

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA - DMP

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Efeito da imunização com enzimas recombinantes do metabolismo de
nucleotídeos de *Schistosoma mansoni* sobre o desenvolvimento da
esquistossomose mansônica experimental**

DÉBORA MEIRA NERIS

São Carlos – SP

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA - DMP

**Efeito da imunização com enzimas recombinantes do metabolismo
de nucleotídeos de *Schistosoma mansoni* sobre o desenvolvimento da
esquistossomose mansônica experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

DÉBORA MEIRA NERIS

Orientadores: Prof^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Prof^o Dr. Richard Charles Garratt

Co-orientador: Dr. Humberto D’Muniz Pereira

São Carlos – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N446ei

Neris, Débora Meira.

Efeito da imunização com enzimas recombinantes do metabolismo de nucleotídeos de *Schistosoma mansoni* sobre o desenvolvimento da esquistossomose mansônica experimental / Débora Meira Neris. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

104 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Imunização. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Purinas. 5. Pirimidinas. 6. Enzimas recombinantes. I. Título.

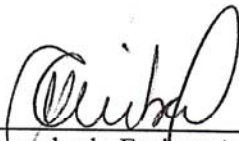
CDD: 660.6 (20^a)

Débora Meira Neris

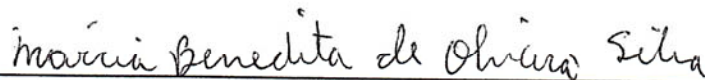
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/08/2012


BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Fernanda de Freitas Aníbal (Orientadora)
(UFSCar)



Prof.^a. Dr.^a. Márcia Benedita de Oliveira Silva (UFMT)



Prof.^a. Dr.^a. Maria Teresa Marques Novo (UFSCar)

Dedico este trabalho aos meus pais Cleusa Meira Neris e Valdemar de Oliveira Neris, aos meus irmãos Luciano de Oliveira Neris e Leandro de Oliveira Neris pelo apoio, incentivo e amor. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me dar paciência, força, permitindo superar obstáculos surgidos ao longo do caminho.

Aos meus queridos pais **Cleusa Meira Neris** e **Valdemar de Oliveira Neris**, me apoiaram em todos os momentos, sempre com muito amor, mesmo estando longe. Aos meus irmãos **Leandro de Oliveira Neris** mesmo tão distante, que me ajudou em tudo que eu precisei e ao meu irmão **Luciano de Oliveira Neris** juntamente com minha cunhada **Vânia Paula de Almeida Neris**, sem eles eu não teria conseguido chegar aonde eu cheguei, sem palavras para expressar meu grande agradecimento: **OBRIGADA! A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família** (*Léon Tolstoi*).

A minha orientadora **Profª Dra. Fernanda de Freitas Anibal** uma pessoa maravilhosa, que me aceitou como aluna em seu laboratório, obrigada pelos diversos ensinamentos, pela confiança, paciência em muitas ocasiões, e pela grande amizade. Tivemos uma convivência enriquecedora fora e dentro do LAP. Eu agradeço por tudo que você fez por mim!

Ao **Profº Dr. Richard Charles Garrat** pela grande contribuição no desenvolvimento desta pesquisa, abrindo as portas do seu laboratório, onde tive acesso a diversas técnicas experimentais e a muitos profissionais competentes.

Ao **Dr. Humberto D'Muniz Pereira**, co-orientador, pessoa que tive a honra de conhecer e de trabalhar, foi de extrema importância para esta pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos queridos novos amigos, com quem sempre troquei informações científicas, risadas, conversas, conselhos e muitas músicas. Vocês são especiais, e com cada um, aprendi muito sobre ciência, vida, amizade, obrigada por tudo: **Joice M. de Almeida Rodolpho, Laís Cristina de Souza, Naiara Naiana Dejani, Sandra Regina Pereira de Oliveira, Ricardo de Oliveira Correia e Danilo Arantes. Todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo** (*Voltaire*).

As **minhas amigas de Lucélia**, por todo o apoio antes mesmo desta caminhada se iniciar, pelo incentivo e momentos de desconcentração, saudades. **Há 2 espécies de chatos: os chatos propriamente ditos e ... os amigos, que são os nossos chatos prediletos.** (*Mario Quintana*).

A uma pessoa muito especial que entrou em minha vida, meu namorado **Felipe Adachi (Fe)**, me dando total apoio em todos os momentos, por sempre falar o que eu preciso ouvir e ser meu ombro amigo, obrigada por partilhar sua vida comigo, você torna meus dias mais felizes.

Gostaria de agradecer também a todos os professores e colegas do LAP, equipes de outros laboratórios e fomento, listados abaixo, por terem contribuído com o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

- Aos Professores: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues e Prof. Dr. Edson Soares, pelas valiosas contribuições que possibilitaram a realização deste trabalho.

- As equipes - técnicos dos laboratórios: Mara Brigoto, Ana Soares e Kelven Ulisses. E alunos: Ana Carolina Fattori, Vitor leão, Larissa Romanello e Juliana Torini.

- Ao CNPq que contribuiu com apoio financeiro.

A todos que tornaram este trabalho possível, fazendo tudo que podiam para facilitar meu trabalho e a convivência dia-a-dia. **MUITO OBRIGADA.**

Quanto tempo demora? - perguntou ele.

- Não sei. Um pouco.

Sohrab deu de ombros e voltou a sorrir, desta vez era um sorriso mais largo.

- Não tem importância. Posso esperar. É que nem maçã ácida.

- Maçã ácida?

- Um dia, quando eu era bem pequenininho mesmo, trepei em uma árvore e comi uma daquelas maçãs verdes, ácidas. Minha barriga inchou e ficou dura feito um tambor. Doeu à beça. A mãe disse que, se eu tivesse esperado as maçãs amadurecerem, não teria ficado doente. Agora, quando quero alguma coisa de verdade tento lembrar do que ela disse sobre as maçãs.

O Caçador de Pipas - Khaled Hosseini

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária, crônica e negligenciada que afeta milhares de pessoas ao redor do mundo, causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*. No hospedeiro infectado a doença é caracterizada pela presença do granuloma, resultado imunopatológico do infiltrado celular contra antígenos dos ovos. A quimioterapia atual é baseada no uso do Praziquantel (PZQ), usado contra todas as espécies de *Schistosoma* spp há mais de 30 anos. O principal problema é que o PZQ é praticamente inativo contra esquistossomulos imaturos e favorece o desenvolvimento de resistência das linhagens existentes. Um dos caminhos na busca por novos alvos terapêuticos é o estudo de enzimas que são essenciais para o *S. mansoni*. Em especial, sabe-se que as enzimas Adenilato Quinase 1 e 2 (ADK), Uridina Citidina Quinase 1 e 2 (UCK), Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase 1 (PNP) são encontradas nas vias metabólicas de nucleotídeos do parasito, participando do metabolismo de purinas e pirimidinas. A estratégia de utilizar enzimas do parasito na esquistossomose mansônica murina foi de avaliar uma resposta induzida por estas enzimas quando aplicadas em camundongos BALB/c e desafiados com cercarias de *S. mansoni*. Desta forma, avaliamos a fase crônica de camundongos imunizados e infectados com *S. mansoni*, onde foram analisadas amostras parasitológicas, hematológicas, sorológicas e fluidos da cavidade peritoneal. Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a imunização com essas enzimas, usando o modelo murino infectado com cercarias de *S. mansoni* e posteriormente avaliar a ação na oviposição e desenvolvimento de vermes adultos. Nossos resultados demonstraram que a imunização em camundongos Balb/c com a enzima UCK foi capaz de induzir uma resposta imune específica, a qual favoreceu a diminuição significativa da carga parasitária (vermes adultos). No entanto, não foi possível observar redução significativa no número de ovos eliminados. Em relação à imunização com as enzimas PNP e HGPRT os camundongos que receberam as imunizações com PNP e HGPRT tiveram redução no número de ovos por grama de fezes. Os dados obtidos são considerados interessantes e podem ser considerados novos alvos para a imunoterapia contra a esquistossomose mansônica. Dessa forma, novos ensaios deverão ser realizados com diferentes doses das enzimas para melhor avaliar como essas enzimas modulam a carga parasitária através da redução de ovos, diminuição na recuperação de vermes adultos, assim como os níveis de anticorpos durante a infecção murina pelo *S. mansoni*.

Palavras-chave: esquistossomose mansônica, imunização, Adenilato Quinase 1 e 2, Uridina Citidina Quinase 1 e 2, Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e Purina Nucleosídeo Fosforilase1

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is a neglected chronic parasitic disease that affects thousands of people worldwide, caused by the trematode *Schistosoma mansoni*. In the infected host the disease is characterized by the presence of granuloma, immunopathological response of the cellular infiltration against egg antigens. Thus, the host-parasite relation favors hepatosplenomegaly, acute and hepatic fibrosis. Current chemotherapy is based on the use of Praziquantel (PZQ), used against all species of *Schistosoma* spp for over 30 years. The main issue is that the PZQ is practically inactive against immature schistosomula and favors the resistance growth of the existent lineages, which makes the study for new drugs and vaccines that can contribute to the control of this disease even more urgent. One of the paths on the search for new therapeutic targets is the study of essential enzymes to the *S. mansoni*. In particular, it is known that the enzymes Adenylate Kinase 1 and 2 (ADK), Uridine cytidine Kinase 1 and 2 (UCK), Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) e Purine nucleoside phosphorilase 1 (PNP) are found on the metabolic pathways of the parasite's nucleotide, participating in the metabolism of purines and pyrimidines. Our goals in this study were to assess the immunization with these enzymes, using the *S. mansoni* cercariae – infected murine model, and subsequently analyze the acting in oviposition and growth of adult worms. Our results showed that the immunization in Balb/c mice with the UCK enzyme was capable of inducing a specific immune response, which favored a significant reduction of the parasitic load (adult worms). However, it was not possible to observe significant reduction in the number of eliminated eggs. Regarding the immunization with PNP and HGPRT enzymes, the mice had a reduction in the number of eggs per gram of feces. The data obtained are considered interesting and can be new targets for immunotherapy against schistosomiasis mansoni. Thereby, new assays must be made with different dosages of the enzymes for a better assessment on how these enzymes modulate the parasitic load through the eggs reduction, reduction in the adult worms retrieving, as well as the antibody levels during the murine infection by the *S.mansoni*.

Keywords: schistosomiasis mansoni, immunization, Adenylate Kinase 1 and 2, Uridine cytidine Kinase 1 and 2, Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase and Purine nucleoside phosphorilase 1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição da esquistossomose no Brasil.....	17
Figura 2. Ilustração fotográfica da população de região endêmica em uma área contaminada.....	18
Figura 3. Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 4. Vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	21
Figura 5. Caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i> mantidos no moluscário da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP- RP.....	22
Figura 6. Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> demonstrando a fase no hospedeiro mamífero e molusco.....	23
Figura 7. Delineamento experimental do ensaio de imunização com as enzimas e desafio com cercária de <i>Schistosoma mansoni</i>	37
Figura 8 - Imunização dos camundongos por via intraperitoneal.....	44
Figura 09 - Sangria por punção cardíaca.....	45
Figura 10 - Lavado da cavidade peritoneal (LCP).....	46
Figura 11 - Kit Kato-Katz: Contagem de ovos nas fezes.....	49
Figura 12. Contagem de ovos nas fezes.....	50
Figura 13. Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 48° dia após a infecção.....	53
Figura 14. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal no 48° dia após a infecção.....	56
Figura 15. Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 85° dia após a infecção.....	58
Figura 16. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal no 85° dia após a infecção.....	60
Figura 17. Dosagens de anticorpos no plasma de animais imunizados no 48° dia após a infecção.....	62
Figura 18. Dosagens de anticorpos no plasma de animais imunizados no 85° dia após a infecção.....	64
Figura 19. Número de vermes adultos acasalados e suas respectivas % de redução da carga parasitária no 48° dia após a infecção.....	66

Figura 20. Número de vermes adultos acasalados e suas respectivas % de redução da carga parasitária no 85° dia após a infecção.....	69
Figura 21 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	71
Figura 22 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	73
Figura 23 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	75
Figura 24 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	77
Figura 25 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	79
Figura 26 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	81
Figura 27 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	83
Figura 28 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac- Anticorpo

ATP- Adenosina Trifosfato

AMP- Adenosina Monofosfato

ADK- Adenilato Quinase

Ag- Antígeno

ANVISA- Agência de Vigilância Sanitária

Balb/c- Camundongo albino de linhagem isogênica

CMP- citidina monofosfato

D. O.- Densidade óptica

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA- Ensaio imunoenzimático

EPM- Erro padrão da média

FDA- Administração de Comidas e Remédios (*Food and Drugs Administration*) – Órgão americano (EUA) de controle para proteção e promoção de saúde

GMP- Guanosina Monofosfato

HGPRT- Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferase

IFN- Interferon, citocina

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina (citocina)

IPTG- Indutor de transcrição genética

IMP- Inosina Monofosfato

KOH- Hidróxido de potássio

LCP- Lavado da cavidade peritoneal

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAMPs- Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PNP- Purina Nucleosídeo Fosforilase

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

PCE- Programa de Controle da Esquistossomose

PZQ- Praziquantel

SEAs- Antígenos solúveis dos ovos

s.c.-Subcutânea

UCK- Uridina Citidina Quinase

UMP-Uridina monofosfato

Th- Células T auxiliaries (*helper*)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. Esquistossomose.....	16
1.2. <i>Schistosoma mansoni</i>	19
1.3. Vetores biológicos - hospedeiros intermediários.....	21
1.4. Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
1.5. Patogenia e resposta imune da esquistossomose.....	24
1.6. Quimioterapia contra o <i>Schistosoma. mansoni</i>	27
2. Metabolismo de purinas em <i>Schistosoma mansoni</i>	29
2.1 Enzimas da via <i>de salvação</i> de purinas de <i>Schistosoma mansoni</i>	30
2.1.1. Adenilato quinase (ADK).....	30
2.1.2. Purina nucleosídeo fosforilase (PNP).....	30
2.1.3. Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT).....	31
3. Metabolismo de pirimidinas em <i>Schistosoma mansoni</i>	32
3.1 Enzima da via <i>de salvação</i> de pirimidinas de <i>Schistosoma mansoni</i>	32
3.1.1 Uridina-citidina quinase (UCK).....	32
4. Imunização.....	33
5. Objetivos.....	36
5.1. Objetivo geral.....	36
5.1.1 Objetivos específicos.....	36
6. Material e Métodos.....	37
6.1 Delineamento.....	37
6.2 Animais.....	37
6.3 Obtenção das enzimas recombinantes ADK (1 e 2), UCK (1 e 2), HGPRT e PNP 1 de <i>Schistosoma mansoni</i>	38
6.3.1 Expressão das enzimas recombinantes HGPRT, UCK 2 e ADK 2 de <i>Schistosoma mansoni</i>	38
6.3.2 Expressão das enzimas recombinantes ADK 1, UCK1 e PNP 1.....	39
6.3.3 Purificação das enzimas recombinantes ADK (1 e 2), UCK (1 e 2) , HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i>	39
6.3.4 Purificação da enzima PNP1 de <i>Schistosoma mansoni</i>	40

6.3.5 Análise das enzimas purificadas	41
6.4 Obtenção das larvas (cercárias) infectantes do <i>Schistosoma mansoni</i>	41
6.4.1 Infecções dos camundongos com larvas infectantes (cercárias) do <i>Schistosoma mansoni</i>	41
6.5 Adjuvante Hidróxido de Alumínio.....	42
6.6 Imunização dos camundongos.....	42
6.7 Avaliação celular.....	44
6.7.1 Obtenções dos leucócitos do sangue.....	44
6.7.2 Obtenções dos leucócitos do lavado da cavidade peritoneal (LCP).....	44
6.7.3 Contagem dos leucócitos totais do lavado LCP e do sangue.....	45
6.8 Ensaio Imunoenzimático – ELISA indireto.....	46
6.8.1 Para detecção de anticorpos.....	46
6.9 Avaliação da carga parasitária.....	47
6.9.1 Recuperação de vermes adultos acasalados do sistema porta-hepático.....	47
6.9.2 Contagem de ovos nas fezes	48
6.9.3 Recuperação de ovos no intestino e no fígado.....	50
6.10 Análise estatística.....	51
7. Resultados.....	52
7.1 Avaliação Celular.....	52
7.1.1 Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 48° dia após a infecção.....	52
7.1.2 Contagem diferencial de eosinófilos no 48° dia após a infecção.....	55
7.1.3 Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 85° dia após a infecção.....	57
7.1.4 Contagem diferencial de eosinófilos no 85° dia após infecção.....	59
7.2 Avaliação da resposta humoral no 48° dia após a infecção.....	61
7.2.1 Avaliação da resposta humoral no 85° dia após a infecção.....	63
7.3 Número de vermes adultos acasalados recuperados no 48° dia após a infecção.....	65
7.3.1 Número de vermes adultos acasalados recuperados no 85° dia após a infecção.....	68
7.4 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	70

7.4.1 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	72
7.4.2 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	74
7.4.3 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 47° e 48° dias de infecção.....	76
7.4.4 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	78
7.4.5 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	80
7.4.6 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	82
7.4.7 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 84° e 85° dias de infecção.....	84
8. Discussão.....	86
9. Conclusões.....	92
10. Referencias	93
ANEXO 1.....	104

1. Introdução

1.1 Esquistossomose

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nas áreas tropicais e subtropicais, a esquistossomose é a segunda doença parasitária de maior prevalência em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública, superada apenas pela malária. Atualmente aproximadamente 779 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco, em 77 países onde a doença é endêmica (WHO, 2012).

A esquistossomose, conhecida popularmente como bilharziose, xistose, doença do caramujo ou barriga d'água, é causada por um platelminto do gênero *Schistosoma*, que afeta as populações mais pobres dos países subdesenvolvidos ou emergentes (HOTEZ & FERRIZ, 2006). A doença tem como principais agentes etiológicos o *Schistosoma haematobium* encontrado na África, *Schistosoma japonicum*, no sudeste Asiático e no Pacífico ocidental e *Schistosoma mansoni* presente na África, na América do Sul e nas Antilhas (REY, 2008). Os sintomas da doença dependem do parasito infectante. O *S. haematobium* é o causador da esquistossomose urinária e os *S. mansoni* e *S. japonicum* são os responsáveis pela esquistossomose intestinal e hepatoesplênica (NEVES, 1995).

Acredita-se que, as espécies do gênero *Schistosoma* foram introduzidas nas Américas devido ao tráfico de escravos e imigrantes asiáticos (DESPRÉS et al., 1993). Apesar de haver a detecção de indivíduos parasitados pelo *S. japonicum* e *S. haematobium*, apenas o *S. mansoni* permaneceu no continente por causa dos bons hospedeiros intermediários e da existência de ambientes favoráveis, tais como: características físico-químicas da água, leito lodoso ou rochoso, vegetação enraizada ou flutuante mais próxima às margens, entre outros (PARAENSE, 1972). No Brasil, estima-se que 6 milhões de pessoas estejam infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), e a doença está distribuída em 18 estados (Figura 1), com maior prevalência nas regiões Nordeste e Sudeste; e mais de 25 milhões de brasileiros vivem em áreas endêmicas, sendo os estados de Minas Gerais e Bahia os que apresentam maior incidência. (KATZ & PEIXOTO, 2000; BINA & PRATA, 2003).

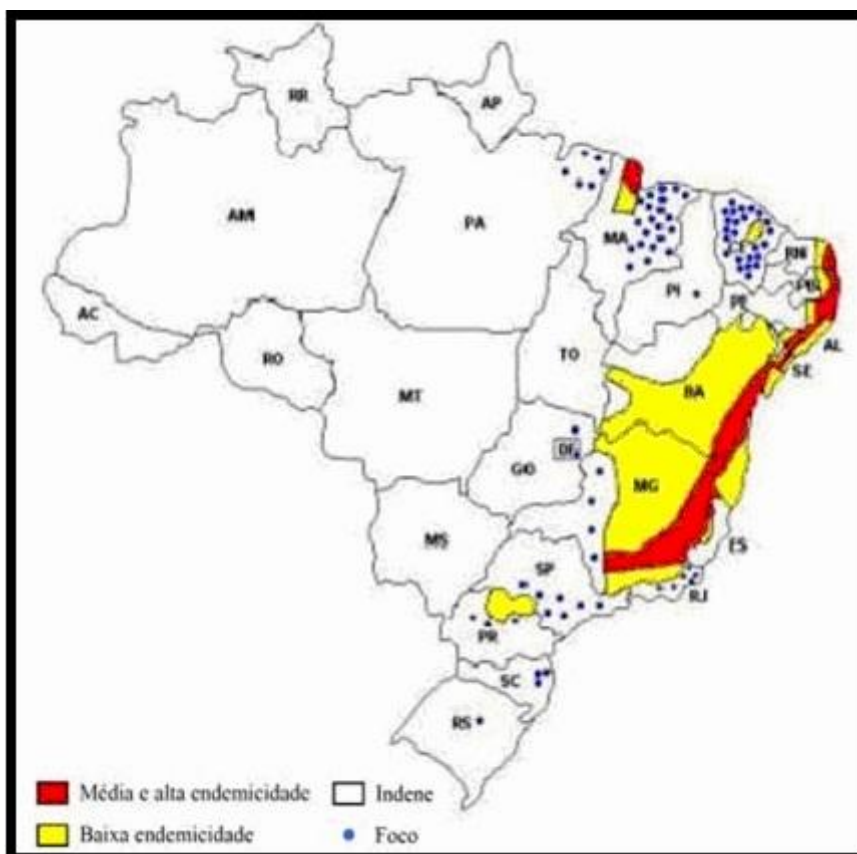


Figura 1. Distribuição da esquistossomose no Brasil.

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

A esquistossomose é uma das doenças negligenciadas que ocorrem no Brasil. Tais doenças, na maioria das vezes, são tropicais, infecciosas e ainda não possuem tratamentos eficazes com cura efetiva. Atinge principalmente a população de baixa renda, o que torna difícil o interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver pesquisas para o seu tratamento (DNDi, 2009).

A expansão da esquistossomose no Brasil está relacionada ao fluxo migratório interno dos trabalhadores para outras regiões e à presença de moluscos predispostos à hospedar miracídeos para o desenvolvimento da cercária (MACHADO, 1977). No entanto, a prevalência da doença teve um decréscimo significativo entre o final da década de 1970 e 2002. Também ocorreu uma diminuição na morbidade e mortalidade consequentes da doença, pela implementação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), criado em 1975 pela Secretaria de Vigilância Sanitária e pelo uso de altas doses individuais de oxaminiquine e de praziquantel. O PCE teve ótimos resultados no controle da esquistossomose e um sucesso relativo na redução da sua prevalência e dos focos isolados. Porém, o PCE não foi capaz de diminuir a prevalência

a menos de 5%, nem de interromper a transmissão da doença (COURA & AMARAL, 2004). Mesmo existindo um fármaco contra o parasito, o medicamento não impede a reinfecção em regiões endêmicas, havendo a necessidade de tratamentos repetitivos. Por isso, a busca para o controle da esquistossomose compreende várias medidas: quimioterapia e vacina (OLIVEIRA et al., 2008), construção da infra-estrutura de recursos hídricos, educação sanitária e a conscientização da população do problema em relação aos hábitos domésticos (FILHO, 2001). De acordo com KATZ (1999), o controle ideal da doença seria interromper o ciclo evolutivo do parasito, pois, apenas o tratamento das populações infectadas é insuficiente.

Um estudo realizado em áreas litorâneas de Pernambuco mostrou que a diversidade de fatores ecológicos pode contribuir para que o molusco *Biomphalaria glabrata* se adapte em águas com um grau de salinidade acima do normal, podendo aumentar as possibilidades de expansão da doença (SILVA et al, 2006). Sendo assim, é necessário a busca de novos alvos terapêuticos para o controle dessa enfermidade.



Figura 2. Ilustração fotográfica da população de região endêmica em uma área de risco e contaminada.

Fonte: Adaptado de: CARVALHO et al., 2008.

1.2 *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* é um membro da família *Schistosomatidae*, da classe *Trematoda* e da subclasse *Digenea*. O parasito apresenta dimorfismo sexual na fase adulta e há indícios de que o sexo do helminto é determinado nos cromossomos no ovo fertilizado (RIBEIRO-PAES & RODRIGUES, 1997).

Pela microscopia eletrônica, o ovo (figura 3) foi descrito como uma casca protéica com uma densa série de microespinhos na sua parte externa e, na sua parte interna, com maior conteúdo correspondente às células vitelínicas com citoplasma rico em mitocôndrias, vesículas de vários tipos, gotículas de gordura e uma membrana que envolve o miracídio. (SILVA et al., 2008).



Figura 3. Ovo de *S. mansoni*.

Fonte: Adaptado de

<<http://www.imagefree.org/freeimage/ViewImage.aspx?imageId=53966>>

Os vermes adultos vivem no interior dos vasos sanguíneos de mamíferos e obtêm a maior parte dos nutrientes pela ingestão de sangue. O tegumento também está envolvido nessa nutrição; sua superfície tegumentar parece um epitélio digestivo-absorvedor contendo vários tubérculos, pregas e espinhos (CHAPPEL, 1993). Na década de 70, trabalhos demonstraram que a maior parte da alimentação dos Schistosomas se dá pelo tegumento, transferindo pequenas moléculas por transporte ativo ou passivo. Nesse mesmo sentido, trabalhos sobre o proteoma do tegumento de *S. mansoni* mostraram aquaporinas e proteínas transportadoras de íons (BRASCHI et

al., 2006a, 2006b). Devido a ausência de uma abertura anal no final do tubo digestivo, os parasitos regurgitam suas excretas. (LAWRENCE, 1973).

O macho de *S. mansoni* (figura 4.2) mede cerca de 1,0 cm de comprimento e apresenta a coloração branca. Na extremidade anterior, possui uma ventosa oral afunilada que permite a fixação do parasito, e próxima desta, uma segunda ventosa, o acetábulo. O curto segmento anterior compreendido entre as duas ventosas é cilíndrico e mais fino que o segmento posterior. Este é muito mais longo, formando um tubo longitudinal, conhecido como o canal ginecóforo, onde, nele, costuma-se abrigar a fêmea (REY, 2001).

A fêmea (figura 4.1) com 1,2 a 1,6 cm de comprimento, possui corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que a do macho. Possui uma coloração escura e acinzentada devido à presença, no tubo digestivo, de um pigmento derivado da digestão do sangue (hemozoína). Tem duas ventosas pequenas, estando a ventosa acetabular, pedunculada, muito perto da oral. As fêmeas põem um ovo por vez, estimando-se que o total seja de 300 ovos diários. Os ovos medem 110 a 180 μm de comprimento por 45 a 70 μm de largura, possui um pólo anterior delgado e o posterior mais volumoso, com um espinho lateral saliente e agudo em suas proximidades. (REY, 2001).

O tegumento do verme adulto exhibe pequenos tubérculos, com maiores concentrações na superfície dorsal do segmento posterior, e minúsculos espinhos situados na superfície interna das ventosas (REY, 2001). Portanto, as proteínas secretadas e expressas pelo parasito em suas superfícies que possam causar uma resposta imune, são alvos promissores para a busca por uma candidata a vacina antielmíntica (WILSON, et al., 2004).

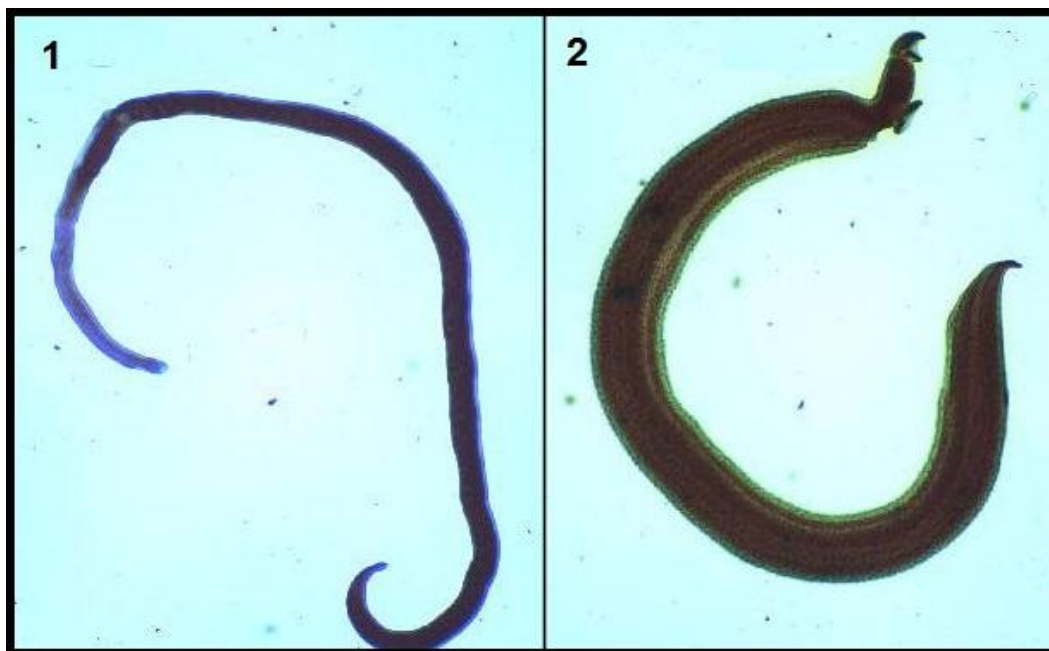


Figura 4. Vermes adultos de *S mansoni*, fêmea (1) e macho (2).

Fonte: Adaptado de: < <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/trematodes.htm>>

1.3 Vetores biológicos - hospedeiros intermediários

Os moluscos hospedeiros pertencem ao gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910), foram descritas no Brasil cerca de 10 espécies, dentre elas, três principais transmissoras da doença: *B. glabrata*, *B. straminea*, *B. tenagophila* (REY, 1991). Os moluscos habitam desde grandes lagos até pequenos brejos, córregos e poços rasos. Apesar da presença dos caramujos ser frequentes em águas naturais, sua densidade populacional costuma ser maior em criadouros artificiais, como vala de drenagem pluvial, canais, e outros (REY, 2001).

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* (figura 5) são hermafroditas simultâneos e se reproduzem por fecundação cruzada ou por autofecundação (PARAENSE, 1955). Quando ocorre a seca, dessecam, mantendo-se vivos, recolhidos à concha, em estágio fisiológico vegetativo, até a próxima estação úmida. (TUAN & SIMÕES, 1989). O número de cercárias produzidas varia de acordo com a espécie de molusco hospedeiro, sendo maior em *B. glabrata*, que pode eliminar cerca de 1.000 a 3.000 cercárias de *S. mansoni* por dia e mais de 100.000 durante toda a vida (REY, 2001).

O *B. glabrata* é o principal hospedeiro do *S. mansoni* no Brasil, não apenas pelo alto grau de suscetibilidade de suas populações ao parasito, mas também pela

distribuição geográfica em toda faixa costeira do Nordeste e em algumas regiões do Centro e Sul (NEVES, 2010).



Figura 5. Caramujos *B. glabrata* mantidos no moluscário da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP- RP.

Fonte: NERIS, D.M e CORREIA,R.O. 2011.

1.4 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* é compreendido por várias etapas: a transmissão do parasito necessita da presença do portador humano contaminado, eliminando ovos nas fezes; da existência de hospedeiro intermediário, o molusco, e finalmente, do contato do homem com águas contaminadas com cercárias (REY, 2001). O ciclo de vida do *S. mansoni* possui duas fases, uma fase assexuada que ocorre num hospedeiro intermediário, um molusco do gênero *Biomphalaria* no caso do *S. mansoni*, e uma fase sexuada em um hospedeiro mamífero. Quando há a liberação de ovos de *Schistosoma* nas fezes de indivíduos infectados (figura 6), os miracídios eclodem e são liberados no meio. Os miracídios possuem receptores sensoriais e procuram caramujos de água doce. Depois dos miracídios penetrarem no molusco, transformam-se em esporocistos e

diferenciam para liberação como cercárias no próximo estágio. As cercárias entram em contato com a pele humana, as mesmas, penetram utilizando enzimas e movimentos. Após a penetração no hospedeiro definitivo, perdem a cauda, diferenciando-se em esquistossômulos, percorrendo a corrente sanguínea, passando pelos pulmões, fígado e, finalmente vão para as veias do intestino ou da bexiga. No decorrer desse processo, os esquistossômulos maturam, tornando-se vermes adultos, dióicos, pareados. Após a fêmea depositar os ovos nas pequenas vênulas intestinais, eles rompem as vênulas utilizando espinhos e enzimas e vão em direção à luz intestinal e são liberados nas fezes do hospedeiro, reiniciando o ciclo (RUPPERT & BARNES, 1996).

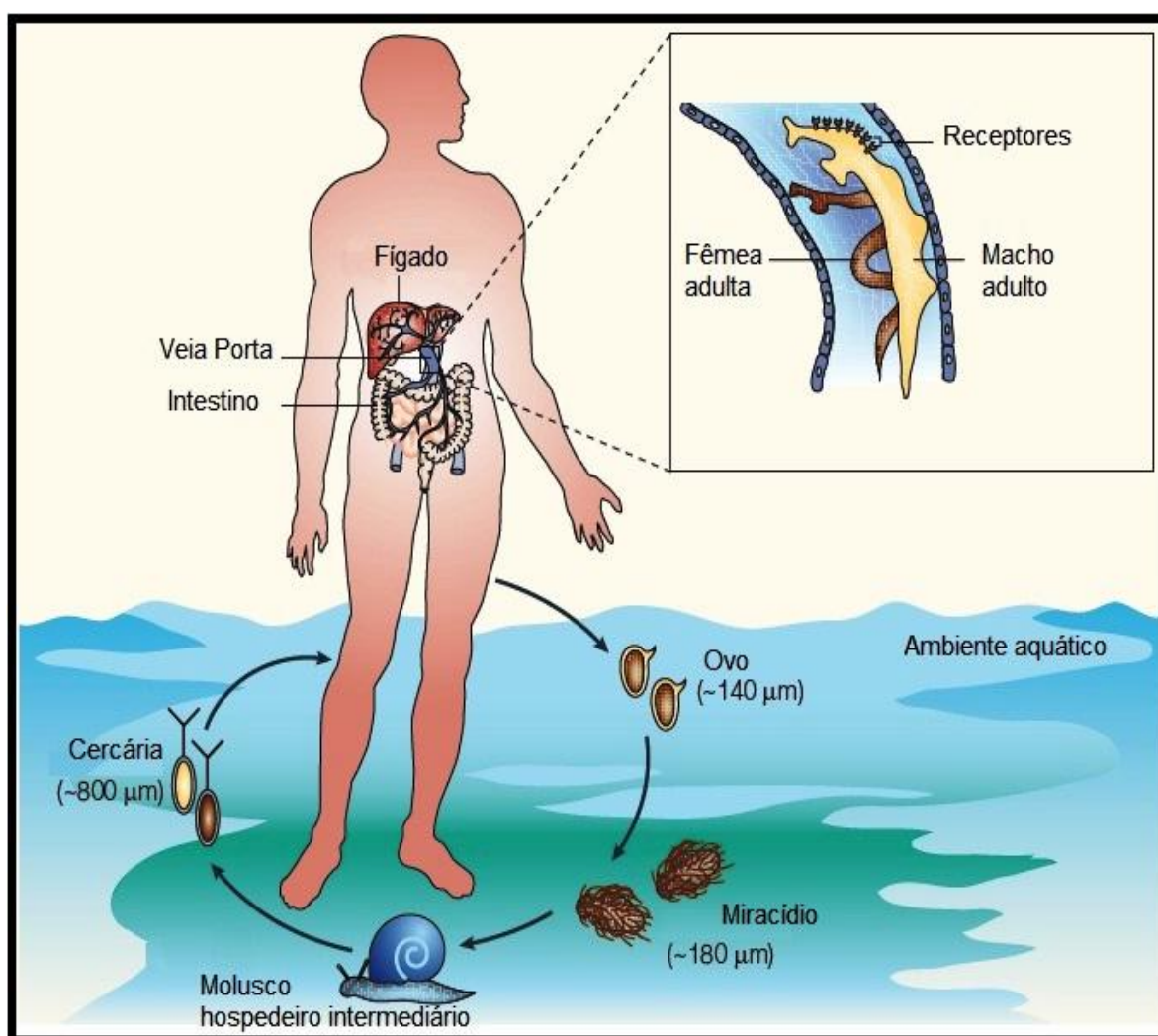


Figura 6. Ciclo de vida do *S. mansoni* demonstrando a fase no hospedeiro mamífero e molusco.

Fonte: Adaptado de: DAVID W. DUNNE e ANNE COOKE, 2005.

1.5 Patogenia e resposta imune da esquistossomose

A patogenia da esquistossomose mansônica depende de uma série de fatores: linhagem do parasito, idade do hospedeiro, estado nutricional, imunidade e, principalmente, a carga parasitária (KATZ& ALMEIDA, 2003).

Assim que, as cercárias penetram na pele, a dermatite cercariana é um dos primeiros sinais apresentado pelo indivíduo. Essa alteração é caracterizada por erupções cutâneas, edema, pequenas pápulas dolorosas e coceira intensa (KOLAROVA, 2007). No decorrer do desenvolvimento dos parasitos à esquistossômulos, após a segunda semana de infecção, eles já se apresentam no pulmão e no fígado, podendo levar o indivíduo a ter febre, esplenomegalia e sintomas pulmonares. Dessa forma, a maturação dos esquistossômulos nos capilares hepáticos pode levar a lesões no tecido hepático, causando a hepatite esquistossomótica, mesmo antes da fase de postura de ovos. (BOROS, 1989; NEVES, 2002).

Aproximadamente 50 dias após a infecção, os vermes adultos acasalados se encontram no plexo mesentérico e iniciam a posturas dos ovos. Estes se disseminam principalmente na parede do intestino podendo ocasionar áreas de necrose e enterocolite aguda. No fígado e em outros órgãos, provocam a formação de granulomas, juntamente com outros sintomas. Esse período agudo tem duração de aproximadamente 120 dias após a infecção. A fase crônica da doença pode apresentar variações clínicas como: dor abdominal, diarreia muco-sanguinolenta, constipação constante, fibrose nas alças intestinais, gerando uma diminuição do peristaltismo. Além dos sintomas acima ocorrem também alterações hepáticas com o início da oviposição do parasito e, conseqüentemente, a formação do granuloma (CALDAS et al., 2008; MANZELLA et al., 2008).

O granuloma é formado por diversas células inflamatórias do sistema imune, 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, deixando placas fibrosas em seu lugar, aumentando a pressão sanguínea portal assim como o diâmetro da veia porta. (LENZI et al., 2008; PEARCE & MACDONALD, 2002).

O processo granulomatoso na esquistossomose depende dos linfócitos TCD4+ e requer recrutamento e acumulação de células inflamatórias no sitio de

deposição dos ovos. Os granulomas são compostos principalmente por macrófagos, eosinófilos e linfócitos (CHEEVER et al., 2002). As células podem desencadear uma resposta Th1, com produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ ; ou uma resposta Th2, com secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 e também por outras citocinas como IL-6 e IL 10 (ABATH et al., 2006; BOROS & WHITFIELD, 1998; HOFFMAN et al., 2002; PEARCE & MACDONALD, 2002).

Citocinas do tipo Th1 ativam a resposta inflamatória e induzem a hipersensibilidade tardia, já as citocinas do tipo Th2 estimulam a produção de anticorpos, particularmente IgE e aumentam a proliferação de eosinófilos. Os eventos imunológicos descritos para a fase aguda pré-ovular incluem hipersensibilidade mediada por anticorpos IgE, resposta imune celular e humoral antiesquistossômulos (IgM e/ou IgG) e anticorpos contra antígenos de ovos e vermes adultos. (RABELLO, 1995). Na fase aguda da esquistossomose, a resposta celular de linfócitos T auxiliares é claramente Th1, dominada por alta produção de citocinas próinflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, e baixa produção das citocinas Th2 como IL-4 e IL-5. (ARAÚJO et al., 1996).

O papel do IFN- γ , na esquistossomose murina parece estar relacionado à morte de esquistossômulos, sendo que experimentos *in vitro* demonstraram o envolvimento de macrófagos na morte destas larvas. Além disso, a administração de anticorpos anti-IFN- γ em camundongos vacinados com cercárias atenuadas diminuiu parcialmente a proteção contra a infecção. (SMYTHIES et al.,1992).

Em estudos sobre a resposta imune celular foram observadas intensa resposta proliferativa direcionada contra antígenos derivados de ovos (SEA) e fraca resposta direcionada contra antígenos de preparações de vermes adultos (SWAP). Entretanto, na fase crônica da esquistossomose a resposta imune celular e humoral contra SWAP torna-se predominante. Além disso, a resposta contra SWAP é dependente da parasitemia, apresentando-se reduzida em indivíduos com altas cargas parasitárias. (ELLNER et al.,1981).

A progressão natural da doença gera a resposta imune do tipo Th2 induzida pelos antígenos do ovo de *S. mansoni*, a qual é capaz de regular de forma negativa a produção e as funções efetoras dos mediadores liberados na fase aguda da doença, com a participação importante da interleucina IL-10 (uma citocina regulatória) neste processo. (MONTENEGRO et. al., 1999). Embora, o início da resposta Th2 pareça ter um papel crucial na modulação da resposta inflamatória da fase aguda, uma resposta Th2

prolongada contribui para o desenvolvimento de fibrose hepática e aumenta a morbidade da doença. (CHEEVER, et. al., 2000). Como consequência da resposta Th2, ocorre aumento do número de eosinófilos, mastócitos e produção de anticorpos IgE. Os antígenos parasitários funcionam como potentes alérgenos e isso poderia explicar os níveis elevados de IgE policlonal, IgG1 e IgG4 encontrados nos indivíduos infectados de área endêmica. Apesar da elevada produção de IgE e da presença de mastócitos e eosinófilos, em indivíduos cronicamente infectados pelo *Schistosoma* residentes em 24 área endêmica não se observam fenômenos de anafilaxia, provavelmente devido a fatores moduladores da resposta imune induzidos pelo parasito, a exemplo da produção de IL-10. (HUSSAIN et. al., 1992).

Na fase crônica da esquistossomose no qual prevalece a resposta Th2, os títulos de anticorpos IgG1, IgE e IgG4 tem sido amplamente demonstrado que interleucinas podem influenciar na seleção de classes e subclasses destas imunoglobulinas, produzidas por células B. (FINKLEMAN et al., 1990). A citocina IL-4, secretada pelas células Th2, induz as células B a secretarem IgG1, enquanto que a IFN- γ , citocina do tipo Th1, aumenta a produção de IgG2a. A produção de anticorpos IgE e IgG4 é dependente inicialmente de IL-4 ou IL-13 produzidos por células Th2. (AKDIS et al., 1997).

Vários trabalhos também demonstraram um aumento na relação IgG4:IgE em pacientes com altas cargas parasitárias. Além disso, um estudo avaliando a resposta imune humoral contra antígenos de *S. mansoni* demonstrou padrões de agregação familiar na resposta dos isotipos IgE e IgG4 específicos, reforçando o papel destes anticorpos na resistência/susceptibilidade à esquistossomose. (BETHONY et al., 1999). Entretanto, o papel biológico destas imunoglobulinas na infecção por *S. mansoni* ou por outros helmintos ainda não está claro. Porém, as evidências sugerem que IgG4 pode interferir na imunidade protetora adquirida por bloquear a ativação específica da cascata do complemento competindo com IgG1 e, também, por bloquear a degranulação de mastócitos ao competir com a ligação de IgE aos antígenos do parasito. (BUTTERWORTH et al., 1987). Esta hipótese é favorecida pelas características bioquímicas do isotipo IgG4 que não apresenta sítios de ligação para proteínas do sistema do complemento na sua porção Fc, além de apresentar a capacidade de se ligar a mastócitos sem, contudo, induzir o processo de degranulação. (BURTON & WOOF, 1992; JEFFERIS et al. 1995).

1.6. Quimioterapia contra o *Schistosoma. mansoni*

A utilização de diferentes fármacos sobre a resposta parasitêmica tem sido estudada em vários modelos experimentais. Dentre os medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose mansônica estão o Praziquantel (PZQ) e o Oxamniquine (REY, 2001).

O Praziquantel é usado contra todas as espécies de *Schistosoma* e só é eficaz contra vermes adultos e, além disso, diversos casos de resistência têm sido descritos (LIANG et al., 2003; CIOLI et al., 2004). Sabe-se que o medicamento é absorvido pelo verme adulto por difusão simples, promovendo aumento da permeabilidade da membrana celular ao cálcio, gerando contrações tetânicas, seguidas de paralisia muscular. Após, observa-se vacuolização e desintegração do tegumento, o que causa a morte do parasito. (PAX et al., 1978; CAMPBELL & REW, 1986; GOODMAN & GILMAN, 1996).

Uma grande preocupação de todos os medicamentos antihelmínticos e antibióticos é a resistência, e os primeiros relatos de resistência ao tratamento com o PZQ vieram do Senegal em 1995, onde o medicamento produziu taxas de cura muito baixas (18-39%). Essa suspeita foi confirmada com tratamento posterior dos indivíduos com Oxamniquine, que com doses baixas (20mg) levou a uma taxa satisfatória da cura (79%) (CIOLI, 1998; PICA-MATTOCCHIA & CIOLI, 2003; HAGAN et al., 2004).

Mesmo tendo um fármaco contra a doença, o índice de indivíduos contaminados pelo *S. mansoni* ainda é muito alto, pois o medicamento não impede a reinfeção em regiões endêmicas, havendo a necessidade de tratamentos repetitivos; o que torna necessário novas buscas por medicamentos. Dessa forma, o Projeto Genoma de *Schistosoma mansoni* que se iniciou em 1992, juntamente com o laboratório do Prof^o Sérgio Danilo Pena (ICB-UFMG-BRASIL), Dr Andrew Simpson (René Rachou-FIOCRUZ-BRASIL) e do Instituto de Pesquisa de Genoma (EUA), teve como principal objetivo o de descobrir genes de interesse para melhor compreender a biologia do parasito e também de desenvolver novos antígenos para vacinas ou alvos protéicos para novos fármacos. Apesar da disponibilidade de quimioterapia, a esquistossomose continua sendo uma das principais infecções parasitárias que afeta o ser humano, sem ainda nenhuma imunização efetiva.

Algumas imunizações para a esquistossomose mansônica com proteínas já estão em fase de teste clínicos, entre elas estão a proteína de membrana Sm TSP-1 encontrada

no tegumento apical da membrana do parasito que induziu uma redução de 30% a 50% contra vermes adultos e >50% contra ovos (TRAN, et al., 2006). A paramiosina Sm97 proteína do tegumento do esquistossômulo e de musculatura de vermes adultos, a qual induziu uma ação contra vermes adultos e apresentou redução de 30% a 50% (AL-SHERBINY et al., 2003; CORREA-OLIVEIRA et al., 1989; MATSUMOTO, et al., 1988; PEARCE et al., 1988). A proteína glutathione S-transferase Sm28 (GST) encontrada no corpo inteiro do parasito induziu uma ação contra vermes adultos e ovos com diminuição da carga parasitária de 30% a 50% (PORCHET et al., 1994). A proteína Sm14 encontrada no corpo todo do parasito (citossólico) induziu uma ação que atingiu vermes adultos com redução >50% (AL-SHERBINY et al., 2003; MOSER, et al., 1991; TENDLER, et al., 1996; FONSECA, et al., 2005; VARALDO et al., 2004). A proteína Sm23 encontrada no tegumento apical da membrana induziu uma ação contra vermes adultos com redução de 30% a 50% da carga parasitária (AL-SHERBINY et al., 2003; DA'DARA, et al., 2001; RIBEIRO DE JESUS et al., 2000). Devido a essas proteínas já estarem sendo utilizadas em testes clínicos, a busca por novos antígenos é de grande interesse para que novos conhecimentos sejam gerados a fim de, contribuir com os novos estudos que estão sendo realizados.

Dessa forma, um dos caminhos para novos alvos terapêuticos são de enzimas em vias essenciais do *S. mansoni*, sendo que as abordagens mais utilizadas são: cristalização, inibição e imobilização enzimáticas (PEREIRA, et al., 2003; WANG, et al., 2002), além de estudos com proteínas recombinantes (LEVANO-GARCIA, et al., 2008).

A escolha das enzimas ADK (1 e 2), UCK (1 e 2), PNP 1 e HGPRT para este estudo decorreu destas terem apresentado resultados promissores em nosso laboratório e outros fatores como: da parceria do nosso laboratório (LAP-UFSCar) com o Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), de estas enzimas participarem da via *de salvação* de purinas e pirimidinas, via essencial para a sobrevivência do *S. mansoni*, e da literatura não apresentar dados suficientes para responder os questionamentos sobre os mecanismos de ação dessas enzimas.

As enzimas atuam intracelularmente e não foram encontrados na literatura trabalhos que comprovem sua exposição ou secreção pelo *S. mansoni*. Porém, existem estudos que relatam a secreção da enzima Nucleosídeo Difosfato Quinase (NDPK) que também atua intracelularmente, por patógenos procariotos, como demonstrado por Zaborina e colaboradores, 1999, nos quais observa-se a secreção dessa enzima pelo

Mycobacterium bovis, *Pseudomonas aeruginosa*, bem como Punj e colaboradores 2000, observaram a secreção por *Vibrio cholerae*.

Algumas pesquisas utilizaram algumas dessas enzimas recombinantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos. PENG et al.; (2004) demonstraram em soros de coelhos infectados com cercárias de *Schistosoma japonicum* uma resposta imunológica positiva, após a imunização com a enzima Adenilato Quinase. Em 2008, a técnica de RNAi reforçou a importância da enzima Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) para a sobrevivência do parasito. Pequenos RNAs de interferência (RNAsi) foram produzidos contra HGPRT, injetados após 70 dias de infecção com cercárias em camundongos, sendo o número de vermes contado seis dias após a injeção. O número total de parasitos foi reduzido em aproximadamente 27% após o tratamento (PEREIRA et al., 2008). Desse modo segue a hipótese de que as enzimas da via de purinas e pirimidinas, por mecanismo ainda desconhecido, parecem modular a infecção por *Schistosoma* em diferentes espécies.

Desta forma, encontrar um entendimento melhor da resposta imune é essencial, abrindo novas possibilidades na terapia preventiva e/ou terapêutica contra a esquistossomose e enriquecer a literatura.

2. Metabolismo de purinas em *Schistosoma mansoni*

Os nucleotídeos são moléculas que tem diversas funções importantes nas células. São constituídos por uma base nitrogenada púrica, adenina (A) ou guanina (G) ou pirimídica, citosina (C), timina (T), ou uracila (U), uma ribose e um grupamento fosfato, sendo os constituintes do DNA e RNA (FREEMAN, 2008).

Dois tipos de vias levam à síntese de nucleotídeos nos seres vivos: via *de novo* e via *de salvação*. A via *de novo* para biossíntese de purinas e pirimidinas são similares praticamente em todos os organismos vivos e possuem como precursores metabólicos: aminoácidos, ribose 5-fosfato, CO₂ e NH₃. As vias *de salvação* são as reutilizações de nucleosídeos (sem o grupamento fosfato) liberados da quebra de ácidos nucléicos. Esses dois tipos de vias são importantes para o metabolismo celular (FREEMAN, 2008; WILEY & SONS, 2004). Assim, uma das vantagens da via *de salvação* é que a via *de novo* requer maior quantidade de energia para síntese de bases púricas.

Em *S. mansoni*, Senft e Colaboradores (1972), em seu trabalho sobre metabolismo de purinas, demonstraram uma rápida incorporação de adenina em nucleotídeos e não conseguiram estabelecer a incorporação de ^{14}C -glicina e ^{14}C -glicose no anel púrico. Este fato tanto mostra uma grande dependência de um suprimento externo de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos, como mostra a perda da via *de novo* de síntese de purinas. Esta hipótese foi confirmada por Dovey et al., 1984, ao mostrar a dependência do parasito pela via *de salvação* de purinas.

2.1 Enzimas da via de salvação de purinas de *Schistosoma mansoni*

2.1.1. Adenilato quinase (ADK)

Adenilato quinase (ADK, 1 e 2) (E.C 2.7.4.3) é uma enzima que está envolvida na homeostase celular, no metabolismo energético e na síntese de nucleotídeos. A enzima cataliza a reação $\text{ATP (adenosina trifosfato)} + \text{AMP (adenosina monofosfato)} \rightleftharpoons 2 \text{ADP (adenosina difosfato)}$. Sabe-se que, diversas ADK são encontradas em mamíferos, pois o músculo esquelético é particularmente rico em ADK1, principal fornecedor de isoforma citosólica. (TANABE et al., 1993). Tem sido relatado que sua deficiência em humanos pode causar leve anemia hemolítica não-hesferocítica (BEUTLER, 1984).

A ADK1 (Smp_071390) codifica para uma proteína com 197 aminoácidos e a ADK2 (Smp_061940.1) para uma proteína com 239 aminoácidos. Estas duas seqüências compartilham apenas 28% de identidade. A ADK1 possui 54% de identidade quando comparada com a ADK1 Humana. A ADK 2 possui 50% de identidade com seu homólogo humano. No entanto, ainda são desconhecidos os efeitos da ADK em *Schistosoma*.

2.1.2 Purina nucleosídeo fosforilase (PNP)

A PNP (EC 2.4.2.1) possui duas isoformas PNP 1 e 2. É uma enzima que catalisa reversivelmente a fosforilase da purina nucleosídeo para gerar a base purina e ribose-1-fosfato.

A distribuição das PNPs em diversos tecidos e em células foi documentado por ARGAWAL e colaboradores em 1972 e por STOECKLER em 1984. Nos seres humanos, a maior atividade foi encontrada no rim, granulócitos e em linfócitos periféricos. No entanto, as hemácias também possuem o mesmo nível de atividade que linfócitos periféricos, levando em conta o volume celular. (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.

2.1.3. Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT)

A enzima HGPRT (E.C 2.4.2.8) catalisa a fosforibosilação reversível de hipoxantina e guanina para IMP (inosina monofosfato) ou GMP (guanina monofosfato) [48]. O produto dessa reação reversível é a formação de IMP (inosina monofosfato) ou GMP o que favorece a construção dos nucleotídeos (XU et al., 1997). A enzima HGPRT tem sido encontrada normalmente como dímero em solução nos organismos *Tritrichomonas foetus* (HGXPRT) (SOMOZA et al., 1996) *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* (ULLMAN & CARTER, 1997) e *Leishmania tarentolae* (MONZANI et al., 2002). É encontrada na forma tetramérica em solução em *Escherichia coli* (HPRT) (GUDATT et al., 2002), *Toxoplasma gondii* (HGXPRT) (RÉROUX et al., 1999), *Plasmodium falciparum* (HGXPRT) (KEOUGH et al., 1999) e em enzima humana (XU et al., 1997).

Em humanos, a mutação encontrada no gene que codifica para a enzima HGPRT, interfere em sua atividade normal, porém, em casos menos rigorosos a mutação ocasiona a hiperuricemia, nefrolitoses, e artrites de gotas (KELLEY et al., 1969). Outras mutações como deleção parcial ou total do gene, substituição de base ou mudança de fase de leitura podem resultar em uma grave deficiência da enzima, acarretando a síndrome de Lesch-Nyhan (SEEGMILLER et al., 1967). Essa doença é caracterizada por retardamento mental, hiper-uricemia, senilidade, e auto mutilação compulsiva (STOUT & CASKEY, 1989).

Estudos sobre esquistossômulos de *S. mansoni* indicam que os organismos dependem basicamente da recuperação das bases púricas para cumprir suas exigências de nucleotídeos purina (DOVEY et al., 1984; DOVEY et al., 1986). Devido à limitada interconversão entre nucleotídeos adenina e guanina, as HGPRTase de *S. mansoni* fornecem as principais fontes de nucleotídeos guanina para o parasito. Em seu genoma, foram encontrados três genes homólogos para a HGPRT (Smp_148820, Smp_168500, Smp_103560) que estão relacionados a diferentes estágios de vida do parasito.

Essa enzima demonstrou várias propriedades que a distinguem de enzimas de mamíferos (DOVEY et al., 1986).

3. Metabolismo de pirimidinas em *Schistosoma mansoni*

Diferentemente da via de salvação de purinas, que possui diversos estudos, a via de salvação de pirimidinas apresenta escassez na literatura, assim, apenas um artigo foi encontrado: “Pyrimidine Salvage Pathways in Adult *Schistosoma mansoni*” de El Kouni e colaboradores (EL KOUNI & NAGUIB, 1990). Esse estudo demonstrou a incorporação de orotato, uridina, citidina, deoxicitidina, timina e uracil nos ácidos nucléicos do parasito, mostrando que estes compostos são precursores para a síntese de ácidos nucléicos. Porém, não foi observada a incorporação de orotidina, timina ou citosina, sugerindo que estas pirimidinas são pobremente ou não são utilizadas para a síntese de ácidos nucléicos no parasito (EL KOUNI & NAGUIB, 1990).

Ao contrário do metabolismo de purinas do *S. mansoni*, onde a via *de novo* está ausente (SENFT, et al 1972, SENFT et al., 1983), o metabolismo de pirimidinas possui tanto a via *de novo* quanto a via de salvação. A via *de novo* efetua a síntese de pirimidinas a partir de precursores simples como nitrogênio, CO₂, amida da glutamina, fosforibosil-pirofosfato (PRPP) e ATP. As enzimas da via de salvação estão envolvidas na reutilização de pirimidinas pré-formadas (EL KOUNI & NAGUIB, 1990).

3.1 Enzima da via de salvação de pirimidinas de *Schistosoma mansoni*

3.1.1 Uridina-citidina quinase (UCK)

A Uridina-citidina quinase (E.C.2.7.1.48) é uma pirimidina ribonucleosídeo quinase que catalisa a fosforilação de uridina ou citidina para UMP e CMP. A enzima tem a capacidade de catalisar a fosforilação de vários ribonucleosídeos citotóxicos e, por esse motivo, tem sido estudada para sua possível utilização na quimioterapia do câncer (SHIMAMOTO et al., 2005). O Genoma do *S. mansoni* possui duas isoformas da UCK; a Smp_062260.1 (UCK1) e a Smp_062260.2 (UCK2), que codificam para proteínas com 245 e 264 aminoácidos, respectivamente. As duas isoformas compartilham 97% de identidade seqüencial, distinguindo-se apenas no C-terminal, na qual a Smp_062260 possui 19 resíduos a mais. As duas isoformas compartilham 46% de identidade quando comparada à UCK humana.

4-Imunização

O sistema imune inato é capaz de reconhecer porções antigênicas presentes na superfície de patógenos conhecidas como PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) e assim inicia os primeiros padrões de resposta imunológica contra o patógeno. Dessa forma, a imunização tem como meta apresentar antígenos ao organismo de maneira mais eficiente e controlada para a geração da resposta imune específica adequada e duradoura (BIANCHI et al., 2007). A imunização é um dos meios mais eficazes em controlar patologias causadas por agentes infecciosos e representa a estratégia de melhor custo benefício (O'HAGAN & VALIANTE, 2003).

Ao longo da história diversas imunizações foram desenvolvidas baseadas em microorganismos atenuados inativos ou ainda nas toxinas que eles produzem como fatores de virulência. Porém, várias dessas imunizações representaram efeitos adversos com a utilização em massa, o que motivou a busca por imunizações mais efetivas e seguras. Assim, as imunizações contendo microorganismos inteiros foram substituídas por antígenos purificados, ou ainda pela informação genética codificando antígenos relevantes do patógeno. (O'HAGAN & RAPPIOLI, 2004). No entanto, essas imunizações baseadas em antígenos purificados normalmente induzem uma resposta imunológica baixa sendo necessária à utilização de adjuvantes para estimular adequadamente o sistema imunológico (PASHINE et al., 2005).

Recentemente, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), no Rio de Janeiro, desenvolveu e patenteou a primeira vacina para esquistossomose do mundo. A vacina aprovada pela

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mostrou ser segura e capaz de imunizar humanos contra a doença. Também mostrou-se eficaz contra a fasciolose (verminose que afeta o gado) e poderá ser usada no futuro para evitar a contaminação por outros tipos de verminoses. Assim como em outras vacinas, a dose nacional foi produzida a partir de um antígeno (Sm14) substância que estimula a produção de anticorpos para preparar o sistema imunológico do ser humano à infecção pelo parasito. (FIOCRUZ, 2012).

Além da esquistossomose, diversos estudos com antígenos purificados de outros parasitos estão sendo testados em outros modelos experimentais como candidatos a imunizações. Destes estudos, alguns apresentaram resultados promissores, como o estudo com imunizações utilizando o modelo com primatas onde a imunização com a proteína MSP1 de *Plasmodium cynomolgi* resultaram em elevados níveis de anticorpos e a diminuição da carga parasitária sanguínea após o desafio (PERERA, et al 1998). A imunização com a proteína intracelular cistéico proteinase de *Leishmania amazonensis* conferiu a diminuição significativa da carga parasitária e de lesões na pele após o desafio em camundongos balb/c (RAFATI et al 2000).

Atualmente, o tratamento para a esquistossomose mansônica utilizado e indicado pela OMS é o Praziquantel (PZQ), porém, este é praticamente inativo contra esquistossomulos imaturos, apresenta efeitos colaterais mutagênicos e teratogênicos, bem como o surgimento de linhagens resistentes. No entanto, o efeito tóxico do PZQ, a falta de saneamento básico e de educação sanitária em áreas endêmicas, justifica a importância de novas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos ou de uma imunização preventiva para a esquistossomose mansônica. Para que uma imunização contra a esquistossomose seja eficiente é necessário que, ela tenha a capacidade de diminuir a carga parasitária, sendo o esquistossomulo em migração, o principal alvo (WILSON & COULSON, 2006). Entretanto, para a esquistossomose mansônica é um grande problema, devido à complexidade do ciclo de vida do *S. mansoni* dentro de seus hospedeiros, assim como, a variedade de respostas imunes por eles induzidos (DUPRE et al., 2001). As enzimas em questão de *S. mansoni* apresentam identidades diferentes com as enzimas de humano. A PNP é a enzima mais próxima com 50% de identidade quando comparada com a enzima humana, dessa forma, possibilita ser uma alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos e possivelmente de não apresentar reações cruzadas. Diante disto, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da imunização com as enzimas ADK (1 e 2), UCK (1 e 2), PNP 1 e HGPRT; na

recuperação de vermes e ovos, relacionando a carga parasitária aos efeitos dos animais infectados com *S. mansoni*, visando melhorias na morbidade e novas opções para alvos terapêuticos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da imunização com as enzimas, Adenilato Quinase 1 e 2, Uridina Citidina Quinase 1 e 2, Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase 1 (PNP) em animais infectados com *S. mansoni*.

5.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a reposta leucocitária do sangue e da cavidade peritoneal de camundongos imunizados com as enzimas ADK (1 e 2), UCK(1 e 2), PNP 1 e HGPRT;
- Analisar a produção de anticorpos (IgG , IgG2a e IgE) de camundongos imunizados com as enzimas ADK (1 e 2), UCK(1 e 2), PNP 1 e HGPRT;
- Verificar a carga parasitária de camundongos imunizados com as enzimas ADK (1 e 2), UCK(1 e 2), PNP 1 e HGPRT; por meio de recuperação de vermes adultos e contagem de ovos nas fezes;
- Investigar a presença de ovos no intestino e no fígado dos camundongos imunizados com as enzimas ADK (1 e 2), UCK(1 e 2), PNP 1 e HGPRT.

6. Material e Métodos

6.1 Delineamento

Nessa figura estão representadas as atividades realizadas nesse estudo.

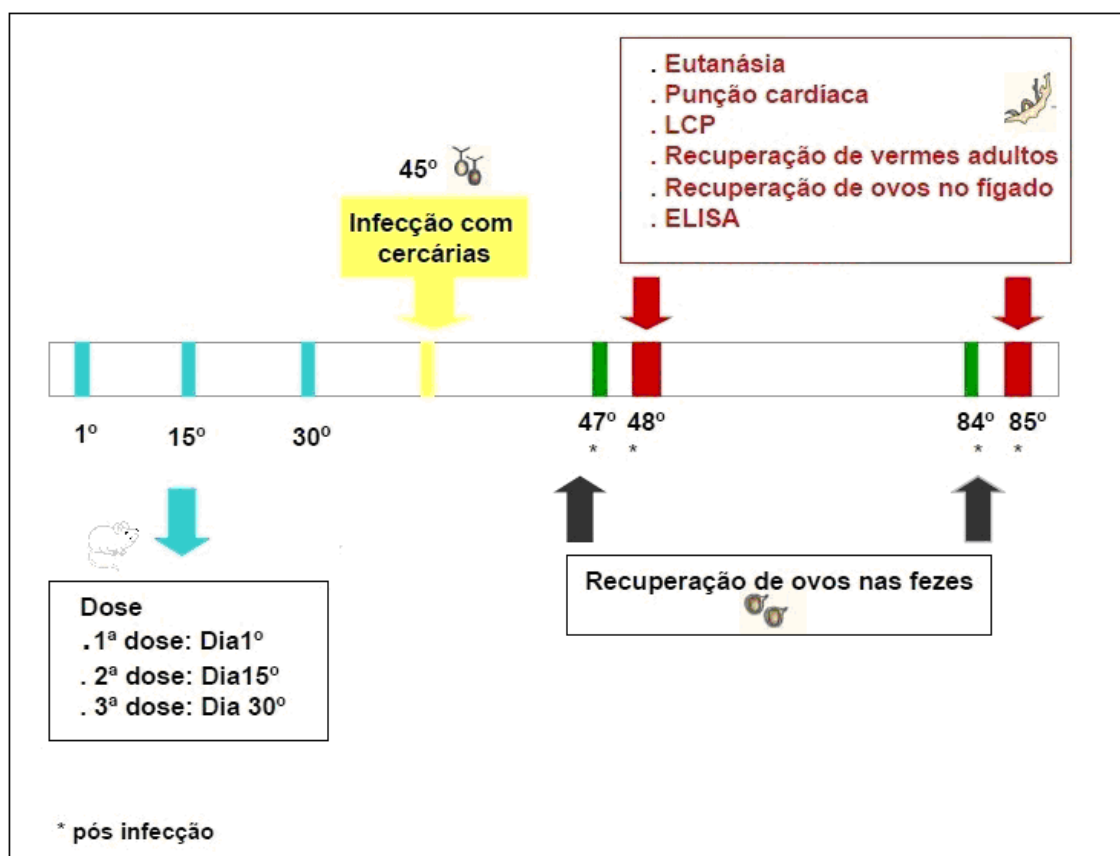


Figura 7: Delineamento experimental do ensaio de imunização com as enzimas e desafio com cercária de *S. mansoni*, a base em forma de reta demonstra o período em dias.

6.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, provenientes do CEMIB da Universidade de Campinas (UNICAMP) pesando entre 15 e 18 gramas, (4 semanas de idade) livres de patógenos específicos e com livre acesso à água e alimento.

O delineamento experimental se pautou nas recomendações dos princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências de

Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da unidade. Protocolo nº 009/2010 (anexo).

6.3 Obtenção das enzimas recombinantes ADK (1 e 2), UCK (1 e 2), HGPRT e PNP 1 de *Schistosoma mansoni*

A expressão e a purificação das enzimas foram realizadas no Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME), Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, sob a coordenação do Prof. Dr. Richard C. Garratt e Dr. Humberto D' Muniz Pereira.

Nosso laboratório em parceria com o CBME tem objetivo de analisar a atividade imunológica das enzimas estudadas *in vivo* no modelo da esquistossome murina.

As metodologias (expressão e purificação) e suas padronizações foram desenvolvidas pelo o grupo de cristalografia, que serão descritas a seguir.

6.3.1 Expressão das enzimas recombinantes HGPRT, UCK 2 e ADK 2 de *Schistosoma mansoni*

Para a expressão das enzimas HGPRT, UCK 2 e ADK 2 foi utilizado 500 mL de meio de cultura 2XTY suplementado com 30µg/mL de kanamicina. Foram incubadas em tubos de ensaio (separadamente) 10 mL de uma cultura contendo bactérias recombinantes *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28a e os genes das enzimas HGPRT, UCK 2 e ADK 2 de *S. mansoni* por 16 horas. Os tubos de ensaio ficaram sob agitação (250rpm) a 37 °C até que a D.O. (densidade óptica) fosse igual ou acima de 0,5. Após, os meios de cultura foram esfriados e foi adicionado 100µM/mL de IPTG (indutor de expressão). Em seguidas as culturas foram mantidas a 18°C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 12 horas.

O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 rpm. o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi 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.

6.3.2 Expressão das enzimas recombinantes ADK 1 UCK1 e PNP 1

Para a expressão das enzimas ADK1, UCK 1 e PNP 1 de *S. mansoni* foram utilizados 500 mL de meio de cultura 2XTY suplementado com 30µg/mL de kanamicina. Foram incubadas em tubos de ensaio 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 ficaram sob agitação (250rpm) a 37°C até que a D.O. (densidade óptica) fosse igual ou acima de 0,5. Após foi adicionado 100µM/mL de IPTG e as culturas foram mantidas nas mesmas condições por 3 horas.

O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 rpm. o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 50 mL de tampão de lise (50mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol e 1mM MgCl₂) e congelado a -20°C.

6.3.3 Purificação das enzimas recombinantes ADK (1 e 2), UCK (1 e 2) , HGPRT de *Schistosoma mansoni*

A cromatografia é uma técnica que utiliza propriedades físico-químicas para separação dos componentes de uma mistura protéica. Normalmente, as técnicas de cromatografia utilizam colunas verticais, em que as amostras são colocadas e as moléculas protéicas se distribuem em uma fase estacionária (fixa) e a outra móvel. A fase estacionária é formada de um material que pode ser: resinas, camadas porosas, papel de filtro, entre outros, para reter os componentes da amostra que se deseja (ZAHA et al., 1996, STRYER et al., 1998).

A técnica utilizada para purificação das enzimas ADK (1 e 2), UCK(1 e 2) e HGPRT foi de cromatografia de afinidade. Para a purificação foi utilizada a resina cromatográfica de cobalto, nesta resina o N-terminal das proteínas, uma sequência de 6 histidinas possui afinidade pelos metais zinco ou cobalto. Cada enzima dessa pesquisa possuía uma coluna de afinidade individual para evitar possíveis contaminações.

Primeiramente, foram preparadas colunas de cobalto com 5 mL cada. Após a sedimentação da resina em cada coluna, elas foram lavadas com 10 volumes de (50) mL

de água ultra-pura para a retirada do etanol e 10 volumes (50 mL) de tampão de lise (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol, pH 7.4).

Em seguida, o pellet foi resuspendido com 50 mL de tampão de lise (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol, pH 7.4, e, em seguida, as bactérias (em tubos mantidos no gelo) foram lisadas em sonicador com 6 pulsos de 1 min. e descanso de 30 seg. entre os pulsos e, então, centrifugado por 20 min. a 9000 rpm a 4° C.

As colunas foram equilibradas com tampão de lavagem antes de receber o extrato bruto (sobrenadante) para a retirada de contaminantes. Logo após a passagem do sobrenadante pela coluna, o eluato (primeira passagem do sobrenadante) proveniente da coluna foi coletado. Após, a lavagem da coluna foi realizada com 10 volumes de tampão de lavagem (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol, pH 7.4) para o seu equilíbrio.

Para a eluição da enzima ligada à coluna, foram utilizados 1,5 volumes de coluna de tampão de eluição (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 200mM imidazol, 5mM β-Mercaptoetanol, pH 7.4). Em seguida, as enzimas purificadas foram concentradas em Centriprep Ultra 10 da Amicon (Millipore Corporation Bedford, MA, EUA) contendo membranas de tamanho adequadas a suas massas moleculares. Cada enzima possuía um concentrador individual para evitar possíveis contaminações.

6.3.4 Purificação da enzima PNP1 de *Schistosoma mansoni*

Após a expressão da proteína de fusão MBP-PNP, esta foi submetida a clivagem com 1μg da protease fator Xa (New England Biolabs). A clivagem durou 96 h, tendo sido mantida em repouso por a 4C°. 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). Em seguida, foi realizada a purificação cromatográfica em coluna de troca catiônica POROS 20HS, empregando-se um cromatógrafo líquido. Nessa passagem, a PNP já está aderida na coluna e a MBP passa-se diretamente pela coluna.

6.3.5 Análise das enzimas purificadas

As análises das enzimas purificadas foram realizadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. Essa técnica permite a separação de proteínas pela massa molecular. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Antes de serem submetidas à separação por eletroforese, as enzimas foram quantificadas pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976). O método de *Bradford* é uma técnica usada para a determinação de proteínas totais. Este método é baseado na interação entre o corante “*Coomassie brilliant blue*” e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. (COMPTON, 1985).

6.4 Obtenção das larvas (cercárias) infectantes de *Schistosoma mansoni*

As larvas (cercárias), cepa LE (BH-MG), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ((FMRP-USP). As larvas foram retiradas de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com o *S. mansoni* mantidos no Moluscário da mesma instituição.

6.4.1 Infecções dos camundongos com larvas infectantes (cercárias) de *Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram infectados por via subcutânea (s.c.) com as larvas do *S. mansoni*, e foram inoculadas cerca de 50 cercárias /0,3 mL de solução fisiológica 0,9% NaCl/animal com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Este volume e concentração (solução fisiológica) são incapazes de afetar a viabilidade das cercárias. O método de infecção foi padronizado pela técnica de laboratório Olinda Mara Brigoto do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

6.5 Adjuvante Hidróxido de Alumínio

Adjuvantes são substâncias que, associadas com antígenos, auxiliam ou potencializam a resposta imunológica que seria de menor intensidade, se o antígeno fosse administrado isoladamente (LIMA, 2008). A utilização de adjuvantes em vacinas é de grande importância quando o antígeno possui baixa imunogenicidade. Este se aplica para antígenos constituídos por peptídeos recombinantes ou subunidades de peptídeos, quando sua conformação e estrutura são menos complexas que vírus e bactérias intactos inativados (GUPTA et al., 1993).

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

A atividade biológica desses sais consiste em pelo menos três características: formação de depósito do antígeno nos tecidos para produzir uma exposição prolongada, produção de antígenos particulados para facilitar a apresentação para APC, ativação do complemento e estimulação dos macrófagos para induzir retenção e ativação dos linfócitos (O'HAGAN; MACKICHAN, 2001).

6.6 Imunização dos camundongos

Após a purificação das enzimas recombinantes ADK (1 e 2), UCK (1 e 2), PNP 1 e HGPR1, 100 µg delas foram adicionadas em 200µL de PBS estéril, contendo 100µg de hidróxido de alumínio (lote 35044) e aplicado nos camundongos por via intraperitoneal (i.p.) (figura 8) por 3 vezes em intervalos de 15 dias, segundo o cronograma da figura 7. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram infectados com 50 cercárias/animal de *S. mansoni*.

Em nosso laboratório, estudos foram realizados com soros de camundongos apenas imunizados com enzimas da *via de salvação* de purinas e de pirimidinas de *S. mansoni*. Em algumas análises pode-se detectar a presença de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2a) contra as enzimas Adenilato Quinase (ADK) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP). Esta etapa da pesquisa consistiu na criação dos seguintes grupos experimentais

(doravante G): grupo controle que continha 6 camundongos e o grupo infectado e o imunizado/infectado continham 10 animais.

- G1 controle não recebeu nenhuma imunização, e sem infecção,
- G2 sem imunização e infectado com *S. mansoni*,
- G3 imunizado com a enzima PNP (1) e infectado com *S. mansoni*,
- G4 imunizado com a enzima HGPRT e infectado com *S. mansoni*,
- G5 imunizado com a enzima ADK (1e2) e infectado com *S. mansoni*,
- G6 imunizado com a enzima UCK (1e2) e infectado com *S. mansoni*.

O modelo proposto foi repetido duas vezes, para a confirmação dos resultados obtidos. Os animais ficaram no biotério de experimentação do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos, com livre acesso à água potável, ração comercial padrão, sob temperatura e luminosidade controlada. Os camundongos foram eutanasiados nos 48° e 85° dias após a infecção com anestésico Thionembutal (North Chicago, Illinois, USA). Os tempos estabelecidos para a eutanásia no 48° foi devido ao parasito ter completado o seu ciclo e iniciado a postura de ovos e no 85° já ser a fase crônica da doença e possivelmente apresentar fibrose no fígado. Esses tempos estabelecidos também foram utilizados em outros experimentos em nosso laboratório com resultados promissores.



Figura 8 - Imunização dos camundongos por via intraperitoneal (v.i.): Procedimento realizado nos camundongos apenas imunizados, LAP – UFSCar.
Fonte: SOUZA ,L.C; NERIS,D.M.; RODOLPHO, J.M de A.; 2011.

6.7 Avaliação celular

6.7.1 Obtenções dos leucócitos do sangue.

No 48° e 85° dias após a infecção os camundongos foram eutanasiados com anestésico tionembutal (North Chicago LLLinois, USA). O sangue foi obtido com um auxílio de uma seringa com anticoagulante (EDTA) para a sangria dos animais, por punção cardíaca, como mostra a figura 09.

6.7.2 Obtenções dos leucócitos do lavado da cavidade peritoneal (LCP).

Nos tempos já estabelecidos, para a realização do lavado da cavidade peritoneal (LCP) (figura 10) foram utilizados 3 mL de PBS1x pH 7,4, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS Citrato), e agulhas no peritônio.

6.7.3 Contagem dos leucócitos totais do lavado LCP e do sangue

O número total dos leucócitos nos diferentes compartimentos foi determinado por meio do líquido diluidor de Turk (ácido acético 3% + corante azul de metileno) que tem a função de destruir as hemácias e conservar apenas os leucócitos, os quais foram contados na câmara de Neubauer. Em cada lâmina, foram contadas 100 células pela microscopia de luz com aumento final de 1000 X.



Figura 09 - Sangria por punção cardíaca: Procedimento realizado em todos os grupos experimentais, LAP – UFSCar.

Fonte: SOUZA, L.C.; NERIS, D.M.; RODOLPHO, J.M de A.; 2011

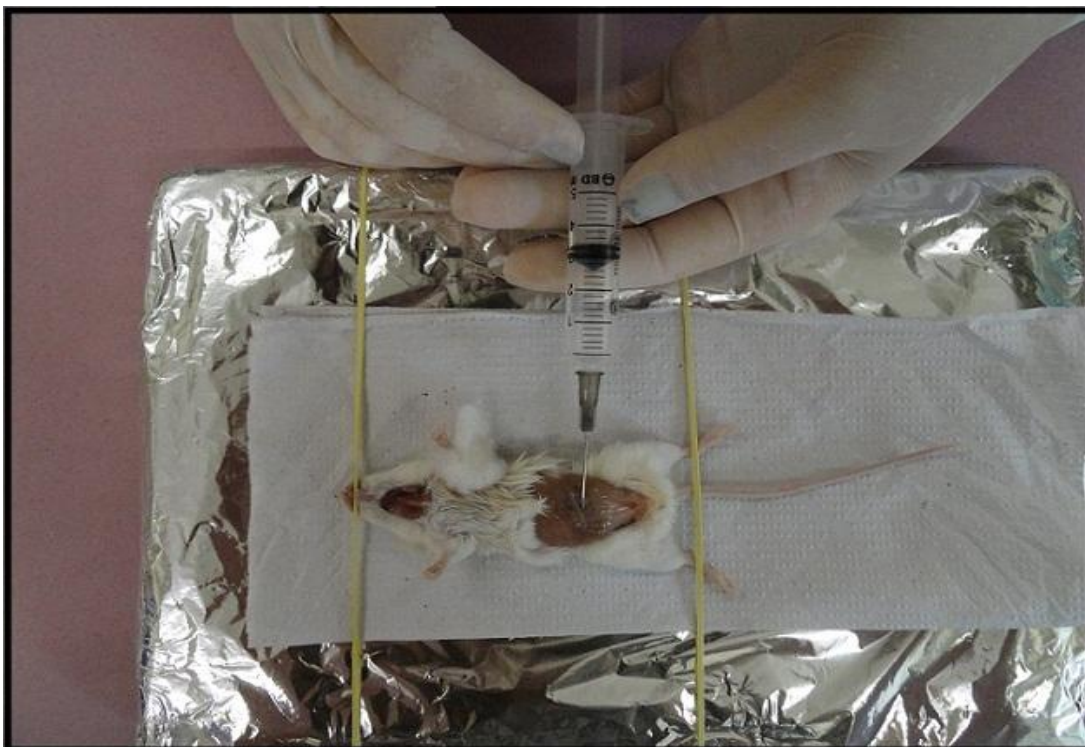


Figura 10 - Lavado da cavidade peritoneal (LCP): Procedimento realizado em todos os grupos experimentais, LAP - UFSCar.

Fonte: SOUZA,L.C; NERIS,D.M.; RODOLPHO, J.M de A.; 2011

6.8 Ensaio Imunoenzimático – ELISA indireto

6.8.1 Para detecção de anticorpos

Para detecção das imunoglobulinas (IgG, IgG2a e IgE), foi feito um ELISA (Kit BD). Em nosso laboratório foi realizado um teste para padronização da melhor diluição da amostra e concentração do antígeno. Para IgG foi de 5 µg/mL de proteína do antígeno total para sensibilização da placa e 1:64 para diluição da amostra sorológica e para IgG2a e IgE foi utilizada a concentração de 10 µg/mL de proteína total do antígeno e 1:4 para diluição da amostra. O extrato protéico de antígenos de *S. mansoni*, foi gentilmente preparado pelo aluno Ricardo Oliveira Correia LAP-DMP-UFSCar de acordo com (Rofatto et al, 2009). Para o seu preparo, foram utilizados 80 vermes adultos de *S. mansoni*, recuperados de camundongos Balb/c infectados com 200 cercárias. A extração de proteínas foi feita com 40mM de Tris (0,24g/ pH 7.4), 2% SDS

um coquetel inibidor de proteases (Etanol 100%, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina A, PMSF 100mM). Em seguida foram realizadas a sonicação com ultra-som, 2 ciclos de 2 minutos, com pulção de 1 segundo à 40% de amplitude, e a precipitação da amostra com acetona. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a temperatura de 4°C e o “*pellet*” foi recuperado para a quantificação da proteína pelo método de *Bradford*.

Desta forma, para a detecção das imunoglobulinas na amostra (plasma), foram utilizadas placas de microtitulação com 96 poços, recobertas com 5 ou 10 µg/mL de proteína do antígeno total de *S. mansoni* (diluídos em tampão carbonato 0.1M e aplicados 100 µL/poço). Logo após, as placas serem lavadas com PBS-Tween 20 0,05%, acrescentou-se 200 µL de tampão bloqueio (PBS-BSA 1%) e permaneceram por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e foram adicionados 50 µL das amostras diluídas em tampão carbonato (1:4 para IgG2a/IgE e 1:64 para IgG), as placas permaneceram 2h a temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 µL de Ac secundário conjugado com biotina (4 µL Ac + 10 mL de tampão carbonato). Após 1h, as placas foram lavadas novamente e adicionou-se 100 µL da enzima estreptoavidina (diluição 1:200). Após 30 minutos, lavou-se a placa e 100 µL do substrato, uma mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB) (BD-OpTEIA), foi adicionado. Em seguida a reação foi bloqueada com 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M. A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

6.9 Avaliação da carga parasitária

6.9.1 Recuperação de vermes adultos acasalados do sistema porta-hepático

Os vermes adultos acasalados foram recuperados dos camundongos por meio da perfusão do sistema porta no 48° e 85° dias após a infecção. A porcentagem (%) de redução da carga parasitária foi medida pela comparação entre o número de vermes adultos acasalados recuperados em cada grupo experimental e seu respectivo controle, (apenas infectado), de acordo com a fórmula (FONSECA et al., 2004):

$$\text{GR} = \frac{\text{RGC} - \text{RGE}}{\text{RGC}} \times 100$$

Onde GR é grau de redução, RGC é recuperação no grupo controle e RGE, recuperação no grupo experimental.

6.9.2 Contagem de ovos nas fezes

Os camundongos foram analisados quanto à eliminação de ovos nas fezes no 47º e 84º dias após a infecção. Para a análise foi utilizado o kit Kato-Katz (Katz & Peixoto, 2000). O Kato-Katz através do Helm Teste, um teste desenvolvido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos, da Fiocruz e recomendado pela Organização Mundial da Saúde, pois aumenta de duas a quatro vezes a detecção de ovos de helmintos nas fezes. Para o procedimento foram seguidas as instruções do fabricante: as fezes foram submetidas ao peneiramento em filtro-Test, montadas em lâminas de microscopia e cobertas com lamínula de celofane pré-colorida com corante verde-malaquita. Após a leitura das lâminas e contagem dos ovos, foi calculada a quantidade de ovos por grama de fezes seguindo a seguinte fórmula:

Nº de ovos da amostra = nº de ovos encontrados na lâmina x fator 24 (o fator varia de acordo com cada Kit). O Kit de Kato-Katz foi gentilmente doado pela Fundação Oswaldo Cruz-Biomanguinhos, Rio de Janeiro-RJ.

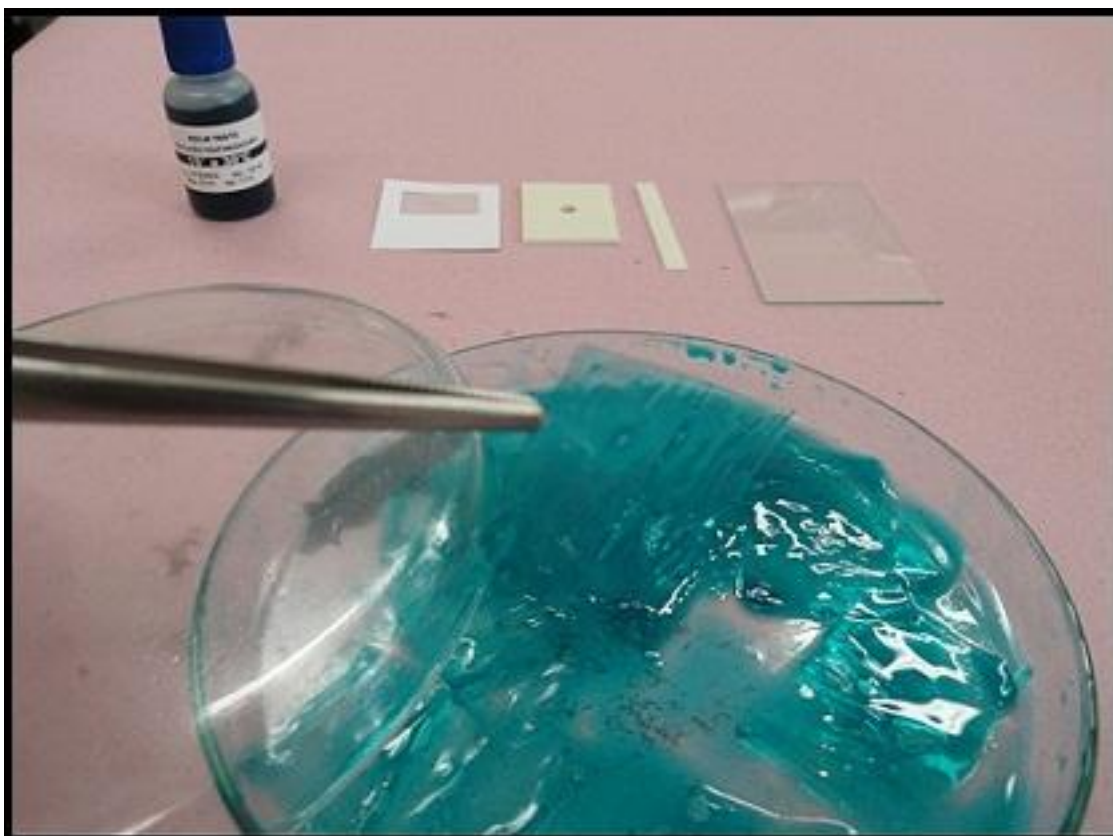


Figura 11 - Kit Kato-Katz: Contagem de ovos nas fezes: Os camundongos foram analisados quanto à eliminação de ovos nas fezes pelo método Kato-Katz, no 47º e 84º dias após a infecção. Procedimento realizado nos camundongos sem imunização/infectados e imunizados/infectados, LAP – UFSCar.

Fonte: SOUZA, L.C; 2010

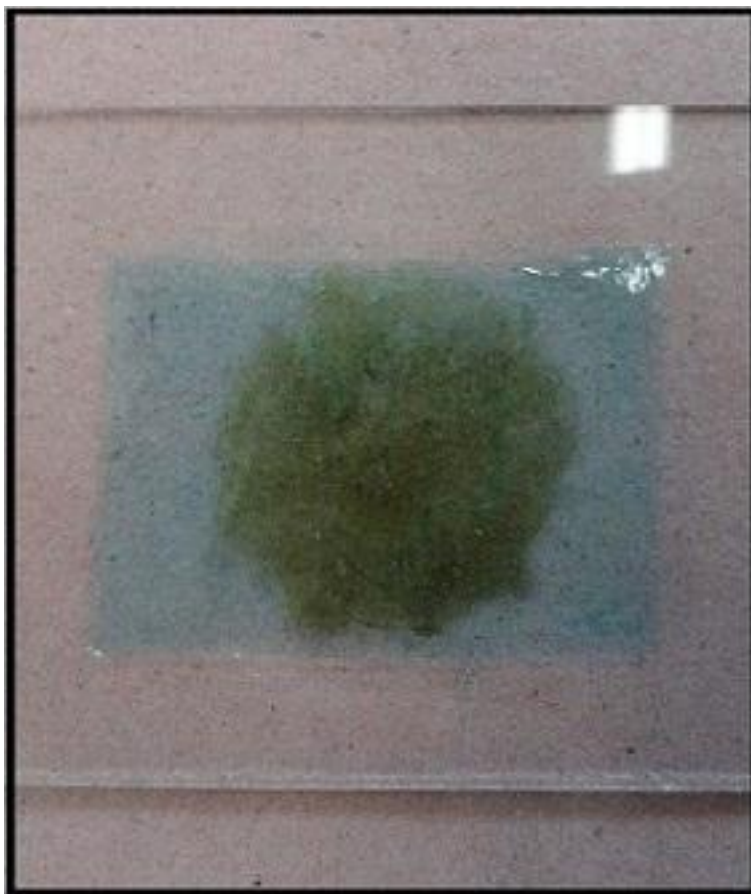


Figura 12. Contagem de ovos nas fezes: Lâmina de fezes de camundongos feita pelo o método Kato-Katz, no 47° e 84° dias após a infecção. Procedimento realizado nos animais sem imunização/infectados e imunizados/infectados, LAP – UFSCar.

Fonte: SOUZA,L.C; NERIS,D.M.; RODOLPHO, J.M de A.; 2010.

6.9.3 Recuperação de ovos no intestino e no fígado

Para a recuperação de ovos no intestino e no fígado, no 48° e 85° dias após a infecção, foram retirados o intestino e o fígado dos grupos sem imunização/infectados e imunizados/infectados. Apenas uma porção de 0,5 g dos respectivos órgãos (lóbulo esquerdo do fígado e intestino grosso) foi recolhida, lavada em salina 1x e colocada entre dois papéis adsorventes (papel higiênico) para retirada do excesso do líquido. Em seguida, esta porção foi colocada em tubos de 50 mL contendo 5mL de solução de hidróxido de potássio – KOH a 5% e incubados a 37°C por 24h para completa digestão (CHEEVER, 1968).

Após a incubação dos tecidos, estes foram submetidos à agitação (Vortex Mixer -VIXAR), obtendo-se um tecido emulsificado e 3 alíquotas de 100 μ L de cada amostra foram pipetadas separadamente em lâminas, para a realização da leitura. O número de ovos em cada 100 μ L foi lido no aumento de 100x. O total de ovos de cada grupo foi verificado pela média de número de ovos/mg do fígado, calculado da seguinte forma: média do número de ovos em:

$$100\mu\text{L}=\text{M}=\text{soma de ovos nas 3 alíquotas}/3.$$

$$\text{Número de ovos em 5mL}=\text{N}=\text{M} \times 5000/100.$$

$$\text{Número de ovos em 1 g de tecido} = \text{N}/\text{peso do tecido}.$$

M= média

N = número de ovos

6.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos com média \pm EPM. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados utilizando o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (2005) (San Diego, Califórnia, USA) pelo teste não - paramétrico One-way ANOVA (*One-Way analysis of variance*), pós-teste pelo método de Tukey (*Compare all pairs of columns*). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Avaliação Celular

7.1.1 Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 48º dia após a infecção

A figura 13 mostra o número de leucócitos totais no sangue (A) e na cavidade peritoneal (B) de camundongos dos grupos: controle, sem imunização/infectado, imunizado com as enzimas PNP/infectado, HGPRT/infectado, ADK/infectado e com UCK/infectado. As imunizações e a infecção com cercárias de *S. mansoni* favoreceu o aumento significativo de leucócitos totais no sangue dos animais dos grupos imunizados com as enzimas ADK/infectado e UCK/infectado em relação ao grupo controle. Na cavidade peritoneal (Fig. 13B) observamos aumento significativo de leucócitos totais em todos os grupos imunizados (PNP, HGPRT, ADK e UCK)/infectados quando comparados com o grupo controle.

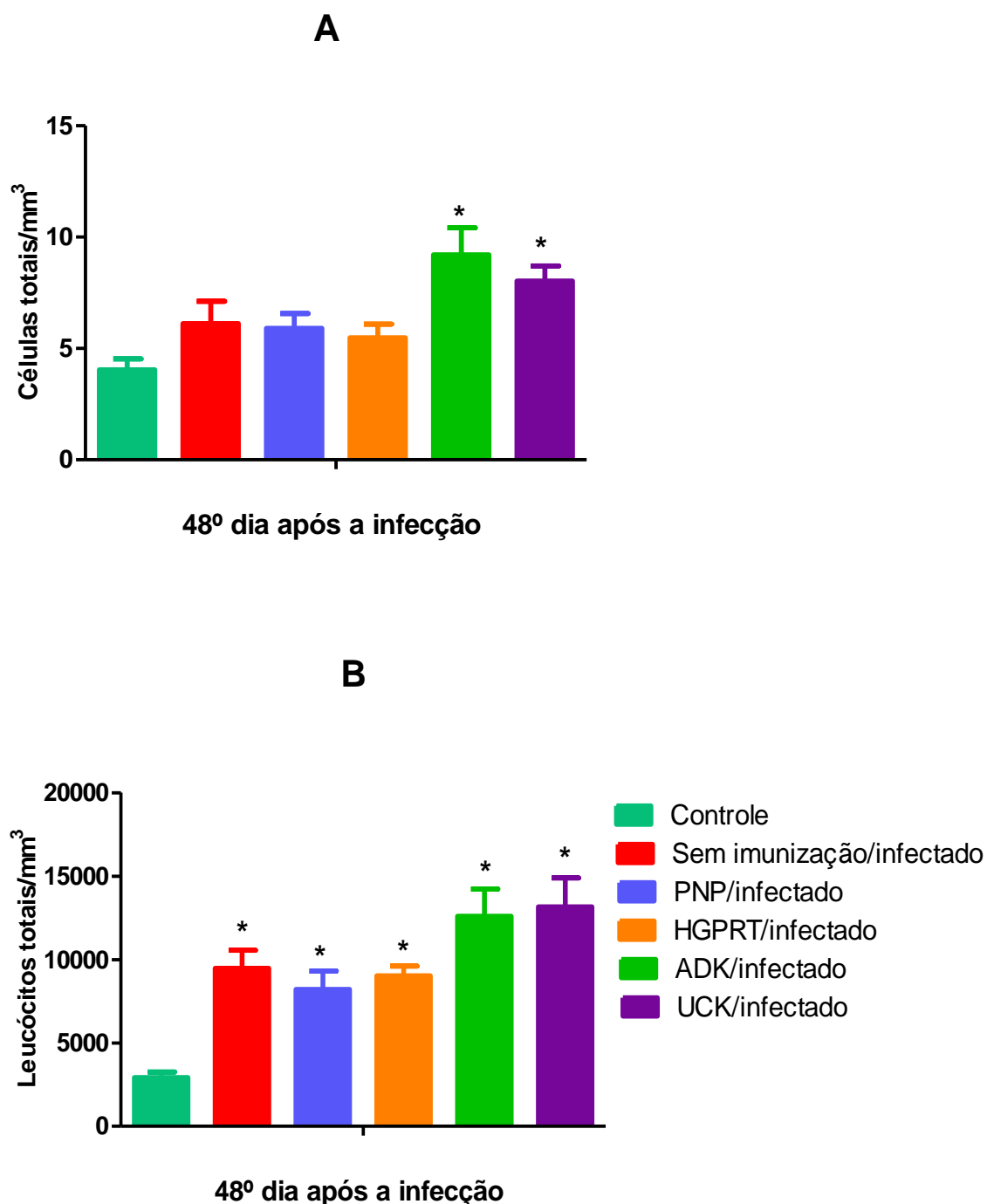


Figura 13. Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 48º dia após a infecção (A) Leucócitos totais/mm³ do sangue. (B) Leucócitos/mm³ da cavidade peritoneal, no 48º dia de infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: sem imunização/infected e imunizado/infected quando comparados com o grupo controle usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.1.2 Contagem diferencial de eosinófilos no 48º dia após a infecção

A figura 14 demonstra o número de eosinófilos/mm³ no sangue (A) e na cavidade peritoneal (B) dos grupos de camundongos controle, sem imunização/infectado com *S. mansoni* e imunizado/infectado com *S. mansoni*. No sangue (fig.14 A) pode-se observar que os grupos de camundongos imunizado/infectado não apresentaram diminuição significativa no número de eosinófilos quando comparados com o grupo controle e sem imunização/infectado. Na cavidade peritoneal (fig. 14 B) os grupos de camundongos imunizado/infectado não apresentaram uma diminuição significativa no número de eosinófilos quando comparados com os grupos controle e sem imunização/infectado.

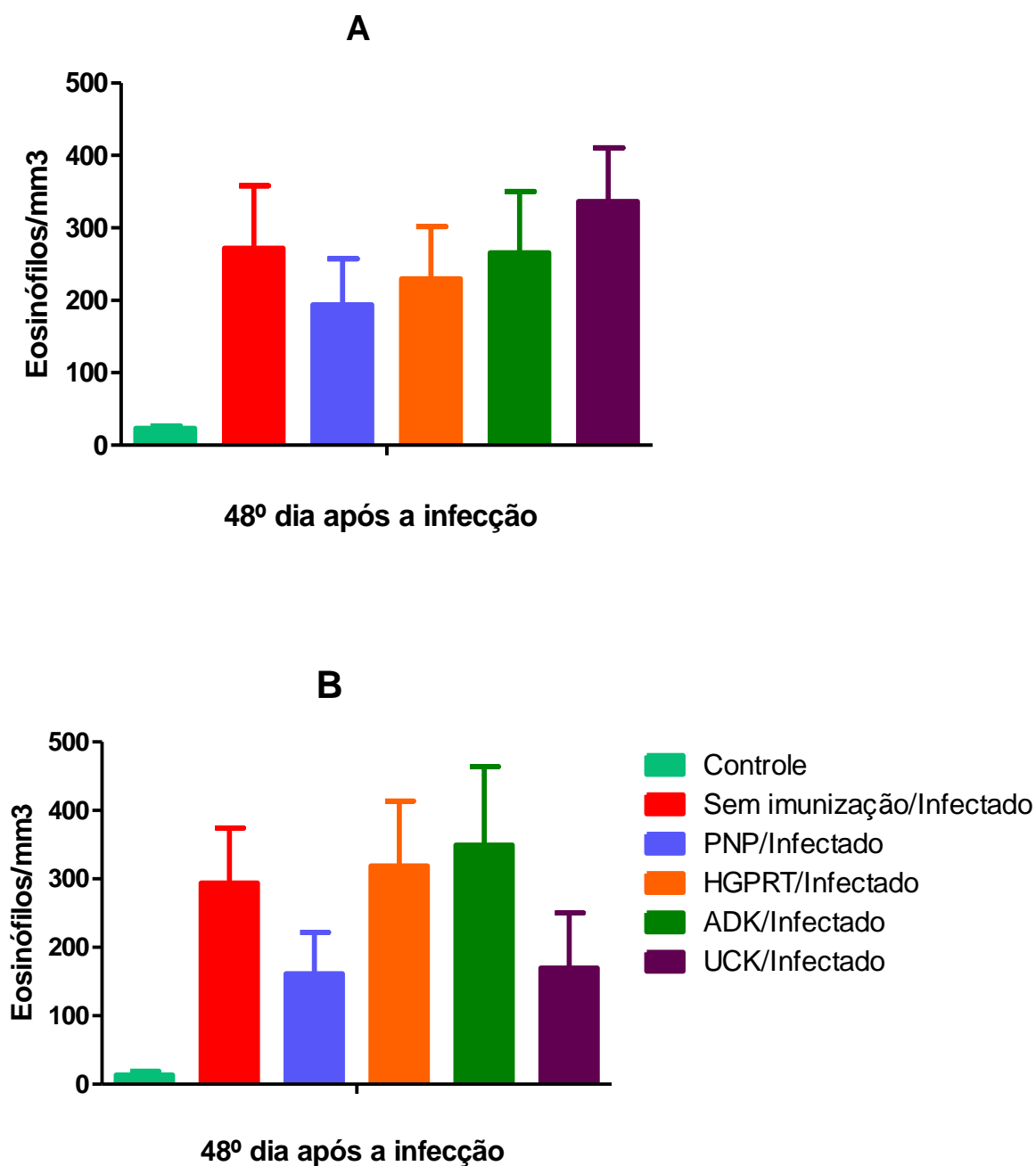


Figura 14. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal. Eosinófilos/mm³ no sangue (A) e eosinófilos/mm³ no espaço peritoneal (B). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo *($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: sem imunização/infectedado e imunizado/infectedado quando comparados com o grupo controle usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.1.3 Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 85º dia após a infecção

A figura 15 mostra o número de leucócitos totais do sangue (A) e da cavidade peritoneal (B) de camundongos dos grupos controle, sem imunização/infectado, imunizado com a enzima PNP/infectado, imunizado com a enzima HGPRT/infectado, imunizado com a enzima ADK/infectado e imunizado com a enzima UCK/infectado. No sangue o número de leucócitos totais (Fig. 15 A) dos grupos imunizados com as enzimas ADK/infectado e UCK/infectado apresentaram aumento significativo quando comparados com o grupo controle. Já na cavidade peritoneal (Fig. 15 B) observamos aumento significativo de leucócitos totais dos grupos sem imunização/infectado, imunizado com a enzima PNP/infectado, imunizado com a enzima HGPRT/infectado, imunizado com a enzima ADK/infectado e imunizado com a enzima UCK/infectado quando comparados com o grupo controle.

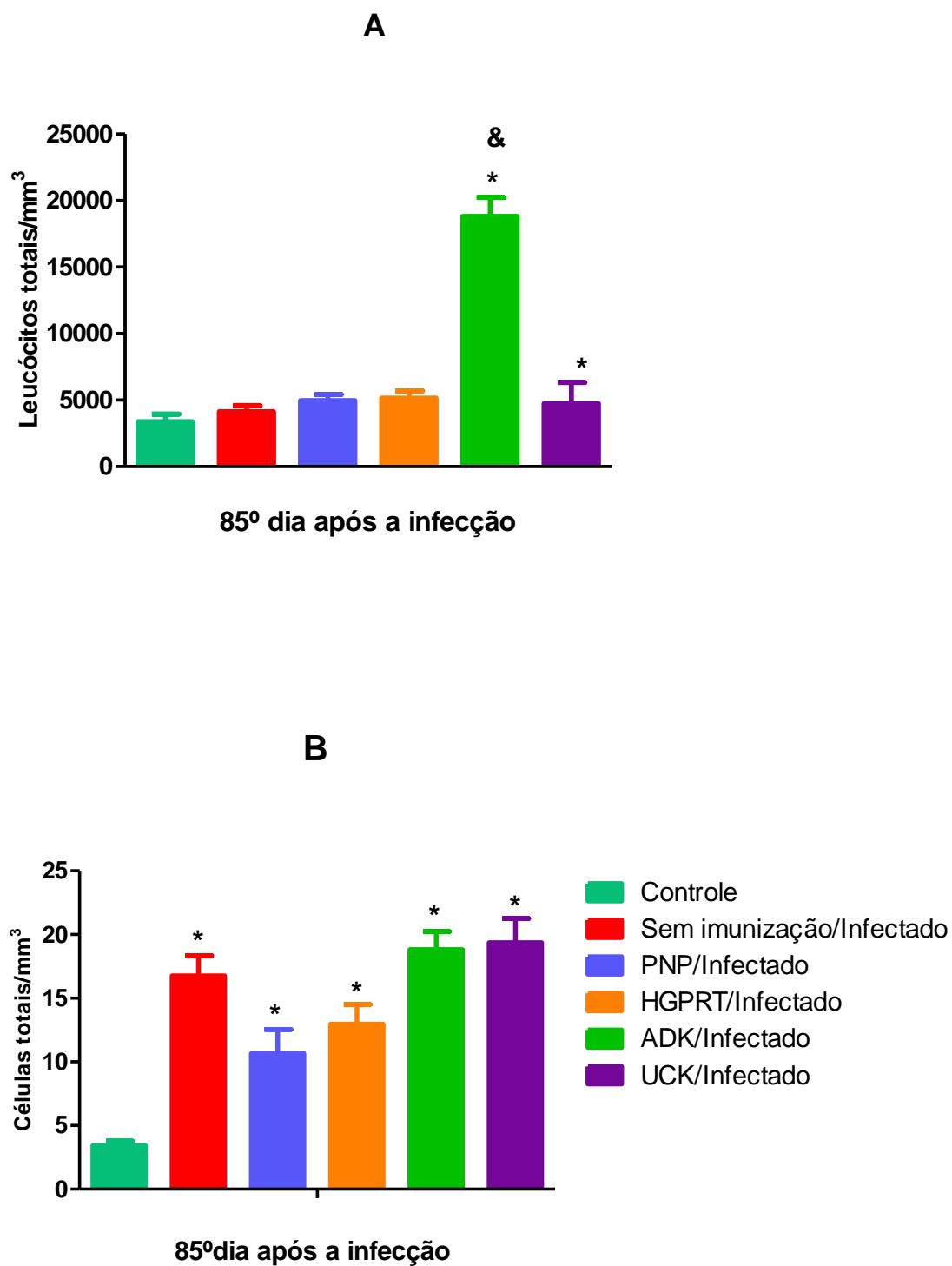


Figura 15. Contagem de leucócitos totais do sangue e da cavidade peritoneal no 85º dia após a infecção. (A) Leucócitos totais/mm³ do sangue. (B) leucócitos totais/mm³ na cavidade peritoneal, no 85º dia de infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo *($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: sem imunização/infectado e imunizado/infectado quando comparados com o grupo controle usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.1.4 Contagem diferencial de eosinófilos no 85º dia após infecção

A figura 16 demonstra o número de eosinófilos/mm³ no sangue e na cavidade peritoneal dos grupos de camundongos controle, sem imunização/infectado e imunizado/infectado. No sangue (fig. 16 A) foi observado aumento significativo de eosinófilos no grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com o grupo controle. Já na cavidade peritoneal (fig.16 B) foi observado um aumento significativo no número de eosinófilos dos grupos sem imunização/infectado e imunizado com a enzima HGPRT/infectado quando comparados com o grupo controle.

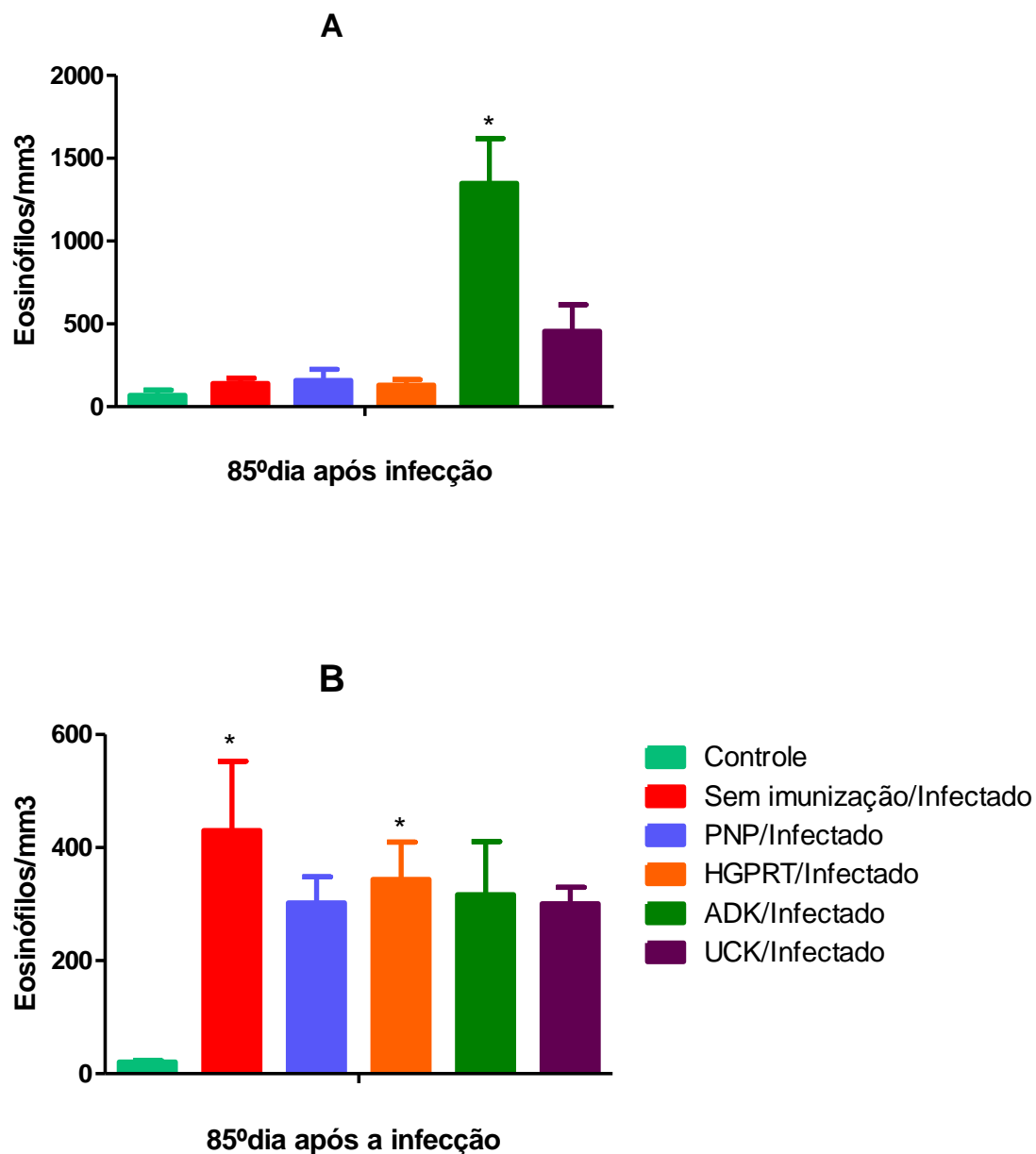


Figura 16. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue e na cavidade peritoneal. Eosinófilos/mm³ no sangue (A) e eosinófilos/mm³ na cavidade peritoneal (B), no 85º dia de infecção. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo * (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: sem imunização/infectado e imunizado/infectado quando comparados com o grupo controle usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.2 Avaliação da resposta humoral no 48º dia após a infecção

Os resultados do ensaio imunoenzimático - ELISA indicam que níveis de anticorpos foram produzidos no 48º dia após a infecção. A Figura 17 representa a densidade óptica (D.O.) dos anticorpos IgG, IgG2a e IgE reativos a antígenos dos vermes adultos presentes no plasma dos animais dos grupos sem imunização/infectado e imunizados com as enzimas PNP/infectado, HGPRT/infectado, ADK/infectado e UCK/infectado, no 48º dia após a infecção.

Foi observado um aumento significativo de IgG no grupo imunizado com a enzima UCK/infectado, quando comparado com o grupo controle. Já para a detecção da produção de IgG2a o grupo imunizado com a enzima UCK/infectado também apresentou um aumento significativo quando comparado com o grupo controle. Para a detecção da produção de IgE os grupos imunizados com as enzimas HGPRT/infectado e ADK/infectado apresentaram um aumento significativo quando comparado com o grupo controle.

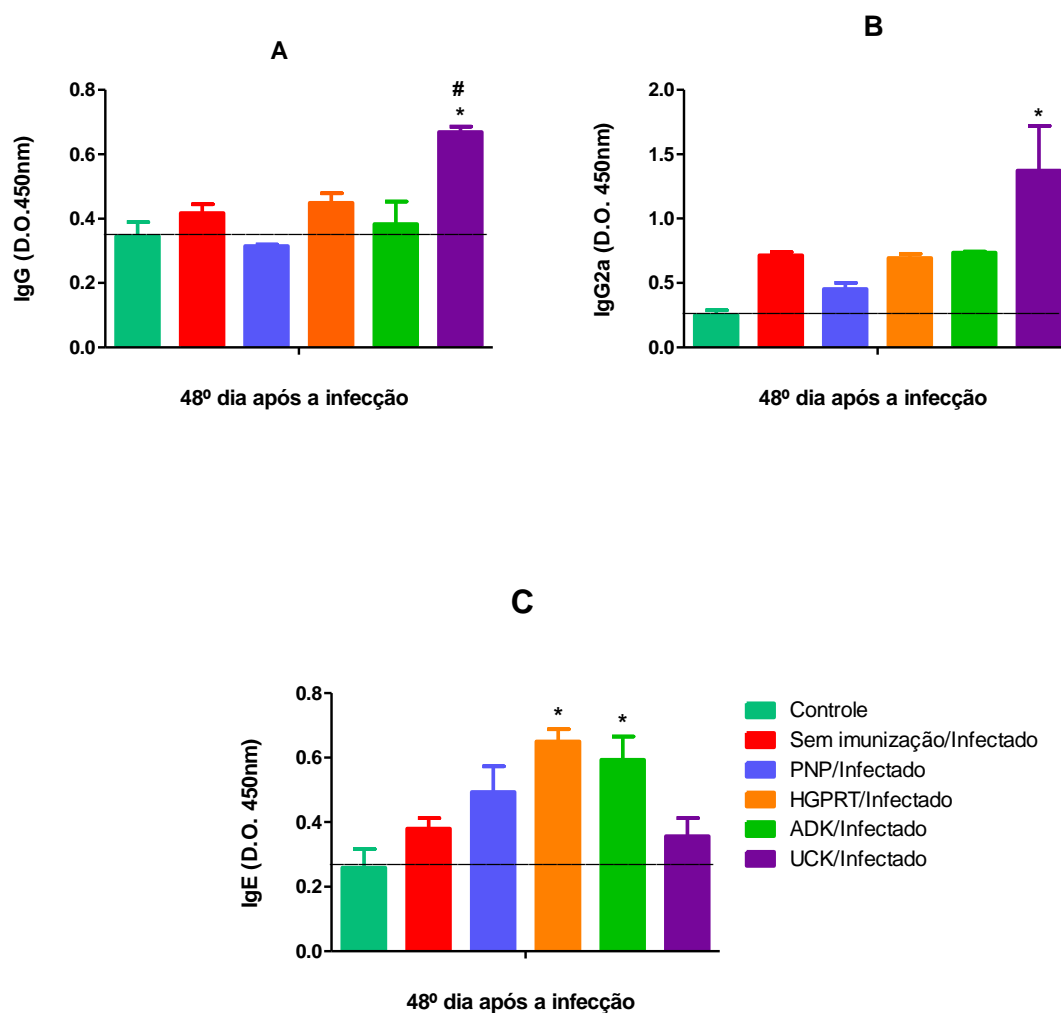


Figura 17. Dosagens de anticorpos no plasma de animais imunizados no 48º dia após a infecção. Dosagens de IgG (A); IgG2a (B) e IgE (C) no plasma. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: sem imunização/infected e imunizado/infected quando comparados com o grupo controle. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: imunizado/infected quando comparados com o grupo sem imunização/infected, usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.2.1 Avaliação da resposta humoral no 85º dia após a infecção

Foi observada no 85º dia após a infecção (figura 18) que os grupos imunizados com as enzimas PNP/infectado, HGPRT/infectado e UCK/infectado apresentaram um aumento significativo de IgG quando comparados com o grupo controle.

Para a detecção da produção de IgG2a os grupos imunizados com as enzimas PNP/infectado e HGPRT/infectado apresentaram um aumento significativo quando comparados com o grupo controle. Já o grupo imunizado com a enzima UCK/infectado apresentou um aumento significativo de IgG2a quando comparado com os grupos controle e sem imunização/infectado. Para a detecção da produção de IgE os grupos imunizados com as enzimas HGPRT/infectado e ADK/infectado apresentaram aumento significativo quando comparados com o grupo controle.

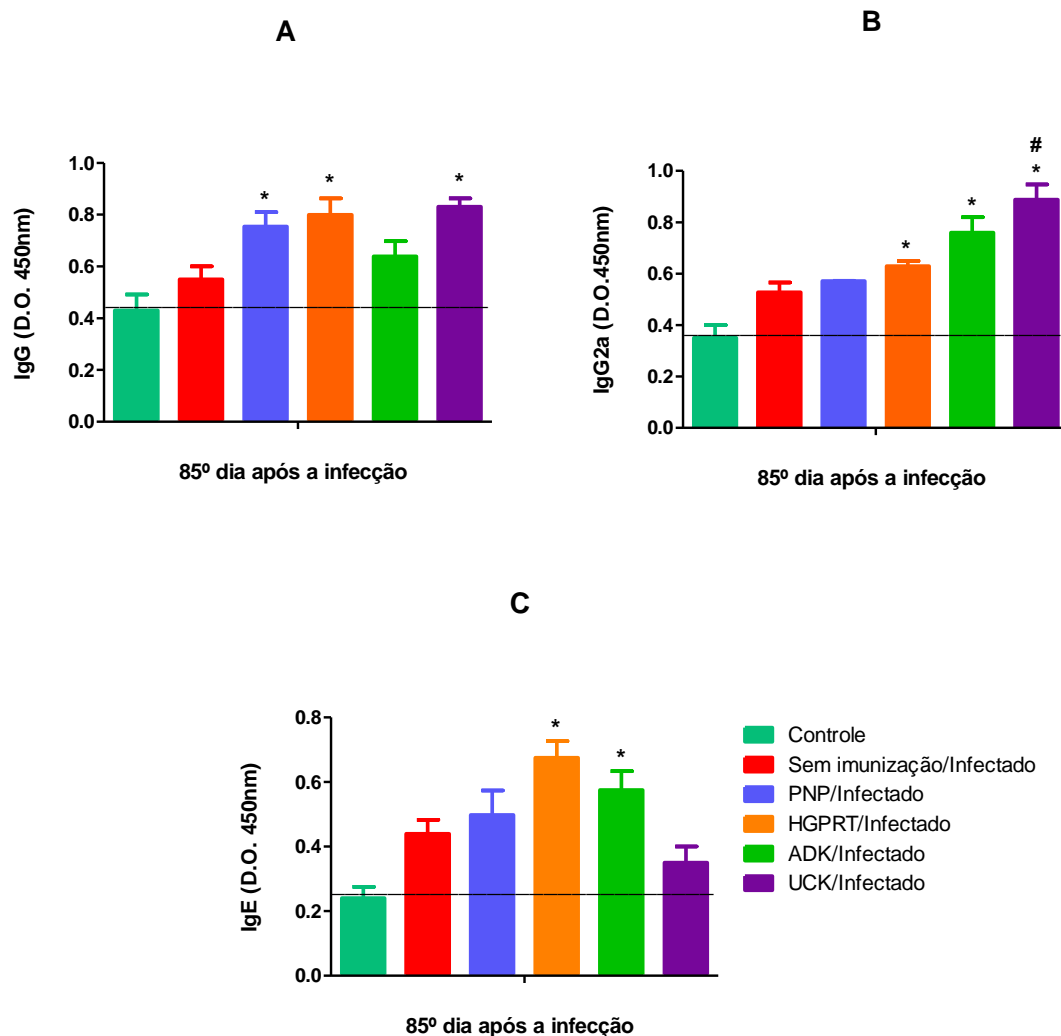


Figura 18. Dosagens de anticorpos no plasma de animais imunizados no 85º dia após a infecção. Dosagens de IgG(A); IgG2a (B) e IgE (C) no plasma. Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo *($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: sem imunização/infected e imunizado/infected quando comparados com o grupo controle. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos: imunizado/infected quando comparados com o grupo sem imunização/infected usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA

7.3 Número de vermes adultos acasalados recuperados no 48º dia após a infecção

Na figura 19 estão representados os casais recuperados dos grupos: sem imunização/infectado, imunizado com a enzima PNP/infectado, imunizado com a enzima HGPRT/infectado, imunizado com a enzima ADK/infectado e imunizado com a enzima UCK/infectado com suas respectivas porcentagens (%) de redução da carga parasitária, calculada segundo FONSECA et al., 2004. A média de vermes acasalados recuperados do grupo sem imunização/infectado foi de 85, do grupo imunizado com a enzima PNP/infectado foi de 72, do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado foi de 62, do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado foi de 77 e no grupo imunizado com a enzima UCK/infectado foi de 39.

É possível verificar que todos os grupos imunizados com as enzimas apresentaram uma diminuição da carga parasitária quando comparado ao grupo sem imunização/infectado. A porcentagem de redução da carga parasitária do grupo de animais imunizado com a enzima PNP/infectado em relação ao grupo sem imunização/infectado foi de 25%, do grupo de animais, imunizado com a enzima HGPRT/infectado a porcentagem de redução foi de 27% da carga parasitária em relação ao grupo sem imunização/infectado, do grupo de animais imunizado com a enzima ADK/infectado a porcentagem de redução foi de 9.41% em relação ao grupo sem imunização/infectado e do grupo de animais imunizado com a enzima UCK/infectado a porcentagem de redução foi de 54% em relação ao grupo sem imunização/infectado.

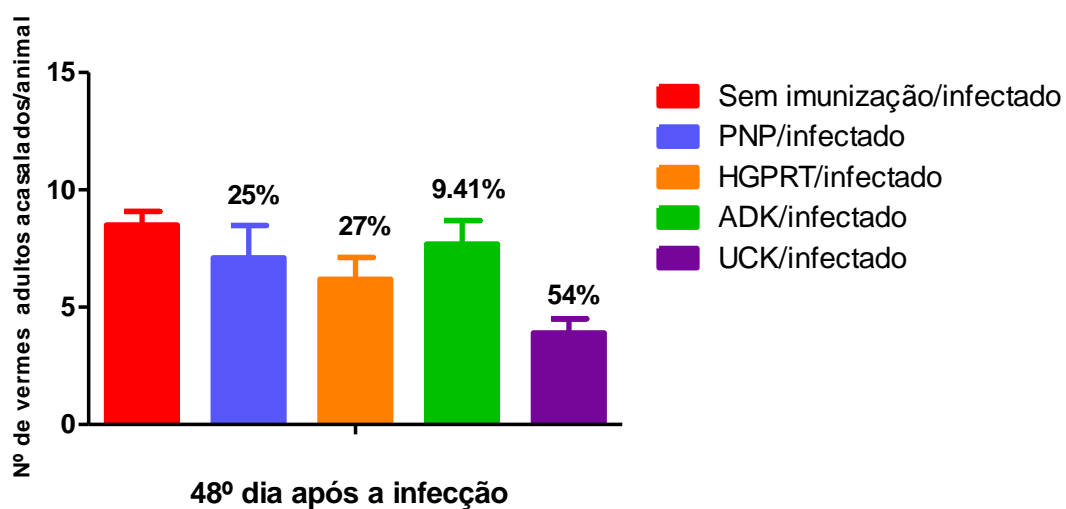


Figura 19. Número de vermes adultos acasalados e suas respectivas % de redução da carga parasitária no 48º dia após a infecção. Os vermes adultos acasalados foram recuperados por meio do sistema porta-hepático dos grupos: sem imunização/infectado, imunizado com a enzima PNP/infectado, imunizado com a enzima HGPRT/infectado, imunizado com a enzima ADK/infectado e imunizado com a enzima UCK/infectado, no 48º dia após a infecção. Os dados representam n= 10 animais de 2 experimentos independentes usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA

7.3.1 Número de vermes adultos acasalados recuperados no 85º dia após a infecção

No 85º dia de infecção foi realizada a perfusão do sistema porta-hepático para recuperação dos parasitos. Na figura 20 estão representados os vermes adultos acasalados recuperados dos grupos: sem imunização/infectado, imunizado com a enzima PNP/infectado, imunizado com a enzima HGPRT/infectado, imunizado com a enzima ADK/infectado e imunizado com a enzima UCK/infectado com suas respectivas porcentagens (%) de redução da carga parasitária, calculada segundo FONSECA et al., 2004. A média de vermes adultos acasalados recuperados do grupo sem imunização/infectado foi de 92, do grupo imunizado com a enzima PNP/infectado foi de 49, do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado, foi de 71, do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado foi de 67 e do grupo imunizado com a enzima UCK/infectado foi de 55.

É possível verificar que todos os grupos imunizados com as enzimas apresentaram uma redução da carga parasitária quando comparados com o grupo sem imunização/infectado. A porcentagem de redução da carga parasitária do grupo imunizado com a enzima PNP/infectado em relação ao grupo infectado foi de 50%, do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado a porcentagem de redução da carga parasitária foi de 19 % em relação ao grupo sem imunização/infectado, do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado a porcentagem de redução da carga parasitária foi de 27% em relação ao grupo infectado e do grupo imunizado com UCK/infectado a porcentagem de redução da carga parasitária foi de 40%.

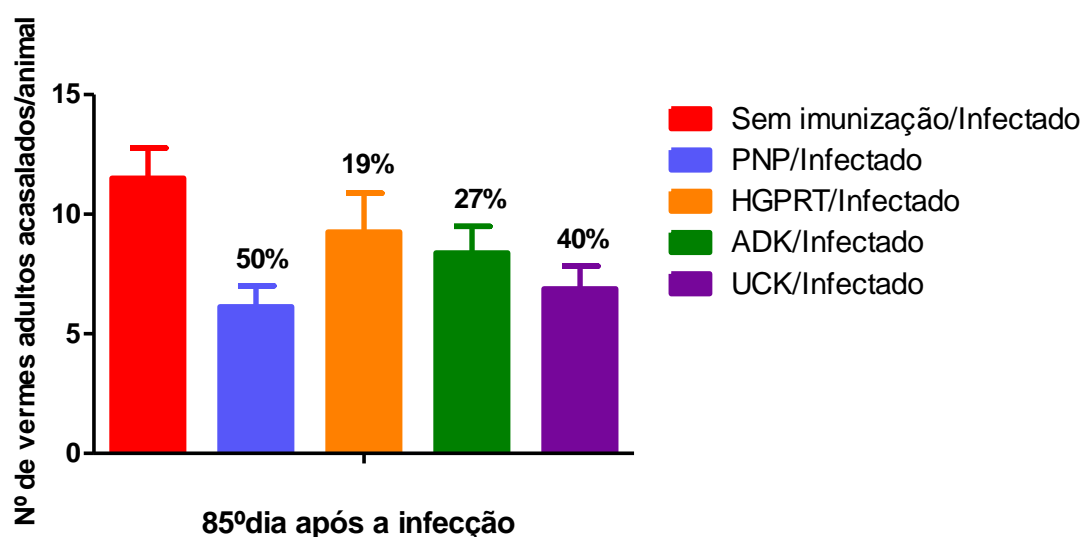


Figura 20. Número de vermes adultos acasalados e suas respectivas % de redução da carga parasitária no 85º dia após a infecção. Os vermes adultos acasalados foram recuperados por meio do sistema porta-hepático dos grupos: sem imunização/ infectado, imunizado com a enzima PNP/infectado, imunizado com a enzima HGPRT/infectado, imunizado com a enzima ADK/infectado e imunizado com a enzima UCK/infectado, no 85º dia após infecção. Os dados representam n= 10 animais de 2 experimentos independentes usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 47° e 48° dias de infecção.

A figura 21 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima PNP/infectado.

Na figura 21 A (recuperação de ovos no fígado) e 21 B (recuperação de ovos no intestino) foi observado uma diminuição significativa de ovos no 48° dia após a infecção do grupo imunizado com PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Na figura 21C também ocorreu uma diminuição significativa de ovos nas fezes no 47° dia após a infecção do grupo imunizado com PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

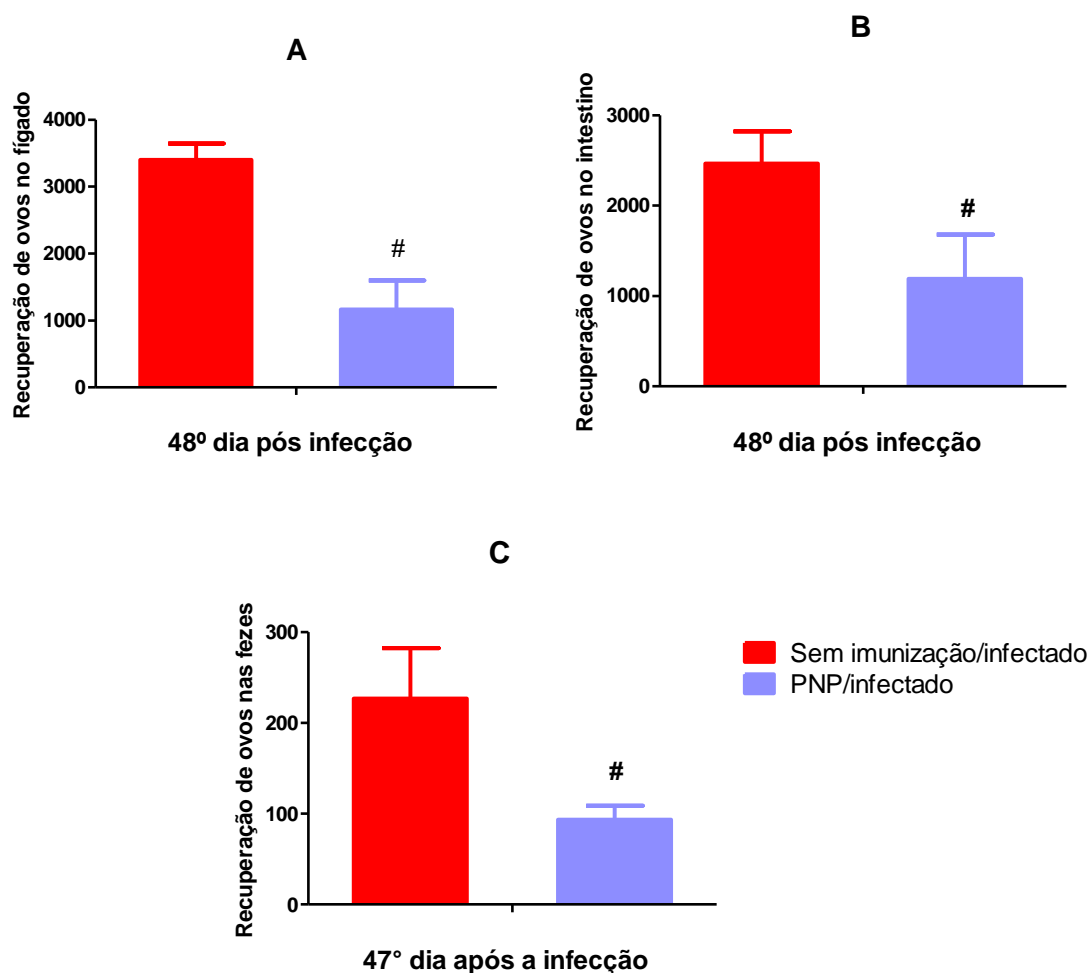


Figura 21 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 47º e 48º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo: imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/ infectado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.1 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 47° e 48° dias de infecção.

A figura 22 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima HGPRT/infectado.

Na figura 22 A (recuperação de ovos no fígado) e 22 B (recuperação de ovos no intestino) foi observado uma diminuição significativa de ovos do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado nos 48° dia após a infecção quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Na figura 22C também ocorreu uma diminuição significativa de ovos nas fezes no 47° dia após a infecção do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

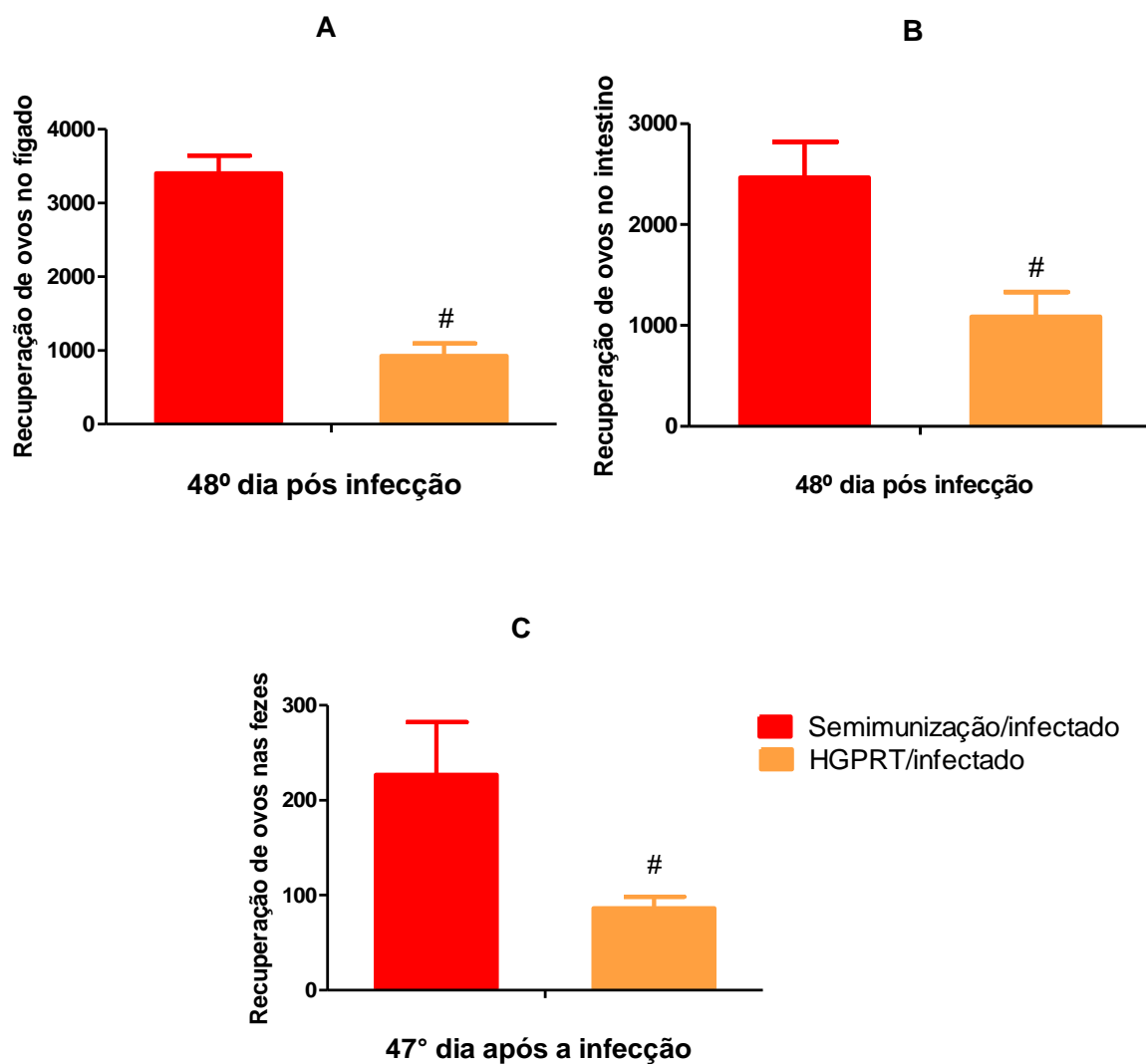


Figura 22 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 47º e 48º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes.. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo: imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/ infectado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.2 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 47° e 48° dias de infecção.

A figura 23 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima ADK/infectado.

Na figura 23 A foi observado no 48° dia após a infecção um aumento do número de ovos no fígado do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Também na figura 23 B foi observado no 48° dia após a infecção um aumento do número de ovos no intestino do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com grupo sem imunização/infectado. Já na figura 23 C foi observado no 47° dia após a infecção uma diminuição de ovos nas fezes quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

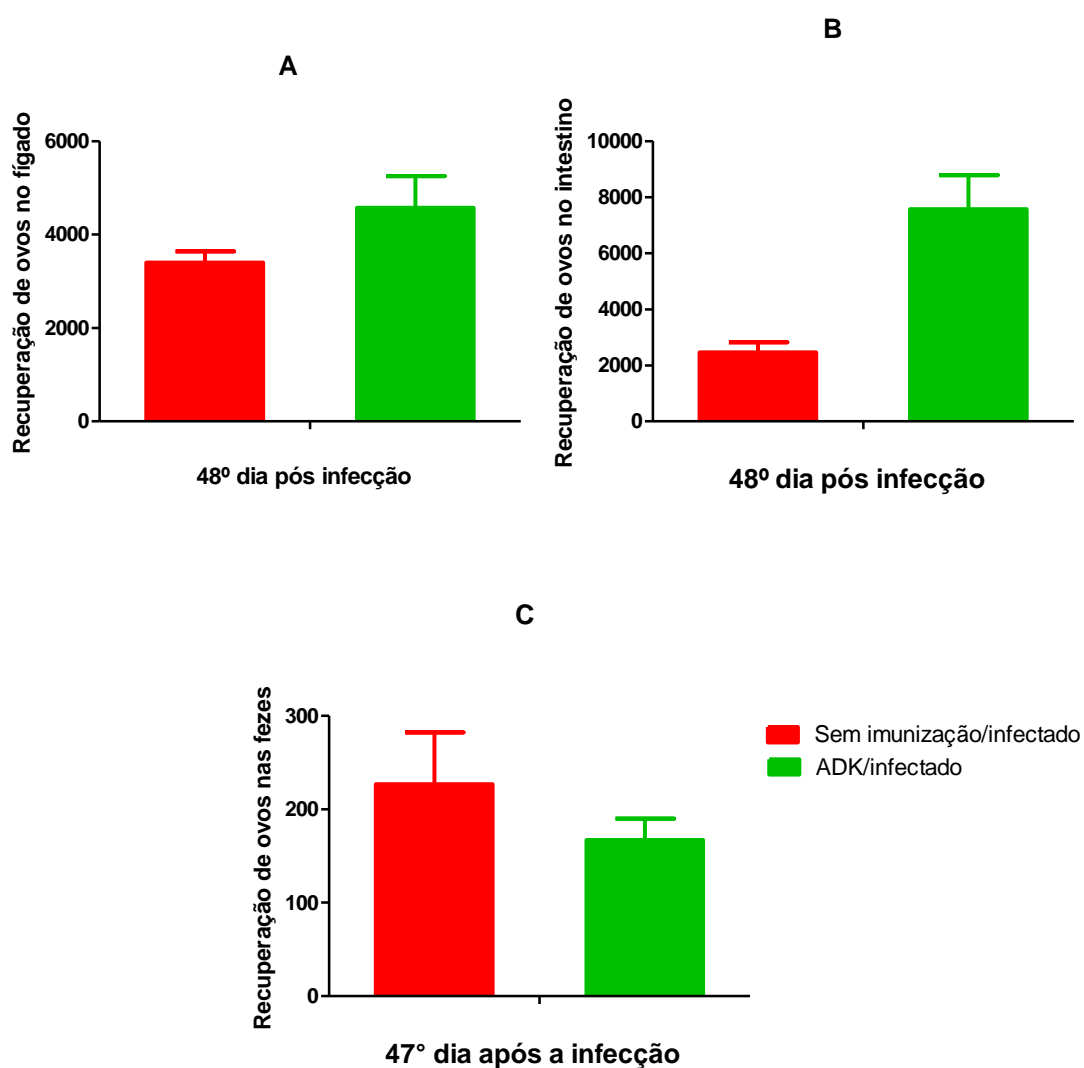


Figura 23 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 47º e 48º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.3 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 47° e 48° dias de infecção.

A figura 24 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima UCK/infectado.

Na figura 24 A foi observado no 48° dia após a infecção um aumento do número de ovos no fígado do grupo imunizado com a enzima UCK/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Já na figura 24 B foi observado no 48° dia após a infecção uma diminuição do número de ovos no intestino do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com grupo sem imunização/infectado. Também na figura 24 C foi observado no 47° dia após a infecção uma diminuição de ovos nas fezes quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

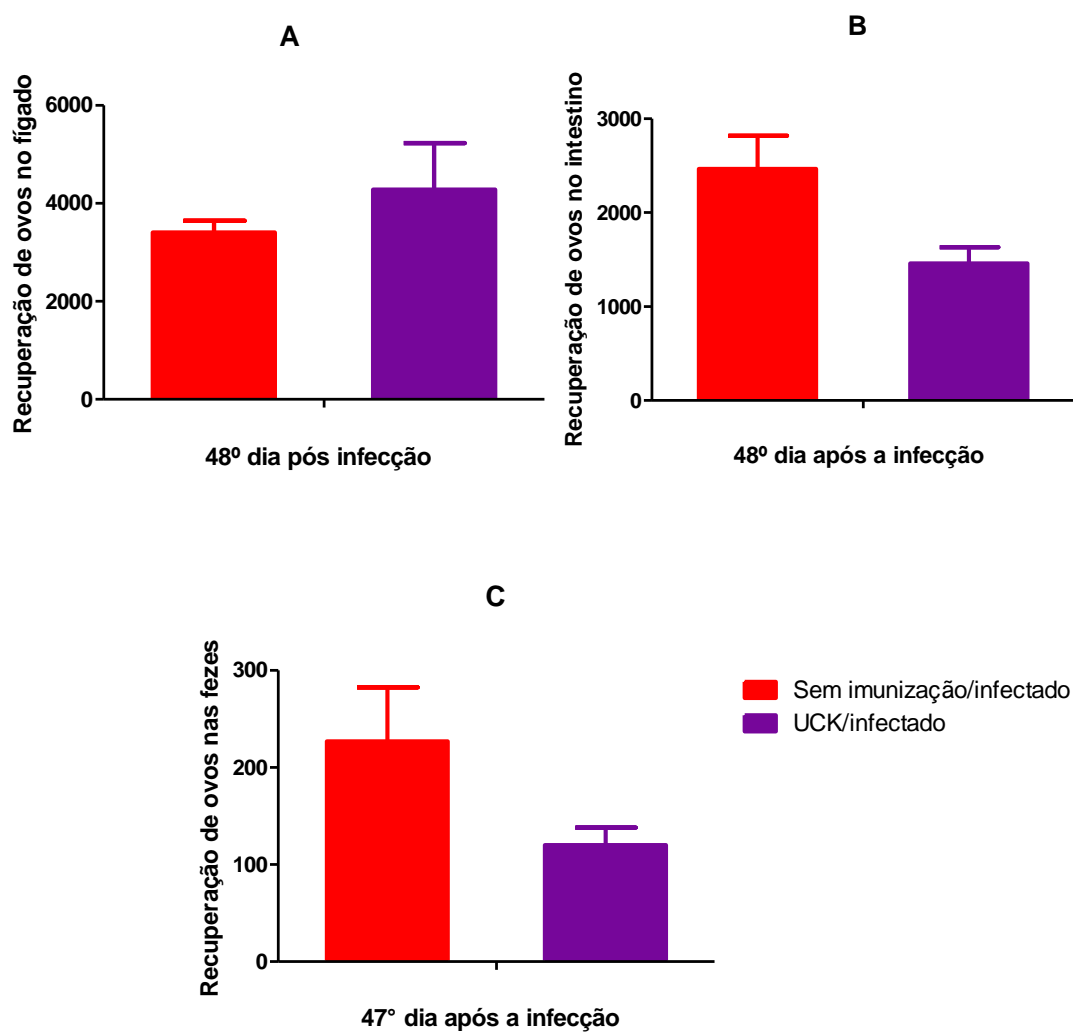


Figura 24 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 47º e 48º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.4 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 84° e 85° dias de infecção.

A figura 25 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima PNP/infectado.

Na figura 25 A (recuperação de ovos no fígado) e 25 B (recuperação de ovos no intestino) foi observado uma diminuição significativa de ovos no 85° dia após a infecção do grupo imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Já na figura 25 C no 84° dia após a infecção ocorreu uma diminuição de ovos nas fezes do grupo imunizado com PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

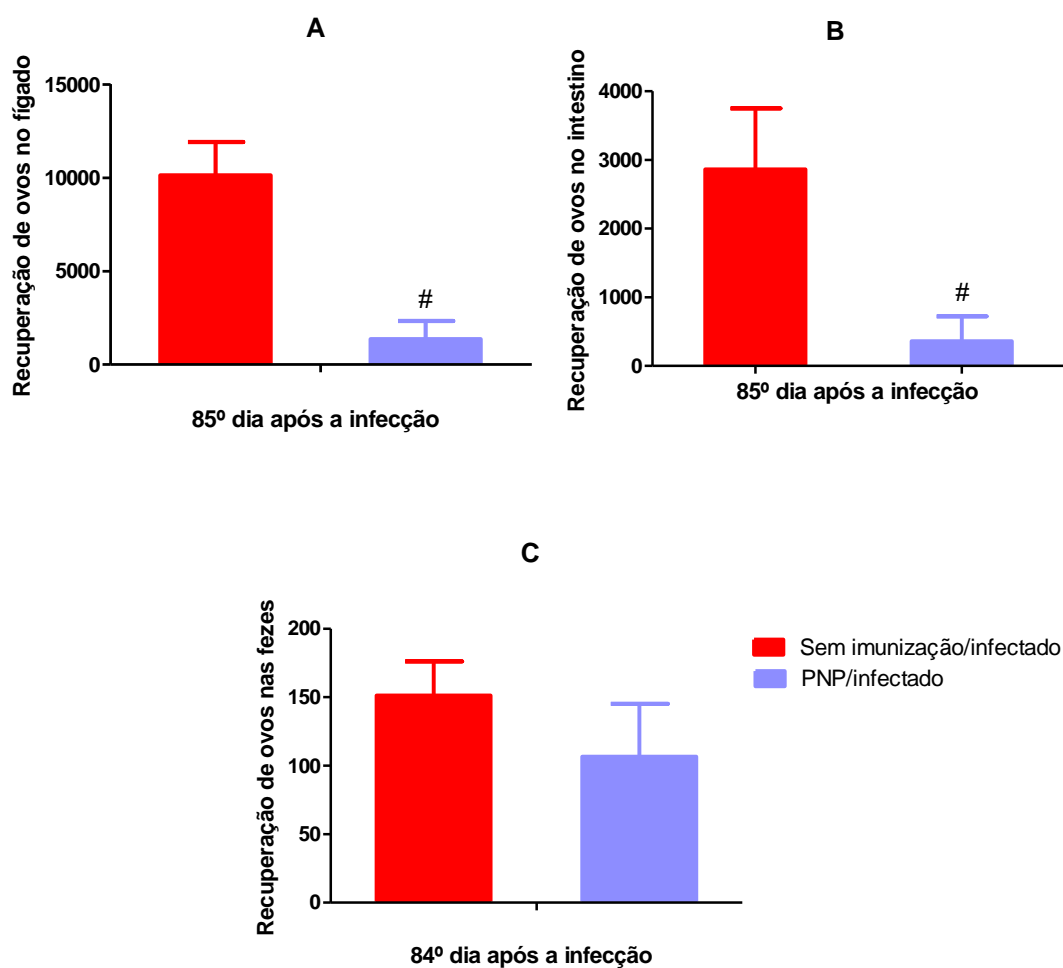


Figura 25 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com PNP/infectado após 84º e 85º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes.. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo: imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/ infectado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.5 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 84° e 85° dias de infecção.

A figura 26 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima UCK/infectado.

Na figura 26 A foi observado no 84° dia após a infecção uma diminuição significativa do número de ovos no fígado do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Já na figura 27 B foi observado no 84° dia após a infecção um aumento do número de ovos no intestino do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado quando comparado com grupo sem imunização/infectado. Também na figura 26 C foi observado no 84° dia após a infecção uma diminuição de ovos nas fezes quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

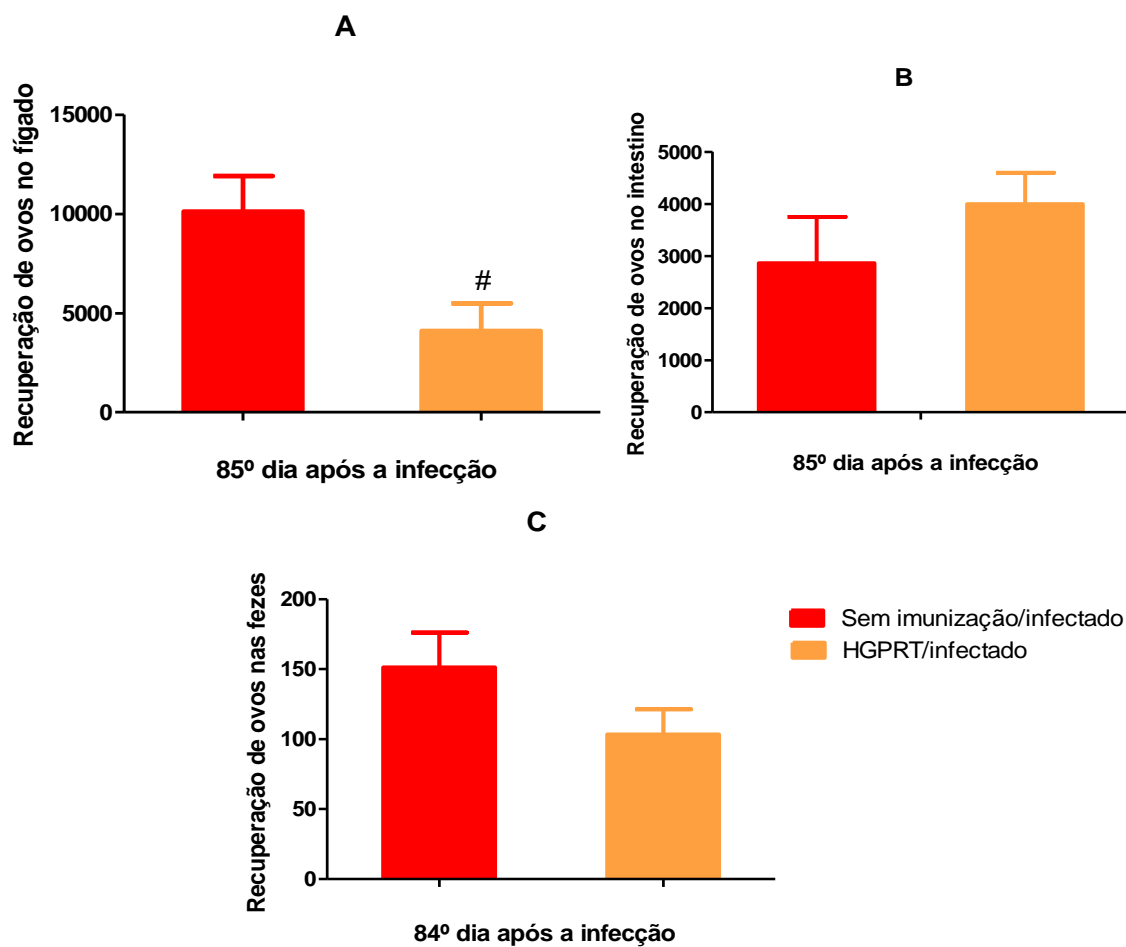


Figura 26 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com HGPRT/infectado após 84º e 85º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes.. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo: imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/ infectado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.6 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 84° e 85° dias de infecção

A figura 27 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima ADK/infectado.

Na figura 27 A foi observado no 84° dia após a infecção uma diminuição do número de ovos no fígado do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Já na figura 27 B foi observado no 84° dia após a infecção um aumento significativo do número de ovos no intestino do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com grupo sem imunização/infectado. Também na figura 27 C foi observado no 84° dia após a infecção um aumento de ovos nas fezes do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

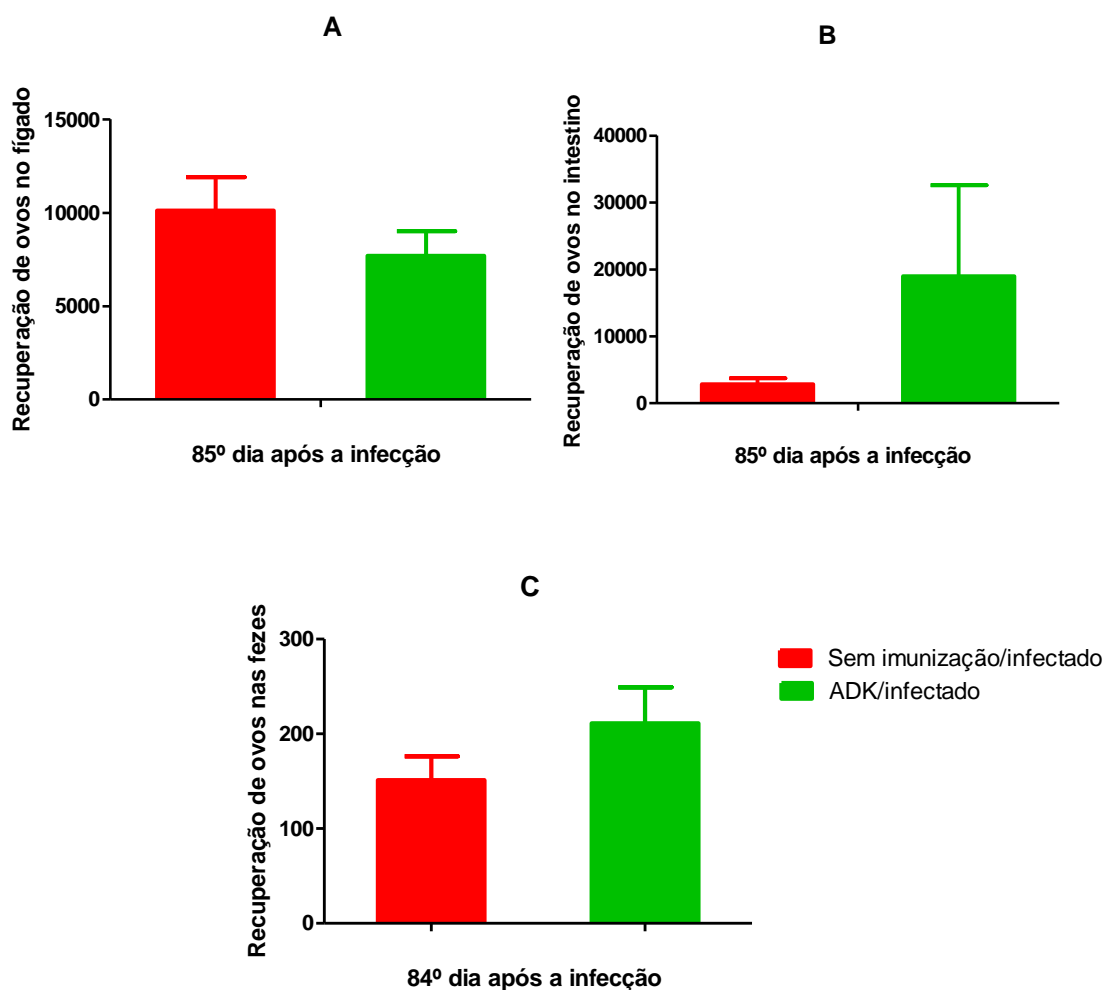


Figura 27 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 84º e 85º dia de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo: imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/ infectado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

7.4.7 Avaliação do número de ovos no fígado, intestino e nas fezes de camundongos sem imunização/infectado e imunizado com UCK/infectado após 84° e 85° dia de infecção

A figura 28 representa o número de ovos no fígado, no intestino e nas fezes dos grupos de camundongos sem imunização/infectado e imunizados com a enzima ADK/infectado.

Na figura 28 A foi observado no 85° dia após a infecção uma diminuição do número de ovos no fígado do grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado. Já na figura 28 B foi observado no 84° dia após a infecção um aumento significativo do número de ovos no intestino do grupo imunizado com a enzima UCK/infectado quando comparado com grupo sem imunização/infectado. Também na figura 28 C foi observado no 84° dia após a infecção um aumento de ovos nas fezes do grupo imunizado com a enzima ADK/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/infectado.

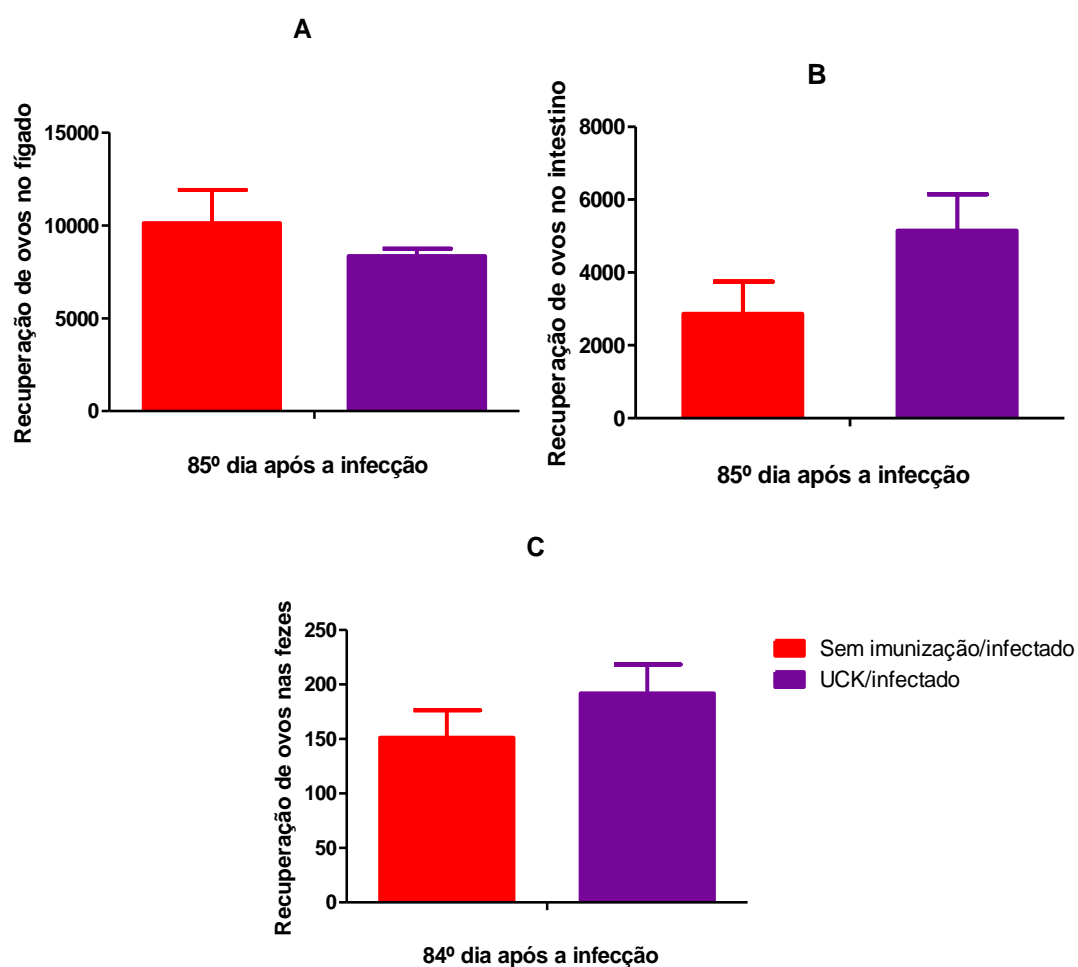


Figura 28 – Recuperação de ovos no fígado, intestino e nas fezes de animais sem imunização/infectado e imunizado com ADK/infectado após 84º e 85º dias de infecção. Recuperação de ovos no fígado (A) no intestino (B) e nas fezes (C). Os dados representam a média \pm EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. O símbolo # ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo: imunizado com a enzima PNP/infectado quando comparado com o grupo sem imunização/ infectado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

8-Discussão

A esquistossomose é uma infecção de importância mundial, acomete um grande número de pessoas e promove um comprometimento socioeconômico. Apesar da existência de fármacos contra os vermes adultos, há deficiência de fármacos que possam controlar os efeitos da infecção ou mesmo vacinas que possam controlar a disseminação deste parasito. Dessa forma, o grande avanço no combate e controle da infecção não é suficiente para minimizar a transmissão e as suas consequências. O investimento no desenvolvimento de vacinas contra parasitos é maior, no entanto, a complexidade dos vermes e suas interações com o hospedeiro mostram que estamos diante de um grande desafio. (DINIZ, 2009). Embora, em 2012 o Ministério da Saúde tenha disponibilizado uma vacina para testes em humanos a eficiência dessa vacina ainda é discutida.

Sabe-se que os parasitos induzem fraca imunidade natural e são capazes de evadirem ou resistirem às respostas imunes específicas dos hospedeiros. Esta persistência no hospedeiro leva a reações imunológicas crônicas que resultam em lesões teciduais e complicações patológicas, essas complicações estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro ao parasito e aos ovos do que à própria infecção. (DINIZ, 2009). Durante a infecção, a resposta imune do hospedeiro contra cercárias e esquistossômulos é inicialmente mediada por células tipo Th1. Com o avanço da infecção, a resposta é modulada por células Th2, induzida em especial durante a formação de granulomas gerados pelos antígenos de ovos retidos em tecidos do hospedeiro. (LOUKAS e MCMANUS, 2008).

A estratégia de utilizar enzimas do parasito na esquistossomose mansônica murina foi de avaliar uma resposta induzida por estas enzimas quando aplicadas em camundongos BALB/c e desafiados com o *S. mansoni*. Desta forma, avaliamos a fase crônica de camundongos imunizados e infectados com *S. mansoni*, onde foram analisadas amostras parasitológicas, hematológicas, sorológicas e fluidos da cavidade peritoneal, tendo em vista analisar os efeitos da imunização proposta. Não encontra-se trabalhos na literatura com essas enzimas em imunizações neste modelo experimental.

Devido a diversas proteínas já estarem sendo utilizada em testes clínicos, a busca por novos antígenos é de grande interesse para que novos conhecimentos sejam gerados a fim de, contribuir com os novos estudos que estão sendo realizados.

O processo inflamatório é um dos principais fatores que contribui para o aumento da morbidade na esquistossomose, sendo os eosinófilos uma das células de maior importância nesse contexto inflamatório. Em relação ao número de eosinófilos no sangue no 48° (Fig. 14 A PNP e HGPRT) e 85° (Fig. 16 A PNP, HGPRT, ADK e UCK) dias após a infecção no sangue, nossos resultados demonstraram que os animais imunizados/infectados apresentaram diminuição de eosinófilos quando comparados ao respectivo grupo somente infectado. Vários autores têm demonstrado que o número de eosinófilos, durante a infecção pelo *S. mansoni*, em distintos compartimentos (medula óssea, sangue, cavidade peritoneal e órgãos), apresenta número maior na fase aguda da esquistossomose, com altos níveis persistindo mesmo na fase crônica da infecção. (COLLEY, 1972; MAHMOUD et al., 1975; LENZI; LENZI, 1990). Podemos então sugerir que, as imunizações modularam negativamente a presença de eosinófilos na corrente sanguínea. Já na cavidade peritoneal dos animais dos grupos imunizados/infectados foram observados. Desse modo, esses dados sustentam a hipótese de uma possível diminuição no processo inflamatório o que indiretamente pode favorecer uma redução na fisiopatogênese que o eosinófilo esteja envolvido.

O PZQ atualmente é a única droga efetiva contra todos os Schistosomas patogênicos para o homem (WHO, 2010) e sua utilização em populações tem apresentado alguns problemas como redução e ausência da eficácia terapêutica em pacientes de diferentes regiões como Senegal e Egito. (GRYSEELS et al., 2001; ISMAIL et al., 1999). Assim a busca por novas ferramentas terapêuticas é apropriada, enquanto, ainda almeja-se a produção de formas eficazes de imunização (BOTROS, 2004). Entretanto, a ativação da resposta imune durante uma infecção pode favorecer controle do agente infeccioso. Por isso, é de grande valia observar se a modulação de parâmetros imunológicos interfere no processo infeccioso, através da análise da carga parasitária e do perfil celular envolvido no processo inflamatório desencadeado durante a infecção. Nossos resultados mostraram que, no 48° e 85° dias após infecção, todos os grupos imunizados com as enzimas PNP/infectado, HGPRT/infectado, ADK/infectado e UCK/infectado e infectados com cercárias de *S. mansoni*, apresentaram uma redução da carga parasitária (fig. 19 e 20). A imunização com a enzima PNP induziu uma diminuição da carga parasitária aproximadamente 25% no 48° dia após a infecção e aproximadamente 50% no 85° dia após a infecção, a imunização com a enzima HGPRT induziu uma resposta na redução da carga parasitária aproximadamente 27% no 48° dia

após a infecção e aproximadamente 19% no 85º dia após a infecção, a imunização com a enzima ADK induziu uma resposta na redução da carga parasitária aproximadamente 9,41% no 48º dia após a infecção e de aproximadamente 27% no 86º dia após a infecção, a imunização com a enzima UCK induziu uma resposta na redução da carga parasitária aproximadamente 54% no 48º dia após a infecção e de aproximadamente 40% no 85º dia após a infecção (fig. 19 e 20). Dessa forma, nosso resultado é semelhante com outros estudos que, utilizaram diferentes proteínas de *S. mansoni* através de imunização em modelo animais, obtendo-se resultados promissores. (MATSUMOTO, et al.,1988; PEARCE et al.,1988; CORREA-OLIVEIRA et al., 1989; MOSER, et al., 1991; PORCHET et al., 1994; TENDLER,et al., 1996; RIBEIRO DE JESUS et al., 2000; DA'DARA, et al., 2001; AL-SHERBINY et al., 2003; SHERBINY et al., 2003; VARALDO et al., 2004; FONSECA,et al 2005). Observa-se que a nossa imunização com as enzimas intracelulares, promoveu imunorreatividade de modo que, favoreceu a diminuição da carga parasitária, por vias ainda desconhecidas. Contudo, esses resultados precisam ser melhor investigados para propor qual o mecanismo levou a redução dos parasitos neste modelo experimental.

Os casais adultos de *S. mansoni* vivem nas vênulas do plexo hemorroidário e no sistema porta. (HENRI et al., 2002) e nesses locais, as fêmeas fazem a oviposição em torno de 300 ovos por dia e aproximadamente 20% deles vão em direção à luz intestinal, o restante fica aderido principalmente no intestino, baço e fígado do hospedeiro ocasionando reações inflamatórias no modelo experimental em camundongos (LENZI et al., 1987). Esse processo inflamatório desencadeado principalmente pelos antígenos liberados dos ovos favorecem estímulos que promovem aumento do infiltrado celular, direcionando células inflamatórias a formar granulomas ao redor dos ovos retidos nos tecido alvos, sendo que a morbidade é causada pela exposição antigênica, e da resposta inflamatória ao ovo do parasito (MEIRA, et al 1991). A diminuição no número de ovos é muito importante pelo fato que, os granulomas são causados principalmente pelas respostas imunes contra os antígenos solúveis dos ovos (SEAs), e ainda, um menor número de ovos sendo depositados nos tecidos pode levar uma redução do processo granulomatoso (HELMY et al., 2009), considerando conseqüentemente uma possível diminuição da morbidade dessa patogênese. Desse modo, nossos resultados sugerem que, a imunização principalmente com a PNP, HGPRT e UCK foi capaz de modular o perfil inflamatório durante a esquistossomose experimental. A fisiopatogênese da esquistossomose mansônica está diretamente relacionada aos mecanismos inflamatórios

envolvidos nas lesões hepáticas e intestinais. E dentre os fatores inerentes ao desenvolvimento do processo inflamatório está à aderência de ovos aos tecidos alvos, principalmente fígado e intestino. Nossos resultados mostraram no 48º dia de infecção, ocorreu uma redução significativa de ovos nas fezes, no intestino e no fígado dos grupos de animais imunizados/infectados com as enzimas PNP e HGPRT, sugerindo que estas enzimas podem interferir no processo de oviposição da fêmea ou estar relacionadas com a redução dos vermes adultos fêmeas indiretamente interferindo na diminuição da oviposição (Fig.20). Nossos resultados sugerem que, estas enzimas foram capazes de induzir uma resposta imunológica que atuasse na redução da carga parasitária através da eliminação dos ovos. Entretanto, no 85º dia após a infecção o grupo imunizado com a enzima PNP/infectado apresentou uma diminuição de ovos no fígado e intestino e um aumento de ovos nas fezes, o grupo imunizado com a enzima HGPRT/infectado foi observado uma diminuição de ovos no fígado, sendo que, uma diminuição de ovos no fígado também ocorre uma redução do processo granulomatoso. Nenhuma das imunizações com as enzimas ADK e UCK apresentou resultados significativos na redução de ovos no fígado, intestino e nas fezes quando comparados com o grupo sem imunização/infectado, sugerindo que na fase tardia da infecção outros fatores podem estar interferindo no controle da esquistossomose mansônica.

Para a detecção de anticorpos no plasma dos animais imunizados ou não com as enzimas, o grupo imunizado com a enzima UCK/infectado induziu a produção de IgG total no 48º e 85º dias após infecção (Fig.17 e 18). Os grupos imunizados com as enzimas PNP/infectado, HGPRT/infectado e ADK/infectado não apresentaram produção significativos de IgG total (fig.17) no 48º dia após a infecção quando comparados com o grupo controle. Porém, estas mesmas enzimas apresentaram no 85º dia após a infecção (fig. 18) produção significativa de IgG total quando comparados com o grupo controle. Existe uma família de proteínas de *S. mansoni*, com peso molecular de 20 kDa que foi associada com a resistência do hospedeiro contra reinfecção, sendo a resistência correlacionada com produção de IgE induzidos por esses antígenos. Em nossos ensaios para detecção da produção de IgE no plasma dos animais imunizados verificamos que, os grupos imunizados com as enzimas HGPRT/infectado e ADK/infectado elevaram a produção de IgE no 48º e 85º dias pós a infecção. Capron e colaboradores (2005) e Gryseels e colaboradores (2006) relacionam a resistência adquirida com a idade de indivíduos de regiões endêmicas e reinfeções durante a esquistossomose mansônica com uma resposta mediada por IgE. Em nossos ensaios de

detecção de IgE no plasma dos animais imunizados com as enzimas HGPRT/infectado e ADK/infectado, verificamos que foram detectados produção significativa de IgE no 48° e 85° dias após a infecção quando comparados com o grupo controle. Sob esse aspecto sugere que, essas enzimas podem estar associadas com o padrão de resposta Th2 que os parasitos induzem no hospedeiro, e que imunizações com elas poderiam contribuir com essa a resposta Th2. Porém, níveis de IgE contra alguns antígenos constitui uma marca em indivíduos resistentes de área endêmica e vale ressaltar, que alguns estudos relatam a idéia de que um antígeno para ser eficiente contra a esquistossomose mansônica também deve ser capaz de elevar anticorpos do tipo IgE (WILSON & COULSON, 1998).

O aumento da IgG2a se mostrou significativo apenas no grupo imunizado com UCK/infectado (fig.17) no 48° dia pós a infecção e nos grupos imunizados com as enzimas HGPRT/infectado e ADK/infectado (fig.18) obteve uma produção de anticorpos apenas no 85° dia após a infecção. Correspondendo que, a enzima UCK pode ser mais imunogênica, quando comparado com os grupos imunizados com as enzimas HGPRT/infectado e ADK/infectado. Nos ensaios de ELISA realizados para analisar IgG, IgG2a e IgE foi observado uma correlação entre a produção de anticorpos no número de parasitos recuperados, na diminuição de ovos por grama nas fezes e no fígado. Pode-se observar que, os grupos imunizados não apresentaram uma produção elevada de anticorpos (fig.17 e 18) apenas o grupo imunizado com a enzima UCK/infectado e ao mesmo tempo nestes animais obteve o menor número de parasitos, o que sugeriu um possível efeito neutralizante destes anticorpos contra diferentes fases do parasito.

Baseado nos achados deste trabalho pode sugerir que, é necessário conhecer melhor a identidade dessas enzimas, pois, sugerimos uma atividade antiparasitária. É necessário um melhor entendimento pelo qual mecanismo as enzimas agem contra os parasitos, nesse modelo experimental.

Um programa eficiente para controlar a esquistossomose mansônica deve conter pesquisas para encontrar novos fármacos para o tratamento da doença como novos antígenos. Além disso, incluir medidas de controle e conscientização junto a população como programas educativos, principalmente em regiões endêmicas.

9. Conclusões

1- A imunização com a enzima UCK/infectado apresentou acentuada redução significativa da porcentagem de vermes acasalados recuperados;

2- A imunização com a enzima PNP e HGPR induziu uma resposta imune que atuasse na diminuição significativa de ovos esquistomicidas;

3- A imunização com a enzima UCK promoveu alta produção de IgG e IgG2a nos períodos estudados correlacionado-se com a diminuição da carga parasitária;

4- As enzimas PNP E HGPRT se mostraram alvos interessantes para o desenvolvimento de novas terapias para a esquistossomose mansônica, visto que, essas foram capazes de modular a infecção através da redução da carga parasitária no fígado, intestino e fezes de animais infectados com *S. mansoni*.

10- Referências

ABATH, F.G.C.; MORAIS, C.N.L; MONTENEGRO, C.E.L.; WYNN, T.A.; MONTENEGRO, S.M.L. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.

AGARWAL, K.C.; PARKS, R.E. J.R. Adenosine triphosphate-guanosine 5- phosphate phosphotransferase IV. Isozymes in human erythrocytes and Sarcoma 180 ascites cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 8, n. 2, p. 128-138,1972.

AKDIS, C. A. et al. Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies in vitro requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 99, n. 3, p. 345 - 353, 1997.

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

ARAÚJO, M. I; et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, p. 1399-1403, 1996.

ATKINSON, D. E. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation. **Academic Press**, New York, p.85-107, 1997.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods. 3rd ed. New York: **Grune & Stratton**, 1984.

Rofatto, H. K., Tararam, C. A., Borges, W. C., Wilson, R. A., Leite, L. C. e Farias, L. P. Characterization of phosphodiesterase-5 as a surface protein in the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol** 166, 32-41, 2009.

BERENS, R.L.; KRUG, E.C; MARR, J.J.; MULLER, M. Purine an pyrimidine metabolism. **Biochemistry and molecular biology of parasites**, p. 89-117, 1995.

BETHONY, J.; et. al. Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic area in Brasil. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p.1665-1673, 1999.

BUTTERWORTH, A. E.; et. al. Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. **Parasitology**, v. 94, p.281-300, 1987.

BIANCHI, M. E.; DAMPS, PAMPs and alarmis: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, n.1, p. 1-5, 2007.

BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 211-216, 2003.

BLANCHARD T. J.; SCHISTOSOMIASIS. **Travel. Med. Infect. Dis**, v. 2, p.5–11, 2004.

BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248, 1976.

BRASCHI, S.; BORGES, W.C. e WILSON, R.A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p. 205-12, 2006a.

BRASCHI, S.; CURWEN, R.S.; ASHTON, P.D. VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WILSON, A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v. 6, p.1471-1482, 2006b.

BOROS, D. L.; WHITFIELD, J. R. Endogenous IL-10 regulates INF-gamma and IL-5 cytokine production and the granulomatous reponse in *Schistosomiasis mansoni* – infected mice. **Immunology**. v. 67, p. 1187-1193, 1998.

BOROS, D.L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Rev. Clin. Microbiol.**, p. 250-269, 1989.

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA,E.;SHUGAR,D. Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin, **Z. Naturforsch. Sect. C** 45 59–70, 1990.

CALDAS, I. R.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; OLIVEIRA, L.F.; SILVEIRA, A.M.; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop**, v.108, n.2-3, p.109-17, 2008.

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

CARVALHO, O.S.; JANNOTTI-PASSOS L.K.; CALDEIRA, R.L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero Biomphalaria. In: CARVALHO O.S., COELHO P.M.Z., LENZI H.L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose uma visão multidisciplinar. 1 ed. Rio de Janeiro: **editora FIOCRUZ**; p. 311-34, 2008.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; **Anal. Biochem.**, p.151- 369, 1985.

CHAPPEL, L.H. In Modern Parasitology. A textbook of parasitology, ed. F.E.G. **Blackwell Science**, Oxford. Cox, p. 157, 2nd, 1993.

CHEEVER, A.W., LENZI, J.A., LENZI, H.L., ANDRADE, Z.A. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.97, p. 917-940, 2002.

CHEEVER, A.W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, v. 39, p. 328-331, 1968.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol Today*, v. 21, n.9, p. 465-6, 2000.

CIOLI, D., BOTROS, S.S.; WHWATCROFT-FRANCKLOW, A.L.; TROIANI, A.R.; EL-DIN, S.H.; SABRA, A.N.; ALBIN, J.; ENGELS, D.; DOENHOFF, M.J. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int. J. Parasitol.*, v.34, p. 979-87, 2004.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today*, v.14, p. 418-412, 1998.

CORREA-OLIVEIRA, R., E. J. PEARCE, G. C. OLIVEIRA, D. B. GOLGHER, N. KATZ, L. G. BAHIA, O. S. CARVALHO, G. GAZZINELLI; A. SHER.. 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. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.83:p.98-804. 1989.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, n.5, p. 13-19, 2004.

DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J.; WANG, M. M.; HARN, D. A.. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine* **20**:P.359-369. 2001.

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, p. 221-230, 1993.

DINIZ, P. P. **Estudo do potencial vacinal de proteínas de *S. mansoni* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan /IPT, São Paulo, 135f. 2009.

DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C.C. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 11, p.157-167, 1984.

DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; AIDRITT, S.M.; WANG, C.C. *J. Biol. Chem.*, p.944-948, 1986.

DZEJA, P. P.; ZELEZNIKAR, R. J.; GOLDBERG, N. D. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 184(1-2) p.169-182, 1998.

ELLNER, J. J.; et. al. Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol* v.162, p.300-312, 1981.

EL KOUNI, M.H. NAGUIB, F.N. Pyrimidine salvage pathways in adult *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol.** v. 20, 37-44, 1990.

SMYTHIES, L. E; COUSLON, P. S.; WILSON, A. Monoclonal antibody to IFN- γ modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. **J Immunol**, v. 149, p.3654-3658, 1992.

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

STOECKLER, J.D., AGARWAL, R.P., AGARWAL, K.C., SCHMID, K., PARKS, R.E., Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes: physicochemical properties of the crystalline enzyme. **Biochemistry**, p. 278–283. 1978.

FILHO, R. P.; da SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; Brazilian Journal of Pharmaceutical. **Sciences**, v. 37, n. 2, 2001.

Fundação Osvaldo Cruz (**FIOCRUZ**) 2012. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/institucional>

FINKLEMAN, F. D. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotypeselection. Rev. **Immunol.**, Palo Alto, v. 8, p. 303 - 333, 1990.

FREEMAN, W.H. **Lehninger principles of biochemistry**. New York, 2008.

FONSECA, C. T., E. CUNHA-NETO, A. C. GOLDBERG, J. KALIL, A. R. de JESUS, E. M. CARVALHO, R. CORREA-OLIVEIRA; S. C. OLIVEIRA. Human T cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14-kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in areas endemic for schistosomiasis. **Microbes Infect.** v.7,p..204–212. 2005.

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

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

GIBLET, E.R.; AMMAN, A.J.,WARA, D.W.; SANDMAN, R., DIAMOND, L.K.: Nucleoside phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. **Lancet I**, p.1010-1975, 1975.

GOODMAN A.G.; GILMAN A.G. The Pharmacological Basis Therapeutics. **The Raw Hill.** 9A ED. CD-ROM VS. 1.0, 1996.

GUDATT, T.W.; VÓS, S.; MARTIN, J.L.; KEOUGH, D.T.; DE JERSEY J. Crystal structure of free, IMP- and GMP-bound Escherichia coli hypoxanthine phosphoribosyltransferase. **Protein Science**, v. 11, p. 1626-1638, 2002.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E.H.; LINDBLAD, E..B.; BIZZINI, B.; BENEFRAIM,S. GUPTA,C.K. Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v.1, p.293-306, 1993.

HAGAN, P.; APPLETON, C. C.; COLES, G C.; KUSEL J.R.; TCHUEM – TCHUENTE, L.A. Schistosomiasis control: **Keep taking the tablets Trends Parasitol**, n. 20, v.2, p. 92-97, 2004.

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., WHITE, E.L., ROSS, L.J., DAVIS, R.L., BORHANI, D.W. 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.

HIRSCH, C.; GOES, A. M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. **Parasitology**, p. 529-535, 1996.

HOFFMAN, K.F.; WYNN, T. A; DUNNE, D.W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infection; walking the fine line between immunological control. **Advances in parasitology and immunopatology., Londres**, v. 52, p. 265-307, 2002.

HOTEZ, P.J.; FERRIS, M.T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**. v. 24, p. 5787-5799, 2006.

HUSSAIN, R.; POINDEXTER, R. W.; OTTESEN, E. A. Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass. **J Immunol**, v. 148, n.9, p. 2731-7, 1992.

Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi). Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doenca_chagas.aspx>. 2009.

JONES, M.K.; GOBERT, G.N.; ZHANG, L.; SUNDERLAND, P. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **Biossays**, v. 26, p. 752- 65, 2004.

JACOBS, W.; BOGERS, J.; DEELDER, A.; WÉRY, M.; VAN MARCK, E. Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigeninduced inflammatory hepatic granuloma formation *in vivo*. **American Journal of Pathology**. v. 150, n.6, 1997.

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, p.303-308, 2000.

KEOUGH, D.T.; NG, A.L.; WINZOR, D.J.; EMMERSON, B.T.; DE JERSEY, J. 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.

KOSZALKA, G.W.; KRENITSKY, T.A. 5'-Methylthioadenosine (MTA) phosphorylase from promastigotes of *Leishmania donovani*. **Adv. Exp. Med. Biol.** p. 559 – 63, 1986.

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, p.303-308, 2000.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.705-711, 1999.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

KELLEY, W.N.; GREENE, M.L.; ROSENBLOOM, F.M.; HENDERSON, J.F.; SEEGMELLER, J.E. Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase deficiency on gota. **Annals of internal Medicine**, v.70 p.155-206, 1969.

KOLAROVA L. Schistosomes causing cercarial dermatitis a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity. **Folia Parasitol.**, v.54, p. 81–87, 2007.

KEOUGH, D.T.; NG, A.L., WINZOR, D.J., EMMERSON, B.T., DE JERSEY, J. 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.

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

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

LENZI, H.L.; ROMANHA, W.S.; MACHADO, M. P.; MOTA, E.M.; LENZI, J.A. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, p.575-627, 2008.

LEVANO-GARCIA, J.C. Caracterização bioquímica e imunológica das enzimas recombinants ATPdifosfohidrolases 1e 2 do parasito *Schistosoma mansoni* . Tese Doutorado. Programa de Pós - graduação em Bioquímica. Universidade de São Paulo, SP, 2008.

LIANG, Y.S.; DAI, J.R.; ZHU, Y.C.; COLES, G.C.; DOENHOFF, M.J. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**, v. 34, p. 274-280, 2003.

LIMA, M.G.S. Uso de óleos vegetais como adjuvantes da resposta imunológica em procedimentos de imunização. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008.

MACHADO, P.A. Programa Especial de Controle da Esquistossomose. O modelo. In: Painel Programa Especial de Controle da Esquistossomose. VI Conferência Nacional de Saúde. Brasil, Ministério da Saúde, p. 1-9, 1977.

MANZELLA, A.K.; OHTOMO, A.; MONZAWA, S.; LIM, J.H. Schistosomiasis of the liver. *Abdom Imaging. PubMed*, v. 33 p.144–50, 2008.

MATSUMOTO, Y., G. PERRY, R. J. LEVINE, R. BLANTON, A. A. MAHMOUD, and M. AIKAWA. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. **Nature**. 333,p.76–78. 1988.

MONTENEGRO, S. M., P. et.al. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, 1999.

MONZANI, P.S.; ALFONSO, J.D.; SIMPSON, L.; OLIVA, G.; THIEMANN, O.H. Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1598, P. 3-9, 2002.

MOSER, D., M. TENDLER, G. GRIFFITHS, M. Q. KLINKERT. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. **J. Biol. Chem.** p.8447–8454. 1991.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2002.

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

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 9a. ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1995.

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

O'HAGAN, D.T.; RAPPUOLI, R. Novel approaches to vaccine delivery. **Pharm Res**, v. 21, p.1519–1530. 2004.

O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2(9): p. 727–735. 2003.

OLIVEIRA, K.C; DEMARCO, R.; VENANCIO, T.M.; VERJAR- ORDENES, M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Identification of TNF-alpha receptor gene and

characterization of the effect of human TNF-alpha on the *Schistosoma mansoni* gene expression profile. Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome. **Trust Genomic Perspectives to Host Pathogens Interactions meeting. Hinxton – UK, 2008.**

OLIVEIRA, S. F. O.; PEREIRA, M. V.; VIANA, R. M. EDUCAÇÃO AMBIENTAL: Pertencer e cuidar da teia da vida. **Mercator - Revista de Geografia da UFC.** Ano 07, n. 13, p. 39-46, 2008.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: BLUCHER E. (Ed.) **Introdução à Geografia Médica do Brasil.** São Paulo: [S.n.], p. 213-239, 1972.

PASHINE, A.; VALIANTE, N.M.; ULMER, J.B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nat. Med.**, v.4, p. 63-68, 2005.

PAX R.; BENNETT, J.L.; FETTERER, R. A BENZODIAZEPINE DERIVATIVE AND PRAZIQUANTEL: EFFECTS ON MUSCULATURE OF *Schistosoma mansoni* AND *Schistosoma Japonicum*. NAUNYN SCHMIEDEBERGS ARCH. **PHARMACOL.** 304(3): p. 309-315, 1978.

PEARCE, E. J., S. L. JAMES, S. HIENY, D. E. LANAR, A. SHER. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:5678–5682. 1988.

PEREIRA, M. H., CLEASBY, A., PENA, S.D.J., FRANCO, G.R., GARRATT, R.C. Cloning, expression and preliminary crystallography studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. **Act. Cryst. D.** 59, p.1096-1099, 2003.

PEREIRA, T.C.; PASCOAL, V.D.; MARCHESINI, R.B.; MAIA, I.G.; MAGALHAES, L.A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; LOPES-CENDES, I.: *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. **Exp. Parasitol.** 118(4):619-623, 2008.

PARAENSE, W.L.. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** 53(2-4): 276-284, 1955.

PEARCE, E., J.; MACDONALD, A., S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature reviews – Immunology,** v.2, p. 499 – 509, 2002.

PENG, H.J.; CHEN, X.G; LI, H.; WANG, C.M. 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 Zhi.* Feb 28;22 . p. 46-9, 2004.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex –and stage related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 527- 533, 2004.

PORCHET, E., A. MCNAIR, A. CARON, J. P. KUSNIERZ, K. ZEMZOUMI, A. CAPRON. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology* **109**:565–572. 1994.

RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.90, p. 277-280, 1995.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro, editora: Guanabara Koogan, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. Ed. Guanabara Koogan, 4a ed, 2008.

RIBEIRO DE JESUS, A., I. ARAUJO, O. BACELLAR, A. MAGALHÃES, E. PEARCE, D. HARN, M. STRAND, E. M. CARVALHO. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infect. Immun.** v. 68, p.2797–2803. 2000.

RIBEIRO-PAES, J.T.; RODRIGUES, V. Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma*: a review. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.39, p.337-344, 1997.

RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6a ed., Editora Roca p. 1029, 1996.

SENFT, A.W.; MIECH, R.P.; BROWN, P.R.; SENFTS, D.G. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol**, v. 2, p. 249-60, 1972.

SENFT, A.W.; CABTREE, G.W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. **Pharmacol Ther.** v. 20, p.341-56,1983.

SILVA, S.C.; GAUSRY, V.L.V. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre. Mercado Aberto, 336p, 1996.

SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar/Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p.45-73, 2008.

SILVA, P.B.; BARBOSA, C.S.. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICOS RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DE *Biomphalaria glabrata* EM FOCOS LITORÂNEOS DA ESQUISTOSSOMOSE EM PERNAMBUCO. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 5, 901-906, 2006.

SOMOZA, J.R.; CHIN, M.S.; FOCIA, P.J.; WANG, C.C.; FLETTERICK, R.J. Crystal structure of the hypoxanthine-guanine-xantine phosphoribosyltransferase from the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus* – **Biochemistry**,v.35, p. 7032-7040, 1996

SENFT, A.W.; CRABTREE, G.W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. **Pharmacol. Ther.**, p. 341-56, 1983.

STOUT, J. T.; CASKEY, C. T. Hypoxanthinephosphoribosyl transferase deficiency: The Lesch–Nyhan syndrome and gouty arthritis. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle (Eds), **The Metabolic Basis**, 1989.

SEEGMILLER, J.E.; ROSENBLOOM, F.M.; KELLEY, W.N. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. **Science**, n 31, p.1682–1684. 1967.

STRYER, L. Biochemistry. New York. Freeman and Company, p. 881, 1988

TANABE, T., YAMADA, M., NOMA, T., KAJII, T., NAKAZAWA, A. Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. **J. Biochem.**, v.113 p.200–207, 1993.

TENDLER, M., C. A. BRITO, M. M. VILAR, N. SERRA-FREIRE, C. M. DIOGO, M. S. ALMEIDA, A. C. DELBEM, J. F. DA SILVA, W. SAVINO, R. C. GARRATT, N. KATZ, A. S. SIMPSON.. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA** 93, p.269–273. 1996..

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

TUAN, R. & SIMÕES, L.C.G. Effect of self-fertilization on *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Pulmonata: Planorbidae). **Genet. Mol. Biol.** v.21(4)p.477-478, 1998.

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

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

WANG, C.; WANG., Wu, Z.; SHEN, G.; YU, R. A piezoelectric immunoassay based on selfassembled monolayers of cystamine and polystyrene sulfonate for determination of *Schistosoma japonicum* antibodies. **Anal Bioanal Chem**, v. 373, p.803–809, 2002.

WILSON, R.A.; CURWEN, R.S.; BRASCHI, S.; HALL, S.L.; P.S. COULSON and P.D. ASHTON. From Genomes to Vaccines via the Proteome. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, (Suppl. 1)p. 45-50, 2004.

WILSON, R. A.; P. S. COULSON. Schistosome vaccines: a critical appraisal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 101(Suppl. 1)p.13–20. 2006.

WILSON, R.A.; COULSON, P.S. Why don't we have a schistosomiasis vaccine? **Parasitol Today** 14: p. 97-99. 1998.

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

WU,W.; NILES, E.G.; LOVERDE, P.T. “Thyroid hormone receptor orthologues from invertebrate species with emphasis on *Schistosoma mansoni*.” **BC EVOL BIOL**.v.7.p. 150, 2007.

XU, Y.; EADS, J.; SACCHETTINI, J.C.; GRUBMEYER, C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: Rapid phosphoribosyl transfer chemistry. **Biochemistry**, v. 36, p. 3700–3712. 1997.

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H.B.; SCHRANK, I. S.; RODRIGUES, J.J.S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L.M.P.; ROSSETTI, M.L.R. RAUPP, R.M.;

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propp@power.ufscar.br - www.propp.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal
nº 012/2010

Protocolo nº. 009/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar em sua 41ª. Reunião **APROVOU** o projeto "Avaliação da resposta imune às enzimas de vias metabólicas e de nucleotídeos como alvos terapêuticos na equistossomose mansônica experimental" apresentado pela pesquisadora Débora Meira Neris

São Carlos, 20 de abril de 2010.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal