecção, estão mostradas nas Figuras 44, 45 e 46. Nas Figuras 44 e 45 os cortes de fígado dos animais foram corados com HE a fim de avaliar as células que compõem o tecido e a observação dos granulomas. Na Figura 46 os cortes de fígado dos animais foram corados com Tricrômico de Gomori, para avaliação da deposição de colágeno.

É possível observar na Figura 44 que os animais do grupo controle – não imunizado e não infectado - (Figura 44A) apresentam o tecido hepático preservado e sem a presença de granulomas ou ovos, e nos animais do grupo infectado e não tratado – Sm - (Figura 44B) e também dos grupos tratado com HGPRT, PNP e MIX (Figuras 44C, 44D e 44E), há a formação de granuloma periovular, com infiltrado celular misto e fibrose dos vasos. No grupo infectado sem tratamento há infiltrado inflamatório misto

com inflamação densa, infiltrados de linfócitos, macrófagos e células gigantes, ovos vivos e larvas degeneradas. No grupo tratado com a HGPRT há presença de ovos mais destruídos. No grupo tratado com a PNP há mais presença de granulomas e larvas muito destruídas quando comparado ao grupo Sm+HGPRT. Já no grupo Sm+MIX os granulomas estão bem estruturados e os ovos e larvas bem preservados.

Figura 44. Fotomicrografias de cortes de fígado no 55º dia após a infecção - HE.

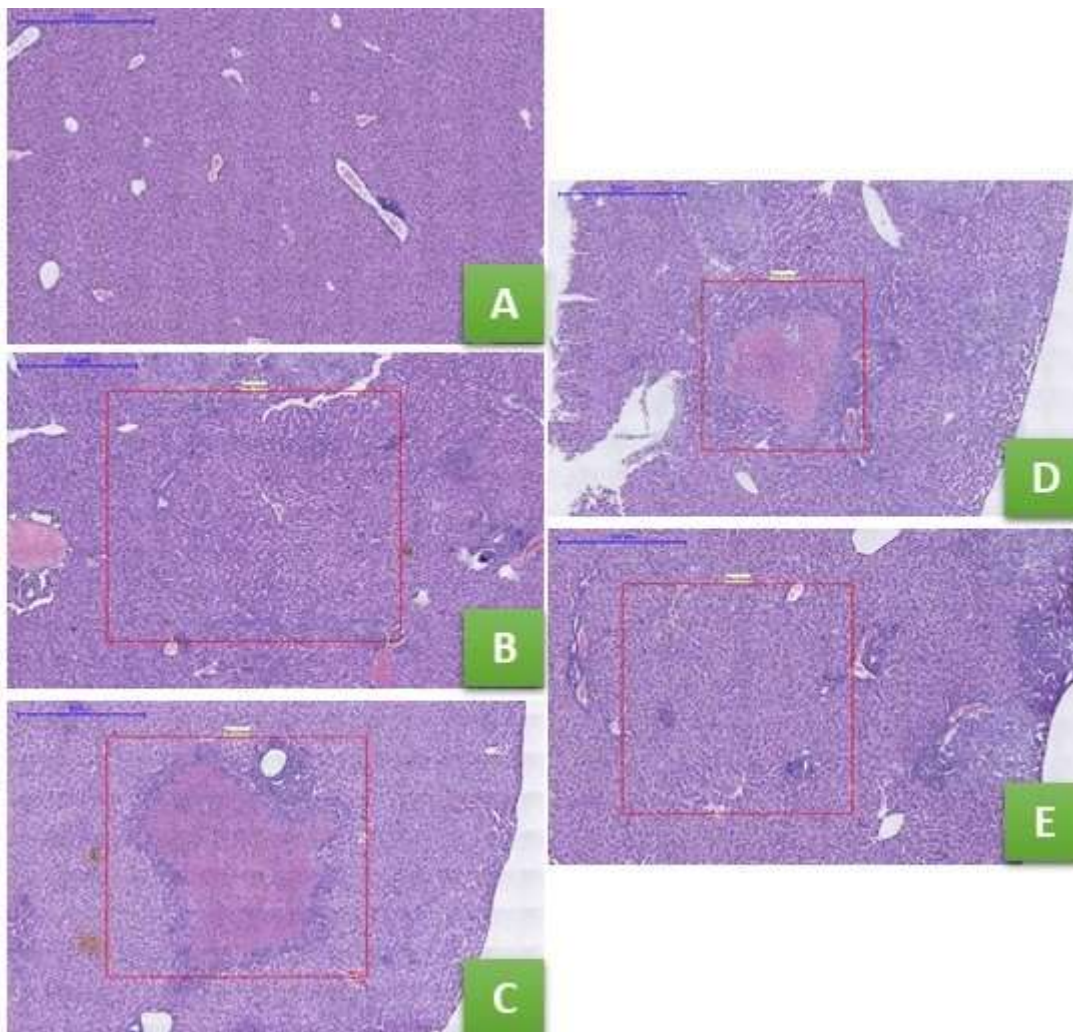


Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: controle (44A), infectado e não tratado (44B), infectado e tratado com a HGPRT (44C), infectado e tratado com a PNP (44D) e infectado e tratado com o MIX (44E). Coloração: HE. Aumento 100X (200 µm) e 400X (50 µm).

Fonte: Arquivo pessoal

Ocorreu necrose (Figura 45) nos grupos infectados, sendo que no grupo infectado e sem tratamento a necrose é do tipo macrofílica (Figura 45B). Já nos grupos infectados e tratados com as enzimas recombinantes a necrose foi do tipo neutrofílica que apresenta aspecto avermelhado (Figura 45C, D e E).

Figura 45. Fotomicrografias de cortes de fígado no 55º dia após a infecção mostrando áreas de necrose - HE.



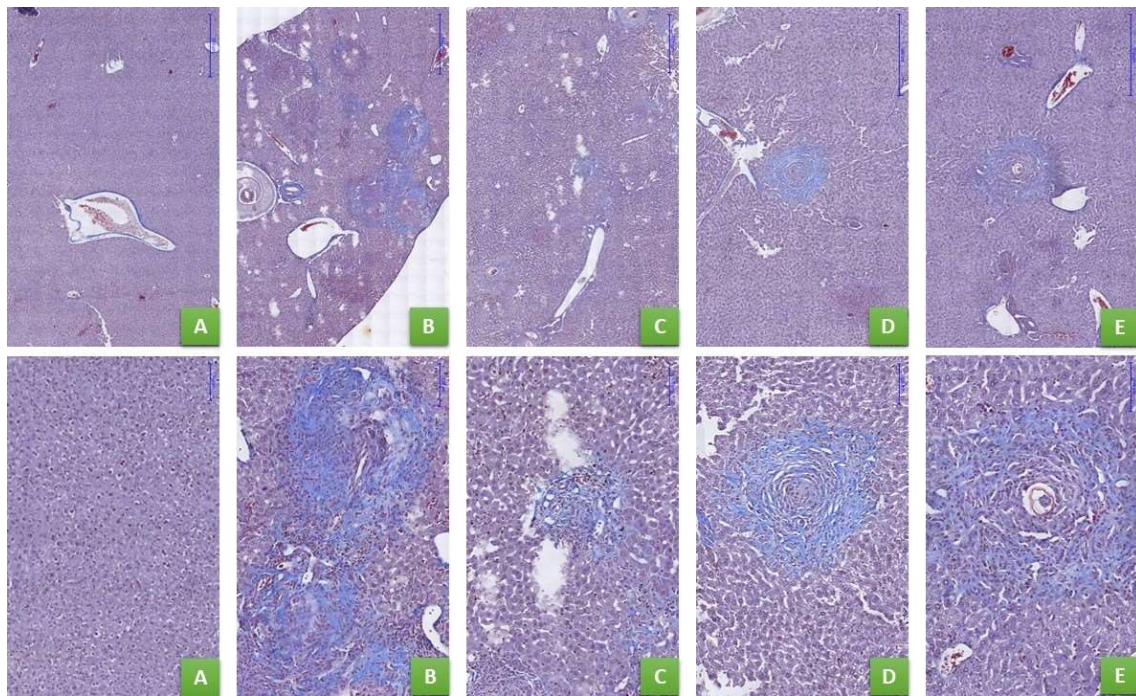
Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental mostrando áreas de necrose: controle (45A), infectado e não tratado (45B), infectado e tratado com a HGPRT (45C), infectado e tratado com a PNP (45D) e infectado e tratado com o MIX (45E). Coloração: HE. Aumento 100X (200 µm) e 400X (50 µm).

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 46, devido à coloração com Tricrômico de Gomori, é possível observar o depósito de colágeno portal mínimo (em azul) no fígado dos animais do grupo controle – não infectado e não tratado – (Figura 45A), e nos animais do grupo infectado e não tratado (Figura 45B) e também dos grupos tratados com HGPRT, PNP e MIX (Figuras 45C, 45D e 45E), observa-se a presença de depósito de colágeno nas áreas granulomatosas periovulares, ao redor dos vasos e formação de necrose. No grupo infectado e sem tratamento (Sm) há a presença de granuloma crônico fibrosante. No grupo tratado com a HGPRT ocorreu menos processo fibrosante. No grupo Sm+PNP há a presença de granulomas fibrosados e processo fibrótico semelhante ao grupo infectado

e sem tratamento. No grupo tratado com o MIX de enzimas os granulomas estão parcialmente destruídos (mais destruídos quando comparados ao grupo Sm+PNP).

Figura 46. Fotomicrografias de cortes de fígado no 55 após a infecção – Tricrômico de Gomori.

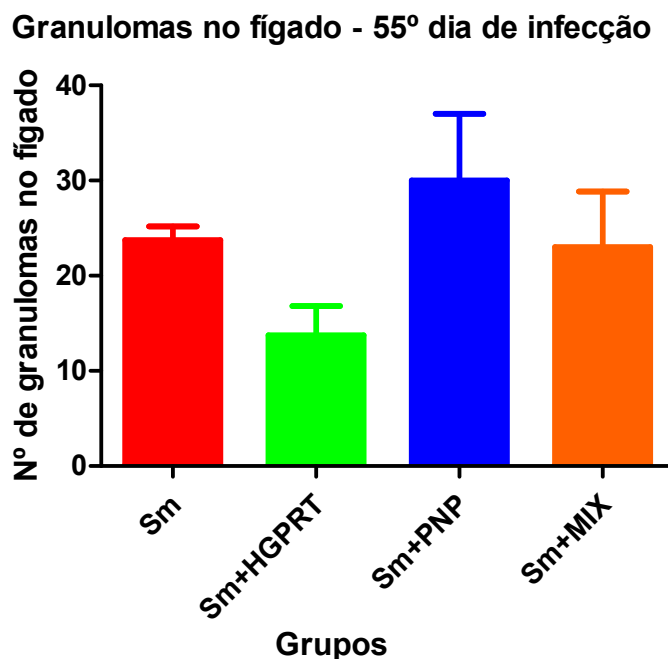


Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: controle (46A), infectado e não tratado (46B), infectado e tratado com a HGPRT (46C), infectado e tratado com a PNP (46D) e infectado e tratado com o MIX (46E). Coloração: Tricrômico de Gomori. Aumento 100X (200 μ m) e 400X (50 μ m).

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 47 estão representados o número de granulomas encontrados nos cortes histológicos de fígado de dois animais de cada grupo experimental, Controle, Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX no 55º dia de infecção. Embora não haja diferença significativa entre os grupos, houve uma redução no número de granulomas nos grupos tratados HGPRT e MIX quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). Já no grupo tratado com a PNP não houve um aumento no número de granulomas quando comparado ao grupo Sm.

Figura 47. Número de granulomas no fígado no 55º dia após a infecção.



Número de granulomas encontrados nos cortes histológicos de fígado de cada grupo experimental. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos independentes ($n = 4$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na tabela 6, estão representadas as médias \pm EPM do número de granulomas encontrados nos cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental, Controle, Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX no 55º dia de infecção. É possível observar uma redução de 42,10% no grupo tratado com a HGPRT quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). No grupo tratado com o MIX de enzimas houve uma redução menor de 3,15%. Já no grupo tratado com a PNP não houve redução no número de granulomas quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm).

Tabela 6. Número de granulomas no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de granulomas no 55º dia após a infecção.

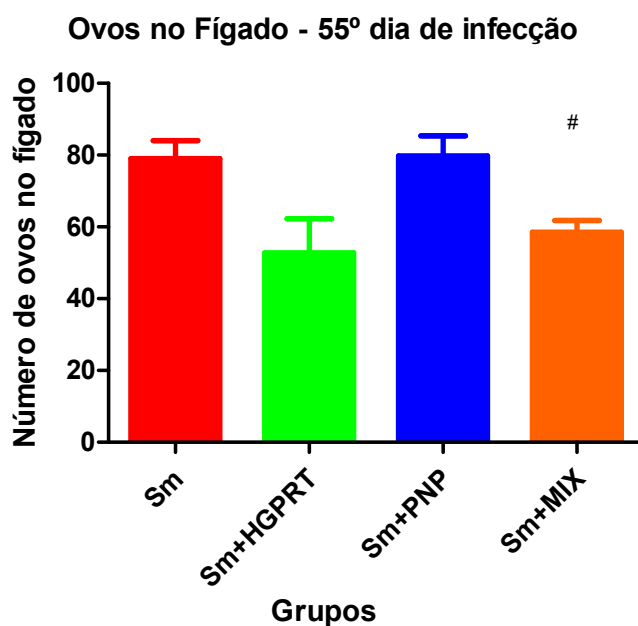
Grupos experimentais	Granulomas	Redução (%)
Sm	23,75	-
Sm+HGPRT	13,75	42,10
Sm+PNP	30	Não houve
Sm+MIX	23	03,15

Os valores representam as médias \pm EPM de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora

A figura 47 mostra o número de ovos encontrados nos cortes histológicos de fígado de dois animais de cada grupo experimental, Controle, Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX no 55º dia de infecção. O tratamento com a enzima HGPRT apresentou redução não significativa no número de ovos quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento (Sm). O grupo tratado com a enzima PNP não apresentou redução no número de ovos quando comparado ao grupo Sm. O tratamento com o MIX de enzimas mostrou uma redução no número de ovos quando comparado ao grupo Sm e uma diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com a HGPRT.

Figura 48. Número de ovos no fígado no 55º dia após a infecção.



Número de ovos encontrados nos cortes histológicos de fígado de cada grupo experimental. Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 4). O símbolo # (p>0.05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima PNP (Sm+PNP) quando comparado ao grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT (Sm+HGPRT).

Fonte: Elaborado pela autora

Na tabela 7, estão representadas as médias ± EPM do número de ovos encontrados nos cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental, Controle, Sm, Sm+HGPRT, Sm+PNP e Sm+MIX no 55º dia de infecção. Nota-se uma redução de 33.22% no número de ovos no fígado no grupo tratado com a HGPRT quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento. O grupo tratado com a enzima PNO não apresentou redução. O grupo tratado com o MIX de enzimas apresentou redução de 25.94% no quando comparado ao grupo Sm.

Tabela 7. Número de ovos no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de granulomas no 55º dia após a infecção.

Grupos experimentais	Ovos no fígado	Redução (%)
Sm	79	-
Sm+HGPRT	52.75	33.22
Sm+PNP	79.75	Não houve
Sm+MIX	58.5	25.94

Os valores representam as médias ± EPM de dois experimentos independentes. Fonte: Elaborada pela autora

5. DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença de grande importância mundial, apresenta abrangência continental, afeta milhares de pessoas e contribui para um comprometimento socioeconômico nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Apesar do uso de medicamento, não há índices que apontam para a diminuição da doença há décadas. A esquistossomose continua avançando geograficamente e não há vacinas e nem novos medicamentos disponíveis, nem mesmo medidas de controle como ação para controlar os hospedeiros intermediários e educação sanitária. Sem contar a sensibilidade diminuída ao PZQ, que está no mercado há 45 anos (BARBERATO, 1996; BERGQUIST, 1998; DINIZ, 2009).

O uso do PZQ não é capaz de reverter o processo fisiopatológico já estabelecido no organismo após a infecção. Isso somado ao fato de não ocorrer o diagnóstico precoce, o que leva à morbidade, que é o maior problema da doença, pois a mortalidade é baixa quando comparada à morbidade, o que compromete muitos anos da vida do indivíduo (ROFATTO et al., 2011).

Outro agravante da esquistossomose se dá pelo fato dos vermes evadirem ou resistirem do sistema imune do hospedeiro, além de não induzirem uma forte imunidade, o que poderia prevenir outras infecções. Como o verme consegue permanecer no organismo, ocorre o agravamento da doença para o estágio crônico, o que gera lesões teciduais sérias e complicações patológicas relacionadas com a resposta imune do hospedeiro contra o verme e principalmente contra os antígenos dos ovos que são encontrados em diferentes tecidos, mas principalmente no fígado dos indivíduos infectados (DINIZ, 2009).

Os países em desenvolvimento são os afetados pela esquistossomose e, portanto, não há interesse das indústrias farmacêuticas e de biotecnologia em desenvolver novos fármacos ou uma vacina para a erradicação da esquistossomose. Assim, pesquisadores do mundo todo, mas principalmente dos países onde ocorre a doença, são os que mais contribuem para novos conhecimentos para melhorar a saúde da população em risco (ROFATTO et al., 2011).

As chances de uma vacina ser efetiva e 100% protetora ainda é muito discutido, principalmente em doenças onde os agentes infecciosos fazem ciclos de vida complexos e tem mais de uma espécie de hospedeiro para completar seu ciclo. Além disso, observa-se em modelos experimentais mecanismos complexos e pouco conhecidos para

o desenvolvimento de plataformas que possam contribuir para a erradicação da esquistossomose (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000; BERGQUIST, 2002). No entanto, estratégias que possam ajudar no controle da gravidade da doença e promover redução na mortalidade podem ser consideradas como positivas no combate as doenças tropicais.

Muitas hipóteses estão em estudo para a busca de uma vacina contra a esquistossomose, usando diversas proteínas do parasita. No entanto, a maioria dos protocolos buscam imunizar os animais e posteriormente realizar o desafio para verificar a cobertura e a proteção dessa imunidade induzida. Inclusive, depois da inserção do PZQ no mercado, diversos derivados do mesmo foram testados, contudo nenhuma delas foi tão eficaz quanto a droga recomendada (CIOLI *et al*, 2014). Mas, ao analisar a esquistossomose, nota-se que a maioria dos indivíduos que são diagnosticados estão na fase mais avançada da doença, onde os parasitas já estão adultos e após o acasalamento produzindo ovos (DINIZ, 2009). O impasse central da quimioterapia é que ela não é capaz de prevenir a reinfeção, gerando a necessidade de repetir o tratamento, principalmente em áreas endêmicas para a doença (CIOLI *et al*, 2014). Por isso, nesse estudo tivemos como objetivo mimetizar a realidade das áreas endêmicas e avaliar por meio do tratamento os efeitos para o controle da esquistossomose mansônica murina, usando enzimas do parasita como estimulantes de uma resposta imune específica contra a doença.

O fato do *S. mansoni* usar apenas a *Via de salvação* para obtenção de purinas (DOVEY; MCKERROW; WANG, 1984), faz dessa via um alvo para investigações. Além disso, não há na literatura estudos utilizando as enzimas da *Via de salvação* de *S. mansoni* para o tratamento contra a esquistossomose. O Ministério da Saúde em 2012 autorizou testes clínicos com uma vacina contra a esquistossomose, porém, a eficiência desta ainda não pode ser comprovada.

Os ovos de *S. mansoni* são os principais causadores da morbidade relacionada à doença (PEARCE; MACDONALD, 2002;) e é o principal agente patogênico, superando muito os efeitos nocivos produzidos diretamente pelos vermes adultos (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013) e, portanto, uma vacina, tratamento ou terapia que sejam capazes de reduzir o número de ovos são fundamentais. Os resultados deste estudo mostram que o uso das enzimas recombinantes de *S. mansoni* HGPRT, PNP e MIX reduziu o número de ovos nas fezes. O tratamento com a enzima PNP e com o MIX parecem atuar na postura de ovos (Figura 21), sendo que o MIX aparenta ser mais

efetivo nesse controle (Tabela 4). O tratamento com a enzimas sugere que a PNP é uma importante enzima para a produção dos ovos em fêmeas do *S. mansoni* (Figura 22). Esses dados suportam a ideia de que principalmente a PNP tem um papel fundamental na produção dos ovos, o que não ocorre quando usamos a HGPRT sozinha, mas se ela estiver com a PNP no MIX o efeito de comprometimento retorna (Tabelas 3 e 4). Essa redução do número de ovos é importante considerado o tratamento com enzimas intracelulares em comparação com trabalhos que imunizaram animais com proteínas totais do tegumento de esquistossômulos, mostrando redução de 59% a 60% no número de ovos nas fezes (MELO et al., 2010) e de 52% a 60% de redução no número de ovos nas fezes em animais imunizados com uma proteína recombinante insolúvel de gastroderme de e de tegumento de vermes adultos (NAWARATAMA et al., 2015).

Reduzir o número de ovos é fundamental, uma vez que auxilia na diminuição da transmissão da doença e que a formação dos granulomas se dá, principalmente, pelas respostas imunes contra os antígenos solúveis dos ovos (HELMY et al., 2009), podendo levar a uma redução na morbidade.

Além da redução dos ovos durante a infecção com *S. mansoni* é importante analisar o perfil da resposta inflamatória nesse modelo (GRYSEELS et al., 2006). A inflamação da esquistossomose está diretamente relacionada ao processo e agravamento da fisiopatogênese da doença (NEVES, 2005). Os dados deste estudo sugerem que o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* HGPRT, PNP e o MIX podem ser capazes de modular indiretamente o perfil inflamatório da esquistossomose no modelo murino, e dessa forma contribuindo para redução de quadros mais graves e diminuindo a mortalidade. Como o granuloma hepático e a fibrose hepática periportal são os eventos patológicos mais graves da esquistossomose (WARREN, 1972; CARVALHO et al., 2008) a redução do número de ovos também é fundamental para controlar esse aspecto. Durante a oviposição, cerca de 60% dos ovos alcançam a luz intestinal e o restante adere-se nos tecidos do fígado (PRATA, 2007). A liberação de antígenos solúveis a partir dos ovos induz a mobilização de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos (SOUZA et al., 2011). Portanto, investigar a postura dos ovos e o número de vermes adultos é fator importante para que o controle do processo inflamatório seja um fator positivo para que a doença não se agrave ou leve o indivíduo a morte.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, uma vacina contra a esquistossomose deve atingir uma redução de carga parasitária igual ou superior a 40%

(WILSON; COULSON, 2006). Portanto é possível afirmar que o tratamento com PNP recombinante de *S. mansoni* favoreceu a diminuição da carga parasitária, sendo considerado um potencial alvo para desenvolvimento de um composto imunoterápico.

Os vermes *S. mansoni* apresentam acentuado dimorfismo sexual (REY, 2008) e, conseqüentemente, a expressão das proteínas nos sexos é diferente. De acordo com Pereira et al., 2017 fêmeas de *S. mansoni* apresentam uma expressão preferencial de APRT em gônadas de fêmeas adultas e maduras. A enzima APRT (Figura 11) está presente na via de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni* para purinas. Essa enzima catalisa a reação de condensação entre adenina e PRPP (5' fosforribosilpirosfato) para produzir AMP e PPI. Experimentos cinéticos usando a proteína heteróloga de uma isoforma de APRT de *S. mansoni* indicaram que esta enzima é cataliticamente ativa. Outro estudo utilizando hibridização *in situ* indicaram que os transcritos desta proteína estão concentrados na região posterior do ovário de fêmeas adultas (PEREIRA et al., 2017). Portanto, o estudo das enzimas envolvidas no metabolismo de purinas de *S. mansoni* pode contribuir para modular a infecção e analisar a proporção de casais, machos e fêmeas recuperados pode ajudar nesse entendimento de diferentes formas que contribuam para a interrupção do ciclo de vida do *S. mansoni*. O presente estudo mostra uma redução de machos e fêmeas em todos os tratamentos, sendo que sem nenhum tratamento o número de fêmeas é maior (figura 24). Portanto, o grupo tratado com a enzima PNP apresenta um menor número de casais. Quanto mais casais, mais ovos, então o tratamento com a PNP mostra menos casais acasalados o que pode indicar um menor número de ovos nas fezes. Essa análise é corroborada pelos dados mostrados nas figuras 21 e 22 e tabelas 3 e 4, onde podemos sugerir que a PNP parece ser fundamental para estabilização do acasalamento e produção de ovos nesse modelo.

O processo inflamatório é um dos fatores que contribui para a morbidade associado ao agravamento da forma crônica da esquistossomose (PEARCE; MACDONALD, 2002). E é importante determinar o perfil das células pela contagem de leucócitos totais, o que nos indica quais células estão sendo mais produzidas e com isso podemos entender o recrutamento dessas para os diferentes tecidos e como a inflamação é modulada. Os dados obtidos nesse estudo mostram que no LCP houve uma redução de leucócitos totais nos grupos tratados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (HGPR, PNP e MIX) (Figura 25), sendo que o MIX parece ser o principal nesse controle, sugerindo aqui um sinergismo das duas enzimas nesse modelo de

imunoterapia. Já no sangue também houve redução dos leucócitos totais nos grupos experimentais (Figura 26) sendo que o grupo tratado com a PNP foi o que apresentou maior redução. Esses dados mostram que a infecção foi estabelecida nos camundongos devido ao alto número de leucócitos no LCP e no sangue e que o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* parece modular o processo inflamatório, sugerindo aqui uma regulação dos fatores de estímulos que poderiam favorecer a saída dessas células da medula óssea para o sangue.

Os eosinófilos são células fundamentais no mecanismo que regula a inflamação e a formação de granulomas durante a esquistossomose (SILVEIRA-LEMONS, 2008). Os eosinófilos possuem grânulos específicos e substâncias farmacologicamente ativas e agem na defesa contra helmintos parasitas e na modulação do processo inflamatório. Essas células são menos numerosas que as outras em organismos saudáveis, cerca de 2 a 3 % das células totais do sangue. Os eosinófilos fagocitam e digerem complexos de antígenos com anticorpos. Tanto nas parasitoses como em alergia há o aumento no número de eosinófilos (eosinofilia) (FREIRE et al., 1995). Portanto, a presença dessas células é fundamental para analisar a ação da enzima HGPRT na defesa contra *S. mansoni*. Os resultados mostram que o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* favorece uma modulação negativa no recrutamento dos eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal (Figuras 27 e 28), sendo que o tratamento com o MIX parece ser mais regulador que os demais tratamentos para que ocorra a modulação negativa dessas células, principalmente no sangue (Figura 27). E a PNP pode ser mais ativa que a HGPRT no tratamento com o MIX, porque sozinha ela apresenta um papel mais regulador do que a HGPRT sozinha (Figura 28).

Os neutrófilos são células fagocitárias que estão presentes na fase aguda da doença e diminuem na fase crônica (PEARCE; MACDONALD, 2002). Os dados deste estudo mostram uma redução do número de neutrófilos tanto no sangue quando no LCP (Figuras 29 e 30). No LCP o grupo tratado com MIX apresentou maior redução de neutrófilos (Figura 29). No sangue o grupo tratado com a enzima PNP mostrou menor quantidade de neutrófilos (Figura 30).

Os leucócitos mononucleares estão presentes na fase aguda da esquistossomose e produzem altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6 e TNF (PEARCE; MACDONALD, 2002). Os dados obtidos nesse estudo mostram que a contagem de leucócitos mononucleares é menor nos grupos tratados, o que leva à uma redução desses mediadores pró-inflamatórios, o que modula o recrutamento de macrófagos

para os tecidos afetados. O tratamento com a PNP sugere que esta enzima é importante no recrutamento dessas células (Figuras 31 e 32), e poderia regular a formação dos granulomas nos tecidos, principalmente no fígado.

A citocina IFN- γ é pró-inflamatória e típica de resposta Th1 (fase aguda) (PEARCE; MACDONALD, 2002). Em ação conjunta com a citocina IL-12 é capaz de remediar as ações causadas pela IL-13 que participa da formação de fibrose na fase crônica da esquistossomose, participando da fibrólise, pois inibe a multiplicação de miofibroblastos e a síntese de proteínas que compõe a matriz extracelular (PEARCE; MACDONALD, 2002; TAMAI et al., 1995). O IFN- γ parecem desenvolver função importante de proteção contra a fibrose em áreas endêmicas de esquistossomose (BOOTH et al., 2004). Estudos controversos demonstram que o IFN- γ , quando não presente em modelos que usam camundongos, contribui para a redução do tamanho dos granulomas nesses animais, sugerindo que essa citocina também é capaz de contribuir para a formação do granuloma em outros modelos (WILSON et al, 2007). O tratamento com a enzima HGPRT sugere uma produção maior de IFN- γ , o que não ocorre quando a PNP está sozinha e nem no MIX (Figura 33).

A citocina IL-4 é importante para dar início o tipo de resposta Th2, muito importante na esquistossomose (PEARCE; MACDONALD, 2002) e sabe-se que IL-4 é fundamental para a mudança de classe de anticorpos para IgE (MEYER et al., 2015). Se houver uma depleção dessa resposta e, conseqüentemente da IL-4, pode ocorrer, devido à ação pró-inflamatória Th1, danos teciduais e até a morte do paciente. É, portanto, uma resposta que pode agir à favor do paciente, protegendo-o, minimizando os danos causados pelo parasita (COLLEY; SECOR, 2014; SILVEIRA-LEMOS, 2008). A IL-4 também é responsável pela formação da fibrose, pois ativa os fibroblastos à produzirem colágeno (PEARCE; MACDONALD, 2002). Os dados obtidos nesse estudo sugerem que a enzima HGPRT sozinha age na produção dessa citocina (Figura 34). Esses dados também sugerem que houve uma modulação maior para a resposta Th2 no grupo tratado com a HGPRT, levando à um menor número de granulomas no tecido hepático (Figura 46).

A citocina IL-10 é regulatória e participa na modulação e regulação das Th1/Th2. No início da fase crônica a resposta Th2 é importante, mas com o passar do tempo deve ser modulada para evitar o agravamento da doença (fibrose hepática). Baixas concentrações de IL-10 podem estar associadas à formação da fibrose na esquistossomose, por deficiência da modulação PEARCE; MACDONALD, 2002;

SILVEIRA-LEMOS, 2008). A IL-10, juntamente com macrófagos ativados de maneira alternativa, correspondem à um *feedback* regulatório da resposta Th2 o que pode limitar a inflamação granulomatosa (COLLEY, SECOR, 2014). Nossos dados obtidos mostram que o tratamento utilizando as enzimas HGPRT e MIX apresentaram um aumento muito discreto nas concentrações dessa citocina quando comparado ao grupo controle (Figura 35). Já no grupo tratado com a PNP (Sm+PNP) houve uma redução discreta nas concentrações de IL-10 (Figura 35). Como a IL-10 é uma enzima regulatória seus níveis devem se manter em equilíbrio a fim de evitar o agravamento da doença, prolongando a resposta Th2. O balanço entre as respostas Th1 e Th2 é muito importante, uma vez que o predomínio de um tipo de resposta pode levar o paciente à morte (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). A homeostase imunológica é fundamental para estabelecer o equilíbrio entre as respostas o que pode garantir a sobrevivência do hospedeiro. Essa homeostase é garantida pelos linfócitos TCD4⁺ (BELKAID; ROUSE, 2005) junto com seus mediadores e fatores de regulação.

A resposta imunológica humoral e celular são importantes para o controle da esquistossomose (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000). Os dados obtidos nesse estudo mostram que aumento houve maior produção de anticorpo IgG2a com o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (Figuras 36, 37 e 38). Esses dados sugerem que as enzimas HGPRT e PNP podem ser imunogênicas, gerando uma resposta específica contra a infecção por *S. mansoni*. Ademais, o plasma dos animais tratados com as enzimas foi capaz de reconhecer as proteínas totais de *S. mansoni* (Figura 39) o que significa que os anticorpos produzidos nos grupos infectados e tratados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* são capazes de ligar-se aos antígenos dos vermes adultos.

A interleucina IFN- γ , presente na resposta Th1 é responsável por aumentar a produção de IgG2a. Os dados desse estudo não mostraram diferença na produção dessa citocina entre os grupos, mas mostrou aumento de IgG2a nos grupos tratados (Figuras 36-39).

Um estudo mostrou que há uma relação entre a produção de anticorpos IgE com resistência adquirida em pacientes em regiões endêmicas (GRYSEELS et al., 2006). Os dados do atual trabalho mostram que níveis não tão elevados de IgE foram produzidos nos grupos infectados e tratados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (Figuras 40, 41 e 42). Além disso, o plasma desses animais reconheceu as proteínas totais de *S. mansoni* (PTS), como pode ser visto na figura 43, o que garante que os anticorpos IgE

são capazes de ligar-se aos antígenos dos vermes adultos. Anticorpos IgE são capazes de ativar mastócitos e basófilos na pele e no sangue, respectivamente, gerando uma hipersensibilidade imediata (CAPRON; CAPRON, 1994). Além disso, estudos mostram que a produção dessa classe de anticorpo está associada à redução da carga parasitária e diminuição da fecundidade dos vermes adultos em diferentes modelos (CAPRON; CAPRON, 1994).

Durante a fase crônica da esquistossomose os ovos ficam retidos nos tecidos e há uma forte localização dos vermes adultos. Esses ovos geram a reação granulomatosa, secretando enzimas proteolíticas que recrutam eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (GRYSEELS et al., 2006). O fígado é o órgão mais afetado por esse processo, pois os ovos são carregados pela rede sanguínea e ficam presos nos sinusoides hepáticos, provocando fibrose. Como consequência há hipertensão portal, varizes gastrointestinais, circulação colateral, ascite, hepatomegalia. Esse quadro caracteriza a fibrose hepática com deposição de colágeno (GRYSEELS et al., 2006; PEARCE; MACDONALD, 2002). Os dados obtidos nesse estudo mostram que o tratamento com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* alteram a fisiopatogênese do fígado (Figuras 44, 45 e 46). A enzima HGPRT e o MIX parecem agir na formação dos granulomas e do número de ovos no fígado (tabelas 5 e 6).

O uso de enzimas recombinantes de *S. mansoni* no tratamento contra a esquistossomose experimental apresentada nesse estudo parece ter contribuído para a melhora do quadro infeccioso e promovido diminuição da patogenicidade doença, mostrando propriedades antiparasitárias e atuando no controle da doença. O combate à esquistossomose não se deve somente à busca por novos fármacos, antígenos ou vacinas, mas principalmente a medidas de controle que possam diminuir significativamente a manutenção de áreas endêmicas ao redor do mundo.

6. CONCLUSÕES

O uso das enzimas recombinantes de *S. mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) e o MIX das duas enzimas no tratamento da esquistossomose experimental parece contribuir para o controle da esquistossomose, auxiliando na modulação da carga parasitária e na resposta imunológica do hospedeiro, reduzindo a fisiopatologia da doença, uma vez que:

- A enzima PNP e o MIX reduziram o número de ovos nas fezes contribuindo para a diminuição da morbidade e transmissão da doença;
- A enzima PNP reduziu significativamente o número de vermes adultos maduros no fígado e mesentério intestinal, o que contribui para a diminuição da transmissão da parasitose pela possibilidade de eliminação de ovos inviáveis ao meio ambiente;
- A enzima PNP e o MIX de enzimas foi capaz de modular negativamente o número de eosinófilos, o que é fundamental para a diminuição do processo inflamatório da doença, principalmente durante a formação do granuloma no fígado;
- A enzima PNP foi capaz de estimular a produção dos níveis de IgE e IgG2a, anticorpos fundamentais para o controle da doença;
- A enzima HGPRT induziu um aumento discreto nas concentrações das citocinas IL-4 e IL-10, sugerindo que essas enzimas modulam a secreção dessas citocinas nesse modelo experimental de uma forma ainda não compreendida;
- A enzima HGPRT reduziu o número de granulomas no fígado, contribuindo de modo importante e significativo com a morbidade associada à fase crônica da esquistossomose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHERBINY, M. et al. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Tropica** v. 8, n. 22. p.117 – 130. 2003.

ARAÚJO, N. **Associação de fármacos na Terapêutica Experimental da Esquistossomose mansoni**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências: Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2010.

AVALCANTI, M. G.; FERNANDES, E.F.; CARVALHO, M.A.et al. Imunologia. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, p. 33-8. 1998.

BARBERATO, S. Novos derivados da oxamniquina potencialmente squistossomicidas. 1996. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 353-360, 2005.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development progress and prospectus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 95-101, 1998.

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

BOOTH, M. et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1295-1303, 2004.

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E; SHUGAR, D. Properties os purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 45, n. 1-2, p. 59-70, 1990.

CAMPBELL, William C.; REW, Robert S. (Ed.). **Chemotherapy of parasitic diseases**. Springer Science & Business Media, 2013.

CAPRON, M.; CAPRON, A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. **Science-New York Then Washington-**, v. 264, n. 5167, p. 1876-1877, 1994.

CARVALHO A. T. MARTINS, R. C. A resposta imune na forma crônica da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, (editores).

Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 20ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 670-716, 2008.

CAVALCANTI, M. G. et al. **Imunologia. Esquistossomose mansoni. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, p. 33-8, 1998.**

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.

CIMERMAN B.; CIMERMAN S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 212-221.**

CIOLLI, D. et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **International journal for parasitology**, v.34, n. 8, p. 979-987, 2004.

CIOLLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitology Today**, v.14, n. 10, p. 412-418, 1998.

COLLEY, D.G.; SECOR, W.E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

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

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 798-804, 1989.

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**, v. 20, n. 3-4, p. 359-369, 2001.

DELGADO, V. S. et al. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains on both sexes of the parasite. **Parasitology Research**, v. 78, n. 8, p. 648-654, 1992.

DESPRÉS, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 60, n. 2, p. 221-229, 1993.

DINIZ, P.P. Estudo do potencial vicinal de proteínas de *S. mansoni* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao

hospedeiro. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós Graduação em Internuidades em Biotecnologia, USP/ Instituto Butantan/ IPT, São Paulo, 2009.

DOVEY, H.F.; MCKERROW, J.H.; WANG, C.C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 11, p. 157-67, 1984.

DOVEY, H.F.; MCKERROW, J.H.; WANG, C.C. Action of tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 11, p. 157-167, 1984.

EALICK, S. E.; RULE, S. A.; CARTER, D. C. et al. Three dimensional structure of human erythrocytic puine phosphorylase at 3.2 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 3, p. 1812-1820, 1990.

EL RIDI, R. et al. Human T- and B-Cell responses to *Schistosoma mansoni* recombinant glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase correlate with resistance to reinfection with *S. mansoni* or *Schistosoma haematobium* after chemotherapy. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 237-244, 2001.

EL RIDI, R. et al. Induction of protective immune responses against schistosomiasis using functionally active cysteine peptidases. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 1-7, 2014.

EI-SAYED, N. M.; ALY, E. M. Toxoplasma gondii infection can induce retinal DNA damage: na experimental study. **International journal of ophthalmology**, v. 7, n. 3, p. 431, 2014.

EMANUEL, A. PRATA, A. Comparação entre praziquantel e oxamniquine no tratamento da esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, n. 2, p. 90-93, 1983.

FATTORI, A. C. M. Avaliação dos efeitos das enzimas recombinantes Adenilato Quinase e Adenosina Quinase de *Schistosoma mansoni* na esquistossomose mansônica experimental. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

FEITOSA, Karina A. et al. Menthol and Menthone Associated with Acetylsalicylic Acid and Their Relation to the Hepatic Fibrosis in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 1000, 2018.

FIOCRUS. Doenças negligenciadas. 2017. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: Dez. 2017.

FONSECA, C.T. et al. 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, n. 3-4, p.503- 510, 2004.

FRANCO, Glória R. et al. The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 453-463, 2000.

FREIRE, B. F. A.; QUELUZ, T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **J Pneumol**, v. 21, p. 180-184, 1995.

GIBLET, E.R. et al. Nucleoside phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. **The Lancet**, v. 305, n. 7914, p. 1010-1013, 1975

GOODMAN, Louis Sanford et al. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 1996.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GUDATT, T. W. et al. Crystal structure of free, IMP- and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase. **Protein Science**, v. 11, n. 7, p. 1626-1638, 2002.

GUPTA, R. K. et al. Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 1, n. 3, p. 293-306, 1993.

HAGAN, P. et al. A Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 2, p. 92-97, 2004.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 89, 2013.

HELMY, A. C. et al. Microdialysis of cytokines: methodological considerations, scanning electron microscopy and determination of relative recovery. **Journal of neurotrauma**, v. 26, n. 4, p. 549-561, 2009.

HÉROU, A. et al. Crystal structures of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase – GMP and IMP complexes: Comparison of purine binding interactions with the XMP complex. **Biochemistry**, v.38, n. 4, p. 14485- 14494, 1999.

INCA. Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Imunoterapia. 2016. Disponível: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=104>

JENSEN, K. F.; NYGAARD, P. Purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* – Purification and some properties. **European journal of biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 253-265, 1975.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.

KEOUGH, D.T. et al. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 98, n. 1, p. 29-41, 1999.

KEOUGH, D. T. et al. The crystal structure of free human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase reveals extensive conformational plasticity throughout the catalytic cycle. **Journal of molecular biology**, v. 351, n. 1, p. 170-181, 2005.

KOELLNER, G. et al. Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase in a complex with hypoxanthine at 2.15 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 265, n. 2, p. 202-216, 1997.

LAWRENCE, J. D. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. **The Journal of parasitology**, v. 59, n. 1, p. 60-63, 1973.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. p. 491-500; 853-867.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2008.

LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 77-90, 1991.

LENZI, H. L. et al. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. **Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL., organizadores. Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz**, p. 569-654, 2008.

LIANG, Y. S. et al. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 34, n. 2, p. 274-280, 2003..

LICHTENBERGOVÁ, L. et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite immunology**, v. 30, n. 11-12, p. 585-595, 2008.

LIMA, MGS. Uso de óleos vegetais como adjuvantes da resposta imunológica em procedimentos de imunização/vacinação. **Departamento de bioquímica e biologia molecular. Disponível em: <http://64.233>**, v. 169, 2008.

LOPES, F. et al. Patologia. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). **Esquistossomose mansoni. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr.** p. 39-55, 1998.

LOVERDE, P. T. et al. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitology International**, v. 53, n. 2, p. 183-192, 2004.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAHMOUD, A. A. F. Esquistossomose e outras infecções por trematódeos. **Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Medicina Interna de Harrison. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 1330-1336, 2008.**

MALINSKY, Rafael Rossell et al. Punção aspirativa por agulha fina em tumores cervicais. **Revista brasileira de otorrinolaringologia. Rio de Janeiro, vol. 68, n. 3, p. 395-398, 2002.**

MATSUMOTO, Y. G. et al. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature*, v. 333, n. 6168, p. 76-78, 1988.

MELO, T. T. et al. Immunization with newly transformed *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument elicits tegument damage, reduction in egg and parasite burden. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 11-12, p. 749-759, 2010.

MEYER, N. H. et al. A crystalline fold in the interleukin-4-inducing principle of *Schistosoma mansoni* eggs (IPSE/ α -1) mediates IgE binding for antigen-independent basophil activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 36, p. 22111-22126, 2015.

MILAN, E.P.; KEIM, L.S. Esquistossomíase mansônica. In: Tavares W, Marinho LAC, (editores). **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2 ed. São Paulo: Atheneu. p. 345-50, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil – **Vigilância e Controle de moluscos de importância epidemiológica: Diretrizes Técnicas** – Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil – **Vigilância da Esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

MONZANI, P.S. et al. Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v.1598, n. 1-2, p. 3-9, 2002.

MODHA, J. et al. Schistosomes: unanswered questions on the basic biology of the host-parasite relationship. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 396-401, 1998.

MOSER, D. M. et al. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 13, p. 8447-8454, 1991.

MUSICK, W. D. L.; NYHAN, W. L. Structural Features of the Phosphoribosyl-Transferases and Their Relationship to the Human Deficiency Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1-34, 1981.

NAWARATNA, S. S. K. et al. Lysosome-associated membrane glycoprotein (LAMP) – preliminary study on a hidden antigen target for vaccination against schistosomiasis. **Scientific reports**, v. 5, p. 15069, 2015.

NARAYANA, S. V. L.; BUCG, C. E.; EALICK, S. E. Refined structure of purine nucleoside phosphorylase at 2,75 Å Resolution. **Acta Crystallographica Section D**, v. 53, n. 2, p. 131-142, 1997.

NASCIMENTO, A. I. P. Análise epidemiológica da esquistossomose em áreas de risco em São Luís-MA. 2001. 112 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Centro Universitário do Maranhão, São Luís do Maranhão, 2011.

NELSON, D. L., COX, M. M., "Lehninger Principles of Biochemistry", 4 ed., W. H. Freeman, 2005.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. Atheneu, São Paulo. 2005.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Atheneu, São Paulo, 2010.

NERIS, D. M. **Efeito da imunização com enzimas recombinantes do metabolismo de de nucleotídeos de Schistosoma mansoni sobre o desenvolvimento da esquistossomose experimental**. 2012. 105 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. UFSCar, São Carlos, 2012.

NERIS, D. M. et al. Immunization with purine salvation pathway recombinant enzymes induces the production of anti-*Schistosoma mansoni* immuoglobulines. **International Trends in Immunity**, v. 1, n. 3, p. 49-56, 2013 (a).

NERIS, D. M.; et al. Evaluation of immunization with purine salvation pathway recombinant enzymes in *Schistosoma mansoni* worms and eggs in murine schistosomiasis. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 10, p. 894-905, 2013 (b).

O'HAGAN, D. T.; MACKICHAN, M. L.; SINCH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infeccious diseases. **Biomolecular engineering**, v. 18, n. 3, p. 69-85, 2001.

OLIVEIRA, G. The *Schistosoma mansoni* transcriptome: an update. **Experimental parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229-235, 2007.

OLIVEIRA, G.; JOHNSTON, D. A. Mining the schistosome DNA sequence database. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 501-503, 2001.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; SIQUEIRA JUNIOR, W. **Introdução à Geografia Médica do Brasil**. São Paulo: Edgar Blücher e Universidade de São Paulo, 1972. p. 213-239.

PARKS, R. E.; ARGAWAL, R. P. **The enzymes**. Nova York, Impressão Acadêmica, v. 7, cap. 16, p. 486-514, 1972.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature medicine**, v. 11, n. 4s, p. S63, 2005.

PAX, R.; BANNETT, J.L FETTERER, R. A Benzodiazepine derivative and Praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Naunyn Schmiedebergs Arch. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 304, n. 3, p. 309-315, 1978.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-509, 2002.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Ver Bras Malariol D Trop**. v. 8, p. 589-597, 1956.

PENG, H. J. et al. Expression of adenylate kinase of *Schistosoma japonicum* and evaluation on the immunoreactivity of the recombinant protein. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong. Bing Za Zi.**, v. 22, n. 1, p. 46-49, 2004.

PEREIRA, H. M. **Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*: Estruturas Cristalográficas, Estudos Cinéticos e Descoberta de Novos Ligantes.** 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2003.

PEREIRA, H. M. et al. *Schistosoma mansoni* displays an adenine phosphoribosyltransferase preferentially expressed in mature female gonads and vitelaria. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 214, p. 82-86, 2017.

PEREIRA, T. C. et al. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 619-623, 2008.

PICA-MATTOCCIA, L. CIOLLI, D. Sex- and stage related sensitivity os *Schistosoma mansoni* to in vivo na vitro praziquantel treatment. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 4, p. 527-533, 2004.

PORCHET, E. A. et al. Tissue expression. Of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. **Parasitology**, v. 109, n. 5, p. 565-572, 1994.

PRATA, A. Esquistossomose Mansoni. In: Veronesi R, Veronesi FR, (editor). **Tratado de infectologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; p. 1695-1720, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 435-464.

RIBEIRO DE JESUS, A. et al. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infection and immunity**, v. 68, n. 5, p. 2797-2803, 2000.

ROCHA, L, R. F. **Efeito antiinflamatório da fração apolar do extrato das folhas de *Nepeta cataria* (catnip) em ratas.** Dissertação (Medicina veterinária). UNIP, 2007.

ROFATTO, H. K. et al. Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 54-59, 2011.

ROMANELLO, L. **Estudos das enzimas Adenosina Quinase e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni***. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

RUFFER, M. A. Note on the presence of “Bilharzia Haematobia” in Egyptian mummies of the twentieth dynasty [1250-1000 BC]. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2557, p. 16, 1910.

SENFT, A.W. et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. **International journal for parasitology**, v. 2, n. 2, p. 249-260, 1972.

SILVA, J. R.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 45-73.

SILVEIRA-LEMOS, D. *et al.* Eosinophils activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. **Acta Tropica**, v.108, n. 2-3, p.150-159, 2008.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOMOZA, J.R. et al. Crystal structure of the hypoxanthine-guanine-xanthinephosphoribosyltransferase from the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*. **Biochemistry**, v.35, p. 7032-7040, 1996.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Ver. Bras. Clin. Med.**, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

STOECKLER, J. D. *Developments in Cancer Chemotherapy*. **Boca Ranton, CRC Press**. p.35-60, 1984.

STOECKLER, J. D. AGARWAL, R. P.; AGARWAL, K. C. et al. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes: physico-chemical properties of crystalline enzyme. **Biochemistry**, v. 35, n. 22, p. 7032-7040, 1996.

TAMAI, K. et al. Interferon-gamma coordinately upregulates matrix metalloprotease (MMP)-1 and MMP-3, but not tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP), expression in cultured keratinocytes. **Journal of investigative dermatology**, v. 104, n. 3, p. 384-390, 1995.

TENDLER, M. et al. Vaccination against Schistosomiasis and Fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential basis of a multivalent anti-helminth vaccine? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 02, p. 255-256, 1995.

TIMMERS, L F, S. M. Dinâmica Molecular da Hipoxantina-Guanina FosforibosilTransferase de *Mycobacterium tuberculosis*. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009.

TRAN, M. H. M. S. et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nature medicine**, v. 12, n. 7, p. 835, 2006.

ULLMAN, B. CARTER, D. Molecular and biochemical on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase of pathogenic haemoflagellates. **International Journal of Parasitology**, v.27, n. 2, p.203-213, 1997.

VARALDO, P. B. L. C. et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. **Infection and immunity**, v. 72, n. 6, p. 3336-3343, 2004.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature genetics**, v. 35, n. 2, p. 148, 2003.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WANG, W; WANG Li; LIANG, YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v.111, p.1871-1877, 2012.

WARREN KS. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 3, p. 417-432, 1972.

WILEY & SONS, **Biochemistry**, J. New York, 2004.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Schistosomiasis, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: Jun. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Schistosomiasis, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>> Acesso em: Dez. 2017.

XU, Y., EADS, J.C., SACCHETTINI, J.C., and GRUBMEYER, C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphotibosyl transfer chemistry. **Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 3700-3712, 1997.

ZAIA, M.auricio G. et al. Anti-inflammatory properties of menthol and menthone in *Schistosoma mansoni* infection. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 170, 2016.

ANEXO

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito Da Imunoterapia Com Enzimas Recombinantes De *Schistosoma mansoni* Em Modelo Murino", protocolada sob o CEUA nº 7939170816, sob a responsabilidade de **Bruna Dias de Lima Fragelli** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/08/2016.

We certify that the proposal "Effects of immunotherapy with recombinant enzymes *Schistosoma mansoni* in Murine Model", utilizing 30 isogenic mice (30 females), protocol number CEUA 7939170816, under the responsibility of **Bruna Dias de Lima Fragelli** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/18/2016.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa*

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 09/2017 Área: *Morfologia E Patologia*

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
		idade:	4 a 6 semanas
		N:	30
Linhagem:	Balb/c	Peso:	20 a 40 g

Resumo: A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo *Schistosoma*. A Organização Mundial da Saúde estima que a esquistossomose acometa 200 milhões de pessoas em 77 países. É considerada uma doença insidiosa e incapacitante em idades precoces, e está relacionada principalmente à ausência ou a precariedade de saneamento básico. O *Schistosoma mansoni* consegue evadir da atividade imunomodulatória do hospedeiro, de uma forma não totalmente compreendida. A via de biossíntese de bases púricas é uma das principais para o desenvolvimento de fármacos, pelo fato dela estar diretamente relacionada com a manutenção da síntese de DNA e RNA. A Hipoxantina-Guanina Fosforibosil Transferase (HGPRT) e a Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) tem uma importante função na via de salvação de bases púricas. Assim, a investigação experimental via imunoterapia utilizando as enzimas recombinantes HGPRT e PNP de *S. mansoni* nos permitirá avaliar o perfil da resposta imune neste modelo e seus efeitos durante a infecção parasitária.

Local do experimento: *Lap - Laboratório de Parasitologia/ DMP - Departamento de Morfologia e Patologia*

São Carlos, 18 de agosto de 2016

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleonil dos Santos Carvalho
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos