

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR

LUCIANA PAGIATTO

MODULAÇÃO DA INFECÇÃO MURINA PELAS ENZIMAS  
RECOMBINANTES MTAP E APRT DE *Schistosoma mansoni*

São Carlos  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR

LUCIANA PAGIATTO

MODULAÇÃO DA INFECÇÃO MURINA PELAS ENZIMAS  
RECOMBINANTES MTAP E APRT DE *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Genética Evolutiva e Biologia Molecular – UFSCar como  
requisito parcial na obtenção de título de Mestre em  
Genética Evolutiva e Biologia Molecular.  
Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Fernanda de Freitas Aníbal - UFSCar  
Co-Orientador: Dr. Humberto D’Muniz Pereira - USP

São Carlos – SP  
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P136m      Pagiatto, Luciana  
Modulação da infecção murina pelas enzimas  
recombinantes MTAP e APRT de *Schistosoma mansoni* /  
Luciana Pagiatto. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
64 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. MTAP. 3. APRT. 4.  
Infecção e controle. I. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Luciana Pagiatto, realizada em 25/02/2016:

---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar

---

Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama  
UFSCar

---

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia  
USP

Dedico essa dissertação a todos que fizeram possível a pesquisa acontecer. É com muito esforço e paciência que conseguimos bons resultados.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colaboradores do projeto, Juliana e Ivan – IFSC.

Aos que cederam gentilmente os materiais e amostras – UFSCar-DMP, Instituto Fiocruz, UNICAMP, USP-IFSC e USP-RP.

Agradeço aos alunos: Luciana, Joice, Laíza, Débora, Karina, Paulo, Maurício, Túlio, Ana Carolina, Elisandra, Antônio e Ricardo.

Agradeço aos professores Fernanda Aníbal, Humberto Pereira, Silmara Allegreti e Edson Soares Garcia.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço também a participação de outros amigos – João Ricardo Lavoie, Rafael Canevarollo, Tiago Mendes, Rosemeire Nunes, Sheila e à minha família.

Agradeço aos amigos novos e antigos que deram apoio para a conclusão da pesquisa, principalmente a Maria Fernanda Chiari, a Camila Zanolo Bragatto e a Juliana Moreira Lima.

Agradeço às novas amizades e às grandes parcerias que esses dois anos me proporcionaram.

Desde sempre, agradeço a todos pela paciência, união e colaboração durante o decorrer da pesquisa.

Muito obrigada!

“Todo sucesso é resultado de um poder. Todo poder é resultado de um esforço organizado. Todo esforço organizado é resultado de um propósito definido. Todo propósito definido é resultado de um sonho. Todo sonho é resultado de uma ideia”.

**A lei do sucesso de Napoleon Hill (1908),  
segundo Jacob Pétry**

## RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença causada pelo agente etiológico *Schistosoma mansoni*, acomete cerca de 8 milhões de brasileiros, sendo considerada uma doença negligenciada. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas para o seu controle, visto que há mais de 40 anos usa-se o mesmo fármaco para o seu tratamento. Dessa forma, a busca por vacinas é de grande valia para o controle da esquistossomose mansônica. Neste estudo, avaliamos duas enzimas recombinantes de *S. mansoni*, a MTAP e a APRT, como imunógenos e verificamos o efeito antiparasitário e anti-inflamatório no modelo murino da esquistossomose mansônica. Por meio da imunização prévia com MTAP e/ou APRT e após a infecção com *S. mansoni*, analisamos a resposta do hospedeiro com determinação da carga parasitária, as citocinas imunológicas e as alterações histopatológicas no fígado desses animais. Dessa forma, nossos dados mostraram que a enzima MTAP foi capaz diminuir o número de vermes adultos nos animais previamente imunizados. A imunização com a enzima APRT e/ou com o mix das duas enzimas induziu redução do processo inflamatório no fígado dos animais e promoveu controle do depósito de colágeno. E durante a avaliação da resposta humoral a imunização com a enzima MTAP e o mix estimulou uma resposta específica com produção de anticorpos IgG1 e IgE. Assim, sugerimos que, as enzimas apresentam potencial para novos estudos que buscam um futuro alvo vacinal para o controle da esquistossomose mansônica.

**Palavras chave:** *Schistosoma mansoni*, MTAP, APRT, infecção e controle.

## ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a disease caused by *Schistosoma mansoni*, it affects about 8 million people in Brazil and it is a neglected disease. Moreover, it is necessary to develop new tools for its control, since for over 40 years the same drug has been used to treat it. Thus, the search for vaccines is of great value for the control of schistosomiasis. In this study, we evaluated two recombinant enzymes of *S. mansoni*, the MTAP and APRT as immunogens, and checked the antiparasitic and anti-inflammatory effects in the schistosomiasis murine model. By means of prior immunization with MTAP and/or APRT, we analyzed, after the infection with *S. mansoni*, the host response to parasite board determination, immunological cytokines and histopathological changes in the liver of these animals. Our data showed that the MTAP enzyme was able to decrease the number of adult worms in previously immunized animals; APRT enzyme and/or the mix of the two enzymes induced reduction of inflammation in the liver of animals and promoted collagen deposition control; and MTAP enzyme and the mix stimulated a humoral immune response with production of IgG1 and IgE antibodies. Hence we suggest that the enzymes have potential for new studies that would seek a future vaccine target for the control of schistosomiasis.

**Key-words:** *Schistosoma mansoni* , MTAP, APRT, infection and control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil de acordo com as notificações epidemiológicas. ....	5
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil de acordo com a probabilidade estatística. ....	6
Figura 3 - Ciclo biológico do parasita <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	8
Figura 4 - Formas parasitárias. ....	8
Figura 5 - Resposta imune contra o parasita <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	14
Figura 6 - Síntese das purinas na via de salvação. ....	17
Figura 7 - Análise eletroforética da purificação das proteínas. ....	25
Figura 8 - Infecção do caramujo e do camundongo com as formas infectantes. ....	26
Figura 9 - Aplicação intraperitoneal da imunização. ....	27
Figura 10 - Análise quantitativa dos ovos. ....	29
Figura 11 - Perfusão dos vermes adultos. ....	30
Figura 12 - Contagem diferencial de leucócitos no sangue corados com Panótico. ....	31
Figura 13 - Número de ovos por grama de fezes. ....	35
Figura 14 - Total de vermes adultos recuperados na perfusão. ....	36
Figura 15 - Quantidade de granulomas no tecido hepático. ....	36
Figura 16 - Quantidade de ovos encontrados nos granulomas. ....	37
Figura 17 - Corte histológico do grupo controle. ....	38
Figura 18 - Corte histológico do grupo infectado. ....	39
Figura 19 - Corte histológico do grupo infectado e imunizado com a enzima MTAP. ....	39
Figura 20 - Corte histológico do grupo infectado e imunizado com a enzima APRT. ....	40
Figura 21 - Corte histológico do grupo infectado e imunizado com o mix das enzimas. ....	40
Figura 22 - Contagem global de leucócitos no sangue. ....	41
Figura 23 - Contagem diferencial de polimorfonucleares no sangue. ....	41
Figura 24 - Contagem diferencial de mononucleares no sangue. ....	42
Figura 25 - Contagem diferencial de eosinófilos no sangue. ....	42
Figura 26 - Contagem global de leucócitos no lavado peritoneal. ....	43
Figura 27 - Contagem diferencial de polimorfonucleares no lavado peritoneal. ....	43
Figura 28 - Contagem diferencial de mononucleares no lavado peritoneal. ....	44
Figura 29 - Contagem diferencial de eosinófilos no lavado peritoneal. ....	44

Figura 30 - Nível de IgG1 plasmática.....	45
Figura 31 - Nível de IgE plasmática.....	46
Figura 32 - Citocinas inflamatórias.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valor de ovos por grama de fezes.....	35
Tabela 2 - Análise percentual dos vermes adultos.....	36
Tabela 3 - Média obtida de granulomas no tecido hepático.....	37
Tabela 4 - Média de ovos encontrados no tecido hepático.....	37
Tabela 5 - Valor médio da densidade óptica de IgG1 nas diluições de 1:10 e 1:100.....	46
Tabela 6 - Valor médio da densidade óptica de IgE nas diluições de 1:10 e 1:100.....	47
Tabela 7 - Valor da porcentagem de proteção gerada por IgG1 e IgE nas diluições de 1:10 e 1:100.....	47
Tabela 8 - Média estatística de citocinas plasmáticas dos grupos experimentais na concentração de pg/ml.....	49

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- ADA – Adenosina desaminase  
ADK – Adenilato quinase  
ADP – Adenosina difosfato  
ADSL – Adenilossuccinato liasa  
ADSS – Adenilossuccinato sintetase  
AK – Adenosina quinase  
AMP – Adenosina 5-monofosfato  
APRT – Adenina fosforibosiltransferase  
ATP – Adenosina trifosfato  
BH-MG – Belo Horizonte, Minas Gerais  
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico  
cDNA – DNA complementar  
cGMP – Glicose monofosfato cíclico  
CO<sub>2</sub> – Monóxido de oxigênio  
DNA – Adenina desoxirribonucleotídeo  
DO – Densidade óptica  
ELISA – Teste imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)  
EPM – Erro padrão da média  
G1 – Grupo controle sem infecção  
G2 – Grupo infectado  
G3 – Grupo imunizado com MTAP e infectado  
G4 – Grupo imunizado com APRT e infectado  
G5 – Grupo imunizado com MIX (MTAP e APRT) e infectado  
GDP – Guanosina difosfato  
GK – Guanilato quinase  
GMP – Guanosina monofosfato  
GMPS – Guanosina monofosfato sintetase  
GTP – Guanosina trifosfato  
HE – Hematoxilina-eosina  
HGPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase  
IgE – Imunoglobulina do tipo E

IgG – Imunoglobulina do tipo G  
IL – Interleucina  
IMP – Inosina monofosfato  
IMPDH - Inosina monofosfato desidrogenase  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
LB – Luria Bertani  
MTAP – 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase  
mRNA – RNA mensageiro  
NDPK – Nucleosídeo difosfato quinase  
NH<sub>3</sub> – Amônia  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PBS – Tampão fosfato-salino (*fosfate buffered saline*)  
PBS-BSA – Soro fetal bovino 2,5%  
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)  
PNP – Purina nucleosídeo fosforilase  
Poly I:C – Ácido poli-inosínico policitílico (análogo sintético de dsRNA)  
PRPP – 5-fosforibosil 1-pirofosfato  
PZQ – Praziquantel  
Sm14 – Proteína ligadora de ácido à gordura de *S. mansoni*  
Sm29 – Proteína de tegumento de *S. mansoni*  
*S. mansoni* – *Schistosoma mansoni*  
Smp\_028190 – SmMTAP – MTAP de *S. mansoni*  
Smp\_05436 – SmAPRT – APRT de *S. mansoni*  
Smteg – Tegumento de esquistossômulos de *S. mansoni*  
SmTSP2 – Tetrasparina-2 de *S. mansoni*  
TGF – Fator de transformação do crescimento (*transforming growth factor*)  
Th1 – Linfócito T *helper* tipo 1  
Th2 – Linfócito T *helper* tipo 2  
TNF – Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)  
TM – Tricrômico de Masson  
Treg – Linfócito T regulador  
Tris – Solução tampão de tris(hidroximetil)aminometano  
TY – Extrato de levedura e triptonna (*triptone yeast extract*)  
RNA – Adenina ribonucleotídeo

XMP – Xantosina 5'-monofosfato

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Breve Introdução às Parasitoses</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Esquistossomose mansônica</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. Histórico da Doença .....	3
1.2.2. Epidemiologia da Doença .....	4
1.2.3. Ciclo Biológico da esquistossomose .....	7
1.2.4. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento.....	10
1.2.5. Resposta Imune do Hospedeiro .....	13
<b>1.3. Vacinas Antigênicas</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4. Metabolismo de Purinas em <i>S. mansoni</i></b> .....	<b>17</b>
1.4.1. Enzimas MTAP e APRT do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	19
1.4.2. 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP) .....	19
1.4.3. Adenina fosforibosiltransferase (APRT).....	20
1.4.4. Adjuvante .....	20
<b>2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Modelo experimental</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2. Obtenção das enzimas recombinantes MTAP e APRT de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .	<b>22</b>
3.2.1. MTAP.....	23
3.2.2. APRT.....	24
3.2.3. Análise das enzimas purificadas .....	26
<b>3.3. Infecções dos camundongos com cercárias do <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	<b>26</b>
<b>3.4. Imunização com as enzimas recombinantes MTAP e APRT de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	<b>27</b>
<b>3.5. Avaliação da carga parasitária</b> .....	<b>29</b>
3.5.1. Contagem de ovos nas fezes .....	29
3.5.2. Recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático .....	30
<b>3.6. Obtenção e contagem de leucócitos no sangue e no lavado peritoneal</b> .....	<b>31</b>
<b>3.7. Ensaio Imunoenzimático</b> .....	<b>32</b>
3.7.1. ELISA Indireto.....	32

3.7.2. ELISA Sanduíche.....	33
<b>3.8. Estudo Histológico.....</b>	<b>34</b>
<b>3.9. Análise Estatística dos Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Breve Introdução às Parasitoses

Os conhecimentos sobre parasitas que promovem morbidades humanas estão presentes desde a antiguidade. Durante séculos, os informes parasitários eram obscuros e acreditava-se em uma geração “espontânea” e misteriosa desses parasitas, sobretudo pela falta de embasamento científico. Com os avanços da microscopia óptica algumas informações referentes aos parasitas foram descobertas e dessa forma tanto a morfologia quanto os ciclos biológicos desses se tornaram bem definidos (COX, 2002; KONEMMAN, 2012).

Abrangendo as informações que deram as características parasitárias, foram obtidos vários fillos, gêneros e espécies de parasitas (COX, 2002; COURA, 2005). Consequentemente foi descoberto um dos parasitas mais frequentes e que ocasiona elevada morbidade em humanos, os helmintos (NEVES et al, 2005; WANG; HU, 2014; REYNOLDS; FINLAY, 2015). Estão classificados no reino Animalia, sub-reino Metazoa e filo Platyhelminthes (COURA, 2005; ZHIGANG et al, 2015). São considerados vermes Trematódeos e endoparasitas, os quais abrangem aproximadamente 11000 espécies (NEVES et al, 2005; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Os helmintos que habitam o sangue fazem parte do grupo de trematódeos da ordem Schistosomatidae que promovem a esquistossomose (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). São conhecidas cinco espécies que causam a esquistossomose humana (FOCCACIA et al, 2009; CHUAH et al, 2014), mas três das espécies do gênero *Schistosoma* acarretam a maioria das infecções, sendo elas: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (KONEMMAN, 2012; MELTZER; SCHWARTZ, 2013; WANG; HU, 2014).

### 1.2. Esquistossomose mansônica

#### 1.2.1. Histórico da Doença

A esquistossomose humana foi encontrada em múmias egípcias com mais de 3000 anos, que apresentavam lesões típicas da doença e antígenos do parasita em seus tecidos, todavia os relatos da doença no Brasil tiveram início somente com a importação de escravos africanos parasitados e no espaço geográfico local haviam hospedeiros intermediários que

permitiram a instalação e propagação apenas do endoparasita *Schistosoma mansoni* no meio ambiente (COX, 2002; COURA; AMARAL, 2004; NEVES et al, 2005), cuja espécie propaga a doença esquistossomose mansônica (VERONESI, 1991; MELTZER; SCHWARTZ, 2013). Foi primeiramente descrita em nosso país por Pirajá da Silva em 1908 e, até o momento, é considerada um problema grave de saúde pública (DRUMMOND et al, 2010; BLANTON et al, 2015). A parasitose descrita anteriormente é conhecida pelos brasileiros como bilharziose, bilharziase mansônica, doença de Manson-Pirajá da Silva, xistose, barriga-d'água ou mal-do-caramujo (VERONESI, 1991; NEVES et al, 2005).

Apesar das medidas preventivas para minimizar a prevalência dessa e de outras doenças parasitárias, na maioria dos países subdesenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, os parasitas humanos ainda são taxados como os responsáveis pela extensa morbidade, mortalidade e também considerados como um atraso no desenvolvimento econômico (KONEMMAN, 2012; GRIFFITH, et al, 2015). A dispersão e transmissão do *Schistosoma mansoni* está relacionada com as condições de pobreza e com as precárias condições sanitárias em áreas emergentes e em crescimento onde os recursos hídricos são abundantes e o saneamento básico ainda está em desenvolvimento (SCHOLTE et al, 2014). Embora esse tipo de parasitose não seja exclusivamente humana, a incidência do parasita em outros animais (COSTA-SILVA et al, 2012; MELTZER; SCHWARTZ, 2013; LU et al, 2015), como os roedores, facilita a dispersão da doença (NEVES et al, 2005). Esses animais constituem um reservatório não humano dessa parasitose e neles o parasito ocasiona uma similar doença debilitante (COURA, 2005; COSTA-SILVA et al, 2012).

### **1.2.2. Epidemiologia da Doença**

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) cerca de 700 milhões de pessoas vivem nas áreas de risco (endêmicas) da esquistossomose mansônica, com 240 milhões de infectados distribuídos em 78 países (WHO, 2015). Dos países relatados, 52 possuem de moderada a alta transmissão da doença (SCHOLTE et al, 2014; WHO, 2015). Apresenta-se com alta endemicidade na Ásia, África, América do Sul (Brasil, Venezuela, Porto Rico, Antilhas e Suriname) e algumas ilhas do Caribe (COURA, 2005; KONEMMAN, 2012; OLIVEIRA et al, 2014). No Brasil, estima-se que haja 8 milhões de pessoas infectadas com o *Schistosoma mansoni*, no qual esse tipo de parasitose perde apenas para a Malária

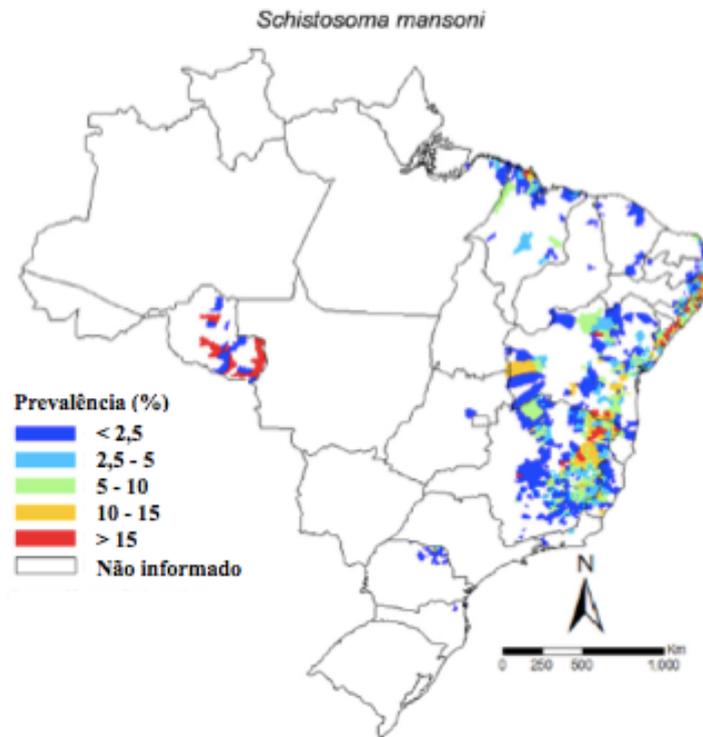
(SHALABY et al, 2003; COURA, 2005) e para a tuberculose, dentre as doenças de importância na saúde pública (SHALABY et al, 2003).

Estudos de Ruppert; Fox; Barnes (2005) mostraram que há mais relatos do parasita *Schistosoma* sp nas áreas descritas acima por serem regiões geográficas que se deparam com climas tropicais e, concomitantemente, oferecem altas temperaturas e umidade elevada proporcionando um ambiente favorável ao desenvolvimento parasitário. Além do clima brasileiro e o ambiente aquático, outros fatores são considerados fundamentais para o crescimento e a proliferação do hospedeiro intermediário (caramujo) (COSTA-SILVA et al, 2012; SCHOLTE et al, 2014). Esses fatores auxiliam na disseminação da doença e entre eles estão os fatores biológicos (habitat, mutações/adaptações dos parasitas/hospedeiros e adaptações bioecológicas dos hospedeiros intermediários), a gestão política, o meio ambiente e os recursos financeiros (TIBIRIÇÁ et al, 2008; WANG; HU, 2014).

Como o atendimento à saúde no Brasil é visivelmente precário, a esquistossomose mansônica está incluída na lista das 17 doenças negligenciadas e isso reflete as condições político-sociais onde o país se encontra (TIBIRIÇÁ et al, 2008; COSTA-SILVA et al, 2012; SCHOLTE et al, 2014). Estatisticamente, 30% da população brasileira não tem acesso ao saneamento básico e 10% é desprovida de água potável. Fato incoerente levando-se em consideração à quantidade de reservas de água doce do planeta (TIBIRIÇÁ et al, 2008).

A maior porcentagem de infectados encontra-se nos estados do nordeste brasileiro, como Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Em relação às outras regiões foram notificados casos em Minas Gerais e focos no estado de São Paulo no Vale do Paraíba, Paranapanema e Vale do Ribeira. Dentre todos os locais relatados, os estados da Bahia e Minas Gerais correspondem a 2/3 dos casos (COURA; AMARAL, 2004; COURA, 2005). Esses dados podem ser ressaltados no mapa a seguir (figura 1), em que pode ser observada a distribuição geográfica relacionada às notificações epidemiológicas da esquistossomose mansônica no Brasil (COURA; AMARAL, 2004; SCHOLTE et al, 2014).

**Figura 1** - Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil de acordo com as notificações epidemiológicas.

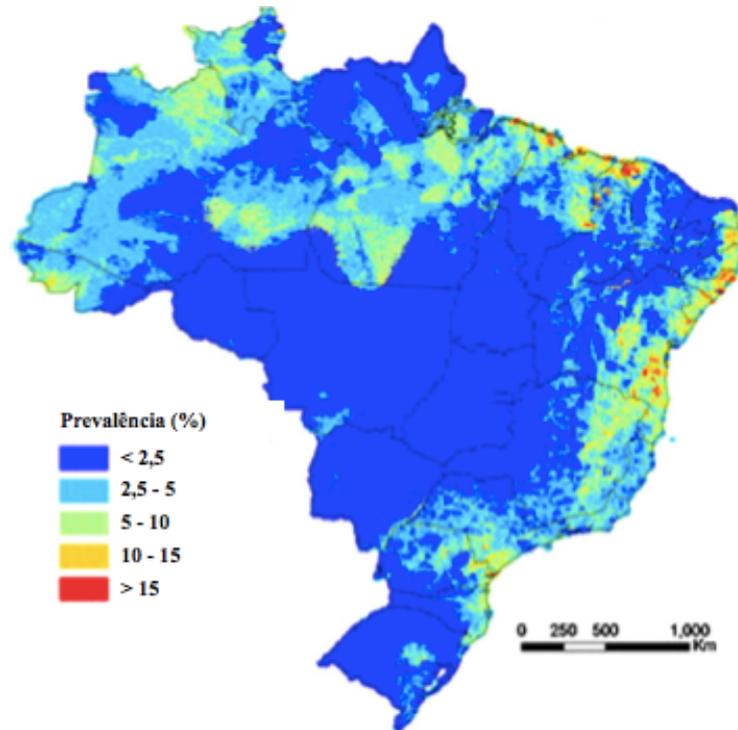


Fonte: SCHOLTE et al, 2014. Mapa referente à prevalência da doença esquistossomose mansônica referente às notificações epidemiológicas registradas pela presença da patologia de 2005 a 2009.

Algumas estatísticas epidemiológicas da doença são baseadas em relatos da esquistossomose em viajantes (turistas, missionários ou estrangeiros residentes) e esses casos podem ocasionalmente servir como “sentinelas”, sendo utilizados de modo que as autoridades da saúde iniciem as notificações epidemiológicas e monitorem os novos focos da doença (MELTZER; SCHWARTZ, 2013; WANG; HU, 2014; BLANTON et al, 2015).

Segundo Scholte et al (2014), o mapa de risco de outras regiões, principalmente o mapa de locais isolados, não existe devido à ausência de notificação epidemiológica. Em seu estudo foram realizados levantamentos de dados baseados no Programa de Controle Nacional (NCP), entre os anos de 2005 e 2009, e a partir destes estabeleceram uma informação geográfica e modelos estatísticos de acordo com as condições climáticas, de desenvolvimento e socioeconômicas de vários locais brasileiros para prever um mapa de risco da esquistossomose no Brasil. Mostrou-se que há uma distribuição espacial da probabilidade de existência do parasita em áreas do Brasil com maior prevalência do risco de infecção em partes mais ao norte da região norte, partes mais ao leste do nordeste e região norte do sudeste. Áreas de baixo riscos foram destinadas as regiões da Amazônia, central e sul do país. Essa informação é demonstrada no mapa abaixo (Figura 2).

**Figura 2** - Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil de acordo com uma probabilidade estatística.



Fonte: SCHOLTE et al, 2014. Mapa referente à presença de possíveis focos do parasita *S. mansoni* nas regiões acima demonstradas de acordo com a legenda na figura.

### 1.2.3. Ciclo Biológico da esquistossomose

A maioria das parasitoses são adquiridas através da ingestão ou contato com a água ou de alimentos contaminados ou através da picada/ferroada de um artrópode transmissor da doença (KONEMMAN, 2012). Nos caso dos helmintos, o ciclo de vida parasitário (ciclo biológico) é complexo e inclui dois ou mais hospedeiros com pelo menos dois estágios infectantes (digenea = duas durações), onde o primeiro (hospedeiro intermediário) geralmente é um molusco (caramujo), e o segundo em um artrópode, um peixe ou um vertebrado, que é o hospedeiro definitivo (COURA; NEVES et al; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

Os helmintos classificados como *Schistosoma* sp promovem a transmissão da forma infectante através da água doce e, para advir a sua proliferação, devem estar presentes no meio aquático moluscos planorbídeos possuindo papel fundamental como hospedeiro intermediário (VERONESI, 1991; MELTZER; SCHWARTZ, 2013). Com a finalidade de iniciar o ciclo parasitário, os ovos presentes nas fezes de um indivíduo infectado devem entrar em contato com água doce e nesse local devem estar presentes os moluscos do gênero

*Biomphalaria* sp (no Brasil: *B. glabrata*, *B. tenagophila* ou *B. straminea*) (COX, 2002; COURA, 2005).

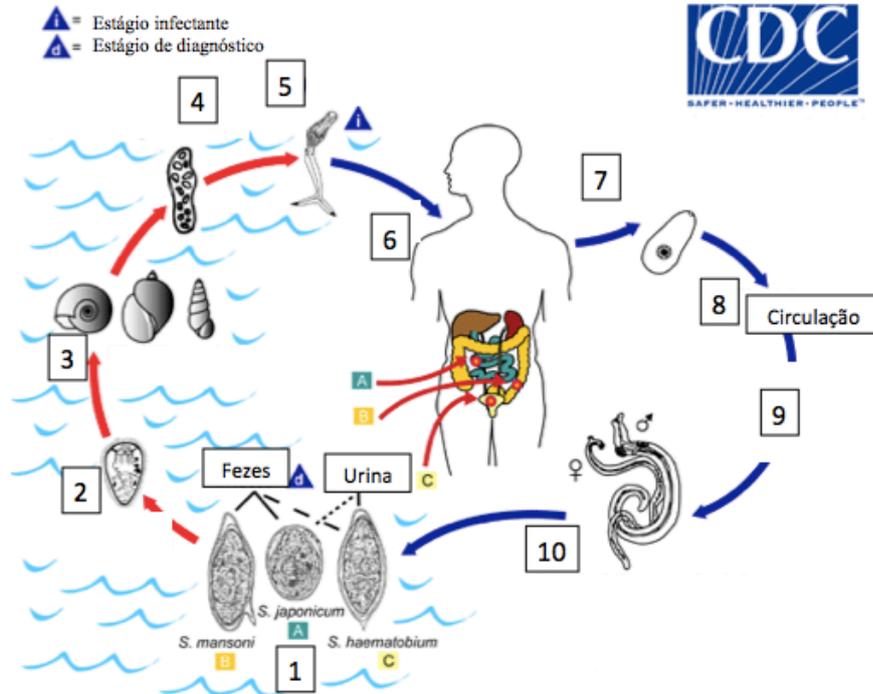
Os ovos que se encontram embrionados (figura 4.B), contendo as larvas ciliadas (miracídeos) viáveis (figura 4.C), ao entrarem em contato com a água doce sofrem eclosão e essas formas infectantes penetram no tegumento desses moluscos, por aproximadamente 15 minutos (COURA, 2005; MELTZER; SCHWARTZ, 2013). No interior do molusco os miracídeos multiplicam-se assexuadamente formando esporocistos e esporocistos filhos, dando origem as cercárias (larvas infectantes; figura 4.D), que serão liberadas para o meio aquático em condições adequadas de temperatura e iluminação (período considerado adequado por volta de 11:00 às 12:00 horas) (COURA, 2005). Esse ciclo demora cerca de 20 a 30 dias e resulta na liberação diária das cercárias, que permanecerão nadando no ambiente aquático até encontrarem e penetrarem no tecido do hospedeiro definitivo. Caso não encontre o seu hospedeiro definitivo as cercárias morrem dentro de três dias posteriores à sua liberação do molusco (COURA, 2005; MELTZER; SCHWARTZ, 2013; WANG; HU, 2014).

Ao adentrar a pele algumas cercárias podem ser destruídas na derme do indivíduo. Esse fato é correspondente à ação da resposta imunológica do hospedeiro referente à morte da metade das cercárias que penetraram na pele (SCHEER et al, 2014; WANG; HU, 2014), dando início à fase inicial da doença, a dermatite cercariana, que mostra-se como manifestações pruriginosas na pele em alguns indivíduos nas áreas endêmicas (COURA, 2005; JEREMIAS et al, 2015). A dermatite cercariana é caracterizada por uma sensação de comichão, erupção urticariforme, seguidas de edema, eritema, pequenas pápulas e dor (NEVES et al, 2005). Os pruridos são transitórios e cedem espontaneamente, podendo durar de 24 a 72 horas (COURA, 2005; JEREMIAS et al, 2015).

Ao acessarem os vasos e, posteriormente à circulação sistêmica, os esquistossômulos migram para os pulmões e fígado (SCHEER et al, 2014). Cerca de 45 dias após a infecção, situados nas veias mesentéricas, os vermes atingiram a maturidade sexual (figura 4.A) e iniciam à postura dos ovos (COURA, 2005). Aproximadamente 300 ovos por dia são liberados pela fêmea na parede dos capilares e de vênulas e 50% destes ganham o meio externo (NEVES et al, 2005; HOELLERICH et al, 2014), os quais aparecem nas fezes cerca de 48 dias após à penetração cercariana (COURA, 2005; MELTZER; SCHWARTZ, 2013; SCHEER et al, 2014). Os números de vermes removidos cirurgicamente podem variar de 4 a 2000, com predomínio de machos (VERONESI, 1991). Caso não removidos cirurgicamente ou realizado o tratamento medicamentoso, os vermes adultos podem viver de 3 a 10 anos no hospedeiro definitivo (SOTILLO et al, 2015), com relatos de pacientes com mais de 20 anos

eliminando ovos viáveis (VERONESI, 1991). Um breve esquema do ciclo biológico do parasita é representado na imagem a seguir (figura 3).

**Figura 3** - Ciclo biológico do parasita *Schistosoma mansoni*.



Formas evolutivas e seus correspondentes sítios de desenvolvimento das formas parasitárias. 1.B. Ovos de *S. mansoni* presentes nas fezes; 2. Miracídio presente no meio aquático; 3. Molusco *Biomphalaria glabrata*; 4. Esporocistos; 5. Cercária penetrando no tecido cutâneo do hospedeiro definitivo; 7. Perda da cauda da cercária após penetração local; 8. Esquistossômulos invadindo a corrente sanguínea; 9. Desenvolvimento e distinção de machos e fêmeas dos parasitas no sistema porta hepático; 10. Vermes adultos pareados iniciam a postura dos ovos. Fonte: imagem modificada de <<http://www.cdc.com>>.

**Figura 4** - Formas parasitárias.

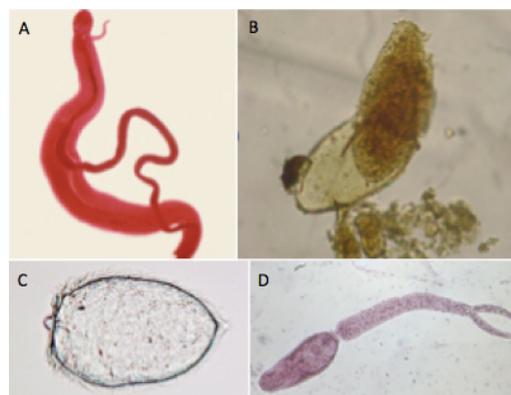


Figura A. Macho (~ 1 cm) e fêmea (~1,5 cm) pareados; Fonte: <<http://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/>>; Figura B. Ovo (~ 150 µm) eclodindo e liberando o miracídio; Fonte: arquivo pessoal; Figura C. Miracídio (~ 180 µm); Fonte: <<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/disease/schistosoma-mansoni/>>; Figura D. Cercária (~ 500 µm). Fonte: <<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/disease/schistosoma-mansoni/>>. Acesso: fev. 2015.

#### 1.2.4. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento

As recomendações básicas para o controle da esquistossomose são as medidas sanitárias, as intervenções ecológicas e a educação sanitária. Sabe-se que a transmissão ocorre pelo hospedeiro intermediário, mas o real vetor para propagação da doença é o homem (CIOLI et al, 2014). Consequentemente, é advertido como profilaxia em regiões tropicais que a população evite nadar em rios, lagos e canais de água doce, pois neles as formas infectantes do *Schistosoma* sp podem estar presentes em abundância (KONEMMAN, 2012; WANG; HU, 2014).

Visando um melhor diagnóstico clínico, faz-se necessária uma crítica análise referente ao histórico de viagem recente do paciente às regiões endêmicas de doenças parasitárias (KONEMMAN, 2012). Análises clínicas são imprescindíveis para o diagnóstico completo, dentre elas estão os exames de biópsia hepática (granuloma esquistossomótico) e análise sorológica de fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase e transaminases, as quais estarão em níveis elevados no soro do paciente. Igualmente, podem ser realizados exames diretos (fezes, biopsias retal, hepática ou outros sítios, pesquisa de antígenos circulantes do verme através da resposta imune do hospedeiro) e indiretos (pesquisa de anticorpos circulantes no soro) ou testes de intradermoreação (COURA, 2005). Há métodos como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética que auxiliam no diagnóstico da forma grave da doença (COURA, 2005; WANG; HU, 2014).

O tratamento no Brasil se dá através do medicamento praziquantel (PZQ) (COURA, 2005; FOCACCIA et al, 2009; FREZZA et al, 2013; WANG; HU, 2014). O PZQ é o único fármaco utilizado no tratamento da esquistossomose mansônica na África e nas Américas (FREZZA et al, 2013). Esse fármaco apesar de estar disponível no mercado para o tratamento não previne reinfecções (FUAAD et al, 2015). Outros medicamentos também podem ser utilizados para cura parasitológica da esquistossomose, como o niridazol, antimoniais, miracil D e seus derivados, hicantone, emetina, dihidroemetina, oltipraz, porém a eficácia dessas drogas dependem da dose medicamentosa e da carga parasitária (FOCACCIA et al, 2009).

O PZQ (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11 b-hexahidro-4H-pirazino [2,1-a] isoquinolona-4-1) é o único fármaco que vem sendo utilizado em grande escala para o tratamento dessa parasitose (SWIERCZEWSKI; DAVIES, 2009) e administrado há mais de 40 anos, recomendado como tratamento pela OMS. Em 2013, pelo menos 261 milhões de pessoas requereram ao tratamento com tal medicação (WHO, 2015). É o medicamento mais utilizado devido as suas propriedades farmacológicas eficazes, baixa toxicidade, baixo custo

(COSTA-SILVA et al, 2012) e além da sua rápida absorção (1-3 horas após à ingestão) através do sangue (FREZZA et al, 2013). Visando o controle de cura deve ser realizado exame de fezes entre o primeiro e o sexto mês após o tratamento medicamentoso (mostrando-se negativo para a presença de ovos de *S. mansoni*), sendo que a biopsia retal negativa para ovos vivos é a forma mais confiável de cura (COURA, 2005).

As propriedades do medicamento PZQ foram previamente descritas em 1975 e se tornou disponível pra uso em 1978. Possui alta eficácia contra o parasita *in vivo* (KAY et al, 2012), além de atuar em amplo espectro com significante ação contra teníase, cisticercose e espécies de *Schistosoma* (FREZZA et al, 2013). Os mecanismos de ação do PZQ são ainda indefinidos, sabe-se apenas que promovem alteração no transporte iônico, alteração a nível de membrada na passagem de fluidos, inibição do fosfoinositídeo, redução da concentração de glutatona e inibição da capacidade de adquirir nucleotídeos (KAY et al, 2012).

O PZQ foi inicialmente desenvolvido por Merck e mais tarde aprimorado pela Bayer (Indústria Farmacêutica Alemã). Hoje em dia é produzida pela Farmanguinhos – Fiocruz no Brasil, onde é distribuída pelos nomes comerciais como Cestox®, Cisticid® ou com o genérico Praziquantel®. É administrada com comprimidos de 150 - 500 mg que paralisam os vermes adultos aumentando a sua permeabilidade celular e promovendo a sua fagocitose pelas células do sistema imune. A droga é rapidamente absorvida e distribuída pelo fígado, alcançando altas concentrações sanguíneas. Seus efeitos colaterais podem ser anorexia, dores abdominais, diarreia, náuseas, vômitos, dores de cabeça, cansaço, tontura, erupções cutâneas e perda momentânea de memória, porém cessam entre 24 - 48 horas após administração (COURA; CONCEIÇÃO, 2010).

A redução na excreção de ovos utilizando esse medicamento é de 85 - 90% (COSTA-SILVA et al, 2012). Contudo, experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que não ocorre a mesma eficácia contra os vermes na sua fase de desenvolvimento (esquistossômulos) por um período de 28 dias posteriores à infecção (KAY et al, 2012), pois age diretamente nos vermes adultos (SWIERCZEWSKI; DAVIES, 2009) e estudos mostraram que os machos adultos são mais suscetíveis à ação da droga do que as fêmeas dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (KAY et al, 2012).

Futuramente, há a possibilidade do verme se tornar resistente após o tratamento quimioterápico com esse fármaco (SWIERCZEWSKI; DAVIES, 2009; GENTILE et al, 2011), uma vez que já foram descritos alguns casos de perda de sensibilidade do verme adulto da esquistossomose mansônica ao PZQ (PEREIRA et al, 2005; GENTILE et al, 2011; WANG et al, 2012; MELTZER; SCHWARTZ, 2013). Houve relatos da presença de ovos do parasita

após o tratamento com PZQ (FREZZA et al, 2013), isso ocorreu devido ao tratamento em massa administrado em algumas populações humanas de áreas endêmicas, onde apresentaram evidências na redução à suscetibilidade ao praziquantel (MELO et al, 2012; MELTZER; SCHWARTZ, 2013; REIS et al, 2013; COUSTAU et al, 2015). Estudos comprovaram que sua resistência pôde ser facilmente induzida e selecionada laboratorialmente (WANG et al, 2012; REIS et al, 2013; COUSTAU et al, 2015), determinando-se assim que o PZQ tem alto potencial a adquirir resistência pelo verme, o que torna o tratamento falho (FREZZA et al, 2013) e prova que o tratamento em massa reduz a carga parasitária, mas não é capaz de erradicar a doença (COURA; CONCEIÇÃO, 2010; EWAISHA et al, 2014; FUUAD et al, 2015).

Além do tratamento medicamentoso, a tentativa de controle da esquistossomose baseia-se em outros inúmeros métodos, como o controle de moluscos com moluscocidas, o combate e a competição biológica de alguma natureza, o saneamento básico, o suprimentos de água potável, dentre outros (COURA; CONCEIÇÃO, 2010). Um dos métodos descritos acima foi baseado em um bloqueio da transmissão do parasita, que é a via do hospedeiro intermediário (molusco) (MEDINA et al, 2009; COUSTAU et al, 2015; VICENTE et al, 2015). Moluscocidas foram utilizados para esse controle da esquistossomose, contudo o uso de produtos químicos (niclosamida) gerou danos ambientais e desequilíbrio no ecossistema local, promovendo à morte e putrefação de peixes e outros organismos de vida aquática, além do seu custo ser inacessível, o que torna seu uso inviável. Como alternativa pode ser utilizado o uso de predadores para o controle do molusco ou organismos que competem naturalmente por esse ambiente (peixes, camarões e outras espécies de moluscos), mas essa aplicação na prática ainda é inviável (CIOLI et al, 2014).

Nenhum dos métodos utilizados descritos acima podem ser considerados capazes de controlar ou erradicar a esquistossomose (COURA; CONCEIÇÃO, 2010; VICENTE et al, 2015). Dessa maneira novos estudos estão sendo feitos para que haja inovações e estratégias alternativas nas formas de combate ao parasita, onde o desenvolvimento de vacinas faz parte destas estratégias (MELO et al, 2012; VICENTE et al, 2015).

### 1.2.5. Resposta Imune do Hospedeiro

A imunidade na esquistossomose vem sendo amplamente estudada em modelos experimentais e em populações humanas por apresentarem distinções em seus mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência do parasita no organismo (SHALABY et al, 2003). Apesar do ser humano ter diferentes mecanismos de defesa, esse parasita é capaz de resistir às defesas do organismo e ainda se desenvolver no hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; OLIVEIRA, 2014). Durante seu ciclo de vida seus antígenos de superfície são modificados a cada fase do seu desenvolvimento e no momento em que o organismo do hospedeiro produz certos anticorpos contra o parasita, este já se diferenciou antigenicamente (OLIVEIRA, 2014; REYNOLDS; FINLAY, 2015). Isso resulta na dificuldade que os pesquisadores encontram para a produção de uma vacina eficaz contra esses parasitas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; OLIVEIRA, 2014; KNOPF; SURI, 2015).

Embora nossa principal defesa imunológica seja a fagocitose, que visa morte de grande quantidade desses parasitas, esses helmintos possuem um tegumento muito rígido, fato que os tornam resistentes aos ataques de neutrófilos e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MAIZELS; GAUSE, 2015). Além da estrutura do seu tegumento, as estratégias de imunoevasão do parasita ajudam-no a sobreviver no meio intravascular (BERRIMAN et al, 2009). O tegumento do parasito participa de vários processos metabólicos, como a nutrição, excreção, transdução de sinal, regulação osmótica, evasão ao sistema imune e sua modulação (XAVIER et al, 1998; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Essa complexidade presente na sua membrana, competentemente, ajuda o parasita a passar pelas fases da sua transformação dentro do hospedeiro definitivo (SOTILLO et al, 2015).

O estágio larval (esquistossômulo), compreende uma resposta celular (leucócitos envolvidos na secreção e citocinas e indução na produção de anticorpos), envolvendo preferencialmente uma resposta celular citotóxica contra o esquistossômulo (SHALABY et al, 2003). A resposta imunológica provocada pelo esquistossômulo no organismo gera uma resposta Th1 tardia, que visariam futuramente a produção de anticorpos (MCMANUS; LOUKAS, 2008). Segundo Dunne; Cooke (2005), essa resposta celular por Th1 ocorre nas 5 primeiras semanas da infecção e em resposta ao início da postura dos ovos pelo verme adulto dá-se a resposta por células Th2, ocorrendo assim a diminuição da resposta por Th1.

Iniciando a deposição de ovos nos tecidos ocorre a regressão da resposta Th1, o que faz gerar o aumento da resposta Th2 promovendo a ativação de eosinófilos, monócitos, linfócitos e citocinas inflamatórias (MCMANUS; LOUKAS, 2008; ALMEIDA et al, 2001).

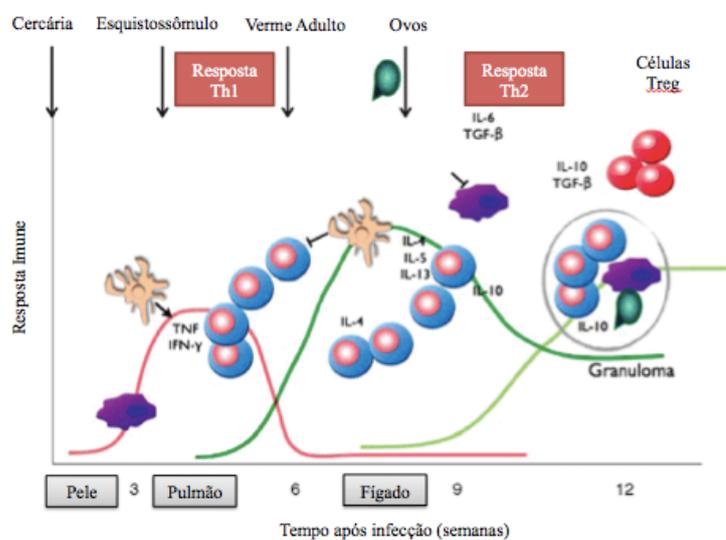
Os diferentes padrões de interleucinas (citocinas) produzidas nas fases da doença (aguda e crônica) permitem diferenciar o desenvolvimento do verme (COURA, 2005; CHUAH et al, 2014; MAIZELS; GAUSE, 2014). A ativação da resposta Th2 tem como consequência o aumento na produção de IL-5 (causando aumento de produção e maturação de eosinófilos que agrava o processo inflamatório nos tecidos) (CHUAH et al, 2014). A retenção de ovos nos tecidos devido a resposta inflamatória gera a deposição de colágeno iniciando a formação do granuloma. Posteriormente, esse tecido passa para o estado de fibrose hepática por meio do aumento da atuação de IL-13, que aumenta a fibrose local pela elevada síntese de colágeno tecidual (KUMAR et al, 2010; MAIZELS; GAUSE, 2014). Além disso, as citocinas IL-4 e IL-13 regulam a expressão de IgE, ativando e direcionando os eosinófilos. Essa atuação do sistema imune é gerada pelo fato dos eosinófilos serem mais eficazes na destruição dos helmintos, consequência determinada pela alta ação tóxica de suas proteínas (CHUAH et al, 2014; MAIZELS; GAUSE, 2014). O resultado da eliminação parasitária pelo eosinófilo é visivelmente mais ágil quando comparado a ação efetiva de outros leucócitos, como as enzimas proteolíticas e as espécies reativas de oxigênio liberadas pelos neutrófilos e mastócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MCMANUS; LOUKAS, 2008), contudo as ações dos mastócitos e eosinófilos em conjunto podem promover a expulsão e destruição do parasita. Infelizmente, essa ação conjunta da resposta adquirida no combate do parasita causam um grande dano tecidual, onde a sua presença induz granulomas e fibroses locais (EPSTEIN et al, 1979; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Em uma tentativa de fuga do local, os ovos liberam alguns antígenos (SEA - *Soluble Egg Antigens*) para o ambiente externo e estes induzem a exacerbada resposta imunológica e esses são os elementos fundamentais para a formação do granuloma (NEVES et al, 2005). A contínua postura de ovos modula a resposta inflamatória, consequentemente ocorre o desaparecimento das áreas necróticas e a redução no tamanho dos granulomas em torno dos ovos (COURA, 2005). A intensão desse granuloma é a formação de proteção para conter esses ovos, mas acompanhada da formação de fibrose leva à interrupção do fluxo sanguíneo venoso no fígado e em casos mais graves à hipertensão da porta e à cirrose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; OLIVEIRA et al, 2014).

Na fase aguda esse reação granulomatosa pode chegar ate 100 vezes o volume do ovo. Com a ação da IL-10 ocorre a modulação da imunidade, sendo um dos componentes para que

ocorra a diminuição do granuloma (NEVES et al, 2005; MAIZELS; GAUSE, 2014). A IL-10 modula a passagem da fase aguda para a fase crônica, regulando a homeostasia da inflamação através da sua atuação em células Treg (linfócitos T reguladores) (SCHEER et al, 2014; STRAUBINGER et al, 2014). As respostas Th1 e Th2 deveriam ser estimuladas no início da infecção para que não ocorresse a progressão da doença ou a presença de baixa carga parasitária, de modo que os níveis de INF- $\gamma$  estariam mais altos e a produção de anticorpos IgE e IgG estariam em sintonia (NEVES et al, 2005). Antígenos do verme adulto também são secretados e/ou excretados e quando depositados nos tecidos ao seu redor, juntamente com imunoglobulinas e o sistema complemento, os quais provocam lesões no tecido devido à atuação local da resposta inflamatória (NEVES et al, 2005; CHUAH et al, 2014). A resposta imunoprotetora é predominantemente humoral (IgE e IgG) em camundongos, contudo também faz parte a imunidade celular. Ocorre degranulação de mastócitos e a presença de IgE poderá destruir os parasitas e, junto à citotoxicidade de algumas células e a ação de anticorpos seguidos da ação dos eosinófilos, matam os esquistossômulos (COURA, 2005).

**Figura 5** - Resposta imune contra o parasita *Schistosoma mansoni*.



Após a penetração da cercária na pele, os esquistossômulos induzem uma resposta Th1 com secreção de TNF e INF- $\gamma$  por linfócitos e macrófagos para tentativa de fagocitose e destruição parasitária. A partir do desenvolvimento parasitário à verme adulto e liberação dos ovos há uma nova tentativa de conter a infecção com o aumento na secreção de citocinas inflamatórias (IL-4 e IL-5) que promovem a diferenciação e proliferação de eosinófilos para combate ao parasita, juntamente com a produção de anticorpos IgG e IgE que marcam a superfície do parasita para sinalização celular de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no combate ao parasita. A secreção de IL-13 promove a formação de fibras de colágeno nos tecidos locais gerando o granuloma. Atuando em conjunto, a IL-10 e o TGF- $\beta$  promovem tentativa de homeostasia local através da sua secreção por células T reguladoras para tentativa de contenção da passagem do ovo no tecido, mas que por sua vez inicia a formação de fibrose tecidual. Fonte: <<http://microbiology.publish.csiro.au/paper/MA13046.htm>>. Acesso em: mai. 2015.

### 1.3. Vacinas Antigênicas

As vacinas são utilizadas para prevenir doenças infecciosas e suas complicações. São administradas em países desenvolvidos e em desenvolvimento para reduzir a morbidade e mortalidade, visando proteção contra patógenos. Com os avanços da imunologia, bem como a tentativa de prevenção de doenças, têm-se expandido o número de vacinas antigênicas com objetivo de melhorar a qualidade de vida (GELLIN; SALISBURY, 2015)

Nos últimos 25 anos foram feitas várias pesquisas em busca de uma vacina eficaz contra o parasita da esquistossomose mansônica e esse objetivo ainda não se tornou uma realidade, devido a um restrito banco de dados genômico e proteômico sobre o *Schistosoma* sp. Com as intensas análises genéticas o genoma completo do *Schistosoma mansoni* foi sequenciado, tornando-se possível o investimento em novas áreas da pesquisa vacinal (FRANCO et al, 2004; CIOLI et al, 2014; EWAISHA et al, 2014). Visto que o *Schistosoma* sp afeta cerca de 5 a 10% da população mundial, uma das estratégias utilizadas para diminuir os impactos dessa doença se baseia na produção de uma vacina antigênica como um potente fator imunogênico para produção de anticorpos contra o parasita (SHALABY et al, 2003).

Como acredita-se que a vacinação seja a melhor estratégia de controle da esquistossomose (SHALABY et al, 2003; FUAAD et al, 2015; VICENTE et al, 2015), muitos laboratórios buscam os melhores antígenos para serem os candidatos a esse papel (RICHTER; HARN, 1993). Diferentes antígenos já foram indicados como um potencial agente para esse tipo de vacina, como o tegumento do verme, as proteínas que o verme secreta, bem como as enzimas antioxidantes ou proteases. Dentre eles, muitos antígenos conferiram proteção parcial, mostrando redução de até 60% dos vermes. Alguns desses antígenos estão em processo de testes, como Sm14, SmTSP2 (proteína de tegumento tetrasparin 2) e Sm29. Proteínas intracelulares também são estudadas como potencial candidatas às vacinas, tendo como exemplo a Paramiosina, Miosina V e a DLC (*Dynein Light Chain*) (INAL, 1999). Como atualmente não existe nenhuma vacina efetiva contra o *Schistosoma* sp (COUSTAU et al, 2015), há a necessidade da busca de uma vacina eficaz para o controle da esquistossomose (DINIZ et al, 2014), a qual busca conferir uma efetiva proteção imunológica contra o parasita, evitando assim a progressão e disseminação da doença, além evitar novas infecções contra futuros contatos com a forma infectante (RIBEIRO et al, 2002).

As vacinas visam manter a produção anticorpos pela resposta imunológica, ativando mediadores da resposta Th1 (principalmente INF- $\gamma$ ), evitando assim a ativação exacerbada da resposta Th2 e suas consequências negativas (aumento das citocinas inflamatórias: IL-4, IL-

10 e, principalmente, IL-13). A ativação de macrófagos pela imunização promove o aumento da resposta Th1 (aumento de INF- $\gamma$ ) e regula também a resposta Th2 com produção aumentada de IL-4 e IL-5 (MCMANUS; LOUKAS, 2008), afim de estimular a produção de IgE (aumento devido IL-4), bem como estimular o desenvolvimento e a diferenciação dos eosinófilos (aumento devido IL-5) (BRITO et al, 1984; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

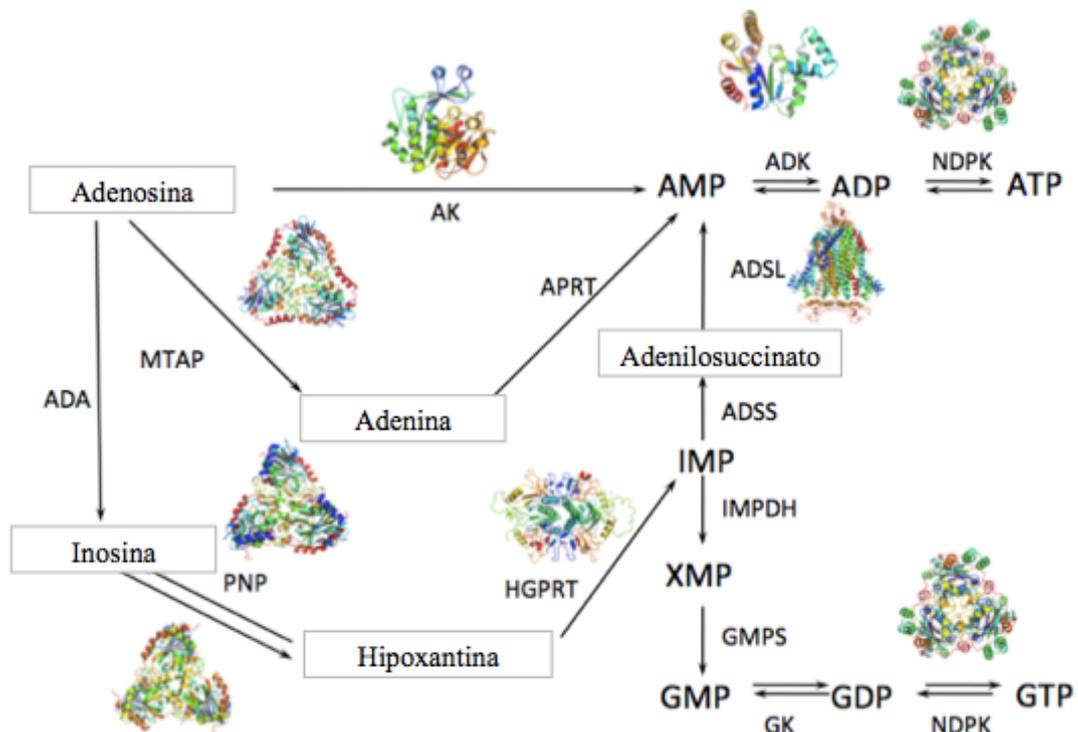
#### **1.4. Metabolismo de Purinas em *S. mansoni***

As duas enzimas presentes nesse estudo, MTAP e APRT (discutidas mais adiante), correspondem ao ciclo das purinas para obtenção de energia pela via de salvação do parasita (figura 6). Os nucleotídeos de purina são necessários em todo organismo vivo para a síntese de DNA, RNA e outros metabólitos (KOUNI; MESSIER; CHA, 1987; SAVARESE; KOUNI, 2014). São fontes de energia (ATP e o GTP - transportadores essenciais de energia) nas transações metabólicas e também são mensageiros secundários celulares (cAMP e o cGMP) (NELSON; COX, 2006). Os componentes característicos dos nucleotídeos são uma base nitrogenada, pentose e fosfato. As bases nitrogenadas são derivadas de pirimidinas (timina, citosina e uracila) e purinas (adenina e guanina) (WIEST; OLDS; BOWEN, 1991). As purinas que se encontram livre no interior das células são em grande parte recuperadas e utilizadas na síntese de nucleotídeos (NELSON; COX, 2006).

A síntese de nucleotídeos pode ocorrer de duas maneiras: através da via “de novo” e/ou a via de salvação, também chamada de recuperação (BOSIACKA et al, 2009; SAVARESE; KOUNI, 2014). A via “de novo” utiliza simples precursores da síntese de vários nucleotídeos de purina (começa com seus precursores metabólicos aminoácidos, ribose 5-fosfato, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>) (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004). Enquanto que a via de salvação reutiliza purinas pré-formadas de maneira endógena ou exógena (reciclam as bases livres e os nucleotídeos liberados na quebra dos ácidos nucléicos). Ao contrário do hospedeiro, o parasita *S. mansoni* não consegue seguir a rota da via “de novo”, pois é dependente em requerer essas purinas pré-formada derivadas do metabolismo do hospedeiro (KOUNI; MESSIER; CHA, 1987; NELSON; COX, 2006; NAGUIB; KOUNI, 2014; SAVARESE; KOUNI, 2014). Como o parasita utiliza essas enzimas (MTAP e APRT) e de outros metabólitos e as eliminam através da regurgitação pelo esôfago de fundo em ceco (sistema digestório incompleto) no sangue do hospedeiro (NAWARATNA et al, 2014), os resíduos provocam a ativação do

sistema imunológico do hospedeiro e são utilizados como antígeno para produção de anticorpos como um procedimento de defesa protetora (SENFT, A. W; SENFT, D. G; MIECH, 1972), pois dão origem aos peptídeos antigênicos que promovem, conseqüentemente, a ativação de células T (ALMEIDA et al, 2001).

**Figura 6** - Síntese das purinas na via de salvação.



Toda a fosforilação pelas enzimas (indicadas nas setas) da via tem como objetivo a produção de energia através da síntese de ATP e de GTP. Todas as siglas estão descritas na lista de abreviaturas. Fonte: PEREIRA et al, 2005.

As enzimas atuantes na via acima estão sendo cogitadas como início de novos métodos de tratamento usando terapias com fármacos anti-parasitas, cujo enfoque está no seu desenvolvimento e também visando o seu estudo em alguns casos de desordens neoplásicas (SENFT; CRABTREE, 1977; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; SWIERCZEWSKI; DAVIES, 2009).

Mesmo que o parasita possua um mecanismo que possa modificar por diferentes rotas o metabolismo de purinas, os fármacos podem bloquear ou interferir nesse caminho. Contudo, são necessários vários análogos de purinas e, até o momento, são poucos os análogos de purinas que tem sido testados como fármacos anti-parasito, já que a maioria não é eficazmente metabolizada a nível de nucleotídeo pelo parasita ou, até mesmo, extremamente tóxicas para o hospedeiro (KOUNI; MESSIER; CHA, 1987).

Como essas drogas mostram-se ineficazes, citotóxicas, atuantes após a infecção e não preventiva contra reinfeções (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004), optamos pelo método de imunização, cuja técnica antigênica mostra-se como potencial alvo para o combate na disseminação do parasita *Schistosoma mansoni*.

#### **1.4.1. Enzimas MTAP e APRT do *Schistosoma mansoni***

A resposta imune derivada da produção de anticorpo e regulação de citocinas inflamatórias na esquistossomose pode ser estudada utilizando antígeno bruto ou utilizando proteínas recombinantes (DIEPEN et al, 2015). Segundo Sotillo et al (2015), diferentes estudos mostraram alguns genes e proteínas que seriam possíveis alvos para vacinação e que estariam envolvidos na transformação da cercária para esquistossômulo, presentes no desenvolvimento do esquistossômulo ou até mesmo no verme adulto. Entretanto, Sotillo et al (2015) em seu estudo mostrou um total de 463 proteínas identificadas no tegumento do *Schistosoma mansoni*, dentre elas estavam as proteínas que constituem o citosol e o núcleo, sendo essas 40% das proteínas encontradas. As outras proteínas encontradas nesse extrato mostraram as porcentagens de 40% na membrana, 10% no citoesqueleto e menores que 10% às mitocondriais e a outros tipos de proteínas (SOTILLO et al, 2015). Como identificamos a possibilidade de uma proteína intracelular se tornar um agente antigênico para o controle da esquistossomose mansônica, selecionamos duas enzimas do parasita *Schistosoma mansoni* na tentativa de conferir uma maior proteção imunológica contra o parasita nesse modelo experimental. As enzimas propostas em análise são a 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP) e a adenina fosforibosiltransferase (APRT) da via de salvação das purinas do *Schistosoma mansoni*.

#### **1.4.2. 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP)**

A enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP) é expressa em todos os tecidos humanos normais e também em outros organismos. A função dessa enzima no caminho de salvação da metionina é converter a síntese de poliamina 5'-deoxy-5'-metiltioadenosina em adenina e metionina (KADARIYA, 2011). A MTAP é reconvertida para nucleotídeos de adenina e metionina (NOBORI et al, 1996). Também está sendo amplamente estudada em *Klebsiella pneumoniae* e em *Saccharomyces cerevisiae*, porém

como alvo de inibidores enzimáticos (SUBHI et al, 2013). A ruptura ou desmembramento da MTAP no caminho da salvação das purinas era uma proposta para ser um alvo de drogas anticâncer (SINGH; SCHRAMM, 2006), entretanto ainda não estudada como agente vacinal. A MTAP do parasita é uma proteína com características comuns à MTAP humana. Possui 314 resíduos, embora 16 são inexistentes na MTAP humana, apresentando-se com 46% de identidade (SOUZA, 2012).

#### **1.4.3. Adenina fosforibosiltransferase (APRT)**

A enzima APRT (adenina fosforribosil tranferase) catalisa a fosforilação para a formação de AMP (adenosina 5-monofosfato). A APRT permite a reutilização de bases de purinas, convertendo-as em mononucleotídeo (AMP) para a produção de alta energia (BOSIACKA et al, 2009). A falta dessa enzima no organismo vertebrado promove o aumento e acúmulo de 2,8-dihidroxiadenina (ALFONZO et al, 1995) e por ser altamente insolúvel afeta o organismo promovendo citotoxicidade (EDVARDSSON et al, 2001; BOITZ; ULLMAN, 2013; FURROW et al, 2013). Possui 39% de semelhança em relação à humana e também está sendo estudada como protótipo para o desenvolvimento de um fármaco com atividade antiparasitária (CALDAS, 2011), embora não avaliada como alvo antigênico.

#### **1.4.4. Adjuvante**

O sucesso da vacina depende de seus antígenos imunogênicos e de seu apropriado adjuvante para induzir a resposta imune (MELO et al, 2012; GELLIN; SALISBURY, 2015). Visando a produção em larga escala, diminuição das doses das vacinas e dos custos são utilizados os adjuvantes. O hidróxido de alumínio quando comparado a outros adjuvantes, mostra-se como o mais aplicado em humanos e vem sendo utilizado a mais de 60 anos devido a sua segurança e eficácia (ANDREASEN et al, 2015). É comumente utilizado como adjuvante, porém seus mecanismo de ação são parcialmente compreendidos, sabe-se que induz a resposta Th2 em camundongos (preferencialmente na indução de IgG e IgE) e com baixo estímulo da resposta celular torna-a mais eficaz (MELO et al, 2012).

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

### 2.1. Objetivo Geral

Após ensaios preliminares do nosso grupo de pesquisa com outras enzimas da via de purinas, e com avaliações positivas no que se refere ao controle da esquistossomose mansônica, objetivamos investigar as enzimas que controlam a via de salvação das purinas no modelo murino da esquistossomose mansônica. Assim, nosso objetivo geral foi realizar a avaliação dos efeitos imunizantes das enzimas recombinantes de *S. mansoni* MTAP e APRT *in vivo* no controle da esquistossomose mansônica murina.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da imunização com as enzimas MTAP, APRT e MIX (MTAP e APRT) recombinantes de *Schistosoma mansoni* no controle da esquistossomose em modelo murino;
- Analisar quantitativamente os efeitos da imunização com as enzimas MTAP e APRT sobre o desenvolvimento e a reprodução do parasita por meio da contagem de vermes adultos no sistema porta hepático e dos ovos nas fezes dos animais;
- Determinar o percentual de leucócitos no sangue e no lavado peritoneal e as células polimorfonucleares, mononucleares e eosinófilos nesses compartimentos;
- Analisar a resposta imune específica frente às imunizações através da detecção dos níveis das imunoglobulinas plasmáticas IgE e IgG1;
- Analisar a modulação do sistema imune através da determinação da concentração plasmática de citocinas (IL-4, IL-10 e IL-13 e INF- $\gamma$ ) produzidas no modelo *in vivo* após imunização e desafio da infecção com *Schistosoma mansoni*;
- Analisar o tecido hepático visando a determinação da imunização no desenvolvimento de granulomas hepáticos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Modelo experimental

O delineamento experimental foi estabelecido de acordo com os princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da unidade de protocolo nº 002/2015 (anexo).

Os animais utilizados foram camundongos (n = 60) fêmeas da linhagem *BALB/c*, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (PCR- USP), pesando entre 15 e 18 gramas, com 4 a 6 semanas de idade, livres de patógenos específicos. Os animais permaneceram no biotério de experimentação do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos, com livre acesso à água potável, ração comercial padrão, sob temperatura e luminosidade controlada.

#### 3.2. Obtenção das enzimas recombinantes MTAP e APRT de *Schistosoma mansoni*

A expressão e a purificação das enzimas MTAP e APRT foram realizadas no Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME) no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) em São Carlos, sob a coordenação do Dr. Humberto D' Muniz Pereira. As metodologias (expressão e purificação) e suas padronizações foram desenvolvidas pelo o grupo de cristalografia do Instituto de Física da USP de acordo com as seguintes etapas:



### 3.2.1. MTAP

Foi realizada a amplificação do gene Smp\_028190 referente à enzima MTAP de *S. mansoni* (SmMTAP) a partir do mRNA total do verme adulto (fornecido pelo Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ricardo De Marco – IFSC – USP). Os *primers* foram adicionados para sua ligação nos vetores de expressão e o gene foi amplificado por PCR (reação obtida com tampão 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 10 pmol/μL de cada *primer* R e F, ~100 ng de DNA molde, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase e água mili-Q) em termociclador (30 segundos a 96°C para desnaturação, 45 segundos a 60°C para anelamento dos *primers* e 45 segundos a 55°C para extensão). A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

Foi realizado um novo PCR em maior escala para obtenção de grandes quantidades desse DNA, o qual sofreu purificação e adenilação para ser inserido no vetor de propagação pTZ57R/T. Foi adicionado 10 μL resultantes dessa ligação para a transformação, por choque térmico (banho a 42°C por 90 segundos gelo por 5 minutos), de 50 μL de bactérias competentes *E. coli* DH5α. Foram adicionados 250 μL de meio de cultura LB e incubados a 37°C por 1 hora sob rotação a 125 rpm. Em seguida as bactérias foram plaqueadas (100 μL por placa de Petri contendo o meio LB suplementado com 100 μg/mL de ampicilina) e mantidas a 37°C por 14 horas. Para confirmar a transformação foi realizado um PCR das colônias, sendo observadas a diferença do peso molecular por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os plasmídeos das colônias que se mostraram recombinantes foram digeridos com enzimas de restrição, purificados e sofreram ligação ao vetor de expressão pEt28a (reação obtida por tampão ligase 2x, inserto adenilado, 50 ng/μL do vetor e T4 DNA ligase) “overnight” a 4°C. O produto resultante foi utilizado para a transformação em bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3), utilizando o mesmo protocolo citado acima, em meio LB suplementado com 50 μg/mL de kanamicina e 10 μg/mL de cloranfenicol. Foi realizado um novo PCR de colônias para confirmação do inserto no vetor.

A expressão da enzima foi realizada utilizando 500 mL do meio 2x TY suplementado com 50 μg/mL de kanamicina e 10 μg/mL de cloranfenicol contendo uma cultura do plasmídeo pET28a com o gene SmMTAP. O meio foi mantido sob agitação de 250 rpm até atingir a densidade óptica igual ou superior a 0,6. Foi então adicionado o indutor de expressão IPTG (100 μM/mL) e mantendo a cultura nas mesmas condições já descritas anteriormente por 4 horas. O meio foi então centrifugado a 9000 g por 20 minutos, sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* foi resuspendido com 50 mL de tampão de lise (50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

pH 7,4, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol e 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) e após, sofreram lise por sonicação e centrifugação a 9000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi separado para a purificação da enzima.

A purificação da enzima recombinante MTAP foi realizada por cromatografia de afinidade em resina cromatográfica de cobalto. Seguiu a purificação através da adição na coluna de afinidade do extrato bruto contendo da proteína em questão. Essa coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de lavagem (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol e 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). Passando posteriormente pelo processo de eluição utilizando 1,5 volumes do tampão de eluição (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 300 mM de NaCl, 200 mM de imidazol e 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). A proteína em seguida foi dialisada (20 mM tris, pH 7,4, 200 mM NaCl e 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) e concentrada até ~ 5 mg/mL. A enzima purificada foi concentrada em um filtro Centriprep Ultra 10 da Amicon (Millipore Corporation Bedford, MA, EUA) contendo membranas de tamanho adequadas a sua massa molecular.

### 3.2.2. APRT

Utilizando o mRNA do verme adulto, referente ao gene Smp\_05436 da enzima APRT de *S. mansoni*, foram utilizados *primers* (R e F) compatíveis com a sequência em questão e realizado o PCR visando à posterior clonagem em plasmídeos recombinantes pGEM-T e pET-28a, transformando em bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  e BL21 (DE3), respectivamente. Para obter o DNA em larga escala foi realizado novamente um PCR (reação foi obtida com 2  $\mu\text{L}$  de tampão contendo 20 mM tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCL, sendo adicionados à solução 50 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de dNTP, 2,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* R e F, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, 0,2 $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase e 50  $\mu\text{L}$  de água mili-Q) em termociclador (30 segundos a 96°C para desnaturação, 30 segundos a 54°C para anelamento dos *primers* e 60 segundos a 72°C para extensão). O resultado foi observado em eletroforese em gel de agarose a 1% corados com 2  $\mu\text{L}/100$  mL de brometo de etídio. A banda referente ao produto final foi recortada e purificada, após sofreu adenilação (reação com 1  $\mu\text{L}$  tampão 10x, 0,5  $\mu\text{L}$  de d ATP 1 mM, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM e 2,5  $\mu\text{L}$  de água mili-Q) do gene e posterior ligação (reação com 1  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação rápida T4 DNA ligase 10x, 1  $\mu\text{L}$  de pGEM-T 50 ng, 5  $\mu\text{L}$  do produto do PCR – inserto, 0,3  $\mu\text{L}$  de T4 ligase e 10  $\mu\text{L}$  de água mili-Q) ao vetor pGEM-T para a propagação do inserto, incubadas por 16 horas a 4°C.

Foram então transformados com 50  $\mu\text{L}$  células competentes (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) onde foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da reação de ligação, sendo agitados cuidadosamente e mantidos em gelo por 30 minutos, seguindo de choque térmico a 42°C por 2 minutos e retornado ao gelo por 5 minutos. Foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do meio LB onde prosseguiu o processo mantendo uma incubação por 2 horas a 37°C e sob agitação a 150 rpm.

Passado esse período, o meio foi centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado com 120  $\mu\text{L}$  do meio LB e espalhado essa suspensão de bactérias em placas de Petri contendo o meio LB sólido com ampicilina.

As colônias, após o período de 14 horas a 37°C, foram selecionadas para verificar o inserto por PCR da colônia (1,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR, 0,3  $\mu\text{L}$  de dNTP, 0,9  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2  $\mu\text{L}$  dos *primers* R e F 5 pmol/ $\mu\text{L}$ , 5,1  $\mu\text{L}$  de água mili-Q, 3  $\mu\text{L}$  de DNA molde e 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase). A reação foi seguida de eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 2  $\mu\text{L}/100$  mL de brometo de etídio para visualização da banda do DNA. A banda foi purificada e os plasmídeos recombinantes foram digeridos e ligados ao vetor de expressão pET28a (reação obtida através de 10  $\mu\text{L}$  de tampão 10x, 2  $\mu\text{L}$  do inserto 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  do vetor pET28a 57,4 ng/ $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA ligase 400 U/ $\mu\text{L}$  e 10  $\mu\text{L}$  de água mili-Q).

Visando a obtenção da enzima APRT foi iniciada a expressão, primeiramente inoculando a cultura crescida previamente com meio LB contendo a cepa *E. coli* BL21 (DE3) e com o plasmídeo pET28a em meio de cultura 2x TY suplementado com 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina. O meio permaneceu sob agitação de 150 rpm a 37°C até à densidade óptica atingir 0,6 e posteriormente adicionado o indutor de expressão IPTG. Houve uma diminuição da temperatura para 30°C sendo mantidos sob a mesma agitação durante 4 a 5 horas.

O produto da expressão foi centrifugado a 8000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado com 50 mL de tampão de lise (já citado anteriormente) e lisadas por sonicação (6 pulsos de 30 segundos mantidos em gelo). Foi realizada uma nova centrifugação a 9000 rpm durante 20 minutos e a fração solúvel foi utilizada para purificação.

A purificação foi iniciada através da cromatografia de afinidade em coluna de níquel, seguida de lavagem, eluição e diálise. Como haviam resíduos de peptídeos juntamente com a enzima recombinante, foi realizada uma nova purificação por cromatografia por exclusão molecular FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*), obtida através de um gel-filtração separando as moléculas por tamanho como critério de separação (reação com 1,5 mL da proteína sem imidazol e clivada com trombina, eluída com tampão PIPES 50 mM, 150 mM de NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  e 1 mM de DTT, pH 6,5). A enzima purificada foi concentrada em um

filtro Centriprep Ultra 10 da Amicon (Millipore Corporation Bedford, MA, EUA) contendo membranas de tamanho adequadas a suas massas moleculares.

### 3.2.3. Análise das enzimas purificadas

As análises das enzimas purificadas, bem como a presença do marcador de massa molecular e as frações de lavagem, foram realizadas em gel de poliacrilamida (SDS-Page) 15%. Após as enzimas foram quantificadas pelo método de *Bradford*.

**Figura 7** - Análise eletroforética da purificação das proteínas.

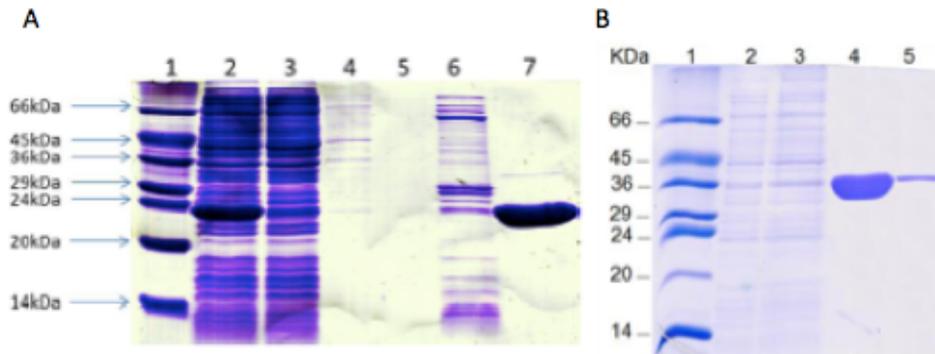


Figura A. Gel de poliacrilamida 15% SDS-Page mostrando na coluna 1 o marcador de massa molecular, na coluna 2 o lisado bacteriano, na coluna 3 o lisado após interagir com a resina, na coluna 4 a estabilização pós resina, na coluna 5 a lavagem com 10% de tampão com 500mM de Imidazol, na coluna 6 a lavagem com 20% e na coluna 7 a lavagem com 50% e o pico da eluição da proteína SmAPRT; Fonte: CALDAS, 2011. Figura B. Gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie blue mostrando na coluna 1 o marcador de peso molecular, na coluna 2 o eluato, na coluna 3 as proteínas encontradas na lavagem da coluna, nas colunas 4 e 5 as frações da eluição da proteína SmMTAP; Fonte: SOUZA, 2012.

### 3.3. Infecções dos camundongos com cercárias do *Schistosoma mansoni*

Os miracídios da cepa LE (BH-MG) de *Schistosoma mansoni* foram cedidos pela Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti do Departamento de Biologia Animal da UNICAMP. Os caramujos do gênero *Biomphalaria glabrata* presentes no Moluscário da mesma instituição foram expostos a 10 miracídios antecipadamente durante aproximadamente 30 dias, prazo estimado para a reprodução dos miracídios em seu interior (figura 8A). Após esse período esses moluscos foram expostos à iluminação artificial por 2 horas, sendo esse procedimento correspondente à luz natural onde há o período de maior incidência de luminosidade do dia (figura 8C). Assim, ocorreu a liberação das cercárias para o exterior do caramujo, onde estas foram selecionadas e adicionadas a tubos de ensaio com 10 mL de água

decolorada até atingirem um total de 80 cercárias por tubo (figura 8B). Foram utilizados 24 tubos devidamente enumerados, sendo que a cada 6 tubos corresponderam a um grupo de camundongos do experimento.

Os camundongos da linhagem *BALB/c* foram infectados por via cutânea com as formas infectantes do *S. mansoni* seguindo o método de Standen (1953). A cauda de cada camundongo foi inserida em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água decolorada e 80 cercárias. Esta exposição permitiu à entrada de maneira natural em ~ 75% das cercárias (figura 8D).

**Figura 8** - Infecção do caramujo e do camundongo com as formas infectantes.

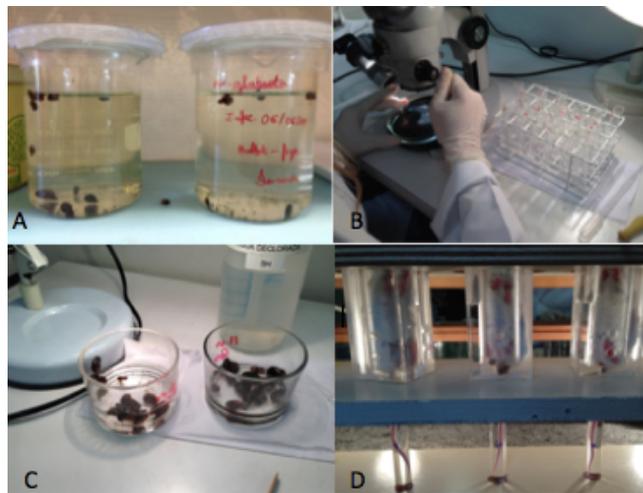


Figura A. Caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídeos; B. Seleção e contagem cercariana; C. Exposição dos caramujos à iluminação artificial; D. Contato cercariano com a cauda dos camundongo. Fonte: arquivo pessoal.

Após a exposição de duas horas da cauda do camundongo em contato com as cercárias foram obtidos os números exatos da forma infectante que não penetraram através dessa via. Com auxílio de um microscópio óptico, o tubo de cada animal foi analisado e pode-se contar com precisão a quantidade das formas infectantes que não penetraram à cauda do camundongo.

### 3.4. Imunização com as enzimas recombinantes MTAP e APRT de *Schistosoma mansoni*

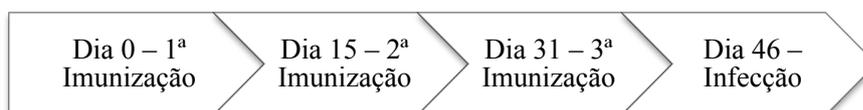
A imunização foi realizada com 100 µg das enzimas recombinantes, já produzidas e purificadas, MTAP e APRT, adicionadas em 200 µL de PBS estéril, contendo 100 µg de hidróxido de alumínio (figura 9).

**Figura 9** - Aplicação intraperitoneal da imunização.

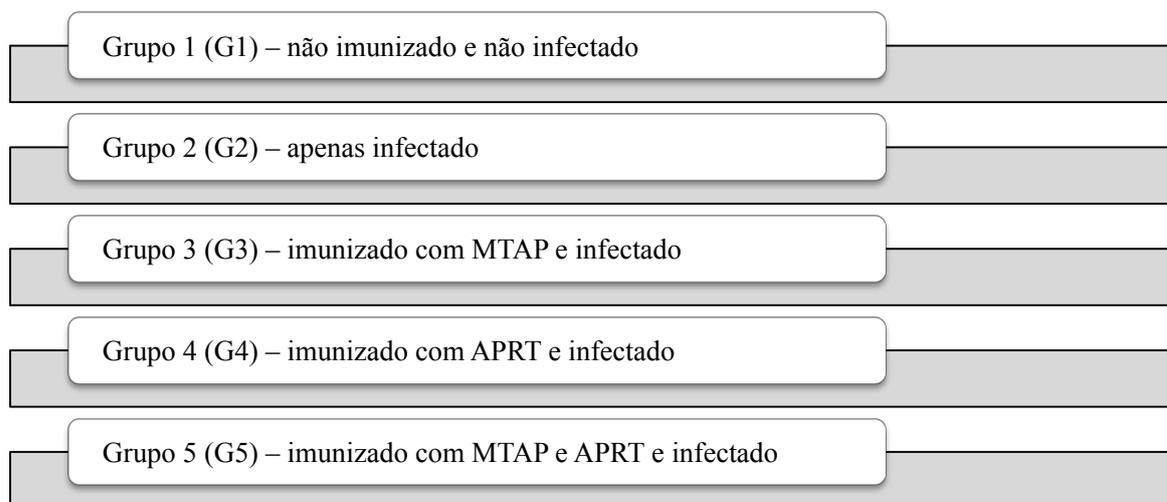


Fonte: arquivo pessoal.

As aplicações nos camundongos foram realizadas por 3 vezes, pela via intraperitoneal, com intervalos de 15 dias. Após 15 dias da última imunização, os camundongos receberam infecção com as cercárias da espécie *Schistosoma mansoni*.



A infecção nos camundongos foi realizada por via natural (infecção com exposição da cauda) com 80 cercárias por animal. Os grupos experimentais continham 6 camundongos nos grupos controle (G1), infectados (G2) e imunizado e infectado (G3, G4 e G5). O G1 não recebeu nenhuma imunização e infecção; o G2 foi infectado com *Schistosoma mansoni*, sem prévia imunização; o G3 foi imunizado com a enzima MTAP e infectado; o G4 foi imunizado com a enzima APRT e infectado; e o G5 recebeu imunização com ambas enzimas e também infectado posteriormente.



### 3.5. Avaliação da carga parasitária

Um dia antes da eutanásia, as fezes foram coletadas para a análise quantitativa dos ovos em todos os grupos infectados. Foi estabelecido o tempo de 47 dias após a infecção para essa análise devido ao fato de já haver a liberação de ovos. Os camundongos foram eutanasiados no 48º dia após a infecção em câmara de CO<sub>2</sub>. Os tempos estabelecidos para a eutanásia foram no 48º dia, pois o parasito já completou o seu ciclo de vida e iniciou a postura de ovos. Dessa forma, foi possível obter o número total dos vermes adultos através do método de perfusão.

#### 3.5.1. Contagem de ovos nas fezes

A realização da análise quantitativa dos ovos nas fezes foi através do método de Kato-Katz (KATZ et al, 1972), o qual aumenta de duas a quatro vezes a detecção de ovos de helmintos nas fezes quando comparados a outros métodos. Essa técnica foi realizada através do Helm Teste, um teste desenvolvido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos, da Fiocruz e recomendado pela Organização Mundial da Saúde desde 1994. O Kit de Kato-Katz foi gentilmente doado pela Fundação Osvaldo Cruz – Biomanguinhos, Rio de Janeiro-RJ.

As fezes dos camundongos foram colocadas em um orifício de 6 mm de um papel cartão, peneiradas por uma tela de náilon de 0,09 mm e montadas em lâminas de microscopia 50 x 76 mm. Após, foram cobertas com uma lamínula de celofane semipermeável de 24 mm por 30 mm com prévia coloração com o corante verde-malaquita. O método foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (figura 10.A).

A quantidade de ovos por grama de fezes foi inferida após contagem e multiplicação por um fator de correção, que varia entre os diferentes kits comerciais. Após a leitura das lâminas e contagem dos ovos, foi calculada a quantidade de ovos por grama de fezes (figura 10.B) seguindo a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de ovos na amostra} = n^{\circ} \text{ de ovos encontrados na lâmina} \times \text{fator } 24$$

**Figura 10** - Análise quantitativa dos ovos.

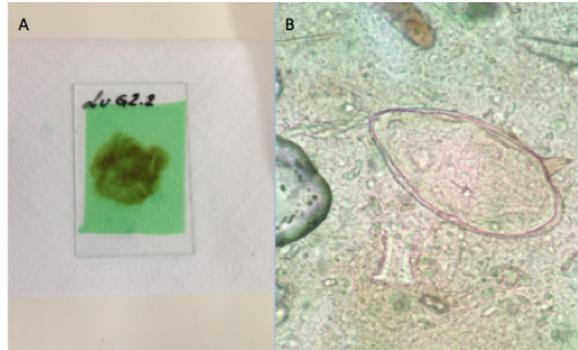


Figura A. Lâmina de microscopia ótica com o método de Kato-Katz; B. Ovo de *Schistosoma mansoni* com a espícula lateral no aumento de 400x em microscópio óptico. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5.2. Recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático

Os vermes adultos acasalados foram recuperados dos camundongos por meio da perfusão do sistema porta no 48º dia após a infecção. A quantificação dos vermes adultos acasalados ocorreu isoladamente em cada camundongo referente a cada grupo infectado.

A técnica iniciou-se com um corte na veia porta-hepática, na qual os vermes se alojam, seguindo-se de injeção de PBS citratado diretamente no coração do camundongo (protocolo de acordo com SMITHERS; TERRY, 1965). Dessa forma, pode-se expulsar os vermes presentes nesse local pelo fluxo sanguíneo corrente forçado juntamente com o líquido injetado, fazendo-se possível a coleta dos vermes com pipeta Pasteur. Os vermes foram depositados em placas de Petri contendo PBS 1x para lavagem e posterior contagem dos parasitas adultos. Os vermes adultos presentes no intestino murino também foram quantificados.

A porcentagem de redução da carga parasitária foi medida comparando o número de vermes adultos acasalados recuperados em cada grupo experimental e o controle.

A porcentagem de maturação dos vermes adultos foi medida de acordo com a fórmula de % Maturação dos vermes. A porcentagem de vermes recuperados foi medida de acordo com a equação % RecV e a % de redução dos vermes adultos foi dada pelo cálculo % RedV (MUCHIRAH et al, 2012).

$$\% \text{ Maturação dos vermes} = \frac{\text{recuperação de vermes do grupo controle infectado}}{\text{número de cercárias que penetraram}} \times 100$$

$$\% \text{ RecV} = \frac{\text{média do total de vermes no grupo experimental}}{\text{média do total de vermes do grupo infectado}} \times 100$$

$$\% \text{ RedV} = \frac{\text{média do total de vermes no grupo infectado} - \text{média do total de vermes no grupo experimental}}{\text{média do total de vermes no grupo infectado}} \times 100$$

**Figura 11** - Perfusão dos vermes adultos.



A imagem mostra os vermes adultos (machos e fêmeas) pareados após remoção pelo método de perfusão em uma placa Petri contendo solução salina a 0,9%. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.6. Obtenção e contagem de leucócitos no sangue e no lavado peritoneal

Com o objetivo de obter os leucócitos do sangue, no 48º dia após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e seu sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur com anticoagulante (EDTA) por ruptura da artéria braquial. Já para a obtenção do lavado da cavidade peritoneal foram injetados no peritônio 3 mL de PBS 1x pH 7,4 com 0,5% de citrato de sódio (PBS Citrato).

O número total dos leucócitos no sangue e lavado foi determinado por meio do líquido diluidor de Turk (ácido acético 3% + corante azul de metileno), promovendo a lise das hemácias e conservação dos leucócitos, os quais foram contados em câmara de Neubauer. A contagem diferencial de eosinófilos/polimorfonucleares/mononucleares sobre o total de leucócitos por mm<sup>3</sup> do sangue e do lavado peritoneal foram realizadas em lâmina de microscopia para obtenção do esfregaço sanguíneo e do centrifugado do lavado peritoneal, posteriormente coradas com Panótico.

**Figura 12** - Contagem diferencial de leucócitos no sangue corados com Panótico.

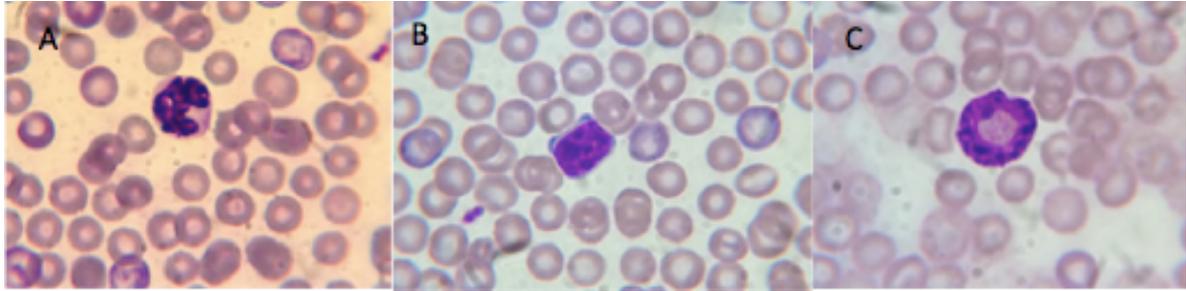


Figura A. Neutrófilo (polimorfonuclear); B. Linfócito (mononuclear); C. Eosinófilo. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.7. Ensaio Imunoenzimáticos

Com a finalidade de avaliar a imunidade no hospedeiro foram selecionadas, detectadas e quantificadas as imunoglobulinas (IgG1 e IgE) e as citocinas IL 4, IL-10, IL-13 e INF- $\gamma$ ) e para a detecção das imunoglobulinas IgG1 e IgE foi utilizado o método de ELISA. Para a detecção de IgG1 foram utilizados 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das proteínas MTAP e/ou APRT para sensibilização da placa e 1:10 e 1:100 para diluição da amostra. O mesmo procedimento segue para a detecção de IgE (concentração das proteínas MTAP e/ou APRT e diluição da amostra).

#### 3.7.1. ELISA Indireto

As Imunoglobulinas (IgG1 e IgE) foram detectadas através do procedimento de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) seguindo as recomendações do fabricante BD-OptEIA<sup>TM</sup> – Mouse IgE ELISA Set e Goat anti-mouse IgG1HRP Conjugated – Bethyl.

Para a detecção de cada imunoglobulina foram utilizados 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  das proteínas MTAP, APRT e MIX para sensibilização de placas de microtitulação com 96 poços de fundo chato. A sensibilização de cada placa de imunoglobulina foi realizada utilizando as proteínas recombinantes de acordo com o grupo experimental: MTAP – grupo 4 (G4), APRT – grupo 5 (G5) e MIX – grupos 2 e 5 (G2 e G5). Não foi realizada a detecção de IgG1 e IgE no grupo controle (G1). As amostras (plasma de cada camundongo) e as proteínas (MTAP, APRT e MIX) foram previamente diluídas a 1:10 e 1:100 em tampão carbonato 0,1 M.

Inicialmente, foram adicionados 100 µl/poço da proteína previamente diluída para sensibilização da placa. Após, a placa foi mantida overnight sob refrigeração a 4°C. O procedimento foi retomado no dia posterior com a lavagem da placa com PBS-Tween 20 (0,05%), seguido de uma adição de 200 µl de tampão de bloqueio (PBS-BSA 1 %). A placa foi mantida por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi novamente lavada e foram adicionados 50 µl/poço da amostra diluída 1:10 e 1:100 de plasma em tampão carbonato. Novamente, a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, a placa foi lavada e foram adicionados 100 µl de anticorpos secundários conjugados com biotina (4 µl anticorpo + 10 ml de tampão carbonato). Após 1 hora de incubação, a placa foi mais uma vez lavada e foram adicionados 100 µl da enzima estreptoavidina (diluição 1:200). Depois de aguardar 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a placa foi pela última vez lavada e acrescentado 100 µl/poço do substrato BD-Pharmingen™ – TMB *Substrate Reagent Set* (1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina). Posteriormente, a reação foi bloqueada com 50 µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Finalizando o procedimento, realizou-se a leitura da absorbância foi obtida no comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

### 3.7.2. ELISA Sanduíche

Seguindo também o método de ELISA, as citocinas foram detectadas utilizando placas de microtitulação (Poly Sorp) com 96 poços, cada placa foi recoberta previamente com 50 µl/poço de anticorpo monoclonal referentes às diferentes citocinas: IL-4, IL-10, IL-13 e IFN-γ em concentrações padronizadas e diluídas em tampão de ligação (tampão carbonato - IL4 e IFN-γ; tampão fosfato - IL-10 e PBS - IL-13), onde as placas foram incubadas a 4 °C overnight. Após este período, o sobrenadante foi desprezado e o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos foi feito com adição de 150 µL de PBS-BSA (soro fetal bovino) 2,5 %. As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas 4 vezes com o tampão de lavagem. Posteriormente foram adicionadas, as diferentes diluições das citocinas padrão, 100 µl/poço das amostras em estudo que estavam diluídas em tampão: PBS 1x (IL-13), carbonato (IL-4, IFN-γ) e fosfato (IL-10).

Após incubação por 18 horas a 4 °C, foi feito novo ciclo de lavagem e também adicionados 100 µl/poço de anticorpo secundário biotilado diluído em PBS/BSA em

concentração determinada. As placas foram incubadas entre 30 min a 60 min a 37 °C e, em seguida, lavadas 4 vezes vigorosamente. O substrato (TMB) foi adicionado, 100 µl/poço, e após um tempo de 45 a 90 minutos da reação, a mesma foi bloqueada com 100 µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda 490 nm na mesma leitora de ELISA descrita anteriormente.

Nesse procedimento foi realizado a curva de cada citocina seguindo as recomendações do fabricante, onde a primeira concentração da citocina recombinante padrão foi de 500 pg/ml da interleucina recombinante, a qual foi sucessivamente diluída na base 2 até 15,6 pg/ml. A curva das citocinas nos serviu como parâmetro para a plotagem dos resultados.

### **3.8. Estudo Histológico**

O órgão utilizado para análise da patologia provocada pela passagem dos ovos no tecido foi o fígado. A sua remoção foi obtida através do auxílio de uma pinça e uma tesoura. O fígado, removido de cada camundongo dos diferentes grupos no 48º dia após a infecção, foi imediatamente fixado em formol tamponado 10%. Posteriormente, o tecido foi desidratado com álcool (70%, 80%, 90%, 95%, 100% por 4 vezes, com intervalos de uma hora), clareado (2 vezes) com xilol, mantidos em parafina (60°C) por quatro horas, incluído em bloco de parafina, seccionado em cortes de 5 µm e corado com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson.

A técnica histológica teve como objetivo a análise da fibrose e do granuloma possivelmente formados. As lâminas foram confeccionadas no laboratório de Anatomia Patológica, sob à responsabilidade do Prof. Dr. Edson Soares Garcia do Departamento de Patologia da FMRP -USP.

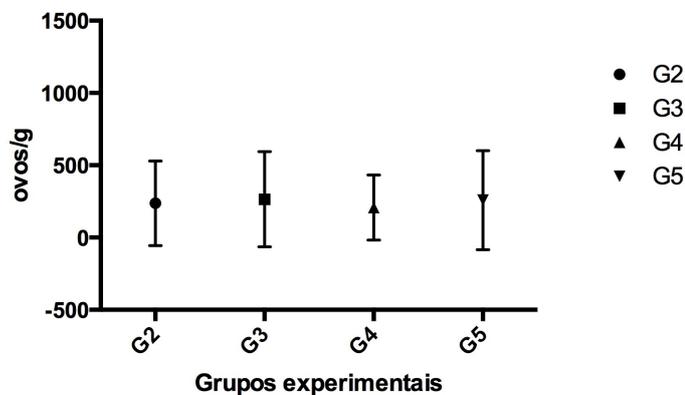
### **3.9. Análise Estatística dos Resultados**

Neste estudo foi utilizado método estatístico, onde a apresentação dos dados foi baseada em uma apresentação gráfica. Os resultados foram obtidos utilizando o programa PRISM versão 6 - GraphPad (San Diego, Califórnia, USA) pelo teste não-paramétrico One-way ANOVA (*One-Way analysis of variance*) e o pós-teste analisado pelo método de Tukey (*Compare all pairs of columns*). Os resultados foram expressos com média ± EPM e a significância estatística foi estabelecida em valores de  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

A partir dos procedimentos experimentais obtivemos como resultados das imunizações com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* MTAP (G3), APRT (G4) e o mix das enzimas (G5) representados nas figuras de 13 a 32. As enzimas recombinantes MTAP, APRT e o mix não mostraram diminuição significativa de ovos liberados pela fêmea (figura 13). A tabela 1 nos mostra os valores da média de cada grupo no estudo existente no gráfico da figura 13, onde não foram observadas diferenças estatísticas.

**Figura 13** - Número de ovos por grama de fezes.

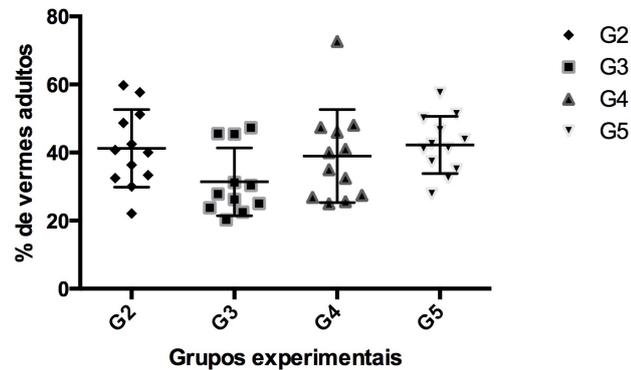


Não houve significância estatística com  $p < 0,05$  ou através das múltiplas comparações entre as colunas por Tukey. Os grupos experimentais estão representados por G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Tabela 1** - Valor de ovos por grama de fezes

Grupos experimentais	G2	G3	G4	G5
Média de opg	236,7	264,7	207,3	258,3

A figura 14 representa a porcentagem do total de vermes adultos recuperados na perfusão, onde observamos que os animais que receberam imunização com MTAP apresentaram discreta diminuição do percentual de vermes recuperados, embora não tenha sido diferente estatisticamente em relação aos demais grupos. A tabela 2 nos mostra, além dos dados plotados no gráfico, dados complementares como a porcentagem dos vermes adultos recuperados na perfusão e a porcentagem de redução dos vermes adultos encontrados nesses animais. Em relação à média estatística da relação cercária *versus* verme recuperado observamos que os animais do G3 apresentaram redução dos vermes após a imunização com MTAP (24%) (tabela 2). Ademais, não houve significância estatística na redução dos vermes pela vacinação administrada referente aos animais dos grupos G4 e G5.

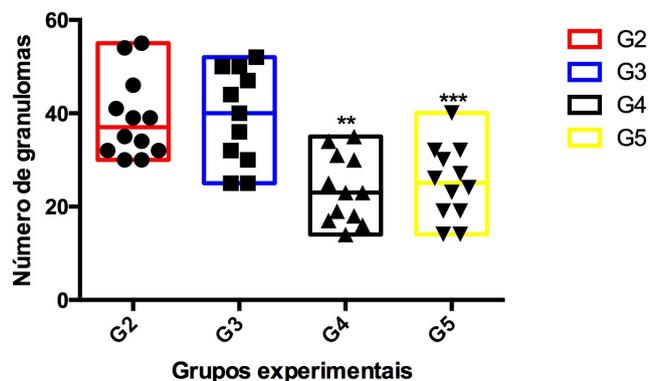
**Figura 14** - Total de vermes adultos recuperados na perfusão.

Valores obtidos de acordo com a % Maturação de verme adulto (fórmula da página 31). Não houve significância estatística com  $p < 0,05$  ou através das múltiplas comparações entre as colunas por Tukey. Os grupos experimentais estão representados por G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Tabela 2** - Análise percentual dos vermes adultos

Grupos experimentais	G2	G3	G4	G5
% de maturação dos vermes	41,25%	31,41%	38,99%	42,21%
% dos vermes recuperados	100%	75,97%	94,32%	94,57%
% de redução dos vermes	NA	24%	5,6%	5,4%

A figura 15 representa o número de granuloma no corte histológico do fígado. Nossos resultados mostram que a imunização com a enzima recombinante APRT e com o mix das enzimas foram capazes de induzir uma diminuição de 40% e 35% respectivamente em comparação ao G2 na formação de granulomas no fígado desses animais.

**Figura 15** - Quantidade de granulomas no tecido hepático.

Houve significância estatística com  $p < 0,05$ . As significâncias estatísticas com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey foram entre os grupos: \*\*\*G2xG4, \*\*G2xG5, \*\*\*G3xG4 e \*\*G3xG5. Os grupos experimentais estão representados por G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

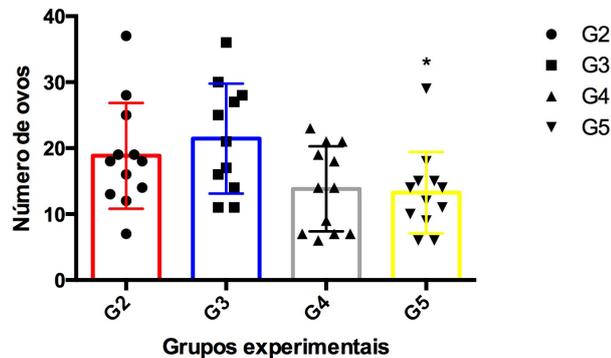
A tabela 3 representa a presença de ovos nos granulomas analisados. Nos animais do G4 e G5 (MIX) houve redução da quantidade de ovos por granuloma contado no fígado desses animais.

**Tabela 3** - Média obtida de granulomas no tecido hepático

Grupos experimentais	G2	G3	G4	G5
Média de granulomas	38,92	39,18	23,75	25

Em relação a porcentagem de ovos encontrados por granulomas obtivemos redução de 26% no G4 e 29% no G5 (figura 16).

**Figura 16** - Quantidade de ovos encontrados nos granulomas.



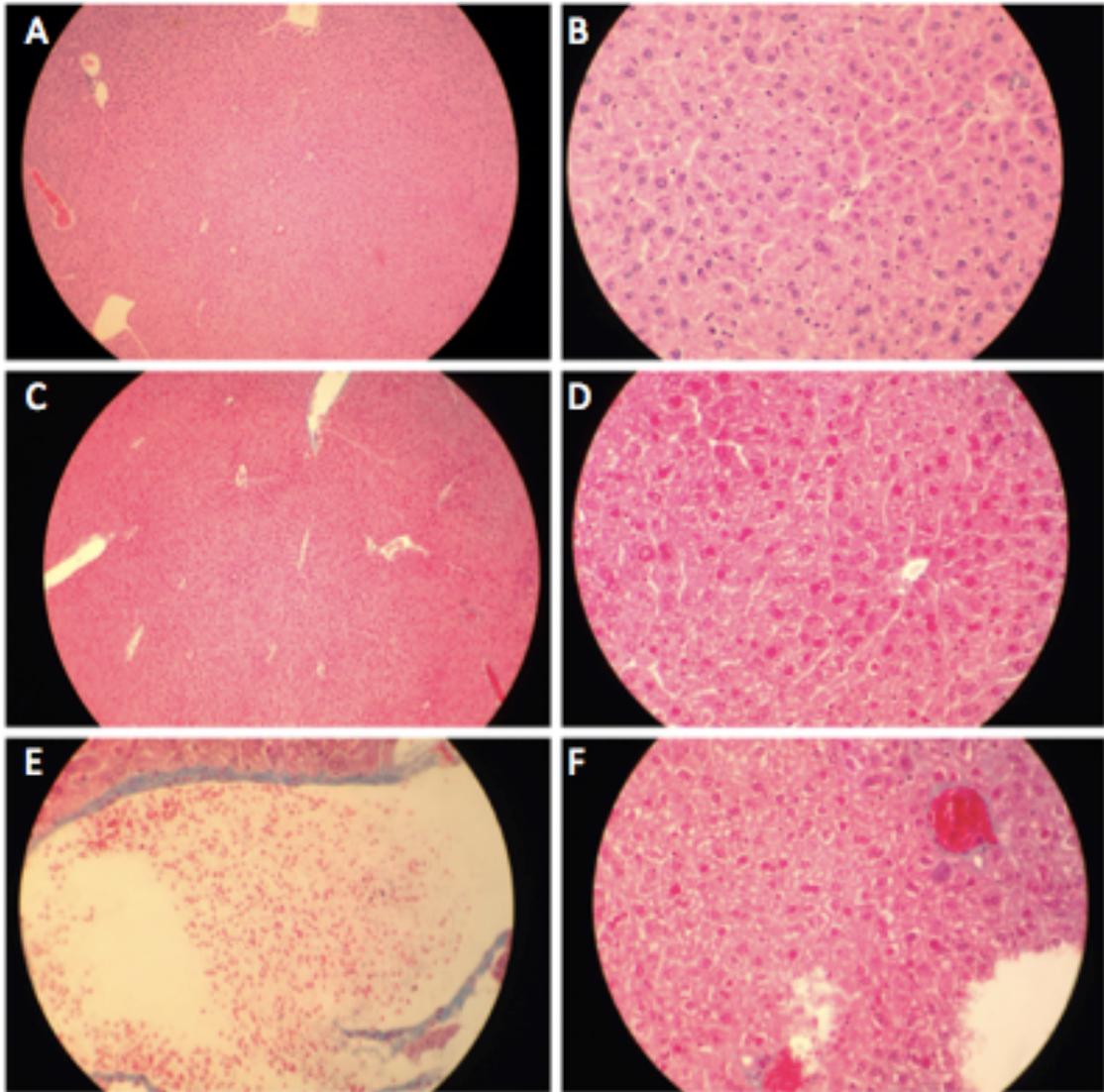
Houve significância estatística com  $p < 0,05$ . As significâncias estatísticas com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey foram entre os grupos \*G3xG5. Os grupos experimentais estão representados por G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Tabela 4** - Média de ovos encontrados no tecido hepático

Grupos experimentais	G2	G3	G4	G5
Média de ovos por granulomas	18,83	21,45	13,83	13,25

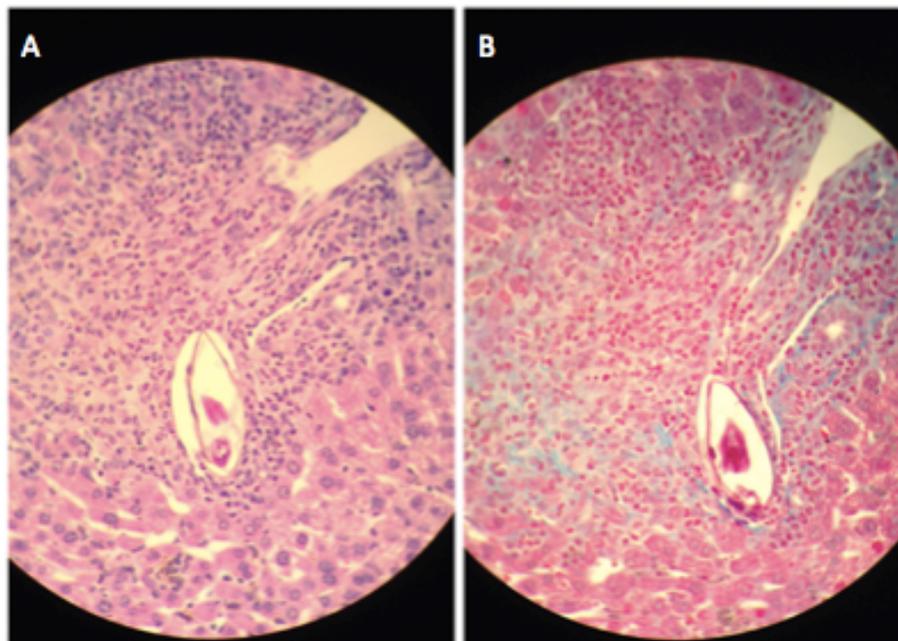
Em relação à patologia no tecido hepático todos os grupos infectados com ou sem imunização apresentaram uma discreta fibrose ao redor e dentro dos granulomas (figuras 18 a 21). Não houve a presença de fibrose no parênquima tecidual, embora a fibras de colágeno mostraram-se presentes ao redor do espaço porta, demonstrando apenas a presença de vasos sanguíneos locais (figuras 18 a 21). No grupo controle não houve alterações ou a presença de lesões teciduais (figura 17). Seguem a seguir as imagens do tecido hepático dos grupos experimentais (figuras 17 a 21).

**Figura 17** - Corte histológico do grupo controle.



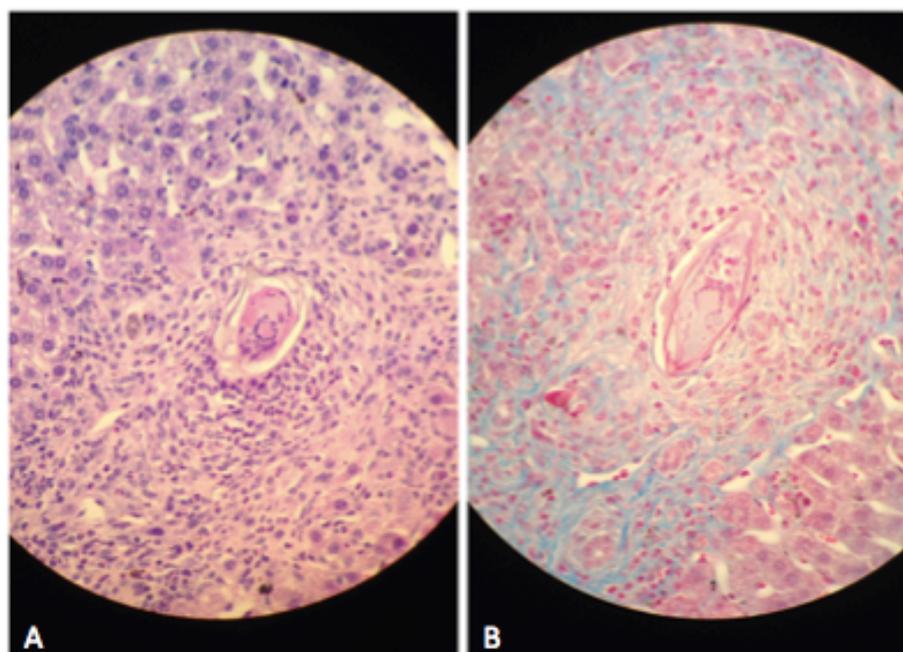
Fonte: Arquivo pessoal. A. Tecido hepático com aumento de 100x corado com HE. B. Células hepáticas sem infiltrado celular no aumento de 400x. C. Tecido hepático no aumento de 100x corados com TM. D. Células hepáticas sem alterações no aumento de 400x. E e F. Presença de fibrose leve ao redor dos vasos sanguíneos, podendo ser visualizada a presença de hemácias (coloração de TM em 400x).

**Figura 18** - Corte histológico do grupo infectado.



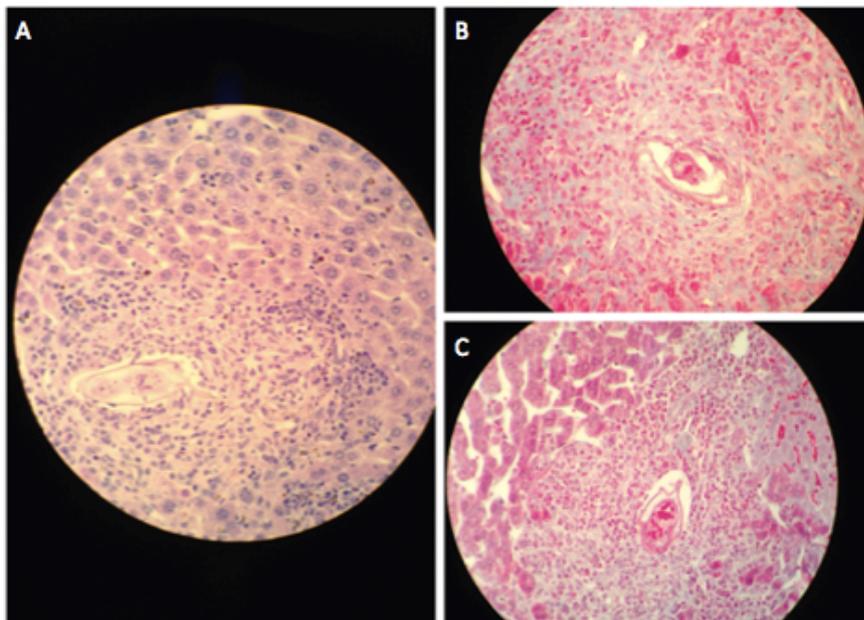
Fonte: Arquivo pessoal. A. Tecido hepático com a presença ovos e infiltrado celular no aumento de 400x com a coloração de HE. B. Presença de fibrose leve ao redor dos ovos (400x, TM).

**Figura 19** - Corte histológico do grupo infectado e imunizado com a enzima MTAP.



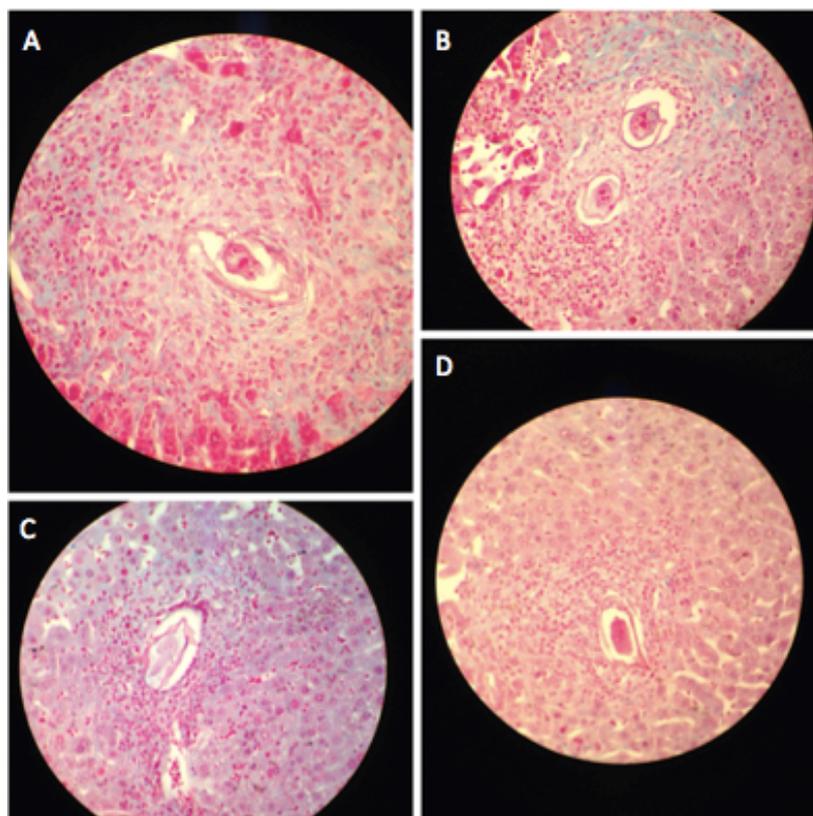
Fonte: Arquivo pessoal. A. Presença de granuloma e infiltrado celular (400x, HE). B. Presença de fibrose leve ao redor dos ovos (400x, TM).

**Figura 20** - Corte histológico do grupo infectado e imunizado com a enzima APRT.



Fonte: Arquivo pessoal. A. Presença de infiltrado celular ao redor dos ovos (400x, HE). B e C. Presença de fibrose leve no tecido hepático ao redor dos ovos (400x, TM).

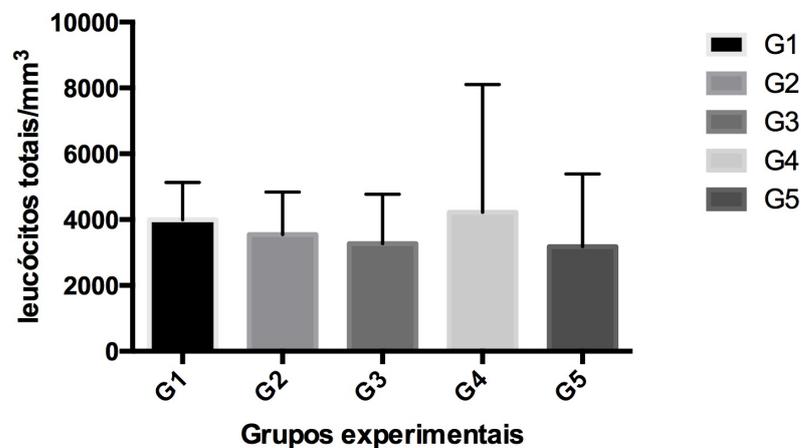
**Figura 21** - Corte histológico do grupo infectado e imunizado com o MIX das enzimas (MTAP e APRT).



Fonte: arquivo pessoal. A, B, C e D. Presença de fibrose leve ao redor dos ovos no tecido hepático (400x, TM).

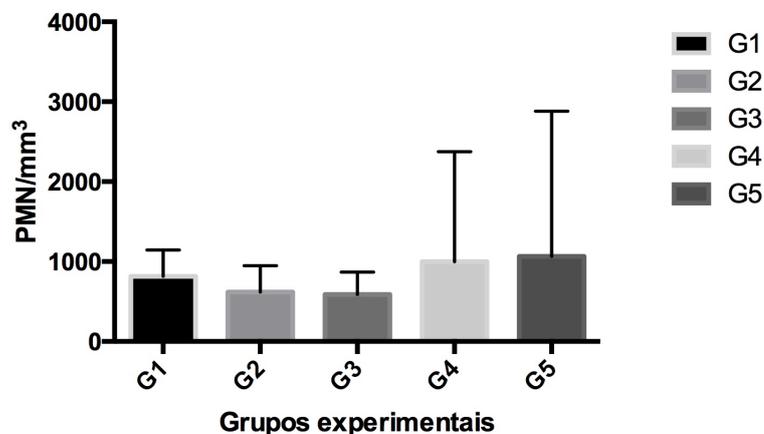
As figuras 22 a 32 referem-se aos aspectos celulares, humoral e o perfil de citocinas nos animais imunizados com as enzimas MTAP e APRT e posteriormente desafiados com *S. mansoni*. De acordo com o gráfico abaixo (figura 22), a contagem global de leucócitos no sangue não mostrou alteração entre os grupos analisados. As respectivas contagens diferenciais de leucócitos (polimorfonucleares, mononucleares e eosinófilos) também não apresentaram diferenças nessas células no sangue. Os dados estão plotados nos gráficos abaixo (figuras 23, 24 e 25) referentes à contagem diferencial de PMN, MN e EOS.

**Figura 22** - Contagem global de leucócitos no sangue.



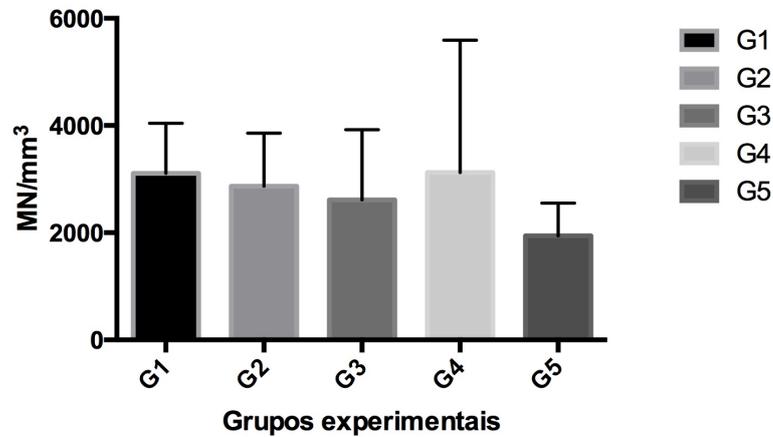
Não houve significância estatística com  $p < 0,05$  ou através das comparações entre as colunas por Tukey. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Figura 23** - Contagem diferencial de polimorfonucleares no sangue.



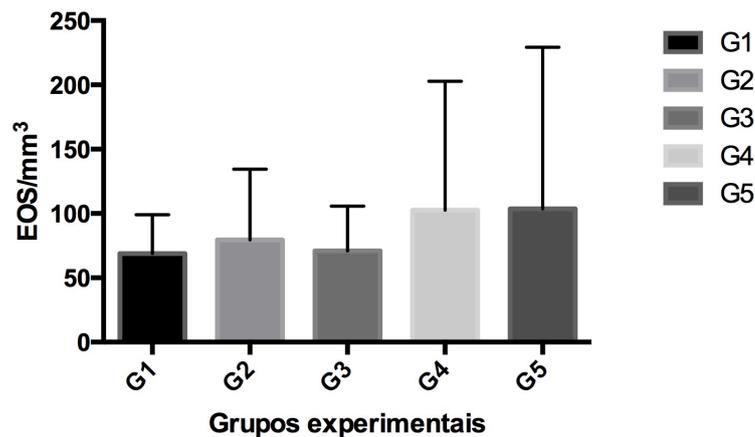
Não houve significância estatística com  $p < 0,05$  ou através das múltiplas comparações entre as colunas por Tukey. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Figura 24** - Contagem diferencial de mononucleares no sangue.



Não houve significância estatística com  $p < 0,05$  ou através das múltiplas comparações entre as colunas por Tukey. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

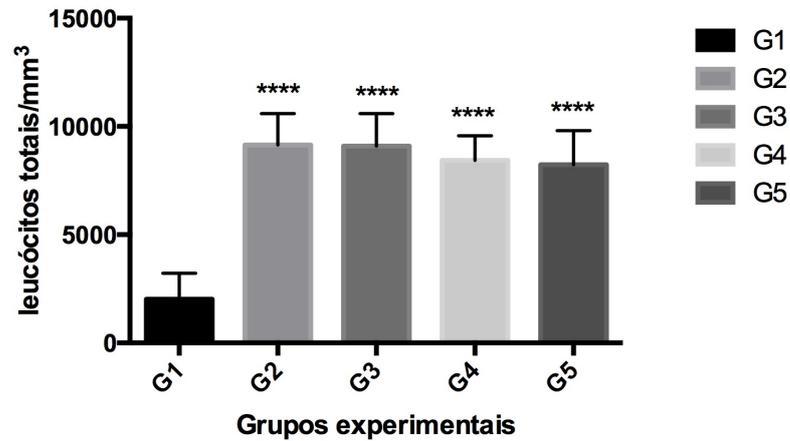
**Figura 25** - Contagem diferencial de eosinófilos no sangue.



Não houve significância estatística com  $p < 0,05$  ou através das múltiplas comparações entre as colunas por Tukey. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

Na contagem diferencial sanguínea observamos que os leucócitos não apresentaram aumento na proliferação dessas células. Ao contrário da contagem global e diferencial sanguínea (figuras 26, 27, 28 e 29) foi demonstrado que a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal nos animais dos grupos infectados, imunizados ou não (G2, G3, G4 e G5), quando comparados ao grupo controle (G1) foi maior que os demais grupos.

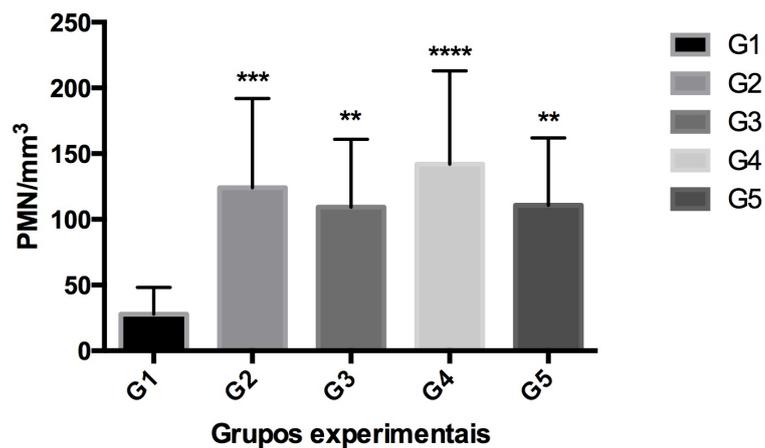
**Figura 26** - Contagem global de leucócitos no lavado peritoneal.



Houve significância estatística com  $p < 0,05$ . A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey foram entre os grupos: \*\*\*\*G1xG2, \*\*\*\*G1xG3, \*\*\*\*G1xG4 e \*\*\*\*G1xG5. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

A figura 27 demonstra um aumento na quantidade de polimorfonucleares presentes na cavidade peritoneal. Embora os animais dos grupos imunizados não demonstraram significância estatística se comparados ao grupo apenas infectado, em relação à migração de polimorfonucleares na cavidade peritoneal desses animais, observa-se um efeito biológico no controle dessas células.

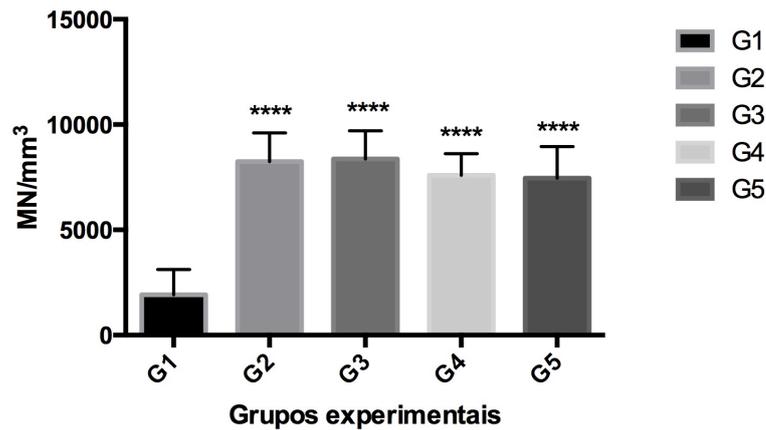
**Figura 27** - Contagem diferencial de polimorfonucleares no lavado peritoneal.



Houve significância estatística com  $p < 0,05$ . A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey foram entre os grupos: \*\*\*G1xG2, \*\*G1xG3, \*\*\*\*G1xG4 e \*\*G1xG5. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

A figura 28 representa o número de células mononucleares na cavidade peritoneal dos animais dos grupos experimentais analisados nesse estudo. Nossos resultados mostram que não houve diferença na quantidade de células mononucleares na cavidade peritoneal nos animais dos grupos que sofreram imunização prévia quando comparado ao grupo apenas infectado.

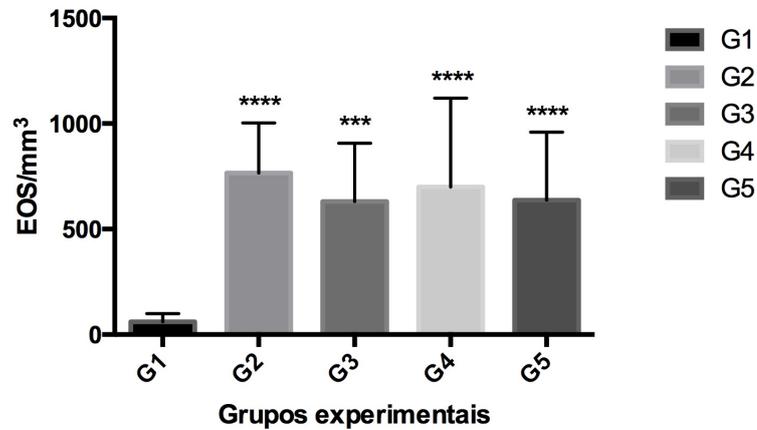
**Figura 28** - Contagem diferencial de mononucleares no lavado peritoneal.



Houve significância estatística com  $p < 0,05$ . A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey foram entre os grupos: \*\*\*\*G1xG2, \*\*\*\*G1xG3, \*\*\*\*G1xG4 e \*\*\*\*G1xG5. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

A figura 29 representa o número de eosinófilos na cavidade peritoneal dos animais dos grupos experimentais analisados nesse estudo. Nossos resultados demonstram que os animais infectados imunizados ou não tiveram um maior recrutamento dessas células para a cavidade peritoneal. Embora tenham sido observados valores menores dos eosinófilos nos animais dos grupos imunizados com MTAP e mix das enzimas, esses valores não tiveram diferença significativa.

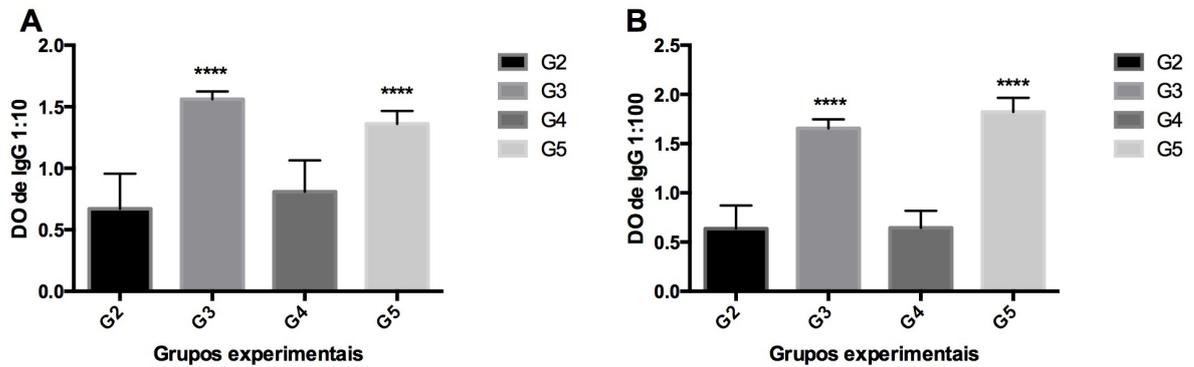
**Figura 29** - Contagem diferencial de eosinófilos no lavado peritoneal.



Houve significância estatística com  $p < 0,05$ . A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey foram entre os grupos: \*\*\*\*G1xG2, \*\*\*G1xG3, \*\*\*\*G1xG4 e \*\*\*\*G1xG5. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

A figura 30 representa as D.O. do anticorpo IgG1 anti as enzimas recombinantes do verme *S. mansoni*. Nossos resultados demonstram que os animais imunizados com MTAP (G3) e com o mix (G5) tiveram valores de D.O. na dosagem de IgG1 significativamente maiores que os animais apenas infectados (tabela 5) nas duas diluições para a titulação dos anticorpos anti-IgG1, 1:10 e 1:100.

**Figura 30** - Nível de IgG1 plasmática na DO de 450 nm.



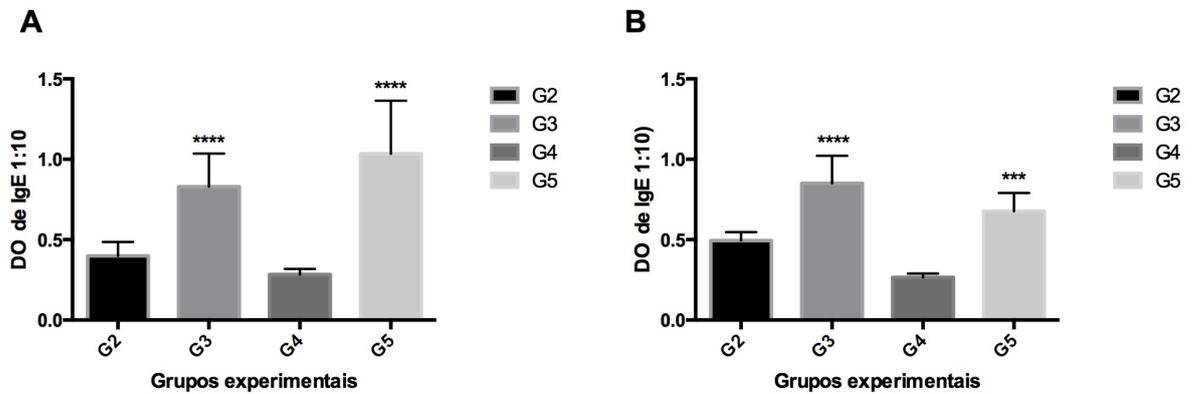
A. Densidade óptica da IgG1 na diluição 1:10; B. Densidade óptica da IgG1 na diluição 1:100. Houve significância estatística com  $p < 0,05$  em ambas as figuras. A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey na figura A foram entre os grupos: \*\*\*\*G2xG3, \*\*\*\*G2xG5, \*\*\*\*G3xG4 e \*\*\*\*G4xG5. A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey na figura B foram entre os grupos: \*\*\*\*G2xG3, \*\*\*\*G2xG5, \*\*\*\*G3xG4 e \*\*\*\*G4xG5. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Tabela 5** - Valor médio da densidade óptica de IgG1 na diluição de 1:10 e 1:100

IgG1	1:10 (DO)	1:100 (DO)
G2	0,671	0,636
G3	1,561	1,655
G4	0,810	0,644
G5	1,362	1,823

A figura 31 representa as DO da IgE anti as enzimas recombinantes do verme *S. mansoni*. Nossos resultados demonstram que os animais imunizados com MTAP (G3) e com o mix (G5) tiveram valores de DO na dosagem de IgE significativamente maiores que os animais apenas infectados (tabela 6) nas duas diluições para a titulação dos anticorpos anti-IgE, 1:10 e 1:100.

**Figura 31** - Nível de IgE plasmática.



A. Densidade óptica da IgE na diluição 1:10; B. Densidade óptica da IgE na diluição 1:100. Houve significância estatística com  $p < 0,05$  em ambas as figuras. A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey na figura A foram entre os grupos: \*\*\*\*G2xG3, \*\*\*\*G2xG5, \*\*\*\*G3xG4 e \*\*\*\*G4xG5. A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey na figura B foram entre os grupos: \*\*\*\*G2xG3, \*\*\*\*G2xG4, \*\*G2xG5, \*\*\*\*G3xG4, \*\*G3xG5 e \*\*\*\*G4xG5. Os grupos experimentais estão representados por G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Tabela 6** - Valor médio da densidade óptica de IgE nas diluições de 1:10 e 1:100

IgE	1:10 (DO)	1:100 (DO)
G2	0,340	0,495
G3	0,830	0,851
G4	0,283	0,266
G5	1,034	0,677

A tabela 7 demonstra a comparação dos valores obtidos em porcentagem das imunoglobulinas IgG1 e IgE.

**Tabela 7** - Valor da porcentagem de proteção gerada por IgG1 e IgE nas diluições de 1:10 e 1:100

% Proteção	IgG1 1:10	IgG1 1:100	IgE 1:10	IgE 1:100
G3	130%	203%	140%	72%
G4	20%	1,2%	NA	NA
G5	110%	186%	200%	37%

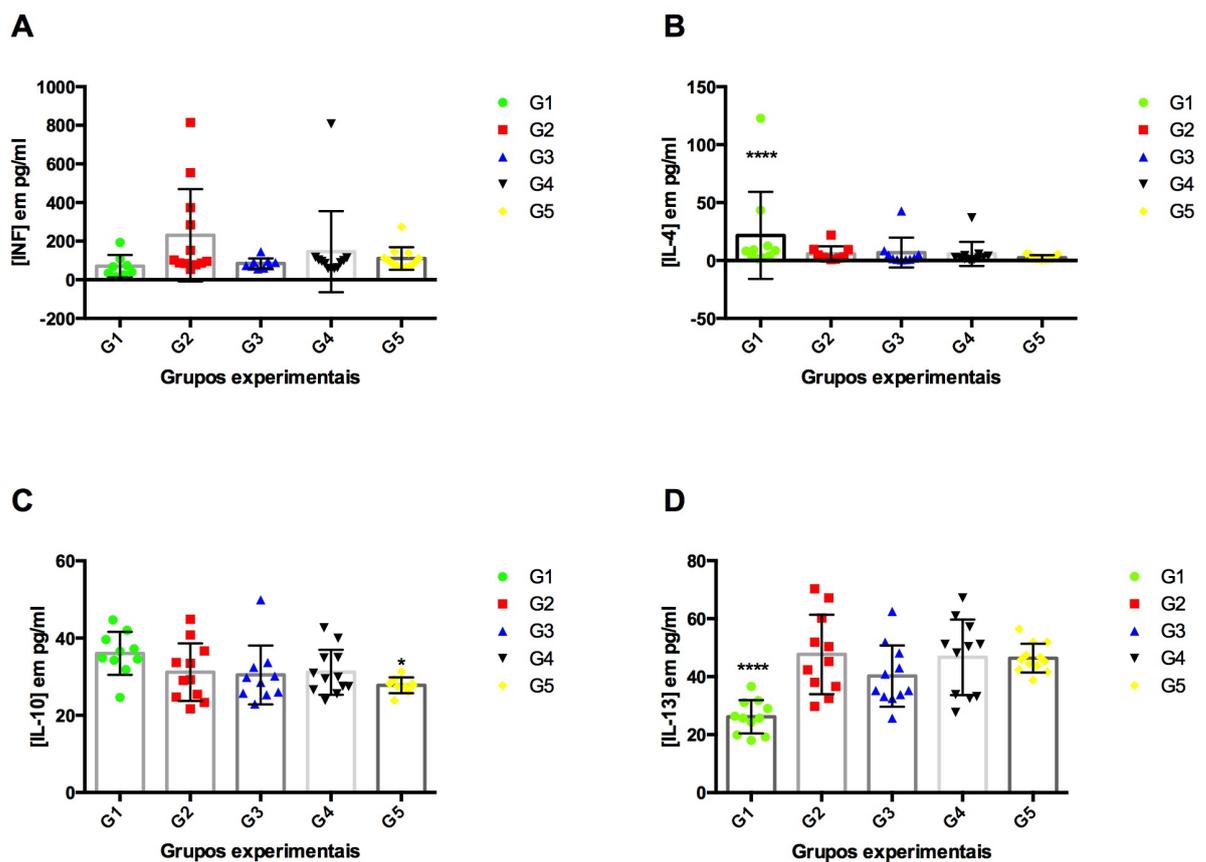
A figura 31 representa as quantificações das citocinas INF- $\gamma$  (figura 31A), IL-4 (figura 31B), IL-10 (figura 31C), IL-13 (figura 31D). Nossos resultados demonstraram que os níveis de IFN- $\gamma$  tiveram aumento no grupo infectado quando comparado com o grupo controle (figura 31A, tabela 8), nos animais que receberam as imunizações prévias a infecção com *S.*

*mansoni* observamos que os animais imunizados com MTAP e APRT apresentaram diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  maiores do que os animais imunizados com as duas enzimas ao mesmo tempo (figura 31A, tabela 8).

Em relação a quantificação da citocina IL-4 nesse modelo, nossos dados demonstram que houve redução dos níveis dessa citocina em todos os animais infectados, independente se foram ou não imunizados com as enzimas MTAP e APRT (figura 31B, tabela 8).

Os níveis de IL-10 não apresentou diferença nos grupos experimentais analisados nesse estudo (figura 31C, tabela 8). A quantificação da citocina IL-13 demonstrou que os animais dos grupos infectados, com ou sem imunização tiveram seus valores maiores que os animais do grupo controle, no entanto entre os animais infectados imunizados ou não, não foram observadas diferenças significativas (figura 31D, tabela 8).

Figura 32 - Citocinas inflamatórias.



A. Concentração de INF- $\gamma$  em pg/ml; B. Concentração de IL-4 em pg/ml; C. Concentração de IL-10 em pg/ml; D. Concentração de IL-13 em pg/ml. Houve significância estatística com  $p < 0,05$  apenas nas figuras B e D. A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey na figura B foi entre \*G1xG5. A significância estatística com múltiplas comparações entre as colunas por Tukey na figura D foram entre os grupos: \*\*\*\*G1xG2, \*G1xG3, \*\*\*G1xG4 e \*\*\*G1xG5. Os grupos experimentais estão representados por G1 (controle sem infecção), G2 (controle infectado), G3 (MTAP), G4 (APRT) e o G5 (mix das enzimas MTAP e APRT).

**Tabela 8** - Média estatística de citocinas plasmáticas dos grupos experimentais na concentração de pg/ml.

Média em pg/ml	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
INF- $\gamma$	34,98	230,54	80,02	84,89	110,17
IL-4	21,60	4,69	2,05	2,49	5,52
IL-10	36,04	31,17	30,53	31,16	27,75
IL-13	26,17	47,68	40,20	46,67	46,38

## 5. DISCUSSÃO

As estratégias para o controle da esquistossomose mansônica podem ser baseadas desde a técnica de detectar e mapear o hospedeiro intermediário, identificar e tratar precocemente os novos doentes e controlar a reinfeção até o desenvolvimento de um sistema de notificação ágil, porém não ocorrem de forma eficaz pelos Programas Governamentais na maioria dos países onde a doença ocorre (SCHOLTE et al, 2014). Embora tenha advindo uma expansão da cobertura dos serviços da saúde e desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico da doença esquistossomose mansônica, a identificação de dados epidemiológicos mais coerente com a que o Brasil se encontra ainda não foi estimada corretamente pelos sistema de saúde, assim essa doença emerge e reemerge promovendo a ocorrência de novas formas graves dessa patologia mesmo em regiões de baixa endemicidade (MELTZER; SCHWARTZ, 2013). Esse fato é gerado pelos movimentos migratórios às grandes densidades populacionais em espaços reduzidos onde oferecem uma infraestrutura ineficaz, pelo saneamento básico inadequado e/ou precário e pela modificação do meio ambiente que vem promovendo a adequação do parasita às condições ambientais (COURA; CONCEIÇÃO, 2010; MCCREESH; BOOTH, 2014) e, por conseguinte, ocasionando mutações (do parasita e do hospedeiro intermediário) e pressões seletivas constantes devido à interação humana (condições sociais, políticas, econômicas e culturais), animal, microbiológica e ambiental (TIBIRIÇÁ et al, 2008; MCCREESH; BOOTH, 2014). A incorporação de técnicas de biologia molecular a favor dos diagnósticos da doença na população e das novas abordagens terapêuticas em busca de novos fármacos, bem como o tratamento com PZQ, não são estratégias suficientes para conter a expansão do *Schistosoma mansoni* no Brasil, ainda que haja redução nas taxas de mortalidade e prevalência da doença. (TIBIRIÇÁ et al, 2008; COURA; CONCEIÇÃO, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de novas ferramentas para combate da disseminação e reinfeção dessa doença mostram-se imprescindíveis (VICENTE et al, 2015; MELO et al, 2012).

Acredita-se que a vacinação antigênica seja a tática mais coerente para impedir uma doença infecciosa (COURA; CONCEIÇÃO, 2010; VICENTE et al, 2015), assim a OMS propôs aos grupos de pesquisa testarem seis potenciais antígenos para vacinação, no caso da esquistossomose, porém nenhum dos antígenos propostos conferiram no mínimo 40% de proteção em camundongos (CIOLI et al, 2014). Uma das tentativas de vacinação em camundongos foi com a proteína recombinante Sm14 (proteína ligadora de ácidos graxos) e que apresentou níveis significantes de produção de anticorpos com três doses de vacinação e

uma proteção de 36,9 a 49,5% em animais com grupos infectados com 100 cercárias (RIBEIRO et al, 2002). Contudo, nos estudos de Ewaisha et al (2014) indicou que não houve redução significativa dos vermes adultos com a Sm14, todavia quando acrescentados à vacina uma combinação de dois adjuvantes (Sm29 e poly I:C) resultou em altos níveis de anticorpos, com uma contagem de vermes adultos reduzidos a 40,3% e redução de ovos nas fezes de 68,2%. No entanto, quando testados separadamente, a Sm14, a Sm29 e o poly I:C não demonstraram diminuição significativa de vermes ou ovos (EWAISHA et al, 2014).

Em nosso estudo, não foram observados diferenças significativas no número de ovos por gramas de fezes entre os animais dos grupos imunizados e infectados quando comparados aos animais do grupo somente infectados, sugerindo que as imunizações com as enzimas MTAP e/ou APRT não induziram modulação da carga parasitárias nesses animais (tabela 1). Assim esses resultados diferem de outros autores que apresentaram reduções significativas no número de ovos nesse modelo experimental, embora esses autores tenham utilizados proteínas de tegumento e superficiais, ao invés de enzimas intracelulares como o caso desse modelo (TENDLER et al, 1996; VARALDO et al. 2004; FONSECA et al 2005). Entretanto, a imunização com a MTAP foi capaz de induzir 24% de redução no número de vermes recuperados nos animais imunizados (tabela 1), dados que corroboram com outros autores de nosso grupo de pesquisa, que também usaram enzimas da via de purinas como alvos imunogênicos no controle da esquistossomose mansônica (NERIS et al, 2013A; NERIS et al, 2013B). Contudo, esses resultados precisam ser melhor investigados para propor qual o mecanismo levou a redução dos parasitos neste modelo experimental.

Em análises onde se observou o controle do infiltrado inflamatório com a imunização dos animais previamente imunizados com MTAP e/ou APRT, nossos dados demonstraram que os animais que receberam APRT ou mix das duas enzimas tiveram redução no número de granulomas no fígado desses animais (figura 15, tabela 3) e redução no número de ovos nesses granulomas no tecido hepático (figura 16, tabela 4), sugerindo que para o controle da fase crônica da esquistossomose mansônica, a APRT apresenta-se como boa candidata no controle da morbidade dessa patologia e essa imunização promoveu imunorreatividade de modo que favoreceu a diminuição da carga parasitária no fígado desses animais (figura 15-16, tabela 3-4), por vias ainda desconhecidas. Em relação ao infiltrado inflamatório que contribui de forma significativa para a manutenção do granuloma no fígado dos animais infectados com *S. mansoni* (DEJANI et al, 2014) a imunização com a APRT assim como reduziu os granulomas e o número de ovos nesses tecidos, contribui de forma significativa para a redução do infiltrado inflamatório, diminuição do colágeno aderido ao tecido (figura 20) e

quando associada a imunização a MTAP, a APRT indica em nossos resultados que essa redução é de maior magnitude favorecendo uma recuperação do parênquima hepático nesses animais imunizados com o mix (figura 21). À vista disso, observamos a ativação da resposta imune durante uma infecção sendo favorecida pela imunização com APRT e/ou mix das enzimas para o controle do processo inflamatório hepático, principalmente no controle da fibrose hepática (figura 21). Esses dados também corroboram com NERIS et al (2013A e 2013B), onde a imunização com enzimas da via de purinas foram capazes de modular o infiltrado inflamatório no fígado dos animais imunizados. Por conseguinte, 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. Todavia, o perfil celular no sangue e na cavidade peritoneal não apresentou diferenças entre os grupos experimentais, o que sugere que essas enzimas não teriam papel direto na saída das células inflamatórias da medula para o sangue (figura 22-25), assim como não modula o recrutamento dessas para a cavidade peritoneal (figura 26-29).

Os dados obtidos em relação à resposta imune humoral demonstram que as imunizações com MTAP e mix das duas enzimas, foram capazes de estimular a produção de anticorpos IgG1 (figura 30) e IgE (figura 31) de forma específica nas duas titulações avaliadas do soro dos animais tanto para IgG1 quanto para IgE, 1:10 (figura 30A e 31A) e 1:100 (figura 30B e 31B). A literatura traz diversas proteínas que já estão sendo utilizada em testes pré-clínicos e 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 (PEARCE et al, 1988; CORREA-OLIVEIRA et al, 1989; PORCHET et al, 1994; TENDLER et al, 1996; DA'DARA et al., 2001; AL-SHERBINY et al, 2003; SHERBINY et al, 2003; VARALDO et al, 2004; FONSECA et al 2005; NERIS et al, 2013A e 2013B). Logo, temos a opção de complementar esses estudos com novos alvos que, associados aos estudos em andamento, podem ser de grande importância para o controle da esquistossomose mansônica. Apesar da resposta imunológica de células Th2 do hospedeiro em parasitoses helmínticas basear-se na produção de anticorpos IgE, esses parasitas conseguem enganar o sistema imunológico reduzindo a efetividade dos eosinófilo. A IgE tem papel fundamental na proteção imune contra o *Schistosoma mansoni* em humanos, pois promove a expressão de inúmeros receptores celulares promovendo um aumento na atividade larvicida nos granulócitos (GRIFFITH et al, 2015). Embora apenas significativo com a administração da enzima MTAP na redução da maturação dos vermes (24%) (figura 14, tabela 2) e da formação de granulomas no tecido hepático (figura 20 e 21). Em nosso estudo observamos que a

atuação das enzimas MTAP e mix como imunizantes foram capazes de aumentar a produção e secreção de IgE (figura 31), bem como de IgG1 (figura 30), sugerindo que esses anticorpos podem contribuir com a redução do granuloma no fígado desses animais (figura 20 e 21).

Um teste vacinal feito com o *pool* do tegumento de esquistossômulos (Smteg), analisado por Melo et al (2012), mostrou que em estudo não houve redução significativa dos vermes adultos ou na eliminação de ovos nas fezes, dados esses que corroboram com os nossos resultados nas análises dos ovos dos animais imunizados com MTAP e/ou APRT (tabela 1). No entanto, esses autores demonstraram que quando adicionado essa proteína Smteg a um fator indutor CpG-ODN (sintético oligodeoxinucleotídeos não metilado) a mesma mostrou ser capaz de modular a resposta Th1 nesses animais e promover o estímulo de células NK e proliferar células B que melhoraram a produção de anticorpos, dados que evidenciam os nossos resultados nos animais que foram imunizados com MTAP e mix das enzimas (figura 30 e 31).

Em relação à resposta imune mediada pelas citocinas Th1, Th2 e regulatória nossos dados mostraram que a imunização foi capaz de modular a resposta Th1 nos animais que receberam imunizações com a enzima MTAP e/ou APRT (figura 31A) por meio da diminuição do INF- $\gamma$  nesses animais (tabela 8). Esses resultados podem ser explicados pela permanência das células inflamatórias nesses animais, principalmente as células mononucleares (figura 24 e 28). A produção de citocinas pelas células inflamatórias depois da estimulação com antígenos do parasito refletem em uma resposta Th1, ao invés de uma resposta Th2. No entanto, na progressão natural da doença, os antígenos dos ovos induzem uma resposta Th2 (MONTENEGRO et al, 1999). Porém, em nosso modelo verificamos a *down*-regulação da resposta Th2, visto que quando quantificamos a citocina IL-4, nossos dados demonstram que houve redução dos níveis dessa citocina em todos os animais infectados, independente se foram ou não imunizados com as enzimas MTAP e APRT (figura 31B, tabela 8). Sugerindo que a resposta Th2 estava em desbalanço com a fase inicialmente crônica nesse modelo. Embora, a quantificação da citocina IL-13 demonstrou que os animais dos grupos infectados, com ou sem imunização tiveram seus valores maiores que os animais do grupo controle, no entanto entre os animais infectados imunizados ou não, não foram observadas diferenças significativas (figura 31D, tabela 8). Sugerindo assim, que a resposta Th2 ainda não havia se estabelecido no período analisado e quando observamos a citocina regulatória IL-10 avaliada nesse estudo, observamos que não houve diferença nos animais dos grupos experimentais analisados nesse estudo (figura 31C, tabela 8).

Em outros estudos alguns autores tem demonstrado que proteínas como a SmDLC (Proteína Intracelular *Dynein Light Chain* de *Schistosoma mansoni*), estão associadas com a atividade antiparasitária mediada pela indução de IgE e pela redução na formação do granuloma tecidual (DINIZ et al, 2014). Dados esses que corroboram parcialmente com os nossos. Em alguns estudos, os efeitos de proteção antiparasitária com vacinas antigênicas contra o *Schistosoma mansoni* raramente excedem 40% (DIAS et al, 2014). Acima disso, foi encontrada uma proteção contra o parasita de 90% porém utilizando uma vacinação com cercárias irradiadas e ainda inviável para ser administrada em humanos (VARALDO et al, 2004). Como vimos, ainda não há uma vacina eficaz para o controle da esquistossomose mansônica e proteínas presentes no tegumento do parasita representam potentes candidatas a vacinas por ativarem o mecanismo do sistema imune efetor do hospedeiro há anos de estudo (INAL, 1999). Nesse estudo optamos por proteínas intracelulares como alvos de vacinas antigênicas, já que estas poderiam ser liberadas para o meio externo e serem utilizadas para produção de anticorpos contra os parasitas (ver item 1.4). Baseando no fato que o parasita *Schistosoma mansoni* é o único agente etiológico da esquistossomose no Brasil selecionamos o estudo de proteínas imunogênicas e focamos no teste vacinal com as duas enzimas recombinantes do próprio parasita, MTAP e APRT, atuantes na via das purinas que buscariam a ativação da resposta imunológica, visto que já temos em andamento estudos com outras enzimas da via de regulação de purinas de *S. mansoni* (NERIS et al., 2013A e 2013B).

Desse modo, as enzimas recombinantes MTAP e APRT de *S. mansoni* demonstram um possível papel na modulação da resposta imune e antiparasitária durante a esquistossomose mansônica experimental.

## 6. CONCLUSÃO

- A imunização com a enzima MTAP foi capaz regular a carga parasitária de vermes adultos nos animais previamente imunizados com MTAP e infectados com *S. mansoni*;
- A imunização com a enzima APRT e/ou com o mix das duas enzimas induziu redução do processo inflamatório no fígado dos animais, modulando o número de granulomas formados e o número de ovos do parasita nesses tecidos, além de controle do depósito de colágeno, sugerindo diminuição da formação de granuloma;
- A imunização com a enzima MTAP e mix das duas enzimas foi capaz de estimular uma resposta humoral com produção de anticorpos IgG1 e IgE, implicando que essas enzimas podem ser um futuro alvo para o desenvolvimento de vacina multifatorial para o controle da esquistossomose mansônica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H. A.; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ALFONZO, J. D. et al. Cloning and characterization of the adenine phosphoribosyltransferase encoding gene (APT1) from *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 161, p. 81-85, mar. 1995.

ALMEIDA, C. A.; LEITE, M. F.; GOES, A. M. Signal Transduction Events in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by *Schistosoma mansoni* Antigens. **Human Immunology**. v. 62, p. 1159-1166, jun. 2001.

ANDREASEN, L.V. et al. Aluminium hydroxide potentiates a protective Th1 based immune response against polio virus that allows for dose sparing in mice and rats. **Vaccine**, v. 33, p. 1873-1879, fev. 2015.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, L. J.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059p.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 406, p.353-360, jul. 2009.

BLANTON, R. E. et al. The relative contribution of immigration or local increase for persistence of urban schistosomiasis in Salvador, Bahia, Brazil. **Beglected Tropical Diseases**, p. 1-14, mar. 2015.

BOITZ, J. M.; ULLMAN, B. Adenine and adenosine salvage in *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 190, p. 51-55, jul. 2013.

BOSIACKA, I. B. et al. Inhibition of erythrocyte phosphoribosyltransferases (APRT and HPRT) by Pb<sup>2+</sup>: A potential mechanism of lead toxicity. **Toxicology**, v. 259, p. 77-83, 2009.

BRITO, P. A. et al. Host granulomatous response in schistosomiasis mansoni. **Journal Clinical Investigation**, v. 74, p. 1715-1723, nov. 1984.

CALDAS, V. E. A. **Dissertação de Mestrado: Adenina fosforibosiltransferase de *Shistosoma mansoni***: proposta de detalhamento do mecanismo catalítico por dinâmica molecular. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 519p.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141-150, mar. 2014.

CIOLO, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 195, p. 23-29, jun. 2014.

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

COSTA-SILVA, M. et al. Susceptibility of a Brazilian wild rodent isolate of *Schistosoma mansoni* to praziquantel in mice. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 394-399, fev. 2012.

COUSTAU, C. et al. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. **Fish & Shellfish Immunology**. p. 1-12, 2015.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005; v. 1.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-19, jul. 2014.

COURA, J. R.; CONCEIÇÃO, M. J. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 598-603, jul. 2010.

COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-612, out. 2002.

DIAS, S. R. C. et al. Evaluation of the *Schistosoma mansoni* Y-box-binding protein (SMYB1) potential as a vaccine candidate against schistosomiasis. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 1-13, jun. 2014.

DIEPEN, A. V. et al. Development of a *Schistosoma mansoni* shotgun O-glycan microarray and application to the Discovery of new antigenic schistosome glycan motifs. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p.465-475, mar. 2015.

DINIZ, P. P. et al. Two SmDLC antigens as potential vaccines against schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 140, p. 193-201, set. 2014.

DRUMMOND, S. C. et al. Schistosomiasis control program in the state of Minas Gerais in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 04, p. 519-523, jul. 2010.

DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**. Cambridge, v. 5, p. 420-426, mai. 2005.

EDVARDSSON, V. et al. Clinical Features and Genotype of Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency in Iceland. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 3, p. 473-480, set. 2001.

EPSTEIN, W. L. et al. Granulomatous inflammation in normal and athymic mice infected with *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural study. **Journal of Pathology**, v. 127, p.207-215, abr. 1979.

EWAISHA, R. E. et al. Combination of the two schistosomal antigens SM14 and Sm29 elicits significant protection against experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Experimental Parasitology**, v. 145, p. 51-60, ago. 2014.

FRANCO, G. R. et al. Minas Gerais Sequencing Network: The study of the parasite *Schistosoma mansoni* transcriptome. **Journal Biosci**, v. 20, p. 93-100, 2004.

FREZZA, T. F. et al. Liposomal-praziquantel: Efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay. **Acta Tropica**, v. 128, p. 70-75, jun. 2013.

FUAAD, A. A. H. A. et al. The use of a conformational cathepsin D-derived epitope for vaccine development against *Schistosoma mansoni*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1307-1312, jan. 2015.

FURROW, E. et al. An APRT mutation is strongly associated with and likely causative for 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis in dogs. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 111, p. 399-403, dez. 2013.

FOCACIA, R. et al. **Tratado de Infectologia** – Veronese-Focaccia. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2009 – cap. 105; Aluísio Prata; p. 1860-1882. p.2319; v. 2

GELLIN, B. G.; SALISBURY, D. M. Communicating the role and value of vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 33S, p. B44-B46, 2015.

GENTILE, R. et al. Evaluation of immunological, parasitological and molecular methods for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections before and after chemotherapy treatment with praziquantel in experimentally infected *Nectomys squamipes*. **Veterinary Parasitology**. v. 180, p. 243-249, mar. 2011.

GRIFFITH, Q. et al. Immune-evasive tactics by schistosomes identify an effective allergy preventative. **Experimental Parasitology**, v.153, p. 139-150, mar. 2015.

HOELLERICH, E. et al. Nucleolus localization of SmMark16 protein from *Schistosoma mansoni* is regulated by three distinct signals that function independent of pH or phosphorylation status. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 193, p. 9-16, jan. 2014.

INAL, J. M. Schistosoma TOR (trispansing orphan receptor), a novel, antigenic surface of the blood-dwelling, *Schistosoma* parasite. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1445, p. 283-298, mar. 1999.

JEREMIAS, W. J. et al. The skin migratory stage of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni* has a surface showing greater permeability and activity in membrane internalization than other forms of skin or mechanical schistosomula. **Parasitology**, p.1-9, mar. 2015.

KADARIYA, Y. et al. Chemical Genetic Screening for Compounds that Preferentially Inhibit Growth of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) Deficient *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 16, n. 1, p. 44-52, jan. 2011.

KATZ, N; CHAVES, A; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thicksmear technique in schistosomiasis mansoni **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 397–400, 1972.

KAY, J. H. et al. Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with praziquantel in vitro. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 186, p. 87-94, set. 2012.

KNOPF, M. P.; SURI, P.B. *S. mansoni* trapping in lungs contributes to resistance to reinfection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 186, p. 1-5, abr. 2015.

KOUNI, M. H; MESSIER, N. J; CHA, S. Treatment of schistosomiasis by purine nucleoside analogues in combination with nucleoside transport inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 22, p. 3815-3821, abr. 1987.

KONEMANN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1565p.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran – Patologia** – Bases Patológicas das Doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458p.

LU, Z. et al. Isolation, enrichment and primary characterization of vitelline cells from *Schistosoma mansoni* obtained by the organ isolation method. **International Journal for Parasitology**. p. 01-10, abr. 2015.

MAIZELS, R. M.; GAUSE, W. C. How helminths go viral: cellular signals during helminth infection can skew the immune response to favor viral spreading. **Immunology**, v. 345, n. 6196, p. 517-519, ago. 2014.

MCCREESH, N.; M. BOOTH. The effect of simulating different intermediate host snail species on the link between water temperature and schistosomiasis risk. **Journal Plosone**, v. 6, n.7, p1-7, jul. 2014.

MEDINA, J. M. et al. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n.1B, p. 207-211, mar. 2009.

MELO, T. T. et al. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtég) in association with CpG-ODN. **Microbes and Infection**, v. 15, p. 28-36, out. 2012.

MELTZER, E; SCHWARTZ, E. Schistosomiasis: Current epidemiology and management in travelers. **Current Infectious Disease Reports**, v. 15, p. 211-215, abr. 2013.

MUCHIRAH, P. N. et al. Determination of effective praziquantel dose in different mouse strains: BALB/c and Swiss mice in treatment of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research**, v. 4, p. 12-21, mar. 2012.

NAGUIB, F. N. M.; KOUNI, M. H. E. Nucleoside kinases in adult *Schistosoma mansoni*: Phosphorylation of pyrimidine nucleosides. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 194, p. 53-55, abr. 2014.

NAWARATNA, S. S. K. et al. Transcriptional profiling of the esophageal gland region of male worms of *Schistosoma mansoni*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 196, p.82-80, ago. 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494p.

NOBORI, T. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, (local), v.93, n. 12, p. 6203-6208, jun. 1996.

OLIVEIRA, S. M. et al. Association between allergic responses and *Schistosoma mansoni* infection in residents in a low-endemic setting in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 770-774, nov. 2014.

PEREIRA, H. D.; FRANCO, G. R.; CLEASBY, A.; GARRATT R. C. Structures for the Potential Drug Target Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni* Causal Agent of Schistosomiasis. **JMB – Journal Molecular Biology**, v. 353, p. 584-599, 2005.

REYNOLDS, L. A.; FINLAY, B. B. Worming their way into the Picture: microbiota help helminths modulate host immunity. **Immunity**, v. 43, p. 840-842, nov. 2015.

REIS, E. N. et al. Characterization of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitology International**, v. 63, p.120-126, out. 2013.

RUPPERT, R. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados – Uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.

SAVARESE, T. M.; KOUNI, M. H. E. Isolation and substrate specificity of an adenine nucleoside phosphorylase from adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 194, p. 44-47, abr. 2014.

SCHEER, S. et al. A novel tool to identify the relative contribution of lymphoid cell types that contribute to IL-10 production during the infection with *Schistosoma mansoni*: The TIGER index. **Journal of Immunological Methods**, v. 406, p. 66-73, mar. 2014.

SCHOLTE, R. G. C. et al. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57-63, dez. 2014.

SENFT, A. W., SENFT, D. G., MIECH. R. P. Pathways of Nucleotide Metabolism in *Schistosoma mansoni* II – Disposition of Adenosine by Whole Worms. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, p. 437-447, jul. 1972.

SENFT, A. W., CRABTREE, G. W. Pathways of Nucleotide Metabolism in *Schistosoma mansoni* VII - Inhibition of adenina and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. **Biochemical Pharmacology**, v. 26, p. 1847-1855, jan. 1977.

SHALABY, K. A. et al. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. **Vaccine**, v. 22, p. 130-136, jun. 2003.

SINGH, V.; SCHRAMM, V. L. Transition-state structure of human 5'-methylthioadenosine phosphorylase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 45, p. 14691-14696, nov. 2006.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with the cercariae of mansoni and the recovery of adults' worms. **Parasitology**, v. 5, p. 695-700, 1965.

SOTILLO, J. et al. A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. **International Journal for Parasitology**, v.45, p. 505-516, abr. 2015.

SOUZA, J. R. T. **Determinação estrutural e funcional da enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase de *Schistosoma mansoni***. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

STANDEN, O. D. The penetration of the cercariae of *Schistosoma mansoni* into the skin and lymphatics of the mouse. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 47, p. 292-298, jun. 1953.

STRAUBINGER, K. et al. Maternal immune response to helminth infection during pregnancy determines offspring susceptibility to allergic airway inflammation. **Journal Allergy Clinic Immunology**, mai. 2014.

SUBHI, A. L. et al. Metabolism and Bioenergetics: Methylthioadenosine Phosphorylase Regulates Ornithine Decarboxylase by Production of Downstream Metabolites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49868-49873, dez. 2003.

SWIERCZEWSKI, B. E.; DAVIES, S. J. A Schistosome cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Essential for Parasite Viability. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Bethesda, v. 3, n. 8, p. 1-10, ago. 2009.

TIBIRIÇÁ, S. H. C. et al. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, p. 1375-1381, out. 2008.

VICENTE, B. et al. The combination of the aliphatic diamine AA0029 in ADAD vaccination system with a recombinant fatty acid binding protein could be a good alternative for the animal schistosomiasis control. **Experimental Parasitology**, v. 154, p. 134-142, abr. 2015.

VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991 – cap. 100; Aluisio Prata; p. 838-855.

WANG, S., HU, W. Development of “-omics” research in *Schistosoma* spp. and -omics-based new diagnostic tools for schistosomiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 313, p. 1-11, jun. 2014.

WANG, W., WANG, L., LIANG, Y. S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1871-1877, out. 2012.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em: jul. 2015.

WIEST, P. M., OLDS, G.R., BOWEN, W. D. *Schistosoma mansoni*: Protein phosphorylations during transformation of cercariae to schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 214-222, 1991.

XAVIER, E. M. et al. The tegument of *Schistosoma mansoni*: genes. Antigens and the host-parasite relationship. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 85-86, ago, 1998.

ZHIGANG, L. et al. Isolation, enrichment and primary characterization of vitelline cells from *Schistosoma mansoni* obtained by the organ isolation method. **International Journal for Parasitology**, abr. 2015.

## 8. ANEXO



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

---

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**n° 002/2015**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa *ANÁLISE DOS EFEITOS IMUNIZANTES DAS ENZIMAS MTAP e APRT RECOMBINANTES DE Schistosoma mansoni NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL*, submetido pela pesquisadora Luciana Paggiatto.

São Carlos, 23 de Fevereiro de 2015

**Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais