

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

BRUNA DIAS DE LIMA FRAGELLI

**Efeitos da enzima recombinante HGPRT na imunoterapia durante a infecção
murina com *Schistosoma mansoni***

Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de São Carlos como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

DMP – UFSCar

Co-orientador: Dr. Humberto D’Muniz Pereira

IFSC – USP

SÃO CARLOS

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos esforços dos meus pais por todo o amor incondicional dedicado à família e por serem meu principal incentivo e também pelas milhares de caronas que se não fossem por elas essa monografia não estaria pronta.

Ao meu irmão (Hélio), familiares e amigos pelo amor e exemplo que me dão todos os dias.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Fernanda de Freitas Anibal por toda a ajuda e tempo dispensados comigo, e por tão boa orientação, que com o tempo passou a ser amiga também.

À Elisandra de Almeida Montija e à Ana Carolina Maragno Fattori por aceitarem o convite de participar da minha banca, me ensinarem tudo o que sei e pelos momentos de risada inesquecíveis.

Ao meu co – orientador Dr. Humberto pela confiança à mim depositada.

Ao grupo de alunos do LIDI – Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas que me auxiliaram na realização dos experimentos e na parceria.

Às equipes do Laboratório de Biologia Estrutural, do IFSC-USP, pelo auxílio e contribuição nesse trabalho e à aluna de doutorado Larissa que sempre se mostrou receptiva e contribui com este trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia, pela boa convivência e por contribuírem nos trabalhos.

Agradeço a todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e que estiveram presentes ao longo deste trajeto. Obrigada!

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica e negligenciada, causada pelo platelminto *Schistosoma sp.* e afeta 240 milhões de pessoas em todo o planeta. No Brasil, é considerada uma endemia em expansão e atinge 19 estados. O *Schistosoma mansoni* consegue evadir da resposta imune do hospedeiro de uma forma não totalmente compreendida. Assim, a busca por novos fármacos para o tratamento da esquistossomose tende a se tornar uma nova alternativa para o controle das infecções causadas por esse parasito. 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 enzima recombinante Hipoxantina-Guanina FosforribosilTransferase (HGPRT) tem uma importante função na via de salvação de bases púricas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da enzima recombinante HGPRT no tratamento (Imunoterapia) de esquistossomose experimental. Como metodologia foi utilizada Imunoterapia utilizando a enzima HGPRT recombinante de *S. mansoni* para tratar camundongos fêmeas da linhagem Swiss infectados pelo *S. mansoni* em 3 doses após 28º dia de infecção. Posteriormente foi feita a avaliação e contagem de ovos nas fezes pelo método Kato – Katz, contagem de células da cavidade do lavado peritoneal e sangue, perfusão para recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático e mesentério intestinal. Os resultados foram analisados usando o programa estatístico *Prism GraphPad 5.01*. Os animais infectados e tratados com essa enzima apresentaram uma acentuada diminuição no número de ovos, o que é fundamental para a diminuição da morbidade relacionada à parasitose. Houve também uma diminuição da carga parasitária e no número de eosinófilos. Os resultados demonstram que, o tratamento com a enzima HGPRT recombinante de *S. mansoni* apresentou potencial para tratamento da esquistossomose mansônica. Dessa forma, esses resultados precisam ser melhores investigados para se compreender quais os mecanismos estão envolvidos no controle da esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose; Imunoterapia; Via de salvação; HGPRT.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease and neglected, caused by the flatworm *Schistosoma sp* and affects 240 million people around the world. In Brazil is considered expanding and reaches 19 states. *Schistosoma mansoni* can evade the host immune response in a way not fully understood. Thus, the search for new drugs for the treatment of schistosomiasis tends to become a new alternative for the control of infections caused by this parasite. The purine bases biosynthetic pathway is a key to drug development, because it is directly related to the maintenance of DNA and RNA synthesis. The recombinant enzyme Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) has an important function in the way of salvation of purine bases. Therefore, this study aimed to evaluate the potential of recombinant enzyme HGPRT treatment (Immunotherapy) in experimental schistosomiasis. The methodology used was Immunotherapy using the enzyme of *S. mansoni* recombinant HGPRT to treat female mice of the strain Swiss infected with *S. mansoni* with 3 doses after 28 days of infection. Later it was made the evaluation of egg in feces by the method Kato - Katz, cell count of peritoneal cavity lavage and blood, perfusion for the recovery of adult worms' door-hepatic system and intestinal mesentery. The results were analyzed using statistical program GraphPad Prism 5.01. Infected animals and treated with the enzyme showed a marked decrease in the number of eggs, which is critical to reducing the morbidity related to parasitosis. There was also a reduction of the parasitic load and the number of eosinophils. The results demonstrate that treatment with recombinant *S. mansoni* HGPRT enzyme has potential for treatment of schistosomiasis. Thus, these results need to be better investigated to understand which mechanisms are involved in the control of schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis; Immunotherapy; Salvation pahtway; HGPRT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

.Figura 1: Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil.....	11
Figura 2. Vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em vista lateral e em vista frontal mostrando a fêmea emergindo do canal ginecóforo.....	12
Figura 3. Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	13
Figura 4. Morfologia da concha de <i>Biomphalaria glabrata</i>	13
Figura 5. Granuloma hepático	14
Figura 6. Intensidade da resposta imune nas fases da esquistossomose	15
Figura 7. Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em <i>S. mansoni</i>	18
Figura 8. Alinhamento das três isoformas da HGPRT de <i>S. mansoni</i> com a HGPRT humana	19
Figura 9. Protocolo de Imunoterapia.....	23
Figura 10. Ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes	23
Figura 11. Método Kato-Katz.....	24
Figura 12. Leucócitos totais no LCP e no sangue	25
Figura 13. Eosinófilos no LCP e no sangue	25
Figura 14. Número de ovos por grama de fezes no 48º dia após a infecção.....	27
Figura 15. Número de ovos por grama de fezes no 54º dia após a infecção.....	27
Figura 16. Número de vermes adultos totais recuperados nos grupos Sm e Sm+HGPRT	28
Figura 17. Número de vermes adultos acasalados e separados em fêmeas e machos recuperados nos grupos Sm e Sm+HGPRT	29
Figura 18. Número de leucócitos totais no LCP.....	30
Figura 19. Número de leucócitos totais no sangue.....	30
Figura 20. Número de eosinófilos no LCP.....	31
Figura 21. Número de eosinófilos no sangue.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais	22
---------------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Adenosina Monofosfato
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP – Adenosina Trifosfato
CBME – Centro de Biologia Molecular Estrutural
cDNA – *complementary Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico complementar)
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
DMP – Departamento de Morfologia e Patologia
DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM – Erro Padrão da Média
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GDP – Guanosina Difosfato
GMP – Guanosina Monofosfato
GTP – Guanosina Trifosfato
HA – Hidróxido de Alumínio
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
INCA – Instituto Nacional de Câncer
IMP – Inosina Monofosfato
LCP – Lavado da Cavidade Peritoneal
OMS – Organização Mundial da Saúde
OXM - Oxamniquine
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)
PZQ - Praziquantel
PRPP – Fosforibosil-pirofosfato
RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)
RNAi – *Ribonucleic Acid interference* (Ácido Ribonucleico de interferência)
SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
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

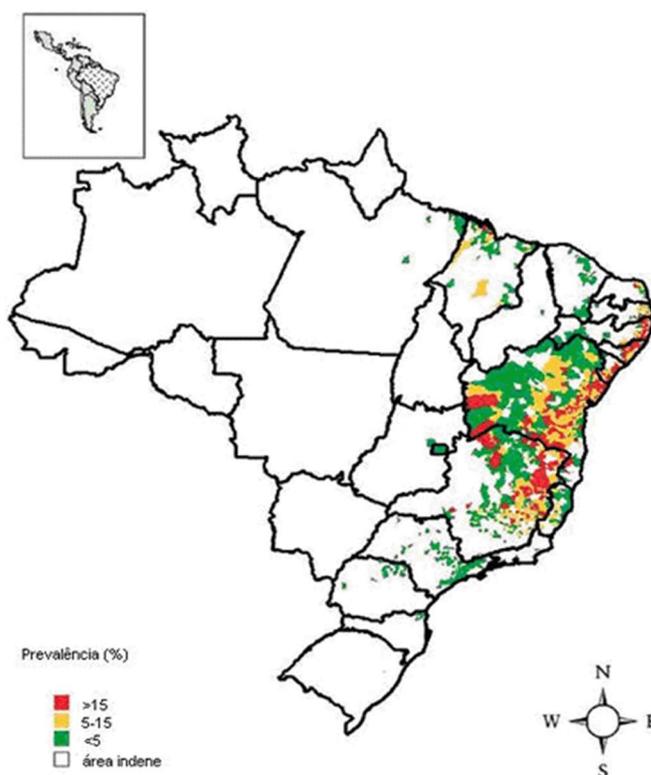
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Esquistossomose	11
1.2 Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	12
1.3 O hospedeiro intermediário.....	13
1.4 Patogenia da esquistossomose.....	14
1.5 <i>S. mansoni</i> e o sistema imunológico do hospedeiro.....	15
1.6 Fármacos comerciais.....	16
1.7 Medidas alternativas para o controle do <i>S. mansoni</i>	17
1.8 Imunoterapia	17
1.9 Via de Salvação de purinas do <i>S. mansoni</i>	17
1.10 Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPRT).....	19
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Animais.....	20
3.2 Obtenção da enzima recombinante HGPRT de <i>S. mansoni</i>	20
3.2.1 Expressão da enzima recombinante HGPRT de <i>S. mansoni</i>	21
3.2.2 Purificação da enzima recombinante HGPRT de <i>S. mansoni</i>	21
3.3 Obtenção das larvas infectantes do <i>S. mansoni</i>	22
3.4 Infecções dos animais com as larvas infectantes (cercárias) do <i>S. mansoni</i>	22
3.5 Imunoterapia e tratamento dos animais.....	22
3.6 Contagem de ovos nas fezes	23
3.7 Avaliação celular.....	24
3.7.1 Coleta de sangue para a contagem de leucócitos	24
3.7.2 Coleta de células do LCP para contagem de leucócitos.....	24
3.7.3 Contagem global de leucócitos do sangue e do LCP	24
3.8 Avaliação da Carga Parasitária: Recuperação de vermes adultos	26
3.9 Análise Estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Contagem de ovos nas fezes de animais infectados com <i>S. mansoni</i> tratados ou não com HGPRT	26
4.2 Recuperação de vermes adultos na veia porta do fígado e mesentério intestinal.....	28
4.3. Avaliação da resposta leucocitária em animais infectados com <i>S. mansoni</i> tratados ou não com HGPRT	30
4.3.1 Avaliação de leucócitos totais no LCP e sangue em animais infectados com <i>S. mansoni</i> tratados ou não com HGPRT	30
4.3.2 Avaliação de eosinófilos no LCP e no sangue.....	31
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXO	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo trematoda *Schistosoma* sp., e apresenta diferentes espécies, sendo a única presente no Brasil o *S. mansoni*, que também ocorre na África, América e sul das Antilhas. O *S. haematobium* pode ser encontrado na África. Já as espécies *S. japonicum* e *S. mekongi* ocorrem no sudeste asiático e no Pacífico Ocidental. Há também o *S. intercalatum* na África e o *S. malayensis* na Malásia (REY, 2008). A Organização Mundial da Saúde estima que a esquistossomose acometa 240 milhões de pessoas e 779 milhões vivem em áreas de risco em 78 países (WHO, 2014). No Brasil a esquistossomose mansônica atinge aproximadamente 7 milhões de indivíduos, sendo que 25 milhões de pessoas vivem em área de risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Atingem 19 estados (Figura 1) com maior prevalência nas regiões Nordeste e Vale do Jequitinhonha. É considerada uma doença negligenciada e na maioria das vezes, essas doenças são tropicais, infecciosas e não apresentam tratamento eficaz com cura efetiva (DINIZ, 2009), pois atinge pessoas pobres e não há interesse em erradicar a doença.

Figura 1: Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil



Fonte: AMARAL, R. S. TAIUIL, L. D. D, ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101 (Suppl. 1), p 79-85, 2006.

A esquistossomose tem grande importância nas discussões sobre saúde no mundo devido a sua abrangência continental. Ocupa a segunda posição no ranking das doenças tropicais, superada apenas pela malária, registrando altos índices de morbidade. É considerada uma doença insidiosa e incapacitante em idades precoces e está relacionada,

principalmente, à ausência ou à precariedade no saneamento básico (WHO, 2014). É conhecida pelos brasileiros como barrida d'água, xistose, doença do caramujo e belhardíase e é caracterizada na forma mais grave, pela hepatoesplenomegalia, pelo aumento do fígado e do baço. O diagnóstico e o tratamento são relativamente simples, mas a erradicação da doença só é possível com medidas que interrompam o ciclo evolutivo do parasito, como a realização de obras de saneamento básico e a mudança comportamental das pessoas que vivem em áreas endêmicas e tratamentos eficazes com 100% de cura dos indivíduos tratados (KATZ; ALMEIDA, 2003).

1.2 Ciclo de vida de *S. mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo, pois é caracterizado por duas fases: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado mamífero/ homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/ molusco – *Biomphalaria* sp.). As etapas evolutivas consistem no verme adulto, macho e fêmea (Figura 2), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulos. Os indivíduos dessa espécie apresentam nítido dimorfismo sexual. O macho apresenta tamanho inferior à fêmea e mede cerca de 1 cm e tegumento esbranquiçado. Já a fêmea mede cerca de 1,5 cm, apresentando forma cilíndrica, cor escura e tegumento liso (REY, 2008).

Figura 2. Vermes adultos de *S. mansoni* em vista lateral e em vista frontal mostrando a fêmea emergindo do canal ginecóforo

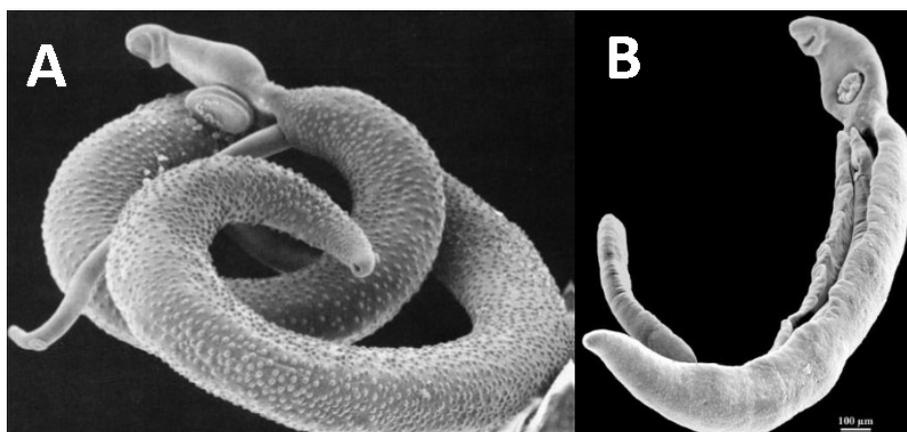


Figura 2. Vermes adultos de *S. mansoni* em vista frontal (A) e em vista lateral (B) mostrando a fêmea emergindo do canal ginecóforo. Fonte: Parasite of day. Disponível em: <http://scienceblogs.com.br/rainha/files/schistosoma_mansoni1.jpg>

Os vermes adultos vivem nos vasos sanguíneos que ligam o intestino ao fígado (veias mesentéricas e sistema porta-hepático) do hospedeiro vertebrado (Figura 3). A postura dos ovos ocorre nos vasos capilares do intestino do hospedeiro, quando então passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes. Na água, os ovos eclodem, e liberam a larva miracídio que penetra no corpo do molusco e sofre modificações abandonando o corpo deste como cercária. Esta pode penetrar na pele do homem, transformando-se em esquistossômulos. Os esquistossômulos são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro definitivo e penetram em seus vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos (KATZ; ALMEIDA, 2003). Muitos deles são destruídos pelo sistema de defesa humano e os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões e, posteriormente, migram para o fígado, onde esses pequenos vermes se alimentam e

tornam-se adultos. O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Figura 3. Ciclo de vida de *S. mansoni*

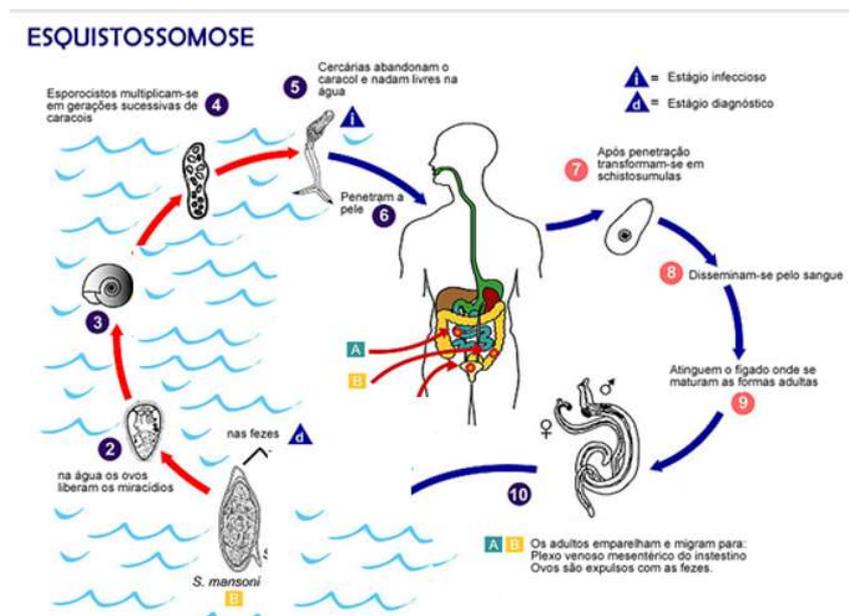


Figura 3: Ciclo de vida de *S. mansoni*. Fonte: Adaptado de Manual de doenças transmitidas por água e alimentos. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>

1.3 O hospedeiro intermediário

No Brasil existem três espécies de hospedeiro intermediário para o *S. mansoni*, todas pertencente ao gênero *Biomphalaria*. Por ordem de importância são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O *B. glabrata* é o principal hospedeiro de *S. mansoni* no Brasil, não apenas pelo alto grau de suscetibilidade de suas populações ao parasito, mas também pela distribuição geográfica em toda a faixa costeira do Nordeste e regiões do Centro e do Sul (NEVES, 2010).

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 4. Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata*

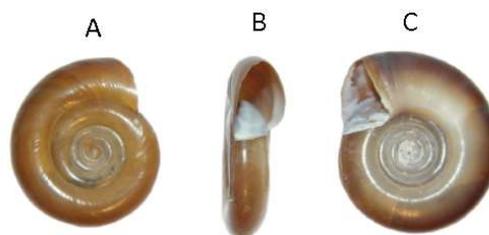


Figura 4. Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata*. A e C. Vista lateral. B. Vista frontal. Fonte: Adaptado de Vigilância da Esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

1.4 Patogenia da esquistossomose

Os sintomas da esquistossomose resultam primariamente da penetração das larvas cercárias (dermatite cercariana) início da postura de ovos (esquistossomose aguda) e como complicações de estágios posteriores de proliferação tecidual e reparo (esquistossomose crônica) (PARISE-FILHO; SILVEIRA, 2001). O período de incubação é de cerca de duas a seis semanas, sendo que o início da ovoposição é de quatro a seis semanas e pode durar de seis a dez anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A fase aguda (3 a 5 semanas) geralmente é assintomática. Após a entrada da cercária pode ocorrer a formação de micropápula avermelhada, sensação de comichão, edema e dores. A dermatite geralmente ocorre em casos de reinfecção e em indivíduos hipersensíveis. Nesse período observa-se infiltração de polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos. Mais tarde surgem linfócitos e macrófagos. Após 3 dias, os esquistossômulos atingem o pulmão. A partir da segunda ou terceira semana os vermes adultos são encontrados no sistema porta-hepático o que pode causar, nessa fase, linfadenia generalizada, febre, aumento generalizado do baço e sintomas pulmonares. Os vermes adultos consomem aproximadamente 2,5 mg de ferro por dia, levando à anemia por deficiência de ferro (NEVES, 2005; REY, 2008; WHO, 2014;).

A esquistossomose na fase crônica pode apresentar distintas manifestações. Nessa fase, o fígado é o órgão mais frequentemente comprometido, dependendo da maior ou menor suscetibilidade do indivíduo e da intensidade da infecção (WHO, 2014).

O comprometimento do fígado se dá pela formação de granuloma (Figura 5). O granuloma é formado por inúmeras células inflamatórias do sistema imune, incluindo eosinófilos, componentes de matriz extracelular, proteínas de adesão, fatores de crescimento e angiogênese, originando uma estrutura esférica que circunda cada ovo individualmente. Após a morte do ovo, o granuloma diminui de tamanho, e deixa placas fibrosas (com abundante quantidade de colágeno) em seu lugar, aumentando a pressão sanguínea portal assim como o diâmetro da veia porta (PEARCE; MACDONALD, 2002; LENZI et al., 2008). Sendo assim, é relevante notar que o ovo do parasito é o principal agente patogênico, superando muito os efeitos nocivos produzidos diretamente pelos vermes adultos (REY, 2008).

Figura 5. Granuloma hepático

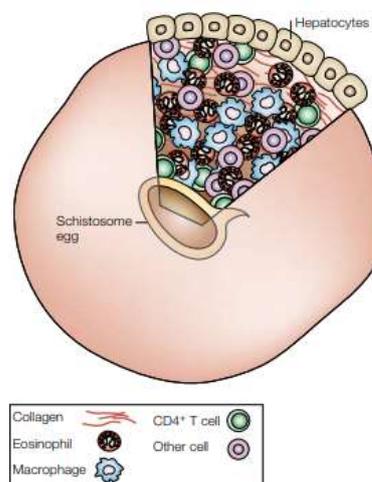


Figura 5. Esquema de granuloma hepático. Fonte: Adaptado de Pearce; MacDonald, 2002.

1.5 *S. mansoni* e o sistema imunológico do hospedeiro

O *S. mansoni* consegue evadir da resposta imune do hospedeiro, de uma forma não totalmente compreendida. Os processos de defesa do organismo iniciam-se a partir do momento em que as larvas cercárias penetram na pele. Este órgão é responsável por grande parte da destruição das cercárias inibindo sua migração. Trabalhos conseguiram recuperar um terço de esquistossômulos mortos na pele de camundongos que foram usados para infectá-los. Os esquistossômulos também podem ser destruídos na migração pelos pulmões e fígado (REY, 2008).

A destruição dos esquistossômulos ocorre devido à receptores para IgG e proteínas do sistema complemento (C3) na membrana plasmática de leucócitos. Outra célula do sistema imunológico, o eosinófilo, apresenta 2,5 vezes menos receptores deste tipo quando comparado aos neutrófilos. Porém, os receptores constitutivos do eosinófilo parecem favorecer mastócitos que foram sensibilizados por anticorpos específicos IgE a aderirem aos esquistossômulos, pois podem sofrer influência de fatores quimiotáticos produzidos por mastócitos. A excreção de tais fatores é importante no mecanismo de destruição de parasitos (REY, 2008).

A infecção por *S. mansoni* apresenta duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda o padrão de resposta predominante é do tipo Th1. Nesta fase, pode-se mensurar níveis de TNF (fator de necrose tumoral) no plasma e em células mononucleares do sangue periférico produzindo altos níveis de TNF, IL-1 e IL-6, que atuam como mediadores pró-inflamatórios (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Com a evolução da esquistossomose ocorre a produção de antígenos dos ovos na 6ª semana, aproximadamente, e, neste momento, ocorre a modulação da resposta Th1 e a resposta do tipo Th2 é induzida (Figura 6), levando à uma diminuição da produção e funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios. A citocina anti-inflamatória IL-10 tem função extremamente importante na modulação da resposta TH1 e sua transição (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Na fase crônica predomina o padrão de resposta do tipo Th2. Após a fase inicial da doença, a resposta Th2 precisa ser modulada para evitar o desenvolvimento de fibrose hepática e da morbidade crônica. As principais citocinas responsáveis pela fibrose hepática são as IL-13 e IL-4 uma vez que estas estimulam os macrófagos e os fibroblastos a sintetizar colágeno (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Figura 6. Intensidade da resposta imune nas fases da esquistossomose

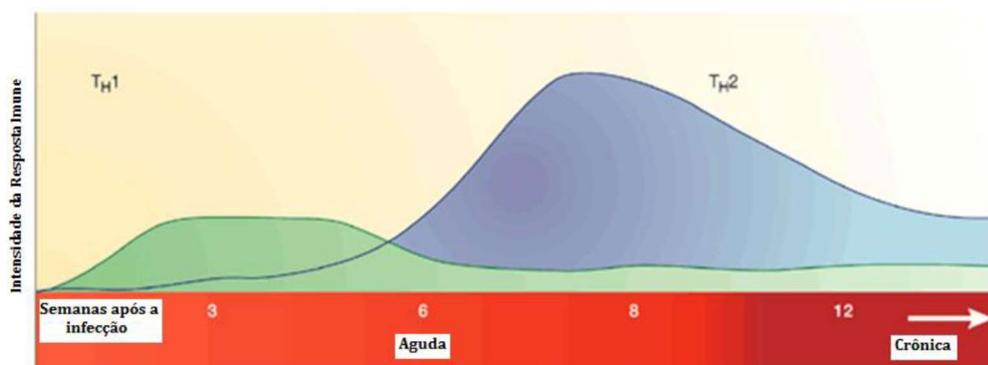


Figura 6. Resposta imune da esquistossomose mansônica ao longo do tempo. Fonte: Adaptado Pearce; MacDonald, 2002.

É de grande importância o balanço entre os padrões de resposta, Th1 e Th2, uma vez que o predomínio da resposta imune em direção de um único perfil é prejudicial e pode levar o hospedeiro a morte. A IL-10 evita que aconteça um mecanismo pró-inflamatório potencialmente letal. Se o padrão Th2 não for modulado na fase crônica ele pode levar ao aumento do processo de formação da fibrose hepática gerando a forma mais grave da doença, a hepatoesplênica (PEARCE; MACDONALD, 2002). As células TCD4⁺ mantêm a homeostase imunológica, controlando a magnitude da resposta imune a organismos invasores (BELKAID; ROUSE, 2005).

Por fim, nota-se que a eficiência nos mecanismos imunológicos do hospedeiro é contrabalanceada pelos dispositivos de escape do parasito, tais como: modificação do tegumento das larvas, em que estas não conseguem mais fixar anticorpos; descamação da superfície externa do tegumento dos vermes adultos, a qual 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).

1.6 Fármacos comerciais

Vários fármacos têm sido estudados em vários modelos experimentais. No tratamento da esquistossomose é utilizado o Praziquantel (PZQ) (REY, 2001). O PZQ é utilizado para todas as espécies de *Schistosoma* sp. e atua nos vermes adultos 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 medicamento é absorvido via difusão simples pelo verme adulto, o que promove um aumento da permeabilidade ao cálcio da membrana celular gerando contrações tetânicas, seguidas de paralisia muscular. Posteriormente, ocorre vacuolização e desintegração do tegumento, matando, assim, o parasita (PAX et al., 1978; CAMPBELL; REW, 1986; GOODMAN; GILMAN, 1996).

Mesmo tendo fármacos para tratar a doença o índice de pessoas infectadas ainda é muito alto, uma vez que o PZQ não evita a reinfeção 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; PICA-MATTOCCHIA; 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 de uso exclusivo para tratar esquistossomose mansônica na África e Sul das Américas. Os pacientes adultos são curados com dose única, enquanto que as crianças necessitam de duas doses em um curto espaço de tempo. 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).

Existem grupos de pesquisa no Brasil que vem testando fitoterápicos para o tratamento da esquistossomose experimental. Alguns exemplos desses fitoterápicos são a menta (*Mentha piperita L.*) e a garra (*Harpagophytum procumbens*).

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

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). Há algumas imunizações utilizando proteínas em fase de pesquisa. 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).

Já 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 et al., 1988; 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 Glutathione S-transferase (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).

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 e Imunoterapia se faz importante.

1.8 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).

Os linfócitos B são os responsáveis pela produção de anticorpos e os linfócitos T tem papel na mediação por células na imunidade. Os monócitos e os macrófagos são células também efectoras de imunidade. Estes tipos celulares facilitam a ação dos linfócitos T e de modificadores da resposta biológica, como as interleucinas (INCA, 2016).

A Imunoterapia vem sendo utilizada no tratamento de 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 é inédito.

1.9 Via de Salvação de purinas do *S. mansoni*

Os nucleotídeos são moléculas com diversas funções. São formados por uma base nitrogenada púrica (Adenina ou Guanina) ou uma base pirimídica (Citosina, Timina ou Uracila), uma ribose e um grupo fosfato, formando o DNA ou RNA (WILEY; SONS, 2004)

Há duas vias metabólicas que sintetizam os nucleotídeos: a Via de Novo e a Via de Salvação. A Via de Novo é similar em todos os seres vivos para a síntese de bases púricas e pirimídicas. A Via De salvação reutiliza os nucleotídeos sem o grupamento fosfato que são liberados na quebra de ácidos nucleicos. Portanto, ambas vias são essenciais para o metabolismo celular, sendo a de salvação mais econômica energeticamente (WILEY; SONS, 2004).

O *S. mansoni* depende exclusivamente da Via de Salvação, pois o metabolismo de purinas apresenta uma rápida incorporação de ¹⁴C-glicina e ¹⁴C-glicose no anel púrico, o que mostra a dependência externa de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos (SENFTE et.al., 1972; DOVEY et.al., 1984).

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 é convertida em nucleotídeos em *S. mansoni*. Este esquema é mostrado na figura 7 (PEREIRA, 2009).

Figura 7. Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*

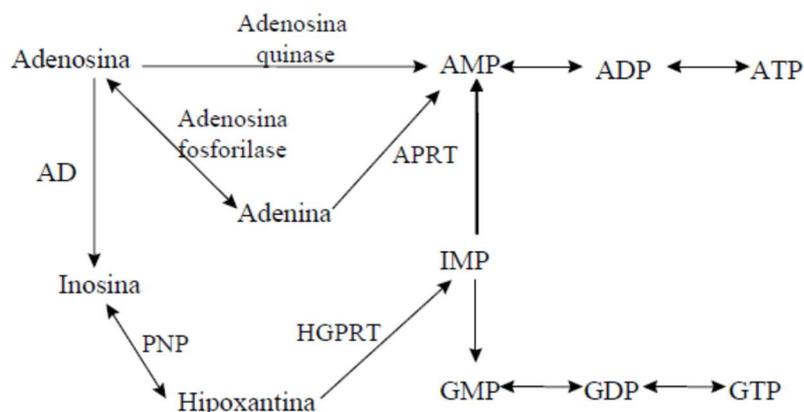


Figura 7. Esquema da via de salvação de purina de *S. mansoni*. AD: Adenosina Desaminase; PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase; HGPRT: Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase; APRT: Adenina Fosforibosiltransferase; AMP: Adenosina Monofosfato; ADP: Adenosina Difosfato; ATP: Adenosina Trifosfato; IMP: Inosina Monofosfato; GMP: Guanosina Monofosfato; GDP: Guanosina Difosfato; GTP: Guanosina Trifosfato. Fonte: Pereira, H. M. et al. 2003.

As enzimas dessa via metabólica 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*. 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., 2008).

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 Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase (HGPR)T

A Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase tem uma importante função na via de salvação de bases púricas (TIMMERS, 2009). A enzima HGPR)T participa da Via de Salvação de purinas, sendo que, essa enzima 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 (inosinammonofosfato) ou GMP (guanina monofosfato), o que favorece a formação dos nucleotídeos (XU et al.,1997). A HGPR)T 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 HGPR)T pertence à família das fosforribosiltransferases, que catalisam a transferência do grupo ribose 5' fosfato vindo do PRPP, para uma variedade de substrato secundários na presença de Mg²⁺, 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., 1983; 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 HGPR)Tase de *S. mansoni* fornecem as principais fontes de nucleotídeos guanina para o 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 8.

Figura 8. Alinhamento das três isoformas da HGPR)T de *S. mansoni* com a HGPR)T humana

2JBH	MAGSSEEAPDYGRG-----VVIMDDWPGYDLNLFYTPQHYYGDLEYVLIPH	46
Smp_103560	MNSSVLDNGNHSNPQIRDMSSNMKADCVVIEDSFRGFPTTEYFCTSPRYDECLDYVLIPN	60
	. : : :..	*** *.* : * : * . : * * :*****
2JBH	GIIVDRIERLAKDIMK---DIGYSDIMVLCVLKGGYKFCADLVEHLKNISRNSDRFVSMK	103
Smp_103560	GMIKDRLEKMSMNIVDYEACNATSITLMCVLKGKFKFLADLVGLERTVVRARGIVLPMS	120
	. ** : : : : : * . : .	. : * : :***** : * * * * : * . * . : . * .
2JBH	VDFIRLKSRYNDQSMGEMQIIGGDDLSTLAGKNVLIVEDVVGTGRMKALLSNIKEYKPN	163
Smp_103560	VEFVRVKSRYVNDVSIHEPILTLGLDPSEYKDKNVLVVEDI IDTGKTITKLISHLDSLSTK	180
	. : * : * * * * * : * : * . * * .	***** : * : * : * . * : * : : . : .
2JBH	MIKVASLLVKRTSRSDGFRPDYAGFEIPNLFVVGALDYNEYFRDLNHICVINEHGKEY	223
Smp_103560	SVKVASLLVKRTSPRNDYRPFVGFVFNRFVVGALDYNDNFRDLHHICVINEVGQKPF	240
	:***** : . : * : * : * * * * * : * * * : * * * * * : * * * * * : * : * :	
2JBH	RV-----	225
Smp_103560	SVPCTSKPV	249
	*	

Figura 8. Alinhamento experimental das 3 HGPR)Ts humanas com a de *S. mansoni*. Identidade sequencial da HGPR)T Smp_103560 de *S. mansoni* (Smp) e o homólogo humano (2JBH) – 45%. Fonte: Romanello, L. Estudos das enzimas Adenosina Quinase e Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase de *Schistosoma mansoni*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. Fonte: ROMANELLO, L, 2011.

Assim, a investigação experimental via Imunoterapia utilizando a enzima HGPRT recombinante de *S. mansoni* nos permitirá avaliar o perfil da resposta celular neste modelo e seus efeitos durante a infecção parasitária. E como essa Imunoterapia poderá modular a redução da carga parasitária em camundongos da linhagem *Swiss* infectados com *S. mansoni* e tratados com HGPRT.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As principais ações para erradicar a esquistossomose são desenvolver tratamentos para a população atingida, controlar a população de caramujos, educação sanitária e saneamento básico (MOHDA et al., 1998; CHITSULO et al., 2000). 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. Considerando que a gravidade da doença depende geralmente da carga parasitária para o agravamento do quadro clínico do indivíduo infectado, este projeto tem como principal objetivo avaliar os efeitos das enzimas de via metabólica, a Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) em camundongos infectados com *S. mansoni*. Mais especificamente, verificou-se:

- A contagem de ovos nas fezes de animais infectados com *S. mansoni* tratados ou não com a HGPRT;
- A resposta leucocitária no lavado da cavidade peritoneal (LCP) e no sangue de animais infectados com *S. mansoni*, tratados ou não com HGPRT;
- A carga parasitária, na recuperação dos vermes presentes no sistema porta hepático e nas veias mesentéricas e contagem de ovos nas fezes dos animais infectados tratados ou não com HGPRT após 2 e 3 doses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto 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 Experimentação Animal (CEEAA) desta Unidade N. 060/2013 (Anexo I).

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmea da linhagem *Swiss*, pesando entre 30 a 40 gramas, com 6 semanas de vida, de procedência do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Estes 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.

3.2 Obtenção da enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*

A proteína Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase foi sintetizada pela metodologia de expressão proteica através da inserção de plasmídeos em culturas bacterianas e foi purificada pelo método de cromatografia de afinidade em coluna de cobalto, em colaboração com o Laboratório de Cristalografia 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 *S. 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 amplificação, estabelecimento das metodologias de expressão e purificação) da enzima e suas padronizações foram desenvolvidas pelo o grupo de cristalografia, que serão descritas a seguir.

3.2.1 Expressão da enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*

Para a expressão da enzima HGPRT 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 tubos de ensaio (separadamente) 10 mL de uma cultura contendo bactérias recombinantes *E. coli* Lemo 21(DE3) contendo o plasmidio pOPINF e os genes das enzimas HGPRT de *S. mansoni* por 16 horas.

Os tubos de ensaio 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.

O produto da expressão foi centrifugado por 40 minutos a 4000 rpm 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.

3.2.2 Purificação da enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*

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 que havia sido armazenado a - 20°C foi ressuspensionado em 50 mL de tampão de lise e posteriormente as bactérias (tubos mantidos em gelo) foram lisadas 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 foi coletado.

A coluna foi então 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.

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.

3.3 Obtenção das larvas infectantes do *S. mansoni*

As larvas (cercárias) da cepa BH (Belo Horizonte – MG, Brasil) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo – USP. 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.

3.4 Infecções dos animais com as larvas infectantes (cercárias) do *S. 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. Os animais serão eutanasiados com anestésico 10 Thionembutal (North Chicago, Illinois, USA) no tempo previamente estabelecido, ou seja, no 48º dia após a infecção para realização dos procedimentos descritos a seguir.

3.5 Imunoterapia e 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. A enzima foi emulsificada com o adjuvante Hidróxido de Alumínio (HA). A Imunoterapia ocorreu após 28 dias de infecção: 1ª dose: 28º dia; 2ª dose: 38º dia; 3ª dose: 48º dia (Figura 9). Os grupos experimentais foram divididos em 4, como visto na tabela a seguir.

Tabela 1: Grupos experimentais

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

Tabela 1. Quatro grupos experimentais foram criados: Controle, em que os animais não receberam infecção e não receberam tratamento; HGPRT em que os animais não receberam infecção mas receberam tratamento; Sm em que os animais receberam somente infecção e; Sm+HGPRT em que os animais receberam infecção e tratamento. Fonte: elaborada pelo autor.

Os animais do grupo controle não receberam infecção e nem tratamento. Os animais do grupo HGPRT não receberam infecção, mas receberam tratamento. Os animais do grupo Sm receberam infecção e nenhum tratamento. Os animais do grupo Sm+HGPRT foram infectados e receberam tratamento.

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

Figura 9. Protocolo de Imunoterapia

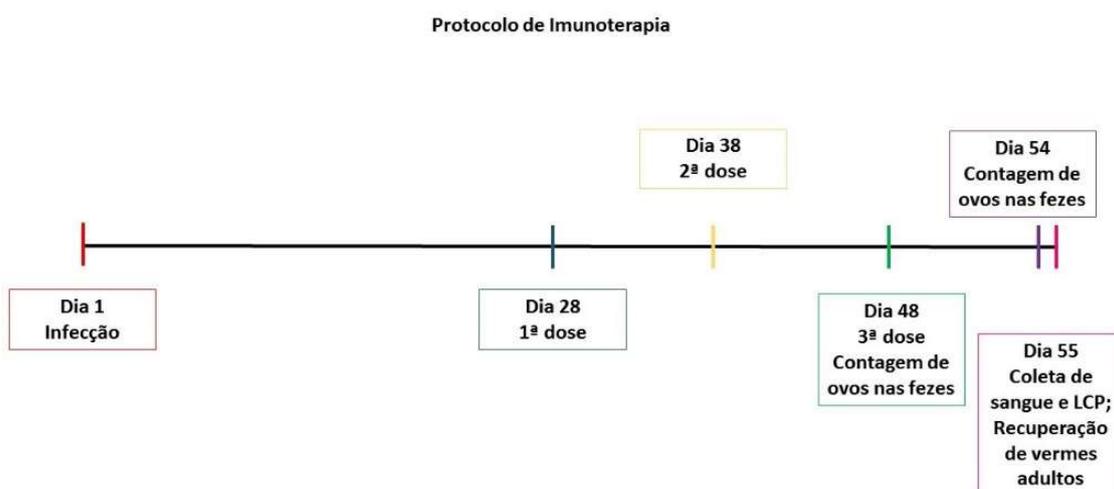


Figura 9. Protocolo de imunoterapia. No 1º dia foi realizada a infecção. No 28º dia foi feita a primeira administração da enzima HGPRT. No 38º e 48º dia outras doses de 100 µg da enzima HGPRT foram administradas. No 48º e no 54º foram contados os ovos nas fezes pelo método Kato-Katz. No 55º e último dia foi feita a eutanásia para recuperar o sangue, lavado da cavidade peritoneal e vermes adultos no fígado e mesentério. Fonte: Elaborado pelo autor.

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 ocorre o clareamento dos ovos facilitando sua identificação para contagem, como pode ser visto na figura 10.

Figura 10. Ovos de *S. mansoni* nas fezes



Figura 10. Ovos de *S. mansoni* no aumento de 100 x. 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 11. 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 11. Método Kato-Katz

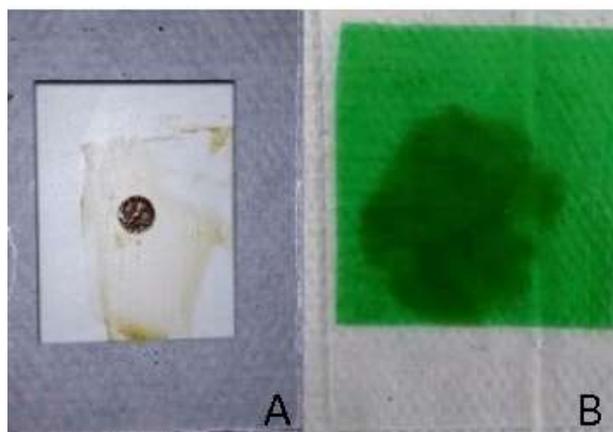


Figura 11. Método de Kato-Katz. A. Placa com orifício no meio para coleta de quantidade específica de fezes. B. Lâmina de microscopia coberta com lamínula de papel celofane impregnada de verde malaquita. Fonte: acervo pessoal.

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

3.7 Avaliação celular

3.7.1 Coleta de sangue para a contagem de leucócitos

A coleta de sangue foi feita por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), cujas agulhas foram banhadas com anticoagulante EDTA 0,3M. A técnica consiste na retirada de pequena porção de tecido (neste caso sangue) por aspiração através de uma agulha fina no lado esquerdo do coração. Posteriormente, esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados com Panótípo 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, homogeneizou-se a região e posteriormente as células da região peritoneal foram recuperadas na seringa (em torno de 3 mL).

3.7.3 Contagem global 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 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 Panótíco. 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 12.

Figura 12. Leucócitos totais no LCP e no sangue

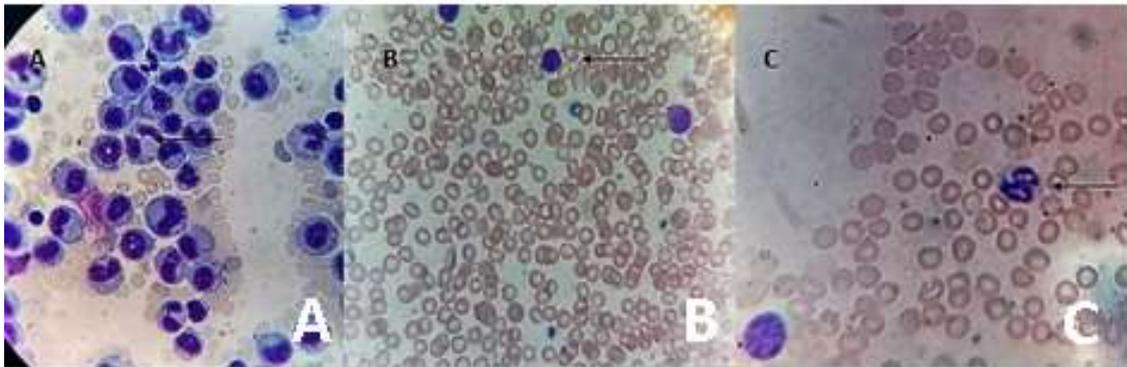


Figura 12. Leucócitos totais no LCP (A) e no sangue (B e C). Em A há leucócitos totais no LCP, na seta está sendo indicado um neutrófilo. Em B e C há leucócitos no sangue. As setas indicam mononucleados e dois eosinófilos respectivamente. Aumento de 1000 vezes. Fonte: acervo pessoal.

A figura 13 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 granulações 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). Conhecer a morfologia de tais células é fundamental para fazer a contagem correta.

Figura 13. Eosinófilos no LCP e no sangue

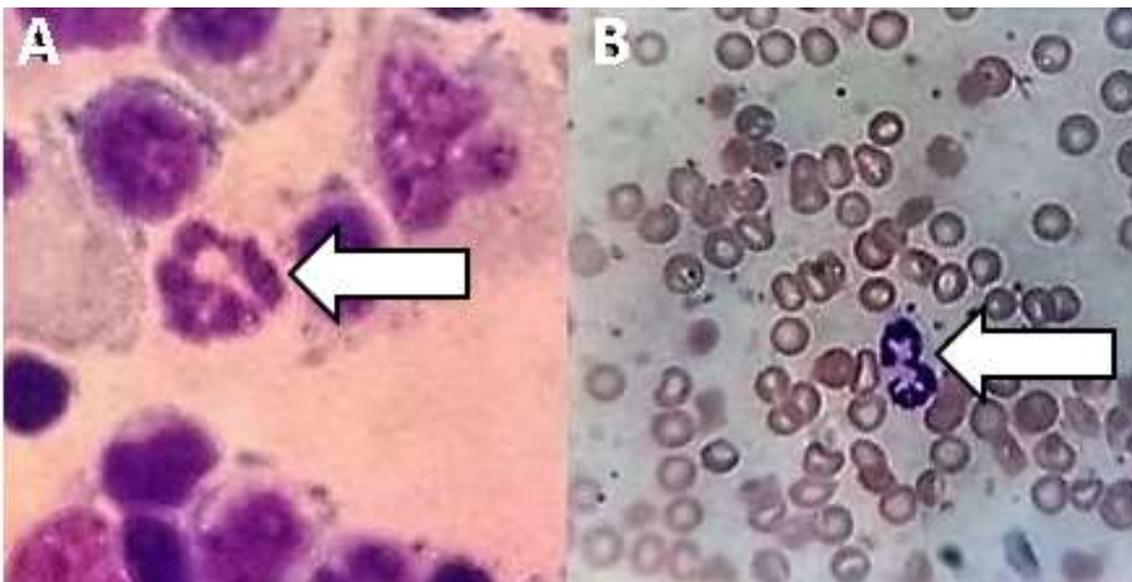


Figura 13. Eosinófilos de camundongos. A. Eosinófilo no LCP com aumento de 1000 vezes. B. Dois eosinófilos no sangue com aumento de 400 vezes. Os eosinófilos apresentam núcleo bilobado e a primeira característica para a sua identificação é a presença de granulações ovoides que se coram pela eosina dando um aspecto avermelhado. 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 mesentérico intestinal. O grau de proteção foi medido pela comparação entre o número de vermes recuperados em cada grupo experimental e seu respectivo controle (Sm), de acordo com a fórmula:

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

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

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SD e analisados usando o GraphPad Prism 7.0 (San Diego, Califórnia, EUA). A identificação dos dados discrepantes foi realizada através da análise de Grubbs, seguida do teste de Shapiro-Wilk para verificar a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados. Posteriormente, o teste ANOVA (análise de variância) foi aplicado aos dados paramétricos e o pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. A significância estatística estabelecida é $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença de importância mundial e acomete um grande número de pessoas. Apesar da existência de fármacos contra os vermes adultos, ainda não há fármacos e vacinas que possam controlar a infecção e a disseminação desse parasito (DINIZ, 2009). A busca por novos tratamentos é de grande interesse para que novos conhecimentos sejam gerados a fim de contribuir para novos estudos. Portanto, a estratégia utilizada nesse trabalho de utilizar proteínas recombinantes do parasito para verificar a indução de resposta imunológica em esquistossomose experimental objetivou propiciar nessa contribuição. Além disso, pesquisas para encontrar novos fármacos para a imunização e tratamento de esquistossomose mansônica e medidas de controle e conscientização em práticas educativas junto a populações em risco devem fazer parte de um programa eficiente para combater essa parasitose.

4.1 Contagem de ovos nas fezes de animais infectados com *S. mansoni* tratados ou não com HGPRT

A figura 14 mostra a contagem de ovos nas fezes no 48º dia dos animais nos grupos Sm e Sm+HGPRT. Observa-se que no grupo Sm+HGPRT houve uma redução significativa no número de ovos após a Imunoterapia utilizando a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*.

Figura 14. Número de ovos por grama de fezes no 48º dia após a infecção

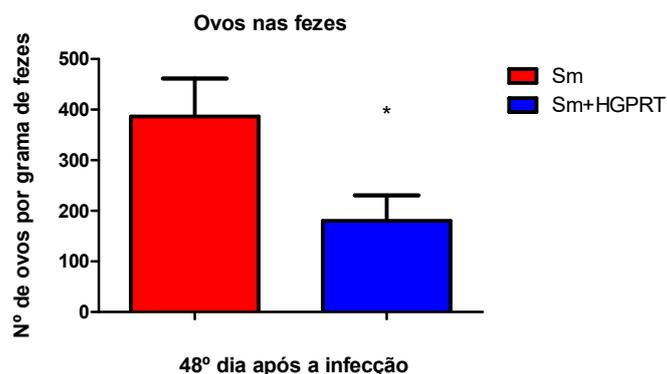


Figura 14. Contagem de ovos nas fezes no 48º dia após a infecção. Os dados representam a média ± EPM (n= 12). O símbolo * (p<0,05) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo infectado e tratado com a enzima HGPRT quando comparado com o grupo infectado e sem tratamento.

A figura 15 mostra a contagem de ovos nas fezes no 54º dia dos animais nos grupos Sm e Sm+HGPRT. Observa-se que no grupo Sm+HGPRT houve uma redução significativa no número de ovos após a Imunoterapia utilizando a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*.

Figura 15. Número de ovos por grama de fezes no 54º dia após a infecção

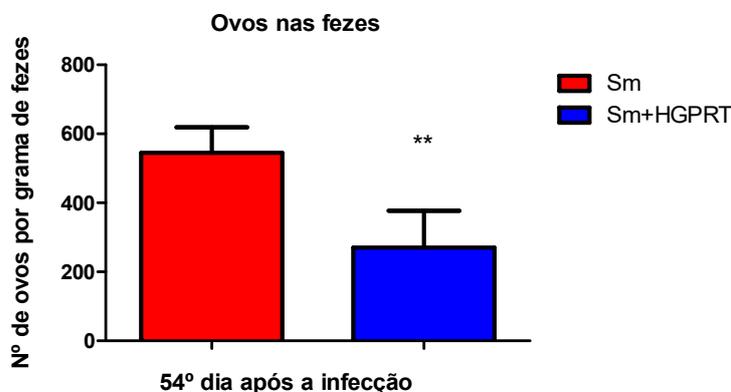


Figura 15. Contagem de ovos nas fezes no 54º dia após a infecção. Os dados representam a média ± EPM (n= 10-12). O símbolo ** (p<0,01) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo: infectado e tratado com a enzima HGPRT quando comparado com o grupo infectado e sem tratamento.

A contagem de ovos nas fezes no 48º dia os animais ainda não haviam recebido a 3ª dose de 100 µg de HGPRT. Já na contagem no 54º dia a 3ª dose já havia sido administrada. A diferença significativa entre os grupos foi maior na recuperação no 54º dia, evidenciando que o tratamento com 3 doses é mais eficiente que um tratamento com somente 2 doses quando analisado o número de ovos nas fezes.

A diminuição no número de ovos é importante, pois auxilia na diminuição da transmissão da doença e uma vez que a formação dos granulomas se dá, principalmente, pelas respostas imunes contra os antígenos solúveis nos (HELMY et al., 2009), levando

a uma diminuição na morbidade. Os dados sugerem que a Imunoterapia com a enzima recombinante HGPRT pode ser capaz de modular indiretamente o perfil inflamatório no modelo murino da esquistossomose.

O evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma hepático e a fibrose hepática peri-portal (WARREN, 1972; CARVALHO et al., 2008). Esta é mediada por várias subpopulações linfocitárias, induzindo resposta inflamatória e fibrótica em torno dos ovos alojados nos diferentes tecidos. Por ocasião da oviposição, cerca de 60% dos ovos alcançam a luz intestinal. O restante mantém-se “preso” nos capilares da mucosa do intestino, sobrevivendo a morte do miracídio, larva ciliada e livre natante, em que o embrião não se desenvolve e não ocorre eclosão (PRATA, 2007). Alguns ovos aí permanecem, ao passo que outros vão sendo carreados pela circulação mesentérica até o fígado, onde “encalham” nos sinusoides hepáticos. 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.

4.2 Recuperação de vermes adultos na veia porta do fígado e mesentério intestinal

A figura 16 mostra a quantidade de vermes adultos totais recuperados na veia porta do fígado e no mesentério dos animais no grupo infectado sem tratamento e no grupo infectado e tratado no 55º dia. Os dados demonstram que houve uma redução de 16,77% no grupo tratado com a enzima recombinante HGPRT.

Figura 16. Número de vermes adultos totais recuperados nos grupos Sm e Sm+HGPRT

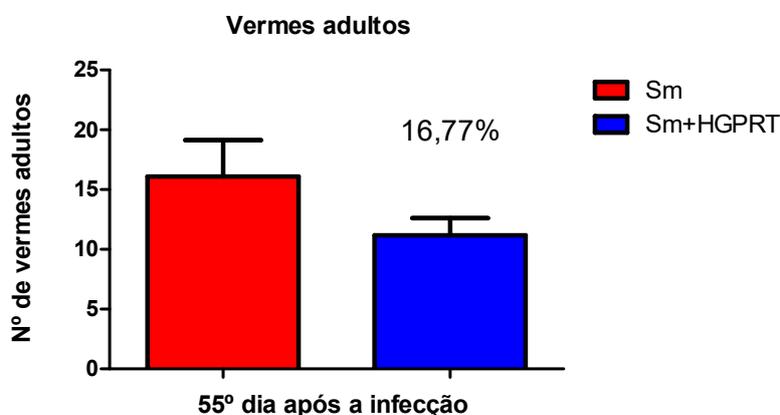


Figura 16. Recuperação de vermes adultos na veia porta do fígado e mesentério intestinal. Os dados representam a média ± EPM (n= 10-12).

A figura 17 mostra a recuperação de vermes adultos acasalados e separados fêmeas e machos na veia porta do fígado e no mesentério dos animais no grupo infectado sem tratamento e no grupo infectado e tratado. Em ambos os grupos o número de casais supera com grande significância os machos e fêmeas sozinhos. Quando comparado o grupo infectado e tratado com o grupo infectado sem tratamento, percebe-se um menor número de fêmeas.

Figura 17. Número de vermes adultos acasalados e separados em fêmeas e machos recuperados nos grupos Sm e Sm+HGPRT

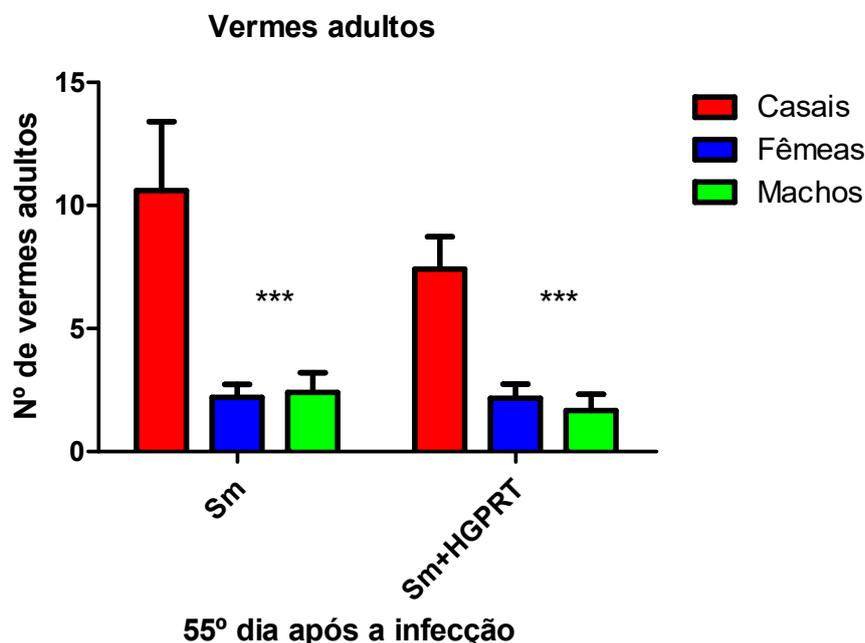


Figura 17. Recuperação de vermes adultos acasalados e separados, fêmeas e machos na veia porta do fígado e mesentério intestinal. Os dados representam a média \pm EPM ($n= 10-12$). O símbolo *** ($p<0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre fêmeas e machos quando comparados a casais.

Uma fêmea coloca em média 300 ovos por dia. A postura ocorre nos vasos capilares do intestino do hospedeiro, quando então passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes. Quando maduros, os ovos do *S. mansoni* medem 150 μ m (um micron equivale a um milésimo de milímetro) de comprimento por 65 μ m de largura, tamanho considerado grande (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Casais adultos de *S. mansoni* vivem nas vênulas do plexo hemorroidário e no sistema porta (HENRI et al., 2002), onde ocorre a oviposição. Cerca de 40% desses ovos são eliminados nas fezes, o restante adere-se no intestino, fígado e baço (SOUZA et al., 2011). Isso gera um processo inflamatório que é desencadeado pelos antígenos liberados dos ovos e favorece estímulos que promovem aumento do infiltrado celular, o que direciona células inflamatórias a formar granulomas ao redor dos ovos retidos, causando a morbidade (MEIRA et al., 1991).

Os resultados demonstram que o tratamento com a enzima HGPRT foi capaz de causar redução da carga parasitária e, conseqüentemente, interferir no ciclo de vida do verme, diminuindo a carga parasitária, infecção e suas conseqüências. Esse resultado é semelhante com outros estudos que utilizaram diferentes proteínas de *S. mansoni* para imunização, uma vez que não foram encontrados dados na literatura com Imunoterapia no modelo murino da esquistossomose utilizando enzimas da via de purinas de *S. mansoni* (MATSUMOTO, et al.; 1988; PEARCE, et al.; 1988; PORCHET, et al.; 1994; TENDLER, et al.; 1996; RIBEIRO DE JESUS, et al.; 2000; DA'DARA, et al.; 2001; AL-SHERBINY, et al.; 2003; 2004; FONSECA, et al.; 2005; NERIS, et al.; 2013).

4.3. Avaliação da resposta leucocitária em animais infectados com *S. mansoni* tratados ou não com HGPRT

4.3.1 Avaliação de leucócitos totais no LCP e sangue em animais infectados com *S. mansoni* tratados ou não com HGPRT

A figura 18 mostra a contagem total de leucócitos no LCP onde foi observado um aumento significativo na quantidade dessas células nos animais do grupo Sm quando comparados aos grupos controle (Controle e HGPRT). Isso comprova que a infecção foi efetiva, uma vez que houve um número maior de leucócitos nos animais no grupo infectado sem tratamento. E quando os animais receberam a imunoterapia os leucócitos apresentaram redução.

Figura 18. Número de leucócitos totais no LCP

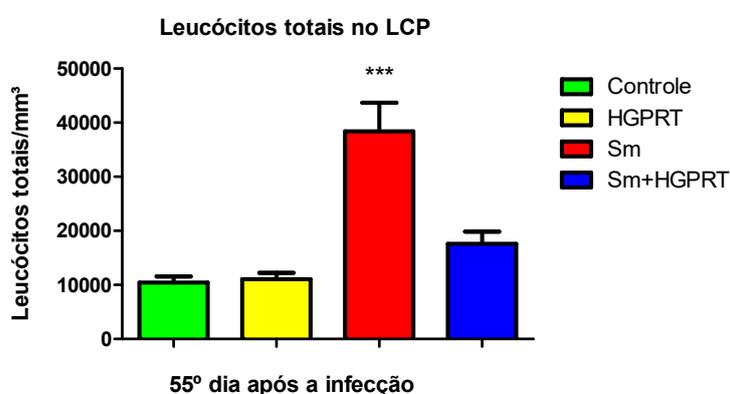


Figura 18. Contagem de leucócitos totais no LCP. Leucócitos totais/mm³ no LCP. Os dados representam a média ± EPM (n= 10-12). O símbolo *** (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre o grupo infectado não tratado com os dois controles.

A Figura 19 mostra a contagem total de leucócitos no sangue. Houve um aumento significativo dessas células nos animais do grupo Sm quando comparados aos animais dos grupos controle (Controle e HGPRT) e uma diminuição significativa entre o grupo Sm+HGPRT e o Sm.

Figura 19. Número de leucócitos totais no sangue

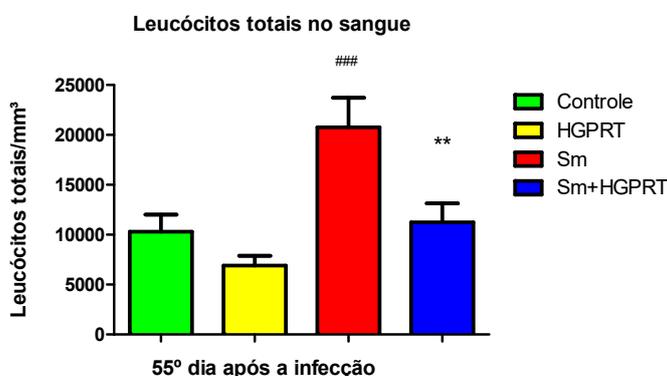


Figura 19. Contagem de leucócitos totais no sangue. Leucócitos totais/mm³ no LCP. Os dados representam a média ± EPM (n= 10-12). O símbolo ### (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado

obtido entre o grupo infectado não tratado com os dois controles e o símbolo **($p < 0,01$) representa a diferença significativa entre o grupo tratado e o infectado sem tratamento.

4.3.2 Avaliação de eosinófilos no LCP e no sangue

A figura 20 mostra a quantidade de eosinófilos no LCP. A Imunoterapia com HGPRT modulou o recrutamento de eosinófilos no LCP nos animais do grupo Sm+HGPRT quando comparado ao grupo Sm.

Figura 20. Número de eosinófilos no LCP

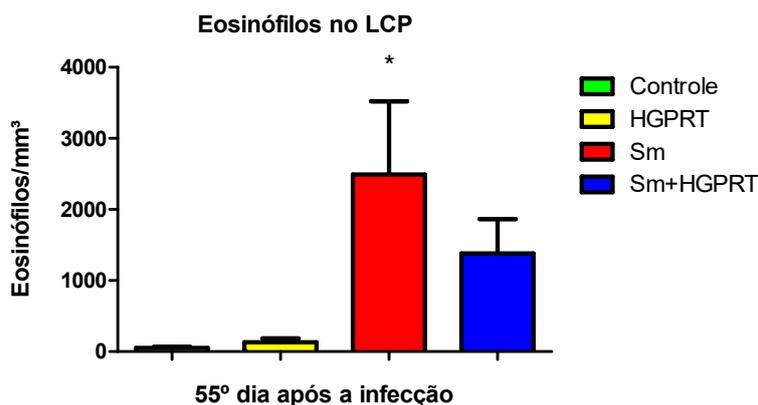


Figura 20. Contagem diferencial de eosinófilos no LCP. Eosinófilos/mm³ no LCP. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10-12). O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido entre o grupo infectado não tratado com os dois controles.

A figura 21 mostra a quantidade de eosinófilos no sangue. A Imunoterapia com HGPRT também modulou negativamente o número de eosinófilos no sangue dos animais do grupo Sm+HGPRT comparados ao grupo Sm, embora os resultados tenham sido mais discretos quando comparados ao LCP.

Figura 21. Número de eosinófilos no sangue

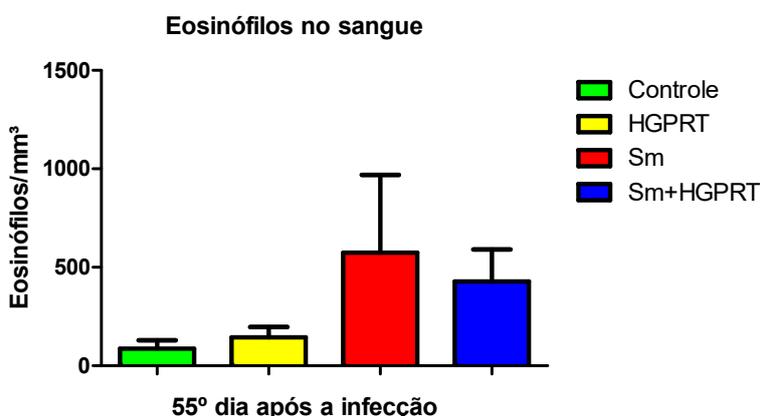


Figura 21. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue. Eosinófilos/mm³ no sangue. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10-12).

Algumas pesquisas demonstraram que o número de eosinófilo, durante a infecção com *S. mansoni* em compartimentos diferentes, como a medula óssea, sangue, lavado

peritoneal e órgãos, é maior na fase aguda e com altos níveis persistentes na fase crônica (LENZI et al., 1987). Então, nossos dados sugerem que houve uma modulação negativa no recrutamento dos eosinófilos, o que é compatível com a hipótese de que há uma possível diminuição no processo inflamatório levando indiretamente a um favorecimento na redução da fisiopatogênese na qual o eosinófilo está presente.

O processo inflamatório é um dos fatores que contribui para a morbidade, portanto, os eosinófilos são células fundamentais nesse mecanismo. Os Eosinófilos possuem grânulos específicos e substâncias farmacologicamente ativa e agem na defesa contra helmintos parasitas e na modulação do processo inflamatório. Essas células são menos numerosas que as outras em organismos saudáveis. 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 com o tratamento de 3 doses com 100 ug de HGPRT no LCP houve uma significativa diminuição no número de Eosinófilos no grupo Sm+HGPRT em relação ao grupo Sm (Figura 20). Isso sugere que a enzima HGPRT modulou a presença de eosinófilos no LCP.

A Imunoterapia utilizando a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni* pareceu estar auxiliando no controle da doença diminuindo a transmissão e interrompendo o ciclo de vida quando observado um menor número de ovos nas fezes dos animais no grupo tratado com a HGPRT. Também diminuiu a infecção quando analisado o número de vermes recuperados dos animais no grupo infectado e tratado. A Imunoterapia também modulou o processo inflamatório e a formação de granulomas quando analisados o número de eosinófilos no sangue e no LCP nos animais tratados.

5. CONCLUSÃO

A enzima HGPRT apresentou potencial para tratamento de esquistossomose mansônica em modelo murino. Os animais infectados e tratados com essa enzima apresentaram uma acentuada diminuição no número de ovos, o que é fundamental para a diminuição da morbidade relacionada à parasitose e transmissão da doença. Houve também uma diminuição na carga parasitária, o que leva à diminuição da infecção e uma modulação negativa no recrutamento de eosinófilos, modulando o processo inflamatório. Portanto, novas pesquisas com a utilização da HGPRT assim como as outras enzimas do metabolismo de nucleotídeos de *S. mansoni* devem ser estimuladas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248–254, 1976.

CAMPBELL, W.C.; REW, R.S. Chemotherapy of Parasitic Diseases. **Plenum Press**, New York, 1986.

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.

- CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.*, v. 77, p. 41-51, 2000.
- CIOLLI, D. et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int.J.Parasitol.**, v.34, p. 979-87, 2004.
- CIOLLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: na update. **Parasitol. Today**, v.14, p. 412-418, 1998.
- 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. **Trop. Med. Hyg.** v.83, p. 98-804, 1989.
- DA'DARA, A. A. et al. Immunizations with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. **Vaccine**, v. 20, p. 359-369, 2001.
- DINIZ, P.P. Estudo do potencial vacinal 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 Internúcleos 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. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 16, n. 2, p. 185-198, 1985.
- EMANUEL, A. PRATA, A. Comparação entre praziquantel e oxamniquine no tratamento da esquistossomose mansoni. **Rev. Soc. Bra. Med. Tro.**, v. 16, n. 2, p. 90-93, 1983.
- FATORI, A. C. M. Efeitos da imunização com Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) recombinantes de *Schistosoma mansoni*: Controle da infecção murina. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Programa De Pós-Graduação Em genética Evolutiva E Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.
- 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 22**, p.503- 510, 2004.
- FREIRE, B. F. A.; QUELUZ, T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **J Pneumol**, v. 21, p. 180-184, 1995.
- GOODMAN, A. G.; GILMAN, A.G. The Pharmacological Basis Therapeutics. **The Raw Hill**. 9A ED. CD-Rom VS. 1.0, 1996.
- GUDATT, T. W. et al. Crystal structure of free, IMP- and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase. **Protein Science**, v. 11, p. 1626-1638, 2002.
- HAGAN, P. et al. A Schistosomiasis control: **Keep taking the tablets Trends Parasitol**, n.20, p. 92-97, 2004.
- HELMY, A. C. et al. Microdialysis of cytokines: methodological considerations, scanning electron microscopy and determination of relative recovery. **J. Neurotrauma**, v. 26, p. 549-561, 2009.
- HENRI, S. et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease. **J. Immunol.** V. 169, n. 2, p. 929-936, 2002.
- 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 p. 14485- 14494, 1999.

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

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

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

KEOUGH, D.T.; et al. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. **Mol Biochem Parasitol**, v. 98, p. 29-41, 1999.

LENZI, H.L. LENZI, J. A. SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to intestinal lumen in schistosomiasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 3-4, p. 433-435, 1987.

LIANG, Y.S. et al. Genetic analysis os praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**, v.34, p. 274-280, 2003.

MALINSKY, R. et al. Punção aspirativa por agulha fina em tumores cervicais. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 3, p. 394-398, 2002.

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

MEIRA, S. L.; CAVALCANTI, A. L. C. The Modular object oriented Z specifications. **In [Nicholls]**, p. 173-192, 1991.

MELO, A, G. S. Epidemiologia da esquistossomose e conhecimento da população em área periurbana de Sergipe. 2001. 107 páginas. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, 2011.

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

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

MONZANI, P.S. et al. Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **BiochimBiophysActa**, v.1598, p. 3-9, 2002.

MOSER, D. M. et al. A 14-kDa *Shistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. **J. Biol. Chem.**, p. 8447-8454, 1991.

MUSICK, W.D., Structural features of the phosphoribosyltransferase and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. **CRC- Critical Review in Biochemistry**, v.11, p. 1-34, 1981.

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.

NERIS, D. M.; et al. Immunization with purine salvation pathway recombinant enzymes induces the production of anti-*Schistosoma mansoni* immunoglobulines. **Int. Trends Immun.**, v.1, n. 3, p. 49-56, 2013.

NEVES, D.P. Parasitologia humana. Atheneu, São Paulo. 2010.

PAIVA, F, P. MAFFILI, V, V. SANTOS, A, S. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Centro de Pesquisas Gonçalo Munis. Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Salvador, BA. 2005.

- PARISE-FILHO, R. SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 37, p. 123-135, 2001.
- PAX, R.; BANNETT, J.L FETTERER, R. A Benzodiazepine derivative and Praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Naunyn Schmiedebergs Arch. **Pharmacol**, v.304, n. 3, p. 309-315, 1978.
- PEARCE, E.J., MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 1988.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 499-509, 2002.
- PEREIRA, H.M. Relatório de Pesquisa: Ensaios de inibição enzimática e cristalografia de alvos protéicos de parasitas tropicais. Trabalho não publicado, 2009.
- PEREIRA, T. C. et al. Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Exp. Parasitol.**, v. 118, n. 4, p. 619-623, 2008.
- 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. 28, n. 22, p. 46-49, 2004.
- PICA-MATTOCCIA, L. CIOLLI, D. Sex- and stage related sensitivity os Schistosoma mansoni to in vivo na vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v.34, p. 527-533, 2004.
- PORCHET, E. A. et al. Tissue expression. Of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. **Parasitology**, v. 109, 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. **Prasitologia**. Editora Guanabara Kooga, 4 edição, 2008.
- RIBEIRO DE JESUS, A. I. et al. Human imune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infect. Immun.** v. 68, 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.
- 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.
- SENFT, A.W. et al Pathways os nucleotide metabolism in *Shistossomamansoni*. 3. Identification of enzymes en cell-free extracts. **BiochemPharmacol**, v. 22, p. 449-58, 1973.
- SOMOZA, J.R. et al Crystal structure of teh hypoxanthine-guanine-xantinephosphoribosyltransferase from the protozoan parasite Tritrichomonasfoetus – **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.
- TENDLER, M. et al. Vaccination against Schistosomiasis and Fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential basis of a multivalent anti-helminth vaccine? Mem Inst Oswaldo Cruz; Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, **Fiocruz**,v. 90, n. 02, p. 255-256,1995.
- TIMMERS, L F, S. M. Dinâmica Molecular da Hipoxantina-Guanina FosforribosilTransferase 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. **Nat. Med.**, v. 12, p. 835-840, 2006.

VARALDO, P. B. L. C. et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 3336-3343, 2004.

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

WANG, C. C. et al. Mol. **Biochem.Parasitol.** v.8, p.325- 337,1983.

WARREN KS. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 66, n. 3, p. 417-34, 1972.

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

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

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, 1996.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

nº 060/2013

Protocolo nº. 060/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação dos efeitos da imunoterapia pela enzima HGPRT em camundongos durante a infecção com Schistosoma mansoni*", submetido pelo pesquisador Fernanda de Freitas Anibal.

São Carlos, 7 de janeiro de 2014.

Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais