

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

ANA CAROLINA MARAGNO FATTORI

**Efeitos da imunização com Adenosina Quinase (AK) e  
Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT)  
recombinantes de *Schistosoma mansoni*: Controle da infecção  
murina**

São Carlos – SP  
2016

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

ANA CAROLINA MARAGNO FATTORI

**Efeitos da imunização com Adenosina Quinase (AK) e  
Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT)  
recombinantes de *Schistosoma mansoni*: Controle da infecção  
murina**

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

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
**Co-orientador:** Dr. Humberto D’Muniz Pereira

São Carlos – SP

2016

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

F254e Fattori, Ana Carolina Maragno  
Efeitos da imunização com Adenosina Quinase (AK) e  
Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT)  
recombinantes de Schistosoma mansoni : Controle da  
infecção murina / Ana Carolina Maragno Fattori. --  
São Carlos : UFSCar, 2016.  
105 p.

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

1. Imunização. 2. Adenosina Quinase (AK). 3.  
Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT).  
4. Schistosoma mansoni. 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 Ana Carolina Maragno Fattori, realizada em 24/02/2016:

---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar

---

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra  
UFSCar

---

Profa. Dra. Fernanda Canduri  
IQSC/USP

*Dedico este trabalho ao Sagrado Coração de Jesus, para Sua maior honra e glória.  
Aos meus pais, Júlia e Valdir, pelo amor e apoio incondicional.  
À minha família e amigos, pela confiança e compreensão.  
Vocês foram essenciais. Obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser presença em minha vida, por me abençoar e fortalecer, me concedendo sabedoria em todos os momentos de minha vida e especialmente ao longo deste caminho. Muito obrigada Senhor!

Aos meus pais, Júlia e Valdir, por tudo o que me ensinaram e que me tornaram a pessoa que sou hoje. Pelo apoio e incentivo que fizeram com que eu conquistasse meus sonhos. Pela paciência, confiança e amor incondicional que sempre devotaram a mim: vocês são fundamentais em minha vida. Sou eternamente grata!

A minha irmã, Angelita, pela amizade, compreensão, por me ouvir sempre. Obrigada por você ter entrado e permanecido em minha vida e por ter me dado um sobrinho que é a nossa alegria, o Miguel.

A toda minha família, que sempre esteve comigo, me apoiando, torcendo por mim. Obrigada por compreenderem algumas ausências devido aos estudos. E de maneira especial, a minha tia Jussara, pelos ensinamentos e por estar sempre pronta a me ajudar. Obrigada!

A minha querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal, pela confiança, pelos ensinamentos, acadêmicos e também de vida, pela paciência em muitos momentos e por ser mais que uma orientadora, uma amiga ao longo desses anos!

Ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira, meu co-orientador, que contribuiu muito para este trabalho, não só no que diz respeito às enzimas, mas também agregando grande conhecimento.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Afonso, pela disponibilidade e empenho em sempre me ajudar naquilo que era necessário, pela amizade e por contribuir com meu crescimento intelectual e pessoal.

Agradeço a todos os meus amigos, que de uma maneira ou outra estiveram presentes, me apoiando e torcendo por mim. Em especial aos meus companheiros e amigos do

laboratório, pela amizade, pelos ensinamentos, por colaborarem com esta pesquisa, por me auxiliarem na construção do aprendizado científico e também pelos momentos de descontração.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia, pela convivência agradável e por contribuírem nos trabalhos. Sem vocês não seria possível.

Às equipes do Laboratório de Cristalografia, do IFSC-USP, pelo auxílio e contribuição nesse trabalho e à aluna de doutorado Larissa, que sempre esteve muito próxima a mim, transmitindo conhecimento, tirando dúvidas e pela disposição em ajudar, além da amizade. Obrigada!

À equipe do Departamento de Biologia Animal, do IB-UNICAMP, pela contribuição no que diz respeito à infecção dos animais, em especial à Prof.<sup>a</sup> Dra. Silmara Marques Allegretti, e à aluna de doutorado Rosimeire, pela constante ajuda e amizade. Obrigada!

Também à equipe do Laboratório de Citopatologia, da FMRP-USP, pela contribuição no que diz respeito às análises histológicas, em especial à Ana Maria da Rocha, pela confecção das lâminas e ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares, pela análise histopatológica.

Às instituições CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, em particular à CAPES pelo auxílio como bolsista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular por toda a formação acadêmica e apoio na participação de Congressos.

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

*“Não ande apenas pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram”.*

Alexander Graham Bell

## RESUMO

A esquistossomose mansônica é a mais importante das helmintíases humanas. Apesar dos avanços no seu controle continua se espalhando para novas áreas geográficas. Atualmente afeta mais de 250 milhões de pessoas. Entretanto, opções limitadas estão disponíveis para o tratamento da doença e o único fármaco de escolha é o Praziquantel. Assim, vários estudos têm sido propostos para encontrar novos fármacos e vacinas para combater a esquistossomose. Dessa forma, o presente estudo teve como proposta avaliar os efeitos da imunização prévia com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT), que participam do metabolismo de purinas do parasito, bem como com o MIX das duas enzimas, e posterior desafio com cercárias do parasito, para o controle da infecção murina. Camundongos fêmea Balb/c foram divididos em 5 grupos. Os grupos imunizados receberam três doses das enzimas e após 15 dias da última imunização, os animais foram infectados com *S. mansoni*. Após a infecção, no 47º dia foi realizada a contagem de ovos nas fezes e no 48º dia foi realizada a eutanásia dos animais para avaliação de resposta leucocitária (sangue e lavado da cavidade peritoneal), carga parasitária, produção de anticorpos, quantificação de citocinas e análise histopatológica do fígado desses animais. Os resultados demonstraram que, a imunização com o MIX promoveu nesses animais redução do número de ovos nas fezes de 46% quando comparado com os animais do grupo somente infectado. Os animais dos grupos imunizados com AK, HGPRT e/ou MIX apresentaram diminuição na quantidade de eosinófilos na cavidade peritoneal quando comparados com os animais do grupo somente infectado. Em relação à carga parasitária, os animais do grupo imunizado com o MIX apresentaram maior redução (31,27%) quando comparados aos animais do grupo somente infectado. Os animais dos grupos imunizados com AK, HGPRT e/ou MIX foram capazes de produzir anticorpos IgG1 e IgE anti as enzimas e anti as proteínas do parasito. Os animais do grupo imunizado com o MIX apresentaram aumento discreto de IL-4 e foi observada redução de IL-10, e no grupo imunizado com HGPRT houve aumento discreto de IFN- $\gamma$ , quando comparados com os animais do grupo somente infectado. Além disso, os animais do grupo imunizado com AK apresentaram redução do número de granulomas hepáticos (44,55%) e de ovos no fígado (42,31%), quando comparados com o grupo somente infectado. Assim, sugere-se que a imunização com essas enzimas pode contribuir para o controle da esquistossomose, bem como auxiliar na modulação da infecção experimental, induzindo redução da fisiopatologia desta parasitose.

**Palavras-chave:** Imunização. Adenosina Quinase (AK). Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT). *Schistosoma mansoni*.

## ABSTRACT

The mansoni schistosomiasis is the most important of human helminthiasis. Despite advances in its control this disease continues to spread to new geographical areas. It currently affects more than 250 million people. However, limited options are available for and Praziquantel is the drug of choice. Various authors have been searching new drugs and vaccines to control schistosomiasis. This study aimed to evaluate the effects of a prior immunization with recombinant enzymes of *Schistosoma mansoni*: Adenosine Kinase (AK) and Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase (HGPRT), which are important for parasite purine metabolism, as well as a MIX of these enzymes, and subsequent challenge with cercariae of the parasite in the control of murine infection. Female Balb/c mice were divided into 5 groups. The groups were enzyme-immunized in three doses and 15 days after the last immunization, animals were infected with *S. mansoni*. After infection in the 47<sup>o</sup> day egg count were carried in mice faeces and in the 48<sup>o</sup> day mice were sacrificed for evaluation of leukocyte numbers (blood and peritoneal cavity), worm burden, antibodies production, cytokines quantification and histopathological analysis of the liver of these animals. Our results strongly suggest that, immunization with a MIX originated in these animals reduction in the number of eggs in faeces by 46% when compared with the animals of the infected group. Animals of the groups immunized with AK, HGPRT and/or MIX seem to induce a reduction in the number of eosinophils in the peritoneal cavity when compared to the animals of the infected group. Concerning worm burden, the animals of the MIX group presented greater reduction (31.27%) when compared to the animals of the infected group. The animals of the immunized groups, AK, HGPRT and/or MIX were capable of producing IgG1 antibodies and IgE anti the enzymes and anti the parasite proteins. The animals of the immunized group MIX showed a slight increase in IL-4 production and observed reduction of IL-10, and in the HGPRT group induced a slight increase on IFN- $\gamma$  production when in compared with the infected group. In addition, the animals of the AK group showed a decrease in the number of hepatic granulomas in tissue (44,55%) and the eggs present in liver (42,31%). Therefore, it suggests that immunization with these enzymes can contributes to schistosomiasis control, as well as it might helps to modulate experimental infection inducing reduction of physiopathology of this parasitosis.

**Key-words:** Immunization. Adenosine Kinase (AK). Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase (HGPRT). *Schistosoma mansoni*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil. ....	21
<b>Figura 2</b> - <i>Schistosoma mansoni</i> em vista lateral e em vista frontal mostrando a fêmea emergindo do canal ginecóforo. ....	22
<b>Figura 3</b> - Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	23
<b>Figura 4</b> - Caramujos da espécie <i>B. glabrata</i> mantidos no Moluscário da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – SP. ....	24
<b>Figura 5</b> - Distribuição do <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil. ....	25
<b>Figura 6</b> - Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	27
<b>Figura 7</b> - Granuloma hepático. ....	29
<b>Figura 8</b> - Intensidade da resposta imune nas fases da esquistossomose. ....	31
<b>Figura 9</b> - Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em <i>S. mansoni</i> . ....	38
<b>Figura 10</b> - Alinhamento das duas sequências da AK de <i>S. mansoni</i> (Smp) e a AK humana (1BX4). ....	39
<b>Figura 11</b> - Alinhamento da HGPRT Smp_103560 de <i>S. mansoni</i> com a HGPRT humana (2JBH). ....	40
<b>Figura 12</b> - Análise da purificação da AK2 em gel de poliacrilamida 15% corado com Comassie Blue. ....	48
<b>Figura 13</b> - Análise da purificação da HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado com Comassie Blue. ....	49
<b>Figura 14</b> - Protocolo de imunização e delineamento experimental. ....	50
<b>Figura 15</b> - Aplicação intraperitoneal. ....	51
<b>Figura 16</b> - Infecção por imersão caudal. ....	52
<b>Figura 17</b> - Demonstrativo da eficiência da infecção por imersão caudal. ....	53
<b>Figura 18</b> - Lâmina para quantificação de ovos nas fezes. ....	54
<b>Figura 19</b> - Número de ovos por grama de fezes no 47º dia após a infecção. ....	60
<b>Figura 20</b> - Número de eosinófilos/mm <sup>3</sup> de sangue no 48º dia após a infecção. ....	62
<b>Figura 21</b> - Número de eosinófilos/mm <sup>3</sup> de lavado da cavidade peritoneal no 48º dia após a infecção. ....	63
<b>Figura 22</b> - Número de vermes adultos recuperados no 48º dia após a infecção. ....	64
<b>Figura 23</b> - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização pela enzima recombinante AK. ....	66

<b>Figura 24</b> - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT. ....	67
<b>Figura 25</b> - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes. ....	68
<b>Figura 26</b> - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização com PTS. ....	69
<b>Figura 27</b> - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante AK. ....	71
<b>Figura 28</b> - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT. ....	72
<b>Figura 29</b> - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes. ....	73
<b>Figura 30</b> - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização com PTS. ....	74
<b>Figura 31</b> - Dosagem da citocina IL-4 no plasma. ....	75
<b>Figura 32</b> - Dosagem da citocina IL-10 no plasma. ....	76
<b>Figura 33</b> - Dosagem da citocina IL-13 no plasma. ....	77
<b>Figura 34</b> - Dosagem da citocina IFN- $\gamma$ no plasma. ....	78
<b>Figura 35</b> - Fotomicrografias de cortes de fígado no 48º dia após a infecção - HE. ....	80
<b>Figura 36</b> - Fotomicrografias de cortes de fígado no 48º dia após a infecção - Tricômico de Masson. ....	81
<b>Figura 37</b> - Número de granulomas no fígado no 48º dia após a infecção. ....	82
<b>Figura 38</b> - Número de ovos no fígado no 48º dia após a infecção. ....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Número de ovos por grama de fezes dos animais e porcentagem de redução de ovos no 47º dia após a infecção. ....	61
<b>Tabela 2</b> - Número de vermes adultos recuperados dos animais e porcentagem de redução de carga parasitária no 48º dia após a infecção. ....	65
<b>Tabela 3</b> - Número de granulomas no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de granulomas no 48º dia após a infecção. ....	83
<b>Tabela 4</b> - Número de ovos no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de ovos no 48º dia após a infecção. ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AK** – Adenosina Quinase

**AMP** – Adenosina Monofosfato

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATP** – Adenosina Trifosfato

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

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CBME** – Centro de Biologia Molecular Estrutural

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

**CDP** – Difosfato de Citosina

**CEMIB** – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais

**DGE** – Departamento de Genética e Evolução

**DMP** – Departamento de Morfologia e Patologia

**DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

**DO** – Densidade Óptica

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

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

**EPM** – Erro Padrão da Média

**ESP** – Excreção e Secreção de Produtos

**FAD** – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

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

**Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz

**FMRP** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**GDP** – Guanosina Difosfato

**GMP** – Guanosina Monofosfato

**GTP** – Guanosina Trifosfato

**HE** – Hematoxilina-Eosina

**HGPRT** – Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase

**HXGPRT** – Hipoxantina-Xantina-Guanina Fosforibosiltransferase

**IB** – Instituto de Biologia

**IFN** – Interferon

**IFSC** – Instituto de Física de São Carlos

**Ig** – Imunoglobulina

**IL** – Interleucina

**IMP** – Inosina Monofosfato

**IPTG** – Isopropiltiogalactosídeo (Indutor de transcrição genética)

**LCP** – Lavado da Cavidade Peritoneal

**NAD** – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

**NK** – Células *Natural Killer* (exterminadoras)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

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

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

**PRPP** – Fosforribosil-pirofosfato

**PTS** – Proteínas Totais de *Schistosoma mansoni*

**RNA** – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

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

**SBCAL** – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

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

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

**SmAK** – Adenosina Quinase de *Schistosoma mansoni*

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

**Th** – Células T *helper* (auxiliares)

**TMB** – Tetrametilbenzidina

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

**Tris** – Trisaminometano

**UDP** – Difosfato de Uridina

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

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Esquistossomose .....	19
1.2 <i>Schistosoma mansoni</i> .....	21
1.3 Vetor biológico – molusco do gênero <i>Biomphalaria</i> .....	23
1.4 Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	25
1.5 Patologia da esquistossomose .....	27
1.6 Mecanismos Imunológicos na esquistossomose .....	29
1.7 Tratamento para a esquistossomose .....	31
1.8 Medida de controle alternativa: Vacina .....	34
1.9 Metabolismo de purinas em <i>Schistosoma mansoni</i> .....	36
1.9.1 Adenosina Quinase (AK) .....	37
1.9.2 Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) .....	39
1.10 Imunização com as enzimas Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) para o controle da esquistossomose mansônica .....	40
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	44
2.1 Objetivo geral .....	44
2.2 Objetivos específicos .....	44
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1 Animais .....	45
3.2 Obtenção das enzimas recombinantes Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	45
3.2.1 Expressão heteróloga da enzima AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	46
3.2.2 Expressão heteróloga da enzima HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	46
3.2.3 Purificação da enzima AK2 de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	46
3.2.4 Purificação da enzima HGPRT de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	47
3.3 Protocolo de imunização e delineamento experimental .....	50
3.4 Imunização dos animais .....	50
3.5 Infecção dos animais com as larvas infectantes do <i>S. mansoni</i> .....	51
3.6 Contagem de ovos nas fezes .....	53
3.7 Avaliação celular .....	54

3.7.1 Obtenção dos leucócitos do sangue e do lavado da cavidade peritoneal (LCP)	54
3.7.2 Contagem dos leucócitos do sangue e do lavado da cavidade peritoneal (LCP)	55
3.8 Avaliação da carga parasitária: recuperação de vermes adultos	55
3.9 Ensaio Imunoenzimático – ELISA	56
3.9.1 Obtenção do plasma dos animais	56
3.9.2 Detecção de anticorpos – ELISA indireto	56
3.9.3 Dosagem de citocinas – ELISA direto	57
3.10 Avaliação histológica do fígado	58
3.11 Análise Estatística	59
<b>4- RESULTADOS</b>	<b>60</b>
4.1 Contagem de ovos nas fezes	60
4.2 Avaliação celular	61
4.2.1 Contagem diferencial de eosinófilos no sangue no 48º dia após a infecção	61
4.2.2 Contagem diferencial de eosinófilos no lavado da cavidade peritoneal no 48º dia após a infecção	62
4.3 Avaliação da carga parasitária: recuperação de vermes adultos	63
4.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG1	65
4.4.1 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com a enzima recombinante AK de <i>S. mansoni</i>	65
4.4.2 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com a enzima recombinante HGPRT de <i>S. mansoni</i>	66
4.4.3 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com o MIX das enzimas recombinantes AK e HGPRT de <i>S. mansoni</i>	67
4.4.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com PTS (Proteínas Totais de <i>S. mansoni</i> )	68
4.5 Avaliação da produção de anticorpos IgE	70
4.5.1 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com a enzima recombinante AK de <i>S. mansoni</i>	70
4.5.2 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com a enzima recombinante HGPRT de <i>S. mansoni</i>	71

4.5.3 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com o MIX das enzimas recombinantes AK e HGPRT de <i>S. mansoni</i> .....	72
4.5.4 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com PTS (Proteínas Totais de <i>S. mansoni</i> ) .....	73
4.6 Avaliação da dosagem de citocinas .....	75
4.6.1 Avaliação da dosagem da citocina IL-4 no plasma .....	75
4.6.2 Avaliação da dosagem da citocina IL-10 no plasma .....	76
4.6.3 Avaliação da dosagem da citocina IL-13 no plasma .....	76
4.6.4 Avaliação da dosagem da citocina IFN- $\gamma$ no plasma .....	77
4.7 Avaliação histológica do fígado .....	78
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>6- CONCLUSÕES</b> .....	<b>94</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>95</b>
<b>ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais</b> .....	<b>105</b>

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença endêmica em países tropicais e subtropicais que atinge principalmente populações desfavorecidas social e economicamente, englobando 78 países nos quais aproximadamente 779 milhões de pessoas vivem em áreas de risco e cerca de 240 milhões estão infectadas. É a segunda doença parasitária de maior prevalência em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública, sendo superada apenas pela malária (WHO, 2014). No Brasil, estima-se que 7 milhões de pessoas estejam infectadas (SCHOLTE et al., 2014) embora a estimativa oficial do Ministério da Saúde é de 1 milhão de infectados entre 2003 e 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O helminto trematódeo intravascular do gênero *Schistosoma* é o parasito causador da esquistossomose, doença de grande potencial de disseminação e popularmente conhecida como barriga d'água, doença do caramujo, xistosa ou bilharziose (CHITSULO et al., 2000; MODHA et al., 1998 e HOTEZ; FERIZ, 2006). Existem seis espécies de *Schistosoma* que infectam os seres humanos, sendo três as principais. A esquistossomose urinária é causada pelo *Schistosoma haematobium* que ocorre na África e no Oriente Médio. Já a esquistossomose intestinal resulta da infecção pelo *Schistosoma japonicum*, endêmico na Ásia, e o *Schistosoma mansoni*, endêmico na África, Antilhas e América do Sul (CHITSULO et al., 2000).

Historicamente, há relatos de que a esquistossomose esteja há séculos acompanhando a humanidade. Os ovos de *Schistosoma* foram encontrados em vísceras de múmias egípcias originadas a cerca de 1250 a.C. (RUFFER, 1910). Igualmente existem relatos de que ovos de *S. japonicum* foram encontrados em múmias chinesas de mais de dois mil anos (KATZ; ALMEIDA, 2003). Acredita-se que a doença tenha chegado ao Brasil devido ao tráfico de escravos originários da costa ocidental da África, que ingressaram no país para trabalharem na lavoura de cana-de-açúcar, e imigrantes asiáticos (DESPRÉS; IMBERT-ESTABLET; MONNEROT, 1993). E aqui encontrando seu hospedeiro intermediário, o parasito se instalou.

Aspectos clínicos da doença foram descritos pela primeira vez em 1847, pelo japonês Yoshinao Fuji, com a descrição da síndrome de Katayama. No Egito, o parasito tornou-se conhecido em 1852, com a descrição detalhada do verme feita pelo médico alemão Theodor

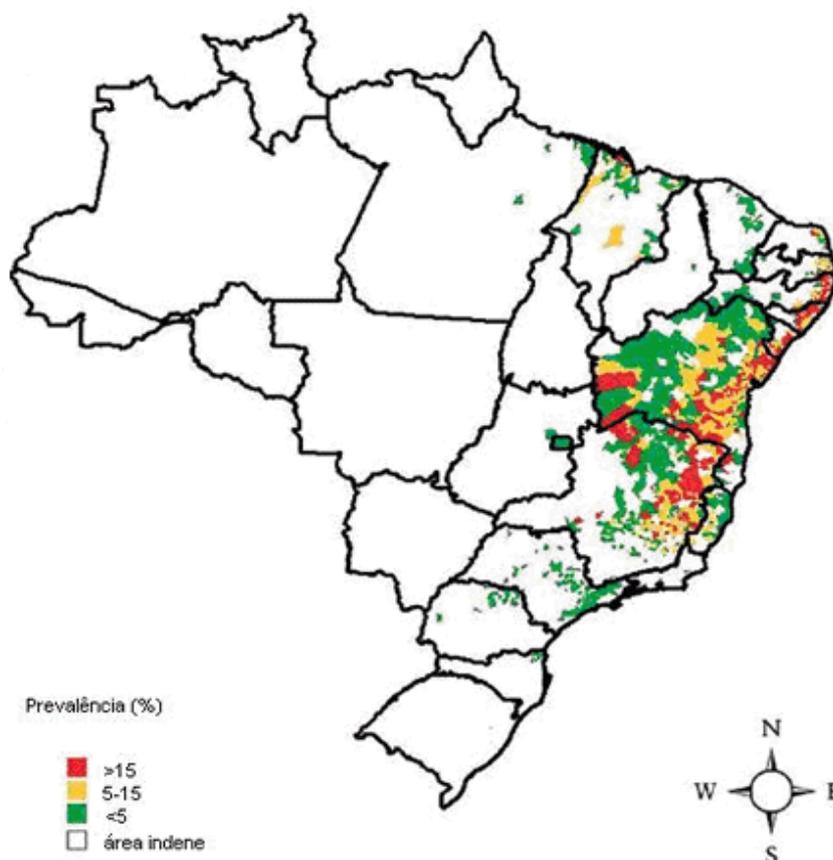
Bilharz, surgindo assim a denominação bilharziose usada em alguns países. A espécie existente no Brasil foi descrita, em 1907, pelo médico inglês Louis Sambon, que a nomeou *Schistosoma mansoni* em homenagem ao mestre Patrick Manson, médico escocês que fez grandes descobertas na parasitologia e foi o fundador da medicina tropical. O *S. mansoni* foi identificado no Brasil pela primeira vez em 1908, e descrito através de análises minuciosas pelo médico Pirajá da Silva (KATZ; ALMEIDA, 2003; COURA; AMARAL, 2004).

Apesar de haver a detecção de indivíduos parasitados por outras espécies do gênero *Schistosoma*, somente o *S. mansoni* permaneceu no continente americano devido aos bons hospedeiros intermediários e da existência de ambientes favoráveis, tais como: características físico-químicas da água, leito lodoso ou rochoso, vegetação enraizada ou flutuante mais próxima às margens, entre outros (PARAENSE, 1972).

No Brasil, a esquistossomose mansônica foi descrita em 18 estados e no Distrito Federal, sendo que sua ocorrência está diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores. Os estados das regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste são os mais afetados e estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

De acordo com o Ministério da Saúde, atualmente a doença é detectada em todas as regiões do país, distribuindo-se mais intensamente numa faixa de terras contínuas e contíguas ao longo de quase toda a costa litorânea da região Nordeste, a partir do Rio Grande do Norte em direção ao Sul, incluídas as zonas quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, onde se interioriza alcançando Minas Gerais, no Sudeste, seguindo o trajeto de importantes bacias hidrográficas. De forma localizada está presente nos estados do Ceará, Piauí, Maranhão, Pará, Goiás, Distrito Federal, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, como mostra a Figura 1.

**Figura 1 - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil.**



Fonte: Amaral, R. S.; Tauil, P. L.; Lima, D. D.; Engels, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101 (Suppl. I), p. 79-85, 2006.

A expansão da esquistossomose no país está relacionada ao fluxo migratório interno dos trabalhadores para outras regiões e à presença de moluscos predispostos a hospedar miracídeos para o desenvolvimento da cercária (MACHADO, 1977).

Os esforços para erradicar a doença se baseiam no tratamento da população atingida com droga esquistossomicida, controle de caramujo (hospedeiro intermediário), educação sanitária e saneamento básico (MODHA et al., 1998; CHITSULO et al., 2000).

### **1.2 *Schistosoma mansoni***

O parasito *Schistosoma mansoni* é um platelminto da classe Trematoda e subclasse Digenea, pertencendo à família Schistosomatidae. Os trematódeos do gênero *Schistosoma* distinguem-se dos outros Digenea por apresentarem sexos separados, acentuado dimorfismo sexual e por terem, os machos, menos de 10 massas testiculares. Os vermes adultos vivem no interior dos vasos sanguíneos de mamíferos. Os esquistossomos, contrariamente à

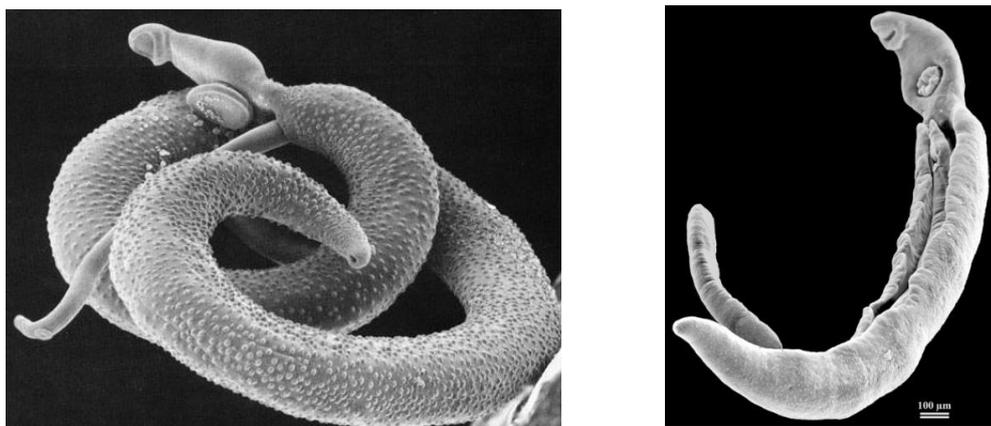
generalidade dos trematódeos, apresentam-se como vermes delgados e longos, como observado na Figura 2 (REY, 2008).

O macho mede cerca de 1 cm de comprimento por 0,11 cm de largura e é de cor branca. Na extremidade anterior traz uma ventosa oral, afunilada, e a pequena distância desta uma segunda ventosa, pedunculada, o acetábulo. O curto segmento anterior compreendido entre as duas ventosas é cilíndrico e mais fino que o segmento anterior. Este é várias vezes mais longo, porém enrolado de maneira a formar um tubo longitudinal, conhecido como canal ginecóforo, pois nele costuma estar alojada a fêmea (REY, 2008).

O revestimento externo dos vermes adultos é formado por uma citomembrana que possui sete camadas e, na superfície exterior, apresenta uma camada poliônica rica em carboidratos. O tegumento exhibe, sobretudo nos machos, grande quantidade de pequenos tubérculos, mais abundantes na superfície dorsal, e de aspecto grosseiro. Também apresenta estruturas mais delicadas consistindo em minúsculos espinhos na superfície interna (REY, 2008).

A fêmea tem corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que o do macho (1,2 a 1,6 cm por 0,016 cm de diâmetro em média). Apresenta coloração escura e acinzentada devido à presença do pigmento hemozoína, derivado da digestão do sangue, em seu tubo digestivo. As duas ventosas são pequenas e o tegumento possui poucos tubérculos (REY, 2008).

**Figura 2 - *Schistosoma mansoni* em vista lateral e em vista frontal mostrando a fêmea emergindo do canal ginecóforo.**



Fonte: Parasite of day <[http://4.bp.blogspot.com/Schistosoma\\_mansoni2.jpg](http://4.bp.blogspot.com/Schistosoma_mansoni2.jpg)> e Science Blogs <[http://scienceblogs.com.br/rainha/files/schistosoma\\_mansoni1.jpg](http://scienceblogs.com.br/rainha/files/schistosoma_mansoni1.jpg)>

O ovo de *S. mansoni* (Figura 3) mede de 110 a 180  $\mu\text{m}$  de comprimento por 45 a 70  $\mu\text{m}$  de largura e apresenta o pólo anterior mais delgado e o posterior mais volumoso, com um

espinho lateral saliente e agudo em suas proximidades. As fêmeas põem um ovo por vez e calcula-se que o total diário esteja em torno de 300 ovos (REY, 2008). Pela microscopia eletrônica, o ovo foi descrito como uma casca protéica com uma densa série de microespinhos na sua parte externa e, na parte interna, apresenta maior conteúdo correspondente às células vitelínicas com citoplasma rico em mitocôndrias, vesículas de vários tipos, gotículas de gordura e uma membrana que envolve o miracídio (SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

**Figura 3 - Ovo de *Schistosoma mansoni*.**



Fonte: Biblioteca Virtual em Saúde Adolpho Lutz  
<[http://www.bvsalutz.coc.fiocruz.br/html/pt/trajetoria/mudanca/imagens/s\\_mansoni.egg](http://www.bvsalutz.coc.fiocruz.br/html/pt/trajetoria/mudanca/imagens/s_mansoni.egg)>

A nutrição dos vermes adultos ocorre pela ingestão de sangue venoso. A absorção de carboidratos e aminoácidos ocorre principalmente através do tegumento, no qual se encontram vários sistemas transportadores de nutrientes (REY, 2008). Devido à ausência de abertura anal ao final do tubo digestivo, os parasitos regurgitam suas excretas (LAWRENCE, 1973).

### **1.3 Vetor biológico – molusco do gênero *Biomphalaria***

Os hospedeiros intermediários do gênero *Schistosoma* são moluscos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*. Foram descritas no Brasil cerca de 10 espécies, dentre elas três principais transmissoras da doença: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (REY, 2001). Os caramujos deste gênero são hermafroditas simultâneos e se reproduzem por fecundação cruzada ou por autofecundação (PARAENSE, 1972).

Esses moluscos podem colonizar uma grande variedade de habitats, tanto lóticos (desde rios até pequenas valas) quanto lênticos (de lagoas a pequenas poças). Já os focos de transmissão propriamente ditos geralmente têm características ecológicas semelhantes, sendo

localizados no peridomicílio de comunidades urbanas ou rurais desprovidas de água encanada ou saneamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

As características físico-químicas da maioria das coleções de água encontradas no peridomicílio estão dentro dos limites de tolerância dos moluscos hospedeiros. O *B. glabrata*, por exemplo, pode tolerar faixas relativamente amplas de condutividade, íons cálcio, sódio e potássio, cloretos, dióxido de carbono, nitrogênio (amônia), oxigênio dissolvido, turbidez, temperatura e pH (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Um outro aspecto ecológico relevante é a habilidade que os moluscos vetores possuem de sobreviverem fora da água por períodos relativamente longos e assim têm a capacidade de resistir à dessecação. Na ausência de água, a primeira resposta dos moluscos é a retração do corpo no interior da concha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

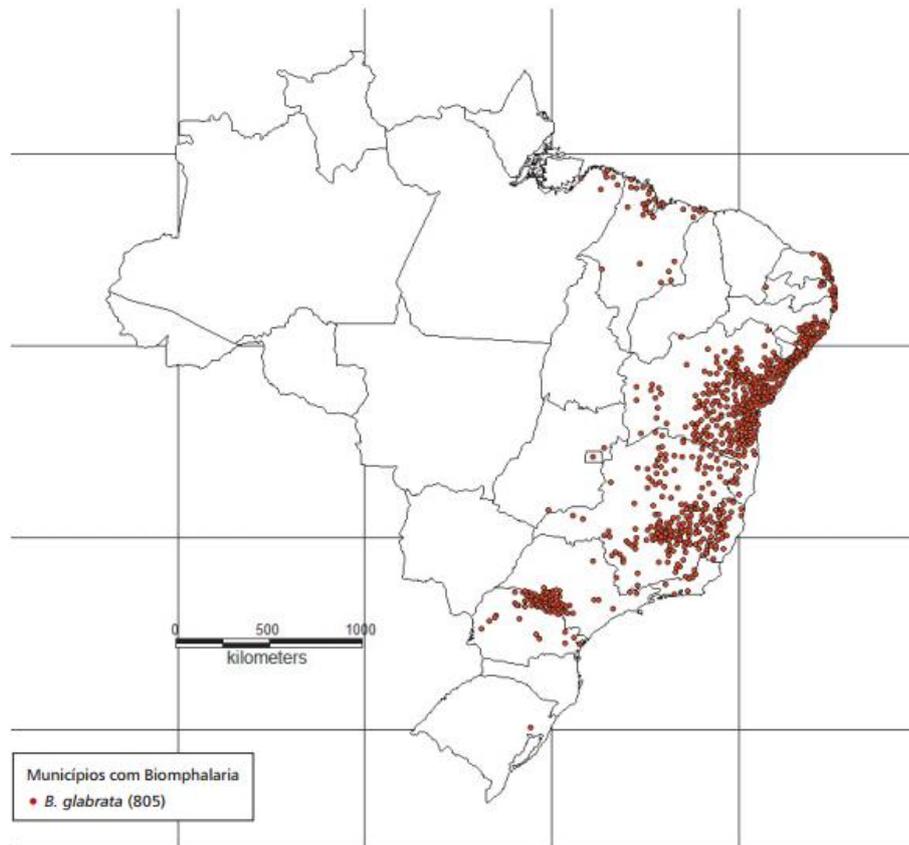
O *B. glabrata* (Figura 4) é o principal hospedeiro do *S. mansoni* no Brasil, não apenas pelo alto grau de suscetibilidade de suas populações ao parasito, mas também pela distribuição geográfica em toda a faixa costeira do Nordeste e em algumas regiões do Centro e Sul do país (NEVES, 2010), como apresentado na Figura 5. A capacidade desses caramujos de sobreviver à estação seca, repovoar as coleções de águas sazonais, inclusive albergando formas larvares de *S. mansoni*, torna seu controle mais difícil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

**Figura 4 - Caramujos da espécie *B. glabrata* mantidos no Moluscário da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – SP.**



Fonte: de Oliveira, R. N, 2012.

**Figura 5 - Distribuição do *Biomphalaria glabrata* no Brasil.**



Fonte: Extraído de Carvalho et al., 2008

<<http://www.ufjf.br/labproteinas/material-de-apoio/esquistossomose/ciclo-biologico/>>

#### **1.4 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni***

O ciclo de vida do *S. mansoni* é heteroxênico, ou seja, há duas fases parasitárias distintas: uma no hospedeiro definitivo (homem e outros mamíferos), no qual ocorre a reprodução sexuada, e outra no hospedeiro intermediário (caramujo), onde ocorre a reprodução assexuada. Em seu ciclo o *S. mansoni* se apresenta sob as seguintes formas evolutivas: verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo (CIMERMAN; CIMERMAN, 2002).

A infecção se dá pelas cercárias liberadas pelo hospedeiro intermediário (molusco do gênero *Biomphalaria sp*) que penetram pela pele e infectam o homem quando este entra em contato com águas contaminadas (D'ARCY; HARRON, 1983). No sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos (forma evolutiva que precede os vermes adultos) se desenvolvem e alcançam a fase adulta. Então, esses vermes acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, caminhando contra a corrente sanguínea da veia porta e das veias

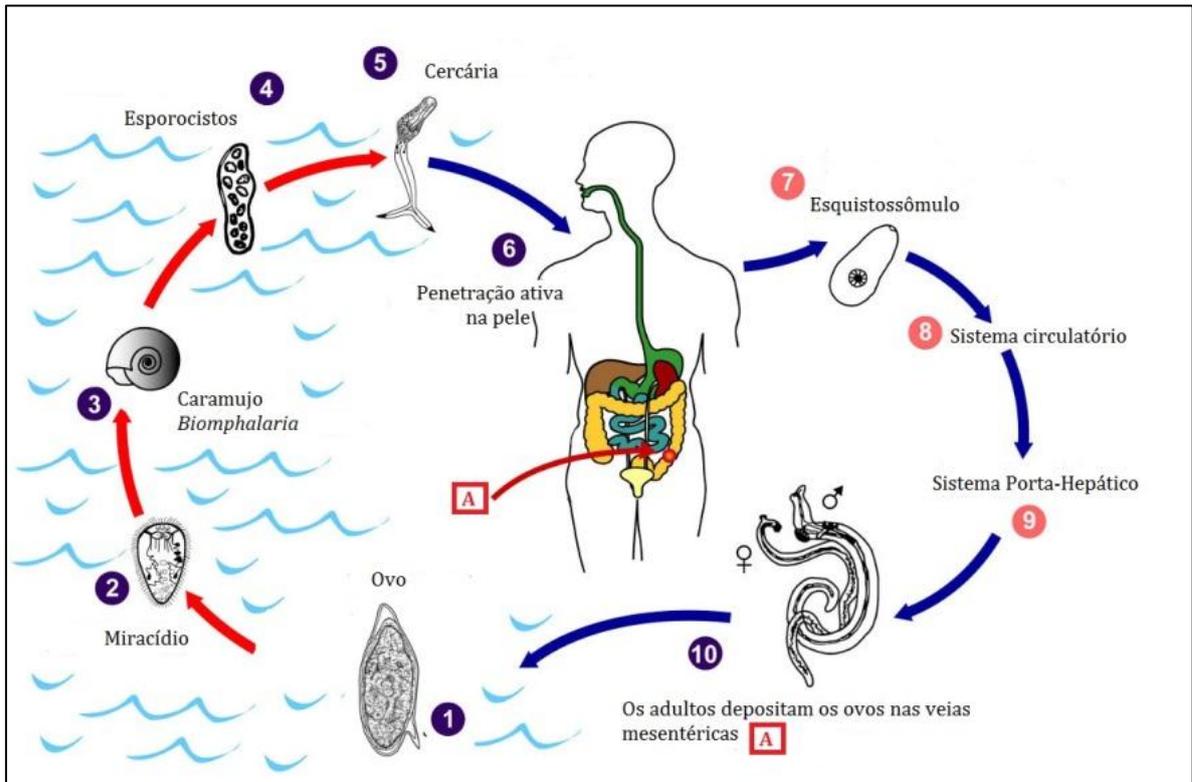
mesentéricas, particularmente da mesentérica inferior, na qual as fêmeas põem seus ovos (REY, 2008).

Os ovos colocados chegam à luz intestinal e vão para o exterior junto com o bolo fecal (NEVES, 2005). Alcançando a água, e estimulado por alguns fatores como temperatura mais alta, luz intensa e oxigenação da água, os ovos eclodem e liberam suas larvas: os miracídios (NEVES, 2005; REY, 2008). Estes nadam em círculos durante algumas horas até encontrar moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Substâncias difundidas na água pelos moluscos induzem os miracídios a percorrerem círculos cada vez menores, aumentando suas chances de encontro com o hospedeiro invertebrado (REY, 2008).

Penetrando no tegumento e indo alojar-se em diversos tecidos do molusco, os miracídios transformam-se em esporocistos que, por poliembrionia, geram esporocistos filhos e depois cercárias. Voltando ao meio líquido (através de vesículas tegumentares que se rompem), as cercárias que abandonaram o molusco hospedeiro ficam nadando na água, quase sempre em direção à superfície, enquanto não têm oportunidade de entrar em contato com a pele de um hospedeiro vertebrado, através do qual penetram ativamente. Depois de penetrarem transformam-se logo em esquistossômulos (REY, 2008).

Os que não são destruídos na pele ganham a circulação sanguínea geral e vão até o coração, depois aos pulmões (local onde também podem ser retidos e destruídos) e, em seguida, ao fígado. No sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos alimentam-se de sangue, desenvolvem-se e alcançam a fase adulta (REY, 2008). Dessa maneira se completa o ciclo evolutivo do parasito, esquematizado na Figura 6.

**Figura 6 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.**



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

### 1.5 Patologia da esquistossomose

O quadro inicial e a evolução do processo patológico provocado pelo *S. mansoni*, no organismo do hospedeiro, deve ser considerado a partir da análise de uma série de fatores como a linhagem do parasito, a carga parasitária, as características do hospedeiro (idade, nutrição, hábitos e condições de vida), intensidade da infecção, grau de imunidade e, no caso de infecções anteriores, a carga parasitária acumulada e a duração da infecção (REY, 2008).

Assim que as cercárias penetram na pele as mesmas podem desencadear a chamada dermatite cercariana, caracterizada por intenso prurido, erupção urticariforme e é seguida, dentro de 24 horas, por eritema, edema, pequenas pápulas e dor. Nesse período observa-se infiltração de polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos. Mais tarde surgem linfócitos e macrófagos. Esses fenômenos são mais intensos nas reinfecções e nos indivíduos hipersensíveis. A dermatite cercariana é, portanto, um processo imunoinflamatório muito importante na imunidade concomitante, pois há grande destruição de cercárias na pele durante esse processo (NEVES, 2005; REY, 2008).

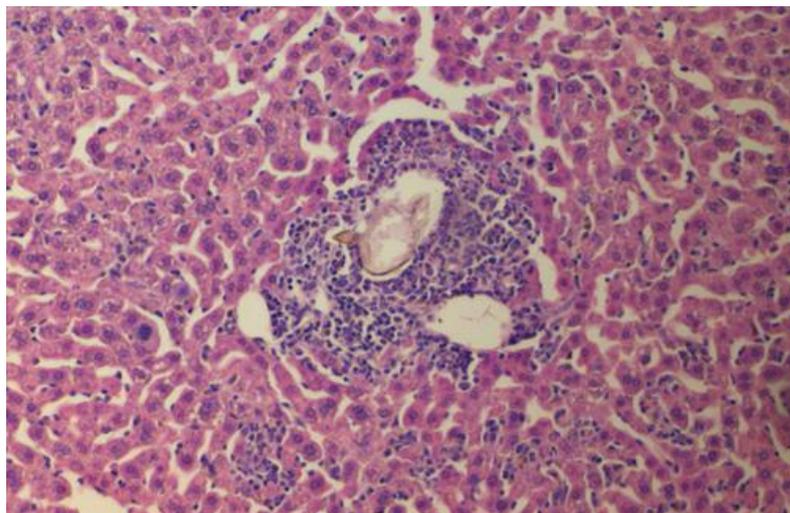
Após cerca de três dias da penetração das cercárias na pele, os esquistossômulos são levados aos pulmões e a partir da segunda semana após a infecção, podem ser encontrados nos vasos do fígado e, posteriormente, no sistema porta intra-hepático. A morte de alguns vermes produz obstrução embólica do vaso e reação inflamatória. A desintegração do parasito costuma provocar necrose do tecido em torno, mais tarde substituído por tecido cicatricial. Nessa fase, pode haver linfadenia generalizada, febre, aumento volumétrico do baço e sintomas pulmonares. Em condições experimentais têm-se verificado que, numa primeira infecção, o parasito já apresenta mecanismos de evasão à ação da resposta do organismo, como síntese e aquisição de moléculas semelhantes às do hospedeiro e capacidade de renovação do tegumento lesado (NEVES, 2005; REY, 2008).

Aproximadamente 50 dias após a infecção, os vermes adultos acasalados se encontram no plexo mesentérico e iniciam a postura dos ovos que se disseminam principalmente na parede do intestino, com áreas de necrose, levando a uma enterocolite aguda. E no fígado, provocando a formação de granulomas simultaneamente, caracterizando a forma aguda da doença na qual pode ocorrer febre, calafrios, emagrecimento, fenômenos alérgicos, diarreia, cólicas, hepatoesplenomegalia discreta, leucocitose com eosinofilia, aumento das globulinas e alterações discretas das funções hepáticas. Esse período pode durar até cerca de 120 dias após a infecção (NEVES, 2005).

As lesões hepatoesplênicas são devidas principalmente a uma hipersensibilidade do hospedeiro aos antígenos solúveis secretados pelos ovos (SEA - *Soluble Egg Antigens*, Antígenos Solúveis dos Ovos). Essa hipersensibilidade, que é maior no início da infecção, decresce espontaneamente na fase crônica da doença, resultando na redução do tamanho dos granulomas através da modulação da resposta imune que resulta na eventual redução da sintomatologia (NEVES, 2005).

O granuloma (Figura 7) é formado por diversas células inflamatórias do sistema imune, incluindo eosinófilos, componentes de matriz extracelular, proteínas de adesão, fatores de crescimento e angiogênese, originando uma estrutura esférica que circunda cada ovo individualmente. Após a morte do ovo, o granuloma diminui, deixando placas fibrosas (com abundante quantidade de colágeno) em seu lugar, aumentando a pressão sanguínea portal assim como o diâmetro da veia porta (PEARCE; MACDONALD, 2002; LENZI et al., 2008). Sendo assim, é relevante notar que o ovo do parasito é o principal agente patogênico, superando muito os efeitos nocivos produzidos diretamente pelos vermes adultos (REY, 2008).

**Figura 7 - Granuloma hepático.**



Fonte: Arquivo pessoal

A fase crônica da doença pode apresentar grandes variações clínicas, dependendo de serem as alterações predominantemente intestinais, hepatointestinais ou hepatoesplênicas. Em relação às alterações intestinais o paciente pode apresentar como principais sintomas, dor abdominal, diarreia mucossanguinolenta e tenesmo. Em casos mais graves pode ocorrer fibrose da alça retossigmoide, levando à diminuição do peristaltismo e constipação constante (NEVES, 2005).

Nas alterações hepáticas iniciais, o fígado apresenta-se com aumento de volume e bastante doloroso à palpação. Entretanto, numa fase mais adiantada, o mesmo pode estar menor e fibroso. Os granulomas hepáticos que se formam causam endoflebite aguda e fibrose periportal, a qual provocará obstrução dos ramos intra-hepáticos da veia porta. Como consequência ocorre a hipertensão portal, que, com a evolução da doença, desencadeia alterações como a esplenomegalia, as varizes e a ascite (NEVES, 2005). Além dessas alterações, podem ser observadas, na fase crônica, lesões cardiopulmonares, tumorações esquistossomóticas, lesões renais e lesões neurológicas (REY, 2008).

### **1.6 Mecanismos Imunológicos na esquistossomose**

Os processos inespecíficos de defesa do organismo se iniciam logo que as cercárias penetram na pele de seu hospedeiro. A pele tem um importante papel na imunidade natural, pois nela grande parte das cercárias são destruídas e é inibido o poder de migração das mesmas. A dermatite cercariana surge, em alguns casos, em resposta à presença das cercárias

e aparece na pele uma reação inflamatória. Constatou-se que é possível recuperar da pele de camundongos, como esquistossômulos mortos, mais de um terço das cercárias usadas para infectá-los; outro terço chega ao fígado e é recuperável como vermes adultos vivos. Os esquistossômulos também podem ser destruídos, durante seu trajeto, nos pulmões e no fígado (REY, 2008).

A destruição dos esquistossômulos é função da existência de receptores para IgG e para proteínas do sistema complemento (C3), na membrana dos leucócitos. Os eosinófilos possuem 2,5 vezes menos receptores que os neutrófilos. No entanto, sob a influência de fatores quimiotáticos produzidos por mastócitos, os receptores constitutivos do eosinófilo parecem favorecer os mastócitos sensibilizados por anticorpos específicos IgE a aderirem aos esquistossômulos e, por meio da excreção desses fatores, apresentarem importante papel no mecanismo de destruição dos parasitos (REY, 2008).

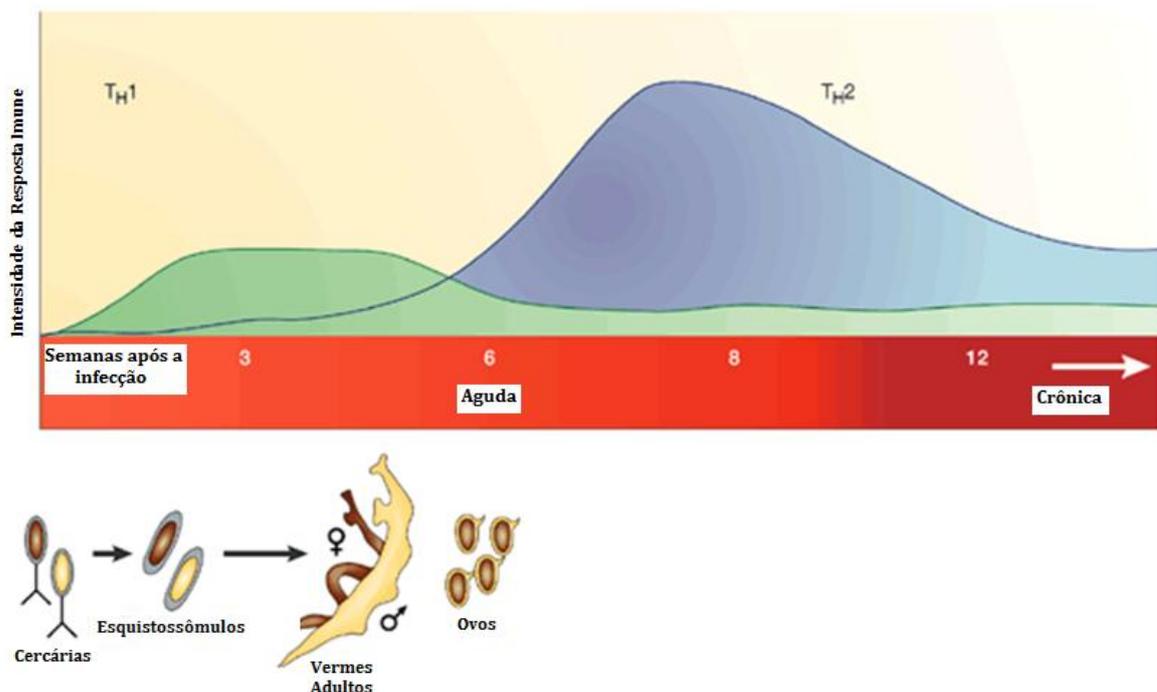
No decorrer da infecção, a resposta imunológica evolui por três fases principais. Na fase aguda da doença, compreendida entre as primeiras 3 a 5 semanas de infecção, o padrão de resposta que predomina é do tipo Th1. Durante esse período observa-se um nível mensurável de fator de necrose tumoral (TNF) no plasma e células mononucleares do sangue periférico que produzem grande quantidade de TNF, IL-1 e IL-6, que são mediadores pró-inflamatórios. Com a progressão da doença e o aparecimento dos antígenos dos ovos, por volta da 6ª semana, a resposta Th1 é modulada e a Th2 é induzida (Figura 8) diminuindo a produção e as funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios. A produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, tem um papel de extrema importância na modulação da resposta Th1 e na transição do tipo de resposta. Na fase crônica há o predomínio do padrão de resposta Th2 que apresenta papel principal nos estágios iniciais desta fase. Após esse período, a resposta Th2 deve ser modulada para não contribuir com o desenvolvimento da fibrose hepática e da morbidade crônica. As interleucinas IL-13 e IL-4 são as principais citocinas responsáveis pela fibrose, já que as mesmas estimulam o macrófago e os fibroblastos a sintetizar colágeno (PEARCE; MACDONALD, 2002).

O balanço entre os padrões de resposta, Th1 e Th2, é muito importante, pois o predomínio da resposta imune em direção de um único perfil é prejudicial e pode levar o hospedeiro a morte. A IL-10 apresenta papel importante na regulação pró-inflamatória evitando que ocorra um mecanismo pró-inflamatório potencialmente letal. Na fase crônica, se o padrão Th2 não for modulado, o mesmo aumenta o processo de fibrose gerando a forma mais grave da doença, a forma hepatoesplênica (PEARCE; MACDONALD, 2002). A

homeostase imunológica é mantida pelas células TCD4+ reguladoras controlando, dessa maneira, a magnitude da resposta imune a organismos invasores (BELKAID; ROUSE, 2005).

Finalmente, é relevante notar que a eficácia dos mecanismos imunológicos do hospedeiro é contra-balanceada pelos dispositivos de escape do parasito, como: modificação do tegumento das larvas, que deixam de fixar anticorpos ou complemento; descamação da superfície externa do tegumento dos vermes adultos, a qual é substituída por novas camadas de membrana celular e presença de antígenos do hospedeiro adsorvidos ou incorporados à membrana do parasito, fato que impede que os vermes adultos sejam reconhecidos como estranho pelo organismo do hospedeiro (REY, 2008).

**Figura 8 - Intensidade da resposta imune nas fases da esquistossomose.**



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

### 1.7 Tratamento para a esquistossomose

Os primeiros fármacos desenvolvidos com ação esquistossomicida eram altamente tóxicos e de incômoda administração. Ao longo dos anos foram sendo desenvolvidos medicamentos com baixa toxicidade e administrados oralmente. O tratamento específico da esquistossomose é feito através de dois fármacos: o Praziquantel e o Oxaminiquine. No

Brasil, e também na maior parte dos países afetados, o medicamento de escolha é o Praziquantel, sendo que o mesmo é efetivo contra todas as espécies de *Schistosoma*. No entanto, ambos os fármacos apresentam limitações como baixa atividade sobre os vermes imaturos do *S. mansoni* e falha em tratamentos devido ao fato de ocorrer perda de sensibilidade ao medicamento (REY, 2008; ARAÚJO, 2010).

O Praziquantel é um derivado do núcleo isoquinoleínico-pirazínico de amplo espectro anti-helmíntico. É absorvido rapidamente por via oral e alcança concentração sérica máxima ao final de 1 ou 2 horas. O medicamento é apresentado comercialmente em tabletes de 600 mg, sob o nome de Biltricide<sup>®</sup>. A administração é realizada, em adultos, em dose única de 50 mg/kg por via oral em uma tomada ou fracionada em duas tomadas com intervalo de 4 a 12 horas; em crianças, em dose única de 60 mg/kg fracionada em duas tomadas (REY, 2008; VITORINO et al., 2012).

A ação do Praziquantel foi relacionada ao aumento da atividade muscular, seguido de contração e paralisia do verme com posterior vacuolização e destruição tegumentar devido à atuação na permeabilidade ao cálcio nas células do helminto, tornando a concentração desse íon aumentada. Após o contato com o medicamento, o verme perde a capacidade de fixação, em consequência da contração muscular, sendo arrastado para o fígado, e a reação inflamatória que ocorre nesse órgão ocasiona a morte do parasito. Além disso, após a destruição tegumentar, ocorre a exposição de antígenos do parasito que estimulam a resposta imune do hospedeiro beneficiando a ação do fármaco. O percentual de cura com a utilização deste medicamento varia de 60% a 90% e esses índices estão associados à substancial redução da carga parasitária e da produção de ovos pelo parasito. Estudos sugerem que o tratamento com o Praziquantel é efetivo na redução da morbidade em pacientes com fibrose hepática grave (ARAÚJO, 2010; VITORINO et al., 2012).

O Oxaminiquine é um derivado das tetraidroquinoleínas, com atividade restrita sobre o *S. mansoni*. É absorvido prontamente por via oral e encontra-se, para ser comercializado, sob o nome de Mansil<sup>®</sup> ou Vansil<sup>®</sup>, em cápsulas de 250 mg ou em xarope contendo 50 mg/mL. A administração é realizada, em adultos, em dose única de 15 mg/kg por via oral, após a última refeição; em crianças, em dose única de 20 mg/kg por via oral, uma hora após a refeição (REY, 2008; VITORINO et al., 2012).

O mecanismo de ação principal do Oxaminiquine está relacionado com a sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos. A esterificação do fármaco pela enzima sulfotransferase produz compostos eletrolíticos capazes de alquilar o DNA e outras moléculas

do parasito. Sob o efeito do medicamento os vermes adultos interrompem a oviposição e são levados pela circulação porta ao fígado, no qual são envolvidos pelo processo inflamatório e fagocitados. A eficácia clínica do Oxaminiquine tem sido demonstrada, em alguns estudos brasileiros, atingindo índices de cura entre 80% e 95%. Entretanto este medicamento apresenta vários efeitos colaterais como náuseas, dor de cabeça, vômito, além de relatos de efeitos adversos graves no sistema nervoso central (ARAÚJO, 2010; VITORINO et al., 2012). Assim, já faz algum tempo que esse fármaco não é escolha para o tratamento e controle da esquistossomose.

A resistência a um determinado medicamento pode desencadear graves consequências a longo prazo, principalmente se considerarmos doenças que apresentam apenas um fármaco de uso recorrente para seu tratamento, como é o caso da esquistossomose, que tem sido tratada quase que exclusivamente com o Praziquantel, pois entre outros aspectos, apresenta baixo custo (ARAÚJO, 2010). O tratamento com o uso deste fármaco já foi descrito como sendo de baixa eficácia no Egito e Senegal, onde linhagens com perda de sensibilidade ao medicamento foram isoladas (FALLON et al., 1995; ISMAIL et al., 1999). Há relatos também de perda de sensibilidade do *S. mansoni* ao Oxaminiquine (ARAÚJO, 2010; VITORINO et al., 2012). Além do aparecimento de linhagens com perda de sensibilidade ao fármaco, tais medicamentos apresentam efeitos colaterais mutagênicos e teratogênicos. O Oxaminiquine apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BARBERATO, 1996). Já o Praziquantel, apesar da sua eficácia, apresenta relatos de reincidência e de aparecimento de linhagens com perda de sensibilidade (CAPRON, 1998; BERGQUIST, 1998; WILLIAN et al., 2001).

O tratamento em massa nas regiões endêmicas, com a utilização dos fármacos descritos, não se apresenta como muito efetiva, pois não previne a reinfeção e dificulta a erradicação da doença, se tornando necessária a repetição do tratamento de tempos em tempos. Somando-se a esses fatores a quimioterapia não reverte a patologia já instalada no organismo, considerando a dificuldade de diagnóstico da doença em seu estágio inicial devido à sintomatologia inespecífica (ROFATTO et al., 2011). Sendo assim, é notória a necessidade da busca por novas alternativas para melhor tratamento e controle da esquistossomose como a utilização de vacinas e desenvolvimento de novos fármacos que sejam efetivos na erradicação da doença (CAPRON, 1998; ROFATTO et al., 2011).

## 1.8 Medida de controle alternativa: Vacina

A vacinação ou imunização tem como finalidade apresentar antígenos ao organismo de maneira eficiente e controlada, para a produção de uma resposta imune específica que seja adequada e duradoura (BIANCHI, 2007). Além disso, a imunização constitui um dos meios mais eficazes no controle de patologias causadas por agentes infecciosos e é a estratégia de melhor custo-benefício. Essas características são importantes no caso da esquistossomose quando levamos em consideração as dificuldades políticas e econômicas dos países em desenvolvimento que impedem ou dificultam a implantação de saneamento básico, educação sanitária, tratamento específico e controle dos vetores, que seriam as medidas mais adequadas de controle (KATZ, 1999; O'HAGAN; VALIANTE, 2003). Além disso, a doença é de difícil diagnóstico por ser geralmente assintomática no início do desenvolvimento da infecção e, portanto, quando o medicamento é administrado, a patologia desenvolvida já é bastante significativa (WILSON; COULSON, 2006).

Somado aos fatores já descritos, estudos têm sugerido que as taxas de mortalidade e morbidade da doença são em grande parte subestimadas (VAN DER WERF et al., 2003; KING; DICKMAN; TISCH, 2005). Também é importante ressaltar que a quimioterapia com Praziquantel em dose única não é totalmente eficaz em todos os pacientes, além de não atuar contra os parasitas em desenvolvimento e não evitar a reinfeção (DOENHOFF et al., 1987). Dessa maneira, a imunização preventiva da esquistossomose impediria a infecção de pessoas que entram em contato com águas contaminadas e também a reinfeção, preveniria a evolução de linhagens resistentes ao tratamento com fármacos e protegeria contra a patologia, se apresentando não só como um instrumento de prevenção, mas também um instrumento complementar ao controle da doença (KATZ, 1999; ROFATTO et al., 2011).

O parasito causador da esquistossomose apresenta um complexo ciclo biológico além de possuir vários mecanismos de escape das defesas do hospedeiro, como a maior parte dos organismos que possuem vida parasitária obrigatória. Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina contra a doença se mostra um desafio para a ciência atual. Entretanto, diversos estudos e seus dados têm demonstrado a possibilidade plausível de uma vacina eficaz contra a esquistossomose: I - pessoas que vivem em áreas endêmicas desenvolvem diferentes níveis de proteção natural contra a infecção (BERGQUIST, 2002); II - diversos modelos animais da esquistossomose apresentam autocura através da resposta imune, como *Macaca mulatta* e *Rattus norvegicus* (REY, 2008; WILSON; COULSON, 2009); III - modelos animais diversos,

tanto roedores como primatas, apresentam altos níveis de proteção quando imunizados com cercárias atenuadas por irradiação (COULSON, 1997; HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005).

Ao analisar o fato de que o *S. mansoni* não se multiplica dentro do hospedeiro definitivo, a síntese de uma vacina que confere uma proteção de pelo menos 60% seria efetiva diminuindo a transmissão e a morbidade da doença (CAPRON; CAPRON, 1994; COULSON, 1997; TENDLER; SIMPSON, 2008).

Uma vacina ideal contra a esquistossomose, segundo Ribeiro de Jesus e colaboradores (2000) e Bergquist e colaboradores (2005), deve apresentar as seguintes características:

- Ser capaz de induzir altos índices de proteção (estimulando tanto o padrão de resposta do tipo Th1 quanto o Th2) e/ou reduzir fecundidade dos vermes e patologia;
- Ser facilmente produzida em larga escala;
- Ser segura para uso em humanos (não conduzindo a respostas imunopatológicas, como reação granulomatosa ou fibrose hepática);
- Ser facilmente incorporada aos programas de imunização.

Diversas imunizações foram realizadas ao longo da história com a utilização de microorganismos atenuados inativos ou com as toxinas que os mesmos produzem como fator de virulência. Entretanto, muitas dessas imunizações apresentaram efeitos adversos com a utilização em massa, o que incentivou a busca por imunizações mais efetivas e seguras. Assim sendo, as imunizações com microorganismos inteiros foram substituídas por antígenos purificados, ou até mesmo pela informação genética codificadora de antígenos relevantes do patógeno (O'HAGAN; RAPPOLI, 2004). Porém as imunizações feitas com antígenos purificados normalmente induzem uma resposta imunológica baixa e torna-se necessário o uso de adjuvantes para estimular adequadamente o sistema imune (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

Com a publicação do transcriptoma do *S. mansoni*, em 2003, juntamente com o sequenciamento de seu genoma completo, em 2009, houve um aumento significativo de informações sobre a composição gênica deste parasito, as quais proporcionaram uma melhor compreensão da biologia do mesmo e tornou possível o desenvolvimento de novos antígenos para vacinas ou alvos protéticos para novos fármacos (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003; BERRIMAN et al., 2009).

## 1.9 Metabolismo de purinas em *Schistosoma mansoni*

Os nucleotídeos são moléculas constituídas de um grupamento fosfato ligado a um açúcar (ribose ou desoxirribose), ao qual está ligada uma base nitrogenada púrica, adenina (A) ou guanina (G), ou pirimídica, citosina (C), timina (T) ou uracila (U) e desempenham várias funções importantes em todas as células de diversos organismos. Eles são precursores do DNA e do RNA, componentes dos co-fatores NAD, FAD, S-adenosilmetionina e coenzima A, bem como de intermediários biossintéticos ativados como a UDP-glicose e o CDP-diacilglicerol. Alguns, como o cAMP e o cGMP, também são mensageiros celulares secundários (LEHNINGER, 2006).

Há um total de nucleotídeos nas células que corresponde à aproximadamente 1% ou menos das quantidades requeridas para a síntese do DNA. Por isso a síntese de nucleotídeos deve ocorrer paralelamente à síntese de ácidos nucléicos, podendo esta última apresentar-se como um fator limitante aos processos celulares de replicação e transcrição (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008). Se considerarmos a importância que esses processos têm para as células que se encontram em processo de divisão, agentes que inibem a síntese de nucleotídeos se mostram de grande relevância para a medicina atual (ROMANELLO, 2011).

Existem dois tipos de vias que levam à síntese de nucleotídeos nos seres vivos: as vias *de novo* e as vias *de salvação*. As vias *de novo* para biossíntese de purinas e pirimidinas são muito semelhantes em praticamente todos os seres vivos e possuem como precursores metabólicos aminoácidos, ribose 5-fosfato, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>. As bases livres não são utilizadas como intermediárias pelas vias *de novo*, pois as bases são sintetizadas acopladas ao grupo 5-fosfo-ribose do nucleotídeo ao invés de serem sintetizadas previamente ao seu acoplamento à ribose. Já as vias *de salvação*, utilizam as bases livres e nucleosídeos liberados da quebra de ácidos nucléicos, requerendo, dessa maneira, menor quantidade de energia para a síntese de bases púricas. Os dois tipos de vias são importantes para o metabolismo celular (VOET; VOET, 2004; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Os nucleotídeos de purina são necessários em todos os organismos para sintetizar a molécula de DNA, RNA e outros metabólitos. Estima-se que um grama de *Schistosoma* tem um requerimento nove vezes maior de energia que um grama de tecido humano (EL KOUNI; MESSIER; CHA, 1987). Em seu trabalho sobre metabolismo de purinas em *S. mansoni*, Senft e colaboradores, mostraram uma grande dependência de um suprimento externo de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos e demonstraram, assim, a perda da *via* “*de*

*novo*” de síntese de purinas por parte do parasito (SENFTE et al., 1972). Esta evidência foi confirmada por Dovey e colaboradores, fato que demonstra a dependência exclusiva do *S. mansoni* pela *via de salvação* de purinas, sendo que alterações ou a perda da função das enzimas que participam dessa via representam o não funcionamento do metabolismo de nucleotídeos do mesmo (DOVEY; MCKERROW; WANG, 1984).

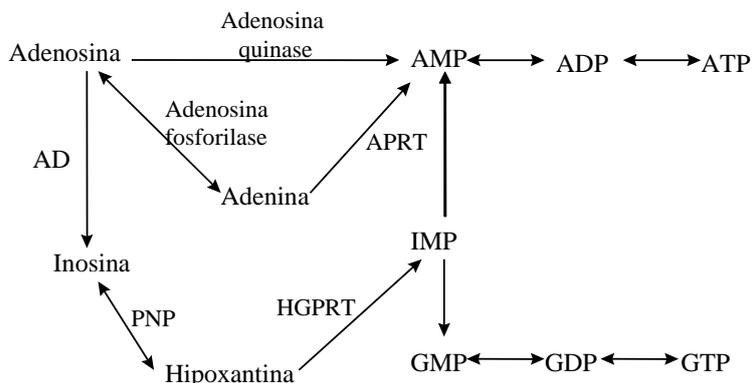
As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina ou resíduos de tirosina. A fosforilação desses resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas (SILVA et al., 2009).

Esse grupo das proteínas quinases forma a maior família de proteínas em eucariotos (MANNING et al., 2002) e é a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional (SILVA et al., 2009). Por isto, um detalhado entendimento do mecanismo de controle das proteínas quinases é foco de interesse de muitas pesquisas, principalmente para a descoberta de novos fármacos (ENGH; BOSSEMEYER, 2001), e nesse estudo em particular, para o desenvolvimento de vacina.

### **1.9.1 Adenosina Quinase (AK)**

A Adenosina Quinase é uma das enzimas centrais da via de salvação de purinas, sendo que a mesma catalisa a fosforilação de adenosina para adenosina monofosfato (AMP) utilizando ATP ou GTP como doadores de fosfato (ZHANG; EL KOUNI; EALICK, 2006). Senft e Crabtree (1977) esquematizaram as várias vias pelas quais a adenosina é convertida em nucleotídeos em *S. mansoni* e este esquema é mostrado na Figura 9.

**Figura 9 - Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em *S. mansoni*.**



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

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

A enzima Adenosina Quinase apresenta uma especificidade de substrato relativamente ampla, tolerando alterações no açúcar e base (MILLER et al., 1979). Sendo assim, vários medicamentos nucleosídeos antivirais e anticancerígenos desenvolvidos são substratos de AK (MATHEWS; ERION; EALICK, 1998).

As duas sequências codificantes para a enzima Adenosina Quinase, Smp\_008400 (SmAK1) e Smp\_008360 (SmAK2), possuem 79% de identidade sequencial. Quando comparadas ao homólogo humano as SmAK possuem cerca de 33% de identidade sequencial (ROMANELLO, 2011), como mostra a Figura 10.





ocupa o segundo lugar entre as doenças parasitárias tropicais mais comuns, perdendo apenas para a malária (REY, 2008; WHO, 2014). Nas áreas endêmicas as constantes reinfecções e a falta de saneamento fazem com que o número de casos da doença aumente ainda mais (BERGQUIST, 1998).

O Praziquantel, medicamento recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para o tratamento da doença, é eficaz contra as três principais espécies do gênero *Schistosoma* que afetam o homem e apresenta baixo custo e efeitos colaterais não muito significativos. Entretanto a taxa de cura da doença por meio da utilização de tal fármaco não é superior a 60% e dessa maneira uma considerável parcela dos indivíduos tratados podem permanecer infectados correndo risco de apresentar a doença na sua forma crônica (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013). Além disso, o parasito tem apresentado perda de sensibilidade a este medicamento usado para tratar a esquistossomose (COLES et al., 1986).

O desenvolvimento de uma vacina, em conjunto com o tratamento, seria uma forma promissora de combater e controlar a esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2008). Nos últimos anos, as análises de genômica e proteômica e a conclusão do sequenciamento do genoma do *S. mansoni* representam um grande impulso para as pesquisas de vacinas contra a doença (MCMANUS; LOUKAS, 2008; BERRIMAN et al. 2009).

Os antígenos encontrados na superfície do tegumento do parasito encabeçam a lista de estudos por alvos vacinais, entre eles está o antígeno conhecido como Sm29 que induziu proteção significativa contra a infecção em modelo murino (CARDOSO et al., 2008; FONSECA et al., 2012). Entretanto também os antígenos que não se encontram na superfície do tegumento têm apresentado resultados significativos de proteção contra a infecção, dentre eles o antígeno conhecido como Sm14, uma proteína de ligação de ácidos graxos, que se encontra em experimentação na fase I dos testes clínicos (TENDLER; ALMEIDA; SIMPSON, 2015; ClinicalTrials.gov).

Além disso, proteínas intracelulares associadas à função dos microtúbulos têm sido estudadas como possíveis candidatos vacinais (BICKLE et al., 2001; GITHUI et al., 2009), assim como proteínas “housekeeping” apesar da sua evidente origem intracelular (WILSON, 2012). Esses estudos se originam do fato de que o parasito apresenta intestino terminando em fundo cego e dessa forma a digestão no mesmo ocorre de maneira extracelular e os resíduos são expelidos para a corrente sanguínea do hospedeiro (WILSON, 2012). Essas moléculas expelidas pelo parasito (denominadas de ESP - Excreção e Secreção de Produtos) interagem com anticorpos específicos e outros efetores do sistema imune do hospedeiro e representam

um conjunto de alvos vacinais a serem pesquisados (DEAN, 1983; COULSON, 1997). Foram identificadas várias enzimas da *via de salvação* em extratos de *S. mansoni*, entre elas fosforibosiltransferases, quinases, difosfoquinases, desaminases e uma fosforilase (SENFTE et al., 1973).

No parasito protozoário *Toxoplasma gondii*, também dependente de maneira exclusiva da *via de salvação* de purinas assim como o *S. mansoni*, as enzimas Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Xantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HXGPRT) são enzimas chave dentro do metabolismo de purinas, pois fazem parte das duas vias disponíveis para a obtenção de substratos para os nucleotídeos Adenina e Guanina, tornando tais enzimas alvos atrativos para a terapia contra a toxoplasmose. Isso se deve ao retardo observado no crescimento do *T. gondii* quando os genes que codificam tais enzimas são inibidos (YU et al., 2009). A enzima HGPRT também se mostrou importante alvo para o desenvolvimento de fármacos contra a malária causada por *Plasmodium vivax*, devido ao parasito protozoário também depender exclusivamente da *via de salvação* de purinas, assim como o protozoário *T. gondii* e o helminto *S. mansoni* (KEOUGH et al., 2010).

Em nosso laboratório, estudos realizados recentemente demonstraram que, camundongos previamente imunizados com a enzima Adenosina Quinase (AK) e desafiados com cercárias de *Schistosoma mansoni* apresentaram redução de carga parasitária de 27,32%, além de interferir no pareamento da fêmea com o macho, quando comparado com os animais infectados e não imunizados (FATTORI, 2013). Também foram verificados níveis significantes na produção de anticorpos do tipo IgG1, demonstrando uma resposta com padrão Th2, após a imunização com a enzima AK, o que sugere uma atividade antiparasitária e imunogênica a partir da imunização com a mesma (FATTORI, 2013). Outros estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que, camundongos imunizados com a enzima Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e desafiados com cercárias de *S. mansoni* apresentaram redução de carga parasitária de 27% quando comparados com os animais infectados e não imunizados, além de uma significativa redução do número de ovos por grama de fezes (NERIS et al., 2013a). Também foi observado produção elevada de anticorpos do tipo IgE além de produção de anticorpos do tipo IgG2a, demonstrando uma resposta com padrão Th1 (NERIS et al., 2013b), sugerindo que a enzima HGPRT de *S. mansoni*, assim como a AK, apresentam-se como boas candidatas na busca por ferramentas que possam contribuir para o controle da esquistossomose.

Dessa forma, o presente trabalho teve como proposta avaliar a imunização conjunta com as enzimas Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) propondo um MIX com as duas enzimas, já que é conhecido que a enzima AK é capaz de induzir a produção de anticorpos do tipo IgG1, caracterizando um padrão de resposta Th2, e que a enzima HGPRT é capaz de induzir a produção de anticorpos do tipo IgG2a, caracterizando um padrão de resposta Th1. Visto que uma vacina eficaz contra a esquistossomose, segundo Ribeiro de Jesus e colaboradores (2000) e Bergquist e colaboradores (2005) deve apresentar como uma das principais características a capacidade de induzir altos índices de proteção, estimulando tanto o padrão de resposta do tipo Th1 quanto o Th2 e/ou reduzir a fecundidade dos vermes e sua fisiopatologia. Além disso, uma proposta vacinal para a esquistossomose utilizando múltiplos antígenos tem demonstrado maior eficácia quando comparada com a utilização de um único antígeno (EL RIDI et al., 2014).

A partir da imunização prévia com as enzimas AK e HGPRT, bem como do MIX (AK + HGPRT) a partir das referidas enzimas recombinantes de *S. mansoni*, e posterior desafio com cercárias deste parasito, foi proposto confirmar e aprofundar os dados já obtidos a partir da imunização com tais enzimas, além de avaliar, por meio do MIX, se existe um sinergismo entre as enzimas AK e HGPRT que possa melhorar os resultados da imunização. Para tal investigamos a produção de anticorpos e citocinas, para melhor compreensão da resposta imune humoral e inflamatória envolvida no controle do processo fisiopatológico no modelo da esquistossomose murina. E ainda avaliamos a carga parasitária pelo número de ovos nas fezes e vermes adultos recuperados, que é de grande importância para reduzir a transmissão da esquistossomose. Avaliamos a histopatologia da doença por meio de estudo do fígado dos animais para avaliação do processo granulomatoso e de fibrose. Sendo assim, o presente trabalho determinou os efeitos dessas imunizações nas respostas imunológicas celular e humoral, parasitológica e hepatohistológicas durante a esquistossomose mansônica experimental.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia da imunização com as enzimas recombinantes Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT), além do MIX (AK + HGPRT) das referidas enzimas de *Schistosoma mansoni* em animais previamente imunizados e desafiados com cercárias do parasito.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito anti-parasitário da imunização com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT), além do MIX (AK + HGPRT) em animais desafiados com cercárias do parasito, por meio da quantificação de ovos nas fezes e recuperação de vermes adultos;
- Analisar a resposta leucocitária no sangue e na cavidade peritoneal mediante a imunização prévia com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT), além do MIX (AK + HGPRT) em animais desafiados com cercárias do parasito;
- Avaliar a produção de anticorpos (IgG1 e IgE) e a dosagem de citocinas (IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$ ) mediante a imunização com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT), além do MIX (AK + HGPRT) em animais desafiados com cercárias do parasito;
- Avaliar por meio de lâminas histológicas, o processo inflamatório e formação de granulomas no fígado, além da observação de deposição de colágeno neste órgão, dos animais imunizados com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT), além do MIX (AK + HGPRT) e desafiados com cercárias do parasito.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

O delineamento experimental deste trabalho se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, sob parecer nº 3-024/2014 (anexo).

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmea da linhagem Balb/c, pesando entre 15 e 18 gramas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Esses animais apresentam o certificado *Specified Pathogen Free* - SPF, o que garante que os mesmos são livres de patógenos. Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP - UFSCar), com livre acesso à água e ração para roedores.

#### **3.2 Obtenção das enzimas recombinantes Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) de *Schistosoma mansoni***

As enzimas recombinantes são provenientes de uma colaboração estabelecida com o Dr. Humberto D´Muniz Pereira, cujo projeto visa a obtenção das estruturas tridimensionais de todas as enzimas da Via de Salvação de Purinas e de Síntese de Pirimidinas do parasita *Schistosoma mansoni* através da técnica de Cristalografia por Difração de Raio-X. Sendo assim, as enzimas foram produzidas e purificadas no Laboratório de Cristalografia do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME) do Instituto de Física de São Carlos – IFSC, situado na Universidade de São Paulo – USP, São Carlos – SP.

As etapas de amplificação, clonagem do cDNA, estabelecimento das metodologias de expressão e purificação das enzimas foram realizadas previamente pela aluna de doutorado Larissa Romanello, que supervisionou a produção destas da forma descrita a seguir.

### **3.2.1 Expressão heteróloga da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni***

Para a expressão da AK2 de *S. mansoni* foram utilizados 4 L de meio de cultura 2XTY (10 g de extrato de levedura; 16 g de bacto triptona e 5 g de NaCl – para 1 L) suplementado com 30 µg/mL de kanamicina (antibiótico marcador). Foram então inoculados o volume de 20 mL, para cada litro de meio de cultura 2XTY, de uma cultura de bactérias recombinantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET28a e o gene da enzima AK2 de *S. mansoni*, previamente crescida por 16 horas.

Os frascos foram mantidos sob agitação (160 rpm) a 37°C até que a DO (Densidade Óptica) fosse igual ou superior a 0,5. Foram então adicionados 100 µM/mL de IPTG (indutor de transcrição) e as culturas foram mantidas nas mesmas condições por 4 horas.

O produto da expressão foi centrifugado por 40 minutos a 4000 rpm e a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi congelado a -20°C.

### **3.2.2 Expressão heteróloga da enzima HGPRT de *Schistosoma mansoni***

Para a expressão da HGPRT (Smp\_103560) de *S. mansoni* foram utilizados 1 L de meio de cultura Power Broth (específico para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e constituído por uma complexa mistura rica em aminoácidos, vitaminas e fonte de carbono) suplementado com 30 µg/mL de kanamicina. Foram então inoculados o volume de 20 mL de uma cultura de bactérias recombinantes de *E. coli* Lemo 21 (DE3) contendo o plasmídeo pOPINF e o gene da enzima HGPRT de *S. mansoni*, previamente crescida por 16 horas.

Os frascos foram mantidos sob agitação (160 rpm) a 37°C até que a DO fosse igual ou superior a 0,5. Foram então adicionados 100 µM/mL de IPTG e as culturas foram mantidas a 20°C sob agitação (150 rpm) por 16 horas.

O produto da expressão foi centrifugado por 40 minutos a 4000 rpm e a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi congelado a -20°C.

### **3.2.3 Purificação da enzima AK2 de *Schistosoma mansoni***

A técnica utilizada para a purificação das enzimas AK2 e HGPRT foi a cromatografia de afinidade. Tanto o vetor pET28a quanto o pOPINF codificam a inserção de uma sequência

de 6 histidinas na região N-terminal das proteínas expressas conferindo às mesmas afinidade pelos íons níquel ou cobalto.

Para a purificação da AK2, primeiramente foi preparada a coluna de níquel. Após a sedimentação da resina na coluna, a mesma foi lavada com 10 volumes de coluna (50 mL) de água ultrapura para a retirada do etanol (utilizado para o armazenamento da coluna) e foi equilibrada com 10 volumes de coluna (50 mL) de tampão de lise (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em pH 7,8; 300 mM de NaCl; 10 mM de imidazol; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ ). Em seguida, o precipitado que havia sido armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  foi ressuspensionado em 50 mL de tampão de lise e posteriormente as bactérias (tubos mantidos em gelo) foram lisadas em sonicador utilizando-se a programação de 6 pulsos de duração de 1 minuto e descanso de 30 segundos entre cada pulso. Após a sonicação, o produto foi centrifugado por 40 minutos a 14000 rpm e a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante (extrato bruto) foi aplicado na coluna e o eluato (primeira passagem do sobrenadante) foi coletado.

A coluna foi então lavada com 10 volumes de coluna (50 mL) de tampão de lavagem (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de NaCl; 20 mM de imidazol; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,8) e o lavado foi coletado.

Para a eluição da enzima ligada à coluna foram utilizados 5 volumes de coluna (30 mL) de tampão de eluição (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de NaCl; 200 mM de imidazol; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,8) e a eluição (contém a enzima) foi coletada.

### **3.2.4 Purificação da enzima HGPRT de *Schistosoma mansoni***

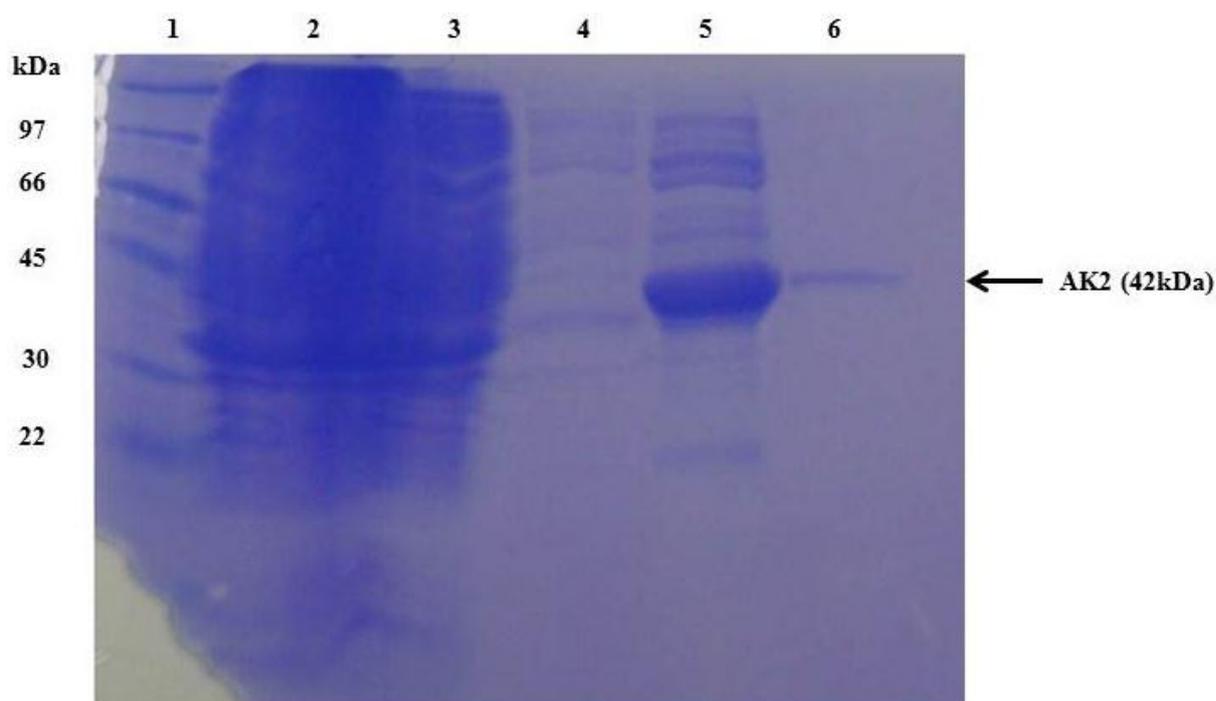
Para a purificação da HGPRT foi utilizada a coluna de cobalto. Após a sedimentação da resina na coluna, a mesma foi lavada com 10 volumes de coluna (50 mL) de água ultrapura para a retirada do etanol e foi equilibrada com 10 volumes de coluna (50 mL) de tampão de lise (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em pH 7,4; 300 mM de NaCl; 10 mM de imidazol; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ ). Em seguida, o precipitado que havia sido armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  foi ressuspensionado em 50 mL de tampão de lise e posteriormente as bactérias (tubos mantidos em gelo) foram lisadas em sonicador utilizando-se a programação de 6 pulsos de duração de 1 minuto e descanso de 30 segundos entre cada pulso. Após a sonicação, o produto foi centrifugado por 40 minutos a 14000 rpm e a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante (extrato bruto) foi aplicado na coluna e o eluato foi coletado.

A coluna foi então lavada com 10 volumes de coluna (50 mL) de tampão de lavagem (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de  $\text{NaCl}$ ; 20 mM de imidazol; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4) e o lavado foi coletado.

Para a eluição da enzima ligada à coluna foram utilizados 5 volumes de coluna (30 mL) de tampão de eluição (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de  $\text{NaCl}$ ; 200 mM de imidazol; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4) e a eluição (contém a enzima) foi coletada.

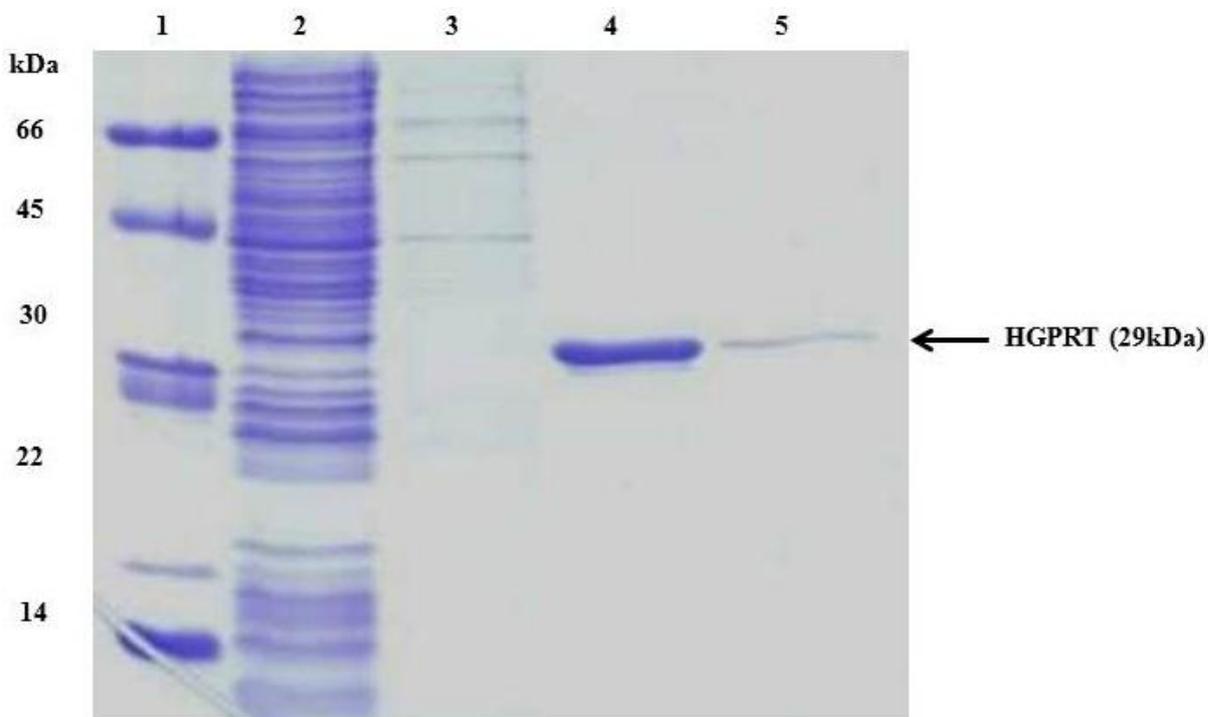
O eluato, o lavado e a eluição de ambas as enzimas foram visualizadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado por Coomassie Blue, como mostram as Figuras 12 e 13.

**Figura 12 - Análise da purificação da AK2 em gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie Blue.**



Poço 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Extrato bruto; 3 – Extrato bruto após a cromatografia em coluna de níquel; 4 – Lavagem da coluna; 5 e 6 – Frações da AK2 purificadas da coluna de níquel.  
Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 13 - Análise da purificação da HGPRT em gel de poliacrilamida 15% corado com Comassie Blue.**



Poço 1 - Marcador de peso molecular; 2 - Extrato bruto após a cromatografia em coluna de cobalto; 3 - Lavagem da coluna; 4 e 5 - Frações da HGPRT purificadas da coluna de cobalto.

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

Após a purificação de ambas as enzimas, AK2 e HGPRT, as mesmas foram dialisadas para a retirada do imidazol com tampão de diálise (20 mM de Tris; 200 mM de NaCl; 10 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol; 1 mM de  $MgCl_2$  e 5% de glicerol, pH 7,8 para a AK2 e 20 mM de Tris; 200 mM de KCl; 5 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol e 500  $\mu M$  de  $MgCl_2$ , pH 7,4 para a HGPRT). Ao final da diálise, as enzimas foram concentradas utilizando-se um *Centricon* (30kDa para AK2 e 10kDa para HGPRT) a 3500 rpm e a 4°C por 30 minutos.

Para a quantificação das enzimas foi utilizado o equipamento NanoDrop (280 nm), obtendo-se como resultado as seguintes concentrações: AK2 – 4,52 mg/mL e HGPRT – 8 mg/mL.

### 3.3 Protocolo de imunização e delineamento experimental

Figura 14 - Protocolo de imunização e delineamento experimental.



Os animais foram imunizados em 3 doses com intervalos de 15 dias entre as mesmas. Após 15 dias da última imunização foi realizada a infecção (desafio). No 47º dia após a infecção realizou-se a quantificação de ovos nas fezes por meio do método de Kato Katz. Finalmente no 48º dia após a infecção realizou-se a eutanásia dos animais para avaliação da resposta leucocitária, carga parasitária, produção de anticorpos e citocinas, bem como avaliação histológica do fígado.

Fonte: Elaborado pela autora

### 3.4 Imunização dos animais

Foram realizados dois experimentos independentes e, em ambos, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, cada um com 6 animais: grupo controle (C), não imunizado e não infectado; grupo infectado (I), não imunizado e infectado; grupo AK, imunizado com a enzima AK e posteriormente infectado; grupo HGPRT, imunizado com a enzima HGPRT e posteriormente infectado e grupo MIX (AK + HGPRT), imunizado com a enzima AK e com a enzima HGPRT e posteriormente infectado. A imunização foi realizada seguindo um protocolo de três doses, com intervalos de 15 dias entre as doses.

O grupo AK e o grupo HGPRT foram imunizados intraperitonealmente (Figura 15) no dia 0 com 100 µg da respectiva enzima (AK2 ou HGPRT – Smp\_103560) emulsificada em 100 µg de adjuvante Hidróxido de Alumínio e solubilizada em PBS 1X estéril, totalizando 200 µL de solução por animal, o que corresponde à primeira dose. No 15º dia após a 1ª imunização os animais receberam intraperitonealmente o primeiro reforço com 50 µg da respectiva enzima (AK2 ou HGPRT – Smp\_103560) emulsificada em 50 µg de adjuvante Hidróxido de Alumínio e solubilizada em PBS 1X estéril, totalizando 200 µL de solução por animal, o que corresponde à segunda dose. No 30º dia após a 1ª imunização e conseqüentemente 15 dias após a segunda dose, os animais receberam intraperitonealmente o segundo reforço, que procedeu da mesma maneira que o primeiro (50 µg da respectiva enzima emulsificada em 50 µg de adjuvante Hidróxido de Alumínio).

O grupo MIX (AK + HGPRT) foi imunizado intraperitonealmente no dia 0 com 50 µg da enzima AK2 e 50 µg da enzima HGPRT – Smp\_103560 (100 µg de enzima) emulsificadas em 100 µg de adjuvante Hidróxido de Alumínio e solubilizada em PBS 1X estéril, totalizando 200 µL de solução por animal, o que corresponde à primeira dose. No 15º dia após a 1ª imunização os animais receberam intraperitonealmente o primeiro reforço com 25 µg da enzima AK2 e 25 µg da enzima HGPRT – Smp\_103560 (50 µg de enzima) emulsificadas em 50 µg de adjuvante Hidróxido de Alumínio e solubilizada em PBS 1X estéril, totalizando 200 µL de solução por animal, o que corresponde à segunda dose. No 30º dia após a 1ª imunização e conseqüentemente 15 dias após a segunda dose, os animais receberam intraperitonealmente o segundo reforço, que procedeu da mesma maneira que o primeiro (25 µg da enzima AK2 e 25 µg da enzima HGPRT - 50 µg de enzima - emulsificadas em 50 µg de adjuvante Hidróxido de Alumínio).

Os grupos controle (C) e infectado (I) receberam o adjuvante Hidróxido de Alumínio, na mesma dosagem que os grupos imunizados, solubilizado em PBS 1X estéril, sendo aplicado intraperitonealmente 200 µL de solução por animal.

### **Figura 15 - Aplicação intraperitoneal.**



Fonte: Arquivo pessoal

### **3.5 Infecção dos animais com as larvas infectantes do *S. mansoni***

Após 15 dias da última imunização, ou seja, no 45º dia após a 1ª imunização, os animais do grupo infectado (I), do grupo AK, do grupo HGPRT e do grupo MIX (AK + HGPRT) foram desafiados por meio da infecção com 80 cercárias de *S. mansoni* por animal.

As larvas infectantes (cercárias) da cepa BH (Belo Horizonte – MG, Brasil) foram gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Silmara Marques Allegretti, do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP. As referidas larvas foram coletadas após a expulsão das mesmas, pelos hospedeiros intermediários, caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com o *S. mansoni*, mantidos no Moluscário da mesma instituição, sendo a infecção supervisionada pela aluna de doutorado Rosimeire Nunes de Oliveira.

Os animais foram infectados, por via natural ou infecção por imersão caudal (Figura 16), descrita por Oliver e Stirewalt (1952). Após a coleta das cercárias expelidas, as mesmas foram contadas com auxílio de lupa estereoscópica, de modo que se obteve 80 cercárias por tubo. Então, cada animal teve sua cauda imersa no tubo contendo as cercárias por 2 horas, na presença de luz e temperatura de aproximadamente 28°C.

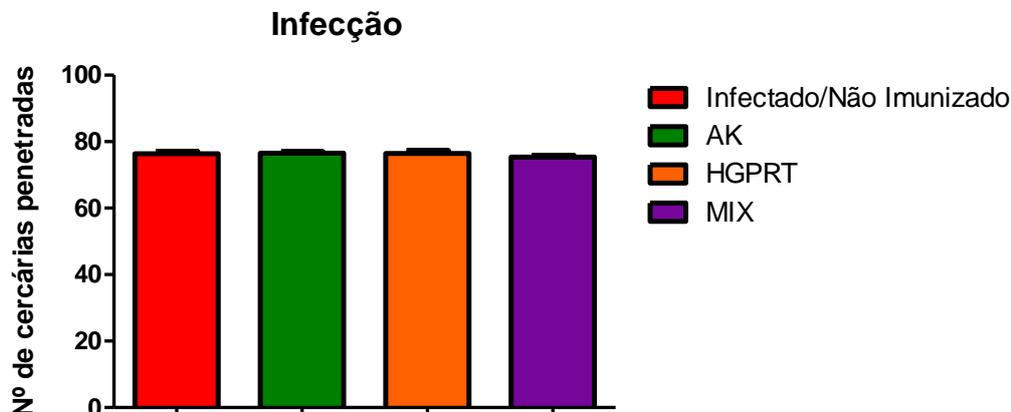
#### **Figura 16 - Infecção por imersão caudal**



Fonte: Arquivo pessoal

Ao final de 2 horas, os tubos que continham as cercárias foram analisados novamente em lupa estereoscópica e as cercárias não penetradas foram novamente contadas para se obter o número exato de cercárias penetradas em cada animal e também avaliar a eficiência do processo de infecção (Figura 17), garantindo a homogeneidade entre os grupos experimentais.

**Figura 17 - Demonstrativo da eficiência da infecção por imersão caudal.**



Número de cercárias penetradas por animal. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes ( $n = 11-12$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, utilizando o teste *One-way ANOVA* e o pós-teste de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora

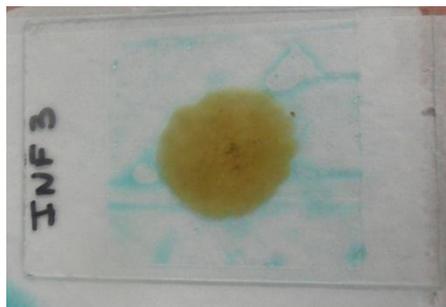
### **3.6 Contagem de ovos nas fezes**

Os animais foram avaliados quanto à eliminação de ovos nas fezes pelo método quantitativo Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) através do HELM TESTE – Bio-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), recomendado pela Organização Mundial da Saúde.

As fezes frescas dos animais foram coletadas no 47º dia após a infecção, sendo que para a coleta os mesmos foram dispostos em caixas individuais. Primeiramente as fezes passaram por uma tela, que além de concentrar o material, retém detritos que possam dificultar ou impedir a visualização dos ovos. Em seguida, foram colocadas em uma placa perfurada, com orifício central de diâmetro conhecido, sobre uma lâmina de vidro, para que a quantidade de fezes analisada fosse sempre a mesma, permitindo a padronização das amostras.

Posteriormente foi colocada sobre a amostra uma lamínula de celofane pré-colorida em solução diafanizadora e fixadora, contendo verde-malaquita, para conservar os ovos e tornar o esfregão transparente (Figura 18). Após 1 hora, a leitura das lâminas para contagem do número de ovos foi realizada em microscópio óptico.

**Figura 18 - Lâmina para quantificação de ovos nas fezes.**



Fonte: Arquivo pessoal

Para a obtenção do número de ovos por grama de fezes é necessário utilizar a fórmula abaixo descrita, padronizada pelo HELM TESTE e que leva em consideração o diâmetro do orifício central da placa perfurada.

$$\text{N}^\circ \text{ de ovos/g de fezes} = \text{N}^\circ \text{ de ovos encontrados na lâmina} \times 24$$

No 48º dia após a infecção realizou-se a eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub>, para obtenção das amostras para avaliação da resposta leucocitária, carga parasitária, produção de anticorpos e citocinas, bem como avaliação histológica do fígado.

### **3.7 Avaliação celular**

#### **3.7.1 Obtenção dos leucócitos do sangue e do lavado da cavidade peritoneal (LCP)**

O sangue dos animais foi obtido por meio de punção da veia braquial esquerda, utilizando-se EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante na concentração final de aproximadamente 0,3M.

Para a realização da lavagem da cavidade peritoneal (LCP) foram utilizados 3 mL de PBS 1X, pH 7,4, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS Citrato). A solução foi injetada no peritônio do animal com auxílio de seringa e agulha, homogeneizou-se a região e posteriormente as células da região peritoneal foram recuperadas na seringa (em torno de 3 mL).

### 3.7.2 Contagem dos leucócitos do sangue e do lavado da cavidade peritoneal (LCP)

Para a contagem do número global de leucócitos, as amostras (sangue e LCP) foram diluídas (1:20) em solução de Turk (ácido acético 3% e azul de metileno 1%) que tem a função de lisar as hemáceas e conservar apenas os leucócitos. A contagem global foi realizada em câmara de Neubauer, sendo que os leucócitos foram contados nos 4 quadrantes da câmara, obtendo-se o número de leucócitos por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>) de sangue ou LCP.

Na contagem diferencial dos leucócitos do sangue foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo e para LCP foram feitas lâminas em citocentrífuga. As lâminas de ambas as amostras foram coradas com o corante Panótico Rápido (Laborclin) que consiste em um conjunto para coloração rápida que se baseia no princípio de coloração estabelecida por Romanowsky, atuando em 15 segundos (manual do fabricante). Em cada lâmina foram contadas 100 células através da microscopia de luz, com aumento final de 1000X.

### 3.8 Avaliação da carga parasitária: recuperação de vermes adultos

Para avaliar a eficácia da estratégia imunogênica proposta, os vermes adultos foram recuperados dos camundongos através da perfusão do sistema porta-hepático e veias mesentéricas (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956). A porcentagem (%) de redução da carga parasitária foi calculada pela comparação entre a média de vermes recuperados em cada grupo experimental e o respectivo controle (grupo infectado/não imunizado), de acordo com a seguinte fórmula (DELGADO et al., 1992):

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

Onde, RCP é a redução da carga parasitária, RGC é a recuperação no grupo controle (grupo infectado/não imunizado) e RGE é a recuperação no grupo experimental (grupos imunizados).

### 3.9 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

#### 3.9.1 Obtenção do plasma dos animais

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

#### 3.9.2 Detecção de anticorpos – ELISA indireto

A partir do plasma total dos animais foi realizada a pesquisa de anticorpos por ELISA Indireto (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático), onde os antígenos fixados (enzimas analisadas) estimularam a ligação com os possíveis anticorpos presentes no plasma dos camundongos, que posteriormente foram detectados por conjugados específicos contra os possíveis anticorpos presentes neste plasma, sendo feita a detecção de anticorpos do tipo IgG1 (anti-Mouse IgG1 Antibody HRP Conjugated, Bethyl Laboratories, Inc.) e IgE (*Kit OptEIA*<sup>TM</sup>, BD Biosciences), seguindo o protocolo abaixo descrito.

Foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços (Corning<sup>®</sup> Costar 3590) sendo aplicados 8  $\mu\text{g}$ /poço da enzima analisada (AK, HGPRT e MIX) e também PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*), que corresponde ao antígeno, diluída em tampão carbonato 0,1 M - pH 9,5, totalizando 100  $\mu\text{L}$ /poço, para sensibilização das placas por 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A quantidade de proteína aplicada por poço foi estabelecida mediante padronização anterior realizada em nosso laboratório. O extrato contendo as proteínas totais de *S. mansoni* (PTS) foi obtido a partir de cerca de 150 vermes adultos de *S. mansoni* (cepa BH), recuperados de camundongos Balb/c infectados, através da perfusão do sistema porta-hepático e veias mesentéricas. A extração das proteínas foi realizada pelo reagente TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a quantificação do extrato protéico foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Após a sensibilização, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300  $\mu\text{L}$ /poço de PBS 1X + Tween 20 à 0,05%, pH 7,4 (solução de lavagem). Posteriormente à lavagem foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$ /poço de solução bloqueio (PBS 1X + BSA – *Bovine Serum Albumin*, Albumina de Soro Bovino 1%) e as placas foram incubadas por 1 hora. Após este período foi

realizada, novamente, a lavagem das placas, por 5 vezes, com a solução de lavagem. Então foi realizada a aplicação das amostras nas placas, sendo aplicados 100 µL/poço do *pool* do plasma dos camundongos em quintuplicatas para os grupos Controle e Infectado/ Não Imunizado e em septuplicatas para os grupos imunizados AK, HGPRT e MIX, sendo que o mesmo foi diluído em tampão carbonato, na proporção 1:10 e a placa foi incubada por 2 horas. A diluição das amostras foi estabelecida mediante padronização anterior também realizada em nosso laboratório.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes, com a solução de lavagem. Foi então preparado, ao abrigo de luz, o anticorpo secundário conjugado com enzima peroxidase diluindo-o em PBS 1X + BSA 1%, na proporção 1:10.000 para IgG1 e 1:500 para IgE, recomendada pelos respectivos fabricantes, e posteriormente foi aplicado 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos ao abrigo de luz. Após este período, as placas foram lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB (3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, por 15 minutos aproximadamente, quando a solução passou a apresentar uma coloração azul mais forte. Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N. Finalmente, a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pela leitora de placas de ELISA.

### **3.9.3 Dosagem de citocinas – ELISA direto**

Para a dosagem das citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  (*Kit* OptEIA™, BD Biosciences) e IL-13 (*Kit* DuoSet® ELISA, R&D Systems) foi realizado o ELISA direto seguindo o protocolo abaixo descrito.

Para este procedimento também foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços. Inicialmente foi realizada a sensibilização das placas com 100 µL/poço de solução contendo 80 µL do anticorpo monoclonal anti-citocina em 20 µL do tampão específico: para IL-4 e IFN- $\gamma$ , tampão carbonato 0,1 M - pH 9,5; para IL-10, tampão fosfato 0,2M - pH 6,5 e para IL-13, PBS 1X + BSA 1% - pH 7,2-7,4. As placas foram então incubadas por 12 horas a 4°C. Após este período foi realizada a lavagem das placas, por 3 vezes com 300 µL/poço de solução de lavagem descrita no item 3.9.2. Posteriormente à lavagem foram acrescentados 200 µL/poço de solução bloqueio (PBS 1X + BSA 1%) e as placas foram incubadas por 1 hora. Após este período foi realizada, novamente, a lavagem das

placas, por 5 vezes, com a solução de lavagem. Então foi realizada a aplicação da curva e das amostras nas placas, sendo aplicados 100 µL/poço do *pool* do plasma dos camundongos de cada grupo experimental em sextuplicatas, e as placas foram incubadas por 2 horas.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes, com a solução de lavagem. Foi então preparado, ao abrigo de luz, o anticorpo secundário e a enzima de detecção, diluindo-o em PBS 1X + BSA 1% na proporção recomendada pelos respectivos *kits*, e posteriormente foi aplicado 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos ao abrigo de luz. Após este período, as placas foram lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, de 15 a 30 minutos aproximadamente. Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N, e a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pela leitora de placas de ELISA, sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/mL.

### **3.10 Avaliação histológica do fígado**

O fígado de dois camundongos por grupo experimental foi removido no 48º dia após a infecção, sendo padronizado o animal 1 e 2 de cada grupo antes da realização da eutanásia (2 experimentos independentes: n = 4), para avaliação do processo inflamatório e formação de granulomas além da observação de deposição de colágeno neste órgão. Após a remoção, os órgãos foram lavados com PBS 1X e secos cuidadosamente em papel. Os mesmos foram então fixados em formol tamponado (4 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mL de formol e 900 mL de água destilada).

A confecção das lâminas histológicas foi realizada pela técnica Ana Maria da Rocha do Laboratório de Citopatologia, no Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Garcia Soares, sendo que fragmentos de cada órgão foram incluídos em blocos de parafina e seccionados em cortes de 4 µm. As lâminas foram coradas por dois tipos de colorações: Hematoxilina-Eosina (HE), para avaliação das células que compõem o tecido e também observação dos granulomas, e Tricômico de Masson, para avaliação da deposição de colágeno.

A leitura das lâminas foi realizada pelo médico patologista responsável pelo laboratório, Prof. Dr. Edson Garcia Soares, sendo realizada a contagem de granulomas e ovos presentes nos cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental.

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

### **3.11 Análise Estatística**

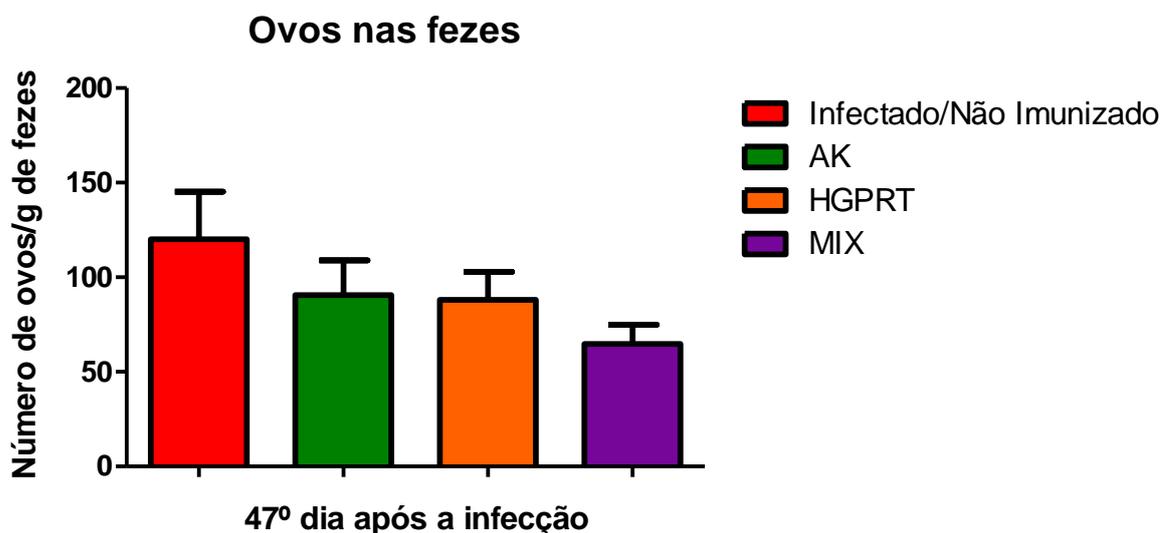
Os resultados foram expressos com média  $\pm$  EPM e analisados no programa *GraphPad Prism*, versão 5.01 – 2005 (San Diego, Califórnia, USA). Foi aplicado, para todos os dados obtidos, o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para os dados paramétricos foi utilizado o teste *One-way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

## 4- RESULTADOS

### 4.1 Contagem de ovos nas fezes

A Figura 19 mostra o número de ovos por grama de fezes, que foi determinado no 47º dia após a infecção, nos animais dos grupos experimentais: infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. As imunizações com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* e a posterior infecção com cercárias do parasito resultaram em uma diminuição do número de ovos eliminados nas fezes dos animais dos grupos AK, HGPRT e MIX quando comparados com o grupo infectado/não imunizado (Figura 19). E, embora não seja observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, houve redução que possivelmente contribuiu para um efeito biológico no controle do ciclo desse parasito (Figura 19). Os animais do grupo imunizado MIX foram os que apresentaram o menor número de ovos nas fezes quando comparados com os animais dos outros grupos imunizados (AK e HGPRT) e com o grupo infectado/não imunizado (Figura 19).

**Figura 19 - Número de ovos por grama de fezes no 47º dia após a infecção.**



Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborado pela autora

Na Tabela 1, estão representadas as médias  $\pm$  EPM do número de ovos por grama de fezes dos animais dos grupos experimentais, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, bem como suas respectivas porcentagens (%) de redução de ovos nas fezes calculada segundo Delgado et al., 1992. Observa-se que, os animais de todos os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) e posteriormente desafiados com cercárias do parasito apresentaram redução do número de ovos nas fezes quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 19, Tabela 1). Dentre os grupos imunizados, o grupo que apresentou maior porcentagem de redução de ovos nas fezes foi o grupo MIX, com 46% (Tabela 1).

**Tabela 1 - Número de ovos por grama de fezes dos animais e porcentagem de redução de ovos no 47º dia após a infecção.**

Grupos Experimentais	Ovos/g de fezes	Redução (%)
Infectado/ Não Imunizado	120 $\pm$ 25,3	-
AK	90,6 $\pm$ 18,2	24,5
HGPRT	88 $\pm$ 14,9	26,6
MIX	64,8 $\pm$ 10,1	46

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

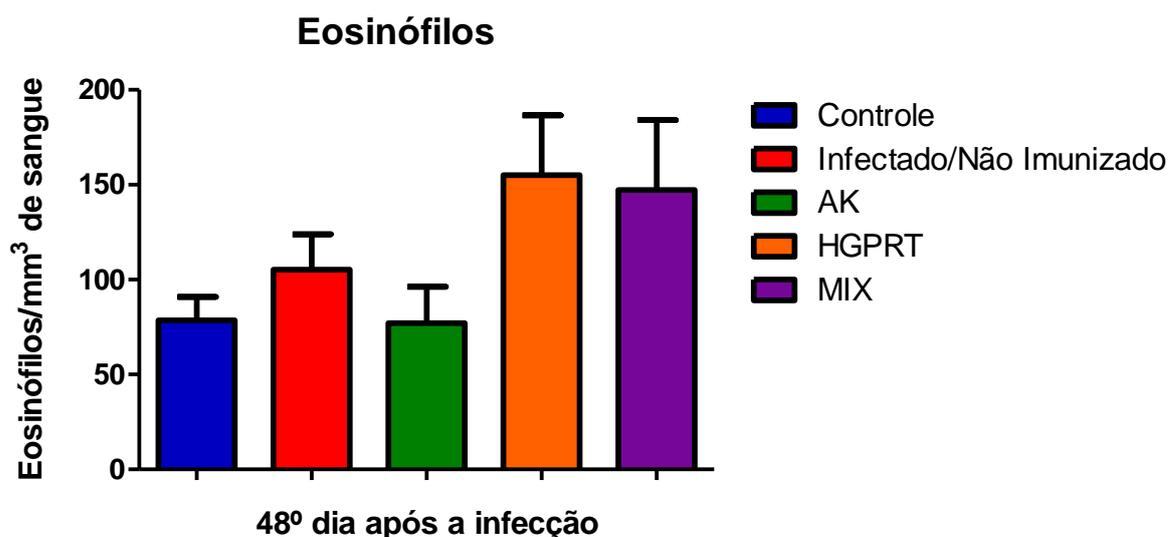
## 4.2 Avaliação celular

### 4.2.1 Contagem diferencial de eosinófilos no sangue no 48º dia após a infecção

A Figura 20 mostra o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> de sangue, no 48º dia após a infecção, nos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. Os animais do grupo controle, não imunizado e não infectado, apresentaram menor quantidade de eosinófilos no sangue quando comparados aos do grupo infectado/não imunizado e imunizados HGPRT e MIX, e quantidade de eosinófilos no sangue semelhante ao grupo imunizado AK (Figura 20). Os animais do grupo infectado/não imunizado apresentaram maior número de eosinófilos no sangue quando comparados com os do grupo imunizado AK, porém esse número é menor quando comparados com os animais dos outros

grupos imunizados (HGPRT e MIX) (Figura 20). Já os animais dos grupos imunizados HGPRT e MIX são os que apresentaram o maior número de eosinófilos no sangue quando comparados com os do grupo imunizado AK e também em relação aos animais dos grupos controle e infectado/não imunizado. Entretanto, não é observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

**Figura 20 - Número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> de sangue no 48º dia após a infecção.**



Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

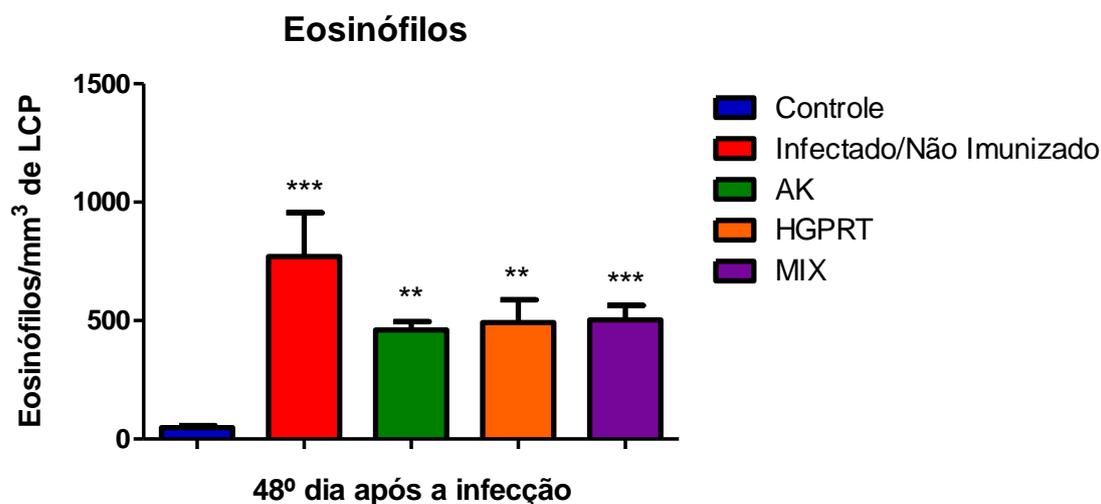
Fonte: Elaborado pela autora

#### **4.2.2 Contagem diferencial de eosinófilos no lavado da cavidade peritoneal no 48º dia após a infecção**

A Figura 21 mostra o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> do lavado da cavidade peritoneal (LCP), no 48º dia após a infecção, nos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. Os animais do grupo controle, não imunizado e não infectado, apresentaram quantidade significativamente menor de eosinófilos no lavado da cavidade peritoneal quando comparados aos do grupo infectado/não imunizado e imunizados AK, HGPRT e MIX (Figura 21). Os animais do grupo infectado/não imunizado apresentaram maior número de eosinófilos no LCP quando comparados com os animais dos grupos imunizados (AK, HGPRT e MIX) (Figura 21), embora não seja observada diferença estatisticamente significativa entre tais grupos. Os animais do grupo imunizado AK

apresentaram uma discreta diminuição do número de eosinófilos no LCP quando comparados com os do grupo também imunizado HGPRT, que por sua vez apresenta quantidade de eosinófilos no lavado da cavidade peritoneal semelhante aos animais do grupo imunizado MIX (Figura 21), não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos citados.

**Figura 21 - Número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> de lavado da cavidade peritoneal no 48º dia após a infecção.**



Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Os símbolos \*\* (p < 0,01) e \*\*\* (p < 0,001) representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectado/não imunizado e dos grupos imunizados e posteriormente infectados (AK, HGPRT e MIX) quando comparados ao grupo controle (não imunizado e não infectado).

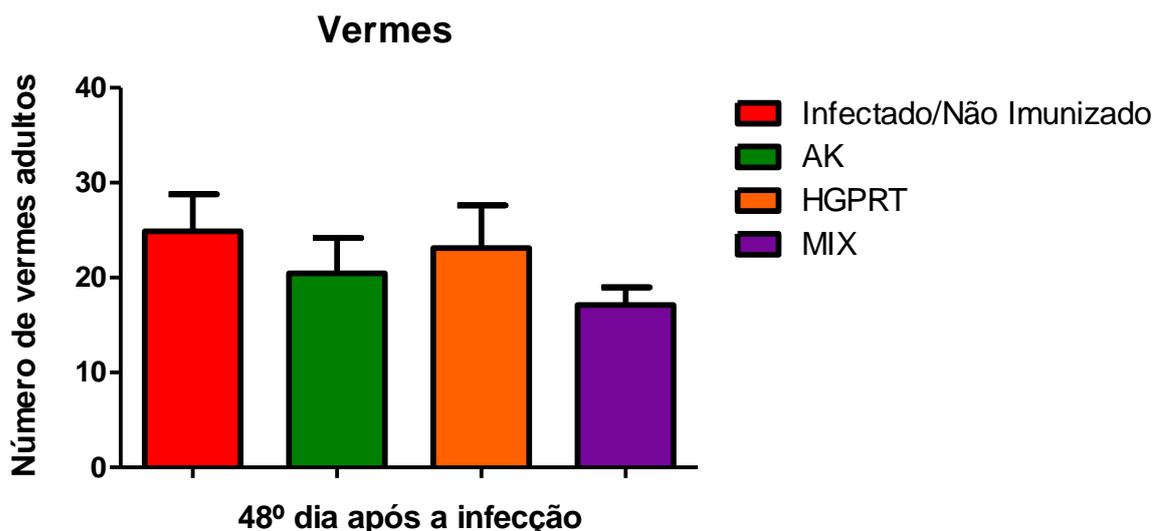
Fonte: Elaborado pela autora

### 4.3 Avaliação da carga parasitária: recuperação de vermes adultos

Na Figura 22 estão representados o número de vermes adultos recuperados por meio de perfusão do sistema porta hepático e veias mesentéricas dos animais dos grupos experimentais: infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. As imunizações com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* e a posterior infecção com cercárias do parasito resultaram em uma discreta diminuição do número de vermes adultos recuperados dos animais do grupo imunizado AK quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 22). Já os animais do grupo imunizado HGPRT apresentaram carga parasitária semelhante aos animais do grupo infectado/não imunizado e maior quando comparada aos demais imunizados (AK e MIX)

(Figura 22). Os animais do grupo imunizado MIX foram os que apresentaram menor carga parasitária quando comparados com os animais dos grupos imunizados AK e HGPRT e infectado/não imunizado (Figura 22), não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

**Figura 22 - Número de vermes adultos recuperados no 48º dia após a infecção.**



Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborado pela autora

Na Tabela 2, estão representadas as médias  $\pm$  EPM do número de vermes adultos recuperados dos animais de cada grupo experimental, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, bem como suas respectivas porcentagens (%) de redução de carga parasitária calculada segundo Delgado et al., 1992. Observa-se que, os animais de todos os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) e posteriormente infectados com cercárias do parasito apresentaram redução da carga parasitária quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 22, Tabela 2). Dentre os grupos imunizados, o grupo que apresentou maior porcentagem de redução de carga parasitária foi o grupo MIX, com 31,27% (Tabela 2).

**Tabela 2 - Número de vermes adultos recuperados dos animais e porcentagem de redução de carga parasitária no 48º dia após a infecção.**

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Vermes adultos</b>	<b>Redução (%)</b>
Infectado/ Não Imunizado	24,8 ± 3,9	-
AK	20,4 ± 3,7	17,84
HGPRT	23,1 ± 4,5	7,11
MIX	17,1 ± 1,9	31,27

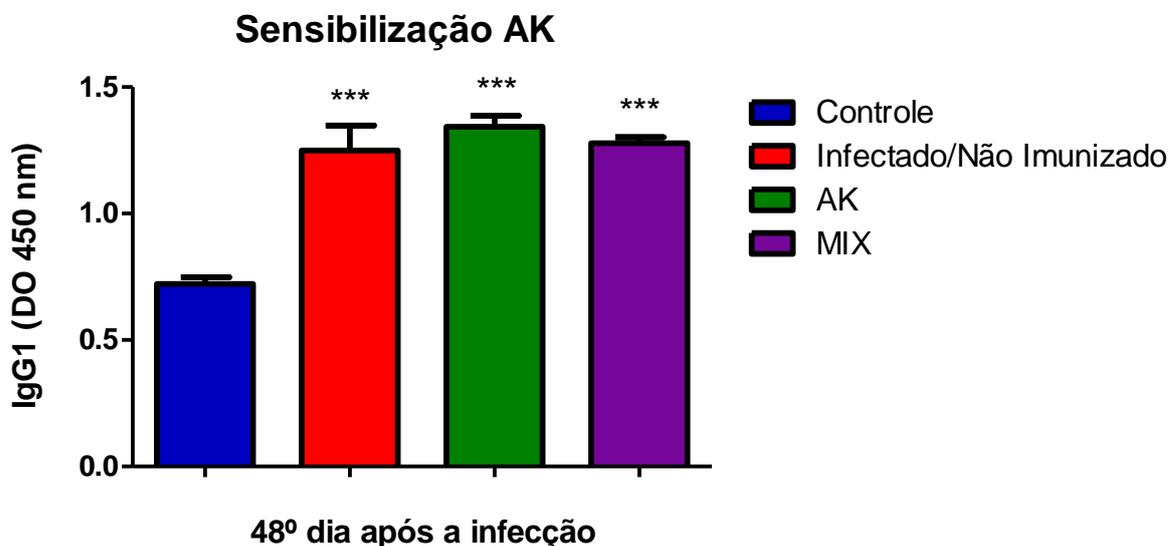
Os valores representam as médias ± EPM de dois experimentos independentes.  
Fonte: Elaborada pela autora

#### **4.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG1**

##### **4.4.1 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com a enzima recombinante AK de *S. mansoni***

Na Figura 23 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG1 presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com a enzima recombinante AK de *S. mansoni*. É possível observar que, os animais do grupo infectado/não imunizado e dos grupos imunizados AK e MIX apresentaram aumento estatisticamente significativo na produção de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com a enzima recombinante AK (Figura 23). Os animais do grupo imunizado AK apresentaram discreto aumento na produção de anticorpos IgG1 quando comparados aos do grupo infectado/não imunizado e imunizado MIX (Figura 23), embora não haja diferença estatisticamente significativa entre tais grupos.

**Figura 23 - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização pela enzima recombinante AK.**



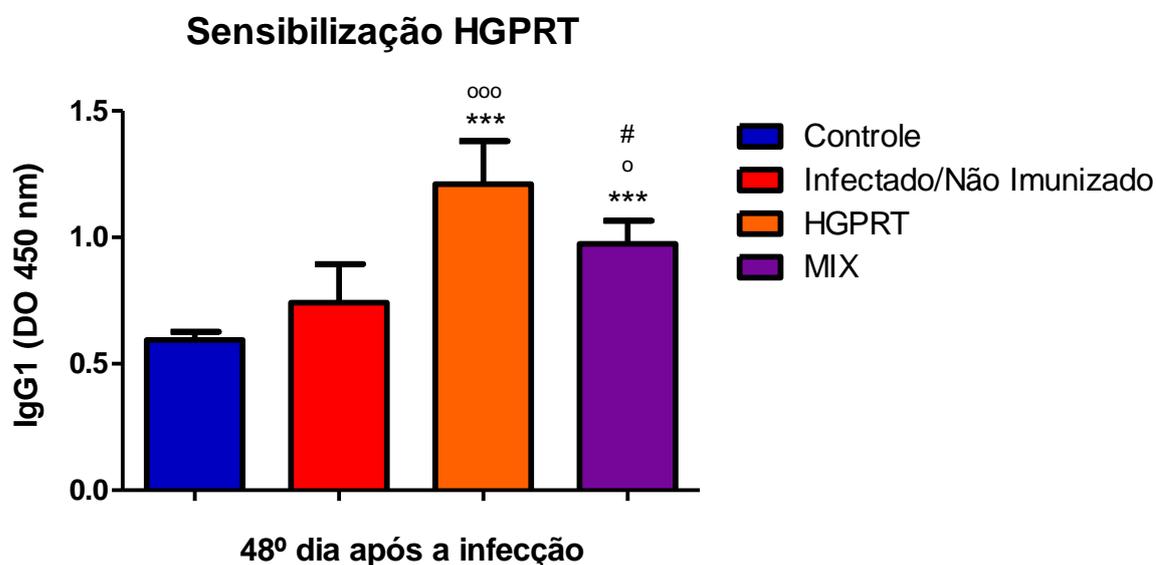
Detecção de anticorpos IgG1 no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço da enzima AK. Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). O símbolo \*\*\* (p < 0,001) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectado/não imunizado e dos grupos imunizados e posteriormente infectados (AK e MIX) quando comparados ao grupo controle (não imunizado e não infectado).

Fonte: Elaborado pela autora

#### **4.4.2 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni***

Na Figura 24 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG1 presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*. Os animais do grupo infectado/não imunizado apresentaram discreto aumento na produção de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com a enzima recombinante HGPRT (Figura 24), embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Os animais dos grupos imunizados HGPRT e MIX apresentaram significativamente mais anticorpos IgG1 quando comparados aos do grupo controle e infectado/não imunizado (Figura 24). Já os animais do grupo imunizado MIX apresentaram quantidade significativamente menor de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo imunizado HGPRT (Figura 24).

**Figura 24 - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT.**



Detecção de anticorpos IgG1 no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço da enzima HGPRT. Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). O símbolo \*\*\* (p < 0,001) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos imunizados e posteriormente infectados (HGPRT e MIX) quando comparados ao grupo controle (não imunizado e não infectado). Os símbolos ° (p < 0,05) e °°° (p < 0,001) representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos imunizados e posteriormente infectados (HGPRT e MIX) quando comparados ao grupo infectado/não imunizado. O símbolo # (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado MIX quando comparado ao grupo imunizado HGPRT.

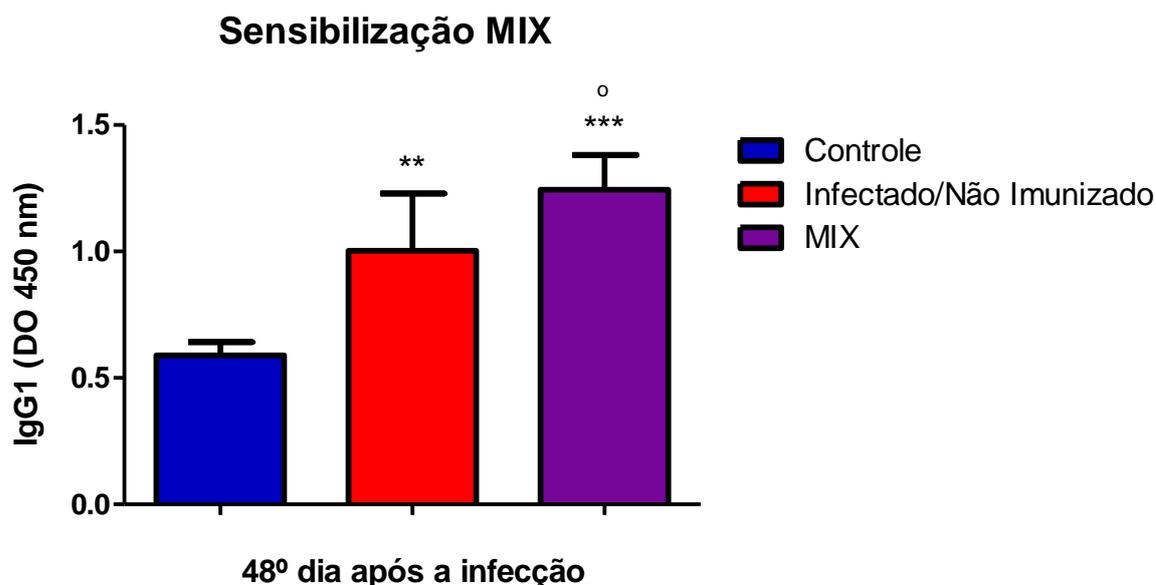
Fonte: Elaborado pela autora

#### **4.4.3 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com o MIX das enzimas recombinantes AK e HGPRT de *S. mansoni***

Na Figura 25 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG1 presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com o MIX das enzimas recombinantes AK e HGPRT de *S. mansoni*. É possível observar que, tanto os animais do grupo infectado/não imunizado quanto os do grupo imunizado MIX apresentaram aumento estatisticamente significativo na produção de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com o MIX (AK + HGPRT) (Figura 25). E os animais do grupo imunizado MIX apresentaram, por sua vez,

quantidade significativamente maior de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 25).

**Figura 25 - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes.**



Detecção de anticorpos IgG1 no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço do MIX de enzimas recombinantes (AK + HGPRT). Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Os símbolos \*\* (p < 0,01) e \*\*\* (p < 0,001) representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/não imunizado e do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparados ao grupo controle (não imunizado e não infectado). O símbolo ° (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado ao grupo infectado/não imunizado.

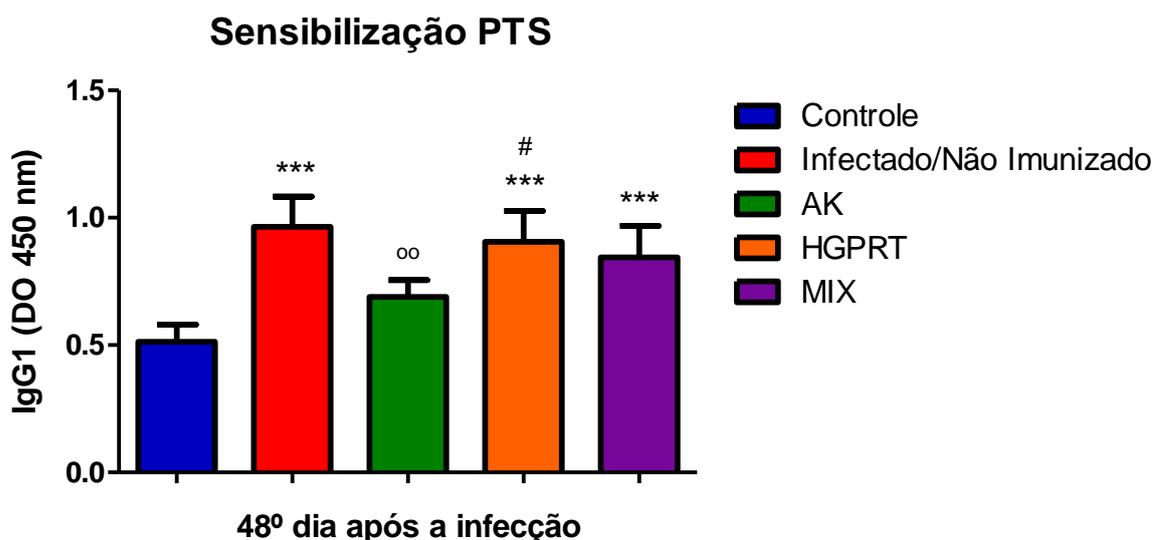
Fonte: Elaborado pela autora

#### **4.4.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 em placa sensibilizada com PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*)**

Na Figura 26 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgG1 presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*). Os animais do grupo infectado/não imunizado e dos grupos imunizados HGPRT e MIX apresentaram aumento estatisticamente significativo na produção de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com PTS (Figura 26). Já os animais do grupo imunizado AK

apresentaram discreto aumento na quantidade de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) (Figura 26), embora não se observe diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Entretanto, os animais do grupo imunizado AK apresentaram quantidade significativamente menor de anticorpos IgG1 quando comparados aos do grupo infectado/não imunizado (Figura 26). Os animais do grupo imunizado HGPRT apresentaram aumento significativo na quantidade de anticorpos IgG1 quando comparados com os do grupo imunizado AK (Figura 26). E ainda, esses mesmos animais apresentaram aumento discreto, embora sem diferença estatística, referente à quantidade de anticorpos IgG1 quando comparados com os animais do grupo imunizado com o MIX (Figura 26).

**Figura 26 - Detecção de anticorpos IgG1 após a sensibilização com PTS.**



Detecção de anticorpos IgG1 no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço de PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*). Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). O símbolo \*\*\* (p < 0,001) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/não imunizado e dos grupos imunizados e posteriormente infectados HGPRT e MIX quando comparados ao grupo controle (não imunizado e não infectado). O símbolo oo (p < 0,01) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado AK quando comparado ao grupo infectado/não imunizado. O símbolo # (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado HGPRT quando comparado ao grupo imunizado e posteriormente infectado AK.

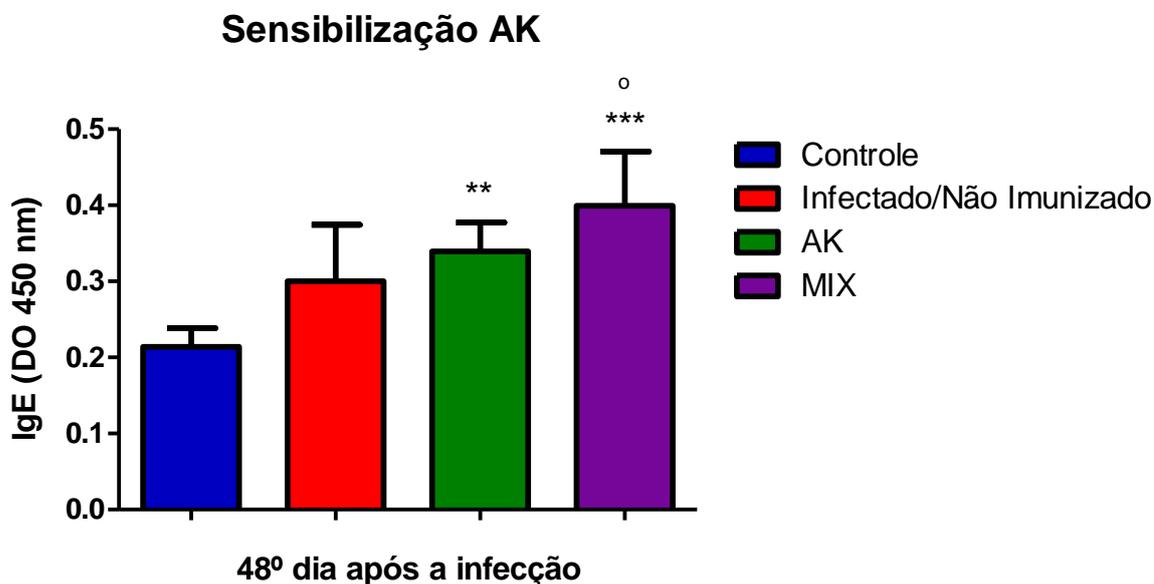
Fonte: Elaborado pela autora

## 4.5 Avaliação da produção de anticorpos IgE

### 4.5.1 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com a enzima recombinante AK de *S. mansoni*

Na Figura 27 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com a enzima recombinante AK de *S. mansoni*. É possível observar que, os animais do grupo infectado/não imunizado apresentaram aumento na produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com a enzima recombinante AK (Figura 27), embora não haja diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Já os animais dos grupos imunizados AK e MIX apresentaram quantidade significativamente maior de anticorpos IgE, quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) (Figura 27). Por sua vez, os animais do grupo imunizado MIX apresentaram quantidade significativamente maior de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 27).

**Figura 27 - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante AK.**



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço da enzima AK. Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Os símbolos \*\* (p < 0,01) e \*\*\* (p < 0,001) representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos imunizados e posteriormente infectados (AK e MIX) quando comparados ao grupo controle (não imunizado e não infectado). O símbolo ° (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado com o grupo infectado/não imunizado.

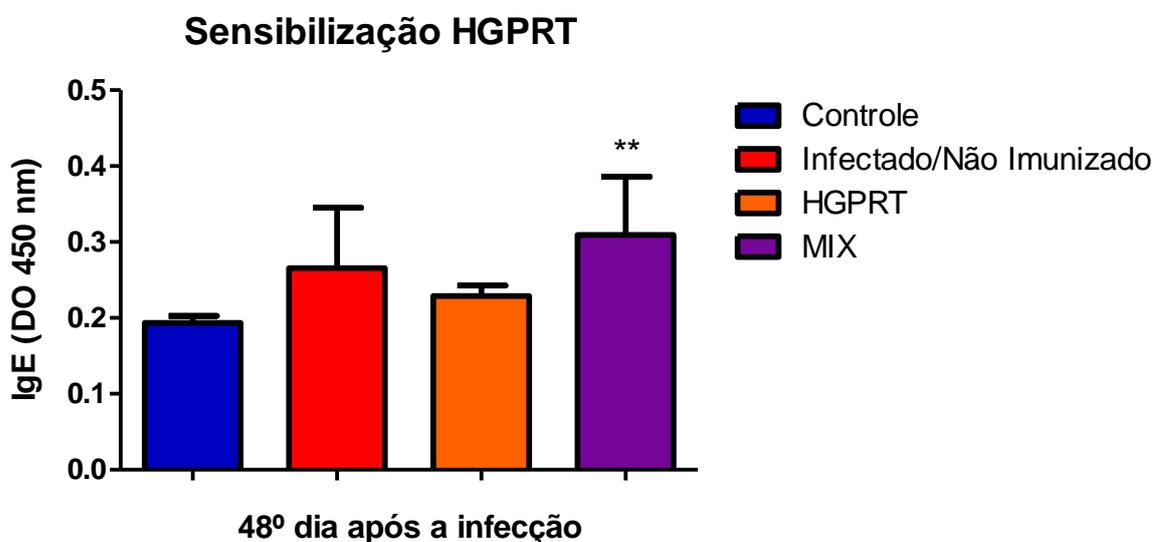
Fonte: Elaborado pela autora

#### **4.5.2 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni***

Na Figura 28 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni*. É possível observar que, os animais do grupo infectado/não imunizado e do grupo imunizado HGPRT apresentaram discreto aumento na produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com a enzima recombinante HGPRT (Figura 28), embora não seja observada diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Os animais do grupo imunizado HGPRT apresentaram discreta diminuição na quantidade de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado e imunizado MIX (Figura 28),

embora não haja diferença estatisticamente significativa entre tais grupos. Já os animais do grupo imunizado MIX foram os que apresentaram maior quantidade de anticorpos IgE quando comparados com os animais dos grupos controle, infectado/não imunizado e HGPRT (Figura 28), havendo diferença estatisticamente significativa somente quando o mesmo é comparado com o grupo controle (não imunizado e não infectado).

**Figura 28. Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pela enzima recombinante HGPRT.**



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8  $\mu\text{g}$ /poço da enzima HGPRT. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes ( $n = 10-12$ ). O símbolo \*\* ( $p < 0,01$ ) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado ao grupo controle (não imunizado e não infectado).

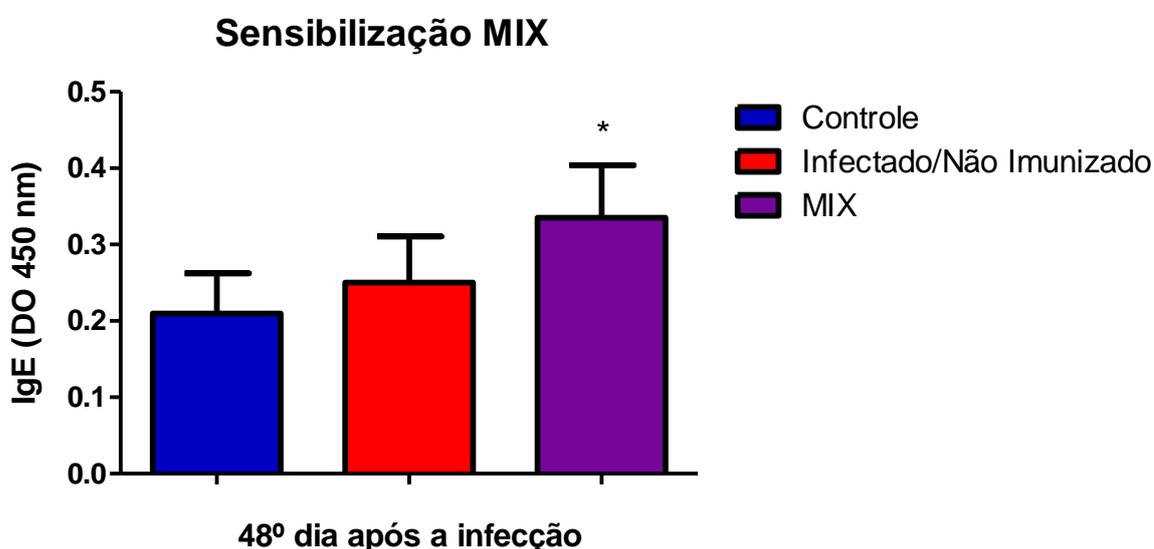
Fonte: Elaborado pela autora

#### **4.5.3 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com o MIX das enzimas recombinantes AK e HGPRT de *S. mansoni***

Na Figura 29 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com o MIX das enzimas recombinantes AK e HGPRT de *S. mansoni*. Observa-se que, os animais do grupo infectado/não imunizado apresentaram discreto aumento na produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após

sensibilização da placa com o MIX (AK + HGPRT) (Figura 29), embora não seja observada diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Os animais do grupo imunizado MIX apresentaram quantidade significativamente maior de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) (Figura 29). E esses mesmos animais tiveram aumento na produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 29), embora não haja diferença estatisticamente significativa entre esses grupos.

**Figura 29 - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização pelo MIX de enzimas recombinantes.**



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço do MIX de enzimas recombinantes (AK + HGPRT). Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). O símbolo \* ( $p < 0,05$ ) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado ao grupo controle (não imunizado e não infectado).

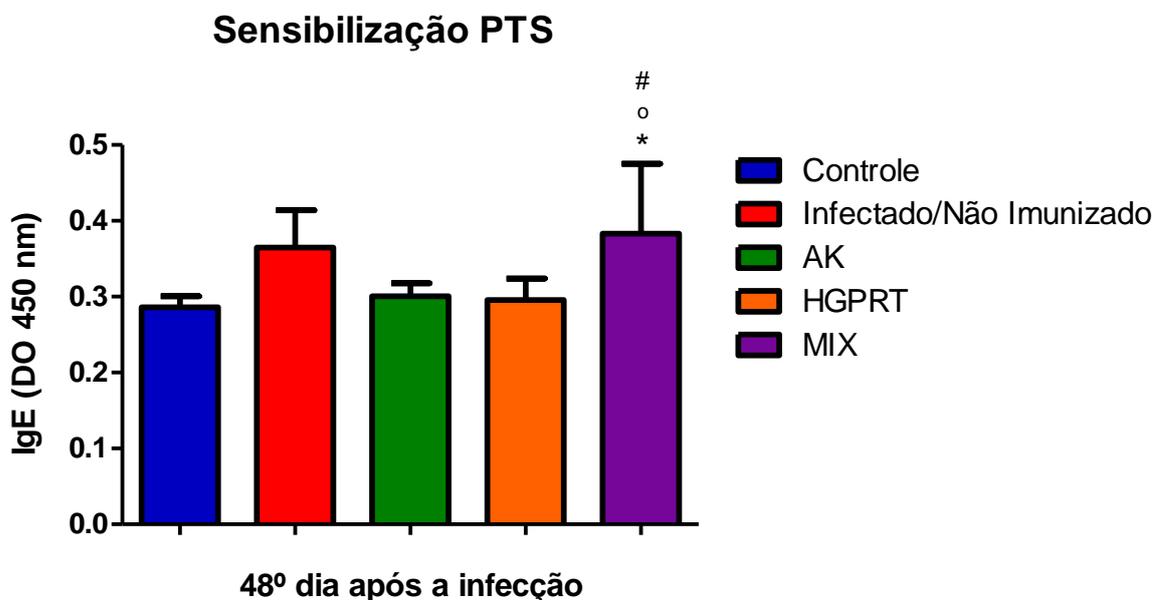
Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.5.4 Avaliação da produção de anticorpos IgE em placa sensibilizada com PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*)

Na Figura 30 estão representadas as densidades ópticas (DO – 450nm) de anticorpos IgE presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, após a sensibilização da placa com PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*). É possível observar que, os animais do grupo infectado/não imunizado

apresentaram aumento na produção de anticorpos IgE quando comparados com os do grupo controle (não imunizado e não infectado) após sensibilização da placa com PTS (Figura 30), embora não haja diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Os animais dos grupos imunizados AK e HGPRT apresentaram quantidades semelhantes de anticorpos IgE e diminuição dessa quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 30), não havendo diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Já os animais do grupo imunizado MIX apresentaram aumento significativo na produção de anticorpos IgE quando comparados aos do grupo controle (não imunizado e não infectado) e imunizados AK e HGPRT (Figura 30).

**Figura 30 - Detecção de anticorpos IgE após a sensibilização com PTS.**



Detecção de anticorpos IgE no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental após a sensibilização da placa com 8 µg/poço de PTS (Proteínas Totais de *S. mansoni*). Os dados representam a média ± EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). O símbolo \* (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado ao grupo controle (não imunizado e não infectado). O símbolo ° (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado ao grupo imunizado e posteriormente infectado AK. O símbolo # (p < 0,05) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo imunizado e posteriormente infectado MIX quando comparado ao grupo imunizado e posteriormente infectado HGPRT.

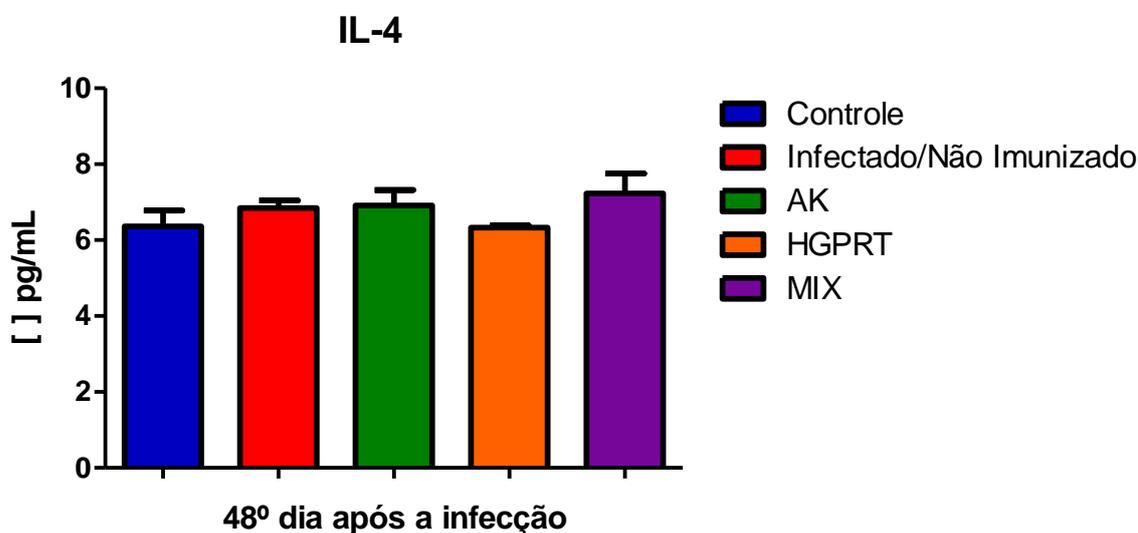
Fonte: Elaborado pela autora

## 4.6 Avaliação da dosagem de citocinas

### 4.6.1 Avaliação da dosagem da citocina IL-4 no plasma

Na Figura 31 estão representadas as concentrações da citocina IL-4, em pg/mL, presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. É possível observar que, embora não haja diferença significativa entre os grupos analisados, quando comparados aos animais do grupo controle (não imunizado e não infectado), os grupos infectado/não imunizado e os grupos imunizados AK e MIX apresentaram discreto aumento na concentração de IL-4 (Figura 31). Já os animais do grupo imunizado HGPRT apresentaram concentração semelhante de IL-4 aos do grupo controle (não imunizado e não infectado) e discreta diminuição em relação aos do grupo infectado/não imunizado e imunizados AK e MIX (Figura 31).

**Figura 31 - Dosagem da citocina IL-4 no plasma.**



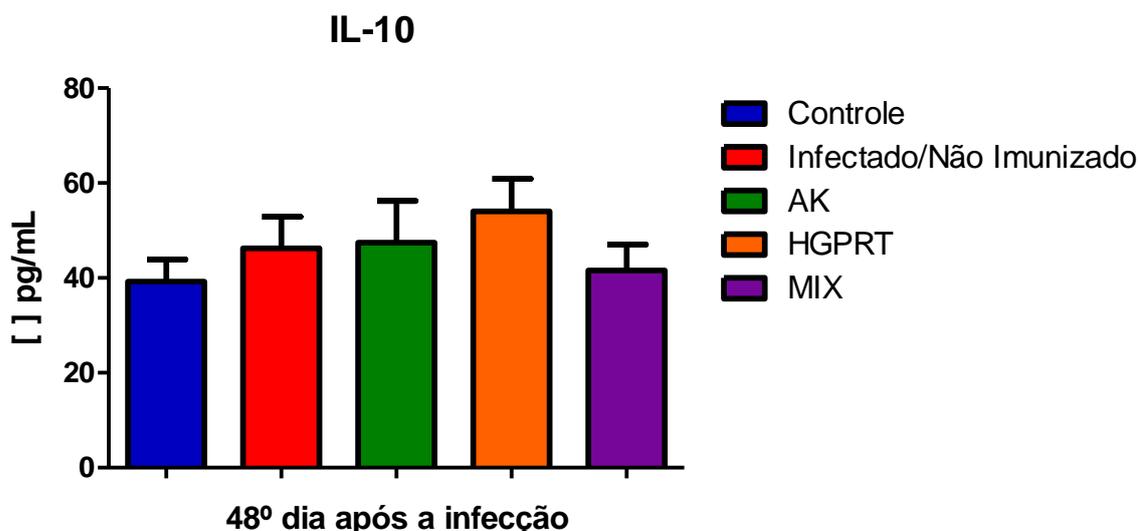
Concentrações da citocina IL-4, em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.6.2 Avaliação da dosagem da citocina IL-10 no plasma

Na Figura 32 estão representadas as concentrações da citocina IL-10, em pg/mL, presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. Os animais do grupo infectado/não imunizado e dos grupos imunizados AK, HGPRT e MIX apresentaram aumento discreto na concentração de IL-10 quando comparados aos do grupo controle (não imunizado e não infectado), embora não haja diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Figura 32). Também é possível observar que dentre os animais dos grupos imunizados (AK, HGPRT e MIX) os do grupo MIX apresentam concentração de IL-10 mais próxima do grupo controle (não imunizado e não infectado) (Figura 32).

Figura 32 - Dosagem da citocina IL-10 no plasma.



Concentrações da citocina IL-10, em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

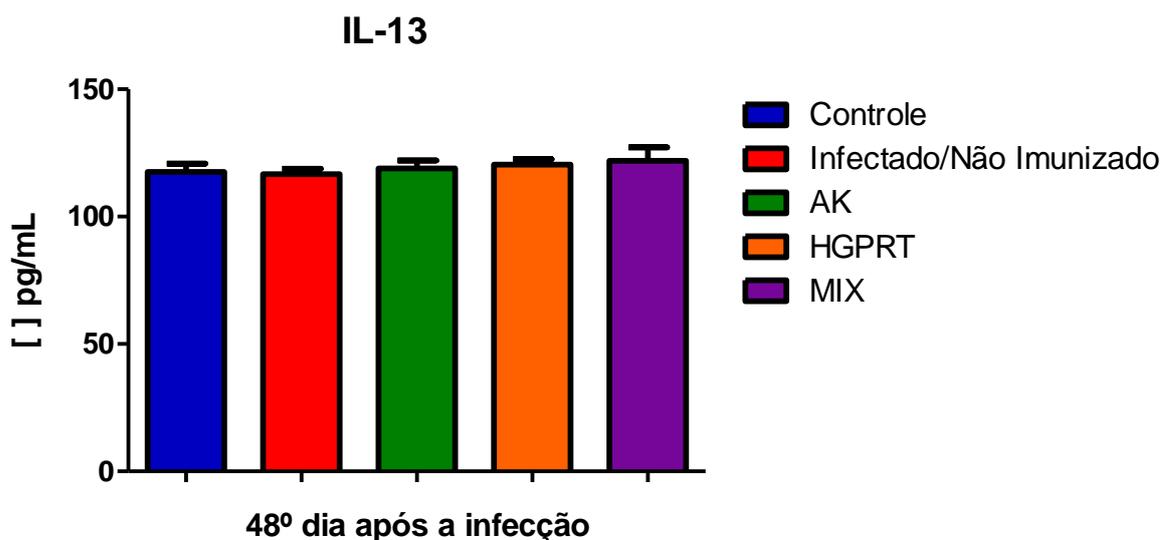
Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.6.3 Avaliação da dosagem da citocina IL-13 no plasma

Na Figura 33 estão representadas as concentrações da citocina IL-13, em pg/mL, presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados

com *S. mansoni*. É possível observar que, todos os animais dos grupos analisados, controle (não imunizado e não infectado), infectado/não imunizado e dos grupos imunizados AK, HGPRT e MIX apresentaram concentrações de IL-13 muito semelhantes entre si, não havendo, portanto, diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 33).

**Figura 33 - Dosagem da citocina IL-13 no plasma.**



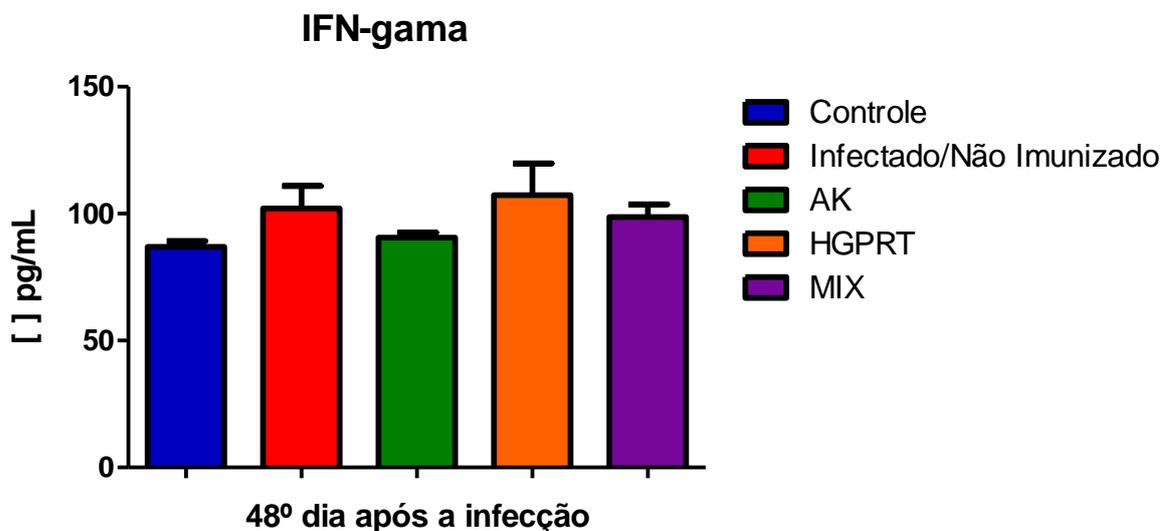
Concentrações da citocina IL-13, em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.6.4 Avaliação da dosagem da citocina IFN- $\gamma$ no plasma

Na Figura 34 estão representadas as concentrações da citocina IFN- $\gamma$ , em pg/mL, presentes no *pool* do plasma dos animais dos grupos experimentais: controle, infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. É possível observar que, embora não haja diferença significativa entre os grupos analisados, os animais do grupo infectado/não imunizado e dos grupos imunizados AK, HGPRT e MIX apresentaram discreto aumento na concentração de IFN- $\gamma$  quando comparados aos do grupo controle (não imunizado e não infectado) (Figura 34). Dentre os animais dos grupos imunizados, os que apresentaram maior concentração de IFN- $\gamma$  foram os do grupo HGPRT e os que apresentaram menor concentração foram os do grupo AK (Figura 34).

**Figura 34 - Dosagem da citocina IFN- $\gamma$  no plasma.**



Concentrações da citocina IFN- $\gamma$ , em pg/mL no *pool* do plasma dos animais de cada grupo experimental. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes (n = 10-12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisado.

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.7 Avaliação histológica do fígado

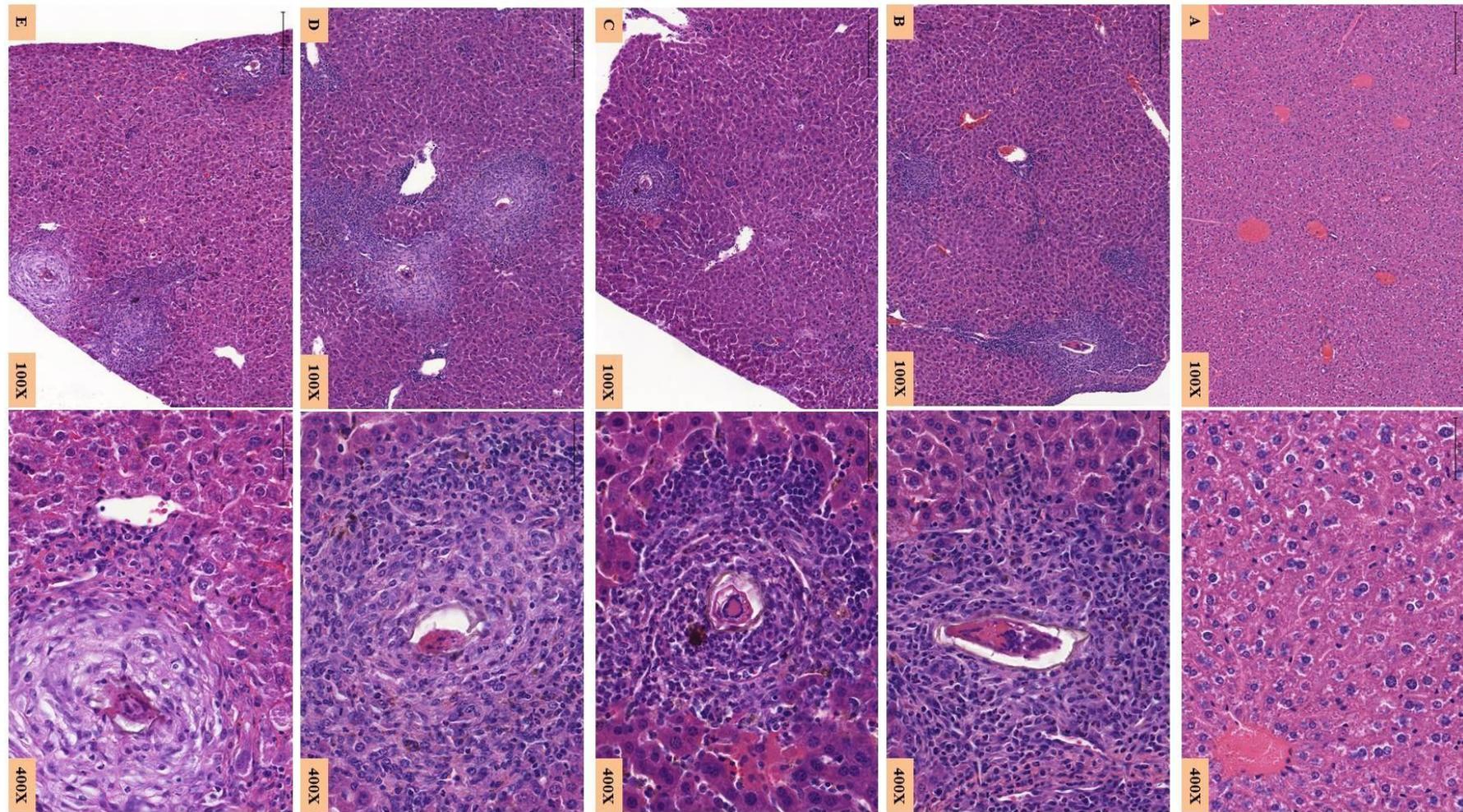
Nas Figuras a seguir (Figura 35 e 36) estão representadas as fotomicrografias de cortes de fígado dos animais de cada grupo experimental, controle (não imunizado e não infectado), infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, no 48º dia após a infecção. Na Figura 35 os cortes de fígado dos animais foram corados com HE para avaliação das células que compõem o tecido e também observação dos granulomas. Na Figura 36 os cortes de fígado dos animais foram corados com Tricômico de Masson, para avaliação da deposição de colágeno.

Observa-se na Figura 35 que os animais do grupo controle – não imunizado e não infectado - (Figura 35A) apresentam o tecido hepático preservado e sem a presença de granulomas ou ovos, e nos animais do grupo infectado/não imunizado (Figura 35B) e também dos grupos imunizados AK, HGPRT e MIX (Figuras 35C, 35D e 35E), há a formação de granuloma periovular, com infiltrado celular misto.

Já na Figura 36, devido à coloração com Tricômico de Masson, pode-se observar depósito de colágeno portal mínimo (em azul) no fígado dos animais do grupo controle – não imunizado e não infectado – (Figura 36A), e nos animais do grupo infectado/não imunizado

(Figura 36B) e também dos grupos imunizados AK, HGPRT e MIX (Figuras 36C, 36D e 36E), observa-se a presença de depósito de colágeno nas áreas granulomatosas periovulares.

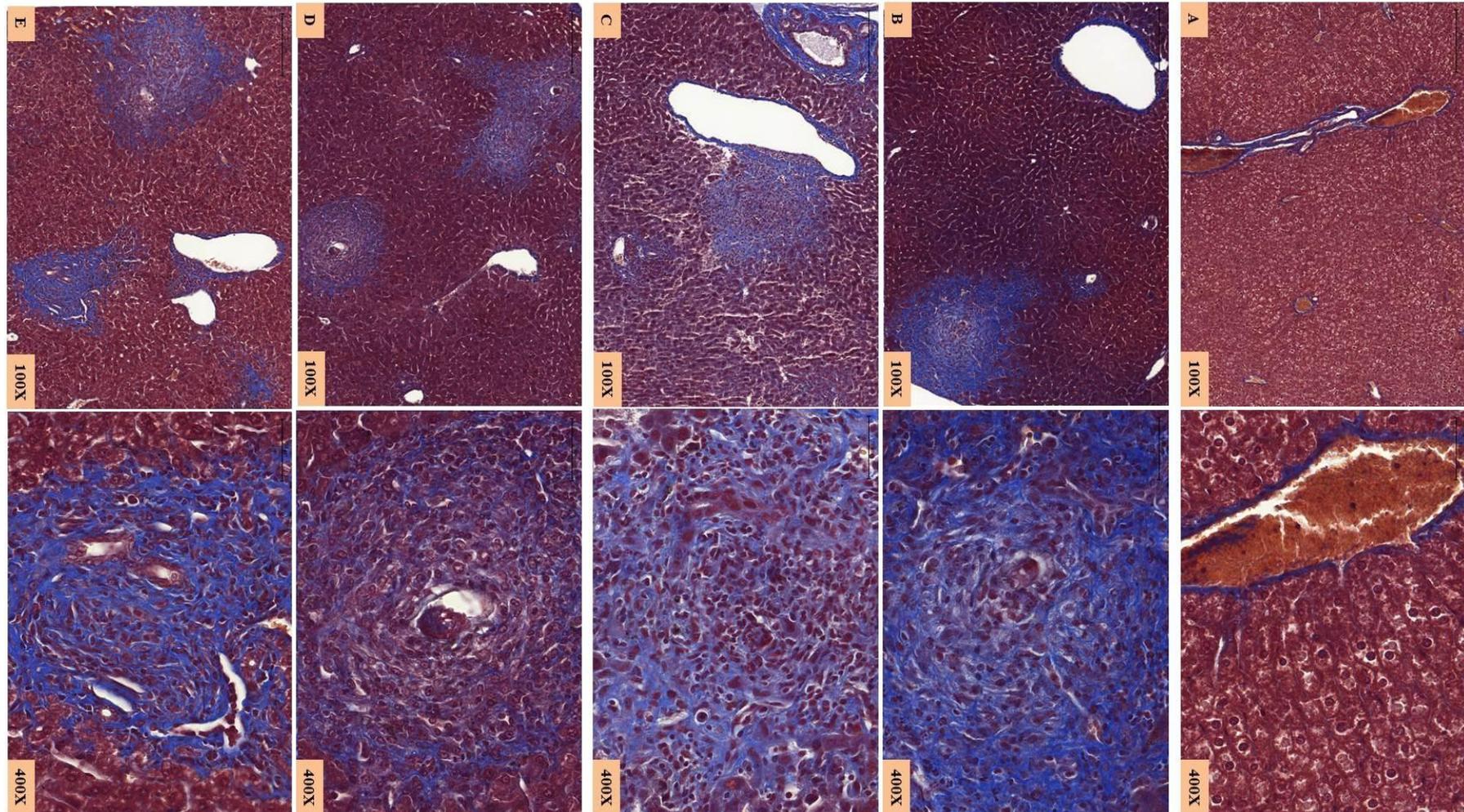
**Figura 35 - Fotomicrografias de cortes de fígado no 48º dia após a infecção - HE.**



Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: controle (31A), infectado/não imunizado (31B), imunizado AK e posteriormente infectado (31C), imunizado HGPRT e posteriormente infectado (31D) e imunizado MIX e posteriormente infectado (31E). Coloração: HE. Aumento 100X (200 µm) e 400X (50 µm).

Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 36 - Fotomicrografias de cortes de fígado no 48º após a infecção - Tricômico de Masson.**

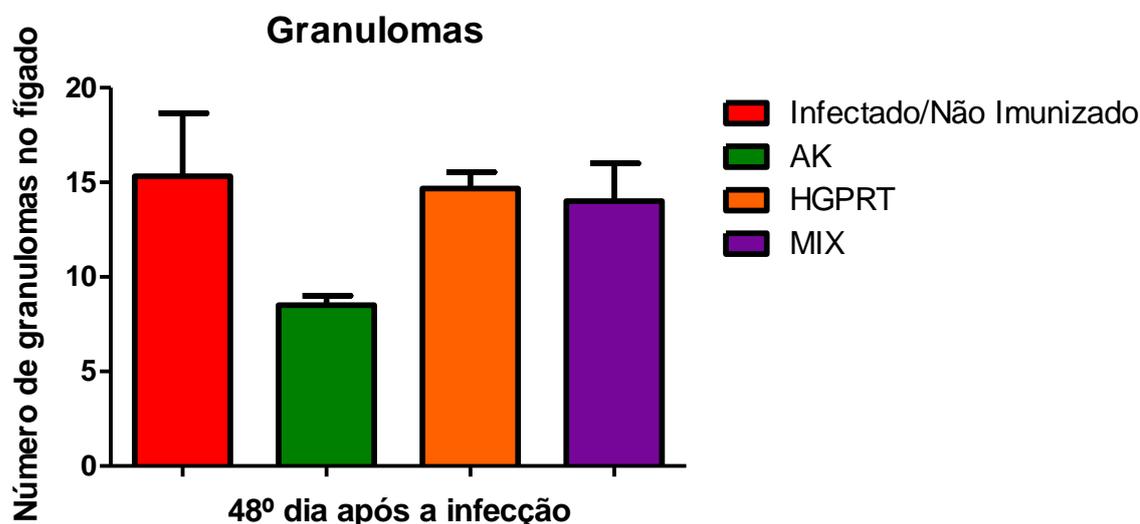


Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental: controle (32A), infectado/não imunizado (32B), imunizado AK e posteriormente infectado (32C), imunizado HGPRT e posteriormente infectado (32D) e imunizado MIX e posteriormente infectado (32E). Coloração: Tricômico de Masson. Aumento 100X (200 µm) e 400X (50 µm).

Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 37 estão representados o número de granulomas encontrados nos cortes histológicos de fígado de dois animais de cada grupo experimental, controle (não imunizado e não infectado), infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. Pode-se observar que, embora não haja diferença estatisticamente significativa entre os grupos, os animais do grupo imunizado AK apresentaram diminuição do número de granulomas no fígado quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 37). Os animais dos grupos imunizados HGPRT e MIX também apresentaram diminuição do número de granulomas quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 37), entretanto essa diminuição foi discreta.

**Figura 37 - Número de granulomas no fígado no 48º dia após a infecção.**



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

Fonte: Elaborado pela autora

Na Tabela 3, estão representadas as médias  $\pm$  EPM do número de granulomas encontrados nos cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental, controle (não imunizado e não infectado), infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, bem como suas respectivas porcentagens (%) de redução do número de granulomas no fígado calculada segundo Delgado et al., 1992. Observa-se que, os animais de todos os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) e posteriormente infectados com cercárias do parasito apresentaram redução do número de granulomas no fígado quando

comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 37, Tabela 3). Dentre os grupos imunizados, o grupo que apresentou maior porcentagem de redução de granulomas no fígado foi o grupo AK, com 44,55% (Tabela 3).

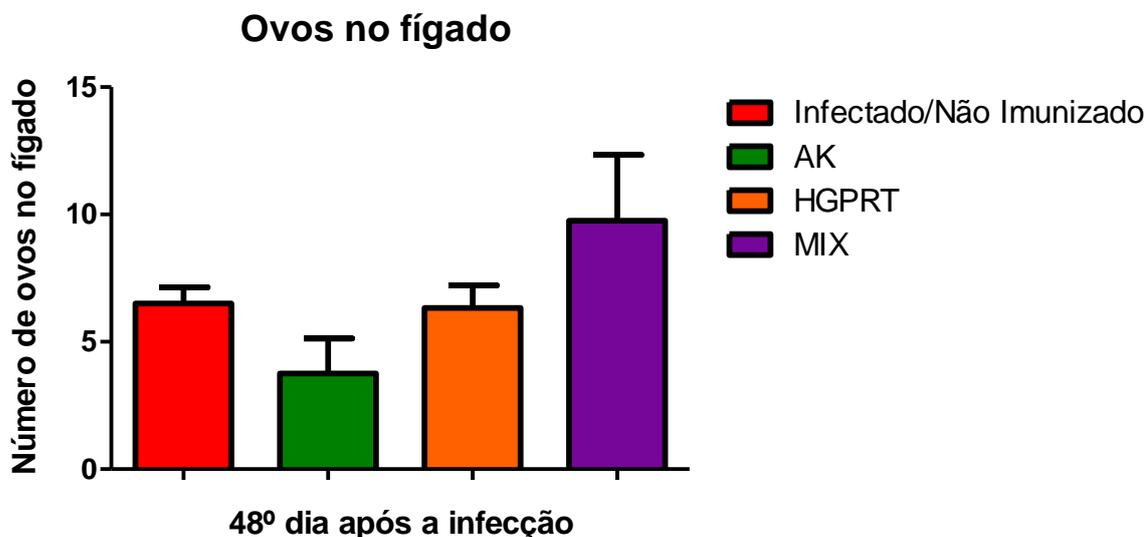
**Tabela 3 - Número de granulomas no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de granulomas no 48º dia após a infecção.**

Grupos Experimentais	Granulomas	Redução (%)
Infectado/ Não Imunizado	15,3 ± 3,3	-
AK	8,5 ± 0,5	44,55
HGPRT	14,6 ± 0,9	4,37
MIX	14 ± 2	8,67

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

Na Figura 38 estão representados o número de ovos encontrados nos cortes histológicos de fígado de dois animais de cada grupo experimental, controle (não imunizado e não infectado), infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*. Pode-se observar que, embora não haja diferença estatisticamente significativa entre os grupos, os animais do grupo imunizado AK apresentaram diminuição do número de ovos no fígado quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 38). Os animais do grupo imunizado HGPRT apresentaram quantidade de ovos no fígado semelhante aos do grupo infectado/não imunizado (Figura 38). Os animais do grupo imunizado MIX, por sua vez, apresentaram maior quantidade de ovos no fígado quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado e com os dos demais grupos imunizados (AK e HGPRT) (Figura 38).

Figura 38 - Número de ovos no fígado no 48º dia após a infecção.



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

Fonte: Elaborado pela autora

Na Tabela 4, estão representadas as médias  $\pm$  EPM do número de ovos encontrados nos cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental, controle (não imunizado e não infectado), infectado/não imunizado, imunizado com a enzima AK, HGPRT e/ou MIX (AK + HGPRT) e desafiados com *S. mansoni*, bem como suas respectivas porcentagens (%) de redução do número de ovos no fígado calculada segundo Delgado et al., 1992. Observa-se que, os animais dos grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* AK e HGPRT e posteriormente infectados com cercárias do parasito apresentaram redução do número de ovos no fígado quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 38, Tabela 4), sendo que os do grupo imunizado AK foram os que apresentaram a maior redução, 42,31% (Tabela 4). Já os animais do grupo imunizado MIX não apresentaram redução do número de ovos no fígado quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Tabela 4).

**Tabela 4 - Número de ovos no fígado dos animais e porcentagem de redução do número de ovos no 48º dia após a infecção.**

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Ovos no fígado</b>	<b>Redução (%)</b>
Infectado/ Não Imunizado	6,5 ± 0,6	-
AK	3,75 ± 1,37	42,31
HGPRT	6,3 ± 0,89	2,61
MIX	9,75 ± 2,6	não houve

Os valores representam as médias ± EPM de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora

## 5- DISCUSSÃO

A esquistossomose é considerada uma das mais importantes helmintíases humanas e uma das parasitoses mais prevalentes no mundo, sendo endêmica em vários países e afetando milhões de pessoas (ROFATTO et al., 2011). Apesar dos grandes avanços no seu controle, a esquistossomose continua se espalhando para novas áreas geográficas. Opções limitadas são disponíveis para o tratamento da doença e a droga de escolha é o Praziquantel. No entanto, após cerca de 35 anos de uso deste fármaco, observa-se sensibilidade diminuída ao mesmo e o surgimento de cepas resistentes em vários países, além do medicamento não prevenir a reinfeção constante nas áreas endêmicas (BARBERATO, 1996; BERGQUIST, 1998).

Somando-se a esses fatores a quimioterapia não reverte a patologia já instalada no organismo, considerando a dificuldade de diagnóstico da doença em seu estágio inicial devido à sintomatologia inespecífica. A morbidade, que tem como consequência anos de vida comprometidos, é a maior parcela da problemática da doença, já que é consenso entre os especialistas que a mortalidade devido à esquistossomose é relativamente pequena quando comparada com sua morbidade. O fato de ser uma doença negligenciada típica de países em desenvolvimento faz com que não haja interesse de grandes companhias farmacêuticas e de biotecnologia em estudar a doença, tornando os trabalhos científicos que se debruçam sobre a esquistossomose, em especial nesses países, de grande importância para a melhoria da saúde sanitária da população (ROFATTO et al., 2011).

A utilização de enzimas recombinantes, envolvidas no metabolismo de purinas do parasito, para imunização de camundongos Balb/c e posterior desafio dos mesmos por meio da infecção por *S. mansoni*, teve por objetivo nesse estudo avaliar os efeitos dessas enzimas na esquistossomose mansônica experimental a fim de agregar novos conhecimentos sobre a infecção e a imunologia da doença. Apesar do Ministério da Saúde, em 2012, ter autorizado os testes clínicos com uma vacina contra a doença, a eficácia da mesma é ainda discutível. Além disso, não se encontram trabalhos na literatura com a imunização a partir da enzima recombinante AK, bem como a partir do MIX das enzimas AK e HGPRT recombinantes de *S. mansoni*, conforme proposto neste trabalho, em modelo murino.

Um dos fatores que uma vacina ideal para a esquistossomose deve ter, segundo Ribeiro de Jesus e colaboradores (2000) e Bergquist e colaboradores (2005), é a capacidade de reduzir a fecundidade dos vermes e consequentemente a eliminação de ovos pelo parasito, visto que as fêmeas põem um total diário em torno de 300 ovos (DEFRANCO; LOCKSLEY;

ROBERTSON, 2007). Dessa maneira têm-se por objetivo interromper o ciclo biológico do *S. mansoni* e sua transmissão. Assim, é possível observar por meio dos resultados do presente estudo, que todos os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) e posteriormente infectados com cercárias do parasito, apresentaram redução do número de ovos nas fezes quando comparados com o grupo infectado/não imunizado (Figura 19). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados dos grupos apresentados, é possível notar que o grupo imunizado com o MIX de enzimas recombinantes apresentou uma redução de 46% do número de ovos nas fezes (Tabela 1) quando comparado com o grupo infectado/não imunizado. Essa redução do número de ovos é bastante relevante se levarmos em conta que se trata da imunização com enzimas recombinantes intracelulares, quando comparado com outros trabalhos que demonstram uma redução de 59 a 60% do número de ovos eliminados nas fezes de animais que foram imunizados com proteínas totais do tegumento de esquistossômulos de *S. mansoni* (MELO et al., 2010) e de 52 a 60% do número de ovos eliminados nas fezes de animais imunizados com uma proteína recombinante insolúvel expressa na gastroderme e no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* (NAWARATNA et al., 2015). Sendo assim, a associação das enzimas recombinantes de *S. mansoni*, AK e HGPRT (MIX), se torna um potencial alvo para ser utilizado na elaboração de uma vacina que busque o controle da esquistossomose.

Durante a fase aguda da doença observa-se um nível mensurável de fator de necrose tumoral (TNF) no plasma e células mononucleares do sangue periférico que produzem grande quantidade de TNF, IL-1 e IL-6, que são mediadores pró-inflamatórios (PEARCE; MACDONALD, 2002). Sendo assim, o número de leucócitos totais no sangue e em fluidos corporais, como no lavado da cavidade peritoneal, fica aumentado durante a infecção devido à resposta celular contra a doença. Entretanto, após certo período, essas células devem ser moduladas, pois o acúmulo das mesmas contribui para a formação de granulomas, que são compostos, entre outros, por células inflamatórias do sistema imune, sendo que os eosinófilos são as células de destaque, já que representam 50% das células que compõem o granuloma (SWARTZ et al., 2006; LINS et al., 2008). Em nossos resultados demonstramos que os animais do grupo imunizado com a enzima recombinante AK de *S. mansoni*, e posteriormente infectados com cercárias do parasito, apresentaram diminuição do número de eosinófilos no sangue (Figura 20) quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado. Pouco se encontra a respeito da modulação do recrutamento de eosinófilos pela imunização com a enzima AK em outros modelos. Sabe-se que a adenosina pode apresentar um papel como

imunomodulador na sepse promovendo sinalização molecular (RAMAKERS et al., 2011), e desse modo podemos compreender que em nosso modelo a imunização com a enzima AK estaria sendo responsável pela modulação do recrutamento de eosinófilos na esquistossomose mansônica experimental. E ainda, os animais dos grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) e posteriormente infectados com cercárias do parasito, também apresentaram diminuição do número de eosinófilos no lavado da cavidade peritoneal quando comparados com os do grupo infectado/não imunizado (Figura 21). Em outros modelos experimentais a enzima AK tem sido alvo para o desenvolvimento de inibidores que possibilitem a regulação do processo inflamatório pela regulação da sinalização intracelular (KOWALUK; JARVIS, 2000). Além disso, há dados que mostram que a adenosina pode ser também um potente mensageiro extracelular possivelmente envolvido em condições desfavoráveis (GESSI et al., 2007). Relatos da literatura mostraram através da técnica de RNAi, que a enzima HGPRT se mostrou fundamental para a sobrevivência do *S. mansoni* (PEREIRA et al., 2008). Dessa forma, a utilização da HGPRT como imunógeno pode desencadear nos animais infectados com *S. mansoni* uma regulação da fisiopatogênese desses animais. E juntas, as enzimas AK e HGPRT, podem atuar na regulação do recrutamento dos eosinófilos para a cavidade peritoneal, possivelmente modulando o processo inflamatório nesses animais por vias ainda desconhecidas. Embora os dados não se apresentem estatisticamente significativos, sugere-se que essas enzimas podem modular e induzir diminuição do processo inflamatório, contribuindo para uma redução de fisiopatogênese, principalmente no que envolve a formação do granuloma e participação dos eosinófilos nesse processo (Figura 21).

O fato do *S. mansoni* não se multiplicar no hospedeiro definitivo faz com que a síntese de uma vacina que confere uma proteção de pelo menos 60% seja efetiva diminuindo a transmissão e a morbidade da doença (CAPRON; CAPRON, 1994; COULSON, 1997; TENDLER; SIMPSON, 2008). Além disso, a evolução do processo fisiopatológico provocado pelo *S. mansoni*, no organismo do hospedeiro, deve ser considerado a partir da análise de uma série de fatores, dentre eles a carga parasitária, que está relacionada com a intensidade da infecção (SOUZA et al., 2011). Sendo assim, é de extrema importância que uma vacina contra a esquistossomose seja capaz de reduzir a carga parasitária do hospedeiro. Neste trabalho pode-se observar que todos os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) apresentaram redução da carga parasitária (Figura 22) quando comparados com o grupo infectado/não imunizado. O grupo imunizado

com o MIX de enzimas apresentou a maior redução, 31,27%, quando comparado com o grupo infectado/não imunizado, demonstrado na Tabela 2. Embora os dados não se apresentem estatisticamente significativos, esse valor de redução da carga parasitária é maior do que o valor obtido com a imunização a partir de uma proteína recombinante insolúvel expressa na gastroderme e no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*, que apresentou uma redução de carga parasitária de 16,21 a 25% (NAWARATNA et al., 2015). A redução de carga parasitária obtida a partir da imunização com o MIX de enzimas recombinantes também está muito próxima dos valores obtidos em vários outros trabalhos que utilizaram diferentes proteínas de *S. mansoni* na imunização em modelos murinos e nos quais a recuperação de vermes foi realizada entre o 45º e o 50º dia de infecção. Entre esses estudos está o modelo que utiliza a imunização com a Sm14 (componente da vacina autorizada para testes clínicos no Brasil, desde 2012) e posterior infecção com 100 cercárias, que apresentou de 36,9 a 49,5% de redução da carga parasitária (RIBEIRO et al., 2002). E também a imunização com proteínas totais do tegumento de esquistossômulos de *S. mansoni* e posterior infecção também com 100 cercárias, que apresentou de 43 a 48% de redução da carga parasitária (MELO et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde, quando foi estabelecido o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose a meta era que a vacina contra a doença atingisse uma redução de carga parasitária igual ou superior a 40% (WILSON; COULSON, 2006). Portanto é possível afirmar que a imunização com o MIX de enzimas recombinantes de *S. mansoni* favoreceu a diminuição da carga parasitária, sendo considerado um potencial alvo para desenvolvimento de uma vacina. São necessários, entretanto, estudos que permitam a compreensão do mecanismo pelo qual as enzimas promovem essa diminuição dos parasitos bem como modulam o recrutamento de células como os eosinófilos para os tecidos mais afetados, como o fígado.

Ambos os mecanismos imunológicos, celular e humoral, são fundamentais para o controle efetivo da infecção por *S. mansoni* (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000). Os resultados do presente trabalho demonstram níveis significativos de produção de anticorpos IgG1 após a imunização com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* AK, HGPRT e MIX, como mostram as Figuras 23, 24, 25, 26. Isso demonstra a capacidade das referidas enzimas em induzir imunidade específica nos animais utilizados no modelo da esquistossomose murina. Além disso, o fato do plasma dos animais imunizados reconhecerem as Proteínas Totais do *S. mansoni* (PTS), demonstrado na Figura 26, comprova que os anticorpos produzidos a partir da imunização com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* AK, HGPRT e MIX são capazes de

reconhecer e se ligar nos vermes adultos, potencializando o controle dessa infecção por caminhos ainda não esclarecidos para esse modelo. A ativação da resposta imune durante uma infecção pode favorecer o controle do agente infeccioso. Anticorpos IgG1 e IgG3 são os mais eficientes na ligação a receptores de monócitos, macrófagos e células NK (*natural killer*) e no desencadeamento da resposta de citotoxicidade (EL RIDI et al., 2001). Os macrófagos ativados podem romper o tegumento do esquistossômulo e tornar exposta a enzima citosólica para a ligação do anticorpo que poderá mediar a citotoxicidade ou comprometer as atividades metabólicas do parasita por inibir a enzima em questão (EL RIDI et al., 2001). Os níveis plasmáticos de IgG1 indicam uma resposta imunológica do tipo Th2, a qual é observada na fase crônica da doença (Figura 8). Essa resposta reflete os principais danos ao tecido hepático e ao processo inflamatório presentes nessa doença. Dessa forma, termos imunógenos capazes de regular esses mecanismos e contribuir para o balanço da resposta imune Th1/Th2 é de fundamental importância para o controle da morbidade associada à gravidade da esquistossomose mansônica.

Gryseels e colaboradores (2006) relacionam a resistência adquirida em indivíduos de regiões endêmicas e as reinfecções, durante a esquistossomose mansônica nessas áreas, com uma resposta mediada por anticorpos IgE. Nos resultados do presente trabalho pode-se observar níveis significativos de produção de anticorpos IgE após a imunização com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* AK e MIX, como mostram as Figuras 27 e 29. Sendo que, a imunização com o MIX de enzimas recombinantes se mostrou mais eficiente, demonstrando mais uma vez a capacidade das referidas enzimas em induzir imunidade específica nos animais no modelo da esquistossomose murina. Além disso, o fato do plasma dos animais imunizados reconhecerem as Proteínas Totais do *S. mansoni* (PTS), demonstrado na Figura 30, comprova que os anticorpos produzidos a partir da imunização com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* AK, HGPRT e MIX são capazes de reconhecer e se ligar nos vermes adultos, sugerindo uma ativação de citotoxicidade associada ao controle da infecção nesses animais. Os anticorpos IgE ativam mastócitos na pele e basófilos do sangue, que são conhecidos por participar das reações de hipersensibilidade imediata, uma função efetora direta na imunidade contra a esquistossomose (CAPRON; CAPRON, 1994). Essa classe de anticorpos também está associada, em modelos experimentais, à redução da carga parasitária e queda da fecundidade do parasita (CAPRON; CAPRON, 1994), observados também pela imunização com o MIX de enzimas recombinantes neste trabalho.

A presença de IgG1 indica ativação da resposta Th2, onde principalmente IL-5 e IL-4 são produzidas. E sabe-se que IL-4 é fundamental para a mudança de classe de anticorpos para IgE (MEYER et al., 2015). Em relação à dosagem de IL-4 no plasma dos animais (Figura 31), os resultados nos mostram concentrações próximas desta citocina nos animais dos grupos analisados (controle, infectado/não imunizado, imunizado AK, imunizado HGPRT e imunizado MIX). Entretanto é possível notar um discreto aumento na concentração de IL-4 no grupo imunizado com o MIX de enzimas recombinantes. Desse modo, podemos sugerir que a imunização foi capaz de estimular uma resposta Th2 e indiretamente aumentar níveis de IgE circulantes, o que pode favorecer uma resistência ao desenvolvimento da infecção na sua forma mais grave.

A produção de IL-10, uma citocina regulatória, tem um papel de extrema importância na modulação da resposta Th1 e na transição do tipo de resposta. Na fase crônica há o predomínio do padrão de resposta Th2 que apresenta papel principal nos estágios iniciais desta fase. Após esse período, a resposta Th2 deve ser modulada para não contribuir com o desenvolvimento da fibrose hepática e da morbidade crônica (PEARCE; MACDONALD, 2002). Podemos observar, a partir dos nossos resultados, que a concentração de IL-10 no plasma dos animais que foram imunizados com o MIX de enzimas recombinantes de *S. mansoni* se manteve muito semelhante à concentração desta citocina no plasma dos animais do grupo controle (não imunizado e não infectado) (Figura 32). Por ser uma citocina reguladora da resposta imune adaptativa (NG SKY et al., 2013) e ser descrita com um “mestre” da regulação imune no contexto das doenças infecciosas (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008) é importante que haja um equilíbrio na concentração da mesma para que esta não apresente valores exacerbados, nem para mais, nem para menos, contribuindo dessa forma para a regulação dos padrões de respostas imunes na esquistossomose. O balanço entre os padrões de resposta Th1 e Th2 é muito importante, pois o predomínio da resposta imune em direção a um único perfil é prejudicial e poderia levar o hospedeiro à morte. A IL-10 apresenta papel importante na regulação pró-inflamatória evitando que ocorra um mecanismo pró-inflamatório potencialmente letal. Na fase crônica, se o padrão Th2 não for modulado, o mesmo aumenta o processo de fibrose gerando a forma mais grave da doença, a forma hepatoesplênica (PEARCE; MACDONALD, 2002). A homeostase imunológica é mantida pelas células TCD4+ reguladoras controlando, dessa maneira, a magnitude da resposta imune a organismos invasores (BELKAID; ROUSE, 2005).

Outros mediadores são de fundamental importância para o controle e ou comprometimento de uma resposta mais grave do hospedeiro. As interleucinas IL-13 e IL-4 são as principais citocinas responsáveis pela fibrose já que as mesmas estimulam, no macrófago, a síntese de colágeno (PEARCE; MACDONALD, 2002), além de também estimular a multiplicação dos fibroblastos e a produção de proteínas da matriz extracelular (TIGGELMAN et al., 1995). Os resultados deste trabalho mostram que a concentração da citocina IL-13 no plasma dos animais é muito semelhante em todos os grupos analisados (controle, infectado/não imunizado, imunizado AK, imunizado HGPRT e imunizado MIX) (Figura 33). Sendo assim, a imunização com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* não modula as concentrações de IL-13 no modelo experimental murino, e de certa forma contribui para a manutenção de níveis de IL-13 que não comprometam um aumento da fisiopatogênese, principalmente no que se refere à fibrose hepática.

O IFN- $\gamma$  é uma citocina de padrão Th1 que juntamente com a IL-12 pode proteger contra o processo de fibrose mediado pela IL-13 na fase crônica da esquistossomose (PEARCE; MACDONALD, 2002). Essa citocina participa da fibrólise, inibindo a multiplicação de miofibroblastos e a produção de proteínas da matriz extracelular (TAMAI et al., 1995). Além disso, estudos em regiões endêmicas de *S. mansoni* demonstraram papel protetor do IFN- $\gamma$  no controle da fibrose grave (BOOTH et al., 2004). Podemos observar, a partir dos resultados deste trabalho, que a concentração de IFN- $\gamma$  no plasma dos animais imunizados com a enzima recombinante HGPRT de *S. mansoni* apresenta um discreto aumento quando comparada com o grupo infectado/não imunizado (Figura 34), embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. Dessa forma, podemos sugerir que esses níveis de IFN- $\gamma$  podem estar contribuindo para o controle da fibrose nesse modelo.

O granuloma é formado por diversas células inflamatórias do sistema imune (principalmente eosinófilos), componentes de matriz extracelular, proteínas de adesão, fatores de crescimento e angiogênese, originando uma estrutura esférica que circunda cada ovo individualmente. Após a morte do ovo, o granuloma diminui, deixando placas fibrosas (com abundante quantidade de colágeno) em seu lugar, aumentando a pressão sanguínea portal assim como o diâmetro da veia porta (PEARCE; MACDONALD, 2002; LENZI et al., 2008). Sendo assim, é relevante notar que o ovo do parasito é o principal agente patogênico, superando muito os efeitos nocivos produzidos diretamente pelos vermes adultos (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Nossos resultados demonstraram que todos os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* (AK, HGPRT e MIX) apresentaram

redução do número de granulomas no fígado quando comparados com o grupo infectado/não imunizado (Figura 37). O grupo imunizado com a enzima AK foi o grupo que apresentou a maior redução do número de granulomas no fígado, 44,55%, quando comparado com o grupo infectado/não imunizado (Tabela 3). Já em relação ao número de ovos encontrados nos cortes histológicos do fígado dos animais, os grupos imunizados com as enzimas recombinantes de *S. mansoni* AK e HGPRT apresentaram redução do número de ovos no fígado quando comparados com o grupo infectado/não imunizado (Figura 38). O grupo imunizado com a enzima AK foi o grupo que apresentou a maior redução do número de ovos no fígado, 42,31%, quando comparado com o grupo infectado/não imunizado (Tabela 4).

Baseado nos achados deste trabalho pode-se sugerir que a imunização com as enzimas recombinantes AK e HGPRT de *S. mansoni*, bem como o MIX das referidas enzimas, apresentam atividade antiparasitária, se mostrando como importantes imunógenos para a construção de uma vacina contra a esquistossomose. O MIX das enzimas se apresentou como melhor opção em vários parâmetros analisados, confirmando a hipótese de que há um sinergismo entre as enzimas AK e HGPRT para que se consiga controlar melhor a infecção de uma maneira geral quando comparada com a utilização das enzimas separadamente.

Embora tenhamos resultados promissores para o uso das enzimas recombinantes AK e HGPRT de *S. mansoni* como alvos vacinais para combater a esquistossomose mansônica, é necessário ainda, um melhor entendimento sobre os mecanismos pelos quais essas enzimas atuam no controle da doença, bem como possibilitam a modulação do processo inflamatório regulando tanto a imunidade inata como a humoral, nesse modelo experimental. Deve-se destacar que o combate à esquistossomose não inclui somente a busca por novos fármacos ou antígenos para a síntese de uma vacina contra a doença, mas também medidas de controle, implantação de saneamento básico e educação sanitária, bem como conscientização, principalmente das pessoas que residem em áreas endêmicas.

## 6- CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem que, a imunização com as enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni*, AK, HGPRT e com o MIX destas enzimas contribui para o controle da esquistossomose, bem como auxilia na modulação da infecção experimental, além de promover redução da fisiopatologia desta parasitose, visto que:

1. A imunização com o MIX das enzimas promoveu regulação da carga parasitária contribuindo desta maneira com o controle da esquistossomose, bem como da transmissão desta doença nesse modelo;
2. A imunização com AK, HGPRT e com o MIX modulou o recrutamento de eosinófilos para a cavidade peritoneal dos animais imunizados, sugerindo que essas enzimas modulam o processo inflamatório no controle da migração de eosinófilos nesse modelo;
3. A imunização com AK, HGPRT e com o MIX foi capaz de induzir nos animais a produção e secreção dos anticorpos IgG1 e IgE, mostrando que essas enzimas recombinantes são imunogênicas;
4. A imunização com o MIX das enzimas induziu aumento discreto de IL-4 e redução de IL-10, e a imunização com HGPRT promoveu aumento discreto de IFN- $\gamma$ , sugerindo que essas enzimas regulam parcialmente os níveis destas citocinas nesse modelo experimental, por mecanismos ainda desconhecidos;
5. A imunização com a AK promoveu redução do número de granulomas hepáticos e de ovos no fígado, contribuindo de maneira significativa com a diminuição da fisiopatologia associada à fase crônica da esquistossomose mansônica experimental.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective. *J. Adv. Res.*, v. 4, p. 433-444, 2013.

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

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

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 309-314, 2002.

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

BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, v. 460, p. 352-358, 2009.

BIANCHI, M. E. DAMPS, PAMPS and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol*, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BICKLE, Q. D. et al. Comparison of the vaccine efficacy of gamma-irradiated *Schistosoma japonicum* cercariae with the defined antigen Sj62 (IrV-5) in pigs. *Vet. Parasitol.*, v. 100, p. 51-62, 2001.

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

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

CAPRON, A. Schistosomiasis: forty years war on the worm. *Parasitol. Today*, v. 14, n. 10, p. 379-384, 1998.

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

CARDOSO, F. C. et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 2, n. 10, e308, 2008.

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

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

COLES, G. C. et al. Drug resistance in schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 347-351, 1986.

COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Adv. Parasitol.*, v. 39, p. 271-336, 1997.

COUPER, K. N.; BLOUNT. D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, v. 180, p. 5771-5777, 2008.

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

D'ARCY, P.F.; HARRON, D.W.G. Schistosomiasis. *Pharm. Int.*, v. 4, n. 1, p. 16-20, 1983.

DEAN, D. A. *Schistosoma* and related genera: acquired resistance in mice. *Exp. Parasitol.*, v. 55, p. 1-104, 1983.

DEFRANCO, A.; LOCKSLEY, R.; ROBERTSON, M. Immunity: The immune response in infectious and inflammatory disease. Northants, UK: *New Sciences Press Ltd.*, 277, 2007.

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

DESPRÉS, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 60, p. 221-230, 1993.

DOENHOFF, M. J. et al. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 947-951, 1987.

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

DOVEY, H.F.; MCKERROW, J.H.; WANG, C.C. Action of tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 16, n. 2, p. 185-198, 1985.

EL KOUNI, M. H. Efficacy of combination therapy with tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate against chronic and advanced stages of schistosomiasis. *Biochem. Pharmacol.*, v. 41, n. 5, p. 815-820, 1991.

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

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

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

ENGH, R. A.; BOSSEMEYER, D. The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation – targets for therapeutic intervention. *Adv. Enzyme Regul.*, v. 41, p. 121-149, 2001.

FALLON, P. G. et al. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, v. 53, p. 61-62, 1995.

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

FONSECA, C. T. et al. *Schistosoma* tegument proteins in vaccine and diagnosis development: na update. *J. Parasitol. Res.*, v. 2012, ID 541268, 2012.

GESSI, S. et al. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal.*, v. 3, p. 109-116, 2007.

GITHUI, E. K. et al. *Schistosoma* spp.: isolation of microtubule associated proteins in the tegument and the definition of dynein light chains components. *Exp. Parasitol.*, v. 121, p. 96-104, 2009.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomes. *Lancet*, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front. Immunol.*, v. 84, p. 1-8, 2013.

HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol.*, v. 27, p. 271-280, 2005.

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

ISMAIL, M. et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, v. 60, p. 932-935, 1999.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, p. 705-711, 1999.

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

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. P. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 14, p. 397-400, 1972.

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

KEOUGH, D. T. et al. *Plasmodium vivax* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: A target for anti-malarial chemotherapy. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 173, p. 165-169, 2010.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*, v. 365, p. 1561-1569, 2005.

KOWALUK, E. A.; JARVIS, M. F. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, v. 9, n. 3, p. 551-564, 2000.

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

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

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

LENZI, H. L. et al. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 575-627.

LINS, R. A. B. et al. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Med. Trop.*, v. 41, n. 2, p. 173-178, 2008.

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

MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, v. 298, p. 1912-1934, 2002.

MATHEWS, I. I.; ERION, M. D.; EALICK, S. E. Structure of human adenosine kinase at 1,5 Å resolution. *Biochemistry*, v. 37, n. 45, p. 15607-15620, 1998.

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 21, p. 225-242, 2008.

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

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

MILLER, R. L. et al. Adenosine kinase from rabbit liver. II. Substrate and inhibitor specificity. *J. Biol. Chem.*, v. 254, n. 7, p. 2346-2352, 1979.

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

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

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

NAWARATNA, S. S. K. et al. Lysosome-associated membrane glycoprotein (LAMP) – preliminary study on a hidden antigen target for vaccination against schistosomiasis. *Nature*, v. 5, n. 15069, p. 1-12, 2015.

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

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

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

NG SKY, T. H. et al. Regulation of adaptative immunity; the role of interleukin-10. *Front. Immunol.*, v. 4, p. 1-13, 2013.

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

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, n. 9, p. 727-735, 2003.

OLIVEIRA, S. C. et al. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. *Acta Trop.*, v. 108, n. 2-3, p. 256-262, 2008.

OLIVER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.*, v. 38, p. 19-23, 1952.

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

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

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 2, p. 499-509, 2002.

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

PEREIRA, H. M. *Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de Schistosoma mansoni: Estruturas cristalográficas, estudos cinéticos e descoberta de novos ligantes*. 2003. Tese (Doutorado em Ciências: Física Aplicada) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

PEREIRA, T. C. et al. *Schistosoma mansoni*: evaluation of na RNAi-based treatment targeting HGPRase gene. *Exp. Parasitol.*, v. 118, n. 4, p. 619-623, 2008.

RAMAKERS, B. P. et al. Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock*, v. 36, n. 3, p. 208-215, 2011.

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

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

RIBEIRO DE JESUS, A. et al. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 2797-2803, 2000.

RIBEIRO, F. et al. The effects of immunization with recombinat Sm14 (rSm14) in reducing worm burden and mortality of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, n. 1, p. 11-17, 2002.

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

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

RUFFER, M. A. Note on the presence of “Bilharzia Haematobia” in Egyptian mummies of the twentieth dynasty [1250-1000 B. C.]. *BMJ*, v. 1, p. 2557, 1910.

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

SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* – VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. *Biochem. Pharmacol.*, v. 26, p. 1847-1855, 1977.

SENFT, A.W. et al. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. 3. Identification of enzymes in cell-free extracts. *Biochem. Pharmacol.*, v. 22, p. 449-58, 1973.

SENF, A.W. et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.*, v. 2, p. 249-260, 1972.

SILVA, B. V. et al. Proteínas Quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim. Nova*, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

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

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev. Bras. Clin. Med.*, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, v. 108, p. 2420-2427, 2006.

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

TENDLER, M.; ALMEIDA, M.; SIMPSON, A. Development of the Brazilian anti Schistosomiasis vaccine based on the recombinant fatty acid binding protein Sm14 plus GLA-SE adjuvant. *Front. Immunol.*, v. 6, n. 218, 2015.

TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. G. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Trop.*, v. 108, p. 263-266, 2008.

TIGGELMAN, A. M. et al. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN-gamma. *J. Hepatol.*, v. 23, n. 3, p. 307-317, 1995.

VAN DER WERF, M. J. et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection sub-Saharan Africa. *Acta Trop.*, v. 86, p. 125-139, 2003.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.*, v. 35, p. 148-157, 2003.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev. Bras. Clin. Med.*, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 3. ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2004.

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

WILLIAN, S. et al. Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. *Parasitology*, v. 122, p. 63-66, 2001.

WILSON, R. A. Proteomics at the schistosome-mammalian host interface: any prospects for diagnostics or vaccines? *Parasitology*, v. 139, p. 1178-1194, 2012.

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

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasites armour. *Trends Parasitol.*, v. 25, p. 423-431, 2009.

YU, L. et al. Double-stranded RNA specific to adenosine kinase and hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphorybosiltransferase retards growth of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.*, v. 104, p. 377-383, 2009.

ZHANG, Y.; EL KOUNI, M. H.; EALICK, S. E. Structure of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase in complex with an ATP analog at 1.1 angstroms resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, v. 62, p. 140-145, 2006.

## ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

nº 3-024/2014

Protocolo nº. 024/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *Efeito da imunização com Adenosina Quinase (AK) e Hipoxantina Guanina Forforibosiltransferase (HGPRRT) recombinantes de Schistosoma mansoni e Análise proteômica dos parasitos: controle da infecção murina*, submetido pelo pesquisador **Ana Carolina Maragno Fattori**.

São Carlos, 15 de dezembro de 2014

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais