

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MICHÉLIA ANTÔNIA DO NASCIMENTO GUSMÃO

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA SmATPDase 2 DE *Schistosoma
mansoni* E ESTUDO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SmB1LJ E
SmB2LJ DERIVADOS DESTA PROTEÍNA NA
ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

Juiz de Fora

2013

Michéla Antônia do Nascimento Gusmão

IMUNOLOCALIZAÇÃO DA SmATPDase 2 DE *Schistosoma mansonii* E ESTUDO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SmB1LJ E SmB2LJ DERIVADOS DESTA PROTEÍNA NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila de Faria Pinto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Eveline Gomes Vasconcelos

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

Antônia do Nascimento Gusmão, Michélia.

Imunolocalização da SmATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e estudo dos peptídeos sintéticos SmB1LJ E SmB2LJ derivados desta proteína na esquistossomose experimental/ Michélia Antônia do Nascimento Gusmão. -- 2013.

90p.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Coorientadora: Eveline Gomes Vasconcelos

Dissertação (Mestrado Acadêmico)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. ATP difosfohidrolase. 3. Apirase de batata. 4. Peptídeos. 5. Imunolocalização. I. de Faria Pinto, Priscila, oriente. II. Gomes Vasconcelos, Eveline, coorient. III. Título.

IMUNOLocalização DA SmATPDase 2 DE *Schistosoma mansonii* E ESTUDO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SmB1LJ E SmB2LJ DERIVADOS DESTA PROTEÍNA NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

MICHÉLIA ANTÔNIA DO NASCIMENTO GUSMÃO

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Imunologia).

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Priscila de Faria Pinto - UFJF

(Orientadora)

Profª. Drª. Eveline Gomes Vasconcelos - UFJF

(Co-orientadora)

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo - UFJF

(Membro interno)

Prof. Dr. Raquel Lopes Martins Souza

(Membro externo)

Dedico esta conquista ao meu marido Ronaldo pelo amor, companheirismo, dedicação, incentivo e paciência em todos os momentos. Aos meus pais por terem me ensinado os verdadeiros valores da vida e pela luta em minha criação. A Priscila e Eveline por me acolherem muito bem no laboratório, pela amizade, conselhos, ensinamentos e dedicação aos alunos e ao trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a:

Deus por abençoar o meu caminho, por ter me dado forças para seguir em frente e pelo dom mais precioso, minha vida.

À Dr^a. Maria Aparecida Juliano que, junto ao Dr. Luiz Juliano (Depto de Biofísica/UNIFESP) doaram os peptídeos sintéticos.

A PDTIS/FIOCRUZ por permitir a utilização de suas instalações.

A todos os professores e técnicos da UFJF que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Meu Marido Ronaldo por sempre estar ao meu lado, me apoiando e ajudando a ser uma pessoa cada vez melhor, lutando junto comigo a cada dia para conquistarmos nossos sonhos.

Meus pais João e Cristina por terem lutado sempre com muito esforço para a minha criação e por terem me ensinado quais são os verdadeiros valores da vida.

Meus irmãos Leandro e Lenildo pela amizade e companheirismo.

Meus sogros Luís e Madalena pelo carinho, amizade, consideração e a compreensão de minha ausência em vários momentos.

A Eveline por “abrir as portas do laboratório” para mim e por ser uma grande pessoa, dando conselhos tanto na parte experimental quanto na pessoal, dedicando sua sabedoria e tempo. Uma pessoa com a qual aprendo muito e admiro. Peço desculpas pelos erros cometidos durante esse período.

A Priscila por ser uma orientadora diária de vários momentos e situações, pela paciência em compartilhar comigo o seu conhecimento, pela amizade,

consideração e por ser tão solícita com todos nós. Por ter me acolhido como aluna com tanta dedicação e também peço desculpas pelas falhas cometidas.

A Michelle por ter me ensinado vários experimentos com tanta dedicação, pelas dicas, com quem eu aprendi muito, pela amizade e consideração.

Aos companheiros de experimentos pela ajuda e aos amigos do laboratório pelos momentos de muita risada e pelo aprendizado diário: Thaís, Nayara, Danielle, Priscila, Lucas, Anna Cecília, Ayslan, Michelle, Gabriane, Leonardo, Carol, Wagner, Laura, Sólon, Flávia, Erick e Felipe.

Agradeço a todos os amigos e colaboradores que participaram desta importante etapa da minha vida!

RESUMO

A esquistossomose é uma doença que acomete cerca de 200 milhões de pessoas no mundo causando grande morbidade. Devido à falta de vacina para essa doença, muitos antígenos são pesquisados. Um domínio antigênico B (r156-195) da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* foi previamente descrito, e dois peptídeos sintéticos (SmB1LJ, r155-176; SmB2LJ, r175-194) derivados deste domínio foram obtidos com o objetivo de avaliar a imunogenicidade dessa proteína. O inóculo de cada peptídeo em camundongos BALB/c induziu atividade imunoestimulatória significativa, elevando os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2, como detectado por ELISA. Os anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ, quando imobilizados em Proteína A-Sepharose, imunoprecipitaram aproximadamente 42-96% da atividade ADPásica da preparação de verme adulto. Por “Western blots” do complexo imunoprecipitado, três bandas de 76, 63 e 55 kDa foram identificadas pelos dois soros imunes, confirmando a identidade da ATPDase 2, e sugerindo que esta proteína está sujeita a vários processamentos pós-tradução, tais como glicosilação e proteólise, resultando finalmente em uma proteína secretada de 55 kDa. Adicionalmente, anticorpos policlonais anti-SmB2LJ inibiram 62% e 37% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, enquanto anticorpos policlonais anti-SmB1LJ inibiram ADPase (92%), mas não atividade ATPásica, sugerindo que o domínio B da ATPDase 2 do *S. mansoni* está envolvido na regulação catalítica da enzima, sendo um novo alvo para o desenho de inibidores. Imunomarcação com anticorpos policlonais anti-SmB2LJ de cortes de fígado de camundongo infectado revelaram reações positivas na superfície externa do miracídio no ovo de *S. mansoni*. Fluorescência intensa foi detectada na região entre o miracídio e o lado interno da casca do ovo, localizada no envelope de von Lichtenberg, a qual é uma região de produção de componentes imunogênicos. Fluorescência foi também detectada no lado de fora da casca do ovo, aprisionada pelos microespinhos de superfície, confirmando que esta proteína, como no verme adulto, é também secretada de ovos de *S. mansoni*. Nenhuma reatividade foi observada nos

tecidos granulomatosos circundantes. Amostras de plasmas de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* foram testadas por ELISA usando SmB1LJ or SmB2LJ como antígeno. Reatividade significativamente maior de anticorpos IgG, IgG1 ou IgG2a foi detectada com SmB1LJ, enquanto somente anticorpo IgG1 foi altamente reativo com SmB2LJ. A reatividade de amostras de plasma (diluídas 1:200) de camundongos Swiss previamente inoculados com apirase de batata ou r-potDomínio B, um polipeptídeo com cauda de hexahistidina derivado do domínio B (r78-117) da apirase de batata, e homólogo ao domínio B da ATPDase 2, foi também testada por ELISA usando os peptídeos como antígenos. Anticorpos policlonais IgG e IgG1 anti-apirase de batata reagiram significativamente com SmB1LJ, enquanto somente IgG1 reagiu com SmB2LJ. Anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B não reagiram significativamente com SmB2LJ. Comparado aos controles, amostras de plasma (diluídas 1:200) destes animais pré-imunizados com apirase de batata ou r-potDomínio B e desafiados com *S. mansoni* não reagem significativamente com os peptídeos. Os resultados confirmaram que o domínio B da ATPDase 2 está potencialmente envolvido na resposta imune do hospedeiro, e os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ podem ser usados em estudos da esquistossomose.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, ATP difosfohidrolase, apirase de batata, peptídeos e imunolocalização.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease that affects approximately 200 million people worldwide causing great morbidity. Due to lack of vaccine for this disease, many antigens are searched. An antigenic domain B (r156-195) from the *Schistosoma mansoni* ATPDase 2 isoform was previously described, and two synthetic peptides (SmB1LJ, r155-176; SmB2LJ, r175-194) belonging to this domain were obtained. Inoculation of each peptide in healthy BALB/c mice induced significant immunostimulatory activity, increasing the IgG1 and IgG2a antibody levels, as detected by ELISA. The polyclonal anti-SmB1LJ and anti-SmB2LJ antibodies, when immobilized on Protein A-Sepharose, immunoprecipitated approximately 42-96% of the ADPase activity from the adult worm preparation. By Western blots of immunoprecipitated complex, three bands of 76, 63 and 55 kDa were identified by the two immune sera, confirming the ATPDase 2 identity, and suggesting that this protein is subject to several posttranslational processing, such as glycosylation and proteolysis, resulting finally in a secreted protein of 55 kDa. Additionally, polyclonal anti-SmB2LJ antibodies inhibited 62% and 37% of the ATPase and ADPase activities, respectively, whereas polyclonal anti-SmB1LJ antibodies inhibited ADPase (92%), but not ATPase activity, suggesting that the domain B from the *S. mansoni* ATPDase 2 is involved in enzyme catalytic regulation, being a new target for inhibitor design. Immunolabelled cryostat sections of infected mouse liver by the anti-SmB2LJ polyclonal antibodies revealed positive reactions on the external surface from the miracidium in the *S. mansoni* egg. Intense fluorescence was detected in the region between the miracidium and the inner side of the egg-shell, located in von Lichtenberg's envelope, which is a region of production of immunogenic components. Fluorescence was also detected in the outer side of the egg-shell and entrapped by the surface microspines, confirming that this protein, like in the adult worm, is also secreted from the *S. mansoni* eggs. No reactivity was observed in the surrounding granulomatous tissues, which are rich in inflammatory cells. Serum samples from *S. mansoni*-infected Swiss mice were tested by ELISA using SmB1LJ or SmB2LJ as coating antigen. Significantly

higher IgG, IgG1 or IgG2a antibody reactivity was detected against SmB1LJ, whereas only IgG1 antibody was highly reactive against SmB2LJ. The reactivity of plasma samples (diluted 1:200) from Swiss mice previously inoculated with potato apyrase or r-potDomain B, a 6xHis tag polypeptide belonging to the domain B (r78-117) from the potato apyrase, homologue to the domain B from the ATPDase 2, was also tested by ELISA using the peptides as coating antigens. Polyclonal IgG and IgG1 anti-potato apyrase antibodies significantly reacted with SmB1LJ, whereas only IgG1 reacted with SmB2LJ. Polyclonal anti-r-potDomain B antibodies did not significantly react with SmB2LJ. Compared to controls, plasma samples (diluted 1:200) from these animals pre-immunized with potato apyrase or r-potDomain B and challenged with *S. mansoni* did not react significantly with peptides. The results confirmed that the domain B from the ATPDase 2 is potentially involved in the host immune response, and peptides SmB1LJ and SmB2LJ can be used in schistosomiasis studies.

Key words: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, ATP diphosphohydrolase, potato apyrase, peptides, antibody, mouse, immunolocalization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Schistosoma mansoni</i>	14
1.2	Esquistossomose, a doença.....	18
1.3	Diagnóstico	20
1.4	Tratamento e Controle.....	21
1.5	Resposta imune na esquistossomose e as propostas de vacina.....	24
1.5.1	Propostas de vacina	27
1.6.	A família das ATP difosfohidrolases.....	31
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivos gerais	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Reagentes.....	38
3.2	Obtenção dos peptídeos sintéticos.....	38
3.3	Imunização de camundongos Balb/c com os peptídeos SmBLJ e SmB2LJ para a produção de anticorpos policlonais e quantificação por ELISA.....	38
3.4	Preparação do homogeneizado total de vermes adultos	40
3.5	Ensaio de inibição e imunoprecipitação enzimática por anticorpos.....	40
3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Western blot</i>	41
3.7	Purificação da apirase de batata	42
3.8	Obtenção do r-potDomínio B	42
3.9	Imunização de camundongos Swiss com apirase de batata ou peptídeos para a produção de anticorpos policlonais e quantificação por ELISA	43

3.10	Imunolocalização da ATP difosfohidrolase solúvel em ovos de <i>S. mansoni</i>	44
3.11	Infecção experimental e perfusão.....	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Propriedades imunoestimulatórias dos peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ em camundongos Balb/c	46
4.2	Potencial inibitório de anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ sobre a atividade fosfohidrolítica da preparação de vermes adultos	49
4.3	Identificação da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i> por anticorpos anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ	50
4.4	Imunolocalização da ATP difosfohidrolase solúvel (ATPDase 2) em ovos de <i>S. mansoni</i>	52
4.5	Reatividade dos peptídeos SmB1LJ ou SmB2LJ com plasmas de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i>	55
4.6	Reatividade dos peptídeos SmB1LJ ou SmB2LJ com plasmas de camundongos Swiss imunizados com a apirase de batata ou r-potDomínio B.....	58
4.7	Reatividade dos peptídeos SmB1LJ ou SmB2LJ com plasmas de camundongos Swiss imunizados com a apirase de batata ou r-potDomínio B e posteriormente infectados com <i>S. mansoni</i>	62
5	DISCUSSÃO	66
5.1	Caracterização dos peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ como novas moléculas para o estudo da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i> e imunolocalização dessa proteína	66
5.2	Avaliação da reatividade dos peptídeos com soro de camundongos imunizados com a apirase de batata e com r-potDomínio B e posteriormente infectados com <i>S. mansoni</i>	69
6	Conclusões	75

7	Perspectivas	76
8	Referências	78
9	Anexos	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	16
Figura 2	Ciclo biológico do parasito.....	18
Figura 3	Estados do Brasil com transmissão da infecção por <i>S. mansoni</i>	20
Figura 4	Resposta imune na esquistossomose.....	27
Figura 5	Imunolocalização da SmATPDase 2 de <i>S. mansoni</i>	35
Figura 6	Propriedades imunoestimulatórias do peptídeo sintético SmB1LJ derivado do domínio B conservado da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i>	47
Figura 7	Propriedades imunoestimulatórias do peptídeo SmB2LJ derivado do domínio B da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i>	48
Figura 8	Reatividade entre o peptídeo SmB1LJ ou da preparação de SWAP e os anticorpos IgGT, IgG1 ou IgG2a de camundongos BALB/c inoculados com o peptídeo SmB1LJ.....	50
Figura 9	Imunodepleção da atividade fosfohidrolítica de preparação de vermes adultos solubilizada em C12E9 por anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ imobilizados em proteína A Sepharose	51
Figura 10	Identificação da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i> usando anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ	52
Figura 11	Localização imunohistoquímica da ATPDase 2 no ovo de <i>S. mansoni</i> por anticorpos anti-SmB2LJ	54
Figura 12	Reatividade dos anticorpos IgGT, IgG1 ou IgG2a de camundongos Swiss	

	infectados com <i>S. mansoni</i> ou de camundongos Swiss saudáveis inoculados com o peptídeo SmB1LJ.....	56
Figura 13	Reatividade dos anticorpos IgGT, IgG1 ou IgG2a de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i> ou de camundongos Swiss saudáveis inoculados com o peptídeo SmB2LJ.....	57
Figura 14	Reatividade dos anticorpos IgGT, IgG1 e IgG2a de camundongos Swiss pré- imunizados com a apirase de batata ou com o peptídeo recombinante r-potDomínio B, usando o peptídeo SmB1LJ como antígeno em ELISA.....	59
Figura 15	Reatividade dos anticorpos IgGT, IgG1 e IgG2a de camundongos Swiss pré- imunizados com a apirase de batata ou com o peptídeo recombinante r-potDomínio B, usando o peptídeo SmB2LJ como antígeno em ELISA.....	60
Figura 16	Reatividade dos anticorpos IgGT, IgG1 e IgG2a de camundongos suíços pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B e infectados com <i>S. mansoni</i> , usando o peptídeo SmB1LJ como antígeno em ELISA.....	63
Figura 17	Reatividade dos anticorpos IgGT, IgG1 e IgG2a de camundongos suíços pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B e infectados com <i>S. mansoni</i> , usando o peptídeo SmB2LJ como antígeno em ELISA.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxa de reatividade IgG1/IgG2a de camundongos Swiss pré-imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B, com o adjuvante ou sem qualquer inóculo (Controle) usando os peptídeos SmB1LJ (A) e SmB2LJ (B) como antígenos em ELISA.....	61
Tabela 2	Taxa de reatividade IgG1/IgG2a de camundongos Swiss pré-imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B, com o adjuvante ou sem qualquer inóculo (Controle) e posteriormente infectados com <i>S. mansoni</i> usando os peptídeos SmB1LJ (A) e SmB2LJ (B) como antígenos em ELISA.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/v	massa/volume
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µl	Micro litro
µM	Micromolar
ACRs	Apyrase Conserved Regions
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
E-NTP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
G	Força gravitacional
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da subclasse IgG1
IgG2a	Imunoglobulina da subclasse IgG2a
IgG4	Imunoglobulina da subclasse IgG4
IgM	Imunoglobulina da classe M
kDa	Quilodáton
MOPS	Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NTPase	Nucleosídeo trifosfato hidrolase
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
OPD	o-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
sc	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS- Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SWAP	Antígenos Solúveis de Vermes adultos
SEA	Antígenos solúveis de ovos
Pi	Fosfato inorgânico
RPM	Rotações por minuto

RESUMO

A esquistossomose é uma doença que acomete cerca de 200 milhões de pessoas no mundo causando grande morbidade. Devido à falta de vacina para essa doença, muitos antígenos são pesquisados. Um domínio B antigênico da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* foi previamente descrito, e dois peptídeos sintéticos derivados deste domínio foram obtidos com o objetivo de avaliar a imunogenicidade dessa proteína. O inóculo de cada peptídeo em camundongos Balb/c induziu atividade imunoestimulatória significativa, elevando os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2, como detectado por ELISA. Os anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ, quando imobilizados em Proteína A-Sepharose, imunoprecipitaram aproximadamente 42-96% da atividade ADPásica da preparação de verme adulto. Por “Western blots” do complexo imunoprecipitado, três bandas de 76, 63 e 55 kDa foram identificadas pelos dois soros imunes, confirmando a identidade da ATPDase 2, e sugerindo que esta proteína está sujeita a vários processamentos pós-tradução, resultando em uma proteína secretada de 55 kDa. Adicionalmente, anticorpos policlonais anti-SmB2LJ inibiram 62% e 37% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente, enquanto anticorpos policlonais anti-SmB1LJ inibiram a atividade ADPásica (92%), mas não a ATPásica, sugerindo que o domínio B da ATPDase 2 de *S. mansoni* está envolvido na regulação catalítica da enzima, sendo um novo alvo para o desenho de inibidores. Imunomarcagem com anticorpos policlonais anti-SmB2LJ de cortes de fígado de camundongo infectado revelaram reações positivas na superfície externa do miracídio no ovo de *S. mansoni*. Fluorescência intensa foi detectada na região entre o miracídio e o lado interno da casca do ovo, localizada no envelope de von Lichtenberg, o qual é uma região de produção de componentes imunogênicos. Fluorescência foi também detectada no lado de fora da casca do ovo, aprisionada pelos microespinhos de superfície, confirmando que esta proteína, como no verme adulto, é também secretada de ovos de *S. mansoni*. Nenhuma reatividade foi observada nos tecidos granulomatosos circundantes. Amostras de plasmas de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* foram testadas por ELISA

usando SmB1LJ ou SmB2LJ como antígeno. Reatividade significativamente maior de anticorpos IgG, IgG1 ou IgG2a foi detectada com SmB1LJ, enquanto somente anticorpo IgG1 foi altamente reativo com SmB2LJ. A reatividade de amostras de plasma (diluídas 1:200) de camundongos Swiss previamente inoculados com apirase de batata ou r-potDomínio B, um polipeptídio com cauda de hexahistidina derivado do domínio B (r78-117) da apirase de batata, e homólogo ao domínio B da ATPDase 2, foi também testada por ELISA usando os peptídeos como antígenos. Anticorpos policlonais IgG e IgG1 anti-apirase de batata reagiram significativamente com SmB1LJ, enquanto somente IgG1 reagiu com SmB2LJ. Anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B não reagiram significativamente com SmB2LJ. Comparado aos controles, amostras de plasma (diluídas 1:200) destes animais pré-imunizados com apirase de batata ou r-potDomínio B e desafiados com *S. mansoni* não reagem significativamente com os peptídeos. Os resultados confirmaram que o domínio B da ATPDase 2 está potencialmente envolvido na resposta imune do hospedeiro e os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ podem ser usados em estudos da esquistossomose.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, ATP difosfohidrolase, apirase de batata, peptídeos, imunolocalização.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease that affects approximately 200 million people worldwide causing great morbidity. Due to lack of vaccine for this disease, many antigens are searched. An antigenic domain B from the *Schistosoma mansoni* ATPDase 2 isoform was previously described, and two synthetic peptides (SmB1LJ, r155-176; SmB2LJ, r175-194) belonging to this domain were obtained. Inoculation of each peptide in healthy BALB/c mice induced significant immunostimulatory activity, increasing the IgG1 and IgG2a antibody levels, as detected by ELISA. The polyclonal anti-SmB1LJ and anti-SmB2LJ antibodies, when immobilized on Protein A-Sepharose, immunoprecipitated approximately 42-96% of the ADPase activity from the adult worm preparation. By Western blots of immunoprecipitated complex, three bands of 76, 63 and 55 kDa were identified by the two immune sera, confirming the ATPDase 2 identity, and suggesting that this protein is subject to several posttranslational processing, resulting in a secreted protein of 55 kDa. Additionally, polyclonal anti-SmB2LJ antibodies inhibited 62% and 37% of the ATPase and ADPase activities, respectively, whereas polyclonal anti-SmB1LJ antibodies inhibited ADPase (92%), but not ATPase activity, suggesting that the domain B from the *S. mansoni* ATPDase 2 is involved in enzyme catalytic regulation, being a new target for inhibitor design. Immunolabelled cryostat sections of infected mouse liver by the anti-SmB2LJ polyclonal antibodies revealed positive reactions on the external surface from the miracidium in the *S. mansoni* egg. Intense fluorescence was detected in the region between the miracidium and the inner side of the egg-shell, located in von Lichtenberg's envelope, which is a region of production of immunogenic components. Fluorescence was also detected in the outer side of the egg-shell and entrapped by the surface microspines, confirming that this protein, like in the adult worm, is also secreted from the *S. mansoni* eggs. No reactivity was observed in the surrounding granulomatous tissues, which are rich in inflammatory cells. Serum samples from *S. mansoni*-infected Swiss mice were tested by ELISA using SmB1LJ or SmB2LJ as coating antigen. Significantly higher IgG, IgG1 or IgG2a antibody reactivity was

detected against SmB1LJ, whereas only IgG1 antibody was highly reactive against SmB2LJ. The reactivity of plasma samples (diluted 1:200) from Swiss mice previously inoculated with potato apyrase or r-potDomain B, a 6xHis tag polypeptide belonging to the domain B (r78-117) from the potato apyrase, homologue to the domain B from the ATPDase 2, was also tested by ELISA using the peptides as coating antigens. Polyclonal IgG and IgG1 anti-potato apyrase antibodies significantly reacted with SmB1LJ, whereas only IgG1 reacted with SmB2LJ. Polyclonal anti-r-potDomain B antibodies did not significantly react with SmB2LJ. Compared to controls, plasma samples (diluted 1:200) from these animals pre-immunized with potato apyrase or r-potDomain B and challenged with *S. mansoni* did not react significantly with peptides. The results confirm that the B domain of ATPDase 2 is potentially involved in the host immune response and peptides SmB1LJ SmB2LJ and can be used in schistosomiasis studies.

Key words: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, ATP diphosphohydrolase, potato apyrase, peptides, antibody, mouse, immunolocalization.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Schistosoma mansoni*

O gênero *Schistosoma* pertence à classe Trematoda, família Schistosomatidae e subfamília Schistosomatinae. Representantes dessa subfamília apresentam um acentuado dimorfismo sexual, são heteroxênicos e parasitam os vasos sanguíneos de mamíferos, os quais são seus hospedeiros definitivos. As espécies do gênero *Schistosoma* com importância epidemiológica na medicina humana são: *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*; sendo as três últimas os principais agentes etiológicos para a patologia humana com distribuição geográfica diferente, além de características morfológicas e fisiológicas próprias (Neves, 2005; Ross et al., 2002).

Schistosoma haematobium, que tem como hospedeiro intermediário caramujos do gênero *Bulinus*, situa-se no plexo vesical, sendo a espécie responsável pela esquistossomose urinária na África e Península Arábica. O *Schistosoma japonicum* que tem o molusco *Oncomelania* como vetor, causa a esquistossomose hepatoesplênica e intestinal na China, Filipinas e Indonésia. O parasito *S. mansoni* é mantido no ambiente por caramujos *Biomphalaria*, é responsável pela doença em sua forma hepática e intestinal na África, Península Arábica e América do Sul (Gryseels et al., 2006).

No Brasil, o agente causador da esquistossomose humana é o *S. mansoni* (Chitsulo et al., 2000). Para a manutenção de seu ciclo biológico são necessárias as formas: verme adulto-macho e fêmea, ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O verme macho (**Figura 1**) mede cerca de 1 cm, tem cor esbranquiçada, tegumento recoberto por tubérculos e o corpo dividido em duas porções: a porção anterior do corpo é composta por duas ventosas, uma oral e outra ventral (acetábulo); já na parte posterior há o canal ginecóforo, que são dobras das laterais do corpo no sentido longitudinal, onde a fêmea é albergada e fecundada. A fêmea por sua vez possui cerca de 1,5 cm, tegumento liso e tem cor mais escura devido ao ceco contendo uma quantidade maior de sangue semidigerido. O ovo mede por volta de 140 por 61 µm e tem um espinho lateral saliente e agudo, sendo essa a principal

característica para a identificação de um ovo de *S.mansoni*. O que caracteriza o ovo maduro é a existência de um miracídio formado que tem na extremidade anterior o *terebratorium*, onde se encontram as terminações das glândulas adesivas; essa forma evolutiva do ciclo também apresenta células epidérmicas onde se implantam cílios que permitem o movimento no meio aquático. Em duas horas após a penetração, os miracídios perdem o seu revestimento epitelial ciliado e demais estruturas externas (órgãos de penetração). Nas fases seguintes (esporocistos) do desenvolvimento intramolusco, as células germinativas se dividem e se diferenciam, mantendo o mesmo sexo do miracídio que as originou. O esporocisto não possui boca e nem sistema digestivo, portanto os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento são absorvidos através de seu tegumento. A cercária, forma infectante para o homem, possui 500 µm de comprimento, tem corpos alongado e cilíndrico, uma cauda bifurcada que é fundamental para o deslocamento no ambiente e duas ventosas, uma oral e outra ventral. A transformação de cercarias em esquistossômulos é representada por respiração anaeróbica, perda da cauda, eliminação progressiva do glicocálix, esvaziamento das glândulas secretoras e reorganização do tegumento, com acúmulo de uma proteína transportadora de glicose (SGTP4) na rede de cítons subtegumentares (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008; Schall, 2007; Ross et al., 2002).

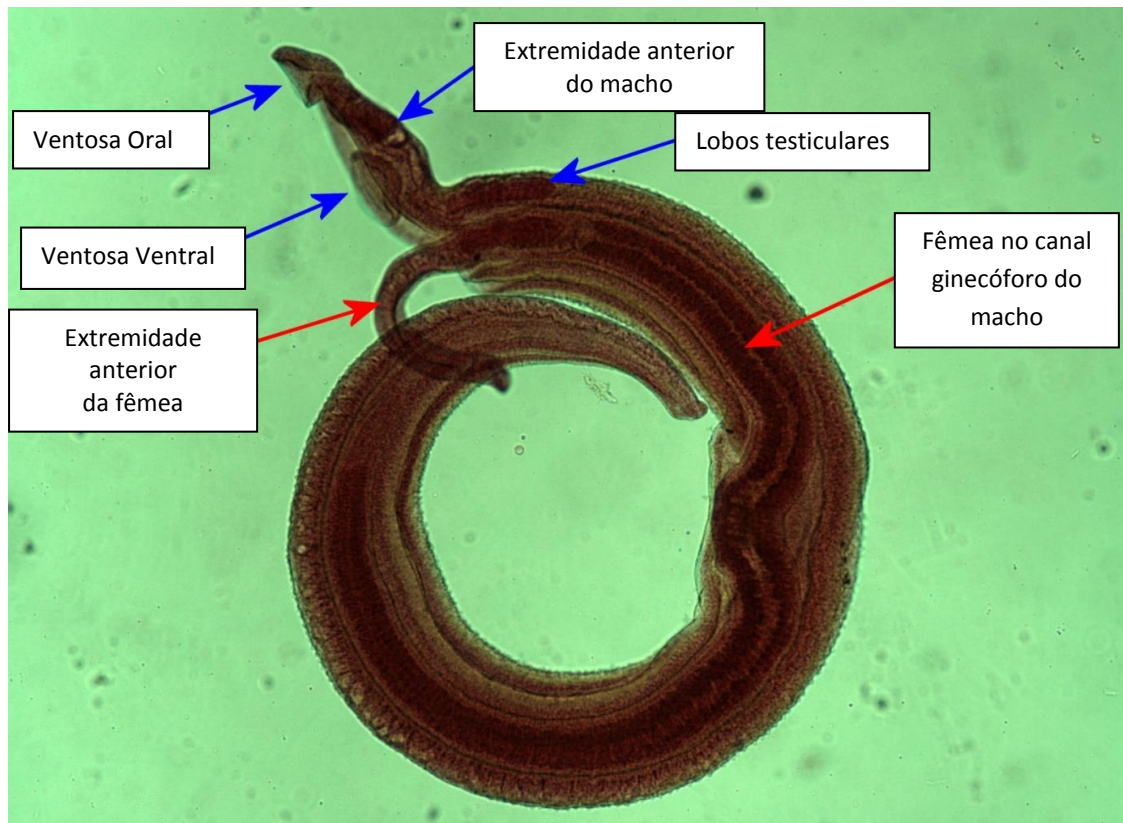


Figura 1. Vermes adultos acasalados de *S. mansoni*. Aumento de 40x. Adaptado de <http://belanich.pbworks.com/w/page/13055428/Trematodes>

O parasito *S. mansoni* tem um ciclo de vida complexo (**Figura 2**) que envolve um hospedeiro intermediário, o molusco aquático do gênero *Biomphalaria*, e um hospedeiro definitivo vertebrado (homem e outros mamíferos). Essa espécie desenvolve sua fase adulta parasitando a luz dos vasos sanguíneos de seus hospedeiros mamíferos, onde habita preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior e nas ramificações mais finas das veias mesentéricas, principalmente a inferior, local de oviposição das fêmeas. A produção de ovos, cerca de 150 a 300 ovos por dia (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008), tem início 4 a 6 semanas após a infecção e continua por toda a vida do verme, que pode ser até mais de 15 anos no hospedeiro definitivo (McManus & Loukas, 2008).

Após atravessarem a mucosa intestinal, cerca de metade dos ovos são eliminados com as fezes atingindo o meio externo e os outros 50% são carregados pela circulação portal e ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, podendo induzir a formação de granulomas hepáticos e intestinais, hepatoesplenomegalia e fibrose peritportal (Jurberg, 2006). O trajeto dos ovos

entre a oviposição e a eliminação nas fezes demora cerca de uma semana. No ambiente externo, os ovos mantêm-se viáveis de 2 a 5 dias na massa fecal sólida, porém em fezes líquidas podem sobreviver por até 3 dias devido a processos de fermentação ou de putrefação (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008; Rey, 2008).

Os ovos que conseguem chegar a tempo viável na água e são estimulados por luminosidade intensa, temperaturas mais altas e oxigenação, sofrem ruptura transversal e liberam suas larvas, os miracídios. Estes nadam em círculos por algumas horas até encontrar moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, e esse encontro é favorecido por substâncias secretadas pelo molusco, as quais fazem com que haja atração miracidiana em relação aos moluscos (Rey, 2008). A penetração dos miracídios deve ocorrer em um período de cinco até oito horas após a eclosão, visto que após esse tempo, a capacidade de penetração fica bastante reduzida (Jurberg, 2006).

Após 72 horas, ocorre a transformação do miracídio em um saco com paredes cuticulares contendo a geração das células germinativas ou reprodutivas que é o esporocisto (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008). Em condições ideais de temperatura, entre 25°C e 28° C, ocorre a formação dos esporocistos secundários. Cerca de 3 a 4 semanas após a infecção do molusco, ocorre a maturação dos esporocistos filhos e a formação de cercárias que é dependente da temperatura ambiente tanto para a maturação quanto para o desenvolvimento. A liberação dessas larvas é estimulada pela luminosidade e temperatura, ocorrendo principalmente durante as horas mais quentes do dia (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008; Gryseels et al., 2006).

Em contato com a água contaminada, o hospedeiro humano se infecta através da penetração ativa das cercárias na pele onde, posteriormente, essas perdem a cauda e se transformam em vermes jovens ou esquistossômulos. Estes vermes jovens migram via circulação sanguínea para os pulmões, coração e fígado. Os esquistossômulos maturam, se transformam em vermes adultos no sistema porta-hepático entre quatro e seis semanas após a infecção, se acasalam e migram para os vasos mesentéricos e veia porta, onde ocorre a oviposição, iniciando o ciclo novamente (Han et al., 2009; Gryseels et al., 2006; Neves, 2005).

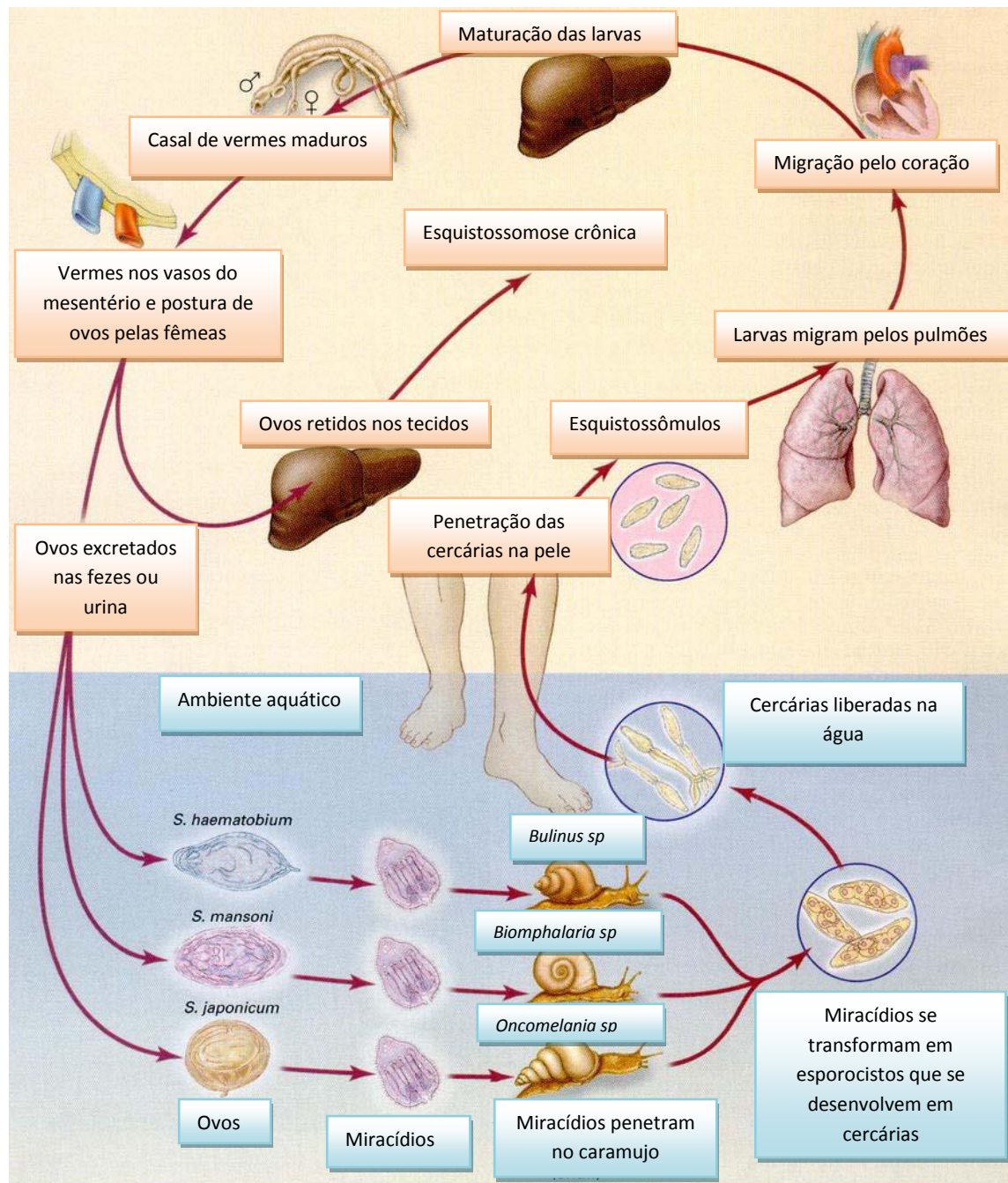


Figura 2. Ciclo biológico do parasito. Extraído e Adaptado de Ross et al., 2002.

1.2. ESQUISTOSSOMOSE, A DOENÇA

No Brasil, cerca de 30 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a esquistossomose e estima-se que 4 a 6 milhões de indivíduos estão infectados com o *S. mansoni* sendo a região Nordeste do país a área mais endêmica (Gomes et al., 2012; Lambertucci, 2010). A transmissão da doença

em nosso país ocorre em uma vasta área endêmica que abrange o Maranhão até Espírito Santo e Minas Gerais (**Figura 3**). Há também focos isolados no Distrito Federal, e em estados como Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, existem casos importados de área endêmica registrados em quase todo o território nacional, principalmente, nos estados que são considerados pontos de migração. Em diferentes áreas endêmicas do Brasil, os índices de prevalência e morbidade estão reduzindo, no entanto a transmissão ainda mantém níveis significativos. O padrão de distribuição espacial da doença indica que a dinâmica de transmissão do *S. mansoni* depende do inter-relacionamento entre o ecossistema, as pessoas e suas condições sociais (Coura & Amaral, 2004; Rokni, 2012).

Prurido e pápulas eritematosas podem surgir posteriores à penetração das cercárias, mas essa dermatite não é frequente na população de área endêmica. Os indivíduos infectados podem apresentar um quadro clínico assintomático que é comum em populações de áreas endêmicas. No entanto, diferentes intensidades de manifestações clínicas são observadas, alguns pacientes evoluem com um quadro relativamente grave, enquanto outros desenvolvem sintomas leves. Os sintomas iniciais, como febre, mal-estar, marcada eosinofilia, dores abdominais e diarreia, os quais caracterizam a forma aguda da doença podem começar duas a seis semanas após a penetração das cercárias na pele (Rey, 2008; Rabelo, 1995).

Os esquistossomos podem alcançar o sistema nervoso central (SNC) a qualquer momento, a partir do instante em que os vermes amadurecem e ocorre a oviposição, mas os casos de migração anômala são incomuns (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008). Devido a isso o envolvimento do SNC pode ocorrer em qualquer estágio clínico da infecção esquistossomótica (Lambertucci et al., 2000). A forma medular é a mais conhecida da neuroesquistossomose (Ferrari et al., 2011).

A fase crônica da esquistossomose mansônica tem início após seis meses de infecção, se não tratada pode se estender por vários anos, sem evidências de eliminação de vermes adultos durante a infecção. Clinicamente a maioria dos pacientes que vivem em área endêmica, apresenta as formas assintomática, intestinal ou hepatointestinal, não apresentando sinais e

sintomas graves, sendo estes limitados a um ligeiro desconforto abdominal associado a uma diarreia. Essa fase intestinal pode persistir por anos, pela dificuldade no diagnóstico e devido a pouca intensidade de infecção (Ministério da Saúde, 2005; Lambertucci et al., 2000).

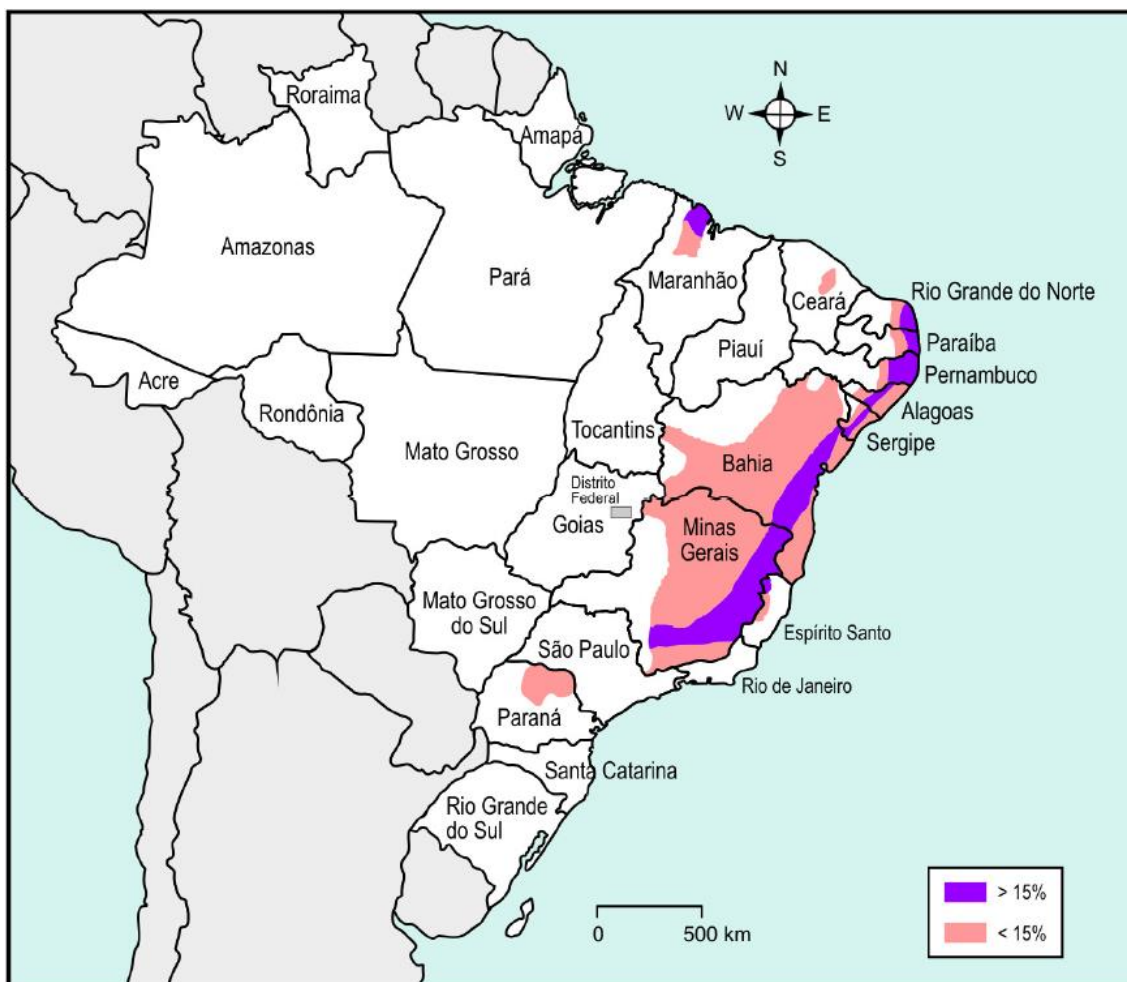


Figura 3. Estados do Brasil com infecção por *S.mansoni*. Extraído de: Rokni, 2012.

1.3. DIAGNÓSTICO

Os métodos de diagnóstico da esquistossomose podem ser agrupados em duas categorias: os métodos de diagnóstico direto, que detectam o parasito ou suas partes, e os métodos indiretos que identificam evidências indiretas da presença do parasito (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008).

O diagnóstico mais utilizado é a realização do exame parasitológico de fezes (diagnóstico direto), preferencialmente através do método Kato-Katz, o qual permite a visualização e contagem dos ovos por grama de fezes,

fornecendo assim, um indicador seguro para avaliar a intensidade da infecção e eficácia do tratamento (Ministério da Saúde, 2005). No entanto a detecção direta de ovos nas fezes não é possível em infecções pré-patentes e o diagnóstico é difícil naqueles pacientes com baixa taxa de eliminação de ovos (Zhao et al., 2012).

A biópsia ou Raspagem da Mucosa Retal também pode ser feita, mas somente em casos especiais já que é um procedimento invasivo, e tem como principal vantagem a maior sensibilidade e verificação mais rápida do efeito quimioterápico. Testes de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em amostras de fezes, soro e plasma para detecção de DNA do parasito mostram-se úteis, mas ainda não estão disponíveis na rotina (Gray, 2011).

Os métodos imunológicos ou indiretos medem a resposta do organismo hospedeiro frente a antígenos do parasito. O imunodiagnóstico, neste caso, depende principalmente de anticorpos para detectar antígenos e destes para a detecção de anticorpos (Sturrock, 2001), porém como os anticorpos persistem depois da cura parasitológica, as técnicas baseadas na pesquisa de anticorpos podem ser limitadas, não distinguindo história de exposição da infecção ativa (Ross et al., 2002). A maioria das técnicas de rotina detectam IgG, IgM ou IgE contra antígenos solúveis do verme ou antígenos solúveis do ovo por ELISA, Hemaglutinação Indireta e Imunofluorescência (Gryseels et al., 2006; Ross et al., 2002).

Os métodos de imagem também podem ser utilizados para detecção das lesões provocadas por *S. mansoni*, particularmente no fígado e no sistema porta. Esses métodos são a ultrassonografia (USG), a ressonância magnética, a tomografia computadorizada, a cintilografia e a esplenoportografia. Dentre eles, a USG é o mais utilizado por ser não invasivo, de simples realização, não ter desvantagens da irradiação e ser comparativamente mais barato (Carvalho, Coelho & Lenzi, 2008).

1.4. TRATAMENTO E CONTROLE

O tratamento para a esquistossomose é importante não apenas visando a cura da doença ou a diminuição da carga parasitária, mas também impedir a sua evolução para formas mais graves (Ministério da Saúde, 2005).

O Praziquantel, descoberto em meados de 1970 (Ross et al., 2002), é a droga de escolha para tratar a esquistossomose (Fenwick, 2006), o Ministério da saúde recomenda o tratamento de indivíduos infectados com doses únicas de praziquantel de 50-60 mg/Kg como forma de prevenção do aumento da morbidade e o estabelecimento de medidas de controle auxiliares tais como, educação, saúde e saneamento ambiental para reduzir a transmissão da doença (Galvão et al., 2010). Uma repetição da dose pode ser feita de 6-12 semanas mais tarde visando a cura de infecções pré-patentes, principalmente se for diagnosticada uma eosinofilia elevada com altos títulos de anticorpos e/ou sintomas persistentes (Gryseels et al., 2006).

O mecanismo de ação preciso do praziquantel não é completamente conhecido, apresenta efeitos mais intensos sobre os vermes adultos, com pouca ou nenhuma ação sobre os ovos do parasito e vermes imaturos (Gryseels et al., 2006). Interage com proteínas específicas do parasito que regulam o fluxo de cálcio, levando a um rápido influxo desse elemento para dentro do verme (Cioli et al., 1995; Talima et al., 2007), a consequência desse influxo é a contração instantânea da musculatura e vacuolização do tegumento do parasito (Esmat et al., 2009). Isso faz com que os canais de cálcio sejam indiretamente identificados como alvo molecular da droga (Gray et al., 2011). O Praziquantel inibe completamente o sistema excretor do esquistossomo macho adulto (Oliveira et al., 2006). Um dos efeitos desse fármaco é o rompimento do tegumento com subsequente exposição de antígenos permitindo o ataque posterior do sistema imunológico do hospedeiro (Ribeiro et al., 2004).

Como o seu mecanismo exato de ação não está esclarecido, a resistência à droga pode ter implicações preocupantes (Greenberg, 2004). No Egito, onde a droga é amplamente usada, estudos de campo mostraram que uma pequena porcentagem dos parasitos não morre (1-2,4%) mesmo depois da administração repetida de doses elevadas do praziquantel (Ismail et al., 1996).

Diferente do praziquantel que possui atividade contra todos os tipos de espécies de esquistossomos, a oxaminiquina, droga descrita e produzida na década de 60, possui atividade restrita ao *S. mansoni*. Uma hipótese para o seu mecanismo de ação é baseada nos efeitos anticolinérgicos, resultando na perturbação da motilidade, interrompendo o peristaltismo e consequentemente

a alimentação do parasito. Pode ocorrer também a inibição da síntese de ácido nucléico do parasito (Abdul-Ghani et al., 2009). Em associação com o praziquantel, a oxaminiquina apresenta taxa de cura de 40-50% na esquistossomose aguda (Lambertucci, 2010).

Derivados da artemisina são efetivos contra os estágios imaturos de *S. japonicum*, *S. mansoni* e possivelmente *S. haematobium* (Shuhua et al., 2002), mas há limitações em relação à utilização desses na quimioterapia esquistossomicida, uma vez que possuem uma meia vida curta (Abdul-Ghani et al., 2009). Artemether, um desses derivados, tem forte atividade contra os esquistossômulos cerca de 21 dias após a infecção (Ribeiro-dos Santos et al., 2006) e induz resistência à reinfecção contra *S. mansoni* em camundongos (Bergquist et al., 2004). Mirazid®, droga patenteada feita a partir do extrato de Mirra, tem sido prescrita no Egito para o uso clínico em infecções por *Fasciola hepatica* e esquistossomos, mas seu papel na terapia não está esclarecido, uma vez que seu mecanismo de ação sobre *S. mansoni* é desconhecido e a atividade esquistossomicida é controversa (Abdul-Ghani et al., 2009). Esse fármaco causa a separação macho-fêmea devido à perda permanente da musculatura (Esmat et al., 2009).

Têm sido estudados os efeitos de novas drogas esquistossomicidas, os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos. Estes compostos mostraram uma significativa especificidade contra as fêmeas do parasito (64-100% redução) e uma redução de 31-61% de vermes machos em camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* (Moreira et al., 2007). Esses ácidos também inibiram a atividade da ATP difosfohidrolase tegumentar de *S. mansoni*, bem como a atividade da apirase de batata (*Solanum tuberosum*), enzima estruturalmente similar à do parasito. (Penido et al., 2006).

Embora haja tratamento eficaz disponível, devido a condições socioeconômicas dos países endêmicos, a reinfecção é altamente prevalente e pode levar ao estabelecimento da patologia (Dutra et al., 2002). Um estímulo importante para desenvolver novas abordagens preventivas para a esquistossomose é a observação da repercussão dessa morbidade. Até 80% das crianças que vivem em áreas de alta transmissão da doença podem sofrer inflamação agressiva recorrente por causa da reinfecção em função da interrupção da quimioterapia (Hotez et al., 2010).

O controle da esquistossomose é dificultado em razão de diversos fatores, tais como: a ampla difusão dos hospedeiros intermediários; a frequência do contato humano com a água em atividades de trabalho agrícola, doméstico e/ou por lazer; o tempo necessário para a educação sanitária e para a aderência da comunidade aos programas de controle; a falta de água potável; as limitações do tratamento individual e em massa e à escassez de abordagens preventivas associadas às ações curativas nos serviços de educação e/ou de saúde (Coura et al., 2004). Além disso, estratégias de prevenção baseadas no contexto social da esquistossomose também podem ter impacto sobre outras doenças que são alvo para o controle preventivo (Bruun & Aagaard-Hansen, 2008).

1.5. RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE E AS PROPOSTAS DE VACINA

A penetração da cercária na pele gera uma mínima resposta imune. Esta resposta pode ser uma adaptação física e bioquímica da larva neste novo ambiente e para isto, ocorrem mudanças como a perda da cauda e do glicocálix, o qual recobre a membrana larval, havendo também a liberação de proteínas com propriedades imunoregulatórias (Hansell et al., 2008; Jenkins et al., 2005).

Nas primeiras 3-5 semanas após a infecção esquistossomótica (**Figura 4**), onde o hospedeiro é exposto à migração dos parasitos imaturos, há a predominância de uma resposta Th1 (Pearce & Macdonald, 2002), com níveis maiores de leucócitos e eosinofilia no sangue periférico na fase aguda (Caldas et al., 2008). Essa resposta Th1 é caracterizada por aumento nos níveis de citocinas pro-inflamatórias circulantes como TNF- α e IFN- γ (Schramm et al., 2010; Pearce & Macdonald, 2002; Wilson et al., 2006). Em camundongos esse perfil de resposta tem um papel protetor e também regulador da resposta Th2 (Khalife et al., 2000).

À medida que os parasitos tornam-se adultos, acasalam-se e começam a produzir ovos (5-6 semanas), a resposta é alterada para um perfil Th2 (Pearce & Macdonald, 2002), com alta produção de IL-4, IL-5, IL-13 e síntese de IgE, resultando em eosinofilia e mastocitose (Rutitzky & Stadecker, 2006;

Schramm et al., 2010). A IL-4, que é uma citocina importante na polarização da resposta Th2, dirigindo o desenvolvimento da resposta granulomatosa, estimula a produção de IgE e não é requerida no desenvolvimento da fibrose, porém, aumenta os efeitos da IL-13 sobre a fibrogênese (Burke et al., 2009; Fallon et al., 2000).

Embora a resposta Th2 inicialmente seja para conter o parasito e proteger o hospedeiro, ela pode causar danos durante a infecção crônica, podendo contribuir para a fibrose severa e hipertensão portal em alguns indivíduos cronicamente infectados (Wynn et al., 2004). Nesta fase, o controle desse perfil de resposta é feito pela IL-10, Tregs e macrófagos ativados alternativamente (Schramm et al., 2010).

Nas infecções por qualquer espécie de *Schistosoma*, a patologia crônica não é devida aos parasitos adultos, mas correlaciona-se com a resposta imunológica do hospedeiro dependente das células T que é dirigida contra os ovos do esquistossomo. Estes ovos ficam aprisionados no tecido do hospedeiro, principalmente no fígado e intestino (locais com sinusóides pequenos que dificultam a passagem dos ovos). Os ovos aderidos no tecido, ainda viáveis, secretam várias moléculas antigênicas que levam a uma inflamação granulomatosa programada por células TCD4+, envolvendo eosinófilos, monócitos, além dos linfócitos (McManus & Loukas, 2008; Pearce & Macdonald, 2002).

À medida que esses ovos morrem, o granuloma tende a se resolver formando uma rede de fibras colágenas. Uma consequência grave é o aumento da pressão sanguínea portal. A resposta Th2 prolongada contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática e morbidade crônica, contribuindo assim para a sobrevivência do hospedeiro, tanto em humanos quanto em camundongos. A IL-13 é a principal citocina responsável pela fibrose hepática no modelo murino (Pearce & Macdonald, 2002).

Uma terceira subpopulação de células TCD4+, as células Th17, tem sido investigada sobre seu papel na esquistossomose (Burke et al., 2009). Inicialmente, acreditava-se que a imunopatologia inicial causada pelos ovos do parasito e agravada com a imunização de camundongos com SEA e CFA fosse mediada por células Th1 devido aos altos níveis de IFN- γ associados à doença. Mas estudos recentes tem revelado que o desenvolvimento dos granulomas é

primariamente dependente da resposta Th17 (Hammerich et al., 2010; Rutitzky et al., 2001). E a neutralização da IL-17, citocina produzida por células Th17, resulta em inibição da imunopatologia, denotando seu papel direto na patogênese da inflamação granulomatosa (Rutitzky & Stadecker, 2011).

Em relação aos mecanismos efetores dirigidos contra o parasito *S. mansoni*, vários estudos tem mostrado que os anticorpos são citotóxicos para esquistossômulos na presença de células efectoras, incluindo eosinófilos, macrófagos e plaquetas. Na esquistossomose em ratos, a imunidade humoral parece desempenhar um papel crítico como mecanismo de defesa, enquanto que as respostas mediadas por células são insignificantes. Neste modelo, foi mostrado que IgG2a e IgE (anticorpos anafiláticos) são capazes de mediar a morte dos esquistossômulos *in vitro* na presença de eosinófilos. Na esquistossomose humana, os mecanismos diretamente efetores tem sido atribuídos aos anticorpos IgG1 e IgG3 (Khalife et al., 2000).

Em relação a resistência à doença, existem evidências clínicas e epidemiológicas de que as pessoas que vivem em áreas endêmicas adquirem alguma forma de resistência imunológica após anos de exposição. A realização de estudos comparativos de resistência após tratamento curativo mostrou que crianças são muito mais susceptíveis do que os adultos e essas diferenças não podem ser explicadas por diferentes padrões de contato com a água. É sugerido que a imunidade adquirida pode ser mediada por IgE, contra antígenos da larva e dos vermes adultos (Gryseels et al., 2006), porém, indivíduos que vivem em áreas endêmicas, mas nunca foram infectados com *S. mansoni* possuem altos níveis de IgE contra antígenos do parasito. É proposto que os indivíduos naturalmente resistentes à reinfecção apresentem forte resposta Th2, com predomínio de IgE como fator protetor contra a infecção (Dutra et al., 2002; Pearce & Macdonald, 2002).

A análise da resposta de anticorpos de pacientes de áreas endêmicas mostrou que o desenvolvimento lento de imunidade à reinfecção após o tratamento é parcialmente atribuído à presença continuada de anticorpos bloqueadores em indivíduos susceptíveis (Correa-Oliveira et al., 2000). Altos níveis de anticorpos IgE e IgG4 são produzidos durante a infecção por esquistossomos (Capron et al., 2005). Anticorpos IgG4 de humanos interferem na degranulação de mastócitos mediada por IgE, podendo também reduzir as

consequências danosas de qualquer reatividade alérgica induzida por IgE (Correa-Oliveira et al., 2000). Níveis elevados de IgG4 estão associados ao aumento da susceptibilidade à reinfecção por esquistossomos. E a associação entre altos níveis de IgG4 e susceptibilidade foi proposto como um resultado do efeito bloqueador dessa imunoglobulina sobre o efeito protetor de IgE (Demeure et al., 1993).

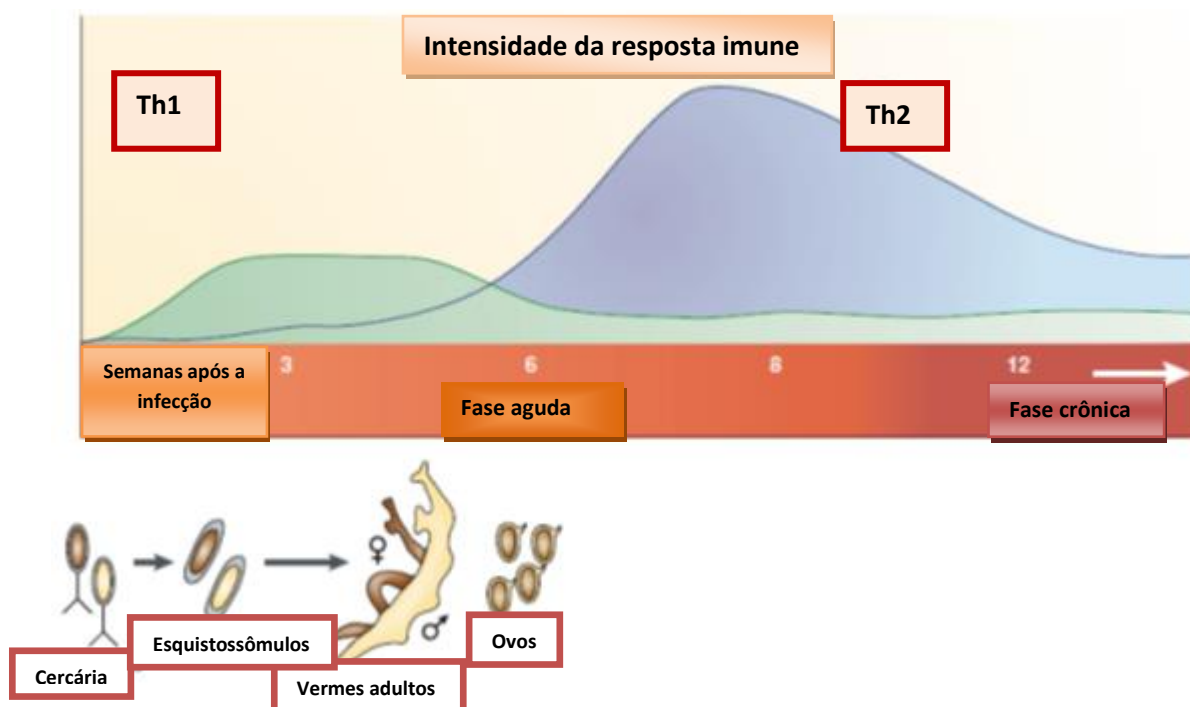


Figura 4. Resposta imune na esquistossomose. Extraído e adaptado de Pearce & Macdonald, 2008.

1.5.1. PROPOSTAS DE VACINA

Apesar do considerável progresso quimioterápico e da existência de moléculas altamente eficazes, como o praziquantel (PZQ), ainda há uma propagação da esquistossomose para novas áreas. Altas taxas de re-infecção após o tratamento em larga escala limitam a estratégia baseada apenas na quimioterapia (McManus & Loukas, 2008). O principal desafio no desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose será a identificação de antígenos que estimulem uma resposta imune apropriada e leve o indivíduo à resistência contra uma infecção (Yang et al., 2000).

Como os esquistossomos não se replicam dentro de seus hospedeiros mamíferos, uma vacina que induza a imunidade adquirida pode diminuir a

patologia humana e a transmissão da doença. A vacinação pode ser direcionada para a prevenção e/ou para reduzir a fecundidade do parasito (McManus & Loukas, 2008). Mais de cem antígenos de esquistossomos já foram identificados e caracterizados, mas menos de 10% deles tem sido promissores e por isso, são selecionados para um desenvolvimento posterior (Bergquist & MacManus, 2008).

Os principais alvos dos programas de desenvolvimento de vacinas contra a esquistossomose são as proteínas da membrana, identificadas em estudos conjuntos de genômica, proteômica e análises da superfície externa ou do tegumento de *S. mansoni* adulto. Apesar de poucas proteínas do tegumento interagirem diretamente com o sistema imunológico do hospedeiro, existem, em estudos, antígenos tegumentares promissores como possíveis candidatos na formulação de vacinas (Loukas et al., 2007).

A Sm23, uma tetraspanina, mostrou-se mais eficaz quando testada como vacina de DNA e não conferiu proteção como proteína recombinante quando formulada com alúmen (DA'Dara et al., 2003; McManus & Loukas, 2008). Outra tetraspanina, TSP-2, é fortemente reconhecida por anticorpos IgG1 e IgG3 (mas não IgE) de indivíduos naturalmente resistentes, diferente dos pacientes cronicamente infectados ou não expostos (Tran et al., 2006). A Sm29, proteína expressa no tegumento de *S. mansoni*, quando utilizada como candidata a vacina na forma recombinante, induziu altos níveis de proteção em camundongos, associada a uma resposta tipo Th1, redução da carga de vermes, do granuloma hepático e de ovos no intestino (Cardoso et al., 2008).

Atualmente há um antígeno recombinante bastante estudado no Brasil, o Sm14, um potencial candidato a vacina (Oliveira et al., 2008). Este antígeno é uma proteína ligadora de ácido graxo que em experimentos com camundongos e coelhos forneceu proteção contra *S. mansoni* (Tandler & Simpson, 2008). Houve uma alta reatividade desta proteína com anticorpos IgG1 e IgG3 em soros de pacientes com esquistossomose, sendo essas subclasses de imunoglobulinas associadas à eliminação do parasito (Brito et al., 2000). Fonseca e cols. (2006) relataram que a imunização de camundongos com a vacina de DNA Sm14 coadministrada com um plasmídeo expressando IL-12 induziu uma menor proteção em relação àquela induzida pela vacina de DNA sozinha, a qual apresentou 40% de proteção.

Outro candidato potencial a vacina que está em desenvolvimento clínico é o Smp80, uma calpaína presente na membrana interna do tegumento e com papel importante na renovação do mesmo (McManus & Loukas, 2008). Como vacina de DNA mostrou 46% de redução na carga de vermes e uma redução de 28% na produção de ovos em babuíños imunizados com a Sm-p80-VR1020 (Zhang et al., 2010).

A Sm28-GST é uma proteína expressa nos tecidos subtegumentares da maioria dos estágios do parasito e na forma recombinante a mesma reduziu significativamente o número de vermes em ratos e hamsters (McManus & Loukas, 2008). Outro antígeno promissor como candidato à vacina é o Sm97 (paramiosina), foi demonstrado que as subclasses de anticorpos IgG1 e IgG4 contra o mesmo são consideradas marcadores de altos níveis de infecção (Ribeiro de Jesus et al., 2000). Em relação ao perfil de resposta de linfócitos T helper, o Sm97 induziu uma mistura de resposta Th1/Th2, com inclinação para o perfil Th2 (Al-Sherbiny et al., 2003).

O antígeno do ovo de *S. mansoni*, Smp40, tem um papel importante na dessensibilização das células TCD4+ que medeiam a formação do granuloma, e este evento pode ser usado como estratégia para prevenir ou melhorar os sinais clínicos da esquistossomose, sendo, portanto, outro promissor candidato a vacina (Abouel-Nour et al., 2006).

A vacinação utilizando peptídeos sintéticos contendo epítomos imunodominantes de antígenos vacinais compreende uma estratégia alternativa no desenvolvimento de uma vacina, uma vez que esses são facilmente produzidos (Oliveira et al., 2008). A MAP4, obtida na forma de peptídeo sintético a partir da enzima triose fosfato isomerase, tem epítomos para células B e T e tem sido avaliada como potencial candidata a vacina (Reis et al., 2008). Apesar de ser capaz de produzir resposta humoral significativa, não há predisposição para proteção ou susceptibilidade (Al-Sharbiny et al., 2003).

A SmATPDase 2 de *S. mansoni* foi identificada em cercárias, esquistossômulos, miracídio e verme adulto (Levano-Garcia et al., 2007) e pode estar associada aos mecanismos de defesa do sistema imune contra o parasito em vários estágios da doença. Análises de bioinformática permitiram a identificação de um domínio extenso, de 40 aminoácidos, compartilhado entre a

proteína vegetal (apirase de batata) e a ATPDase 2 de *S. mansoni* (Faria-Pinto et al., 2008 a e b; Vasconcelos et al., 2009), também conservado em isoformas de organismos patogênicos filogeneticamente distantes (Maia, 2010).

O inóculo do r-potDomB, domínio B recombinante da apirase de batata, mostrou-se imunoestimulatório ativando a resposta imune humoral de camundongos BALB/c saudáveis, aumentando a produção dos subtipos IgG1 e IgG2a (Maia, 2010; Maia et al., 2011). A imunização dos camundongos Swiss com apirase de batata ou com o r-potDomínio B, emulsificados em adjuvantes de Freund Completo e Incompleto, e posterior desafio com cercárias de *S. mansoni*, não reduziu o número de vermes. Mas a análise histopatológica dos granulomas de fígado dos camundongos Swiss mostrou uma redução percentual da área do granuloma do grupo de animais pré-imunizados com apirase e infectados. Este resultado foi evidenciado por uma redução do conteúdo celular e uma substituição deste infiltrado por fibras colágenas, o que sinaliza uma redução da inflamação que progride para a cicatrização e resolução do granuloma (Soares, 2012). A apirase de batata, ao ser usada como antígeno em ELISA, reagiu com anticorpos IgG (53% de soropositividade, 42/80) e suas subclasses IgG1 (58% de soropositividade, 84/146) e de IgG4 (58% de soropositividade, 85/146) em soros de pacientes com esquistossomose de área endêmica. Em crianças, a soropositividade de IgG1 (72% de soropositividade, 52/72) para a apirase foi maior do que aquela encontrada em adultos (43% de soropositividade, 32/74), enquanto a soropositividade de IgG4 foi similar nos dois grupos, 61% e 55% respectivamente (Faria-Pinto et al., 2010b; Mendes et al., 2010). Em trabalho prévio, nosso grupo testou os peptídeos sintéticos SmB1LJ e SmB2LJ derivados do domínio B da SmATPDase 2 com 35 amostras de soros de pacientes com esquistossomose através de ELISA (Mendes, 2010). A soropositividade de anticorpos IgG para os peptídeos SmB1LJ foi de 23% e SmB2LJ, 34%; para as suas subclasses IgG1 (SmB1LJ, 57%; SmB2LJ, 31%) e IgG4 (SmB1LJ, 54%; SmB2LJ, 49%), a soropositividade foi maior, mostrando que o domínio B conservado da SmATPDase 2 é rico em epítomos para células B (Mendes, 2010). Esses resultados indicam que o peptídeo SmB2LJ pode ser usado nos estudos de métodos de diagnósticos e possivelmente nas formulações de vacinas contra a esquistossomose (Mendes et al., 2011).

1.6. A FAMÍLIA DAS ATP difosfohidrolases

A identificação dessa família de proteínas foi feita há dezesseis anos através da clonagem do gene de uma isoforma de apirase de batata (*Solanum tuberosum*) (Handa & Guidotti, 1996) e do sequenciamento de aminoácidos da região N-terminal da apirase de batata (Vasconcelos et al., 1996). O alinhamento das sequências de aminoácidos dessa enzima em vários organismos mostrou dois domínios similares para a ligação de fosfato, indicando um possível papel na ligação de nucleotídeos e três domínios adicionais conservados. Esses domínios foram nomeados “regiões conservadas das apirases” ou ACRs, sendo as ideias contidas nestes trabalhos responsáveis pelo agrupamento destas enzimas em uma nova família de proteínas (Vasconcelos et al., 2009; 1996; Handa & Guidotti, 1996).

As ATP difosfohidrolases (apirase, ATPDase, ATPase, NTPDase, EC 3.6.1.5) compõem uma família de enzimas, caracterizadas pela sua insensibilidade aos inibidores específicos do tipo P, F e V (Plesner, 1995). São capazes de hidrolisar nucleosídeos di e tri-fosforilados, como ADP e ATP, em seus respectivos mononucleotídeos, sendo ativadas por íons bivalentes como cálcio e magnésio (Vasconcelos et al., 2009; Handa e Guidotti, 1996; Zimmermann, 2001).

As isoformas de ATP difosfohidrolases diferem em suas propriedades catalíticas e em sua localização celular, tendo sido identificadas em diferentes organismos como parasitos, mamíferos e plantas, desempenhando papéis importantes no controle dos níveis de nucleotídeos em vários processos fisiológicos (Faria-Pinto et al., 2006; Robson et al., 2006; Kettlun et al., 2005). Em plantas, as apirases têm sido identificadas em várias espécies, podendo ser uma proteína citosólica, nuclear ou associada à membrana, exibindo vários papéis funcionais (Kettlun et al., 2005). Estudos em *Arabidopsis*, gênero de planta pertencente à família das Brassicaceae, sugeriram que o crescimento da planta é fortemente dependente da expressão da apirase, uma vez que a supressão de dois genes dessa proteína ou supressão química de sua atividade resultou em um crescimento prejudicado (Wu et al., 2007). Em

relação à apirase de batata, foi sugerido que a mesma pode atuar na biossíntese de amido e de proteínas da parede celular (Anich et al., 1990). Uma característica peculiar à apirase de batata é sua solubilidade e o fato de parecer não estar fortemente ligada à membrana como outras apirases de plantas caracterizadas até o momento (Riewe et al., 2008), sendo fornecidas evidências de isoformas localizadas no apoplasto que é o conjunto de compartimentos exteriores à membrana plasmática (Sattelmacher, 2001).

Em mamíferos, o primeiro membro da família NTPDase descrito foi o antígeno de ativação de linfócitos, CD39, que foi identificado como um marcador de ativação de linfócitos B, células T, NK e monócitos (Atkinson et al., 2006). Oito genes diferentes codificam os membros dessa família de proteínas nesses animais. Dessas proteínas, quatro estão localizadas na superfície celular (NTPDase 1, 2,3 e 8) com um sítio catalítico extracelular. As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular e podem ser secretadas. Já as NTPDases 4 e 7 são encontradas no meio intracelular em organelas citoplasmáticas (Robson et al., 2006).

O papel funcional das NTPDases em mamíferos está sendo estudado e foi demonstrado a participação dessas proteínas em processos fisiológicos que envolvem a modulação de sinais mediados por receptores purinérgicos da superfície celular como, por exemplo, promover a inibição da agregação plaquetária induzida por ADP e prevenir eventos como a trombose (Vasconcelos et al., 2009; Robson et al., 2006). Em relação à localização, as NTPDases podem ser encontradas em vários órgãos, dentre eles, cérebro, placenta humana, fígado e pâncreas (Leclerc et al., 2000; Kaczmarek et al., 1996).

Em parasitos, as ATPDdifosfohidrolases já foram caracterizadas em *Toxoplasma gondii* (Bermudes et al., 1994), no qual existem duas isoformas com 97% de homologia, mas com diferenças na taxa de hidrólise dos nucleotídeos (Knowles, 2011). Em tripanossomatídeos, já foram caracterizadas em formas promastigostas de *Leishmania (L.) amazonensis* (Coimbra et al., 2002), *L. brasiliensis* (Rezende-Soares et al., 2010) e *Trypanosoma cruzi* (Fieto et al., 2004).

Em *S. mansoni*, esta enzima pode estar associada a mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, sendo importante na recuperação de

purinas (Beaudoin et al., 1996; Vasconcelos et al., 1996). Porém, as funções precisas das ATP difosfohidrolases em parasitos ainda não são completamente compreendidas (Vasconcelos et al., 2009).

Em *S. mansoni*, o primeiro relato da presença de atividade ATPDásica na superfície externa do tegumento de vermes adultos foi feito por Vasconcelos e cols. (1993). Neste parasito foram caracterizadas duas isoformas da enzima com massa molecular aproximada de 63 kDa com diferentes eficiências catalíticas, diferindo na solubilidade em detergentes (Vasconcelos et al., 1993; Vasconcelos et al., 1996). Essas duas isoformas também foram identificadas em homogeneizados de ovos de *S. mansoni* (Faria-Pinto et al., 2004).

Em 2003, De Marco e colaboradores fizeram a caracterização molecular da isoforma SmATPDase 1 de *S. mansoni*, a qual indicou que essa proteína é expressa nos cinco estágios do ciclo do helminto. A SmATPDase 1, com massa molecular predita de 61,353 KDa, apresenta duas porções transmembrana e possui alta similaridade com a CD39/ATPDase 1 humana (DeMarco et al., 2003). Apenas em 2007 foi elucidada a segunda isoforma, a SmATPDase 2 que teve seu gene clonado (Levano-Garcia et al., 2007). Nesse trabalho foi mostrado que essa proteína possui massa molecular predita de 63,785 KDa com uma região transmembrana amino-terminal possivelmente sujeita a processamento pós traducional resultando em uma proteína ativamente secretada por vermes adultos de 55 kDa, a qual apresenta maior similaridade com as NTPDases 5 e 6 de mamíferos (Levano-Garcia et al., 2007).

Enquanto a SmATPDase 1 está localizada preferencialmente na superfície externa do tegumento do verme, a SmATPDase 2 (**Figura 5 A**) pode ser encontrada em algumas estruturas celulares internas do sincício tegumentar do verme (Levano-Garcia et al., 2007). A presença de ATP difosfohidrolase ativa na superfície de parasitos pode representar um alvo potencial para terapia com drogas. Assim, novas drogas esquistossomicidas, os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos, foram testadas sobre as isoformas dessa enzima de *S. mansoni* (Vasconcelos et al., 2009), *S. mansoni*, e esses compostos inibiram a atividade da ATP difosfohidrolase tegumentar de *S. mansoni* e da apirase de batata, sugerindo as proteínas do parasito como um

alvo de drogas, e confirmando a similaridade estrutural destas com a apirase de batata (Penido et al., 2007).

A apirase pura de *Solanum tuberosum* apresenta propriedades imunoestimulatórias, uma vez que induz a produção de anticorpos em camundongos e coelhos. As duas isoformas de ATP difosfohidrolase isoladas do parasito *S. mansoni* apresentam imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata produzidos nesses animais, sugerindo que as proteínas do vegetal e do parasito compartilham epítomos conservados (Faria-Pinto et al., 2004; 2006; Vasconcelos et al., 1996). Imunorreatividade cruzada também foi obtida entre os anticorpos policlonais anti-apirase de batata feitos em coelho e as isoformas de ATP difosfohidrolase de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Maia et al., 2013; Rezende-Soares et al., 2010; Coimbra et al., 2008).

O inóculo de apirase de batata pura em camundongos BALB/c foi capaz de estimular o aumento nas concentrações de anticorpos IgG1 e IgG2a contra esta proteína, o que sugere a presença de epítomos na proteína capazes de induzir respostas com perfil Th1 ou Th2 (Faria-Pinto et al., 2010b).

A imunoreatividade dos anticorpos anti-apirase de batata serviram como ferramentas de imunolocalização das proteínas desta família em diversos parasitos por técnicas de microscopia. Por microscopia confocal, anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho mostraram uma forte marcação na superfície externa de vermes adultos de *S. mansoni* (Vasconcelos et al., 1996) e na superfície externa dos miracídios de ovos (**Figura 5 B**) do mesmo parasito (Faria-Pinto et al., 2004), indicando a presença de uma das isoformas possivelmente associada à membrana. Também foi observada intensa fluorescência no envelope de Von Lichtenberg's e na superfície externa da casca do ovo sugerindo que a isoforma solúvel pode ser secretada (Faria-Pinto et al., 2004).

Como já mencionado neste trabalho, análises *in silico* foram feitas para avaliar a relação estrutural entre as isoformas descritas nos parasitos e na proteína vegetal. Foi possível observar a ocorrência de domínios conservados, sendo que as proteínas com alta homologia com a apirase de batata foram as NDPases de *Leishmania* (30-33% de identidade), seguida pela SmATPDase 2

de *S. mansoni* (28% de identidade) (Vasconcelos et al., 2009; Faria-Pinto et al., 2008b).

A ocorrência de um domínio conservado (nomeado de Domínio B) que é compartilhado entre a proteína vegetal (apirase de batata) e a ATPDase 2 de *S. mansoni* (Vasconcelos et al., 2009; Faria-Pinto et al., 2008a), o qual foi identificado por análises de bioinformática, justificou a obtenção de um polipeptídeo recombinante pertencente à apirase de batata (r-Domínio B) para investigar o envolvimento deste domínio na antigenicidade, atividade e função destas proteínas (Maia et al., 2011). O inóculo desse domínio em camundongos Balb/c induziu a produção de altos níveis de anticorpos IgG. Também foi demonstrado que anticorpos IgG de pacientes com leishmaniose americana cutânea (37% soropositividade) e de pacientes com esquistossomose (40% soropositividade) exibiram significativa imunoreatividade cruzada com o r-Domínio B, sugerindo que o mesmo é rico em epítomos para células B (Maia et al., 2011).

Com base na relação estrutural e imunoreatividade cruzada entre a proteína vegetal e as ATP difosfohidrolases do parasito *S. mansoni*, foram sintetizados dois peptídeos: SmB1LJ e SmB2LJ (**Figura 5: D e E**). Estas regiões pertencentes ao domínio conservado da SmATPDase 2 de *S. mansoni* são homólogas ao r-Domínio B da proteína da batata. Esses peptídeos foram desenhados com o objetivo de manter a capacidade de ligação de anticorpos, de acordo com predição previamente efetuada que indicou sequências de aminoácidos como potenciais ligantes de anticorpos (Faria-Pinto et al., 2008a).

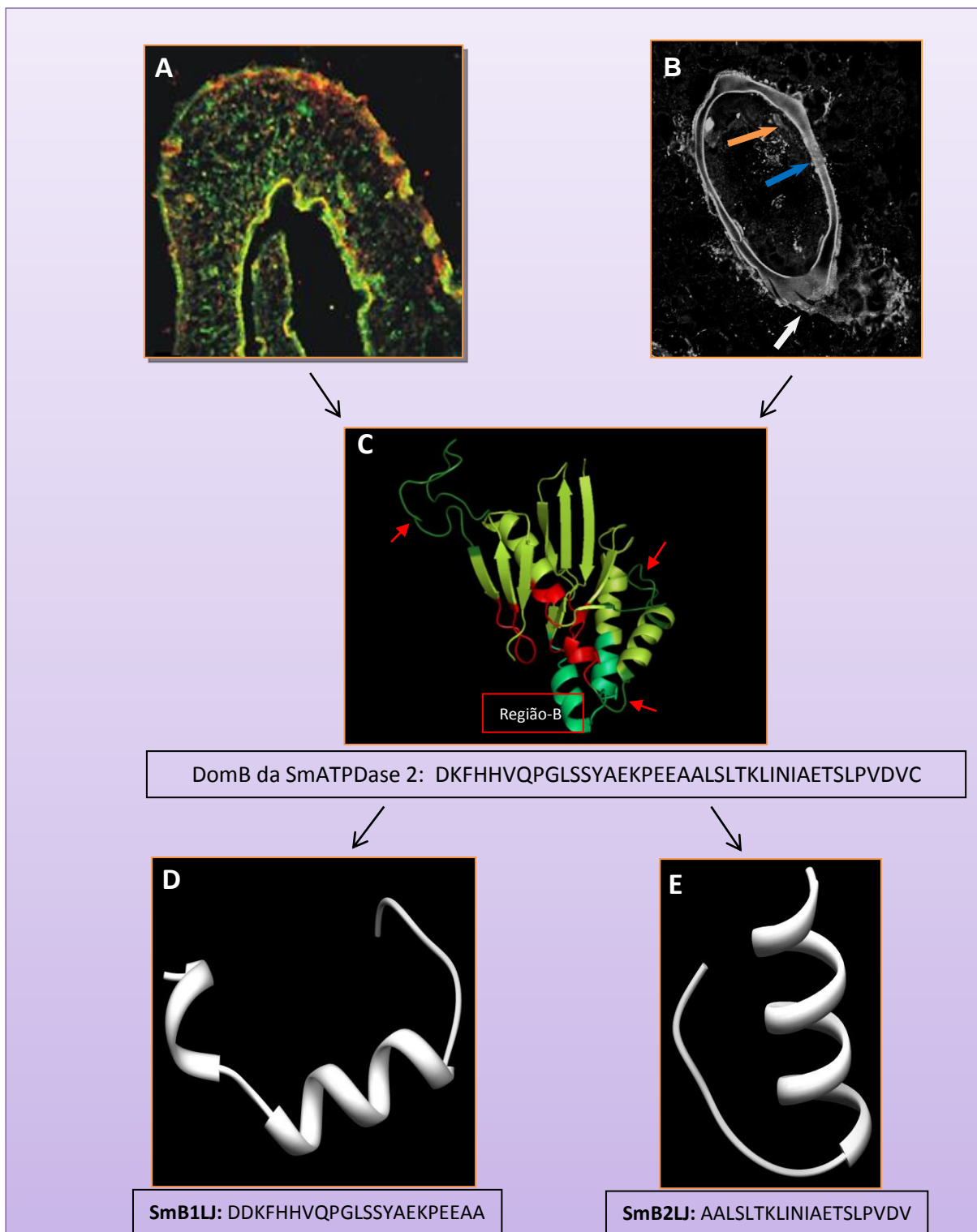


Figura 5: (A) Imunolocalização da SmATPDase 2 (verde) e SmATPDase 1 (vermelho) no tegumento do verme adulto de *S. mansoni* (modificado de Levano-Garcia et al.,2007). (B) Imunolocalização da ATP difosfohidrolase no ovo de *S. mansoni* com anticorpos anti-apirase de batata mostrando a fluorescência homogeneamente distribuída na superfície externa do miracídio (seta laranja), entre o miracídio e a membrana interna da casca do ovo (seta azul), e fora da casca do ovo (seta branca) (Faria-Pinto et al., 2004).(C) Modelo tridimensional predito no servidor PEP-FOLD para a ATPDase 2 de *S. mansoni* e para os peptídeos SmB1LJ (D) e (E) SmB2LJ, ambos derivados da região B da SmATPDase 2 do parasito (Modificado de Mendes, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Localizar a isoforma da ATPDase 2 de *Shistosoma mansoni* e avaliar a imunogenicidade desta proteína durante a progressão da esquistossomose mansoni usando os peptídeos sintéticos SmB1LJ e SmB2LJ derivados de seu domínio B antigênico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar o potencial imunoestimulatório dos peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ quantificando por ELISA a produção de anticorpos IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a em camundongos Balb/c previamente imunizados;

2.2.2. Avaliar o potencial inibitório e de imunodepleção de soros imunes policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ de camundongos Balb/c sobre a atividade fosfohidrolítica da preparação de ovos e vermes adultos de *S. mansoni*;

2.2.3. Localizar a ATP difosfohidrolase solúvel (ATPDase 2) em ovos de *S. mansoni* usando soro imune policlonal anti-SmB2LJ de camundongos Balb/c e microscopia confocal;

2.2.4. Avaliar por ELISA a reatividade de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a de soro de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* com os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ;

2.2.5. Avaliar por ELISA a reatividade dos peptídeos sintéticos SmB1LJ e SmB2LJ com amostras de plasmas de camundongos Swiss previamente imunizados com a apirase de batata ou com r-potDomínio B (polipeptídeo recombinante derivado desta proteína vegetal) e infectados com *S. mansoni*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho possuem alto grau de pureza, e foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Merck (Rio de Janeiro, Brasil), Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e da Cristália (São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada obtidas em um sistema de resinas de troca iônica através do deionizador Permuton. Marcador de peso molecular pré-corado, anti-IgG de coelho e de camundongo conjugados à peroxidase, membranas de nitrocelulose e Kit ECL foram obtidos da GE Healthcare (São Paulo, Brasil).

3.2. OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ foram desenhados e projetados pela Dra Eveline Gomes Vasconcelos do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas do ICB/UFJF. Foram obtidos por síntese em fase sólida e purificados como previamente descrito (Korkmaz et al., 2008). A massa molecular e a pureza dos peptídeos sintetizados foram determinadas por análise de aminoácidos e por MALDI-TOF, usando um espectrômetro de massa Microflex-LT (Bruker-Daltonics, Billerica, MA, USA). Estes peptídeos foram sintetizados e gentilmente doados pelo Dr. Luiz Juliano e pela Dra^a. Maria Aparecida Juliano, ambos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.3. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS Balb/c COM OS PEPTÍDEOS SmB1LJ E SmB2LJ PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E QUANTIFICAÇÃO POR ELISA

O peptídeo SmB1LJ ou SmB2LJ (10 µg; Mendes, 2010) foi emulsificado em Adjuvante Completo de Freund (ACF) e inoculado em camundongos Balb/c (n= 4) com 7 semanas de vida e peso aproximado de 22 g adquiridos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), localizado no Instituto Ciências

Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foram realizados 2 inóculos intraperitoneais com intervalo de 15 dias, sendo que no segundo, o peptídeo foi emulsificado com o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF). Um grupo de camundongos foi inoculado somente com o Adjuvante de Freund Completo e Incompleto e, também como controle, outro grupo de animais foi mantido nas mesmas condições experimentais sem qualquer inóculo. Os animais tiveram livre acesso à água e ração. As amostras de sangue dos animais foram obtidas antes do primeiro inóculo e 15 dias do último inóculo por coleta através do plexo retro-orbital de cada camundongo, com auxílio de pipeta Pasteur, e as amostras de soros pré-imune e imune, obtidas por centrifugação em centrífuga clínica, foram estocadas a -20°C . O título de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a foi quantificado por ELISA, como abaixo descrito.

A análise do perfil de isotipos de anticorpos reativos em amostras de soros de camundongos por meio de ELISA, de acordo com metodologia previamente descrita (Harlow & Lane, 1988). Os peptídeos sintéticos (10 $\mu\text{g}/\text{poço}$) solubilizados em NaHCO_3 0,1 M, pH 9,6, foram adsorvidos a 4°C por 12 h em placas de microtitulação de 96 poços (COSTAR). Após a etapa de bloqueio (Tween-20 0,05%; caseína 2,5%; tampão fosfato 0,15 M, pH 7,2), os soros de camundongos inoculados com os peptídeos SmB1LJ (dil. 1:50 a 1:800) e SmB2LJ (dil. 1:100 a 1:25600) (Mendes, 2010) foram incubados a 4°C por 4 h. Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Os anticorpos ligados aos antígenos na placa foram detectados utilizando os respectivos isotipos de anticorpos secundários conjugados à peroxidase e dihidroclorato de o-fenilenodiamina (OPD)/ H_2O_2 como substrato. A cor subsequente foi lida em um leitor de ELISA a 492 nm (Molecular Devices Corp., SOFTMAX PRO, Menlo Park, CA, USA). Como antígeno de captura foi também usado o SWAP (10 $\mu\text{g}/\text{poço}$). As análises estatísticas foram feitas usando o teste não paramétrico e não pareado de Mann-Whitney e teste T para dois grupos de dados, e o teste Kruskal Wallis para grupos de dados superior a dois, com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os experimentos realizados com animais foram conduzidos de acordo com o guia de “Princípios e cuidado no uso de animais de laboratório” e aprovados pelo Comitê de

Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de fora conforme consta no protocolo nº 017/09.

3.4. PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO TOTAL DE VERMES ADULTOS

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram infectados com 15 miracídios/caramujo por meio de exposição direta dentro de placas de Petri durante duas horas. Ao final de 6-7 semanas, as cercárias liberadas por estes caramujos foram utilizadas para a infecção de camundongos Swiss albinos, os quais receberam inóculos de ~150 cercárias/animal por via subcutânea. O tipo de infecção utilizado foi bissexuado, resultando em vermes adultos machos e fêmeas. Os animais infectados foram sacrificados ao final de aproximadamente 45 dias. O ciclo biológico do *S. mansoni* é mantido no Laboratório de Esquistossomose do CPqRR, Belo Horizonte, MG, sob a supervisão do Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, onde foi preparada parte das amostras de homogeneizado total utilizadas neste trabalho.

A preparação do homogeneizado total de vermes adultos foi realizada de acordo com a técnica previamente descrita (Colley et al.,1977). Os parasitos foram extraídos dos camundongos Swiss albinos com 6 ou 7 semanas de infecção. Em seguida, os vermes adultos de *S. mansoni* foram submetidos à trituração mecânica em potter e o conteúdo protéico determinado pelo método de Lowry (1951).

3.5. ENSAIOS DE INIBIÇÃO E IMUNOPRECIPITAÇÃO ENZIMÁTICA POR ANTICORPOS

Uma alíquota da preparação de vermes adultos de *S. mansoni* foi adicionada a um meio de reação padrão contendo tampão MOPS 50 mM, pH 7,4, ouabaína 1 mM, azida 10 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM, KCl 5mM (tampão de atividade), e suplementado com 1 mg/ml do detergente não-iônico C12E9. Posteriormente, a concentração de proteínas foi medida (Lowry et al., 1951).

O soro imune policlonal anti-apirase de batata (1: 500), anti-SmB2LJ (diluição: 1:400) ou anti-SmB1LJ (diluição 1:400) foi adicionado a uma alíquota deste solubilizado. Esta mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente sob leve agitação. Ao final deste tempo, alíquotas foram usadas para a medida da hidrólise de ATP e ADP.

A medida de atividade fosfohidrolítica foi feita em meio de reação padrão contendo tampão de atividade e 0,05 mg proteína/ml. A medida de atividade hidrolítica foi iniciada com a adição de 3 mM do substrato ATP ou ADP, incubada por 60 minutos a 37°C, e interrompida pela adição de 1 volume de HCl 0,1 N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada espectrofotometricamente (Tausky & Shorr, 1953).

A proteína A-Sepharose (3 µl/100 µl amostra) foi adicionada, e a incubação estendida por mais 2 horas. Como controle, soro pré-imune de camundongo (diluição final 1: 400) foi usado sob as mesmas condições. O complexo Sepharose Proteína A-anticorpo-antígeno foi sedimentado por centrifugação durante 5 minutos, lavado com tampão MOPS 50 mM, pH 7,4 por centrifugação, solubilizado em tampão de amostra e aplicado em gel de poliacrilamida a 10% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo descrito por Laemmli (1970) e, em seguida, eletrotransferido para membranas de nitrocelulose para posterior “Western blot”. O sobrenadante (0,1 mg de proteína/ml) foi usado para medida da atividade fosfohidrolítica pela adição de ATP ou ADP, como já descrito.

3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E “WESTERN BLOT”

O complexo Sepharose Proteína A-anticorpo-antígeno isolado da preparação de homogeneizado total de vermes adultos, obtido conforme o item 3.4, foi submetido à SDS-PAGE 10% de acordo com Laemmli (1970), em um sistema de eletroforese (Mini Protean III, BioRad). Padrão de peso molecular pré-corado também foi aplicado. O gel foi eletrotransferido para membrana de nitrocelulose e a mesma foi bloqueada (Tampão fosfato 0,15 M, pH 7,4 com Tween 20 a 0,1% e caseína a 3%), conforme procedimentos padrão (Harlow e Lane, 1988). O “Western blot” foi desenvolvido com soro policlonal de coelho

(dil. 1: 2000) contendo anticorpos anti-apirase de batata (Faria-Pinto et al., 2010). As membranas foram reveladas por quimioluminescência com o anticorpo secundário específico (1: 3000) acoplado à peroxidase e Luminol como substrato, seguido de exposição à filmes de raio-X, de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western Blotting System; GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

3.7. PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE BATATA

A purificação de apirase de batata *S. tuberosum*, de origem comercial, foi realizada de acordo com método previamente descrito (Traverso-Cori et al., 1965; Kettlun *et al.*, 1982). Em resumo, as batatas foram descascadas e trituradas em liquidificador, com adição de ácido tioglicólico 10 mM para inibir o escurecimento pela ação das tirosinases. Foi feita a remoção do amido. Em seguida, as proteínas em solução foram precipitadas por adição lenta e sob agitação de sulfato de amônio até atingir saturação adequada. Nesta etapa, o precipitado ressuspenso em ácido tioglicólico a 10 mM. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Cada centrifugação foi realizada a 13.000 g por 10 min, sob refrigeração. Após a precipitação final, as amostras foram submetidas a colunas de filtração em gel (Sephadex G-25 e Sephadex G-100) e, como etapa final, coluna de troca-iônica (carboximetil celulose), seguida de diálise. Os picos de proteínas extraídas das colunas foram determinados pela medida de densidade óptica a 280 nm, e a identificação das atividades ATPásica e ADPásica pelo Método de Taussky e Shorr (1953). O rendimento da purificação foi verificado ao longo do processo através de dosagem de proteínas (Lowry et al., 1951), atividade enzimática e eletroforese em gel de poliácridamida a 10% e 0,1% de SDS (Laemmli, 1970), seguida de coloração pelo Coomassie blue.

3.8. OBTENÇÃO DO r-potDomínio B

O domínio B recombinante (r-potDom B, massa molecular 5493 Da) foi gerado pela fusão de uma cauda de hexahistidina ligada à região N-terminal do domínio conservado (r78–117: EYFMATEPGLSSYAEDPKAAANSLEP LLDGAEGVVPQELQ) da apirase de batata. O plasmídeo recombinante foi

usado para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) em meio de cultura SOB (“super optimal broth”) contendo ampicilina. A expressão do recombinante foi induzida por isopropil- β -tiogalactopiranosídeo (IPTG). O polipeptídeo recombinante (r-potDomínio B) foi purificado por cromatografia de afinidade em His-Trap (GE Healthcare Life Science, Brasil), de acordo com instruções do fabricante. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). A pureza do r-potDomínio B foi comprovada por SDS-PAGE, “Dot blot”, “Western blot” e ELISA, usando anticorpos anti-apirase de batata produzidos em coelho e anticorpos anti-histidina, e como antígenos o homogeneizado de *E. coli* BL21, a apirase de batata e o r-potDomínio B (Maia, 2010; Maia et al., 2011). O r-potDomínio B foi obtido com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santos do laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.9. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS SWISS COM APIRASE DE BATATA OU COM O POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE r-potDomínio B E QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA

Fêmeas de camundongos Swiss com 7 semanas de vida e peso aproximado de 22 g foram adquiridas do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), localizado no Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os grupos de animais experimentais (n= 10/grupo) foram: grupo controle – sem imunização; imunizado apenas com o adjuvante; imunizado com a apirase de batata ou com r-potDomínio B. Os camundongos receberam 2 doses peritoneais de apirase de batata (10 μ g) ou r-poDomínio B (10 μ g), com intervalo de 15 dias. Os antígenos foram emulsificados em Adjuvante Completo de Freund para o primeiro inóculo, e em Adjuvante Incompleto de Freund para o segundo inóculo. Quinze dias após a imunização, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital dos animais em experimentação. O plasma foi separado e utilizado em técnicas de ELISA para a quantificação dos níveis de anticorpos usando a apirase de batata, r-potDomínio B ou SEA como antígenos de captura. Alíquotas dessa soroteca foram utilizadas no trabalho de Soares (2012) e nos experimentos dessa dissertação.

Quinze dias após a segunda imunização, os camundongos Swiss dos grupos controle – sem imunização; inoculado com o adjuvante Completo e Incompleto de Freund, imunizado com a apirase de batata e imunizado com r-potDomínio B foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* (Smithers & Terry, 1965; Pellegrino & Siqueira, 1956). Ao final de aproximadamente 45 dias, foi feita nova coleta de sangue pelo plexo orbital desses animais, os quais foram posteriormente sacrificados. O plasma foi separado e utilizado em técnicas de ELISA na diluição de 1: 200, sendo os peptídeos SmB1LJ (10 µg/poço) e SmB2LJ (10 µg/poço) usados como antígenos de captura. As análises estatísticas foram feitas de acordo com o item 3.3 descrito acima. O cálculo da taxa de IgG1/IgG2a foi realizado através da divisão dos valores obtidos pela média da reatividade de anticorpos IgG1 com os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ sendo esse valor dividido pela média da reatividade das amostras para o subtipo IgG2a. Essa taxa foi utilizada em amostras de soros de animais imunizados e infectados.

3.10. IMUNOLocalização DA ATP difosfohidrolase SOLÚVEL EM OVOS DE *S. mansoni*

As amostras de fígado de camundongos foram coletadas oito semanas após a infecção experimental e congelados em TissueTek “OCT Compoud” por imersão em nitrogênio líquido. Cortes micrométricos (10 µm de espessura) foram aderidos a lâminas previamente tratadas com poli-L-Lisina e fixados em acetona por 30 min a 20 ° C. Após secagem, os cortes foram bloqueados por incubação em PBS contendo 2% de leite desnatado, 2,5% albumina bovina e 8% de soro fetal bovino por 45 min a temperatura ambiente e lavados em PBS por três vezes. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* a 4 °C em PBS com o soro de camundongo contendo anticorpos anti-SmB2LJ (1:400). As lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes durante 15 min com agitação suave e incubadas por 60 min a 37 ° C em PBS contendo o anticorpo secundário de camundongo (IgG) (Sigma) conjugado ao corante Alexa Fluor 488. As lâminas foram lavadas novamente, como descrito acima, antes da adição de DABCO (1,4-Diazobencilo [2,2,2] octano). Como controle, algumas lâminas foram incubadas com anticorpo secundário sozinho. Para reduzir e discriminar a excessiva autofluorescência vermelha da casca dos ovos de *S.*

mansoni, as lâminas foram analisadas usando um Microscópio de Varredura Confocal a Laser invertido LSM 510- Zeiss do Instituto Oswaldo Cruz /Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

3.11. INFECÇÃO EXPERIMENTAL E PERFUSÃO

Cercárias obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídeos provenientes da cepa LE de Belo Horizonte foram usadas para a infecção. Quinze dias após a segunda dose de imunização os animais em experimentação foram submetidos à infecção subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni*. Após 60 dias (8 a 9 semanas) da infecção os animais foram anestesiados e submetidos à coleta de sangue. Após a coleta, foi realizado o aprofundamento da anestesia e eutanásia dos camundongos para a realização da perfusão total do sangue com salina heparinizada (NaCl a 0,85%) (Pellegrino & Siqueira, 1956) possibilitando a recuperação dos vermes adultos do mesentério e do sistema porta hepático.

4. RESULTADOS

4.1. PROPRIEDADES IMUNOESTIMULATÓRIAS DOS PEPTÍDEOS SmB1LJ E SmB2LJ EM CAMUNDONGOS Balb/c

Os soros imunes produzidos em camundongos Balb/c inoculados com os peptídeos foram usados para a quantificação de anticorpos IgG1 ou IgG2a por ELISA, usando os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ como antígenos. O peptídeo SmB1LJ (**Figura 6**) foi capaz de elevar a produção de anticorpos IgG1 (**Figura 6, A**) e IgG2a (**Figura 6, B**) em níveis significativamente maiores que o controle até a diluição 1:50 e 1:100, respectivamente. A imunização com o peptídeo SmB2LJ foi mais eficiente, e os níveis de IgG1 e IgG2a estavam significativamente maiores que o controle até a diluição 1:25600 (**Figura 7, A e B**).

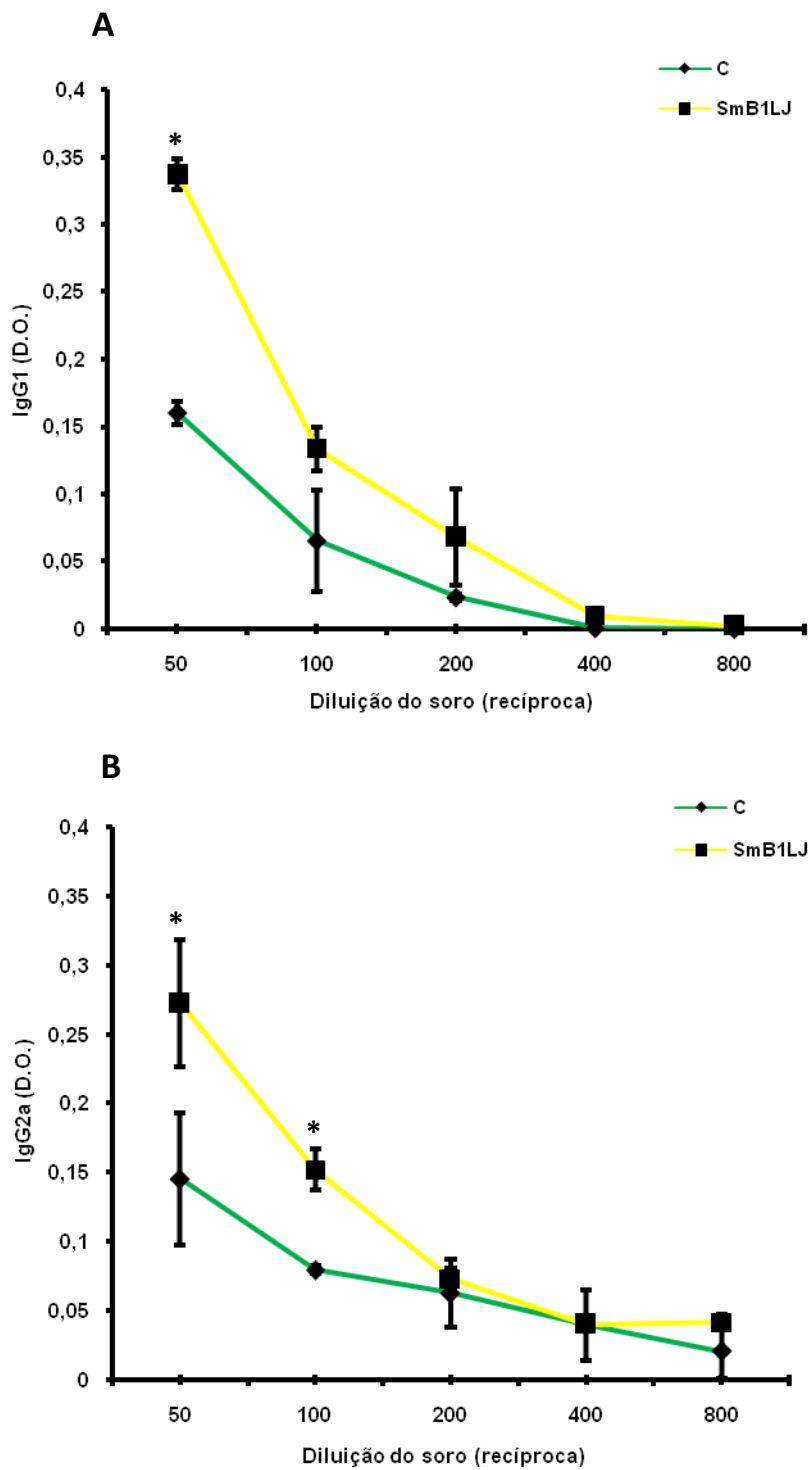


Figura 6. Propriedades imunoestimulatórias do peptídeo sintético SmB1LJ derivado do domínio B conservado da ATPDase 2 de *S. mansoni*. Anticorpos das subclasses IgG1 (A) e IgG2a (B) foram quantificados em amostras de soro de camundongos Balb/c (n= 4) pré-inoculados com SmB1LJ. Amostras de soro de animais não imunizados (C) foram usadas como controle. Os valores são expressos em densidade ótica da média \pm desvio padrão do experimento feito em duplicatas.

*P < 0,05.

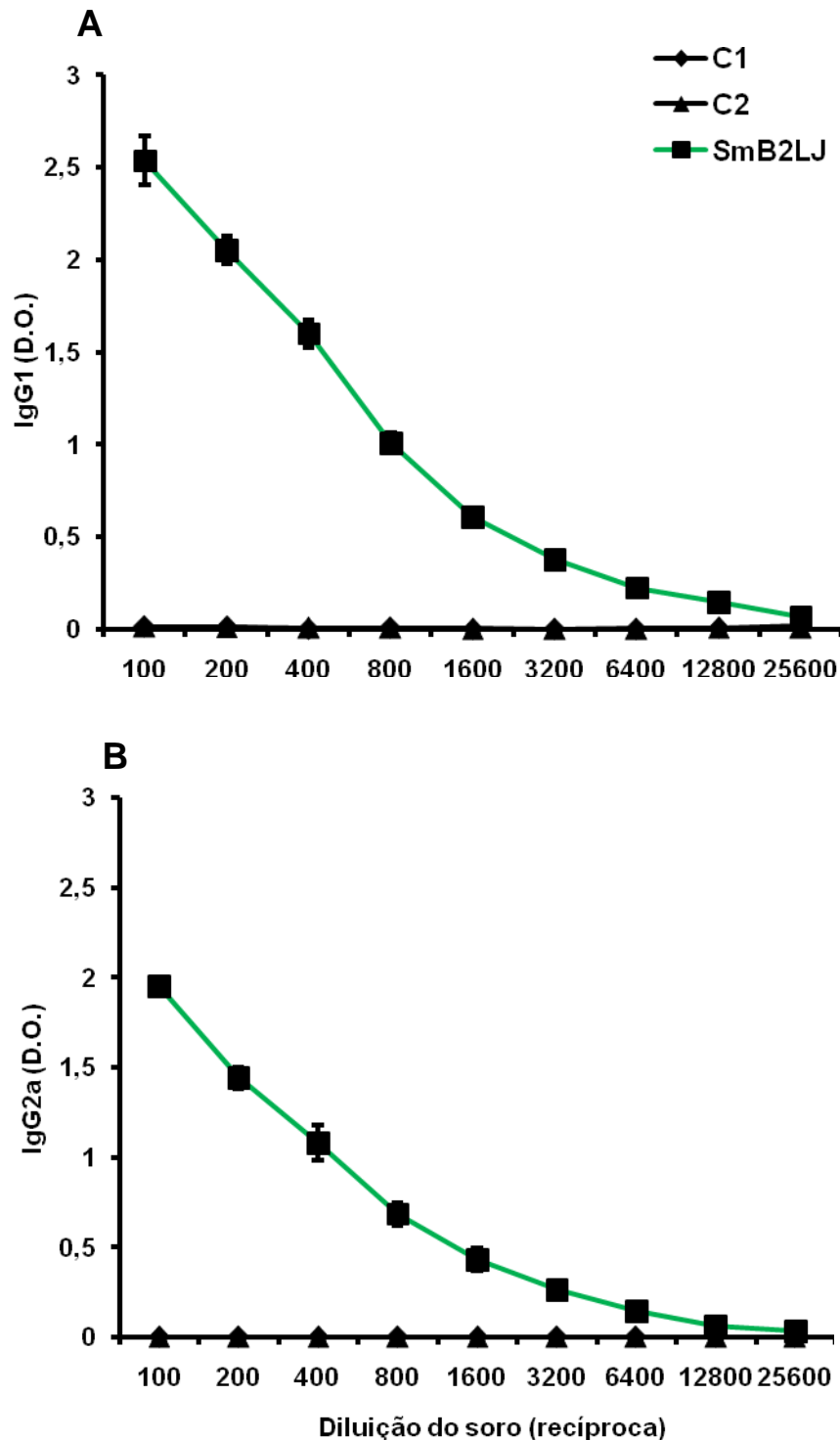


Figura 7. Propriedades imunoestimulatórias do peptídeo SmB2LJ derivado do domínio B da ATPDase 2 de *S. mansoni* – Anticorpos das subclasses IgG1 (A) e IgG2a (B) foram quantificados em amostras de soro de camundongos Balb/c (n= 4) pré-inoculados com SmB2LJ. As amostras de soros de animais não imunizados (C1) ou de camundongos inoculados com ACF e AIF (C2) foram usadas como controle. Os resultados são expressos em

densidade ótica da média \pm desvio padrão do experimento feito em duplicatas para todas as diluições. *P < 0,05.

4.2. POTENCIAL INIBITÓRIO DE ANTICORPOS POLICLONAIS anti-SmB1LJ E anti-SmB2LJ SOBRE A ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DA PREPARAÇÃO DE VERMES ADULTOS

A capacidade de inibição dos soros imunes anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ sobre a atividade ATP difosfohidrolásica de preparação de vermes adultos solubilizada em C12E9 foi testada através de incubação durante 3 h à temperatura ambiente, sob leve agitação, usando como controle o soro pré-imune (**Figura 8**). Os anticorpos anti-SmB2LJ foram capazes de inibir *in vitro* aproximadamente 62,22% da atividade ATPásica quando comparado ao controle feito com soro pré-imune, diferente dos anticorpos anti-SmB1LJ que não inibiram a atividade da enzima quando o ATP foi usado como substrato. Em contrapartida, os anticorpos anti-SmB1LJ inibiram cerca de 92,30% da atividade ADPásica e os anticorpos anti-SmB2LJ inibiram em menor proporção essa atividade, aproximadamente 36,92% (**Figura 8**).

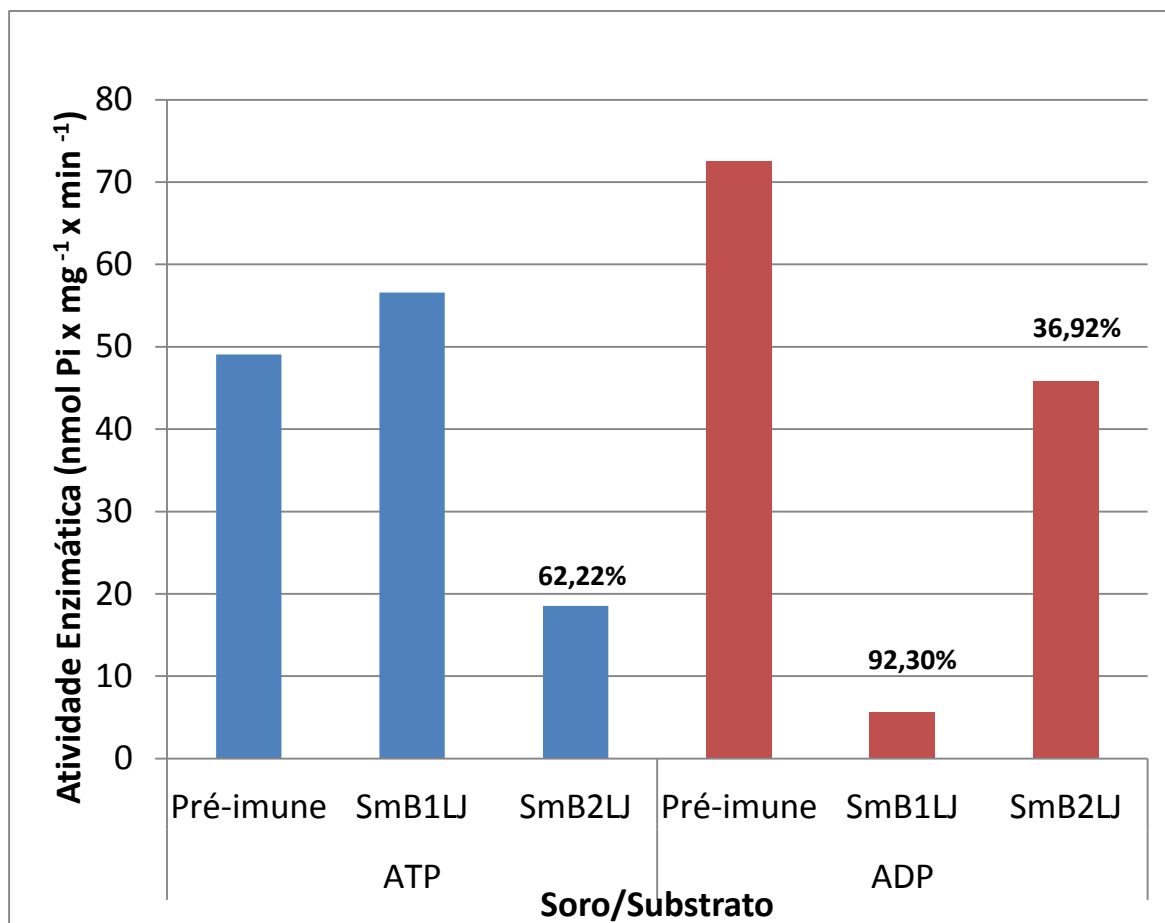


Figura 8. Inibição da atividade fosfohidrolítica de preparação de vermes adultos solubilizada em C12E9 por anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ diluídos 1: 400. A hidrólise de ATP ou ADP foi medida na preparação pré-incubada com soro pré-imune (Controle), soros imunes anti-SmB1LJ ou anti-SmB2LJ. Os experimentos foram repetidos duas vezes com resultados similares.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DA ATPDase 2 DE *S. mansoni* POR ANTICORPOS ANTI-SmB1LJ E ANTI-SmB2LJ

O soro de camundongo Balb/c contendo anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ foi testado em experimentos de imunodepleção de atividade enzimática, usando homogeneizado total de verme adulto previamente solubilizado em C12E9, um detergente não iônico capaz de manter a atividade hidrolítica da enzima. Nas condições experimentais utilizadas, anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ foram capazes de imunodepletar 96,08% e 41,89% da atividade ADPásica quando comparado ao seu respectivo

controle. A atividade ATPásica não foi imunodepletada quando comparada ao seu respectivo controle (**Figura 9**).

O complexo imunoprecipitado resina-anticorpo-antígeno foi lavado e submetido à eletroforese e “Western blot”. Como observado na **figura 10**, os anticorpos policlonais anti- SmB1LJ (A) e anti-SmB2LJ (B) acoplados à Proteína A-Sepharose imunoprecipitaram 3 bandas de aproximadamente 55, 63 e 76 kDa da preparação de vermes adultos, as quais foram reconhecidas por anticorpos policlonais de coelho anti-apirase de batata (**Figura 10**). O anti-SmB1LJ reconheceu a banda de 55 kDa mais fracamente.

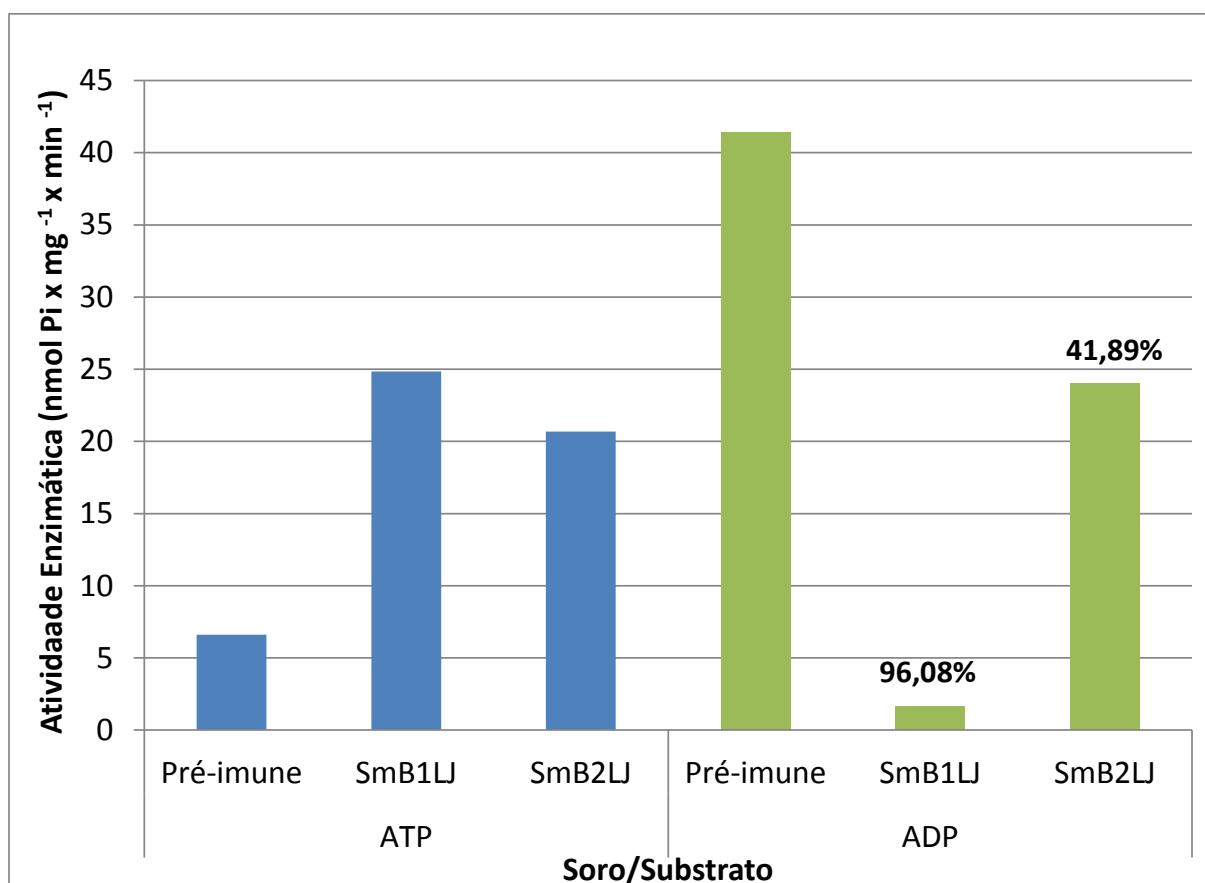


Figura 9. Imunodepleção da atividade fosfohidrolítica de preparação de vermes adultos solubilizada em C12E9 por anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ imobilizados em proteína A Sepharose. A hidrólise de ATP ou ADP foi medida no sobrenadante obtido após centrifugação da preparação contendo o complexo resina-anticorpo-antígeno. Os experimentos foram repetidos duas vezes com resultados similares.

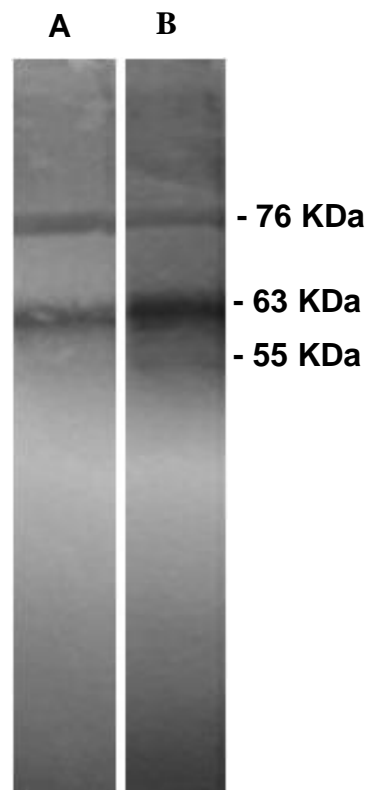


Figura 10. Identificação da ATPDase 2 de *S. mansoni* usando anticorpos policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ. O complexo Proteína A-anticorpo anti-SmB1LJ-antígeno (A) e o complexo Proteína A-anticorpo anti-SmB2LJ-antígeno (B) isolado da preparação de homogeneizado total de vermes adultos (0,05 mg/ml) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 0,1% de SDS, seguida de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. O “Western blot” foi desenvolvido com soro imune de camundongo contendo anticorpos policlonais anti-apirase de batata (diluído 1: 2000). As membranas foram reveladas por quimioluminescência com o anticorpo secundário específico acoplado à peroxidase e Luminol como substrato, usando o kit ECL como recomendado pelo fabricante (GE Healthcare, Brasil).

4.4. IMUNOLocalização DA ATP difosfohidrolase SOLÚVEL (ATPDase 2) EM OVOS DE *Schistosoma mansoni*

Com o objetivo de localizar, especificamente, a ATP difosfohidrolase solúvel (ATPDase 2) no ovo de *S. mansoni*, cortes micrométricos do fígado de camundongos infectados foram observadas por imunofluorescência indireta utilizando microscopia confocal a laser após a incubação com anti-SmB2LJ (dil. 1:400) seguida por anti-IgG de camundongo conjugado com o corante Alexa Flúor 488. Como mostrado na **figura 11**, material imunorreativo granular (verde) foi visível imediatamente fora da casca do ovo (B e D; seta 1) e espalhado distante da mesma, formando depósitos na área periovular central da reação granulomatosa e confirmando que a isoforma solúvel é secretada. Essa proteína também foi detectada na superfície externa do miracídio (B e D; seta 2: C, seta 1) e no envelope de Von Lichtenberg, região entre o miracídio e a casa do ovo (C, seta 2). Nenhuma marcação foi observada quando as amostras foram incubadas apenas com o anticorpo secundário (**Figura 11 A**) e nenhuma marcação foi observada no tecido granulomatoso circundante. Reatividade negativa também foi observada no parênquima hepático, vasos sanguíneos e canais biliares (dados não mostrados).

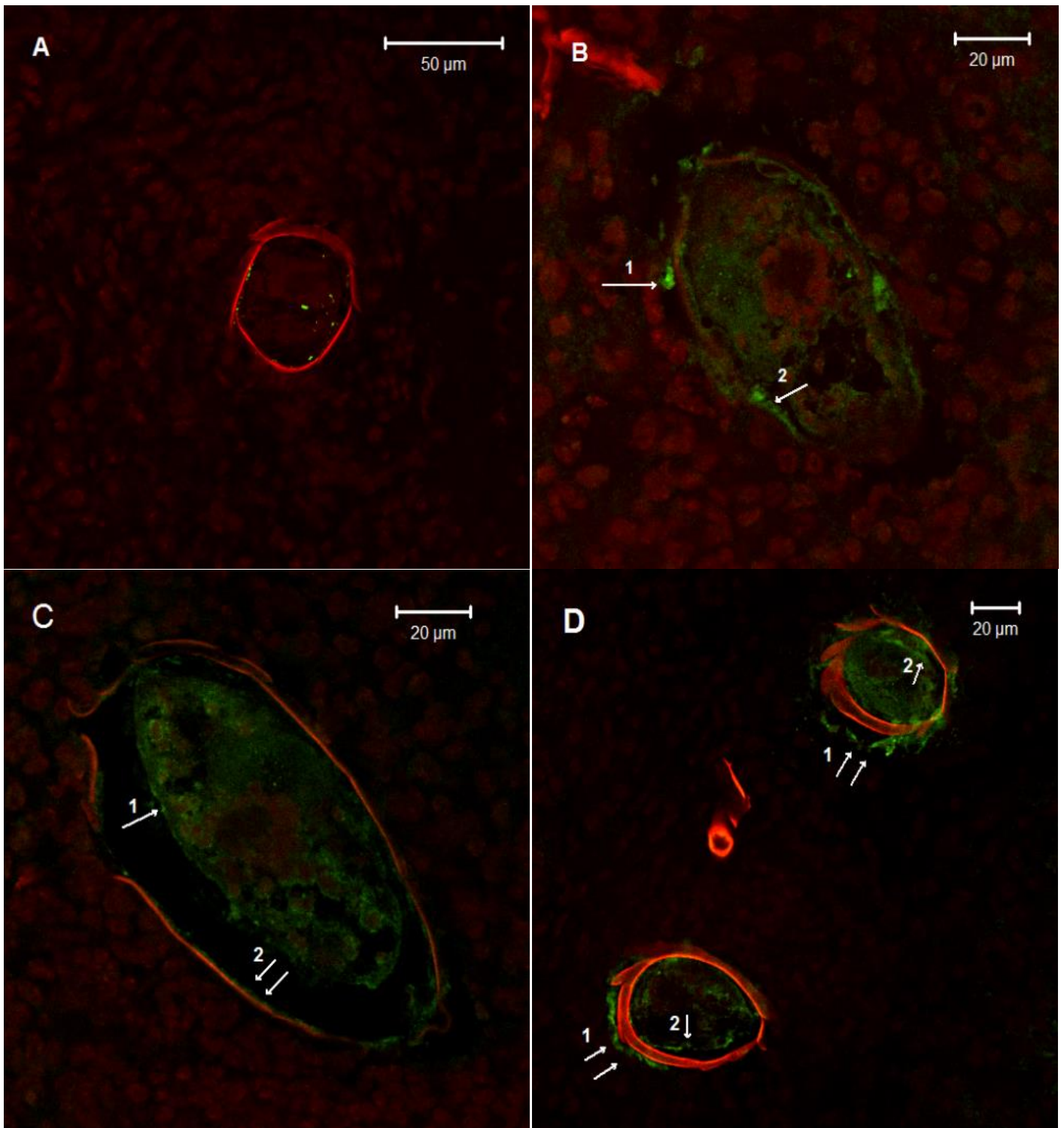


Figura 11: Localização imunohistoquímica da ATPDase 2 no ovo de *S. mansoni* por anticorpos anti-SmB2LJ. Anticorpos anti-SmB2LJ de camundongos Balb/c (diluição 1: 400) e anticorpo secundário ligado a Alexa Fluor 488 foram usados para a detecção da fluorescência (verde) da ATPDase 2 nos cortes micrométricos do fígado de camundongos infectados. **A:** as seções foram incubadas apenas com anticorpo secundário; **B:** aspecto geral da casca do ovo e *S. mansoni* mostrando a fluorescência distribuída fora da casca do ovo (seta 1) e na superfície externa ao miracídio (seta 2); **C:** fluorescência distribuída na superfície externa do miracídio e no envelope de Von Lichtenberg's, localizado na região entre o miracídio e a membrana interna da casca do ovo (seta 2); **D:** material granular aprisionado pelos microespinhos de superfície,

localizados fora da casca do ovo e longe da mesma (seta 1) e na superfície do miracídio (seta 2).

4.5. REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SmB1LJ OU SmB2LJ COM PLASMA DE CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM *Schistosoma mansoni*

Grupos de camundongos Swiss (n=10 animais/grupo), com 90 dias, foram infectados pela injeção intraperitoneal de 50 cercárias de *S. mansoni*. A infecção foi mantida por 60 dias. Ao fim deste período, foi feita a coleta de sangue.

Amostras de plasma (dil.1:200) desses animais foram utilizadas para a avaliação do perfil de anticorpos reativos com os peptídeos SmB1LJ (10µg/poço) e SmB2LJ (10 µg/poço), usados como antígenos em ELISA.

A reatividade de SmB1LJ ($0,275 \pm 0,088$) com anticorpos IgG (**Figura 12,A**) dos animais infectados com *S. mansoni* foi significativamente maior ($P < 0,001$) que o grupo controle ($0,097 \pm 0,030$). A reatividade desse peptídeo ($0,941 \pm 0,184$) com anticorpos IgG1 (**Figura 12, B**) dos animais infectados também foi significativamente maior ($P < 0,001$) que o grupo de animais saudáveis ($0,427 \pm 0,149$). Já a reatividade anticorpos IgG2a (**Figura 12, C**) com o peptídeo SmB1LJ ($0,484 \pm 0,198$) apesar de ser significativamente maior ($P < 0,01$) que o grupo controle ($0,290 \pm 0,088$) teve uma significância menor do que a da subclasse de anticorpos IgG1.

Quando o peptídeo SmB2LJ foi usado como antígeno (**Figura 13**), a reatividade ($1,147 \pm 0,316$) que apresentou significância ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle ($0,428 \pm 0,149$) foi a da subclasse de anticorpos IgG1 (**Figura 13,B**) dos camundongos Swiss infectados com *S. mansoni*.

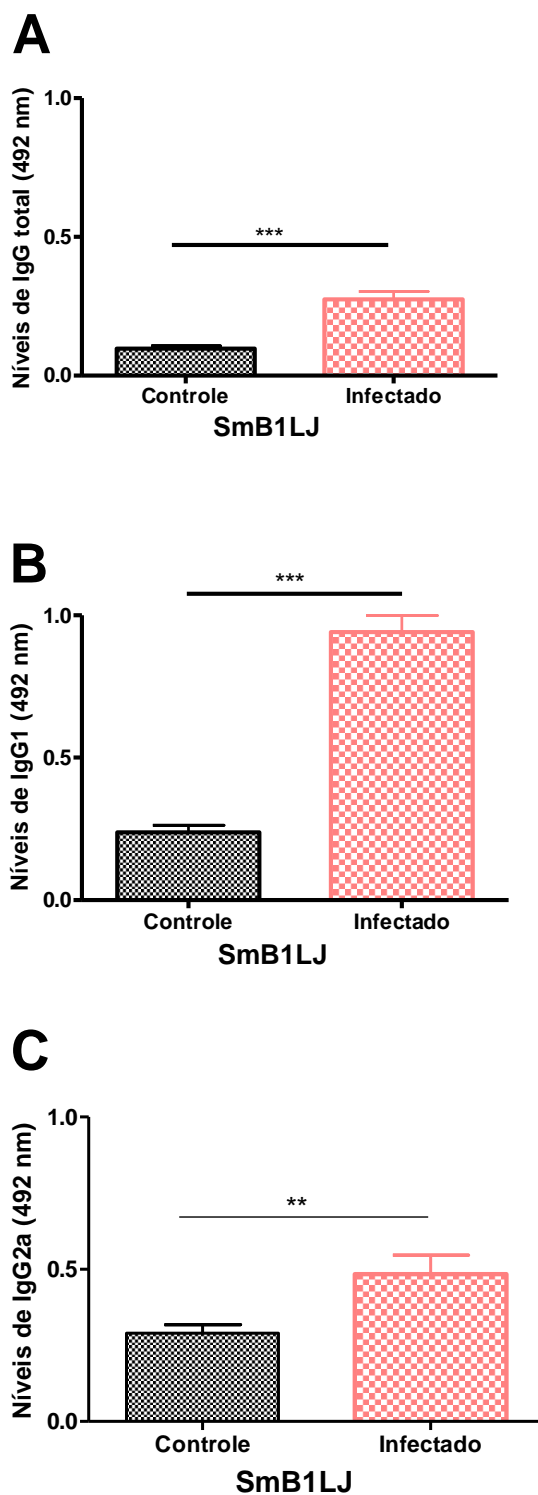


Figura 12. Reatividade dos anticorpos IgG (A), IgG1(B) e IgG2a (C) de camundongos Swiss (n=10/grupo) infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* ou de camundongos Swiss saudáveis (Controle) com o peptídeo SmB1LJ (10 µg/poço) como antígeno em ELISA. Amostras de plasma desses animais foram diluídas 1: 200.Os resultados estão expressos em densidade ótica.

** P< 0,01;***P< 0,001.

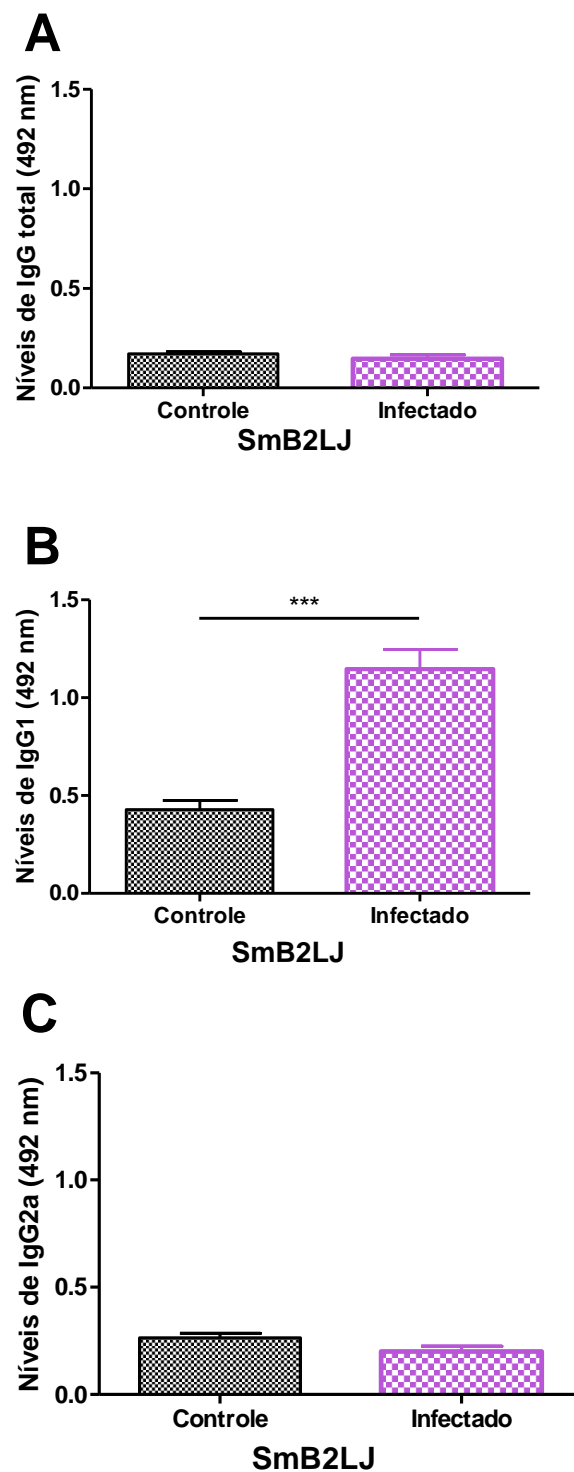


Figura 13. Reatividade dos anticorpos IgG(A), IgG1(B) e IgG2a (C) de camundongos Swiss (n=10 /grupo) infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* ou de camundongos Swiss saudáveis (Controle), usando o peptídeo SmB2LJ (10 µg/poço) como antígeno em ELISA. Amostras de

plasma desses animais foram diluídas 1: 200. Os resultados estão expressos em densidade ótica. Os resultados estão expressos em densidade ótica.***P<0,001.

4.6. REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SmB1LJ E SmB2LJ COM PLASMAS DE CAMUNDONGOS SWISS IMUNIZADOS COM APIRASE DE BATATA OU r-potDOMÍNIO B

Grupos de camundongos Swiss (n= 10 animais/grupo) foram imunizados com apirase de batata (10 µg) ou r-potDomínio B (10 µg). O r-potDomínio B é um polipeptídeo recombinante derivado do domínio B da apirase de batata, que possui alta identidade com os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ os quais são derivados do domínio B da ATPDase 2 de *S. mansoni*.

Quando o peptídeo SmB1LJ foi usado como antígeno em ELISA, o nível de reatividade de anticorpos IgG reativos (diluição 1: 200) (**Figura 14,A**) dos animais que receberam o inóculo da apirase de batata ($0,151 \pm 0,029$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o nível detectado para o grupo controle ($0,097 \pm 0,030$) e, também, significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao nível de reatividade com r-potDomínio B ($0,095 \pm 0,022$).

Já o nível de anticorpos IgG1 (**Figura 14,B**) reativos dos animais inoculados com a apirase de batata apresentou diferença estatística mais acentuada ($p < 0,01$), sendo quase duas vezes mais reativo ($0,569 \pm 0,529$) que o seu controle ($0,190 \pm 0,035$). O nível de anticorpos IgG1 de camundongos imunizados com r-potDomínio B foi similar aos controles (Figura 15, B). Os níveis de anticorpos IgG2a reativos (**Figura 14, C**) com o peptídeo SmB1LJ foram similares ao controle.

Quando o SmB2LJ foi usado como antígeno, a reatividade de anticorpos IgG e seus subtipos IgG1 e IgG2a com este peptídeo não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles (**Figura 15, A, B e C**).

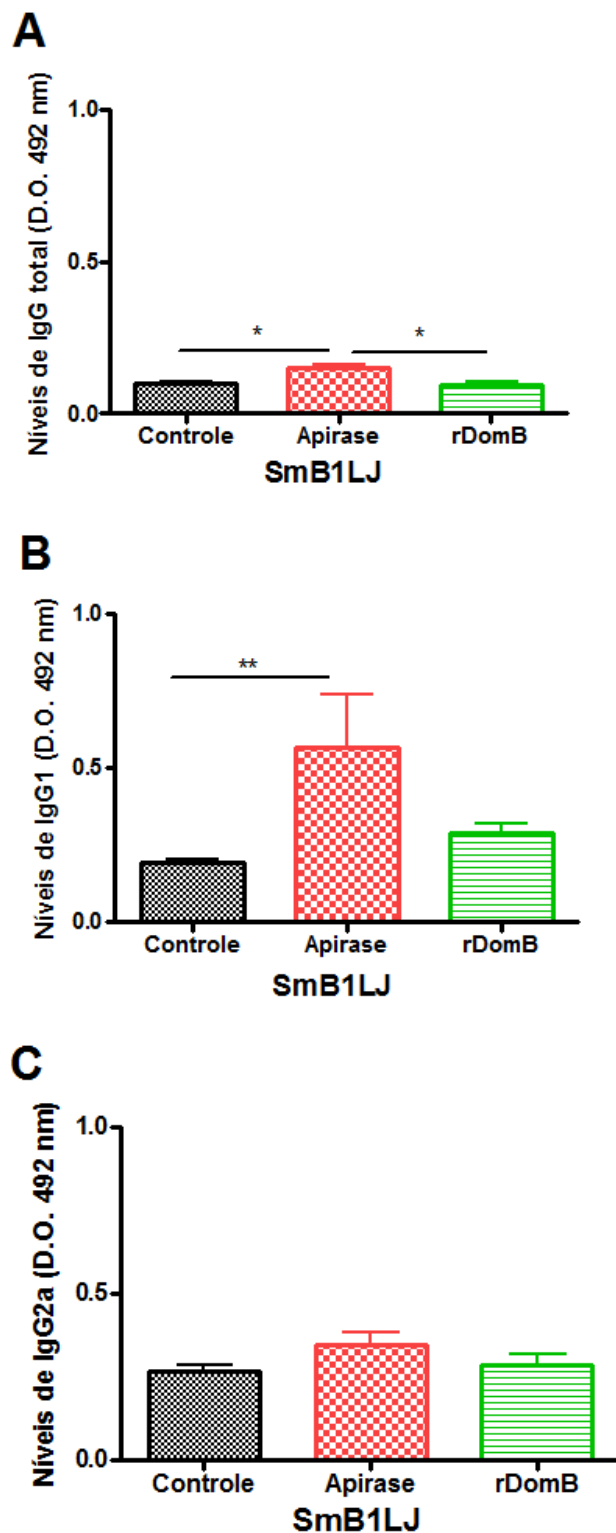


Figura 14. Reatividade do peptídeo SmB1LJ (10 µg/poço) com anticorpos IgG(A), IgG1(B) e IgG2a (C) de camundongos Swiss (n=10 /grupo) pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio Bou sem qualquer inóculo (Controle) em ELISA. As amostras de plasma desses animais foram diluídas 1: 200. Os resultados estão expressos em densidade ótica. *P< 0,05; **P< 0,01.

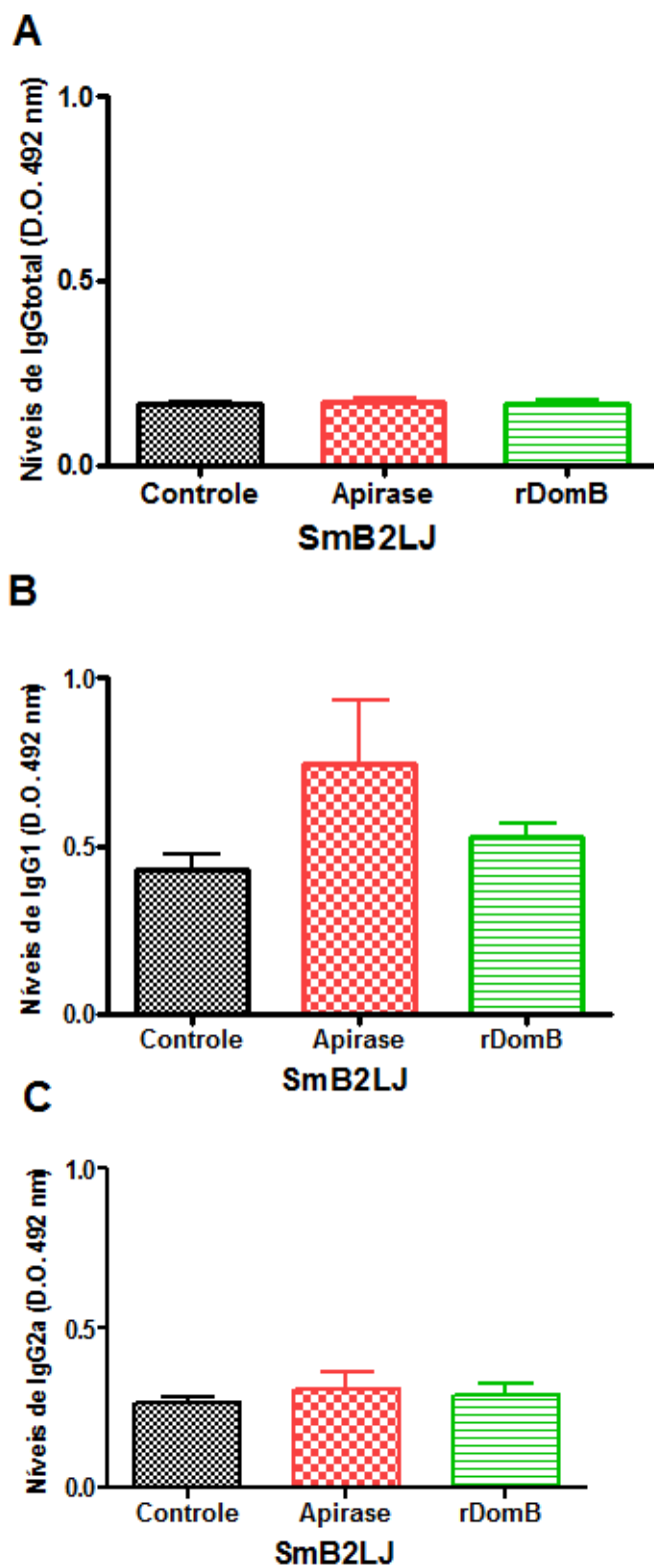


Figura 15. Reatividade do peptídeo SmB2LJ (10 µg/poço) com anticorpos IgG (A), IgG1(B) e IgG2a (C) de camundongos Swiss (n=10/grupo) pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B (rDomB) ou sem qualquer inóculo (Controle) em

ELISA. As amostras de plasma desses animais foram diluídas 1: 200. Os resultados estão expressos em densidade ótica.

Em relação à taxa de IgG1/IgG2a para o peptídeo SmB1LJ (**Tabela 1 A**) dos animais imunizados com a apirase de batata foi maior (1,64) que o grupo controle (0,71), o mesmo se ocorreu com os animais imunizados com o r-potDomínio B (1,00). A taxa IgG1/IgG2a para o SmB2LJ (**Tabela 1 B**) dos animais imunizados com a apirase (2,4) de batata e r-potDomínio B (1,80) foram maiores que o grupo controle (1,62), porém, em menor proporção do que o SmB1LJ.

Tabela 1 (A e B) - Taxa de reatividade IgG1/IgG2a de camundongos Swiss imunizados com a apirase de batata ou r-potDomínio B usando os peptídeos como antígenos.

A

Antígeno SmB1LJ/ Grupos	Após a imunização [#]			Taxa IgG1/IgG2a ^{##}
	IgG total	IgG1	IgG2a	
Controle	0,097 ± 0,030	0,190 ± 0,035	0,267 ± 0,052	0,71
Apirase	0,151 ± 0,029*	0,569 ± 0,529**	0,345 ± 0,121	1,64
rDomB	0,095 ± 0,022	0,287 ± 0,105	0,287 ± 0,089	1,00

B

Antígeno SmB2LJ/ Grupos	Após a imunização [#]			Taxa IgG1/IgG2a ^{##}
	IgG total	IgG1	IgG2a	
Controle	0,165 ± 0,024	0,428 ± 0,149	0,264 ± 0,061	1,62
Apirase	0,169 ± 0,035	0,744 ± 0,604	0,309 ± 0,162	2,40
rDomB	0,167 ± 0,036	0,526 ± 0,122	0,292 ± 0,101	1,80

Tabela 1 (A e B). Taxa de reatividade IgG1/IgG2a de camundongos Swiss (n=10/grupo) pré-imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B ou sem qualquer inóculo (Controle) usando os peptídeos SmB1LJ(**1A**) e SmB2LJ(**1B**) como antígenos em ELISA, sendo as amostras de plasma desses animais diluídas 1:200.[#] Os resultados estão expressos em densidade ótica. *P< 0,05; **P< 0,01. ^{##} Foi feito o cálculo da taxa de IgG1/IgG2a utilizando os valores da média bruta da reatividade dos peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ com os animais imunizados.

4.7. REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SmB1LJ E SmB2LJ COM PLASMA DE CAMUNDONGOS SWISS IMUNIZADOS E POSTERIORMENTE INFECTADOS COM *S. mansoni*

Quinze dias após o segundo inóculo de imunização com a apirase de batata ou o r-pot-Domínio B, todos os grupos foram submetidos ao desafio pela injeção intraperitoneal de 50 cercárias de *S. mansoni*. A infecção foi mantida por 60 dias. Ao fim deste período, os animais foram submetidos a uma nova coleta de sangue.

Amostras de plasma desses animais pré-imunizados com apirase de batata ou r-potDomínio B e infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* foram utilizadas para a avaliação do perfil de anticorpos reativos com os peptídeos SmB1LJ (10µg/poço) e SmB2LJ (10 µg/poço), usados como antígenos em ELISA.

Os níveis de anticorpos IgG, IgG1e IgG2a dos animais imunizados com a apirase de batata ou r-potDomB e posteriormente infectados reativos com os peptídeos SmB1LJ (**Figura 16**) e SmB2LJ (**Figura 17**) não foram significativos.

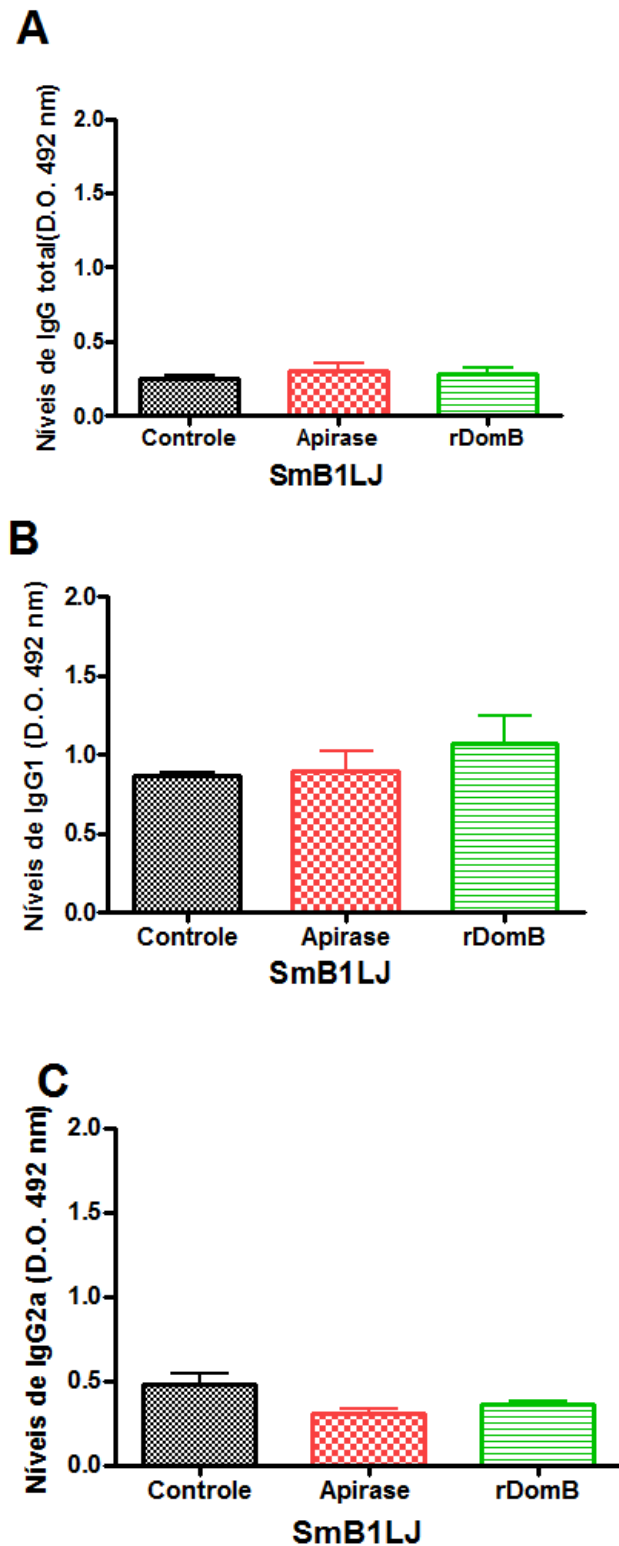


Figura 16. Reatividade dos anticorpos IgG (A), IgG1(B) e IgG2a (C) de camundongos Swiss (n=15/grupo) pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante rpotDomínio B (rDomB), ou sem qualquer inóculo (Controle) e após 15 dias infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*, usando o peptídeo SmB1LJ(10 µg/poço) como antígeno em ELISA. Foram usados plasmas diluídos 1: 200. Os resultados estão expressos em densidade ótica.

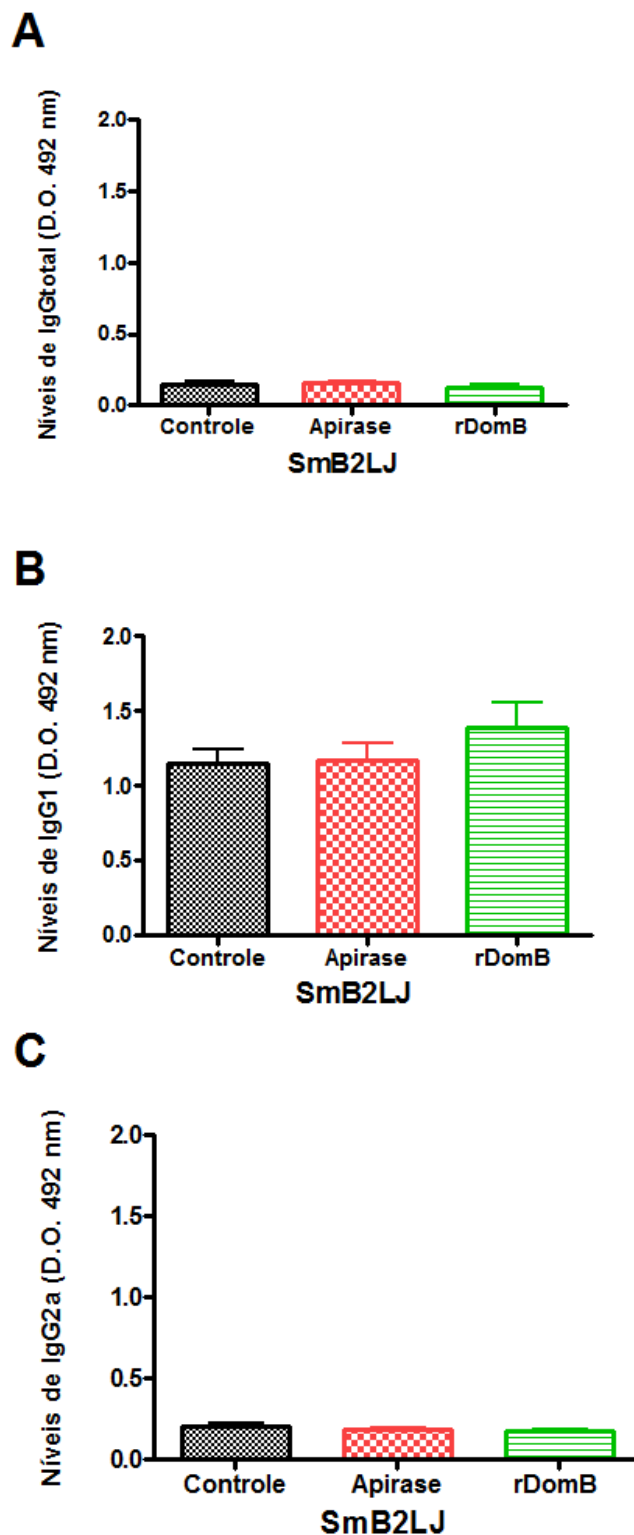


Figura 17. Reatividade do peptídeo SmB2LJ com os anticorpos IgG (A), IgG1(B) e IgG2a (C) de camundongos Swiss (n=10/grupo) pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B ou sem qualquer inóculo (Controle) e após 15 dias infectados com 50 cércárias de *S. mansoni*, usando o peptídeo SmB2LJ(10 µg/poço) como antígeno em

ELISA. Foram usados plasmas diluídos 1: 200. Os resultados estão expressos em densidade ótica.

Quando o peptídeo SmB1LJ (**A**) foi usado como antígeno, a taxa de reatividade IgG1/IgG2a dos animais imunizados com a apirase de batata (2,88) foi maior que a dos animais do grupo controle (1,78). Entretanto, essa relação IgG1/IgG2a dos animais imunizados com o r-potDomB (2,97) foi maior que a daqueles imunizados com a proteína vegetal. Para o peptídeo SmB2LJ (**B**), a taxa de reatividade IgG1/IgG2a dos animais imunizados com o r-potDomB (7,93) continuou maior que a da apirase (6,36) e maior que a do grupo controle (5,70). Além disso, todas as taxas IgG1/IgG2a foram mais altas para esse peptídeo em relação àquelas do SmB1LJ.

Tabela 2 (A e B) - Taxa de reatividade IgG1/IgG2a de camundongos Swiss imunizados com a apirase de batata ou r-potDomínio B e posteriormente infectados com *S. mansoni* usando os peptídeos como antígenos.

A

Antígeno SmB1LJ/ Grupos	Após a infecção [#]			Taxa IgG1/IgG2a ##
	IgG total	IgG1	IgG2a	
Controle	0, 251 ± 0, 051	0, 863 ± 0, 062	0, 484 ± 0, 198	1,78
Apirase	0, 302 ± 0, 145	0, 897 ± 0, 405	0, 311 ± 0, 078	2,88
rDomB	0, 285 ± 0, 116	1, 072 ± 0, 551	0, 360 ± 0, 079	2,97

B

Antígeno SmB2LJ/ Grupos	Após a infecção [#]			Taxa IgG1/IgG2a ##
	IgG total	IgG1	IgG2a	
Controle	0, 145 ± 0, 061	1, 147 ± 0, 316	0, 201 ± 0, 075	5,70
Apirase	0, 153 ± 0, 049	1, 169 ± 0, 515	0, 184 ± 0, 030	6,36
rDomB	0, 131 ± 0, 056	1, 389 ± 0, 369	0, 175 ± 0, 035	7,93

Tabela 2 (A e B). Taxa de reatividade IgG1/IgG2a de camundongos Swiss (n=15/grupo) pré- imunizados com a apirase de batata, com o peptídeo recombinante r-potDomínio B ou sem qualquer inóculo (Controle) usando os peptídeos SmB1LJ (**5A**) e SmB2LJ (**5B**) como antígenos em ELISA, sendo as amostras de plasma desses animais diluídas 1:200.[#] Os resultados estão expressos em densidade ótica. ## Foi feito o cálculo da taxa de IgG1/IgG2a, utilizando os valores da média bruta da reatividade dos peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ com os animais imunizados e infectados.

5. DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SmB1LJ E SmB2LJ COMO MOLÉCULAS PARA O ESTUDO DA ATPDase 2 de *S. mansoni* E IMUNOLocalização DESSA PROTEÍNA

Análises de bioinformática permitiram identificar e planejar os peptídeos SmB1LJ (r155-176, DDKFHHVQPGLSSYAEKPEEAA) e SmB2LJ (r175-194, AALSLTKLINIAETSLPVDV) derivados do domínio B conservado da proteína do parasito (SmATPDase 2) e o polipeptídeo recombinante r-potDomínio B (r77-118, EYFMATEPGLSSYAEKPKAAANSLEPLLDGAEGVVPQELQ) derivado da proteína vegetal (apirase de batata), os quais mantiveram os possíveis epítomos antigênicos previamente preditos (FARIA-PINTO et al., 2008b).

O alinhamento das sequências primárias da apirase de batata e da ATPDase 2 do parasito *S. mansoni* mostrou as regiões conservadas características da família das NTPDases (ACR; “apyrase conserved region”), além de outros domínios compartilhados entre estas duas proteínas (FARIA-PINTO et al., 2008b).

Nessa dissertação, os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ foram usados como antígenos em ELISA para verificar a produção de anticorpos específicos contra os mesmos. Quando inoculado em camundongos Balb/c sob o mesmo protocolo experimental de Faria-Pinto (2010 a), o peptídeo SmB1LJ induziu uma maior produção de anticorpos IgG1 do que a subclasse IgG2a. Já o peptídeo SmB2LJ foi mais imunoestimulatório, reagindo fortemente com a subclasse IgG1 e IgG2a, tendo com a última subclasse uma reatividade menor. Na dissertação de Mendes (2010), o inóculo desses peptídeos foi feito em camundongos Swiss, sendo que o peptídeo SmB1LJ mostrou fraca reatividade com seu respectivo anti-soro imune em “Dot blot” e nenhuma reatividade IgG1 e IgG2a por ELISA. Entretanto, o SmB2LJ foi altamente reativo com anticorpos IgG em “Dot blot” e com anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a em ELISA. Esses resultados mostram que a segunda região do domínio B (SmB2LJ) da SmATPDase 2 possui epítomos que são mais efetivos na estimulação da produção de anticorpos das subclasses citadas do que a região 1 (SmB1LJ).

Como o peptídeo SmB2LJ mostrou-se mais imunoestimulatório que o SmB1LJ induzindo a produção de altos níveis de anticorpos IgG, o soro obtido do inóculo desse peptídeo em camundongos Balb/c foi usado para imunolocalizar a ATP difosfohidrolase solúvel (ATPDase 2) no ovo de *S. mansoni*. Essa proteína foi detectada por anticorpos anti-SmB2LJ (dil.1:400) em ovos de *S. mansoni* obtidos do fígado de camundongos Swiss infectados. Através da microscopia confocal, material imunorreativo granular foi visível fora da casca do ovo, formando depósitos na área periovular central da reação granulomatosa e confirmando que a isoforma solúvel é secretada. A ATPDase 2 também foi detectada na superfície externa do miracídio, indicando a presença desta proteína associada à membrana e no envelope de Von Lichtenberg, região entre o miracídio e a casa do ovo. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Faria-Pinto et al., (2004), neste trabalho foi usado o soro imune anti-apirase de batata para a imunolocalização da proteína no ovo, confirmando sua localização e reafirmando a homologia existente entre a proteína vegetal e a do parasito.

Como foi mostrado nessa dissertação, anticorpos produzidos em camundongos Balb/c contra o peptídeo SmB2LJ inibiram cerca de 62,22% e 36,92% das atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente. Já os anticorpos anti-SmB1LJ inibiram em maior proporção a atividade ATPásica, mas não inibiram a atividade da enzima quando o substrato utilizado foi o ADP. Estes resultados sugerem que os resíduos de aminoácidos presentes nas duas porções do domínio B da ATPDase 2 do parasito podem ter papel importante na regulação diferencial da atividade fosfohidrolítica desta proteína, relacionada aos distintos substratos. Em 2010, Tan & cols. mostraram que anticorpos monoclonais produzidos contra domínios específicos da NTPase de *Toxoplasma gondii* foram capazes de inibir até 70% de sua atividade catalítica, e a transferência passiva destes anticorpos prolongou significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii*, reduzindo a replicação do parasito (Tan et al., 2010). Não foi possível detectar reatividade entre os anticorpos policlonais produzidos contra a apirase de batata (Faria-Pinto et al., 2006; 2008 a) ou contra o peptídeo SmB2LJ (Mendes et al., 2011) e as NTPDases de mamíferos, nos quais existem 8 isoformas já descritas. Estes dados permitem supor que existe um baixo risco de autoimunidade tornando

esses anticorpos ferramentas importantes no estudo dessas proteínas do parasito.

Os danos imunopatológicos da esquistossomose são causados pela inflamação granulomatosa em torno dos ovos (Asahi & Stadecker, 2003). O granuloma esquistossomótico é uma estrutura organóide, híbrida e dinâmica formada por componentes do hospedeiro e do ovo (Lenzi et al., 1998) onde vários antígenos contribuem para sensibilizar o hospedeiro na formação do granuloma. A ATP difosfohidrolase solúvel foi detectada no miracídio durante os estágios 5-7 do desenvolvimento embrionário do ovo de *S. mansoni*, nesse período é que ocorre a diferenciação de tecidos e órgãos e o embrião ocupa quase que inteiramente o volume da casca do ovo (Jurberg et al., 2009). Assim, os resultados obtidos até o momento são importantes como ponto de partida para estudos adicionais de imunohistoquímica utilizando anticorpos anti-SmB2LJ para avaliar o papel específico da ATPDase 2 no desenvolvimento embrionário do ovo de *S. mansoni*.

Nosso grupo também mostrou através do trabalho de Mendes (2010) que o peptídeo sintético SmB2LJ foi capaz de induzir a produção de altos níveis de anticorpos IgG específicos e reativos contra preparações de antígenos solúveis do ovo (SEA) e antígenos solúveis do verme adulto (SWAP). Quando utilizados em Western blot, os anticorpos anti-SmB2LJ reconheceram bandas de aproximadamente 55 e 63 KDa, características das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* em preparações de SEA e SWAP. Resultado similar, em nosso laboratório, foi encontrado por Soares (2012), onde anticorpos policlonais de camundongos Balb/c anti-r-potDomínio B, domínio recombinante derivado da apirase de batata, reconheceram as mesmas bandas em “Western blot”.

Sob nossas condições experimentais, anticorpos policlonais de camundongos Balb/c anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ imobilizados em Proteína A Sepharose também imunoprecipitaram aproximadamente 96% e 41,89% da atividade ADPásica de uma preparação antigênica de vermes adultos de *S. mansoni*, respectivamente. “Western blots” dos complexos resina-anticorpo-antígeno imunoprecipitados permitiram o reconhecimento de 2 bandas de 63 e 55 kDa, as quais foram reconhecidas por anticorpos policlonais de coelho anti-apirase de batata. Porém, o soro contendo anticorpos anti-SmB1LJ reconheceu

mais fracamente a banda de 55 kDa, a qual corresponde à isoforma da SmATPDase 2 que possui essa massa molecular após sofrer processamento pós traducional, reforçando o que também foi proposto por Levano-Garcia & cols. (2007) sobre a SmATPDase 2. Esses resultados mostram o potencial dos anticorpos anti-peptídeos sobre a ATPDase 2 do parasito, presente nestas preparações e reforça os resultados encontrados anteriormente por nosso grupo.

É interessante observar que, além das duas bandas citadas, os anticorpos anti-peptídeos reconheceram uma banda de aproximadamente 76 kDa. Como já mencionado, em *S. mansoni* já foram caracterizadas até o momento, duas isoformas de ATPDases. Dessa forma, propomos que essa banda de 76 kDa, resultante dos complexos resina-anticorpo-antígeno imunoprecipitados pelos anticorpos anti-peptídeos e também reconhecida por anticorpos policlonais de coelho anti-apirase de batata, possa ser uma isoforma que sofreu alguma modificação pós-traducional (MPT), o que poderia explicar essa banda com tal massa molecular. No trabalho de Mendes (2010), anticorpos anti-SmB2LJ reconheceram em SWAP, que são os antígenos solúveis do verme adulto, somente as duas bandas de aproximadamente 63 e 55 KDa, referentes às isoformas já descritas. Entretanto, no presente trabalho, utilizamos nos ensaios de imunoprecipitação o homogeneizado total de vermes adultos, o qual é importante na identificação de proteínas em diferentes estágios de processamento, o que pode não ser observado por ferramentas de biologia molecular que identificam apenas o “cerne” das proteínas. Entretanto, o produto de um gene poder estar presente de várias formas diferentes e modificadas (Jensen, 2004). Além disso, existem cerca de 300 tipos diferentes de modificações pós-traducionais que já foram descritos até o momento (Kamath et al., 2011). A glicosilação, uma das modificações mais comuns, está envolvida em vários eventos celulares, tendo várias funções biológicas como antigenicidade de moléculas imunológicas; localização, direcionamento, meia-vida e dobramento das proteínas; interação célula-célula e estabilidade protéica (Blom et al., 2004). Porém, o aumento na massa molecular de uma proteína como encontrado nesse trabalho, pode ser estudado exatamente por espectrometria de massa da proteína intacta de forma a elucidar sua estrutura (Jensen, 2004).

5.2. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS COM SORO DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A APIRASE DE BATATA E anti-potDomínio B POSTERIORMENTE INFECTADOS COM *S. mansoni*

Em 2003, a equipe de De-Marco clonou o gene e expressou uma isoforma de ATP difosfohidrolase (SmATPDase 1) que estava presente em todas as fases do ciclo de vida do parasito. Em 2004, nosso grupo caracterizou a ATP difosfohidrolase em ovos de *S. mansoni* (Faria-Pinto et al., 2004). Durante esta caracterização, foi detectado que nesta fase do ciclo o parasito exibia as mesmas 2 isoformas desta proteína já descritas para vermes adultos (Vasconcelos et al., 1993), sendo encontrada em várias regiões do ovo e, em especial, no envelope de Von Lichtenberg, característico por conter proteínas possivelmente secretadas. Posteriormente, Levano-Garcia e colaboradores (2007) mostraram que havia um segundo gene em *S. mansoni* que caracterizava uma segunda isoforma de ATP difosfohidrolase, denominada de ATPDase 2, sugerindo ainda que esta proteína é secretada por vermes adultos e ovos em desenvolvimento, concluindo o fato observado por Vasconcelos e colaboradores desde 1993, onde afirmaram que neste parasito estavam presentes duas isoformas de ATP difosfohidrolase.

Esta segunda isoforma, que é solúvel, exhibe maior homologia/similaridade com a apirase de batata, homologia tanto na sequência linear quanto na estrutura tridimensional (Faria-Pinto et al. 2008b; Vasconcelos et al., 2009). Esta semelhança predita por análises *in silico* revelaram que além das regiões conservadas que são características da família das NTPDases, existia um domínio conservado entre parasitos e apirase de batata, que poderia estar envolvido nas imunorreatividades até então observadas. Como as enzimas ATP difosfohidrolases foram caracterizadas como proteínas antigênicas, este domínio foi predito como uma região potencialmente envolvida na resposta imunológica destes parasitos (Faria-Pinto et al., 2008b). A conservação desse Domínio B, o qual não inclui as ACRs descritas como envolvidas no ciclo catalítico da SmATPDase 2, associada à sua antigenicidade o torna um possível alvo de drogas, uma vez que confirmamos neste trabalho a

capacidade de inibição da atividade ATP difosfohidrolásica por anticorpos anti-peptídeos, os quais são derivados do Domínio B.

Como as proteínas SmATPDase 1 e SmATPDase 2 são encontradas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito *S. mansoni* (De Marco et al., 2003; Faria-Pinto et al. 2004; Levano-Garcia et al., 2007; Vasconcelos et al., 1996) podemos inferir que estas sejam vitais para a sobrevivência do helminto. A atividade catalítica desta enzima pode estar envolvida em vários processos fisiológicos deste parasito. Sua atividade ADPásica pode estar envolvida na inibição da agregação plaquetária ao redor dos vermes adultos, uma vez que o ADP é um agente agregante de plaquetas que atua sob três receptores diferentes (Daniel et al. 1997; Vasconcelos et al., 1993).

Conforme mostrado em um trabalho anterior (Faria-Pinto et al., 2010a), o inóculo de apirase de batata (10 µg), emulsificada em adjuvantes Completo e Incompleto de Freund, em camundongos Balb/c saudáveis possui propriedades imunestimulatórias, induzindo a produção de altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a. Estes anticorpos foram reativos com a preparação de antígenos solúveis de ovos (SEA) de *S. mansoni*, sugerindo o reconhecimento de isoformas de ATP difosfohidrolase (ATPDase) nesta preparação e que os epítomos compartilhados entre as proteínas do vegetal e do parasito contribuem estimulando resposta imune dos tipos Th1 e Th2 durante a esquistossomose (Faria-Pinto et al., 2010b).

Os peptídeos foram usados como antígenos em técnica de ELISA para verificar a reatividade dessas moléculas com anticorpos IgG obtidos das amostras de plasma de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni*. O peptídeo SmB1LJ teve reatividade em níveis significativamente elevados de IgG, IgG1 e IgG2a com as amostras dos camundongos infectados. Já o peptídeo SmB2LJ teve reatividade significativa apenas com os anticorpos da subclasse IgG1, subtipo relacionado à resposta Th2, a qual é característica da infecção esquistossomótica após a ovoposição por antígenos do ovo (Pearce & Macdonald, 2002). O subtipo IgG2a, derivado de resposta imune celular do tipo Th1, tem sido descrito como anticorpo funcional na resposta imune protetora contra esquistossômulos e vermes imaturos, possivelmente atuando no estímulo da fagocitose dependente de anticorpos e em mecanismos citotóxicos

em modelo murino (Mountford et al., 1994; James et al., 1998; Carvalho-Queiroz et al., 2004). Com base nesses resultados podemos supor que esses dois peptídeos derivados do Domínio B da ATPDase 2 de *S. mansoni* são regiões imunogênicas durante a infecção.

Em trabalho prévio, foi demonstrado que os epitopos compartilhados entre a apirase de batata e as isoformas de ATPDase de *S. mansoni* são capazes de estimular a produção de IgG1 e IgG2a durante a fase aguda, e a produção de IgG1 na fase crônica da esquistossomose experimental, sugerindo uma resposta celular mista dos tipos Th1 e Th2 no início da infecção, e o predomínio desta última à medida que a doença progride (Faria-Pinto et al., 2010a). O inóculo do r-potDomínio B (polipeptídeo recombinante desenhado através da sequencia da apirase de batata) em camundongos Balb/c, mostrou que esse fragmento tem propriedades estimulatórias, induzindo a produção de altos níveis de IgG1 e IgG2a (Maia, 2010; Maia et al., 2011).

No trabalho de Soares (2012), a imunização dos camundongos Swiss com apirase de batata ou com o r-potDomínio B, emulsificados em adjuvantes de Freund Completo e Incompleto, e posterior desafio com cercárias de *S. mansoni*, não acarretou a redução do número de vermes ou na oviposição. Nesse mesmo trabalho, anticorpos IgG do soro de pacientes com esquistossomose tiveram reatividade significativa com o r-potDomínio B.

Com o objetivo de investigar os fragmentos menores (SmB1LJ e SmB2LJ) dentro do Domínio B da proteína (SmATPDase 2) do parasito, que é homólogo ao da proteína vegetal, testamos esses fragmentos com soros de animais imunizados com a proteína vegetal e com o r-potDomínio B e desafiados pela infecção por *S. mansoni*. A primeira região (SmB1LJ) do DomB da SmATPDase 2 de *S. mansoni* apresentou reatividade significativa com anticorpos IgG anti-apirase de batata e com maior significância quando comparada com a reatividade dos anticorpos anti-r-potDomínio B. Anticorpos da subclasse IgG1 produzidos contra a proteína vegetal reagiram de forma ainda mais significativa com o SmB1LJ. Diferentemente, a região 2 (SmB2LJ) do Domínio B da SmATPDase 2 de *S. mansoni* não apresentou reatividade significativa com anticorpos produzidos contra a proteína vegetal e contra o seu domínio r-potDomínio B que é homólogo ao Domínio B da proteína do parasito.

Esses resultados nos levam a supor que possivelmente, o SmB1LJ embora não seja mais imunoestimulatório que o SmB2LJ, também possui reatividade cruzada com as moléculas citadas, sugerindo que estas regiões tem epítomos compartilhados com a proteína vegetal e a do parasito, importantes na imunomodulação da esquistossomose.

Após a infecção por *S. mansoni* dos animais imunizados com a apirase de batata ou r-potDomínio B, não houve reatividade significativa dos peptídeos com soros desses animais. Entretanto, analisando a taxa IgG1/IgG2a dos peptídeos com soro de animais imunizados com a apirase de batata ou r-potDomínio B, observamos que todas essas taxas foram maiores para o peptídeo SmB2LJ, mostrando os valores maiores para IgG1. Ambas as taxas de reatividade com os peptídeos foram maiores para as amostras dos animais imunizados com a apirase de batata. Após a infecção, as taxas de reatividade IgG1/IgG2a com soro desses animais imunizados e infectados revelam um aumento da reatividade destes peptídeos com as amostras dos animais imunizados com o peptídeo recombinante rpotDomínio B. Quando os animais imunizados são infectados, o SmB1LJ e o SmB2LJ (taxa mais elevada) apresentam uma relação IgG1/IgG2a maior com o r-potDomínio B, indicando que esse domínio pode ser o responsável por elevar a produção de anticorpos IgG1 contra a proteína do parasito uma vez que a progressão da esquistossomose ocorre com aumento significativo de anticorpos IgG1, marcados por uma resposta imune Th2 predominante.

Resultados mais recentes de nosso grupo, ainda não publicados, mostraram que camundongos Swiss imunizados com a apirase de batata tiveram uma taxa IgG1/IgG2a superior (1,29) em relação ao controle (0,82). Esta taxa foi maior do que a observada com a imunização dos animais utilizando o r-potDomínio B (0,86). Isso mostra que o conjunto de epítomos da proteína vegetal, em sua forma íntegra, tende a uma resposta Th2 em protocolos experimentais de imunização (Soares, 2012; Faria-Pinto et al., 2010a). Entretanto, a quantificação de citocinas será necessária para determinar os resultados observados até o presente trabalho em relação à esquistossomose e as ATPDases.

As ATP difosfohidrolases podem ser muito importantes para o parasito e também para o hospedeiro mamífero, que possui 8 isoformas desta

enzima. Sua função em *S. mansoni* ainda não está descrita, não existem dados sobre os mecanismos fisiológicos do parasito em que está envolvida. No entanto, sua antigenicidade está comprovada, assim como sua imunogenicidade durante a progressão da doença (Faria-Pinto et al., 2010b). O domínio B é uma região conservada e também antigênica (Maia et al., 2011). Sua região homóloga, presente na isoforma SmATPDase 2 também possui o mesmo comportamento antigênico e imunogênico como mostrado nesta dissertação. Esses resultados podem apontar que o Domínio B da ATP difosfohidrolase do parasito seja um fragmento importante na relação do parasito-hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

1. Os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ mostraram ter propriedade imunoestimulatória, induzindo a produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a em modelo murino.
2. Os soros policlonais anti-SmB1LJ e anti-SmB2LJ foram usados em “Western blot” para a identificação da ATPDase 2 (isoforma solúvel da ATP difosfohidrolase) de *S. mansoni* em homogeneizado total de vermes adultos confirmando a sensibilidade e afinidade destes anticorpos para os epitopos antigênicos desta proteína do parasito.
3. O soro policlonal anti-SmB2LJ localizou a ATPDase 2 de *S. mansoni* em cortes de fígado de camundongos infectados por *S. mansoni*, com reações positivas na superfície externa do miracídio, no envelope de Von Lichtenberg's e fora da casca do ovo, confirmando mais uma vez que a ATPDase 2 (isoforma solúvel da ATP difosfohidrolase) do parasito é secretada.
4. Os anticorpos anti-SmB2LJ foram capazes de inibir *in vitro* aproximadamente 62,22% da atividade ATPásica e os anticorpos anti-SmB1LJ inibiram cerca de 92,30% da atividade ADPásica da preparação antigênica de vermes adultos de *S. mansoni*, sugerindo que os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ derivados do Domínio B da ATPDase 2 podem ser moléculas importantes na elaboração de inibidores dessa enzima.

7. PERSPECTIVAS

A família de proteínas ATP difosfohidrolases não possui inibidores específicos clássicos de ATPases (Plesner, 1995). Conforme foi mostrado neste trabalho, anticorpos anti-peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ inibiram a atividade ATP difosfohidrolásica de vermes adultos de *S. mansoni* corroborando resultados obtidos por nosso grupo até o presente trabalho com *S. mansoni* e *Leishmania sp* em ensaios de inibição enzimática utilizando anticorpos contra a proteína vegetal, anti-peptídeos e anti-r-potDomínio B (Maia, 2013; Porcino, 2012; Soares, 2010). Uma vez que essas enzimas são ubíquas a vários organismos sob diferentes isoformas, a utilização de ferramentas que atuem funcionalmente na inibição dessas proteínas, como os anticorpos anti-apirase ou anticorpos contra domínios dessas enzimas, podem ser muito úteis no estudo das ATP difosfohidrolases.

Estudos conduzidos por nosso grupo mostraram a presença de duas isoformas ATPDases em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos et al., 1993) e em ovos (Faria-Pinto et al., 2004). Também foi mostrado por Levano-Garcia e cols. (2007) que as duas isoformas, SmATPDase 1 e SmATPDase 2, estão presentes em todas as fases do ciclo de vida desse helminto. Esses dados sugerem a importância dessas proteínas para *S. mansoni*. Assim, buscando estudar regiões menores na sequência de aminoácidos dessa proteína visando alcançar epítomos envolvidos na relação parasito-hospedeiro, nosso grupo tem estudado peptídeos sintéticos obtidos a partir da descoberta do domínio B conservado e compartilhado na proteína vegetal (apirase de batata) e nas isoformas de *S. mansoni* (Mendes et al., 2011), além de outros parasitos como *Leishmania sp* (Maia et al., 2013; Porcino et al., 2012).

Nos ensaios experimentais realizados por Soares (2012) para verificar a atuação dessas moléculas na esquistossomose mansoni, a imunização dos camundongos Swiss com apirase de batata ou com o r-potDomínio B, emulsificados em adjuvantes de Freund Completo e Incompleto, e posterior desafio com cercárias de *S. mansoni*, não acarretou a redução do número de

vermes ou na oviposição. Porém, houve uma redução percentual na área do granuloma nos animais do grupo imunizado com a apirase de batata.

Mendes (2010) observou que os peptídeos que os peptídeos SmB1LJ e SmB2LJ derivados do Domínio B da SmATPDase 2 foram reconhecidos de forma considerável por anticorpos IgG1 e IgG4 de pacientes com esquistossomose, sendo a reatividade maior para o peptídeo SmB1LJ. Nessa dissertação, os peptídeos mostraram ter propriedade imunoestimulatória, induzindo a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a quando inoculados em camundongos Balb/c, também reconheceram as duas isoformas das ATPD difosfohidrolases em vermes adultos de *S. mansoni*. Além disso, o peptídeo SmB1LJ reagiu de forma significativa com anticorpos IgG e subclasses IgG1 e IgG2a de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* e os anticorpos anti-SmB2LJ localizaram a SmATPDase 2 em ovos do parasito. Esses resultados são promissores no estudo das ATP difosfohidrolases do parasito e mostram também que esses peptídeos sintéticos, associados ou não, podem ser utilizados em futuros ensaios de proteção da esquistossomose mansoni.

8. REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; EL SAHN, A.; HASSAN, A. 2009. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. **Parasitology Resources** **104**: 955–965.

ABOUEL-NOUR, M.F.; LOTFY, M.; ATTALLAH, A.M.; DOUGHTY, B.L. 2006. *S. mansoni* major egg antigen Smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **101(4)**: 365-372.

BEAUDOIN, A. R.; SEVIGNY, J.; RICHER, M. ATP diphosphohydrolases, apirases, and nucleotide phosphohydrolases: biochemical properties and functions. **Biomembranes** **5**, 369-401.

AL-SHERBINY, M.; OSMAN, A.; BARAKAT, R.; EL MORSHEDY, H.; BERGQUIST, R.; OLDS, R. 2003. In vitro cellular and humoral responses to *S. mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Tropica**, **88**: 117-130.

ANICH, M.; FANTA, N.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1990. Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, **29**: 1411-1415.

ASAHI, H. & STADECKER, M. 2003. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. **Parasitology International** **52**: 361–367.

ASLAM, A.; QUINN, P.; McINTOSH, S.; SHI, J.; GHUMRA, A.; McKERROW, J.H.; BUNSTING, K.A.; DUNNE, D.W.; DOENHOFF, M.J.; MORRISON, S.L.; ZHANG, K.; PLEASS, R.J. 2007. Proteases from *S. mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions. **Molecular Immunology** **45**: 567–574

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, C.S. 2006. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, **36**: 217–222.

BEAUDOIN, A.R.; SÉVIGNY, J.S.; RICHER, M. ATP-Diphosphohydrolases, apirases, and nucleotide phosphohydrolases: biochemical properties and functions. 1996. **Biomembranes**, **5**: 369-401.

BERGQUIST, N.R.; COLLEY, D.G. 1998. Schistosomiasis Vaccines: Research to Development. **Parasitology Today**, **14 (3)**: 99-104.

BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; SHU-HUA, X.; WEISS, N.A.; TANNER, M. 2004. Triggering of high-level resistance against *S. mansoni* reinfection by artemether in the mouse model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **71(6)**: 774–777.

BERGQUIST, R.; McMANUS, D. Strategy for the Development of a Vaccine against Schistosomiasis. www.rnas.org.cn/.../2008-9-25161018-Strategy. Acesso em: 04 de abril de 2012.

BERMUDES, D.; PECK, K.R.; AFIFI, M.A.; BECKERS, C.J.; JOINER, K.A. 1994. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of biological chemistry**, **269 (46)**: 29252-29260.

BHARDWAJ, R. & SKELLY, P. 2009. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?. **Trends in Parasitology**, **25(6)**: 256-260.

BINA, J.C. & PRATA, A. 2003. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *S. mansoni* e formas graves. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (2)**: 211-216.

BLOM, N.; PONTÉN, T. S.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. 2004. **Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence**. **Proteomics**, **4**:1633–1649.

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

BRINDLEY, P.J.; KALINNA, B.H.; DALTON, J.P.; DAY, S.R.; WONG, J.Y.M.; MARK, L.; SMYTHE, M.L.; McMANUS, D.P. 1997. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **89**:1–9.

BRITO, C.F.A.; CALDAS, I.R.; COURA FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S.C. 2000. CD4T Cells of Schistosomiasis Naturally Resistant Individuals Living in an Endemic Area Produce Interferon- γ and Tumour Necrosis Factor- α in Response to The Recombinant 14KDa *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein. **Scand. J. Immunol.** **51**: 595-601.

BROUWERS, J. F. H. M.; VERSLUIS, C.; GOLDE, L.M.G.V.; TIELENS, A.G.M. 1998. 5-Octadecenoic acid: evidence for a novel type of fatty acid modification in schistosomes. **Biochemical Journal**, **334**: 315-319.

BRUUN, B.; AAGAARD, -HANSEN, J. 2008. The social context of schistosomiasis and its control. **World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical**. 227 p.

BUEDING, E. & FISHER, J. 1982. Metabolic requirements of schistosomes. **Journal of Parasitology**, **68**: 208–12.

BURKE, M.L.; JONES, M.K.; GOBERT, G.N.; LI, Y.S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D.P. 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **[Parasite Immunology](#)**, **31(4)**: 163-176.

CALDAS, I.R.; CAMPI-AZEVE D.O.A, A.C.; OLIVEIRA, L.F.A.; SILVEIRA, A.M.S.; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLIA,G. 2008. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, **108**: 109-117.

CAPRON, A.; RIVEAU, G.; CAPRON, M.; TROTTEIN, F. 2005. Schistosomes: the road from host–parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends in Parasitology**, **21(3)**: 143-149.

CARDIM, L.L.; BAVIA, M.E.; FERRAUDO, A.S.; CARNEIRO, D.D.M.T.; SILVA, M.M.N.; BRITO, V.S.; MARTINS, M.S.; DANTAS FILHO, A.M. 2008. Avaliação da Esquistossomose Mansônica mediante as Geotecnologias e Técnicas Multivariadas no Município de Jacobina, Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, **32(1)**: 29-42.

CARDOSO, F.C.; PACÍFICO, R.N.A.; MORTARA, R.A.; OLIVEIRA, S.C. 2006. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clinical and Experimental Immunology**, **144**: 382-391.

CARDOSO, F.C.; MACEDO, G.C.; GAVA, E; KITTEN, G. T.; MATI, V.L.; MELO, A.L.; CALIARI, M.V.; ALMEIDA, G.T.; VENANCIO, T.M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S.C. 2008. *S. mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. **Plos Neglected Diseases**, **2 (10)**: 1-10.

CARVALHO-QUEIROZ, C.; COOK, R.; WANG, C.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; BAILEY, N.A.; EGILMEZ, N.K.; MATHIOWITZ, E.; LoVerde, P.T. 2004. Cross-Reactivity of *Schistosoma mansoni* Cytosolic Superoxide Dismutase, a Protective Vaccine Candidate, with Host Superoxide Dismutase and Identification of Parasite-Specific B Epitopes. **Infection and immunity** **72(5)**: 2635–2647.

CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z. & LENZI, H.L. 2008. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose, uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 1124 p.

DA'DARA, A.A.; SKELLY, P.J.; WALKER, C.M.; HARN, D.A. 2003. A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *S. mansoni* infection. **Parasite Immunology**, **25**: 429–437.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L.2000. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, **77**: 41–51.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. 1995. Antischistosomal drugs: past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, **68 (1)**: 35-85.

COIMBRA, E.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; CORTE-REAL, S.; FREITAS, F.G.R.; DURÃO, A.; SOUZA, C.S.F.; SILVA SANTOS, M.I.; VASCONCELOS, E.G. 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigote. **Parasitology**, **124**: 137-143.

COIMBRA, E.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; COSTA, B.L.S.; GIAROLA, N.L.L.; REZENDE-SOARES, F.A.; FESSEL, M.R.; FERREIRA, A.P.; SOUZA, C.S.F.; ABREU-SILVA, A.L.; VASCONCELOS, E.G. 2008. [A *Leishmania \(L.\) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression.](#) **Parasitology**, **135 (3)**: 327-35.

COLLEY, D.G.; COOK, J.A.; FREEMAN, G.L.; BARTHOLOMEW, R.K.; JORDAN, P. 1977. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I. In vitro lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, **53**: 420-443.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CALDAS, I.R.; GAZZINELLI, G. 2000. Natural versus Drug-induced Resistance in *S. mansoni* Infection. **Parasitology Today**, **16**: 397-399.

COURA, J.R. & AMARAL, R.S. 2004. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99 (I)**: 13-19.

CUNHA-NETO, E.; OLIVEIRA, S.C. 2008. Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *S. mansoni* infection in mice. **Acta Tropica**, **106**: 162-167.

DANIEL, J.L.; DANGELMAIER, C.; JIN, J.; ASHBY, B.; SMITH, J. B.; KUNAPULI, S.P. 1997. Molecular Basis for ADP-induced Platelet Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, **273 (4)**: 2024–2029.

DE MARCO, R.; KOWALTOWSKI, A.T.; MORTARA, R.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2003. Molecular characterization and immuno-localization of *S. mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307**: 831-838.

DEMEURE, C.E.; RIHET, P.; OUATTARA, L.A.; BOURGOIS, A.; DESSEIN, A.J. Resistance to *S. mansoni* in Humans: Influence of the IgE IgG4 Balance and IgG2 in Immunity to Reinfection after Chemotherapy. **The Journal of Infectious Diseases**, **168**: 1000-1008.

DUTRA, W.O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DUNNE, D.; CECCHINI, L.F.; FRAGA, L.; ROBERT, M.; SOARES-SILVEIRA, A. M.; WEBSTER, M.; YSSEL, H.; GOLLOB, K.J. 2002. Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE-producer schistosomiasis patients. **BMC Immunology**, **3**:1-8.

ESMAT, G. 2009. Antischistosomal therapy: Current status and recent developments. **Arab Journal of Gastroenterology** **10**: 1–3.

FAGHIRI, Z.; CAMARGO, S.M.R.; HUGGEL, K.; FORSTER, I.C.; NDEGWA, D.; VERREY, F.; SKELLI, P.J. 2010. The Tegument of the Human Parasitic Worm *S. mansoni* as an Excretory Organ: The Surface Aquaporin SmAQP Is a Lactate Transporter. **PLoS ONE** **5** (5): 10451.

FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; SMITH, P.; DUNNE, D. W. 2000. Elevated type 1, diminished type 2 cytokines and impaired antibody response are associated with hepatotoxicity and mortalities during *S. mansoni* infection of CD4-depleted mice. **European Journal of Immunology**, **30**:470-480.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.L.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2004. ATP diphosphohydrolase from *S. mansoni* egg: characterization of a new antigen. **Parasitology**, **129**:51-57.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.L.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101** (1): 359-364.

FARIA-PINTO, P. **Mapeamento dos domínios antigênicos compartilhados entre a apirase de batata e a ATP difosfohidrolase de *S. mansoni***. 2008 a. 126f. (Tese Doutorado em Ciências da Saúde)-Centro de Pesquisa René Rachou-CPqRR, da Fundação Oswaldo Cruz, belo Horizonte.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES F.A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. Â.; MARQUES, M.J.; ROCHA, M.O.C.; GOMES, J. A. S.; ENK, M.J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M. Z. ; NETO S.M.; FRANCO O.L.; VASCONCELOS, E. G. 2008b. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, **135**: 943-953.

FARIA-PINTO, P.; MONTESANO, M.A.; JACINTO, A.A.; SANTOS, R.S.; BORDIN, F.H S.; FERREIRA, A.P.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M. Z.; VASCONCELOS, E.G. 2010a. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes whit *S. mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, *in press*, 105 (4).

FARIA-PINTO P.; MENDES, R.G.P.R.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A.C.R.G.; OLIVEIRA, A.A.; COELHO, P. M. Z. ; VASCONCELOS, E. G. 2010b. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, *in press*, 105 (4).

FERRARI, T.C.A. & MOREIRA, P.R.R. 2011. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. **The Lancet Neurology** **10**: 853–64.

FENWICK, A. & WEBSTER, J.P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. 2006. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **19**: 577–582.

FIETTO, J.L.; DE MARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 2004. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, **316**: 454-460.

FONSECA C.T.; PACÍFICO L.G.G.; BARSANTE, M.M.; RASSI, T.; CASSALI, G.D.; OLIVEIRA, S.C. 2006. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa

S. mansoni fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. **Microbes and Infection**, **8**: 2509-2516.

GALVÃO, A.F.; FAVRE, T.C.; GUIMARÃES, J.P.S.; PEREIRA, A.P.B.; ZANI, L.C.; FELIPE, K.T.; DOMINGUES, A.L.C.; CARVALHO, O.S.; BARBOSA, C.S.; PIERI, O.S. 2010. Spatial distribution of *S. mansoni* infection before and after chemotherapy with two praziquantel doses in a community of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **105(4)**: 555-562.

GARCIA, T.C.M.; FONSECA, C.T.; PACIFICO, L.G.G.; DURAES, F.V.; MARINHO, F.A.V.; PENIDO, M.; CALIARI M.V.; MELO A.L.; PINTO, H.A.; BARSANTE, M.M.;

GOMES, E.C.S.; LEAL-NETO O.B.; ALBUQUERQUE, J.; SILVA, H.P.; BARBOSA, C.S. 2012. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco – Brazil. **International Journal of Health Geographics** **11**:51.

GRAY, D.; ROSS, A.G.; LI, Y-S.; McMANUS, D.P. 2011. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ** **342**: 2651.

GREENBERG, R.M. 2004. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **International Journal for Parasitology** **35**: 1–9.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. 2006. Human schistosomiasis. **Lancet**, **368 (9541)**: 1106-1118.

HAAS, W.; DIEKHOFF, D.; KOCH, K.; SCHMALFUSS, G.; LOY, C. 1997. S. MANSONI CERCARIAE: STIMULATION OF ACETABULAR GLAND SECRETION IS ADAPTED TO THE CHEMICAL COMPOSITION OF MAMMALIAN SKIN. **Journal of Parasitology**, **83(6)**: 1079-1085.

HAMMERICH, L.; HEYMANN, F.; TACKE, F. 2010. Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases. **Clinical and Developmental Immunology** **2011**: 1-12.

HAN, Z-G.; BRINDLEY, P.J.; WANG, S-Y.; CHEN, Z. 2009. Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. **Annual Review Genomics and Human Genetics**, **10**: 211-40.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. 1996. Purification and cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). **Biochemical Biophysical Research Communications**, **218**: 916-923.

HANSELL, E.; BRASCHI, S.; MEDZIHRADESKY, K.F.; SAJID, M.; DEBNATH, M.; JESSICA, I.; LIM, K. C.; MCKERROW, J. H. 2008. Proteomic Analysis of Skin Invasion by Blood Fluke Larvae. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **2(7)**: 262.

HELLEMOND, J.J.V.; RETRA, K.; BROUWERS, J.F.H.M.; BALKOM, B.W.M.V.; YAZDANBAKHSI, M.; SHOEMAKER, C.B.; TIELENS, A.G.M. 2006. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology** **36**: 691-699.

HARLOW, E.; LANE, D. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J. M.; DIEMERT, D. J.; PEARSON, M.; LOUKAS, A. 2009. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. **Nature** **8**: 814-826.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; LIANG-FANG, T.; DAY, T.A.; BENNETT, J.L. 1999. Resistance to praziquantel: direct evidence from *S. mansoni* isolated from Egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **60(6)**: 932-935.

JAMES, S.L.; CHEEVER, A.W.; CASPAR, P.; WYNN, T. A. 1998. Inducible Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice Develop Enhanced Type 1 Cytokine-Associated Cellular and Humoral Immune Responses after Vaccination with Attenuated *Schistosoma mansoni* Cercariae but Display Partially Reduced Resistance. **Infection and immunity**, **66(8)**: 3510-3518.

JENKINS, S.J.; HEWITSON, J.P.; JENKINS, G.R.; MOUNTFORD, A.P. 2007. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. **Parasite Immunology**, **27(10-11)**: 385-393.

JENSEN, O.N. 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, **8**:33–41.

JURBERG, A.D. 2006. **Ciclo Biológico de *S. mansoni* Sambon, 1907 (Digenea: Trematoda) e sua ontogenia: uma revisão**. Monografia apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – 62 páginas.

KACZMAREK, E; KATARZYNA, K; SÉVIGNY, J; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J; BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H.; ROBSON, S.C. 1996. Identification and Characterization of CD39/Vascular ATP Diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, **271**: 33116–33122.

KAMATH, K. S.; VASAVADA, M. S.; SRIVASTAVA, S. 2011. Proteomic databases and tools to decipher post-translational modifications. **Journal of proteomics**, **7** 5: 127-144.

KATZ, N. & PEIXOTO, S.V. 2000. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **33(3)**: 303-308.

KHALIFE, J.; CÊTRE, C.; PIERROT, C.; CAPRON, M. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. **Parasitology International** **49(2000)** 339-345.

KETTLUN, A.M.; URIBE, L.; CALVO, V.; SILVA, S.; RIVERA, J; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1982. Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, **21**: 551-558.

KETTLUN, A.M.; ESPINOSA, V.; GARCÍA, L.; VALENZUELA, M.A. 2005. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labelling, and proteolytic susceptibility. **Phytochemistry**, **66**: 975-982.

KNOWLES, A. 2011. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, **7**: 21–45.

KORKMAZ, B.; ATTUCCI, S.; JULIANO, M.A.; KALUPOV, T.; JOURDAN, M.L.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. 2008. Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates. **Nat Protoc** **3**: 991-1000.

KUSEL, J.R.; AL-ADHAMI, B.H.; DOENHOFF, M.J. 2007. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanisms of adaptation. **Parasitology**, **134 (11)**: 1477-526.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227(5259)**:680-685.

LAMBERTUCCI, J.R.; SERUFO, J.C.; Gerspacher-Lara, R.; RAYES, A. A.M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V.; ANTUNES, C.M.F. 2000. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica** **77 (2000)**: 101–109.

LAMBERTUCCI, J.R. 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **105(4)**: 422-435.

LECLERC, M.C.; GRONDIN, G.; GENDRON, F.P.; SÉVIGNY, J.; BEAUDOIN, A.R. 2000. Identification, Characterization, and Immunolocalization of a Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase in Pig Liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **377 (2)**: 372–378.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W.S.; PACHECO, R.G.; MARIANO, M.; LENZI, J. A. 1998. Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **93 (I)**:141-151.

LEVANO-GARCIA, J; MORTARA, R.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DE MARCO, R. 2007. Characterization of *S. mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **352**: 384-389.

LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M.S. Schistosome membrane proteins as vaccines. 2007. *International Journal for Parasitology*, **37**: 257–263.

LoVERDE, P.T.; OSMAN, A.; HINCK, A. 2007. *S. mansoni*: TGF- β signaling pathways. **Experimental Parasitology**, **117**: 304–317.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, **193**:265-275.

MAIA, A.C.R.G. 2010. **Identificação de um domínio conservado e antigênico de ATP difosfohidrolases de parasitos, também presente em uma isoforma ativa de Leishmania (Leishmania) chagasi**. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; GUSMÃO, M.A.N.; FESSEL, M.R.; MARQUES, J.M.; SOUZA, M.A.; COELHO, P.M.Z.; ESTANISLAU, J.A.S.G.; ROCHA, M.O.C.; SANTOS, M.O.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. 2011. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, **35**: 1057–1065.

MAIA, A.C.R.G.; PORCINO, G.N.; DETONI, M.L.; EMÍDIO, N.B.; MARCONATO, D.G.; FARIA-PINTO, P.; FESSEL, M.R.; REIS, A.B.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; MARQUES, M.J.; VASCONCELOS, E.G. 2012. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitology International**, **62**: 44–52.

McMANUS, D.P. & LOUKAS, A. 2008. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, **21(1)**: 225–242.

McKERROW, J.H. & SALTER, J. 2002. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends in Parasitology**, **18(5)**: 193-195.

MENDES, R.G.P. 2010. **Identificação de alvos antigênicos na ATP difosfohidrolase solúvel de *S. mansoni* e possível aplicação funcional de peptídeos sintéticos**. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 155p.

MENDES, R.G.P.R.; GUSMÃO, M.A.N.G.; MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L.†.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. 2011. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalisation of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106(7)**: 808-813.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2005. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª Ed., 295-306.

MOREIRA, L.S. A.; RÔMULO, D. P.V.; MELLO, R.T.; COELHO, P.M.Z.; NELSON, D. N. 2007. A study of the activity of 2-(alkylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acids against infection by *S. mansoni* in a murine model. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **101**: 385—390.

MOUNTFORD, A.P.; FISHER, A.; WILSON, R.A. 1994. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *S. mansoni*. **Parasite Immunology**, **16**: 521-527.

OLIVEIRA, F.A.; KUSEL, J.R.; RIBEIRO, F.; COELHO, P.M.Z. 2006. Responses of the surface membrane and excretory system of *S. mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology**, **132**: 321–330.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. 2002. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Immunology**, **2**: 499-511.

PEARCE, E.J. & FREITAS, T.C. 2008. Reverse genetics and the study of the immune response to schistosomes. **Parasite Immunology**, **30**: 215–221.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A.F. 1956. A perfusion technic for recovery of *S. mansoni* from experimentally infected guinea pigs. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais**, **8**: 589-597.

PENIDO, M.L.O.; RESENDE, D.M.; VIANELLO, M.A.; BORDIN, F.H.S.; JACINTO, A.A.; Dias, W.D; MONTESANO, M.Â.; NELSON, D.L.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2007. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *S. mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, **570**: 10-17.

PEREIRA, H.M.; OLIVA, G.; GARRAT, R.C.2010.Purine nucleoside phosphorylase from *S. mansoni* in complex with ribose-1-phosphate.**Journal of Synchrotron Radiation**, **18**: 62–65.

PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. **International Review of Cytology**, **158**: 141-214.

PURCELL, A.W.; McCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. 2007. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. **Nature**, **6**: 404-414.

RABELLO, A.1995. Acute human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **90(2)**: 277-280.

REIS, E.A.G.; CARMO, M. T. A.; ATHANAZIO, R.; REIS, M. G.; HARN Jr, D. A. 2008. *S. mansoni* Triose Phosphate Isomerase Peptide MAP4 is Able to Trigger Naïve Donor Immune Response Towards a Type-1 Cytokine Profile. Scandinavian **Journal of Immunology**, **68**: 169–176.

REZENDE-SOARES, F.A.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, M.J.; PORCINO, G.N.; GIAROLA, N.L.; COSTA, B.L.; TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA, M.A.; DINIZ, V.A.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, E.G. 2010. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, **137 (5)**: 773-83.

RIBEIRO, F.; MELLO, R.T.; TAVARES, C.A.P.; KUSEL, J.R.; COELHO, P.M.Z. 2004. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *S. mansoni* at different phases of infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **46 (4)**: 231-233.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ARAÚJO, I; BACELLAR, O; MAGALHÃES, A.; PEARCE, E.; HARN, D.; STRAND, M.; CARVALHO, E.M. 2000. Human Immune Responses to *S. mansoni* Vaccine Candidate Antigens. **Infection and Immunity**, **68 (5)**: 2797-2803.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L.C.C. 2006. Schistosomiasis- a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**, **99**: 505-521.

RIEWE, D.; GROSMAN, L.; FERNIE, A.R.; WUCKE, C.; GEIGENBERGER, P. 2008. The Potato-Specific Apyrase Is Apoplastically Localized and Has Influence on Gene Expression, Growth, and Development. **Plant Physiology**, **147**: 1092–1109.

ROBSON, S.C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, **2**: 409-30.

ROKNI, M.B.2012. SCHISTOSOMIASIS.Epidemiology of Schistosomiasis Mansoni in Brazil. **InTech**, 322p., 187.

ROSS, A.G.P.; BARTLEY, P.B.; SLEIGH, A.C.; OLDS, G.R.; LI, Y.; WILLIAMS, G.M.; McMANUS, D.P. 2002. Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, **346** (16): 1212-1220.

RUTITZKY, L. I.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J. 2001. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **98** (23): **13243–13248**.

RUTITZKY, L.I. & STADECKER, M.J. 2006. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **101**: 327-330.

RUTITZKY, L. I. & STADECKER, M. J. 2011.Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *S. mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . **European Journal of Immunology**, **41**: 2677–2687.

SATTELMACHER, B. 2000.The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, **149**: 167–192.

SCHALL, V.; MASSARA, C.L.; ENK, MARTIN, J.; BARROS, H.S.2007. Os caminhos da esquistossomose no meio ambiente. **Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou** (8): parte 2.

SCHRAMM, G.; HAAS, H. 2010.Th2 immune response against *S. mansoni* infection. **Microbes and Infection** **12**: 881-888.

SHUHUA, X.; TANNER, M.; N'GORAN, E.K.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; BERGQUIST, R.; MINGGANG, C.; JIANG, Z. 2002. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Tropica** **82**: 175–181.

SKELLY, P.J. & SHOEMAKER, C.B. 1996. Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter SGTP4 at the apical surface of intramammalian-stage *S. mansoni*. **Proceedings of the National Academy Sciences**, **93**: 3642-3646.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and the recovery of adult worms. **Parasitology**, **55**: 695-700.

SOARES, T.V. 2012. Aplicação da apirase de batata e de polipeptídeo recombinante derivado no estudo da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e da esquistossomose mansoni. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 76p.

STURROCK, R.F. 2001. Schistosomiasis Epidemiology and Control: How Did We Get Here and Where Should We Go? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 17-27.

TALLIMA, T.; EI RIDI, R. 2007. Praziquantel binds *S. mansoni* adult worm actin. **International Journal of Antimicrobial Agents** **29**: 570–575.

TAN, F.; HU, X.; PAN, C-W.; DING, J-Q.; CHEN, X-G. 2010. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, **59**: 141–146.

TAUSSKY, H.H.; SHORR, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, **202**: 675.

TENDLER, M. & SIMPSON, A. J.G. 2008. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica** **108**: 263–266.

TRAN, M.H.; PEARSON, M.S.; BETHONY, J.M.; SMYTH, D.J.; JONES, M.K.; DUKE, M.; DON, T.A.; McMANUS, D.P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LOUKAS, A. 2006. Tetraspanins on the surface of *S. mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nature Medicine**, **12(7)**: 835-840.

TRAVERSO-CORI, A., CHAIMOVICH, H.; CORI, O. 1965. Different molecular forms of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **137**: 133-142.

VASCONCELOS, E; NASCIMENTO, P.S.; MEIRELLES, M.N.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S.T. 1993. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *S. mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **58**: 205-214.

VASCONCELOS, E.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T.; DE SOUZA, W.; KETTLUN, A.M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP Diphosphohydrolase from *S. mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, **271**: 22139-22145.

VASCONCELOS, E.G.; FARIA-PINTO, P.; RESENDE-SOARES, F.A.; PENIDO, M.L.O.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; COELHO, P.M.Z. 2009. Potato Apyrase: a New Tool for Parasitic Disease Research. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, **3**: 80-88.

WALKER, A.J. 2011. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasites & Vectors** **2011**, **4**: 203.

WALTER, K.; FULFORD, A.J.C.; McBEATH, R.; JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KARIUKI, J.H.C.; MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; KABATEREINE, N.B.; VENNERVALD, B.J.; OUMA, J.H.; DUNNE, D.W. 2006. Increased Human IgE Induced by Killing *S. mansoni* In Vivo Is Associated with Pretreatment Th2 Cytokine Responsiveness to Worm Antigens. **The Journal of Immunology**, **177**: 5490-5498.

WILSON, M.S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. 2006. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**: **85**, 148–154.

WU, J.; STEINEBRUNNER, I.; SUN, Y.; BUTTERFIELD, T.; TORRES, J.; ARNOLD, D.; GONZALEZ, A.; JACOB, F.; REICHLER, S.; ROUX, S.J. 2007. Apyrases (Nucleoside Triphosphate-Diphosphohydrolases) Play a Key Role in Growth Control in Arabidopsis. **Plant Physiology**, **144**: 961-975.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunological Reviews** **201**: 156-167.

YANG, W.; JACKSON, D.C.; ZENGA, Q.; McMANUS, D.P. 2001. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine** **19**: 103-113.

ZHANG, W.; AHMAD, G.; TORBEN, W.; NOOR, Z.; LE, L.; DAMIAN, R.T.; WOLF, R.F.; WHITE, G.L.; CHAVEZ-SUAREZ, M.; PODESTA, R.B.; KENNEDY, R.C.; SIDDIQUI, A. 2010. Sm-p80 based DNA vaccine protects baboons against *S. mansoni* infection to comparable levels achieved by the irradiated cercarial vaccine. **Journal of Infectious Diseases**; **201(7)**: 1105–1112.

ZHAO, G-H.; LI, J.; BLAIR, D.; LI, X-Y.; ELSHEIKHA, H.M.; LIN, R-Q.; ZOU, F.C.; ZHU, X-Q. 2012. Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp. **Biotechnology Advances**, 1-9.

ZIMMERMANN, H. 2001. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research**, **52**: 44-56.

9. ANEXOS

A- Cartas de ética para pesquisa em animais

B-MENDES, R.G.P.R., GUSMÃO, M.A.N., MAIA, A.C.R.G., DETONI, M.L., PORCINO, G.N., SOARES, T.V., JULIANO, M.A., JULIANO, L., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L., FARIA-PINTO, P., VASCONCELOS, E.G. (2011). Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) of *Schistosoma mansoni* and immunolocalization of this protein in egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**

C- MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; SOARES, T.V.; GUSMÃO, M.A.N.; FESSEL, M.R.; MARQUES, M.J.; SOUZA, M.A.; COELHO, P.M.Z.; ESTANISLAU, J.A.S.; ROCHA, M.O.C.; SANTOS, M.O.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. (2011). Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology, In press. DOI: 10.1016/j.dci.2011.03.026**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

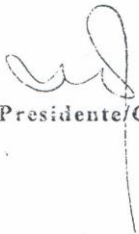
CERTIFICADO-

Certificamos que o Protocolo nº 017/2009 – CEEA sobre “Estudo do potencial imunomodulador da apirase de batata e do óleo de Candeia sobre a resposta inflamatória granulomatosa na esquistossomose mansoni experimental”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Priscila de Faria Pinto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/10/2009.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 017/2009 - CEEA about “Estudo do potencial imunomodulador da apirase de batata e do óleo de Candeia sobre a resposta inflamatória granulomatosa na esquistossomose mansoni experimental” – Priscila de Faria Pinto - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 06/10/2009.

Juiz de Fora, 06 de outubro de 2009


Presidente/CEEA


Secretário/CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
 Comissão de Ética na Experimentação Animal

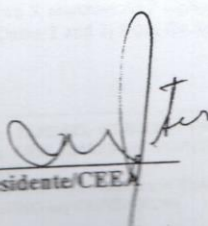
CERTIFICADO

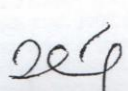
Certificamos que o Protocolo nº 011/2011 – CEEA sobre “ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA APIRASE DE BATATA OU SEUS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 01/03/2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 011/2011 - CEEA about “ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA APIRASE DE BATATA OU SEUS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL” – PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 01/03/2011.

Juiz de Fora, 02 de março de 2011.


 Presidente/CEEA


 Secretário/CEEA

